SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-095147- -00000-0000
Fecha: 2011-07-28 17:44:30 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 378
Act. 411 PRESENTACION Folios: 380

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PCT

"SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO"
INVENTARIO

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

11-95147

SOLICITUD DIVISIONAL

DE PATENTE DE

INVENCIÓN

TITULO: SISTEMAS BASADOS EN CONJUGADOS PARA ENTREGA FARMACOLÓGICA CONTROLADA.

SOLICITANTE: SMARTCELLS, INC

DIRECCIÓN: 100 Cummings Center, Suite 419e, Beverly, MA 01915.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ: 28 de julio de 2011

P2011/000143

P.D., Cr, Rez
28-08-2011
N. Ex

OLARTEMOI

OLARTE MOURE & ASOCIADO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-095147- -00000-0000

Fecha: 2011-07-28 17:44:30 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 378

Act. 411 PRESENTACION Folios: 380

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL **P2011/000143**

SOLICITUD DE:

(1) [X] Patente de Invención. [ ] Patente de Modelo de Utilidad.

[X] Capítulo I. [ ] Capítulo II.

(2) **SOLICITANTE (71)**	**Nombre:** SMARTCELLS, INC. **Dirección:** 100 Cummings Center, Suite 419e, Beverly, MA 01915. **Nacionalidad o Domicilio:** Estados Unidos **Lugar de Constitución:** Estado Unidos **Teléfono:** _____ **Fax:** _____ **E-mail:** _____	**IDENTIFICACIÓN** **C.C.** [ ] **NIT** [ ] **C.E.** [ ] **Otro** [ ] **Cual** _____ **Número** _____
REPRESENTANTE O APODERADO	**Nombre:** CARLOS R. OLARTE **Dirección:** Diagonal 34 No. 5-28 Bogotá **Teléfono:** 601-7700 **Fax:** 601-7799 **E-mail:** office@olartemoure.com	**IDENTIFICACIÓN** **C.C.** [x] **NIT** [ ] **C.E.** [ ] **Otro** [ ] **Cual** _____ **Número** 79.782.747 **TP** 74.295
INVENTOR (ES) (72)	**Nombre:** 1) Todd, C. ZION; 2) Thomas M. LANCASTER **Dirección:** 1) 45 Evans Road, Marblehead, MA 01945, Estados Unidos; 2) 65 Elm Street, Stoneham, MA 02180, Estados Unidos. **Nacionalidad o Domicilio:** 1) y 2) Estadounidenses.	

(5) **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/US2010/022268 Fecha Enero 27, 2010

Publicación Internacional No. WO 2010/088294 Fecha Agosto 5, 2010

(6) **Título (54)** **SISTEMAS BASADOS EN CONJUGADOS PARA ENTREGA FARMACOLÓGICA CONTROLADA.**

Clasificación Internacional (51) A01N 45/00.

Prioridad SI [X] NO [ ]	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	VER PAGINA ADJUNTA	VER PAGINA ADJUNTA	VER PAGINA ADJUNTA

(9) **Comprobante de pago No.** _____ **Fecha** Julio 2011

ANEXOS

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [ ] Poderes, si fuere el caso.
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones.
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [ ] Arte final 12 x 12.
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [x] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [x] Otros. Búsqueda Internacional

(11) **FIGURA CARACTERÍSTICA:**

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE PRIORIDADES

PCT/US2010/022268

Pais de Origen	Fecha	Numero de Solicitud
US	28 de Enero de 2009	61/147,878
US	12 de Marzo de 2009	61/159,643
US	20 de Marzo de 2009	61/162,107
US	25 de Marzo de 2009	61/163,084
US	24 de Junio de 2009	61/219,897
US	07 de Julio de 2009	61/223,572
US	19 de Octubre de 2009	61/252,857

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0072517

Bogotá D.C., Julio 28 de 2011 - 16:19:28

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	408382181	28/07/2011	4.695.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	571.000.00	571.000.00
				$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable _____
-**-
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-095147- -00000-0000
Fecha: 2011-07-28 17:44:30 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 378

Act. 411 PRESENTACION Folios: 380

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
5 August 2010 (05.08.2010)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2010/088294 A1

(51) International Patent Classification:
A01N 45/00 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2010/022268

(22) International Filing Date:
27 January 2010 (27.01.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

61/147,878	28 January 2009 (28.01.2009)	US
61/159,643	12 March 2009 (12.03.2009)	US
61/162,107	20 March 2009 (20.03.2009)	US
61/163,084	25 March 2009 (25.03.2009)	US
61/219,897	24 June 2009 (24.06.2009)	US
61/223,572	7 July 2009 (07.07.2009)	US
61/252,857	19 October 2009 (19.10.2009)	US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **SMARTCELLS, INC.** [US/US]; 100 Cummings Center, Suite 419c, Beverly, MA 01915 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **ZION, Todd, C.** [US/US]; 45 Evans Road, Marblehead, MA 01945 (US). **LANCASTER, Thomas, C.** [US/US]; 65 Elm Street, Stoneham, MA 02180 (US).

(74) Agent: **LYON, Charles, E.**; Choate, Hall & Stewart LLP, Two International Place, Boston, MA 02110 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

(54) Title: CONJUGATE BASED SYSTEMS FOR CONTROLLED DRUG DELIVERY

(57) Abstract: Conjugates which comprise a drug and a ligand which includes a first saccharide; wherein the conjugate is characterized in that, when the conjugate is administered to a mammal, at least one pharmacokinetic or pharmacodynamic property of the conjugate is sensitive to serum concentration of a second saccharide. Exemplary conjugates and sustained release formulations are provided in addition to methods of use and preparation.

WO 2010/088294 A1

CONJUGATE BASED SYSTEMS FOR CONTROLLED DRUG DELIVERY

RELATED APPLICATIONS

This application claims priority to U.S. Provisional Application No. 61/147,878 filed January 28, 2009, U.S. Provisional Application No. 61/159,643 filed March 12, 2009, U.S. Provisional Application No. 61/162,107 filed March 20, 2009, U.S. Provisional Application No. 61/163,084 filed March 25, 2009, U.S. Provisional Application No. 61/219,897 filed June 24, 2009, U.S. Provisional Application No. 61/223,572 filed July 7, 2009, and U.S. Provisional Application No. 61/252,857 filed October 19, 2009, the content of each of which is hereby incorporated by reference in its entirety.

BACKGROUND

The majority of "controlled-release" drug delivery systems known in the prior art (e.g., U.S. Patent No. 4,145,410 to Sears which describes drug release from capsules which are enzymatically labile) are incapable of providing drugs to a patient at intervals and concentrations which are in direct proportion to the amount of a molecular indicator (e.g., a metabolite) present in the human body. The drugs in these prior art systems are thus not literally "controlled," but simply provided in a slow release format which is independent of external or internal factors.

The treatment of diabetes mellitus with injectable insulin is a well-known and studied example where uncontrolled, slow release of insulin is undesirable. In fact, it is apparent that the simple replacement of the hormone is not sufficient to prevent the pathological sequelae associated with this disease. The development of these sequelae is believed to reflect an inability to provide exogenous insulin proportional to varying blood glucose concentrations experienced by the patient. To solve this problem several biological and bioengineering approaches to develop a more physiological insulin delivery system have been suggested (e.g., see U.S. Patent No. 4,348,387 to Brownlee et al.; U.S. Patent Nos. 5,830,506, 5,902,603, and 6,410,053 to Taylor et al. and U.S. Patent Application Publication No. 2004-0202719 to Zion et al.).

Each of these systems relies on the combination of a multivalent glucose binding molecule (e.g., the lectin Con A) and a sugar based component that is reversibly bound by the multivalent glucose binding molecule. Unfortunately, Con A and many of the other readily available lectins have the potential to stimulate lymphocyte proliferation. By binding to carbohydrate receptors on the surfaces of certain types of lymphocytes, these so-called "mitogenic" lectins can potentially induce the mitosis of lymphocytes and thereby cause them to proliferate. Most mitogenic lectins including Con A are selective T-cell mitogens. A few lectins are less selective and stimulate both T-cells and B-cells. Local or systemic *in vivo* exposure to

mitogenic lectins can result in inflammation, cytotoxicity, macrophage digestion, and allergic reactions including anaphylaxis. In addition, plant lectins are known to be particularly immunogenic, giving rise to the production of high titers of anti-lectin specific antibodies. It will be appreciated that mitogenic lectins cannot therefore be used in their native form for *in vivo* methods and devices unless great care is taken to prevent their release. For example, in U.S. Patent No. 5,830,506, Taylor highlights the toxic risks that are involved in using Con A and emphasizes the importance and difficulty of containing Con A within a drug delivery device that also requires glucose and insulin molecules to diffuse freely in and out of the device.

The risks and difficulties that are involved with these and other *in vivo* uses of lectins could be significantly diminished if an alternative controlled drug delivery system could be provided that did not require lectins.

SUMMARY

In one aspect, the disclosure provides methods for controlling the pharmacokinetic (PK) and/or pharmacodynamic (PD) profiles of a drug such as insulin in a manner that is responsive to the systemic concentrations of a saccharide such as glucose. As discussed in the Examples, the methods are based in part on the discovery that when certain insulin-conjugates were modified to include high affinity saccharide ligands they could be made to exhibit PK/PD profiles that responded to saccharide concentration changes even in the absence of an exogenous multivalent saccharide-binding molecule such as Con A. This finding was unexpected and provides an unprecedented opportunity to generate simple lectin-free saccharide-responsive drug systems. In another aspect, the disclosure provides exemplary conjugates and methods for making these. In general, these conjugates include a drug and one or more separate ligands that each includes a saccharide. In certain embodiments, the ligands are capable of competing with a saccharide (e.g., glucose or mannose) for binding to an endogenous saccharide-binding molecule. In certain embodiments, the ligands are capable of competing with glucose or mannose for binding to Con A. As discussed in more detail below, in certain embodiments, the ligands and drug may be covalently or non-covalently attached to a conjugate framework. In certain embodiments, the framework is non-polymeric. In certain embodiments, a conjugate may have a polydispersity index of one and a MW of less than about 20,000 Da. In certain embodiments, the conjugate is long acting (i.e., exhibits a PK profile that is more sustained than soluble recombinant human insulin or RHI).

As discussed in more detail below, it is to be understood that the methods, conjugates and formulations that are described herein are in no way limited to the delivery of insulin and that they can be used to deliver any drug. It is also to be understood that the methods may be used to

deliver drugs in response to saccharides other than glucose. In particular, as discussed in the Examples, exemplary conjugates have been shown to respond to exogenous saccharides such as alpha-methyl mannose and L-fucose. In certain embodiments, this can be used to prepare conjugates that can be controlled by administration of one of these exogenous saccharides (i.e., instead of or in addition to being controlled by fluctuations in endogenous glucose).

DEFINITIONS

Definitions of specific functional groups, chemical terms, and general terms used throughout the specification are described in more detail below. For purposes of this invention, the chemical elements are identified in accordance with the Periodic Table of the Elements, CAS version, Handbook of Chemistry and Physics, 75th Ed., inside cover, and specific functional groups are generally defined as described therein. Additionally, general principles of organic chemistry, as well as specific functional moieties and reactivity, are described in Organic Chemistry, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito, 1999; Smith and March March's Advanced Organic Chemistry, 5th Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2001; Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers, Inc., New York, 1989; Carruthers, Some Modern Methods of Organic Synthesis, 3rd Edition, Cambridge University Press, Cambridge, 1987.

Acyl – As used herein, the term "acyl," refers to a group having the general formula –$C(=O)R^{X1}$, $-C(=O)OR^{X1}$, $-C(=O)-O-C(=O)R^{X1}$, $-C(=O)SR^{X1}$, $-C(=O)N(R^{X1})_2$, $-C(=S)R^{X1}$, $-C(=S)N(R^{X1})_2$, and $-C(=S)S(R^{X1})$, $-C(=NR^{X1})R^{X1}$, $-C(=NR^{X1})OR^{X1}$, $-C(=NR^{X1})SR^{X1}$, and $-C(=NR^{X1})N(R^{X1})_2$, wherein R^{X1} is hydrogen; halogen; substituted or unsubstituted hydroxyl; substituted or unsubstituted thiol; substituted or unsubstituted amino; substituted or unsubstituted acyl; cyclic or acyclic, substituted or unsubstituted, branched or unbranched aliphatic; cyclic or acyclic, substituted or unsubstituted, branched or unbranched heteroaliphatic; cyclic or acyclic, substituted or unsubstituted, branched or unbranched alkyl; cyclic or acyclic, substituted or unsubstituted, branched or unbranched alkenyl; substituted or unsubstituted alkynyl, substituted or unsubstituted aryl, substituted or unsubstituted heteroaryl, aliphaticoxy, heteroaliphaticoxy, alkyloxy, heteroalkyloxy, aryloxy, heteroaryloxy, aliphaticthioxy, heteroaliphaticthioxy, alkylthioxy, heteroalkylthioxy, arylthioxy, heteroarylthioxy, mono– or di– aliphaticamino, mono– or di– heteroaliphaticamino, mono– or di– alkylamino, mono– or di– heteroalkylamino, mono– or di– arylamino, or mono– or di– heteroarylamino; or two R^{X1} groups taken together form a 5– to 6– membered heterocyclic ring. Exemplary acyl groups include aldehydes (–CHO), carboxylic acids ($-CO_2H$), ketones, acyl halides, esters, amides, imines, carbonates, carbamates, and ureas. Acyl substituents include, but are not limited to, any of the substituents described

herein, that result in the formation of a stable moiety (e.g., aliphatic, alkyl, alkenyl, alkynyl, heteroaliphatic, heterocyclic, aryl, heteroaryl, acyl, oxo, imino, thiooxo, cyano, isocyano, amino, azido, nitro, hydroxyl, thiol, halo, aliphaticamino, heteroaliphaticamino, alkylamino, heteroalkylamino, arylamino, heteroarylamino, alkylaryl, arylalkyl, aliphaticoxy, heteroaliphaticoxy, alkyloxy, heteroalkyloxy, aryloxy, heteroaryloxy, aliphaticthioxy, heteroaliphaticthioxy, alkylthioxy, heteroalkylthioxy, arylthioxy, heteroarylthioxy, acyloxy, and the like, each of which may or may not be further substituted).

Aliphatic – As used herein, the term "aliphatic" or "aliphatic group" denotes an optionally substituted hydrocarbon moiety that may be straight–chain (i.e., unbranched), branched, or cyclic ("carbocyclic") and may be completely saturated or may contain one or more units of unsaturation, but which is not aromatic. Unless otherwise specified, aliphatic groups contain 1-12 carbon atoms. In some embodiments, aliphatic groups contain 1-6 carbon atoms. In some embodiments, aliphatic groups contain 1-4 carbon atoms, and in yet other embodiments aliphatic groups contain 1-3 carbon atoms. Suitable aliphatic groups include, but are not limited to, linear or branched, alkyl, alkenyl, and alkynyl groups, and hybrids thereof such as (cycloalkyl)alkyl, (cycloalkenyl)alkyl or (cycloalkyl)alkenyl.

Alkenyl – As used herein, the term "alkenyl" denotes an optionally substituted monovalent group derived from a straight– or branched–chain aliphatic moiety having at least one carbon–carbon double bond by the removal of a single hydrogen atom. In certain embodiments, the alkenyl group employed in the invention contains 2-6 carbon atoms. In certain embodiments, the alkenyl group employed in the invention contains 2-5 carbon atoms. In some embodiments, the alkenyl group employed in the invention contains 2-4 carbon atoms. In another embodiment, the alkenyl group employed contains 2-3 carbon atoms. Alkenyl groups include, for example, ethenyl, propenyl, butenyl, 1–methyl–2–buten–1–yl, and the like.

Alkyl – As used herein, the term "alkyl" refers to optionally substituted saturated, straight– or branched–chain hydrocarbon radicals derived from an aliphatic moiety containing between 1-6 carbon atoms by removal of a single hydrogen atom. In some embodiments, the alkyl group employed in the invention contains 1-5 carbon atoms. In another embodiment, the alkyl group employed contains 1-4 carbon atoms. In still other embodiments, the alkyl group contains 1-3 carbon atoms. In yet another embodiment, the alkyl group contains 1-2 carbons. Examples of alkyl radicals include, but are not limited to, methyl, ethyl, n–propyl, isopropyl, n–butyl, iso–butyl, sec–butyl, sec–pentyl, iso–pentyl, tert–butyl, n–pentyl, neopentyl, n–hexyl, sec–hexyl, n–heptyl, n–octyl, n–decyl, n–undecyl, dodecyl, and the like.

Alkynyl – As used herein, the term "alkynyl" refers to an optionally substituted monovalent group derived from a straight– or branched–chain aliphatic moiety having at least

one carbon–carbon triple bond by the removal of a single hydrogen atom. In certain embodiments, the alkynyl group employed in the invention contains 2-6 carbon atoms. In certain embodiments, the alkynyl group employed in the invention contains 2-5 carbon atoms. In some embodiments, the alkynyl group employed in the invention contains 2-4 carbon atoms. In another embodiment, the alkynyl group employed contains 2-3 carbon atoms. Representative alkynyl groups include, but are not limited to, ethynyl, 2–propynyl (propargyl), 1–propynyl, and the like.

Aryl – As used herein, the term "aryl" used alone or as part of a larger moiety as in "aralkyl", "aralkoxy", or "aryloxyalkyl", refers to an optionally substituted monocyclic and bicyclic ring systems having a total of five to 10 ring members, wherein at least one ring in the system is aromatic and wherein each ring in the system contains three to seven ring members. The term "aryl" may be used interchangeably with the term "aryl ring". In certain embodiments of the present invention, "aryl" refers to an aromatic ring system which includes, but not limited to, phenyl, biphenyl, naphthyl, anthracyl and the like, which may bear one or more substituents.

Arylalkyl – As used herein, the term "arylalkyl" refers to an alkyl group substituted with an aryl group (e.g., an aromatic or heteroaromatic group).

Bivalent hydrocarbon chain – As used herein, the term "bivalent hydrocarbon chain" (also referred to as a "bivalent alkylene group") is a polymethylene group, i.e., $-(CH_2)_z-$, wherein z is a positive integer from 1 to 30, from 1 to 20, from 1 to 12, from 1 to 8, from 1 to 6, from 1 to 4, from 1 to 3, from 1 to 2, from 2 to 30, from 2 to 20, from 2 to 10, from 2 to 8, from 2 to 6, from 2 to 4, or from 2 to 3. A substituted bivalent hydrocarbon chain is a polymethylene group in which one or more methylene hydrogen atoms are replaced with a substituent. Suitable substituents include those described below for a substituted aliphatic group.

Carbonyl – As used herein, the term "carbonyl" refers to a monovalent or bivalent moiety containing a carbon-oxygen double bond. Non-limiting examples of carbonyl groups include aldehydes, ketones, carboxylic acids, ester, amide, enones, acyl halides, anhydrides, ureas, carbamates, carbonates, thioesters, lactones, lactams, hydroxamates, isocyanates, and chloroformates.

Cycloaliphatic – As used herein, the terms "cycloaliphatic", "carbocycle", or "carbocyclic", used alone or as part of a larger moiety, refer to an optionally substituted saturated or partially unsaturated cyclic aliphatic monocyclic or bicyclic ring systems, as described herein, having from 3 to 10 members. Cycloaliphatic groups include, without limitation, cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, cyclopentenyl, cyclohexyl, cyclohexenyl, cycloheptyl, cycloheptenyl, cyclooctyl, cyclooctenyl, and cyclooctadienyl. In some embodiments, the cycloalkyl has 3-6 carbons.

Halogen – As used herein, the terms "halo" and "halogen" refer to an atom selected from fluorine (fluoro, –F), chlorine (chloro, –Cl), bromine (bromo, –Br), and iodine (iodo, –I).

Heteroaliphatic – As used herein, the terms "heteroaliphatic" or "heteroaliphatic group", denote an optionally substituted hydrocarbon moiety having, in addition to carbon atoms, from one to five heteroatoms, that may be straight–chain (i.e., unbranched), branched, or cyclic ("heterocyclic") and may be completely saturated or may contain one or more units of unsaturation, but which is not aromatic. Unless otherwise specified, heteroaliphatic groups contain 1-6 carbon atoms wherein 1-3 carbon atoms are optionally and independently replaced with heteroatoms selected from oxygen, nitrogen and sulfur. In some embodiments, heteroaliphatic groups contain 1-4 carbon atoms, wherein 1-2 carbon atoms are optionally and independently replaced with heteroatoms selected from oxygen, nitrogen and sulfur. In yet other embodiments, heteroaliphatic groups contain 1-3 carbon atoms, wherein 1 carbon atom is optionally and independently replaced with a heteroatom selected from oxygen, nitrogen and sulfur. Suitable heteroaliphatic groups include, but are not limited to, linear or branched, heteroalkyl, heteroalkenyl, and heteroalkynyl groups.

Heteroaralkyl – As used herein, the term "heteroaralkyl" refers to an alkyl group substituted by a heteroaryl, wherein the alkyl and heteroaryl portions independently are optionally substituted.

Heteroaryl – As used herein, the term "heteroaryl" used alone or as part of a larger moiety, e.g., "heteroaralkyl", or "heteroaralkoxy", refers to an optionally substituted group having 5 to 10 ring atoms, preferably 5, 6, or 9 ring atoms; having 6, 10, or 14 π electrons shared in a cyclic array; and having, in addition to carbon atoms, from one to five heteroatoms. Heteroaryl groups include, without limitation, thienyl, furanyl, pyrrolyl, imidazolyl, pyrazolyl, triazolyl, tetrazolyl, oxazolyl, isoxazolyl, oxadiazolyl, thiazolyl, isothiazolyl, thiadiazolyl, pyridyl, pyridazinyl, pyrimidinyl, pyrazinyl, indolizinyl, purinyl, naphthyridinyl, and pteridinyl. The terms "heteroaryl" and "heteroar–", as used herein, also include groups in which a heteroaromatic ring is fused to one or more aryl, carbocyclic, or heterocyclic rings, where the radical or point of attachment is on the heteroaromatic ring. Non limiting examples include indolyl, isoindolyl, benzothienyl, benzofuranyl, dibenzofuranyl, indazolyl, benzimidazolyl, benzthiazolyl, quinolyl, isoquinolyl, cinnolinyl, phthalazinyl, quinazolinyl, quinoxalinyl, 4*H*–quinolizinyl, carbazolyl, acridinyl, phenazinyl, phenothiazinyl, phenoxazinyl, tetrahydroquinolinyl, and tetrahydroisoquinolinyl. A heteroaryl group may be mono– or bicyclic. The term "heteroaryl" may be used interchangeably with the terms "heteroaryl ring", "heteroaryl group", or "heteroaromatic", any of which terms include rings that are optionally substituted.

Heteroatom – As used herein, the term "heteroatom" refers to nitrogen, oxygen, or sulfur, and includes any oxidized form of nitrogen or sulfur, and any quaternized form of a basic nitrogen. The term "nitrogen" also includes a substituted nitrogen.

Heterocyclic – As used herein, the terms "heterocycle", "heterocyclyl", "heterocyclic radical", and "heterocyclic ring" are used interchangeably and refer to a stable optionally substituted 5- to 7-membered monocyclic or 7- to 10-membered bicyclic heterocyclic moiety that is either saturated or partially unsaturated, and having, in addition to carbon atoms, one or more heteroatoms, as defined above. A heterocyclic ring can be attached to its pendant group at any heteroatom or carbon atom that results in a stable structure and any of the ring atoms can be optionally substituted. Examples of such saturated or partially unsaturated heterocyclic radicals include, without limitation, tetrahydrofuranyl, tetrahydrothienyl, pyrrolidinyl, pyrrolidonyl, piperidinyl, pyrrolinyl, tetrahydroquinolinyl, tetrahydroisoquinolinyl, decahydroquinolinyl, oxazolidinyl, piperazinyl, dioxanyl, dioxolanyl, diazepinyl, oxazepinyl, thiazepinyl, morpholinyl, and quinuclidinyl. The terms "heterocycle", "heterocyclyl", "heterocyclyl ring", "heterocyclic group", "heterocyclic moiety", and "heterocyclic radical", are used interchangeably herein, and also include groups in which a heterocyclyl ring is fused to one or more aryl, heteroaryl, or carbocyclic rings, such as indolinyl, 3*H*–indolyl, chromanyl, phenanthridinyl, or tetrahydroquinolinyl, where the radical or point of attachment is on the heterocyclyl ring. A heterocyclyl group may be mono– or bicyclic. The term "heterocyclylalkyl" refers to an alkyl group substituted by a heterocyclyl, wherein the alkyl and heterocyclyl portions independently are optionally substituted.

Unsaturated – As used herein, the term "unsaturated", means that a moiety has one or more double or triple bonds.

Partially unsaturated – As used herein, the term "partially unsaturated" refers to a ring moiety that includes at least one double or triple bond. The term "partially unsaturated" is intended to encompass rings having multiple sites of unsaturation, but is not intended to include aryl or heteroaryl moieties, as herein defined.

Optionally substituted – As described herein, compounds of the invention may contain "optionally substituted" moieties. In general, the term "substituted", whether preceded by the term "optionally" or not, means that one or more hydrogens of the designated moiety are replaced with a suitable substituent. Unless otherwise indicated, an "optionally substituted" group may have a suitable substituent at each substitutable position of the group, and when more than one position in any given structure may be substituted with more than one substituent selected from a specified group, the substituent may be either the same or different at every position. Combinations of substituents envisioned by this invention are preferably those that

result in the formation of stable or chemically feasible compounds. The term "stable", as used herein, refers to compounds that are not substantially altered when subjected to conditions to allow for their production, detection, and, in certain embodiments, their recovery, purification, and use for one or more of the purposes disclosed herein.

Suitable monovalent substituents on a substitutable carbon atom of an "optionally substituted" group are independently halogen; $-(CH_2)_{0-4}R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}OR^\circ$; $-O-(CH_2)_{0-4}C(O)OR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}CH(OR^\circ)_2$; $-(CH_2)_{0-4}SR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}Ph$, which may be substituted with R°; $-(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-1}Ph$ which may be substituted with R°; $-CH=CHPh$, which may be substituted with R°; $-NO_2$; $-CN$; $-N_3$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)_2$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)C(O)R^\circ$; $-N(R^\circ)C(S)R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)C(O)NR^\circ_2$; $-N(R^\circ)C(S)NR^\circ_2$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)C(O)OR^\circ$; $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)R^\circ$; $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)NR^\circ_2$; $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)OR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)R^\circ$; $-C(S)R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)OR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)SR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)OSiR^\circ_3$; $-(CH_2)_{0-4}OC(O)R^\circ$; $-OC(O)(CH_2)_{0-4}SR-$, SC(S)SR°; $-(CH_2)_{0-4}SC(O)R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)NR^\circ_2$; $-C(S)NR^\circ_2$; $-C(S)SR^\circ$; $-SC(S)SR^\circ$, $-(CH_2)_{0-4}OC(O)NR^\circ_2$; $-C(O)N(OR^\circ)R^\circ$; $-C(O)C(O)R^\circ$; $-C(O)CH_2C(O)R^\circ$; $-C(NOR^\circ)R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}SSR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)_2R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)_2OR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}OS(O)_2R^\circ$; $-S(O)_2NR^\circ_2$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)R^\circ$; $-N(R^\circ)S(O)_2NR^\circ_2$; $-N(R^\circ)S(O)_2R^\circ$; $-N(OR^\circ)R^\circ$; $-C(NH)NR^\circ_2$; $-P(O)_2R^\circ$; $-P(O)R^\circ_2$; $-OP(O)R^\circ_2$; $-OP(O)(OR^\circ)_2$; SiR°_3; $-(C_{1-4}$ straight or branched alkylene$)O-N(R^\circ)_2$; or $-(C_{1-4}$ straight or branched alkylene$)C(O)O-N(R^\circ)_2$, wherein each R° may be substituted as defined below and is independently hydrogen, C_{1-6} aliphatic, $-CH_2Ph$, $-O(CH_2)_{0-1}Ph$, or a 5–6–membered saturated, partially unsaturated, or aryl ring having 0–4 heteroatoms independently selected from nitrogen, oxygen, or sulfur, or, notwithstanding the definition above, two independent occurrences of R°, taken together with their intervening atom(s), form a 3–12–membered saturated, partially unsaturated, or aryl mono– or bicyclic ring having 0–4 heteroatoms independently selected from nitrogen, oxygen, or sulfur, which may be substituted as defined below.

Suitable monovalent substituents on R° (or the ring formed by taking two independent occurrences of R° together with their intervening atoms), are independently halogen, $-(CH_2)_{0-2}R^\bullet$, $-(haloR^\bullet)$, $-(CH_2)_{0-2}OH$, $-(CH_2)_{0-2}OR^\bullet$, $-(CH_2)_{0-2}CH(OR^\bullet)_2$; $-O(haloR^\bullet)$, $-CN$, $-N_3$, $-(CH_2)_{0-2}C(O)R^\bullet$, $-(CH_2)_{0-2}C(O)OH$, $-(CH_2)_{0-2}C(O)OR^\bullet$, $-(CH_2)_{0-2}SR^\bullet$, $-(CH_2)_{0-2}SH$, $-(CH_2)_{0-2}NH_2$, $-(CH_2)_{0-2}NHR^\bullet$, $-(CH_2)_{0-2}NR^\bullet_2$, $-NO_2$, $-SiR^\bullet_3$, $-OSiR^\bullet_3$, $-C(O)SR^\bullet$, $-(C_{1-4}$ straight or branched alkylene$)C(O)OR^\bullet$, or $-SSR^\bullet$ wherein each $R^\bullet$ is unsubstituted or where preceded by "halo" is substituted only with one or more halogens, and is independently selected from C_{1-4} aliphatic, $-CH_2Ph$, $-O(CH_2)_{0-1}Ph$, or a 5–6–membered saturated, partially unsaturated, or aryl

ring having 0–4 heteroatoms independently selected from nitrogen, oxygen, or sulfur. Suitable divalent substituents on a saturated carbon atom of R° include =O and =S.

Suitable divalent substituents on a saturated carbon atom of an "optionally substituted" group include the following: =O, =S, $=NNR^*_2$, $=NNHC(O)R^*$, $=NNHC(O)OR^*$, $=NNHS(O)_2R^*$, $=NR^*$, $=NOR^*$, $-O(C(R^*_2))_{2-3}O-$, or $-S(C(R^*_2))_{2-3}S-$, wherein each independent occurrence of R^* is selected from hydrogen, C_{1-6} aliphatic which may be substituted as defined below, or an unsubstituted 5–6–membered saturated, partially unsaturated, or aryl ring having 0–4 heteroatoms independently selected from nitrogen, oxygen, or sulfur. Suitable divalent substituents that are bound to vicinal substitutable carbons of an "optionally substituted" group include: $-O(CR^*_2)_{2-3}O-$, wherein each independent occurrence of R^* is selected from hydrogen, C_{1-6} aliphatic which may be substituted as defined below, or an unsubstituted 5–6–membered saturated, partially unsaturated, or aryl ring having 0–4 heteroatoms independently selected from nitrogen, oxygen, or sulfur.

Suitable substituents on the aliphatic group of R^* include halogen, $-R^\bullet$, $-(haloR^\bullet)$, $-OH$, $-OR^\bullet$, $-O(haloR^\bullet)$, $-CN$, $-C(O)OH$, $-C(O)OR^\bullet$, $-NH_2$, $-NHR^\bullet$, $-NR^\bullet_2$, or $-NO_2$, wherein each $R^\bullet$ is unsubstituted or where preceded by "halo" is substituted only with one or more halogens, and is independently C_{1-4} aliphatic, $-CH_2Ph$, $-O(CH_2)_{0-1}Ph$, or a 5–6–membered saturated, partially unsaturated, or aryl ring having 0–4 heteroatoms independently selected from nitrogen, oxygen, or sulfur.

Suitable substituents on a substitutable nitrogen of an "optionally substituted" group include $-R^\dagger$, $-NR^\dagger_2$, $-C(O)R^\dagger$, $-C(O)OR^\dagger$, $-C(O)C(O)R^\dagger$, $-C(O)CH_2C(O)R^\dagger$, $-S(O)_2R^\dagger$, $-S(O)_2NR^\dagger_2$, $-C(S)NR^\dagger_2$, $-C(NH)NR^\dagger_2$, or $-N(R^\dagger)S(O)_2R^\dagger$; wherein each $R^\dagger$ is independently hydrogen, C_{1-6} aliphatic which may be substituted as defined below, unsubstituted –OPh, or an unsubstituted 5–6–membered saturated, partially unsaturated, or aryl ring having 0–4 heteroatoms independently selected from nitrogen, oxygen, or sulfur, or, notwithstanding the definition above, two independent occurrences of $R^\dagger$, taken together with their intervening atom(s) form an unsubstituted 3–12–membered saturated, partially unsaturated, or aryl mono– or bicyclic ring having 0–4 heteroatoms independently selected from nitrogen, oxygen, or sulfur.

Suitable substituents on the aliphatic group of $R^\dagger$ are independently halogen, $-R^\bullet$, $-(haloR^\bullet)$, $-OH$, $-OR^\bullet$, $-O(haloR^\bullet)$, $-CN$, $-C(O)OH$, $-C(O)OR^\bullet$, $-NH_2$, $-NHR^\bullet$, $-NR^\bullet_2$, or $-NO_2$, wherein each $R^\bullet$ is unsubstituted or where preceded by "halo" is substituted only with one or more halogens, and is independently C_{1-4} aliphatic, $-CH_2Ph$, $-O(CH_2)_{0-1}Ph$, or a 5–6–membered saturated, partially unsaturated, or aryl ring having 0–4 heteroatoms independently selected from nitrogen, oxygen, or sulfur.

Suitable protecting group – As used herein, the term "suitable protecting group," refers to amino protecting groups or hydroxyl protecting groups depending on its location within the compound and includes those described in detail in *Protecting Groups in Organic Synthesis*, T. W. Greene and P. G. M. Wuts, 3rd edition, John Wiley & Sons, 1999.

Suitable amino–protecting groups include methyl carbamate, ethyl carbamante, 9–fluorenylmethyl carbamate (Fmoc), 9–(2–sulfo)fluorenylmethyl carbamate, 9–(2,7–dibromo)fluoroenylmethyl carbamate, 2,7–di–*t*–butyl–[9–(10,10–dioxo–10,10,10,10–tetrahydrothioxanthyl)]methyl carbamate (DBD–Tmoc), 4–methoxyphenacyl carbamate (Phenoc), 2,2,2–trichloroethyl carbamate (Troc), 2–trimethylsilylethyl carbamate (Teoc), 2–phenylethyl carbamate (hZ), 1–(1–adamantyl)–1–methylethyl carbamate (Adpoc), 1,1–dimethyl–2–haloethyl carbamate, 1,1–dimethyl–2,2–dibromoethyl carbamate (DB–*t*–BOC), 1,1–dimethyl–2,2,2–trichloroethyl carbamate (TCBOC), 1–methyl–1–(4–biphenylyl)ethyl carbamate (Bpoc), 1–(3,5–di–*t*–butylphenyl)–1–methylethyl carbamate (*t*–Bumeoc), 2–(2'– and 4'–pyridyl)ethyl carbamate (Pyoc), 2–(*N,N*–dicyclohexylcarboxamido)ethyl carbamate, *t*–butyl carbamate (BOC), 1–adamantyl carbamate (Adoc), vinyl carbamate (Voc), allyl carbamate (Alloc), 1–isopropylallyl carbamate (Ipaoc), cinnamyl carbamate (Coc), 4–nitrocinnamyl carbamate (Noc), 8–quinolyl carbamate, *N*–hydroxypiperidinyl carbamate, alkyldithio carbamate, benzyl carbamate (Cbz), *p*–methoxybenzyl carbamate (Moz), *p*–nitobenzyl carbamate, *p*–bromobenzyl carbamate, *p*–chlorobenzyl carbamate, 2,4–dichlorobenzyl carbamate, 4–methylsulfinylbenzyl carbamate (Msz), 9–anthrylmethyl carbamate, diphenylmethyl carbamate, 2–methylthioethyl carbamate, 2–methylsulfonylethyl carbamate, 2–(*p*–toluenesulfonyl)ethyl carbamate, [2–(1,3–dithianyl)]methyl carbamate (Dmoc), 4–methylthiophenyl carbamate (Mtpc), 2,4–dimethylthiophenyl carbamate (Bmpc), 2–phosphonioethyl carbamate (Peoc), 2–triphenylphosphonioisopropyl carbamate (Ppoc), 1,1–dimethyl–2–cyanoethyl carbamate, *m*–chloro–*p*–acyloxybenzyl carbamate, *p*–(dihydroxyboryl)benzyl carbamate, 5–benzisoxazolylmethyl carbamate, 2–(trifluoromethyl)–6–chromonylmethyl carbamate (Tcroc), *m*–nitrophenyl carbamate, 3,5–dimethoxybenzyl carbamate, *o*–nitrobenzyl carbamate, 3,4–dimethoxy–6–nitrobenzyl carbamate, phenyl(*o*–nitrophenyl)methyl carbamate, phenothiazinyl–(10)–carbonyl derivative, *N'*–*p*–toluenesulfonylaminocarbonyl derivative, *N'*–phenylaminothiocarbonyl derivative, *t*–amyl carbamate, *S*–benzyl thiocarbamate, *p*–cyanobenzyl carbamate, cyclobutyl carbamate, cyclohexyl carbamate, cyclopentyl carbamate, cyclopropylmethyl carbamate, *p*–decyloxybenzyl carbamate, 2,2–dimethoxycarbonylvinyl carbamate, *o*–(*N,N*–dimethylcarboxamido)benzyl carbamate, 1,1–dimethyl–3–(*N,N*–dimethylcarboxamido)propyl carbamate, 1,1–dimethylpropynyl carbamate, di(2–pyridyl)methyl carbamate, 2–furanylmethyl carbamate, 2–iodoethyl carbamate, isoborynl carbamate, isobutyl

carbamate, isonicotinyl carbamate, *p*–(*p'*–methoxyphenylazo)benzyl carbamate, 1–methylcyclobutyl carbamate, 1–methylcyclohexyl carbamate, 1–methyl–1–cyclopropylmethyl carbamate, 1–methyl–1–(3,5–dimethoxyphenyl)ethyl carbamate, 1–methyl–1–(*p*–phenylazophenyl)ethyl carbamate, 1–methyl–1–phenylethyl carbamate, 1–methyl–1–(4–pyridyl)ethyl carbamate, phenyl carbamate, *p*–(phenylazo)benzyl carbamate, 2,4,6–tri–*t*–butylphenyl carbamate, 4–(trimethylammonium)benzyl carbamate, 2,4,6–trimethylbenzyl carbamate, formamide, acetamide, chloroacetamide, trichloroacetamide, trifluoroacetamide, phenylacetamide, 3–phenylpropanamide, picolinamide, 3–pyridylcarboxamide, *N*–benzoylphenylalanyl derivative, benzamide, *p*–phenylbenzamide, *o*–nitophenylacetamide, *o*–nitrophenoxyacetamide, acetoacetamide, (*N'*–dithiobenzyloxycarbonylamino)acetamide, 3–(*p*–hydroxyphenyl)propanamide, 3–(*o*–nitrophenyl)propanamide, 2–methyl–2–(*o*–nitrophenoxy)propanamide, 2–methyl–2–(*o*–phenylazophenoxy)propanamide, 4–chlorobutanamide, 3–methyl–3–nitrobutanamide, *o*–nitrocinnamide, *N*–acetylmethionine derivative, *o*–nitrobenzamide, *o*–(benzoyloxymethyl)benzamide, 4,5–diphenyl–3–oxazolin–2–one, *N*–phthalimide, *N*–dithiasuccinimide (Dts), *N*–2,3–diphenylmaleimide, *N*–2,5–dimethylpyrrole, *N*–1,1,4,4–tetramethyldisilylazacyclopentane adduct (STABASE), 5–substituted 1,3–dimethyl–1,3,5–triazacyclohexan–2–one, 5–substituted 1,3–dibenzyl–1,3,5–triazacyclohexan–2–one, 1–substituted 3,5–dinitro–4–pyridone, *N*–methylamine, *N*–allylamine, *N*–[2–(trimethylsilyl)ethoxy]methylamine (SEM), *N*–3–acetoxypropylamine, *N*–(1–isopropyl–4–nitro–2–oxo–3–pyroolin–3–yl)amine, quaternary ammonium salts, *N*–benzylamine, *N*–di(4–methoxyphenyl)methylamine, *N*–5–dibenzosuberylamine, *N*–triphenylmethylamine (Tr), *N*–[(4–methoxyphenyl)diphenylmethyl]amine (MMTr), *N*–9–phenylfluorenylamine (PhF), *N*–2,7–dichloro–9–fluorenylmethyleneamine, *N*–ferrocenylmethylamino (Fcm), *N*–2–picolylamino *N'*–oxide, *N*–1,1–dimethylthiomethyleneamine, *N*–benzylideneamine, *N*–*p*–methoxybenzylideneamine, *N*–diphenylmethyleneamine, *N*–[(2–pyridyl)mesityl]methyleneamine, *N*–(*N',N'*–dimethylaminomethylene)amine, *N,N'*–isopropylidenediamine, *N*–*p*–nitrobenzylideneamine, *N*–salicylideneamine, *N*–5–chlorosalicylideneamine, *N*–(5–chloro–2–hydroxyphenyl)phenylmethyleneamine, *N*–cyclohexylideneamine, *N*–(5,5–dimethyl–3–oxo–1–cyclohexenyl)amine, *N*–borane derivative, *N*–diphenylborinic acid derivative, *N*–[phenyl(pentacarbonylchromium– or tungsten)carbonyl]amine, *N*–copper chelate, *N*–zinc chelate, *N*–nitroamine, *N*–nitrosoamine, amine *N*–oxide, diphenylphosphinamide (Dpp), dimethylthiophosphinamide (Mpt), diphenylthiophosphinamide (Ppt), dialkyl phosphoramidates, dibenzyl phosphoramidate, diphenyl phosphoramidate, benzenesulfenamide, *o*–nitrobenzenesulfenamide (Nps), 2,4–dinitrobenzenesulfenamide, pentachlorobenzenesulfenamide, 2–nitro–4–

methoxybenzenesulfenamide, triphenylmethylsulfenamide, 3–nitropyridinesulfenamide (Npys), *p*–toluenesulfonamide (Ts), benzenesulfonamide, 2,3,6,–trimethyl–4–methoxybenzenesulfonamide (Mtr), 2,4,6–trimethoxybenzenesulfonamide (Mtb), 2,6–dimethyl–4–methoxybenzenesulfonamide (Pme), 2,3,5,6–tetramethyl–4–methoxybenzenesulfonamide (Mte), 4–methoxybenzenesulfonamide (Mbs), 2,4,6–trimethylbenzenesulfonamide (Mts), 2,6–dimethoxy–4–methylbenzenesulfonamide (iMds), 2,2,5,7,8–pentamethylchroman–6–sulfonamide (Pmc), methanesulfonamide (Ms), β–trimethylsilylethanesulfonamide (SES), 9–anthracenesulfonamide, 4–(4',8'–dimethoxynaphthylmethyl)benzenesulfonamide (DNMBS), benzylsulfonamide, trifluoromethylsulfonamide, and phenacylsulfonamide.

Suitable hydroxyl protecting groups include methyl, methoxylmethyl (MOM), methylthiomethyl (MTM), *t*–butylthiomethyl, (phenyldimethylsilyl)methoxymethyl (SMOM), benzyloxymethyl (BOM), *p*–methoxybenzyloxymethyl (PMBM), (4–methoxyphenoxy)methyl (*p*–AOM), guaiacolmethyl (GUM), *t*–butoxymethyl, 4–pentenyloxymethyl (POM), siloxymethyl, 2–methoxyethoxymethyl (MEM), 2,2,2–trichloroethoxymethyl, bis(2–chloroethoxy)methyl, 2–(trimethylsilyl)ethoxymethyl (SEMOR), tetrahydropyranyl (THP), 3–bromotetrahydropyranyl, tetrahydrothiopyranyl, 1–methoxycyclohexyl, 4–methoxytetrahydropyranyl (MTHP), 4–methoxytetrahydrothiopyranyl, 4–methoxytetrahydrothiopyranyl S,S–dioxide, 1–[(2–chloro–4–methyl)phenyl]–4–methoxypiperidin–4–yl (CTMP), 1,4–dioxan–2–yl, tetrahydrofuranyl, tetrahydrothiofuranyl; 2,3,3a,4,5,6,7,7a–octahydro–7,8,8–trimethyl–4,7–methanobenzofuran–2–yl, 1–ethoxyethyl, 1–(2–chloroethoxy)ethyl, 1–methyl–1–methoxyethyl, 1–methyl–1–benzyloxyethyl, 1–methyl–1–benzyloxy–2–fluoroethyl, 2,2,2–trichloroethyl, 2–trimethylsilylethyl, 2–(phenylselenyl)ethyl, *t*–butyl, allyl, *p*–chlorophenyl, *p*–methoxyphenyl, 2,4–dinitrophenyl, benzyl, *p*–methoxybenzyl, 3,4–dimethoxybenzyl, *o*–nitrobenzyl, *p*–nitrobenzyl, *p*–halobenzyl, 2,6–dichlorobenzyl, *p*–cyanobenzyl, *p*–phenylbenzyl, 2–picolyl, 4–picolyl, 3–methyl–2–picolyl *N*–oxido, diphenylmethyl, *p,p'*–dinitrobenzhydryl, 5–dibenzosuberyl, triphenylmethyl, α–naphthyldiphenylmethyl, *p*–methoxyphenyldiphenylmethyl, di(*p*–methoxyphenyl)phenylmethyl, tri(*p*–methoxyphenyl)methyl, 4–(4'–bromophenacyloxyphenyl)diphenylmethyl, 4,4',4''–tris(4,5–dichlorophthalimidophenyl)methyl, 4,4',4''–tris(levulinoyloxyphenyl)methyl, 4,4',4''–tris(benzoyloxyphenyl)methyl, 3–(imidazol–1–yl)bis(4',4''–dimethoxyphenyl)methyl, 1,1–bis(4–methoxyphenyl)–1'–pyrenylmethyl, 9–anthryl, 9–(9–phenyl)xanthenyl, 9–(9–phenyl–10–oxo)anthryl, 1,3–benzodithiolan–2–yl, benzisothiazolyl S,S–dioxido, trimethylsilyl (TMS), triethylsilyl (TES), triisopropylsilyl (TIPS), dimethylisopropylsilyl (IPDMS), diethylisopropylsilyl (DEIPS), dimethylthexylsilyl, *t*–butyldimethylsilyl (TBDMS), *t*–butyldiphenylsilyl (TBDPS), tribenzylsilyl, tri–*p*–xylylsilyl, triphenylsilyl, diphenylmethylsilyl

(DPMS), *t*–butylmethoxyphenylsilyl (TBMPS), formate, benzoylformate, acetate, chloroacetate, dichloroacetate, trichloroacetate, trifluoroacetate, methoxyacetate, triphenylmethoxyacetate, phenoxyacetate, *p*–chlorophenoxyacetate, 3–phenylpropionate, 4–oxopentanoate (levulinate), 4,4–(ethylenedithio)pentanoate (levulinoyldithioacetal), pivaloate, adamantoate, crotonate, 4–methoxycrotonate, benzoate, *p*–phenylbenzoate, 2,4,6–trimethylbenzoate (mesitoate), alkyl methyl carbonate, 9–fluorenylmethyl carbonate (Fmoc), alkyl ethyl carbonate, alkyl 2,2,2–trichloroethyl carbonate (Troc), 2–(trimethylsilyl)ethyl carbonate (TMSEC), 2–(phenylsulfonyl) ethyl carbonate (Psec), 2–(triphenylphosphonio) ethyl carbonate (Peoc), alkyl isobutyl carbonate, alkyl vinyl carbonate alkyl allyl carbonate, alkyl *p*–nitrophenyl carbonate, alkyl benzyl carbonate, alkyl *p*–methoxybenzyl carbonate, alkyl 3,4–dimethoxybenzyl carbonate, alkyl *o*–nitrobenzyl carbonate, alkyl *p*–nitrobenzyl carbonate, alkyl *S*–benzyl thiocarbonate, 4–ethoxy–1–napththyl carbonate, methyl dithiocarbonate, 2–iodobenzoate, 4–azidobutyrate, 4–nitro–4–methylpentanoate, *o*–(dibromomethyl)benzoate, 2–formylbenzenesulfonate, 2–(methylthiomethoxy)ethyl, 4–(methylthiomethoxy)butyrate, 2–(methylthiomethoxymethyl)benzoate, 2,6–dichloro–4–methylphenoxyacetate, 2,6–dichloro–4–(1,1,3,3–tetramethylbutyl)phenoxyacetate, 2,4–bis(1,1–dimethylpropyl)phenoxyacetate, chlorodiphenylacetate, isobutyrate, monosuccinoate, (*E*)–2–methyl–2–butenoate, *o*–(methoxycarbonyl)benzoate, α–naphthoate, nitrate, alkyl *N,N,N',N'*–tetramethylphosphorodiamidate, alkyl *N*–phenylcarbamate, borate, dimethylphosphinothioyl, alkyl 2,4–dinitrophenylsulfenate, sulfate, methanesulfonate (mesylate), benzylsulfonate, and tosylate (Ts). For protecting 1,2– or 1,3–diols, the protecting groups include methylene acetal, ethylidene acetal, 1–*t*–butylethylidene ketal, 1–phenylethylidene ketal, (4–methoxyphenyl)ethylidene acetal, 2,2,2–trichloroethylidene acetal, acetonide, cyclopentylidene ketal, cyclohexylidene ketal, cycloheptylidene ketal, benzylidene acetal, *p*–methoxybenzylidene acetal, 2,4–dimethoxybenzylidene ketal, 3,4–dimethoxybenzylidene acetal, 2–nitrobenzylidene acetal, methoxymethylene acetal, ethoxymethylene acetal, dimethoxymethylene ortho ester, 1–methoxyethylidene ortho ester, 1–ethoxyethylidine ortho ester, 1,2–dimethoxyethylidene ortho ester, α–methoxybenzylidene ortho ester, 1–(*N,N*–dimethylamino)ethylidene derivative, α–(*N,N'*–dimethylamino)benzylidene derivative, 2–oxacyclopentylidene ortho ester, di–*t*–butylsilylene group (DTBS), 1,3–(1,1,3,3–tetraisopropyldisiloxanylidene) derivative (TIPDS), tetra–*t*–butoxydisiloxane–1,3–diylidene derivative (TBDS), cyclic carbonates, cyclic boronates, ethyl boronate, and phenyl boronate.

In any case where a chemical variable (e.g., an R group) is shown attached to a bond that crosses a bond of ring, this means that one or more such variables are optionally attached to the ring having the crossed bond. Each R group on such a ring can be attached at any suitable

position, this is generally understood to mean that the group is attached in place of a hydrogen atom on the parent ring. This includes the possibility that two R groups can be attached to the same ring atom. Furthermore, when more than one R group is present on a ring, each may be the same or different than other R groups attached thereto, and each group is defined independently of other groups that may be attached elsewhere on the same molecule, even though they may be represented by the same identifier.

Biodegradable – As used herein, the term "biodegradable" refers to molecules that degrade (i.e., lose at least some of their covalent structure) under physiological or endosomal conditions. Biodegradable molecules are not necessarily hydrolytically degradable and may require enzymatic action to degrade.

Biomolecule – As used herein, the term "biomolecule" refers to molecules (e.g., polypeptides, amino acids, polynucleotides, nucleotides, polysaccharides, sugars, lipids, nucleoproteins, glycoproteins, lipoproteins, steroids, metabolites, etc.) whether naturally-occurring or artificially created (e.g., by synthetic or recombinant methods) that are commonly found in cells and tissues. Specific classes of biomolecules include, but are not limited to, enzymes, receptors, neurotransmitters, hormones, cytokines, cell response modifiers such as growth factors and chemotactic factors, antibodies, vaccines, haptens, toxins, interferons, ribozymes, anti-sense agents, plasmids, DNA, and RNA.

Drug – As used herein, the term "drug" refers to small molecules or biomolecules that alter, inhibit, activate, or otherwise affect a biological event. For example, drugs may include, but are not limited to, anti-AIDS substances, anti-cancer substances, antibiotics, anti-diabetic substances, immunosuppressants, anti-viral substances, enzyme inhibitors, neurotoxins, opioids, hypnotics, anti-histamines, lubricants, tranquilizers, anti-convulsants, muscle relaxants and anti-Parkinson substances, anti-spasmodics and muscle contractants including channel blockers, miotics and anti-cholinergics, anti-glaucoma compounds, anti-parasite and/or anti-protozoal compounds, modulators of cell-extracellular matrix interactions including cell growth inhibitors and anti-adhesion molecules, vasodilating agents, inhibitors of DNA, RNA or protein synthesis, anti-hypertensives, analgesics, anti-pyretics, steroidal and non-steroidal anti-inflammatory agents, anti-angiogenic factors, anti-secretory factors, anticoagulants and/or anti-thrombotic agents, local anesthetics, ophthalmics, prostaglandins, anti-depressants, anti-psychotic substances, anti-emetics, and imaging agents. A more complete listing of exemplary drugs suitable for use in the present invention may be found in "Pharmaceutical Substances: Syntheses, Patents, Applications" by Axel Kleemann and Jurgen Engel, Thieme Medical Publishing, 1999; the "Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals", edited by Susan Budavari *et al.*, CRC Press, 1996, and the United States Pharmacopeia-

25/National Formulary-20, published by the United States Pharmcopeial Convention, Inc., Rockville MD, 2001.

Exogenous – As used herein, an "exogenous" molecule is one which is not present at significant levels in a patient unless administered to the patient. In certain embodiments the patient is a mammal, e.g., a human, a dog, a cat, a rat, a minipig, etc. As used herein, a molecule is not present at significant levels in a patient if normal serum for that type of patient includes less than 0.1 mM of the molecule. In certain embodiments normal serum for the patient may include less than 0.08 mM, less than 0.06 mM, or less than 0.04 mM of the molecule.

Hyperbranched – As used herein, a "hyperbranched" structure is a covalent structure that includes at least one branched branch (e.g., a dendrimeric structure). A hyperbranched structure may include polymeric and/or non-polymeric substructures.

Normal serum – As used herein, "normal serum" is serum obtained by pooling approximately equal amounts of the liquid portion of coagulated whole blood from five or more non-diabetic patients. A non-diabetic human patient is a randomly selected 18-30 year old who presents with no diabetic symptoms at the time blood is drawn.

Polymer – As used herein, a "polymer" or "polymeric structure" is a structure that includes a string of covalently bound monomers. A polymer can be made from one type of monomer or more than one type of monomer. The term "polymer" therefore encompasses copolymers, including block-copolymers in which different types of monomer are grouped separately within the overall polymer. A polymer can be linear or branched.

Polynucleotide – As used herein, a "polynucleotide" is a polymer of nucleotides. The terms "polynucleotide", "nucleic acid", and "oligonucleotide" may be used interchangeably. The polymer may include natural nucleosides (i.e., adenosine, thymidine, guanosine, cytidine, uridine, deoxyadenosine, deoxythymidine, deoxyguanosine, and deoxycytidine), nucleoside analogs (e.g., 2-aminoadenosine, 2-thiothymidine, inosine, pyrrolo-pyrimidine, 3-methyl adenosine, 5-methylcytidine, C5-bromouridine, C5-fluorouridine, C5-iodouridine, C5-propynyl-uridine, C5-propynyl-cytidine, C5-methylcytidine, 7-deazaadenosine, 7-deazaguanosine, 8-oxoadenosine, 8-oxoguanosine, O(6)-methylguanine, 4-acetylcytidine, 5-(carboxyhydroxymethyl)uridine, dihydrouridine, methylpseudouridine, 1-methyl adenosine, 1-methyl guanosine, N6-methyl adenosine, and 2-thiocytidine), chemically modified bases, biologically modified bases (e.g., methylated bases), intercalated bases, modified sugars (e.g., 2'-fluororibose, ribose, 2'-deoxyribose, 2´-O-methylcytidine, arabinose, and hexose), or modified phosphate groups (e.g., phosphorothioates and 5' -N-phosphoramidite linkages).

Polypeptide – As used herein, a "polypeptide" is a polymer of amino acids. The terms "polypeptide", "protein", "oligopeptide", and "peptide" may be used interchangeably.

Polypeptides may contain natural amino acids, non-natural amino acids (i.e., compounds that do not occur in nature but that can be incorporated into a polypeptide chain) and/or amino acid analogs as are known in the art. Also, one or more of the amino acid residues in a polypeptide may be modified, for example, by the addition of a chemical entity such as a carbohydrate group, a phosphate group, a farnesyl group, an isofarnesyl group, a fatty acid group, a linker for conjugation, functionalization, or other modification, etc. These modifications may include cyclization of the peptide, the incorporation of D-amino acids, etc.

Polysaccharide – As used herein, a "polysaccharide" is a polymer of saccharides. The terms "polysaccharide", "carbohydrate", and "oligosaccharide", may be used interchangeably. The polymer may include natural saccharides (e.g., arabinose, lyxose, ribose, xylose, ribulose, xylulose, allose, altrose, galactose, glucose, gulose, idose, mannose, talose, fructose, psicose, sorbose, tagatose, mannoheptulose, sedoheptulose, octolose, and sialose) and/or modified saccharides (e.g., 2′-fluororibose, 2′-deoxyribose, and hexose). Exemplary disaccharides include sucrose, lactose, maltose, trehalose, gentiobiose, isomaltose, kojibiose, laminaribiose, mannobiose, melibiose, nigerose, rutinose, and xylobiose.

Small molecule – As used herein, the term "small molecule" refers to molecules, whether naturally-occurring or artificially created (e.g., via chemical synthesis), that have a relatively low molecular weight. Typically, small molecules are monomeric and have a molecular weight of less than about 1500 Da. Preferred small molecules are biologically active in that they produce a local or systemic effect in animals, preferably mammals, more preferably humans. In certain preferred embodiments, the small molecule is a drug. Preferably, though not necessarily, the drug is one that has already been deemed safe and effective for use by the appropriate governmental agency or body. For example, drugs for human use listed by the FDA under 21 C.F.R. §§ 330.5, 331 through 361, and 440 through 460; drugs for veterinary use listed by the FDA under 21 C.F.R. §§ 500 through 589, are all considered acceptable for use in accordance with the present invention.

Treat – As used herein, the term "treat" (or "treating", "treated", "treatment", etc.) refers to the administration of a conjugate of the present disclosure to a subject in need thereof with the purpose to alleviate, relieve, alter, ameliorate, improve or affect a condition (e.g., diabetes), a symptom or symptoms of a condition (e.g., hyperglycemia), or the predisposition toward a condition.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1: Comparison between RP-HPLC chromatograms obtained for (a) exemplary conjugate synthesized using TSAT-C6 as the scaffold, AEM as the ligand, and NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulin as the drug (conjugate **I-1**) and (b) an insulin-glycogen conjugate synthesized according to Example 32.

Figure 2: Accelerated stability testing (AST) aggregation assay for conjugate **I-1** (□), conjugate **I-16** (△), and RHI (◆) in PBS buffer. The conjugates demonstrate greatly enhanced stability over pharmaceutical grade RHI.

Figure 3: Accelerated stability testing (AST) chemical stability results: (a) RP-HPLC AST conjugate stability and (b) LC/MS data on AST conjugates.

Figure 4: *In vivo* bioactivity in (n=4) non-diabetic, male Sprague-Dawley (SD) rats for fresh conjugate (▲) and 72 hr AST conjugate (○). The 72 hr AST conjugate bioactivity was indistinguishable from that of the fresh conjugate ($p > 0.21$ for all timepoints).

Figure 5: Blood glucose depression profile in non-diabetic, male SD rats (n = 3) for subcutaneously injected (▲) insulin-dextran (70 K) at a dose of ~ 20 U of insulin equivalents/kg.

Figure 6: Blood glucose depression profile in non-diabetic, male SD rats (n = 3) for subcutaneously injected (■) insulin-glycogen (Type II oyster) at a dose of ~ 2.5 U of insulin equivalents/kg.

Figure 7: Blood glucose levels resulting from a 3.5 U equivalent insulin/kg subcutaneous dose of (◆) TSAT-C6-AEM-2 insulin conjugate **I-1** and (□) soluble recombinant human insulin (RHI) in male non-diabetic SD rats. Each set of data represents the average and standard deviation for n = 6 rats.

Figure 8: Serum insulin concentrations resulting from a 3.5 U equivalent insulin/kg subcutaneous dose of (◆) TSAT-C6-AEM-2 insulin conjugate **I-1** and (□) soluble recombinant human insulin (RHI) in male non-diabetic SD rats. Each set of data represents the average and standard deviation for n = 6 rats.

Figure 9: Plot of (◆) serum insulin and (○) blood glucose levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats at time 0 with TSAT-C6-AEM-2 (B29-substituted) insulin conjugate **I-7** (5 U/kg). Data represents the average and standard deviation for n = 3 rats.

Figure 10: Chemical structures of AEG, AEM, AEBM and AETM. The affinity of these saccharide based ligands for Con A increases as shown.

Figure 11: Chemical structures of some exemplary non-dendrimeric conjugate intermediates. Exemplary conjugate ligands that include a saccharide are also shown for illustrative purposes (AEG, AEM, AEBM, AETM, AEGA and AEF).

Figure 12: Plot of serum insulin (left) and blood glucose (right) levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats at time 0 with TSAT-C6-AEM-2 insulin conjugate **I-1** (◆), soluble recombinant human insulin, (○) and insulin lispro (Δ) (all 3.5 U/kg). Data represents the average and standard deviation for n = 6 rats.

Figure 13: Plot of blood glucose levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3 for each formulation) at time 0 with TSAT-C6 based insulin conjugates with the different ligands as shown. The glucose lowering response decreases as the affinity of the ligand increases.

Figure 14: Plot of serum insulin (left) and blood glucose (right) levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3) at time 0 with TSAT-C6-AEM-2 conjugate **I-1** (3.5 U/kg).

Figure 15: Plot of serum insulin (left) and blood glucose (right) levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3) at time 0 with TSAT-C6-AEBM-2 **I-3** conjugate (5 U/kg).

Figure 16: Plot of serum insulin (left) and blood glucose (right) levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3) at time 0 with TSAT-C6-AEBM-1 AETM-1 conjugate **I-4** (5 U/kg).

Figure 17: Plot of serum insulin (left) and blood glucose (right) levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3) at time 0 with TSAT-C6-AETM-2 conjugate **I-2** (5 U/kg).

Figure 18: Plot of serum insulin and blood glucose levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3) at time 0 with TSAT-C6-AETM-2 conjugate **I-2** followed by IP injection of alpha-methyl mannose (left) or saline (right) after 15 minutes. Alpha-methyl mannose is a very high affinity saccharide which is capable of competing with AETM for binding to lectins such as Con A. As shown, the change in PK/PD profile that results from injection of alpha-methyl mannose is very significant ($p<0.05$).

Figure 19: Plot of serum insulin and blood glucose levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3) at time 0 with soluble recombinant human insulin (RHI) followed by IP injection of alpha-methyl mannose (left) or saline (right) after 15 minutes. As shown, no change in PK/PD profile results from injection of alpha-methyl mannose ($p>>0.05$).

Figure 20: Plot of serum insulin levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3 for each expt.) at time 0 with TSAT-C6-AETM-2 conjugate **I-2** followed by IP injection of alpha-methyl mannose (♦), L-fucose (■) or saline (▲) after 15 minutes. As shown, alpha-methyl mannose and L-fucose appear to exhibit the same kind of effect.

Figure 21: Plot of serum insulin levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats at time 0 with TSAT-C6-AETM-2 conjugate **I-2** followed by IP injection of glucose (♦), galactose (■) or saline (▲) after 15 minutes. As shown, galactose exhibits no effect as compared to saline. Glucose appears to exhibit a small effect; however, this is complicated by the fact that the exogenous insulin from the conjugate quickly lowers the glucose, so the sustained effect observed with alpha-methyl mannose and L-fucose does not occur.

Figure 22: Plot of serum insulin and blood glucose levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3) at time 0 with TSAT-C6-AETM-2 conjugate **I-2** solution at 5 U/kg dissolved in either (a) buffered saline containing 1M alpha-methyl mannose or (b) buffered saline. In (a) the rats were subsequently injected at 15 min. with the same volume of saline solution used in (b) at a different subcutaneous site than the one used for the conjugate solution. In (b) the rats were subsequently injected at 15 min. with the same volume of 1M alpha-methyl mannose solution used in (a) at a different subcutaneous site than the one used for the conjugate solution. As shown, the serum insulin levels do not increase and the blood glucose levels do not decrease in experiment (a) relative to experiment (b).

Figure 23: Plot of serum insulin and blood glucose levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3) at time 0 with TSAT-C6-AETM-2 conjugate **I-2** solution at 5 U/kg. At 15 min, 60 min, 120 min, or 240 min after the conjugate injection, the rats were given a 4g/kg IP a-MM injection.

Figure 24: Plot of serum insulin and blood glucose levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3) at time 0 with TSAT-C6-AEM-2 conjugate **I-7** followed by IP injection of alpha-methyl mannose (left) or saline (right) after 15 minutes. Alpha-methyl mannose is a very high affinity saccharide which is capable of competing with AEM for binding to lectins such as Con A. As shown, the change in PK/PD profile that results from injection of alpha-methyl mannose is very significant ($p<0.05$).

Figure 25: Plot of serum insulin and blood glucose levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3) at time 0 with TSAT-C6-GA-2 conjugate **I-5** followed by IP injection of alpha-methyl mannose (left) or saline (right) after 15 minutes. Alpha-methyl mannose is a very high affinity saccharide which is capable of competing with AEM for binding to lectins such as Con A. As shown, the change in PK/PD profile that results from injection of alpha-methyl mannose is not significant.

Figure 26: Plot of serum insulin and blood glucose levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3) at time 0 with DSS-C6-AEM-1 conjugate **I-8** followed by IP injection of alpha-methyl mannose (left) or saline (right) after 15 minutes. Alpha-methyl mannose is a very high affinity saccharide which is capable of competing with

n and v

Each occurrence of n is independently an integer from 0 to 5, inclusive, with the proviso that within each k-branch at least one occurrence of n is ≥ 1. Branches within a given k-branch are referred to herein as n-branches.

In certain embodiments, each occurrence of [A] in a p-bracketed moiety is substituted by a number of n-bracketed moieties corresponding to a value of n ≥ 1, e.g., see formula (Ia) above. In some such embodiments, each occurrence of n in the conjugate is the same. In some of these embodiments, n = 1 or 2.

In other embodiments, only terminal occurrences of [A] in a p-bracketed moiety are substituted by a number of n-bracketed moieties corresponding to a value of n ≥ 1, e.g., see formula (Ib) above. In certain embodiments, each k-branch includes just one occurrence of n ≥ 1 (i.e., all other occurrences of n = 0). In some such embodiments, each occurrence of n in the conjugate is the same. In some of these embodiments, n = 1 or 2.

Each occurrence of v is independently an integer from 0 to 5, inclusive, with the proviso that within each k-branch at least one occurrence of v is ≥ 1.

In certain embodiments, each occurrence of [A] in an m-bracketed moiety is substituted by a number of B moieties corresponding to the value of v ≥ 1, e.g., see formula (Ic) above. In some such embodiments, each occurrence of v in the conjugate is the same. In some of these embodiments, v = 1 or 2.

In other embodiments, only terminal occurrences of [A] in an m-bracketed moiety are substituted by a number of B moieties corresponding to a value of v ≥ 1, e.g., see formula (Id) above. In certain embodiments, each k-branch includes just one occurrence of v ≥ 1 (i.e., all other occurrences of v = 0). In some such embodiments, each occurrence of v in the conjugate is the same. In some of these embodiments, v = 1 or 2. In certain embodiments, each n-branch includes at least one occurrence of v ≥ 1. In certain embodiment, each n-branch includes just one occurrence of v ≥ 1 (i.e., all other occurrences of v = 0). In some such embodiments, each occurrence of v in the conjugate is the same. In some of these embodiments, v = 1 or 2.

j

j of formula (II) is an integer from 1 to 4, inclusive, and defines the number of conjugations to the D group. In certain embodiments, j = 1. In certain embodiments, j = 2. In some embodiments, j = 3. In other embodiments, j = 4.

is less than 1 pmol/L. For example, a component may be non-covalently bound to a conjugate framework via a non-covalent ligand-receptor pair as is well known in the art (e.g., without limitation a biotin-avidin based pair). In such an embodiment, one member of the ligand receptor-pair is covalently bound to the component while the other member of the pair is covalently bound to the conjugate framework. When the component and conjugate framework are combined, the strong non-covalent interaction between the ligand and its receptor causes the component to become non-covalently bound to the conjugate framework. Typical ligand/receptor pairs include protein/co-factor and enzyme/substrate pairs. Besides the commonly used biotin/avidin pair, these include without limitation, biotin/streptavidin, digoxigenin/anti-digoxigenin, FK506/FK506-binding protein (FKBP), rapamycin/FKBP, cyclophilin/cyclosporin and glutathione/glutathione transferase pairs. Other suitable ligand/receptor pairs would be recognized by those skilled in the art, e.g., monoclonal antibodies paired with a epitope tag such as, without limitation, glutathione-S-transferase (GST), c-myc, FLAG® and further those described in Kessler pp. 105-152 of *Advances in Mutagenesis"* Ed. by Kessler, Springer-Verlag, 1990; "*Affinity Chromatography: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)*" Ed. by Pascal Baillon, Humana Press, 2000; and "*Immobilized Affinity Ligand Techniques*" by Hermanson et al., Academic Press, 1992.

k and q

k is an integer from 1 to 12, inclusive. In certain embodiments, k = 1 to 6, e.g., 1, 2, or 3. q is an integer from 1 to 4, inclusive, and defines the number of D groups which are bound to the central A group. In certain embodiments, q = 1. In some embodiments, q = 2. In certain embodiments, k + q is an integer from 2 to 6, inclusive. In certain embodiments, k + q = 2, 3 or 4.

p and m

Each occurrence of p is independently an integer from 1 to 5, inclusive. In certain embodiments, each occurrence of p is the same. In certain embodiments, p = 1, 2 or 3. In certain embodiments, p = 1.

Each occurrence of m is independently an integer from 1 to 5, inclusive. In certain embodiments, each occurrence of m is the same. In certain embodiments, m = 1, 2 or 3. In certain embodiments, m = 1.

AEM for binding to lectins such as Con A. As shown, the change in PK/PD profile that results from injection of alpha-methyl mannose is as not significant.

Figure 27: Plot of serum insulin and blood glucose levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3) at time 0 with TSPE-AEM-3 conjugate **I-9** followed by IP injection of alpha-methyl mannose (left) or saline (right) after 15 minutes. Alpha-methyl mannose is a very high affinity saccharide which is capable of competing with AEM for binding to lectins such as Con A. As shown, the change in PK/PD profile that results from injection of alpha-methyl mannose is significant ($p<0.05$).

Figure 28: Plot of serum insulin and blood glucose levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3) at time 0 with DSS-AETM-1 conjugate **I-10** followed by IP injection of alpha-methyl mannose (left) or saline (right) after 15 minutes. Alpha-methyl mannose is a very high affinity saccharide which is capable of competing with AEM for binding to lectins such as Con A. As shown, the change in PK/PD profile that results from injection of alpha-methyl mannose is significant ($p<0.05$).

Figure 29: Plot of serum insulin and blood glucose levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3) at time 0 with TSPE-AETM-3 conjugate **I-11** followed by IP injection of alpha-methyl mannose (left) or saline (right) after 15 minutes. Alpha-methyl mannose is a very high affinity saccharide which is capable of competing with AEM for binding to lectins such as Con A. As shown, the change in PK/PD profile that results from injection of alpha-methyl mannose is significant ($p<0.05$).

Figure 30: Plot of serum insulin concentration as a function of time for 0.4 mg/kg i.v. injections of (♦) RHI and (▲) TSAT-C6-AETM-2 conjugate **I-6** into non-diabetic, male SD rats (n=3 per group). Data (average of n=3) is fit using a two-compartment bi-exponential model. The TSAT-C6-AETM-2 conjugate is eliminated from serum much faster than RHI.

Figure 31: Plots of serum insulin (♦) and blood glucose (O) levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3 per dose) at time 0 with long-acting TSAT-C6-AETM-2 (**I-6**) conjugates followed by IP injection of glucose (4 g/kg) at 240 minutes. Formulations were prepared as described in Example 51: (a) 1xP-1xZ, (b) 4xP-4xZ, and (c) 10xP-4xZ.

Figure 32: Plots of serum insulin (♦) and blood glucose (O) levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3 per dose) at time 0 with long-acting TSAT-C6-AETM-2 (**I-6**) conjugates followed by IP injection of glucose (4 g/kg) at 240 minutes. Formulations were prepared as described in Example 52: (a) 4xP-1xZ and (b) 4xP-2xZ.

Figure 33: Plots of serum insulin (♦) and blood glucose (O) levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3 per dose) at time 0 with long-acting

TSAT-C6-AETM-2 (**I-6**) conjugates followed by IP injection of glucose (4 g/kg) at 240 minutes. Formulations were prepared as described in Example 52: (a) 10xP-1xZ and (b) 10xP-2xZ.

Figure 34: Plots of serum insulin (♦) and blood glucose (O) levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3 per dose) at time 0 with long-acting TSAT-C6-AETM-2 (**I-6**) conjugates followed by IP injection of glucose (4 g/kg) at 240 minutes. Formulations were prepared as described in Example 53: (a) no cresol and (b) 4x cresol.

Figure 35: Plots of serum insulin (♦) and blood glucose (O) levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3 per dose) at time 0 with long-acting TSAT-C6-AETM-2 (**I-6**) conjugates followed by IP injection of glucose (4 g/kg) at 240 minutes. Formulations were prepared as described in Example 54: (a) no salt, (b) 3.3x salt, and (c) glycerol.

Figure 36: Plots of serum insulin (♦) and blood glucose (O) levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3 per dose) at time 0 with long-acting TSAT-C6-AETM-2 (**I-6**) conjugates followed by IP injection of glucose (4 g/kg) at 240 minutes. Formulations were prepared containing increasing amounts of unmodified insulin as described in Example 55: (a) 1/24, (b) 1/12, and (c) 1/6.

Figure 37: Plot of serum insulin (♦) and blood glucose (O) levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3 per dose) at time 0 with a long-acting TSAT-C6-AETM-2 conjugate **I-6** prepared according to Example 56 followed by IP injection of glucose (4 g/kg) at 240 minutes.

Figure 38: Plot of serum insulin (♦) and blood glucose (O) levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3 per dose) at time 0 with a long-acting TSAT-C6-AETM-2 conjugate **I-6** prepared according to Example 57 followed by IP injection of glucose (4 g/kg) at 240 minutes. The material was injected after storage at 2-8 C for (a) one week or (b) two weeks.

Figure 39: Plot of serum insulin (♦) and blood glucose (O) levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3 per dose) at time 0 with a long-acting TSAT-C6-AETM-2 conjugate **I-6** prepared according to Example 57 followed by IP injection of glucose (4 g/kg) at 240 minutes. The material was injected after storage at room temperature for (a) one week or (b) two weeks.

Figure 40: Plot of serum insulin (♦) and blood glucose (O) levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3 per dose) at time 0 with long-acting conjugate formulations prepared according to Example 58 followed by IP injection of glucose (4 g/kg) at 240 minutes. The conjugates are DSS-AEM-1 (**I-8**), DSS-AETM-1 (**I-10**), TSAT-C6-AEM-2 (**I-7**), C6-amide-AEM-2 (**I-17**), TSPE-AEM-3 (**I-9**), and TSPE-AETM-3 (**I-11**).

Figure 41: Plot of serum insulin (♦) and blood glucose (O) levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3 per dose) at time 0 with long-acting conjugate formulations prepared according to Example 59 followed by IP injection of alpha-methyl mannose (4 g/kg) at 240 minutes. The conjugates are (a) TSAT-C6-AETM-2 (**I-6**) and (b) TSAT-C6-GA-2.

Figure 42: Plot of blood glucose levels following subcutaneous injection in non-diabetic (normals) and diabetic (DM's) male SD rats at time 0 with TSAT-C6-AETM-2 (B29-substituted, PZI) conjugate **I-6**. The conjugate was administered at 5, 10 and 20 U/kg. As shown, the non-diabetic male SD rats did not show any hypoglycemia while the glucose levels in diabetic male SD rats showed a clear dose proportional response that lasted for over 8 hours at the highest dose.

Figure 43: Plot of blood glucose levels over 24 hours following subcutaneous injection in non-diabetic (normals) and diabetic (DM's) male SD rats at time 0 with TSAT-C6-AETM-2 (B29-substituted, PZI) conjugate **I-6**. The conjugate was administered at 7, 14 and 28 U/kg.

Figure 44: Plot of serum insulin (♦) and blood glucose (O) levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3 per dose) at time 0 with a long-acting conjugate **I-17** formulation prepared according to Example 67 followed by IP injection of glucose (4 g/kg) at 240 minutes.

Figure 45: Structures of exemplary insulin-conjugates. As described in the Examples, these conjugates were each prepared with recombinant wild-type human insulin (see Figure 63 for the structure of wild-type human insulin). The symbol "insulin" inside an oval as shown in Figure 45 is therefore primarily intended to represent a wild-type human insulin. As discussed herein, it is to be understood that the present disclosure also encompasses *inter alia* versions of these and other conjugates that include an insulin molecule other than wild-type human insulin.

Figure 46: Plots of serum insulin concentration as a function of time following injection of conjugate **I-6** or RHI (left) and conjugate **I-6** with and without glucose or α-methyl mannose (right).

Figure 47: The first two panels show plots of serum insulin (♦) and blood glucose (O) levels following constant intravenous (i.v.) infusion of RHI (3.5 mU/min) or **I-6** (15 mU/min) in non-diabetic, male SD rats (n=3). IP injection of glucose (4 g/kg) was given at 240 minutes. The next three panels compare plots of serum insulin (♦) and blood glucose (O) levels following constant intravenous (i.v.) infusion of RHI (3.5 mU/min) or **I-6** (15 mU/min) in non-diabetic, male SD rats (n=3) when an IP injection of glucose (4, 2, or 1 g/kg) was given at 240 minutes.

Figure 48: Plots of serum insulin concentration as a function of time following injection of conjugates with and without glucose or α-methyl mannose. Rats were infused i.v. with sugar

solution at t = -60 min and throughout study. Each conjugate was injected at 10 U/kg i.v. at time 0, and serum conjugate concentrations were measured.

Figure 49: Composition of insulin conjugates tested in non-diabetic minipig sugar-dependent elimination half-life studies. As described in the Examples, these conjugates were each prepared with recombinant wild-type human insulin (see Figure 63 for the structure of wild-type human insulin). The schematic in Figure 49 is therefore primarily intended to represent a wild-type human insulin. As discussed herein, it is to be understood that the present disclosure also encompasses *inter alia* versions of these and other conjugates that include an insulin molecule other than wild-type human insulin.

Figure 50: β-phase elimination half-life results in non-diabetic minipigs during glucose, α-methyl mannose or saline infusion.

Figure 51: Plots of serum concentrations of (a) recombinant human insulin (RHI) and (b) Di-Sub-AETM-2 insulin conjugate **II-2** following a 0.1 U/kg intravenous (i.v.) injection into non-diabetic male Yucatan minipigs equipped with dual vascular access ports (n = 3 per study). In each experiment, the animals were infused with (◆) i.v. alpha methyl mannose (a-MM) solution (25% w/v infused at constant rate of 80 ml/h) or (▲) no solution. Data are plotted as the average values fit with a curve derived from the two-compartment, bi-exponential model.

Figure 52: Blood glucose depression curves in non-diabetic male Yucatan minipigs equipped with dual vascular access ports (n = 3 per study) following i.v. injection of conjugates at 0.1 U/kg under conditions of (a) no i.v. sugar infusion or (b) i.v. alpha methyl mannose (a-MM) infusion (25% w/v infused at constant rate of 80 ml/h). (▩)RHI, (◌) **I-7**, (◈) **I-6**, (▲) **I-11**, and (●) **II-2**.

Figure 53: Blood glucose levels in (a, ——, closed symbols) alloxan-diabetic Yucatan minipigs (n=3 per dose) and (b, - - - -, open symbols) non-diabetic Yucatan minipigs (n=3 per dose) under fasting conditions after a sub-Q injection at time 0 with soluble Di-Sub-AETM-2 insulin conjugate **II-2** at doses of 0.25, 0.50, and 1.00 U/kg. Data are plotted as the average values ± one standard deviation. NOTE: Figure 53(b) scale is enlarged for clarity.

Figure 54: Blood glucose levels in (a, ——, closed symbols) alloxan-diabetic Yucatan minipigs (n=3 per dose) and (b, - - - -, open symbols) non-diabetic Yucatan minipigs (n=3 per dose) under fasting conditions after a sub-Q injection at time 0 with soluble recombinant human insulin (RHI) at doses of (▲,△) 0.063 and (▩,□) 0.125 U/kg. Data are plotted as the average values ± one standard deviation. NOTE: Figure 54(b) scale is enlarged for clarity.

Figure 55: Additional insulin conjugates for use in non-diabetic minipig sugar-dependent elimination half-life studies. As described in the Examples, these conjugates were each prepared with recombinant wild-type human insulin (see Figure 63 for the structure of wild-type human

insulin). The schematic in Figure 55 is therefore primarily intended to represent a wild-type human insulin. As discussed herein, it is to be understood that the present disclosure also encompasses *inter alia* versions of these and other conjugates that include an insulin molecule other than wild-type human insulin.

Figure 56: Plots of serum insulin concentration as a function of time following administration of RHI or conjugate **I-6** in rats and minipigs.

Figure 57: Summary of i.v. half-life results in minipigs for additional insulin-conjugates.

Figure 58: Plot of serum insulin levels after a single subcutaneous injection of 0.25, 0.5 and 1 U/kg insulin conjugate **II-2** in diabetic and normal minipigs.

Figure 59: Plots of serum glucose levels after i.v. injections of RHI and conjugates **I-6**, **II-3** and **II-2** in minipigs with and without a-MM infusion.

Figure 60: Structures of selected insulin conjugates (C3, C4, and C7) tested in minipigs as controls, along with insulin conjugates **I-6**, **I-12**, **II-2**, and **II-3**. As described in the Examples, these conjugates were each prepared with recombinant wild-type human insulin (see Figure 63 for the structure of wild-type human insulin). The schematic in Figure 60 is therefore primarily intended to represent a wild-type human insulin. As discussed herein, it is to be understood that the present disclosure also encompasses *inter alia* versions of these and other conjugates that include an insulin molecule other than wild-type human insulin.

Figure 61: Plots of serum glucose levels after i.v. injections of RHI and insulin conjugates **I-6**, **I-12**, **II-2** and **C3** in minipigs with and without a-MM infusion.

Figure 62: Plots of serum glucose levels after i.v. injections of RHI and insulin conjugates **C7**, **C4**, **II-3** and **II-2** in minipigs with and without a-MM infusion.

Figure 63: Structure of wild-type human insulin.

DETAILED DESCRIPTION OF VARIOUS EMBODIMENTS

This application refers to a number of documents including patent and non-patent documents. The entirety of each of these documents is incorporated herein by reference.

In one aspect, the disclosure provides methods for controlling the pharmacokinetic (PK) and/or pharmacodynamic (PD) profiles of a drug such as insulin in a manner that is responsive to the systemic concentrations of a saccharide such as glucose. As discussed in the Examples, the methods are based in part on the discovery that when certain insulin-conjugates were modified to include high affinity saccharide ligands they could be made to exhibit PK/PD profiles that responded to saccharide concentration changes even in the absence of an exogenous multivalent saccharide-binding molecule such as Con A. This finding was unexpected and provides an unprecedented opportunity to generate simple lectin-free saccharide-responsive drug systems. In

another aspect, the disclosure provides exemplary conjugates and methods for making these. In general, these conjugates include a drug and one or more separate ligands that each include a saccharide. In certain embodiments, the ligands are capable of competing with a saccharide (e.g., glucose or mannose) for binding to an endogenous saccharide-binding molecule. In certain embodiments, the ligands are capable of competing with glucose or mannose for binding to Con A. As discussed in more detail below, in certain embodiments, the ligands and drug may be covalently or non-covalently attached to a conjugate framework. In certain embodiments, the framework is non-polymeric. In certain embodiments, a conjugate may have a polydispersity index of one and a MW of less than about 20,000 Da. In certain embodiments, the conjugate is of formula (I) or (II) as defined and described herein. In certain embodiments, the conjugate is long acting (i.e., exhibits a PK profile that is more sustained than soluble recombinant human insulin or RHI).

As discussed in more detail below, it is to be understood that the methods, conjugates and formulations that are described herein are in no way limited to the delivery of insulin and that they can be used to deliver any drug. It is also to be understood that the methods may be used to deliver drugs in response to saccharides other than glucose. In particular, as discussed in the Examples, exemplary conjugates have been shown to respond to exogenous saccharides such as alpha-methyl mannose and L-fucose. In certain embodiments, this can be used to prepare conjugates that can be controlled by administration of one of these exogenous saccharides (i.e., instead of or in addition to being controlled by fluctuations in endogenous glucose).

Conjugates

In one aspect, the disclosure provides conjugates that comprise a drug and a ligand that includes a first saccharide. The ligand (or ligands when the conjugates include more than one ligand) are such that when the conjugate is administered to a mammal at least one pharmacokinetic or pharmacodynamic property of the conjugate is sensitive to the serum concentration of a second saccharide. In certain embodiments, the PK and/or PD properties of the conjugate are sensitive to the serum concentration of an endogenous saccharide such as glucose. In certain embodiments, the PK and/or PD properties of the conjugate are sensitive to the serum concentration of an exogenous saccharide, e.g., without limitation, mannose, L-fucose, N-acetyl glucosamine and/or alpha-methyl mannose.

As discussed in more detail below, in certain embodiments, the ligand(s) and drug may be covalently or non-covalently attached to a conjugate framework.

In certain embodiments, the molecular weight of the conjugate absent the drug is less than about 10,000 Da. For example, the molecular weight of the conjugate absent the drug may

be in the range of about 250 to about 5,000 Da, about 450 to about 3,500 Da, about 750 to about 2,500 Da, or about 900 to about 2,000 Da.

In certain embodiments, the molecular weight of the conjugate including the drug is less than about 20,000 Da. For example, the molecular weight of the conjugate including the drug may be in the range of about 2,000 to about 18,000 Da, about 4,000 to about 15,000 Da, about 5,000 to about 10000 Da, or about 6,500 to about 8,000 Da.

In certain embodiments, the conjugate has a unique molecular weight (i.e., has a polydispersity index of one).

PK and PD properties

In various embodiments, the pharmacokinetic and/or pharmacodynamic behavior of a conjugate (i.e., conjugated drug and/or drug which has been released from a conjugate by chemical or enzymatic degradation) may be modified by variations in the serum concentration of a saccharide.

For example, from a pharmacokinetic (PK) perspective, the serum concentration curve may shift upward when the serum concentration of the saccharide (e.g., glucose) increases or when the serum concentration of the saccharide crosses a threshold (e.g., is higher than normal glucose levels).

In certain embodiments, the serum concentration curve of a conjugate is substantially different when administered to the mammal under fasted and hyperglycemic conditions. As used herein, the term "substantially different" means that the two curves are statistically different as determined by a student t-test ($p < 0.05$). As used herein, the term "fasted conditions" means that the serum concentration curve was obtained by combining data from five or more fasted non-diabetic individuals. In certain embodiments, a fasted non-diabetic individual is a randomly selected 18-30 year old human who presents with no diabetic symptoms at the time blood is drawn and who has not eaten within 12 hours of the time blood is drawn. As used herein, the term "hyperglycemic conditions" means that the serum concentration curve was obtained by combining data from five or more fasted non-diabetic individuals in which hyperglycemic conditions (glucose C_{max} at least 100 mg/dL above the mean glucose concentration observed under fasted conditions) were induced by concurrent administration of conjugate and glucose. Concurrent administration of conjugate and glucose simply requires that the glucose C_{max} occur during the period when the conjugate is present at a detectable level in the serum. For example, a glucose injection (or ingestion) could be timed to occur shortly before, at the same time or shortly after the conjugate is administered. In certain embodiments, the conjugate and glucose are administered by different routes or at different locations. For example, in certain

embodiments, the conjugate is administered subcutaneously while glucose is administered orally or intravenously.

In certain embodiments, the serum C_{max} of the conjugate is higher under hyperglycemic conditions as compared to fasted conditions. Additionally or alternatively, in certain embodiments, the serum area under the curve (AUC) of the conjugate is higher under hyperglycemic conditions as compared to fasted conditions. In various embodiments, the serum elimination rate of the conjugate is slower under hyperglycemic conditions as compared to fasted conditions. As discussed in the Examples, we have found that in certain embodiments, the serum concentration curve of the conjugates can be fit using a two-compartment bi-exponential model with one short and one long half-life. The long half-life appears to be particularly sensitive to glucose concentration. Thus, in certain embodiments, the long half-life is longer under hyperglycemic conditions as compared to fasted conditions. In certain embodiments, the fasted conditions involve a glucose C_{max} of less than 100 mg/dL (e.g., 80 mg/dL, 70 mg/dL, 60 mg/dL, 50 mg/dL, etc.). In certain embodiments, the hyperglycemic conditions involve a glucose C_{max} in excess of 200 mg/dL (e.g., 300 mg/dL, 400 mg/dL, 500 mg/dL, 600 mg/dL, etc.). It will be appreciated that other PK parameters such as mean serum residence time (MRT), mean serum absorption time (MAT), etc. could be used instead of or in conjunction with any of the aforementioned parameters.

The normal range of glucose concentrations in humans, dogs, cats, and rats is 60 to 200 mg/dL. One skilled in the art will be able to extrapolate the following values for species with different normal ranges (e.g., the normal range of glucose concentrations in miniature pigs is 40 to 150 mg/dl). Glucose concentrations below 60 mg/dL are considered hypoglycemic. Glucose concentrations above 200 mg/dL are considered hyperglycemic. In certain embodiments, the PK properties of the conjugate may be tested using a glucose clamp method (see Examples) and the serum concentration curve of the conjugate may be substantially different when administered at glucose concentrations of 50 and 200 mg/dL, 50 and 300 mg/dL, 50 and 400 mg/dL, 50 and 500 mg/dL, 50 and 600 mg/dL, 100 and 200 mg/dL, 100 and 300 mg/dL, 100 and 400 mg/dL, 100 and 500 mg/dL, 100 and 600 mg/dL, 200 and 300 mg/dL, 200 and 400 mg/dL, 200 and 500 mg/dL, 200 and 600 mg/dL, etc. Additionally or alternatively, the serum T_{max}, serum C_{max}, mean serum residence time (MRT), mean serum absorption time (MAT) and/or serum half-life may be substantially different at the two glucose concentrations. As discussed below, in certain embodiments, 100 mg/dL and 300 mg/dL may be used as comparative glucose concentrations. It is to be understood however that the present disclosure encompasses each of these embodiments with an alternative pair of comparative glucose concentrations including, without limitation, any one of the following pairs: 50 and 200 mg/dL, 50 and 300 mg/dL, 50 and 400 mg/dL, 50 and

500 mg/dL, 50 and 600 mg/dL, 100 and 200 mg/dL, 100 and 400 mg/dL, 100 and 500 mg/dL, 100 and 600 mg/dL, 200 and 300 mg/dL , 200 and 400 mg/dL, 200 and 500 mg/dL, 200 and 600 mg/dL, etc.

Thus, in certain embodiments, the C_{max} of the conjugate is higher when administered to the mammal at the higher of the two glucose concentrations (e.g., 300 vs. 100 mg/dL glucose). In certain embodiments, the C_{max} of the conjugate is at least 50% (e.g., at least 100%, at least 200% or at least 400%) higher when administered to the mammal at the higher of the two glucose concentrations (e.g., 300 vs. 100 mg/dL glucose).

In certain embodiments, the AUC of the conjugate is higher when administered to the mammal at the higher of the two glucose concentrations (e.g., 300 vs. 100 mg/dL glucose). In certain embodiments, the AUC of the conjugate is at least 50% (e.g., at least e.g., at least 100%, at least 200% or at least 400%) higher when administered to the mammal at at the higher of the two glucose concentrations (e.g., 300 vs. 100 mg/dL glucose).

In certain embodiments, the serum elimination rate of the conjugate is slower when administered to the mammal at the higher of the two glucose concentrations (e.g., 300 vs. 100 mg/dL glucose). In certain embodiments, the serum elimination rate of the conjugate is at least 25% (e.g., at least 50%, at least 100%, at least 200%, or at least 400%) faster when administered to the mammal at at the lower of the two glucose concentrations (e.g., 100 vs. 300 mg/dL glucose).

As discussed in the Examples, we have found that in certain embodiments the serum concentration curve of conjugates can be fit using a two-compartment bi-exponential model with one short and one long half-life. The long half-life appears to be particularly sensitive to glucose concentration. Thus, in certain embodiments, the long half-life is longer when administered to the mammal at at the higher of the two glucose concentrations (e.g., 300 vs. 100 mg/dL glucose). In certain embodiments, the long half-life is at least 50% (e.g., at least 100%, at least 200% or at least 400%) longer when administered to the mammal at at the higher of the two glucose concentrations (e.g., 300 vs. 100 mg/dL glucose).

In certain embodiments, the present disclosure provides a method in which the serum concentration curve of a conjugate is obtained at two different glucose concentrations (e.g., 300 vs. 100 mg/dL glucose); the two curves are fit using a two-compartment bi-exponential model with one short and one long half-life; and the long half-lives obtained under the two glucose concentrations are compared. In certain embodiments, this method may be used as an assay for testing or comparing the glucose sensitivity of one or more conjugates.

In certain embodiments, the present disclosure provides a method in which the serum concentration curves of a conjugated drug (e.g., an insulin conjugate of the present disclosure)

and an unconjugated version of the drug (e.g., RHI) are obtained under the same conditions (e.g., fasted conditions); the two curves are fit using a two-compartment bi-exponential model with one short and one long half-life; and the long half-lives obtained for the conjugated and unconjugated drug are compared. In certain embodiments, this method may be used as an assay for identifying conjugates that are cleared more rapidly than the unconjugated drug.

In certain embodiments, the serum concentration curve of a conjugate is substantially the same as the serum concentration curve of an unconjugated version of the drug when administered to the mammal under hyperglycemic conditions. As used herein, the term "substantially the same" means that there is no statistical difference between the two curves as determined by a student t-test ($p > 0.05$). In certain embodiments, the serum concentration curve of the conjugate is substantially different from the serum concentration curve of an unconjugated version of the drug when administered under fasted conditions. In certain embodiments, the serum concentration curve of the conjugate is substantially the same as the serum concentration curve of an unconjugated version of the drug when administered under hyperglycemic conditions and substantially different when administered under fasted conditions. In certain embodiments, the hyperglycemic conditions involve a glucose C_{max} in excess of 200 mg/dL (e.g., 300 mg/dL, 400 mg/dL, 500 mg/dL, 600 mg/dL, etc.). In certain embodiments, the fasted conditions involve a glucose C_{max} of less than 100 mg/dL (e.g., 80 mg/dL, 70 mg/dL, 60 mg/dL, 50 mg/dL, etc.). It will be appreciated that any of the aforementioned PK parameters such as serum T_{max}, serum C_{max}, AUC, mean serum residence time (MRT), mean serum absorption time (MAT) and/or serum half-life could be compared.

From a pharmacodynamic (PD) perspective, the bioactivity of the conjugate may increase when the glucose concentration increases or when the glucose concentration crosses a threshold, e.g., is higher than normal glucose levels. In certain embodiments, the bioactivity of a conjugate is lower when administered under fasted conditions as compared to hyperglycemic conditions. In certain embodiments, the fasted conditions involve a glucose C_{max} of less than 100 mg/dL (e.g., 80 mg/dL, 70 mg/dL, 60 mg/dL, 50 mg/dL, etc.). In certain embodiments, the hyperglycemic conditions involve a glucose C_{max} in excess of 200 mg/dL (e.g., 300 mg/dL, 400 mg/dL, 500 mg/dL, 600 mg/dL, etc.).

In certain embodiments, the PD properties of the conjugate may be tested by measuring the glucose infusion rate (GIR) required to maintain a steady glucose concentration. According to such embodiments, the bioactivity of the conjugate may be substantially different when administered at glucose concentrations of 50 and 200 mg/dL, 50 and 300 mg/dL, 50 and 400 mg/dL, 50 and 500 mg/dL, 50 and 600 mg/dL, 100 and 200 mg/dL, 100 and 300 mg/dL, 100 and 400 mg/dL, 100 and 500 mg/dL, 100 and 600 mg/dL, 200 and 300 mg/dL , 200 and 400 mg/dL,

200 and 500 mg/dL, 200 and 600 mg/dL, etc. Thus, in certain embodiments, the bioactivity of the conjugate is higher when administered to the mammal at the higher of the two glucose concentrations (e.g., 300 vs. 100 mg/dL glucose). In certain embodiments, the bioactivity of the conjugate is at least 25% (e.g., at least 50% or at least 100%) higher when administered to the mammal at the higher of the two glucose concentrations (e.g., 300 vs. 100 mg/dL glucose).

In certain embodiments, the conjugate includes an insulin molecule as the drug. According to such embodiments, the PD behavior for insulin can be observed by comparing the time to reach minimum blood glucose concentration (T_{nadir}), the duration over which the blood glucose level remains below a certain percentage of the initial value (e.g., 70% of initial value or $T_{70\% BGL}$), etc.

In general, it will be appreciated that any of the PK and PD characteristics discussed in this section can be determined according to any of a variety of published pharmacokinetic and pharmacodynamic methods (e.g., see Baudys et al., *Bioconjugate Chem.* 9:176-183, 1998 for methods suitable for subcutaneous delivery). It is alos to be understood that the PK and/or PD properties may be measured in any mammal (e.g., a human, a rat, a cat, a minipig, a dog, etc.). In certain embodiments, PK and/or PD properties are measured in a human. In certain embodiments, PK and/or PD properties are measured in a rat. In certain embodiments, PK and/or PD properties are measured in a minipig. In certain embodiments, PK and/or PD properties are measured in a dog.

It will also be appreciated that while the foregoing was described in the context of glucose-responsive conjugates, the same properties and assays apply to conjugates that are responsive to other saccharides including exogenous saccharides, e.g., mannose, L-fucose, N-acetyl glucosamine, alpha-methyl mannose, etc. As discussed in more detail below and in the Examples, instead of comparing PK and/or PD properties under fasted and hyperglycemic conditions, the PK and/or PD properties may be compared under fasted conditions with and without administration of the exogenous saccharide. It is to be understood that conjugates can be designed that respond to different C_{max} values of a given exogenous saccharide.

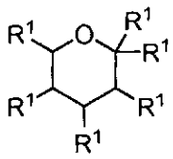
Ligand(s)

In general, the conjugates include at least one ligand. In certain embodiments, the conjugates include a single ligand. In certain embodiments, the conjugates include at least two separate ligands, e.g., 2, 3, 4, 5 or more ligands. When more than one ligand is present the ligands may have the same or different chemical structures.

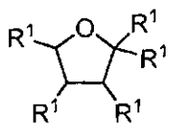
In certain embodiments, the ligands are capable of competing with a saccharide (e.g., glucose or mannose) for binding to an endogenous saccharide-binding molecule (e.g., without

limitation surfactant proteins A and D or members of the selectin family). In certain embodiments, the ligands are capable of competing with a saccharide (e.g., glucose or mannose) for binding to cell-surface sugar receptor (e.g., without limitation macrophage mannose receptor, glucose transporter ligands, endothelial cell sugar receptors, or hepatocyte sugar receptors). In certain embodiments, the ligands are capable of competing with glucose for binding to an endogenous glucose-binding molecule (e.g., without limitation surfactant proteins A and D or members of the selectin family). In certain embodiments, the ligands are capable of competing with a saccharide for binding to a non-human lectin (e.g., Con A). In certain embodiments, the ligands are capable of competing with glucose or mannose for binding to a non-human lectin (e.g., Con A). Exemplary glucose-binding lectins include calnexin, calreticulin, N-acetylglucosamine receptor, selectin, asialoglycoprotein receptor, collectin (mannose-binding lectin), mannose receptor, aggrecan, versican, pisum sativum agglutinin (PSA), vicia faba lectin, lens culinaris lectin, soybean lectin, peanut lectin, lathyrus ochrus lectin, sainfoin lectin, sophora japonica lectin, bowringia milbraedii lectin, concanavalin A (Con A), and pokeweed mitogen.

In certain embodiments, the ligand is of formula (IIIa) or (IIIb):



IIIa



IIIb

wherein:

each R^1 is independently hydrogen, $-OR^y$, $-N(R^y)_2$, $-SR^y$, -O-Y, -G-Z, or $-CH_2R^x$;

each R^x is independently hydrogen, $-OR^y$, $-N(R^y)_2$, $-SR^y$, or -O-Y;

each R^y is independently $-R^2$, $-SO_2R^2$, $-S(O)R^2$, $-P(O)(OR^2)_2$, $-C(O)R^2$, $-CO_2R^2$, or $-C(O)N(R^2)_2$;

each Y is independently a monosaccharide, disaccharide, or trisaccharide;

each G is independently a covalent bond or an optionally substituted C_{1-9} alkylene, wherein one or more methylene units of G is optionally replaced by $-O-$, $-S-$, $-N(R^2)-$, $-C(O)-$, $-OC(O)-$, $-C(O)O-$, $-C(O)N(R^2)-$, $-N(R^2)C(O)-$, $-N(R^2)C(O)N(R^2)-$, $-SO_2-$, $-SO_2N(R^2)-$, $-N(R^2)SO_2-$, or $-N(R^2)SO_2N(R^2)-$;

each Z is independently halogen, $-N(R^2)_2$, $-OR^2$, $-SR^2$, $-N_3$, $-C{\equiv}CR^2$, $-CO_2R^2$, $-C(O)R^2$, or $-OSO_2R^2$; and

each R^2 is independently hydrogen or an optionally substituted group selected from C_{1-6} aliphatic, phenyl, a 4-7 membered heterocyclic ring having 1-2 heteroatoms selected from nitrogen, oxygen, or sulfur, or a 5-6 membered monocyclic heteroaryl ring having 1-4 heteroatoms selected from nitrogen, oxygen, or sulfur.

In certain embodiments, the ligand of formula (IIIa) or (IIIb) is a monosaccharide. In certain embodiments, the ligand is a disaccharide. In certain embodiments, the ligand is a trisaccharide. In certain embodiments, the ligand is a tetrasaccharide. In certain embodiments, the ligand comprises no more than a total of four monosaccharide moieties.

As defined generally above, each R^1 is independently hydrogen, $-OR^y$, $-N(R^y)_2$, $-SR^y$, -O-Y, -G-Z, or $-CH_2R^x$. In certain embodiments, R^1 is hydrogen. In certain embodiments, R^1 is –OH. In other embodiments, R^1 is $-NHC(O)CH_3$. In certain embodiments, R^1 is –O-Y. In certain other embodiments, R^1 is –G-Z. In some embodiments, R^1 is $-CH_2OH$. In other embodiments, R^1 is $-CH_2$-O-Y. In yet other embodiments, R^1 is $-NH_2$. One of ordinary skill in the art will appreciate that each R^1 substituent in formula (IIIa) or (IIIb) may be of (*R*) or (*S*) stereochemistry.

As defined generally above, each R^x is independently hydrogen, $-OR^y$, $-N(R^y)_2$, $-SR^y$, or –O-Y. In some embodiments, R^x is hydrogen. In certain embodiments, R^x is –OH. In other embodiments, R^x is –O-Y.

As defined generally above, each R^y is independently $-R^2$, $-SO_2R^2$, $-S(O)R^2$, $-P(O)(OR^2)_2$, $-C(O)R^2$, $-CO_2R^2$, or $-C(O)N(R^2)_2$. In some embodiments, R^y is hydrogen. In other embodiments, R^y is $-R^2$. In some embodiments, R^y is $-C(O)R^2$. In certain embodiments, R^y is acetyl. In other embodiments, R^y is $-SO_2R^2$, $-S(O)R^2$, $-P(O)(OR^2)_2$, $-CO_2R^2$, or $-C(O)N(R^2)_2$.

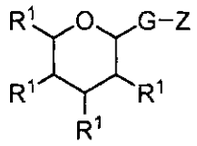
As defined generally above, Y is a monosaccharide, disaccharide, or trisaccharide. In certain embodiments, Y is a monosaccharide. In some embodiments, Y is a disaccharide. In other embodiments, Y is a trisaccharide. In some embodiments, Y is mannose, glucose, fructose, galactose, rhamnose, or xylopyranose. In some embodiments, Y is sucrose, maltose, turanose, trehalose, cellobiose, or lactose. In certain embodiments, Y is mannose. In certain embodiments, Y is D-mannose. One of ordinary skill in the art will appreciate that the saccharide Y is attached to the oxygen group of –O-Y through anomeric carbon to form a glycosidic bond. The glycosidic bond may be of an alpha or beta configuration.

As defined generally above, each G is independently a covalent bond or an optionally substituted C_{1-9} alkylene, wherein one or more methylene units of G is optionally replaced by –O–, –S–, $-N(R^2)-$, –C(O) –, –OC(O) –, –C(O)O–, $-C(O)N(R^2)-$, $-N(R^2)C(O)-$, $-N(R^2)C(O)N(R^2)-$, $-SO_2-$, $-SO_2N(R^2)-$, $-N(R^2)SO_2-$, or $-N(R^2)SO_2N(R^2)-$. In some embodiments, G is a covalent bond. In certain embodiments, G is –O-C_{1-8} alkylene. In certain embodiments, G is $-OCH_2CH_2-$.

As defined generally above, each Z is independently halogen, $-N(R^2)_2$, $-OR^2$, $-SR^2$, $-N_3$, $-C{\equiv}CR^2$, $-CO_2R^2$, $-C(O)R^2$, or $-OSO_2R^2$. In some embodiments, Z is a halogen or $-OSO_2R^2$.

In other embodiments, Z is $-N_3$ or $-C{\equiv}CR^2$. In certain embodiments, Z is $-N(R^2)_2$, $-OR^2$, or $-SR^2$. In certain embodiments, Z is –SH. In certain embodiments, Z is $-NH_2$. In certain embodiments, -G-Z is $-OCH_2CH_2NH_2$.

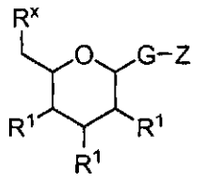
In some embodiments, the R^1 substituent on the C1 carbon of formula (IIIa) is –G-Z to give a compound of formula (IIIa-*i*):



IIIa-*i*

wherein R^1, G, and Z are as defined and described herein.

In some embodiments, the ligand is of formula (IIIa-*ii*):



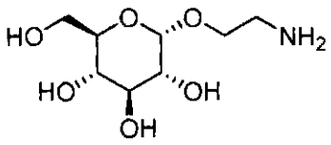
IIIa-*ii*

wherein R^1, R^x, G, and Z are as defined and described herein.

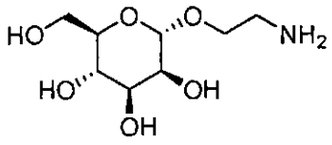
In certain embodiments, the ligand(s) may have the same chemical structure as glucose or may be a chemically related species of glucose. In various embodiments it may be advantageous for the ligand(s) to have a different chemical structure from glucose, e.g., in order to fine tune the glucose response of the conjugate. For example, in certain embodiments, one might use a ligand that includes glucose, mannose, L-fucose or derivatives of these (e.g., alpha-L-fucopyranoside, mannosamine, beta-linked N-acetyl mannosamine, methylglucose, methylmannose, ethylglucose, ethylmannose, propylglucose, propylmannose, etc.) and/or higher order combinations of these (e.g., a bimannose, linear and/or branched trimannose, etc.).

In certain embodiments, the ligand includes a monosaccharide. In certain embodiments, the ligand includes a disaccharide. In certain embodiments, the ligand is includes a trisaccharide. In some embodiments, the ligand comprises a saccharide and one or more amine groups. In certain embodiments the saccharide and amine group are separated by a C_1-C_6 alkyl group, e.g., a C_1-C_3 alkyl group. In some embodiments, the ligand is aminoethylglucose (AEG). In some embodiments, the ligand is aminoethylmannose (AEM). In some embodiments, the ligand is aminoethylbimannose (AEBM). In some embodiments, the ligand is aminoethyltrimannose (AETM). In some embodiments, the ligand is β-aminoethyl-N-acetylglucosamine (AEGA). In some embodiments, the ligand is aminoethylfucose (AEF). In certain embodiments, a saccharide ligand is of the "D" configuration. In other embodiments, a saccharide ligand is of the "L"

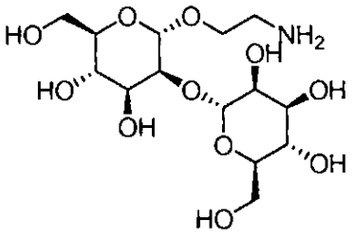
configuration. Below we show the structures of these exemplary ligands. Other exemplary ligands will be recognized by those skilled in the art.



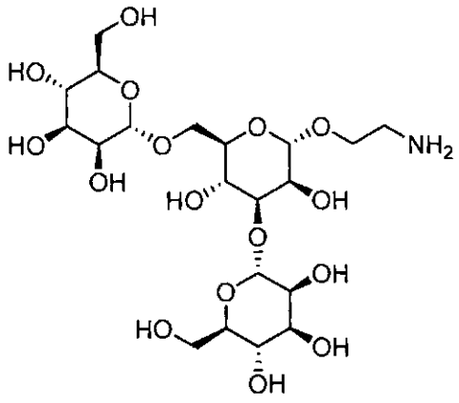
AEG



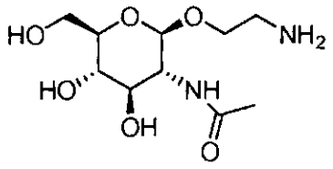
AEM



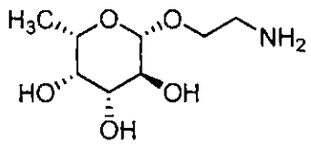
AEBM



AETM



AEGA



AEF

In general, ligands may be directly or indirectly conjugated (i.e., via a linker or framework) to the drug. As discussed in more detail below, the ligands may be naturally present within a conjugate framework (e.g., as part of a polymer backbone or as a side group of a monomer). Alternatively (or additionally) ligands may be artificially incorporated into a conjugate framework (e.g., in the form of a chemical group that is synthetically added to a conjugate framework). In certain embodiments, a conjugate may include a framework which comprises 5 or more, 10 or more, or 20 or more ligands. In certain embodiments, a conjugate may comprise as few as 1, 2, 3, 4 or 5 separate ligands.

In certain embodiments, at least two separate ligands are conjugated to the drug via different conjugation points. In certain embodiments, at least two separate ligands are conjugated to a single conjugate framework that is also conjugated to the drug. In some embodiments, at least one ligand, such as AETM, AEG, AEM, AEBM, AEGA, or AEF, is conjugated to one insulin molecule. In certain embodiments, at least one AETM ligand is conjugated to one insulin molecule. In some embodiments, at least two ligands, such as AETM, AEG, AEM, AEBM, AEGA, or AEF, are conjugated to one insulin molecule, either through one conjugation point or multiple conjugation points. In certain embodiments, the at least two

ligands are not the same ligand. In certain embodiments, the at least two ligands are the same ligand. In certain embodiments, at least two AETM ligands are conjugated to one insulin molecule, either through one conjugation point or multiple conjugation points. As discussed in more detail below in the context of certain exemplary conjugate frameworks, in certain embodiments the separate ligands and drug (e.g., an insulin molecule) may each be located on a separate branch of a branched conjugate framework. For example, the ligands and drug may be located on termini of these branches. In certain embodiments a hyperbranched conjugate framework may be used. Both polymeric and non-polymeric conjugate frameworks are encompassed.

Methods for conjugating ligands to a conjugate framework are discussed in more detail below. In certain embodiments, the saccharide within the one or more ligands is conjugated (directly or indirectly by way of a linker) via the C1, C2 or C6 position. In certain embodiments, the conjugation involves the C1 position. The C1 position of a saccharide is also referred to as the anomeric carbon and may be connected to the drug or conjugate framework in the alpha or beta conformation. In certain embodiments, the C1 position is configured as the alpha anomer. In other embodiments, the C1 position is configured as the beta anomer.

Drug

It is to be understood that a conjugate can comprise any drug. A conjugate can comprise more than one copy of the same drug and/or can comprise more than one type of drug. The conjugates are not limited to any particular drug and may include small molecule drugs or biomolecular drugs. In general, the drug(s) used will depend on the disease or disorder to be treated. As used herein, the term "drug" encompasses salt and non-salt forms of the drug. For example, the term "insulin molecule" encompasses all salt and non-salt forms of the insulin molecule. It will be appreciated that the salt form may be anionic or cationic depending on the drug.

For example, without limitation, in various embodiments a conjugate can comprise any one of the following drugs: diclofenac, nifedipine, rivastigmine, methylphenidate, fluoroxetine, rosiglitazone, prednison, prednisolone, codeine, ethylmorphine, dextromethorphan, noscapine, pentoxiverine, acetylcysteine, bromhexine, epinephrine, isoprenaline, orciprenaline, ephedrine, fenoterol, rimiterol, ipratropium, cholinetheophyllinate, proxiphylline, bechlomethasone, budesonide, deslanoside, digoxine, digitoxin, disopyramide, proscillaridin, chinidine, procainamide, mexiletin, flecainide, alprenolol, proproanolol, nadolol, pindolol, oxprenolol, labetalol, tirnolol, atenolol, pentaerityltetranitrate, isosorbiddinitrate, isosorbidmononitrate, niphedipin, phenylamine, verapamil, diltiazem, cyclandelar, nicotinylalcholhol,

inositolnicotinate, alprostatdil, etilephrine, prenalterol, dobutamine, dopamine, dihydroergotamine, guanetidine, betanidine, methyldopa, reserpine, guanfacine, trimethaphan, hydralazine, dihydralazine, prazosine, diazoxid, captopril, nifedipine, enalapril, nitroprusside, bendroflumethiazide, hydrochlorthiazide, metychlothiazide, polythiazide, chlorthalidon, cinetazon, clopamide, mefruside, metholazone, bumetanide, ethacrynacide, spironolactone, amiloride, chlofibrate, nicotinic acid, nicheritrol, brompheniramine, cinnarizine, dexchlorpheniramine, clemastine, antazoline, cyproheptadine, proethazine, cimetidine, ranitidine, sucralfat, papaverine, moxaverine, atropin, butylscopolamin, emepron, glucopyrron, hyoscyamine, mepensolar, methylscopolamine, oxiphencyclimine, probanteline, terodilin, sennaglycosides, sagradaextract, dantron, bisachodyl, sodiumpicosulfat, etulos, diphenolxylate, loperamide, salazosulfapyridine, pyrvin, mebendazol, dimeticon, ferrofumarate, ferrosuccinate, ferritetrasemisodium, cyanochobalamine, folid acid heparin, heparin co-factor, diculmarole, warfarin, streptokinase, urokinase, factor VIII, factor IX, vitamin K, thiopeta, busulfan, chlorambucil, cyclophosphamid, melfalan, carmustin, mercatopurin, thioguanin, azathioprin, cytarabin, vinblastin, vinchristin, vindesin, procarbazine, dacarbazine, lomustin, estramustin, teniposide, etoposide, cisplatin, amsachrin, aminogluthetimid, phosphestrol, medroxiprogresterone, hydroxiprogesterone, megesterol, noretisteron, tamoxiphen, ciclosporin, sulfosomidine, bensylpenicillin, phenoxymethylpenicillin, dicloxacillin, cloxacillin, flucoxacillin, ampicillin, amoxicillin, pivampicillin, bacampicillin, piperacillin, meziocillin, mecillinam, pivmecillinam, cephalotin, cephalexin, cephradin, cephadroxil, cephaclor, cefuroxim, cefotaxim, ceftazidim, cefoxitin, aztreonam, imipenem, cilastatin, tetracycline, lymecycline, demeclocycline, metacycline, oxitetracycline, doxycycline, chloramphenicol, spiramycin, fusidic acid, lincomycin, clindamycin, spectinomycin, rifampicin, amphotericin B, griseofulvin, nystatin, vancomycin, metronidazole, tinidazole, trimethoprim, norfloxacin, salazosulfapyridin, aminosalyl, isoniazid, etambutol, nitrofurantoin, nalidixic acid, metanamine, chloroquin, hydroxichloroquin, tinidazol, ketokonazol, acyclovir, interferon idoxuridin, retinal, tiamin, dexpantenol, pyridoxin, folic acid, ascorbic acid, tokoferol, phytominadion, phenfluramin, corticotropin, tetracosactid, tyrotropin, somatotoprin, somatrem, vasopressin, lypressin, desmopressin, oxytocin, chloriongonadotropin, cortison, hydrocortisone, fluodrocortison, prednison, prednisolon, fluoximesteron, mesterolon, nandrolon, stanozolol, oximetolon, cyproteron, levotyroxin, liotyronin, propylthiouracil, carbimazol, tiamazol, dihydrotachysterol, alfacalcidol, calcitirol, insulin, tolbutamid, chlorpropamid, tolazamid, glipizid, glibenclamid, phenobarbital, methyprylon, pyrityidion, meprobamat, chlordiazepoxid, diazepam, nitrazepam, baclofen, oxazepam, dikaliumclorazepat, lorazepam, flunitrazepam, alprazolam, midazolam, hydroxizin, dantrolene, chlometiazol, propionmazine, alimemazine,

chlorpromazine, levomepromazine, acetophenazine, fluphenazine, perphenazine, prochlorperazine, trifluoperazine, dixyrazine, thiodirazine, periciazin, chloprothixene, tizanidine, zaleplon, zuclopentizol, flupentizol, thithixen, haloperidol, trimipramin, opipramol, chlomipramin, desipramin, lofepramin, amitriptylin, nortriptylin, protriptylin, maptrotilin, caffeine, cinnarizine, cyclizine, dimenhydinate, meclozine, prometazine, thiethylperazine, metoclopramide, scopolamine, phenobarbital, phenytoine, ethosuximide, primidone, carbamazepine, chlonazepam, orphenadrine, atropine, bensatropine, biperiden, metixene, procylidine, levodopa, bromocriptin, amantadine, ambenon, pyridostigmine, synstigmine, disulfiram, morphine, codeine, pentazocine, buprenorphine, pethidine, phenoperidine, phentanyl, methadone, piritramide, dextropropoxyphene, ketobemidone, acetylsalicylic acid, celecoxib, phenazone, phenylbutazone, azapropazone, piroxicam, ergotamine, dihydroergotamine, cyproheptadine, pizitifen, flumedroxon, allopurinol, probenecid, sodiummaurothiomalate auronofin, penicillamine, estradiol, estradiolvalerianate, estriol, ethinylestradiol, dihydrogesteron, lynestrenol, medroxiprogresterone, noretisterone, cyclophenile, clomiphene, levonorgestrel, mestranol, ornidazol, tinidazol, ekonazol, chlotrimazol, natamycine, miconazole, sulbentin, methylergotamine, dinoprost, dinoproston, gemeprost, bromocriptine, phenylpropanolamine, sodiumchromoglicate, azetasolamide, dichlophenamide, betacarotene, naloxone, calciumfolinate, in particular clonidine, thephylline, dipyradamol, hydrochlothiazade, scopolamine, indomethacine, furosemide, potassium chloride, morphine, ibuprofen, salbutamol, terbutalin, calcitonin, etc. It is to be understood that this list is intended to be exemplary and that any drug, whether known or later discovered, may be used in a conjugate of the present disclosure.

In various embodiments, a conjugate may include a hormonal drug which may be peptidic or non-peptidic, e.g., adrenaline, noradrenaline, angiotensin, atriopeptin, aldosterone, dehydroepiandrosterone, androstenedione, testosterone, dihydrotestosterone, calcitonin, calcitriol, calcidiol, corticotropin, cortisol, dopamine, estradiol, estrone, estriol, erythropoietin, follicle-stimulating hormone, gastrin, ghrelin, glucagon, gonadotropin-releasing hormone, growth hormone, growth hormone-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, histamine, human placental lactogen, insulin, insulin-like growth factor, inhibin, leptin, a leukotriene, lipotropin, melatonin, orexin, oxytocin, parathyroid hormone, progesterone, prolactin, prolactin-releasing hormone, a prostglandin, renin, serotonin, secretin, somatostatin, thrombopoietin, thyroid-stimulating hormone, thyrotropin-releasing hormone (or thyrotropin), thyrotropin-releasing hormone, thyroxine, triiodothyronine, vasopressin, etc. In certain embodiments, the hormone may be selected from glucagon, insulin, insulin-like growth factor, leptin, thyroid-stimulating hormone, thyrotropin-releasing hormone (or thyrotropin), thyrotropin-releasing

hormone, thyroxine, and triiodothyronine. In certain embodiments, the drug is insulin-like growth factor 1 (IGF-1). It is to be understood that this list is intended to be exemplary and that any hormonal drug, whether known or later discovered, may be used in a conjugate of the present disclosure.

In various embodiments, a conjugate may include a thyroid hormone.

In various embodiments, a conjugate may include an anti-diabetic drug (i.e., a drug which has a beneficial effect on patients suffering from diabetes).

In various embodiments, a conjugate may include an insulin molecule. As used herein, the term "insulin" or "insulin molecule" encompasses all salt and non-salt forms of the insulin molecule. It will be appreciated that the salt form may be anionic or cationic depending on the insulin molecule. By "insulin" or "an insulin molecule" we intend to encompass both wild-type and modified forms of insulin as long as they are bioactive (i.e., capable of causing a detectable reduction in glucose when administered *in vivo*). Wild-type insulin includes insulin from any species whether in purified, synthetic or recombinant form (e.g., human insulin, porcine insulin, bovine insulin, rabbit insulin, sheep insulin, etc.). A number of these are available commercially, e.g., from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). A variety of modified forms of insulin are known in the art (e.g. see Crotty and Reynolds, *Pediatr. Emerg. Care.* 23:903-905, 2007 and Gerich, *Am. J. Med.* 113:308-16, 2002 and references cited therein). Modified forms of insulin may be chemically modified (e.g., by addition of a chemical moiety such as a PEG group or a fatty acyl chain as described below) and/or mutated (i.e., by addition, deletion or substitution of one or more amino acids).

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure will differ from a wild-type insulin by 1-10 (e.g., 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 5-9, 5-8, 5-7, 5-6, 6-9, 6-8, 6-7, 7-9, 7-8, 8-9, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 or 1) amino acid substitutions, additions and/or deletions. In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure will differ from a wild-type insulin by amino acid substitutions only. In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure will differ from a wild-type insulin by amino acid additions only. In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure will differ from a wild-type insulin by both amino acid substitutions and additions. In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure will differ from a wild-type insulin by both amino acid substitutions and deletions.

In certain embodiments, amino acid substitutions may be made on the basis of similarity in polarity, charge, solubility, hydrophobicity, hydrophilicity, and/or the amphipathic nature of the residues involved. In certain embodiments, a substitution may be conservative, that is, one

amino acid is replaced with one of similar shape and charge. Conservative substitutions are well known in the art and typically include substitutions within the following groups: glycine, alanine; valine, isoleucine, leucine; aspartic acid, glutamic acid; asparagine, glutamine; serine, threonine; lysine, arginine; and tyrosine, phenylalanine. In certain embodiments, the hydrophobic index of amino acids may be considered in choosing suitable mutations. The importance of the hydrophobic amino acid index in conferring interactive biological function on a polypeptide is generally understood in the art. Alternatively, the substitution of like amino acids can be made effectively on the basis of hydrophilicity. The importance of hydrophilicity in conferring interactive biological function of a polypeptide is generally understood in the art. The use of the hydrophobic index or hydrophilicity in designing polypeptides is further discussed in U.S. Patent No. 5,691,198.

The wild-type sequence of human insulin (A-chain and B-chain) is shown below and in Figure 63.

A-Chain (SEQ ID NO:1): GIVEQCCTSICSLYQLENYCN

B-Chain (SEQ ID NO:2): FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT

Human insulin differs from rabbit, porcine, bovine, and sheep insulin only in amino acids A8, A9, A10, and B30 (see table below).

Insulin	Amino Acid Position			
	A8	A9	A10	B30
human	Thr	Ser	Ile	Thr
rabbit	Thr	Ser	Ile	Ser
porcine	Thr	Ser	Ile	Ala
bovine	Ala	Ser	Val	Ala
sheep	Ala	Gly	Val	Ala

In various embodiments, an insulin molecule of the present disclosure is mutated at the B28 and/or B29 positions of the B-peptide sequence. For example, insulin lispro (HUMALOG®) is a rapid acting insulin mutant in which the penultimate lysine and proline residues on the C-terminal end of the B-peptide have been reversed ($Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin). This modification blocks the formation of insulin multimers. Insulin aspart (NOVOLOG®) is another rapid acting insulin mutant in which proline at position B28 has been substituted with aspartic acid (Asp^{B28}-human insulin). This mutant also prevents the formation

of multimers. In some embodiments, mutation at positions B28 and/or B29 is accompanied by one or more mutations elsewhere in the insulin polypeptide. For example, insulin glulisine (APIDRA®) is yet another rapid acting insulin mutant in which aspartic acid at position B3 has been replaced by a lysine residue and lysine at position B29 has been replaced with a glutamic acid residue ($Lys^{B3}Glu^{B29}$-human insulin).

In various embodiments, an insulin molecule of the present disclosure has an isoelectric point that is shifted relative to human insulin. In some embodiments, the shift in isoelectric point is achieved by adding one or more arginine residues to the N-terminus of the insulin A-peptide and/or the C-terminus of the insulin B- peptide. Examples of such insulin polypeptides include Arg^{A0}-human insulin, $Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, $Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, $Arg^{A0}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, and $Arg^{A0}Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin. By way of further example, insulin glargine (LANTUS®) is an exemplary long acting insulin mutant in which Asp^{A21} has been replaced by glycine, and two arginine residues have been added to the C-terminus of the B-peptide. The effect of these changes is to shift the isoelectric point, producing a solution that is completely soluble at pH 4. Thus, in some embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises an A-peptide sequence wherein A21 is Gly and B-peptide sequence wherein B31 and B32 are Arg-Arg. It is to be understood that the present disclosure encompasses all single and multiple combinations of these mutations and any other mutations that are described herein (e.g., Gly^{A21}-human insulin, $Gly^{A21}Arg^{B31}$-human insulin, $Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, Arg^{B31}-human insulin).

In various embodiments, an insulin molecule of the present disclosure is truncated. For example, in certain embodiments, a B-peptide sequence of an insulin polypeptide of the present disclosure is missing B1, B2, B3, B26, B27, B28, B29 and/or B30. In certain embodiments, combinations of residues are missing from the B-peptide sequence of an insulin polypeptide of the present disclosure. For example, the B-peptide sequence may be missing residues B(1-2), B(1-3), B(29-30), B(28-30), B(27-30) and/or B(26-30). In some embodiments, these deletions and/or truncations apply to any of the aforementioned insulin molecules (e.g., without limitation to produce des(B30)-insulin lispro, des(B30)-insulin aspart, des(B30)-insulin glulisine, des(B30)-insulin glargine, etc.).

In some embodiments, an insulin molecule contains additional amino acid residues on the N- or C-terminus of the A or B-peptide sequences. In some embodiments, one or more amino acid residues are located at positions A0, A21, B0 and/or B31. In some embodiments, one or more amino acid residues are located at position A0. In some embodiments, one or more amino acid residues are located at position A21. In some embodiments, one or more amino acid residues are located at position B0. In some embodiments, one or more amino acid residues are

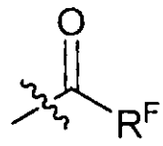
located at position B31. In certain embodiments, an insulin molecule does not include any additional amino acid residues at positions A0, A21, B0 or B31.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure is mutated such that one or more amidated amino acids are replaced with acidic forms. For example, asparagine may be replaced with aspartic acid or glutamic acid. Likewise, glutamine may be replaced with aspartic acid or glutamic acid. In particular, Asn^{A18}, Asn^{A21}, or Asn^{B3}, or any combination of those residues, may be replaced by aspartic acid or glutamic acid. Gln^{A15} or Gln^{B4}, or both, may be replaced by aspartic acid or glutamic acid. In certain embodiments, an insulin molecule has aspartic acid at position A21 or aspartic acid at position B3, or both.

One skilled in the art will recognize that it is possible to mutate yet other amino acids in the insulin molecule while retaining biological activity. For example, without limitation, the following modifications are also widely accepted in the art: replacement of the histidine residue of position B10 with aspartic acid ($His^{B10} \rightarrow Asp^{B10}$); replacement of the phenylalanine residue at position B1 with aspartic acid ($Phe^{B1} \rightarrow Asp^{B1}$); replacement of the threonine residue at position B30 with alanine ($Thr^{B30} \rightarrow Ala^{B30}$); replacement of the tyrosine residue at position B26 with alanine ($Tyr^{B26} \rightarrow Ala^{B26}$); and replacement of the serine residue at position B9 with aspartic acid ($Ser^{B9} \rightarrow Asp^{B9}$).

In various embodiments, an insulin molecule of the present disclosure has a protracted profile of action. Thus, in certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure may be acylated with a fatty acid. That is, an amide bond is formed between an amino group on the insulin molecule and the carboxylic acid group of the fatty acid. The amino group may be the alpha-amino group of an N-terminal amino acid of the insulin molecule, or may be the epsilon-amino group of a lysine residue of the insulin molecule. An insulin molecule of the present disclosure may be acylated at one or more of the three amino groups that are present in wild-type human insulin or may be acylated on lysine residue that has been introduced into the wild-type human insulin sequence. In certain embodiments, an insulin molecule may be acylated at position B1. In certain embodiments, an insulin molecule may be acylated at position B29. In certain embodiments, the fatty acid is selected from myristic acid (C14), pentadecylic acid (C15), palmitic acid (C16), heptadecylic acid (C17) and stearic acid (C18). For example, insulin detemir (LEVEMIR®) is a long acting insulin mutant in which Thr^{B30} has been deleted, and a C14 fatty acid chain (myristic acid) has been attached to Lys^{B29}.

In some embodiments, the N-terminus of the A-peptide, the N-terminus of the B-peptide, the epsilon-amino group of Lys at position B29 or any other available amino group in an insulin molecule of the present disclosure is covalently linked to a fatty acid moiety of general formula:



wherein R^F is hydrogen or a C_{1-30} alkyl group. In some embodiments, R^F is a C_{1-20} alkyl group, a C_{3-19} alkyl group, a C_{5-18} alkyl group, a C_{6-17} alkyl group, a C_{8-16} alkyl group, a C_{10-15} alkyl group, or a C_{12-14} alkyl group. In certain embodiments, the insulin polypeptide is conjugated to the moiety at the A1 position. In certain embodiments, the insulin polypeptide is conjugated to the moiety at the B1 position. In certain embodiments, the insulin polypeptide is conjugated to the moiety at the epsilon-amino group of Lys at position B29. In certain embodiments, position B28 of the insulin molecule is Lys and the epsilon-amino group of Lys^{B28} is conjugated to the fatty acid moiety. In certain embodiments, position B3 of the insulin molecule is Lys and the epsilon-amino group of Lys^{B3} is conjugated to the fatty acid moiety. In some embodiments, the fatty acid chain is 8-20 carbons long. In some embodiments, the fatty acid is octanoic acid (C8), nonanoic acid (C9), decanoic acid (C10), undecanoic acid (C11), dodecanoic acid (C12), or tridecanoic acid (C13). In certain embodiments, the fatty acid is myristic acid (C14), pentadecanoic acid (C15), palmitic acid (C16), heptadecanoic acid (C17), stearic acid (C18), nonadecanoic acid (C19), or arachidic acid (C20).

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: $Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin (insulin lispro), Asp^{B28}-human insulin (insulin aspart), $Lys^{B3}Glu^{B29}$-human insulin (insulin glulisine), $Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin (insulin glargine), $N^{\varepsilon B29}$-myristoyl-des(B30)-human insulin (insulin detemir), Ala^{B26}-human insulin, Asp^{B1}-human insulin, Arg^{A0}-human insulin, $Asp^{B1}Glu^{B13}$-human insulin, Gly^{A21}-human insulin, $Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, $Arg^{A0}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, $Arg^{A0}Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, des(B30)-human insulin, des(B27)-human insulin, des(B28-B30)-human insulin, des(B1)-human insulin, des(B1-B3)-human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: $N^{\varepsilon B29}$-palmitoyl-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-myrisotyl-human insulin, $N^{\varepsilon B28}$-palmitoyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin, $N^{\varepsilon B28}$-myristoyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: $N^{\varepsilon B29}$-palmitoyl-des(B30)-human insulin, $N^{\varepsilon B30}$-myristoyl-$Thr^{B29}Lys^{B30}$-human insulin, $N^{\varepsilon B30}$-palmitoyl-$Thr^{B29}Lys^{B30}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-(N-palmitoyl-γ-glutamyl)-des(B30)-human insulin,

$N^{\varepsilon B29}$-(N-lithocolyl-γ-glutamyl)-des(B30)-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-(ω-carboxyheptadecanoyl)-des(B30)-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-(ω-carboxyheptadecanoyl)- human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: $N^{\varepsilon B29}$-octanoyl-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-myristoyl-$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B31}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-myristoyl-$Gly^{A21}Gln^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-myristoyl-$Arg^{A0}Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-$Arg^{A0}Gly^{A21}Gln^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-myristoyl-$Arg^{A0}Gly^{A21}Asp^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-myristoyl-$Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-myristoyl-$Arg^{A0}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-octanoyl-$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-octanoyl-$Gly^{A21}Gln^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-octanoyl-$Arg^{A0}Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-octanoyl-$Arg^{A0}Gly^{A21}Gln^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-octanoyl-$Arg^{B0}Gly^{A21}Asp^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-octanoyl-$Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-octanoyl-$Arg^{A0}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin polypeptides: $N^{\varepsilon B28}$-myristoyl-$Gly^{A21}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, $N^{\varepsilon B28}$-myristoyl-$Gly^{A21}Gln^{B3}Lys^{B28}Pro^{B30}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, $N^{\varepsilon B28}$-myristoyl-$Arg^{A0}Gly^{A21}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, $N^{\varepsilon B28}$-myristoyl-$Arg^{A0}Gly^{A21}Gln^{B3}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, $N^{\varepsilon B28}$-myristoyl-$Arg^{A0}Gly^{A21}Asp^{B3}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, $N^{\varepsilon B28}$-myristoyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, $N^{\varepsilon B28}$-myristoyl-$arg^{A0}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, $N^{\varepsilon B28}$-octanoyl-$Gly^{A21}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: $N^{\varepsilon B28}$-octanoyl-$Gly^{A21}Gln^{B3}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, $N^{\varepsilon B28}$-octanoyl-$Arg^{A0}Gly^{A21}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, $N^{\varepsilon B28}$-octanoyl-$Arg^{A0}Gly^{A21}Gln^{B3}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, $N^{\varepsilon B28}$-octanoyl-$Arg^{A0}Gly^{A21}Asp^{B3}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, $N^{\varepsilon B28}$-octanoyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, $N^{\varepsilon B28}$-octanoyl-$Arg^{A0}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: $N^{\varepsilon B29}$-tridecanoyl-des(B30)-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-tetradecanoyl-des(B30)-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-decanoyl-des(B30)-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-dodecanoyl-des(B30)-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-tridecanoyl-Gly^{A21}-des(B30)-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-tetradecanoyl-Gly^{A21}-des(B30)-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-

decanoyl-Gly^{A21}-des(B30)-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-dodecanoyl-Gly^{A21}-des(B30)-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-tridecanoyl-Gly^{A21}Gln^{B3}-des(B30)-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-tetradecanoyl-Gly^{A21}Gln^{B3}-des(B30)-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-decanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-des(B30)-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-dodecanoyl-Gly^{A21}-Gln^{B3}-des(B30)-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-tridecanoyl-Ala^{A21}-des(B30)-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-tetradecanoyl-Ala^{A21}-des(B30)-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-decanoyl-Ala^{A21}-des(B30)-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-dodecanoyl-Ala^{A21}-des(B30)-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-tridecanoyl-Ala^{A21}-Gln^{B3}-des(B30)-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-tetradecanoyl-Ala^{A21}Gln^{B3}-des(B30)-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-decanoyl-Ala^{A21}Gln^{B3}-des(B30)-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-dodecanoyl-Ala^{A21}Gln^{B3}-des(B30)-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-tridecanoyl-Gln^{B3}-des(B30)-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-tetradecanoyl-Gln^{B3}-des(B30)-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-decanoyl-Gln^{B3}-des(B30)-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-dodecanoyl-Gln^{B3}-des(B30)-human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: N$^{\varepsilon B29}$-tridecanoyl-Gly^{A21}-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-tetradecanoyl-Gly^{A21}-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-decanoyl-Gly^{A21}-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-dodecanoyl-Gly^{A21}-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-tridecanoyl-Ala^{A21}-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-tetradecanoyl-Ala^{A21}-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-decanoyl-Ala^{A21}-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-dodecanoyl-Ala^{A21}-human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: N$^{\varepsilon B29}$-tridecanoyl-Gly^{A21}Gln^{B3}-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-tetradecanoyl-Gly^{A21}Gln^{B3}-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-decanoyl-Gly^{A21}Gln^{B3}-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-dodecanoyl-Gly^{A21}Gln^{B3}-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-tridecanoyl-Ala^{A21}Gln^{B3}-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-tetradecanoyl-Ala^{A21}Gln^{B3}-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-decanoyl-Ala^{A21}Gln^{B3}-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-dodecanoyl-Ala^{A21}Gln^{B3}-human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: N$^{\varepsilon B29}$-tridecanoyl-Gln^{B3}-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-tetradecanoyl-Gln^{B3}-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-decanoyl-Gln^{B3}-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-dodecanoyl-Gln^{B3}-human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: N$^{\varepsilon B29}$-tridecanoyl-Glu^{B30}-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-tetradecanoyl-Glu^{B30}-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-decanoyl-Glu^{B30}-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-dodecanoyl-Glu^{B30}-human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: N$^{\varepsilon B29}$-tridecanoyl-Gly^{A21}Glu^{B30}-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-tetradecanoyl-Gly^{A21}Glu^{B30}-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-decanoyl-Gly^{A21}Glu^{B30}-human insulin, N$^{\varepsilon B29}$-dodecanoyl-Gly^{A21}Glu^{B30}-human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: $N^{\varepsilon B29}$-tridecanoyl-$Gly^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-tetradecanoyl-$Gly^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-decanoyl-$Gly^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-dodecanoyl-$Gly^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-tridecanoyl-$Ala^{A21}Glu^{B30}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-tetradecanoyl-$Ala^{A21}Glu^{B30}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-decanoyl-$Ala^{A21}Glu^{B30}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-dodecanoyl-$Ala^{A21}Glu^{B30}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-tridecanoyl-$Ala^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-tetradecanoyl-$Ala^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-decanoyl-$Ala^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-dodecanoyl-$Ala^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$-human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: $N^{\varepsilon B29}$-tridecanoyl-$Gln^{B3}Glu^{B30}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-tetradecanoyl-$Gln^{B3}Glu^{B30}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-decanoyl-$Gln^{B3}Glu^{B30}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-dodecanoyl-$Gln^{B3}Glu^{B30}$-human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: $N^{\varepsilon B29}$-formyl-human insulin, $N^{\alpha B1}$-formyl-human insulin, $N^{\alpha A1}$-formyl-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-formyl-$N^{\alpha B1}$-formyl-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-formyl-$N^{\alpha A1}$-formyl-human insulin, $N^{\alpha A1}$-formyl-$N^{\alpha B1}$-formyl-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-formyl-$N^{\alpha A1}$-formyl-$N^{\alpha B1}$-formyl-human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: $N^{\varepsilon B29}$-acetyl-human insulin, $N^{\alpha B1}$-acetyl-human insulin, $N^{\alpha A1}$-acetyl-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-acetyl- $N^{\alpha B1}$-acetyl-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-acetyl-$N^{\alpha A1}$-acetyl-human insulin, $N^{\alpha A1}$-acetyl-$N^{\alpha B1}$-acetyl-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-acetyl-$N^{\alpha A1}$-acetyl- $N^{\alpha B1}$-acetyl-human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: $N^{\varepsilon B29}$-propionyl-human insulin, $N^{\alpha B1}$-propionyl-human insulin, $N^{\alpha A1}$-propionyl-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-acetyl- $N^{\alpha B1}$-propionyl-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-propionyl- $N^{\alpha A1}$-propionyl-human insulin, $N^{\alpha A1}$-propionyl- $N^{\alpha B1}$-propionyl-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-propionyl-$N^{\alpha A1}$-propionyl-$N^{\alpha B1}$-propionyl-human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: $N^{\varepsilon B29}$-butyryl-human insulin, $N^{\alpha B1}$-butyryl-human insulin, $N^{\alpha A1}$-butyryl-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-butyryl-$N^{\alpha B1}$-butyryl-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-butyryl-$N^{\alpha A1}$-butyryl-human insulin, $N^{\alpha A1}$-butyryl-$N^{\alpha B1}$-butyryl-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-butyryl-$N^{\alpha A1}$-butyryl-$N^{\alpha B1}$-butyryl-human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: $N^{\varepsilon B29}$-pentanoyl-human insulin, $N^{\alpha B1}$-pentanoyl-human insulin, $N^{\alpha A1}$-pentanoyl-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-pentanoyl-$N^{\alpha B1}$-pentanoyl-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-pentanoyl-$N^{\alpha A1}$-pentanoyl-human insulin, $N^{\alpha A1}$-pentanoyl-$N^{\alpha B1}$-pentanoyl-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-pentanoyl-$N^{\alpha A1}$-pentanoyl-$N^{\alpha B1}$-pentanoyl-human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: $N^{\varepsilon B29}$-hexanoyl-human insulin, $N^{\alpha B1}$-hexanoyl-human insulin, $N^{\alpha A1}$-hexanoyl-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-hexanoyl-$N^{\alpha B1}$-hexanoyl-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-hexanoyl-$N^{\alpha A1}$-hexanoyl-human insulin, $N^{\alpha A1}$-hexanoyl-$N^{\alpha B1}$-hexanoyl-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-hexanoyl-$N^{\alpha A1}$-hexanoyl-$N^{\alpha B1}$-hexanoyl-human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: $N^{\varepsilon B29}$-heptanoyl-human insulin, $N^{\alpha B1}$-heptanoyl-human insulin, $N^{\alpha A1}$-heptanoyl-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-heptanoyl-$N^{\alpha B1}$-heptanoyl-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-heptanoyl-$N^{\alpha A1}$-heptanoyl-human insulin, $N^{\alpha A1}$-heptanoyl-$N^{\alpha B1}$-heptanoyl-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-heptanoyl-$N^{\alpha A1}$-heptanoyl-$N^{\alpha B1}$-heptanoyl-human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: $N^{\alpha B1}$-octanoyl-human insulin, $N^{\alpha A1}$-octanoyl-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-octanoyl-$N^{\alpha B1}$-octanoyl-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-octanoyl-$N^{\alpha A1}$-octanoyl-human insulin, $N^{\alpha A1}$-octanoyl-$N^{\alpha B1}$-octanoyl-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-octanoyl-$N^{\alpha A1}$-octanoyl-$N^{\alpha B1}$-octanoyl-human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: $N^{\varepsilon B29}$-nonanoyl-human insulin, $N^{\alpha B1}$-nonanoyl-human insulin, $N^{\alpha A1}$-nonanoyl-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-nonanoyl-$N^{\alpha B1}$-nonanoyl-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-nonanoyl-$N^{\alpha A1}$-nonanoyl-human insulin, $N^{\alpha A1}$-nonanoyl-$N^{\alpha B1}$-nonanoyl-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-nonanoyl-$N^{\alpha A1}$-nonanoyl-$N^{\alpha B1}$-nonanoyl-human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: $N^{\varepsilon B29}$-decanoyl-human insulin, $N^{\alpha B1}$-decanoyl-human insulin, $N^{\alpha A1}$-decanoyl-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-decanoyl-$N^{\alpha B1}$-decanoyl-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-decanoyl-$N^{\alpha A1}$-decanoyl-human insulin, $N^{\alpha A1}$-decanoyl-$N^{\alpha B1}$-decanoyl-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-decanoyl-$N^{\alpha A1}$-decanoyl-$N^{\alpha B1}$-decanoyl-human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: $N^{\varepsilon B28}$-formyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin, $N^{\alpha B1}$-formyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin, $N^{\alpha A1}$-formyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin, $N^{\varepsilon B28}$-formyl-$N^{\alpha B1}$-formyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin, $N^{\varepsilon B28}$-formyl-$N^{\alpha A1}$-formyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin, $N^{\alpha A1}$-formyl-$N^{\alpha B1}$-formyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin, $N^{\varepsilon B28}$-formyl-$N^{\alpha A1}$-formyl-$N^{\alpha B1}$-formyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-acetyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin, $N^{\alpha B1}$-acetyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin, $N^{\alpha A1}$-acetyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin, $N^{\varepsilon B28}$-acetyl-$N^{\alpha B1}$-acetyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: $N^{\varepsilon B28}$-acetyl-$N^{\alpha A1}$-acetyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin, $N^{\alpha A1}$-acetyl-$N^{\alpha B1}$-acetyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin, $N^{\varepsilon B28}$-acetyl-$N^{\alpha A1}$-acetyl-$N^{\alpha B1}$-acetyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: $N^{\varepsilon B28}$-propionyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin, $N^{\alpha B1}$-propionyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin, $N^{\alpha A1}$-propionyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin, $N^{\varepsilon B28}$-propionyl-$N^{\alpha B1}$-propionyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin, $N^{\varepsilon B28}$-propionyl-$N^{\alpha A1}$-propionyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin, $N^{\alpha A1}$-propionyl-$N^{\alpha B1}$-propionyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin, $N^{\varepsilon B28}$-propionyl-$N^{\alpha A1}$-propionyl-$N^{\alpha B1}$-propionyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: $N^{\varepsilon B28}$-butyryl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin, $N^{\alpha B1}$-butyryl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin, $N^{\alpha A1}$-butyryl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin, $N^{\varepsilon B28}$-butyryl-$N^{\alpha B1}$-butyryl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin, $N^{\varepsilon B28}$-butyryl-$N^{\alpha A1}$-butyryl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin, $N^{\alpha A1}$-butyryl-$N^{\alpha B1}$-butyryl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin, $N^{\varepsilon B28}$-butyryl-$N^{\alpha A1}$-butyryl-$N^{\alpha B1}$-butyryl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: $N^{\varepsilon B28}$-pentanoyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin, $N^{\alpha B1}$-pentanoyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin, $N^{\alpha A1}$-pentanoyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin, $N^{\varepsilon B28}$-pentanoyl-$N^{\alpha B1}$-pentanoyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin, $N^{\varepsilon B28}$-pentanoyl-$N^{\alpha A1}$-pentanoyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin, $N^{\alpha A1}$-pentanoyl-$N^{\alpha B1}$-pentanoyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin, $N^{\varepsilon B28}$-pentanoyl-$N^{\alpha A1}$-pentanoyl-$N^{\alpha B1}$-pentanoyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: $N^{\varepsilon B28}$-hexanoyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin, $N^{\alpha B1}$-hexanoyl-$Lys^{B28}Pro^{B29}$-human insulin, $N^{\alpha A1}$-

hexanoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin, N$^{\varepsilon B28}$-hexanoyl-N$^{\alpha B1}$-hexanoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin, N$^{\varepsilon B28}$-hexanoyl-N$^{\alpha A1}$-hexanoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin, N$^{\alpha A1}$-hexanoyl-N$^{\alpha B1}$-hexanoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin, N$^{\varepsilon B28}$-hexanoyl-N$^{\alpha A1}$-hexanoyl-N$^{\alpha B1}$-hexanoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: N$^{\varepsilon B28}$-heptanoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin, N$^{\alpha B1}$-heptanoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin, N$^{\alpha A1}$-heptanoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin, N$^{\varepsilon B28}$-heptanoyl-N$^{\alpha B1}$-heptanoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin, N$^{\varepsilon B28}$-heptanoyl-N$^{\alpha A1}$-heptanoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin, N$^{\alpha A1}$-heptanoyl-N$^{\alpha B1}$-heptanoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin, N$^{\varepsilon B28}$-heptanoyl-N$^{\alpha A1}$-heptanoyl-N$^{\alpha B1}$-heptanoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: N$^{\varepsilon B28}$-octanoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin, N$^{\alpha B1}$-octanoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin, N$^{\alpha A1}$-octanoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin, N$^{\varepsilon B28}$-octanoyl-N$^{\alpha B1}$-octanoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin, N$^{\varepsilon B28}$-octanoyl-N$^{\alpha A1}$-octanoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin, N$^{\alpha A1}$-octanoyl-N$^{\alpha B1}$-octanoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin, N$^{\varepsilon B28}$-octanoyl-N$^{\alpha A1}$-octanoyl-N$^{\alpha B1}$-octanoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: N$^{\varepsilon B28}$-nonanoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin, N$^{\alpha B1}$-nonanoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin, N$^{\alpha A1}$-nonanoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin, N$^{\varepsilon B28}$-nonanoyl-N$^{\alpha B1}$-nonanoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin, N$^{\varepsilon B28}$-nonanoyl-N$^{\alpha A1}$-nonanoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin, N$^{\alpha A1}$-nonanoyl-N$^{\alpha B1}$-nonanoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin, N$^{\varepsilon B28}$-nonanoyl-N$^{\alpha A1}$-nonanoyl-N$^{\alpha B1}$-nonanoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: N$^{\varepsilon B28}$-decanoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin, N$^{\alpha B1}$-decanoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin, N$^{\alpha A1}$-decanoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin, N$^{\varepsilon B28}$-decanoyl-N$^{\alpha B1}$-decanoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin, N$^{\varepsilon B28}$-decanoyl-N$^{\alpha A1}$-decanoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin, N$^{\alpha A1}$-decanoyl-N$^{\alpha B1}$-decanoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin, N$^{\varepsilon B28}$-decanoyl-N$^{\alpha A1}$-decanoyl-N$^{\alpha B1}$-decanoyl-Lys^{B28}Pro^{B29}-human insulin.

In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure comprises the mutations and/or chemical modifications of one of the following insulin molecules: N$^{\varepsilon B29}$-pentanoyl-Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}-human insulin, N$^{\alpha B1}$-hexanoyl-Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}-human

insulin, $N^{\alpha A1}$-heptanoyl-$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-octanoyl- $N^{\alpha B1}$-octanoyl-$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-propionyl- $N^{\alpha A1}$-propionyl-$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, $N^{\alpha A1}$-acetyl- $N^{\alpha B1}$-acetyl-$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-formyl- $N^{\alpha A1}$-formyl-$N^{\alpha B1}$-formyl-$Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-formyl-des(B26)-human insulin, $N^{\alpha B1}$-acetyl-Asp^{B28}-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-propionyl- $N^{\alpha A1}$-propionyl- $N^{\alpha B1}$-propionyl-$Asp^{B1}Asp^{B3}AspB^{21}$-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-pentanoyl-Gly^{A21}-human insulin, $N^{\alpha B1}$-hexanoyl-Gly^{A21}-human insulin, $N^{\alpha A1}$-heptanoyl-Gly^{A21}-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-octanoyl- $N^{\alpha B1}$-octanoyl-Gly^{A21}-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-propionyl- $N^{\alpha A1}$-propionyl-Gly^{A21}-human insulin, $N^{\alpha A1}$-acetyl-$N^{\alpha B1}$-acetyl-Gly^{A21}-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-formyl- $N^{\alpha A1}$-formyl- $N^{\alpha B1}$-formyl-Gly^{A21}-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-butyryl-des(B30)-human insulin, $N^{\alpha B1}$-butyryl-des(B30)-human insulin, $N^{\alpha A1}$-butyryl-des(B30)-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-butyryl- $N^{\alpha B1}$-butyryl-des(B30)-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-butyryl-$N^{\alpha A1}$-butyryl-des(B30)-human insulin, $N^{\alpha A1}$-butyryl- $N^{\alpha B1}$-butyryl-des(B30)-human insulin, $N^{\varepsilon B29}$-butyryl- $N^{\alpha A1}$-butyryl- $N^{\alpha B1}$-butyryl-des(B30)-human insulin.

The present disclosure also encompasses modified forms of non-human insulins (e.g., porcine insulin, bovine insulin, rabbit insulin, sheep insulin, etc.) that comprise any one of the aforementioned mutations and/or chemical modifications.

These and other modified insulin molecules are described in detail in U.S. Patent Nos. 6,906,028; 6,551,992; 6,465,426; 6,444,641; 6,335,316; 6,268,335; 6,051,551; 6,034,054; 5,952,297; 5,922,675; 5,747,642; 5,693,609; 5,650,486; 5,547,929; 5,504,188; 5,474,978; 5,461,031; and 4,421,685; and in U.S. Patent Nos. 7,387,996; 6,869,930; 6,174,856; 6,011,007; 5,866,538; and 5,750,497, the entire disclosures of which are hereby incorporated by reference.

In various embodiments, an insulin molecule of the present disclosure includes the three wild-type disulfide bridges (i.e., one between position 7 of the A-chain and position 7 of the B-chain, a second between position 20 of the A-chain and position 19 of the B-chain, and a third between positions 6 and 11 of the A-chain).

In some embodiments, an insulin molecule is modified and/or mutated to reduce its affinity for the insulin receptor. Without wishing to be bound to a particular theory, it is believed that attenuating the receptor affinity of an insulin molecule through modification (e.g., acylation) or mutation may decrease the rate at which the insulin molecule is eliminated from serum. In some embodiments, a decreased insulin receptor affinity *in vitro* translates into a superior *in vivo* activity for an insulin conjugate. In certain embodiments, an insulin molecule is mutated such that the site of mutation is used as a conjugation point, and conjugation at the mutated site reduces binding to the insulin receptor (e.g., Lys^{A3}). In certain other embodiments, conjugation at an existing wild-type amino acid or terminus reduces binding to the insulin receptor (e.g., Gly^{A1}). In some embodiments, an insulin molecule is conjugated at position A4, A5, A8, A9, or

B30. In certain embodiments, the conjugation at position A4, A5, A8, A9, or B30 takes place via a wild-type amino acid side chain (e.g., Glu^{A4}). In certain other embodiments, an insulin molecule is mutated at position A4, A5, A8, A9, or B30 to provide a site for conjugation (e.g., Lys^{A4}, Lys^{A5}, Lys^{A8}, Lys^{A9}, or Lys^{B30}).

Methods for conjugating drugs including insulin molecules are described below. In certain embodiments, an insulin molecule is conjugated to a ligand or conjugate framework via the A1 amino acid residue. In certain embodiments the A1 amino acid residue is glycine. It is to be understood however, that the present disclosure is not limited to N-terminal conjugation and that in certain embodiments an insulin molecule may be conjugated via a non-terminal A-chain amino acid residue. In particular, the present disclosure encompasses conjugation via the epsilon-amine group of a lysine residue present at any position in the A-chain (wild-type or introduced by site-directed mutagenesis). It will be appreciated that different conjugation positions on the A-chain may lead to different reductions in insulin activity. In certain embodiments, an insulin molecule is conjugated to the conjugate framework via the B1 amino acid residue. In certain embodiments the B1 amino acid residue is phenylalanine. It is to be understood however, that the present disclosure is not limited to N-terminal conjugation and that in certain embodiments an insulin molecule may be conjugated via a non-terminal B-chain amino acid residue. In particular, the present disclosure encompasses conjugation via the epsilon-amine group of a lysine residue present at any position in the B-chain (wild-type or introduced by site-directed mutagenesis). For example, in certain embodiments an insulin molecule may be conjugated via the B29 lysine residue. In the case of insulin glulisine, conjugation to the at least one ligand via the B3 lysine residue may be employed. It will be appreciated that different conjugation positions on the B-chain may lead to different reductions in insulin activity.

In certain embodiments, the ligands are conjugated to more than one conjugation point on a drug such as an insulin molecule. For example, an insulin molecule can be conjugated at both the A1 N-terminus and the B29 lysine. In some embodiments, amide conjugation takes place in carbonate buffer to conjugate at the B29 and A1 positions, but not at the B1 position. In other embodiments, an insulin molecule can be conjugated at the A1 N-terminus, the B1 N-terminus, and the B29 lysine. In yet other embodiments, protecting groups are used such that conjugation takes place at the B1 and B29 or B1 and A1 positions. It will be appreciated that any combination of conjugation points on an insulin molecule may be employed. In some embodiments, at least one of the conjugation points is a mutated lysine residue, e.g., Lys^{A3}.

In various embodiments, a conjugate may include an insulin sensitizer (i.e., a drug which potentiates the action of insulin). Drugs which potentiate the effects of insulin include

biguanides (e.g., metformin) and glitazones. The first glitazone drug was troglitazone which turned out to have severe side effects. Second generation glitazones include pioglitazone and rosiglitazone which are better tolerated although rosiglitazone has been associated with adverse cardiovascular events in certain trials.

In various embodiments, a conjugate may include an insulin secretagogue (i.e., a drug which stimulates insulin secretion by beta cells of the pancreas). For example, in various embodiments, a conjugate may include a sulfonylurea. Sulfonylureas stimulate insulin secretion by beta cells of the pancreas by sensitizing them to the action of glucose. Sulfonylureas can, moreover, inhibit glucagon secretion and sensitize target tissues to the action of insulin. First generation sulfonylureas include tolbutamide, chlorpropamide and carbutamide. Second generation sulfonylureas which are active at lower doses include glipizide, glibenclamide, gliclazide, glibornuride and glimepiride. In various embodiments, a conjugate may include a meglitinide. Suitable meglitinides include nateglinide, mitiglinide and repaglinide. Their hypoglycemic action is faster and shorter than that of sulfonylureas. Other insulin secretagogues include glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and GLP-1 analogs (i.e., a peptide with GLP-1 like bioactivity that differs from GLP-1 by 1-10 amino acid substitutions, additions or deletions and/or by a chemical modification). GLP-1 reduces food intake by inhibiting gastric emptying, increasing satiety through central actions and by suppressing glucagon release. GLP-1 lowers plasma glucose levels by increasing pancreas islet cell proliferation and increases insulin production following food consumption. GLP-1 may be chemically modified, e.g., by lipid conjugation as in liraglutide to extend its *in vivo* half-life. Yet other insulin secretagogues include exendin-4 and exendin-4 analogs (i.e., a peptide with exendin-4 like bioactivity that differs from exendin-4 by 1-10 amino acid substitutions, additions or deletions and/or by a chemical modification). Exendin-4, found in the venom of the Gila Monster, exhibits GLP-1 like bioactivity. It has a much longer half-life than GLP-1 and, unlike GLP-1, it can be truncated by 8 amino acid residues at its N-terminus without losing bioactivity. The N-terminal region of GLP-1 and exendin-4 are almost identical, a significant difference being the second amino acid residue, alanine in GLP-1 and glycine in exendin-4, which gives exendin-4 its resistance to *in vivo* digestion. Exendin-4 also has an extra 9 amino acid residues at its C-terminus as compared to GLP-1. Mann et al. *Biochem. Soc. Trans.* 35:713-716, 2007 and Runge et al., *Biochemistry* 46:5830-5840, 2007 describe a variety of GLP-1 and exendin-4 analogs which may be used in a conjugate of the present disclosure. The short half-life of GLP-1 results from enzymatic digestion by dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV). In certain embodiments, the effects of endogenous GLP-1 may be enhanced by administration of a DPP-IV inhibitor (e.g., vildagliptin, sitagliptin, saxagliptin, linagliptin or alogliptin).

In various embodiments, a conjugate may include amylin or an amylin analog (i.e., a peptide with amylin like bioactivity that differs from amylin by 1-10 amino acid substitutions, additions or deletions and/or by a chemical modification). Amylin plays an important role in glucose regulation (e.g., see Edelman and Weyer, *Diabetes Technol. Ther.* 4:175-189, 2002). Amylin is a neuroendocrine hormone that is co-secreted with insulin by the beta cells of the pancreas in response to food intake. While insulin works to regulate glucose disappearance from the bloodstream, amylin works to help regulate glucose appearance in the bloodstream from the stomach and liver. Pramlintide acetate (SYMLIN®) is an exemplary amylin analog. Since native human amylin is amyloidogenic, the strategy for designing pramlintide involved substituting certain residues with those from rat amylin, which is not amyloidogenic. In particular, proline residues are known to be structure-breaking residues, so these were directly grafted from the rat sequence into the human sequence. Glu-10 was also substituted with an asparagine.

In various embodiments, a pre-conjugated drug may contain one or more reactive moieties (e.g., carboxyl or reactive ester, amine, hydroxyl, aldehyde, sulfhydryl, maleimidyl, alkynyl, azido, etc. moieties). As discussed below, these reactive moieties may, in certain embodiments, facilitate the conjugation process. Specific examples include peptidic drugs bearing alpha-terminal amine and/or epsilon-amine lysine groups. It will be appreciated that any of these reactive moieties may be artificially added to a known drug if not already present. For example, in the case of peptidic drugs a suitable amino acid (e.g., a lysine) may be added or substituted into the amino acid sequence. In addition, as discussed in more detail below, it will be appreciated that the conjugation process may be controlled by selectively blocking certain reactive moieties prior to conjugation.

In various embodiments, a conjugate of the present disclosure may be exploited to manipulate a natural feedback mechanism between glucose and insulin (where the level of insulin increases as the level of glucose increases and the level of glucose decreases as the level of insulin increases). Alternatively, in various embodiments, the drug can be a molecule that (a) has the same function as insulin (e.g., reduces glucose levels), (b) stimulates the production of the insulin and/or (c) potentiates the effect(s) of insulin. For example, as discussed above one could use an insulin secretagogue or an insulin sensitizer instead of insulin as the drug.

In various embodiments, a conjugate can be used which includes a drug with a function that is not directly related to glucose. Without limitation, a conjugate which responds to glucose may be used to provide long-term, mealtime dosing of a drug. Any drug which needs to be dosed periodically and/or with food would benefit from such a delivery system. As is well known in the art, many traditional drugs need to be administered with food or at mealtimes. For

example, drugs which inhibit the absorption of fats (e.g., orlistat) are advantageously present during mealtime. Similarly, drugs which lower lipid levels, e.g., lovastatin, atorvastatin, or simvastatin, or triglyceride levels, e.g., gemfibrozil, may also be advantageously released at mealtimes.

Exemplary insulin conjugates

In various embodiments, a conjugate of the present disclosure comprises an insulin molecule conjugated to one or more ligands that are independently selected from the group consisting of aminoethylglucose (AEG), aminoethylmannose (AEM), aminoethylbimannose (AEBM), aminoethyltrimannose (AETM), β-aminoethyl-N-acetylglucosamine (AEGA), and aminoethylfucose (AEF). In certain embodiments, the insulin molecule is conjugated via the A1 amino acid residue. In certain embodiments, the insulin molecule is conjugated via the B1 amino acid residue. In certain embodiments, the insulin molecule is conjugated via the epsilon-amino group of Lys^{B29}. In certain embodiments, the insulin molecule is insulin glulisine conjugated via the epsilon-amino group of Lys^{B3}.

In certain embodiments, a conjugate of the present disclosure comprises an insulin molecule conjugated to one or more aminoethylglucose (AEG) ligands. In certain embodiments, a conjugate of the present disclosure comprises an insulin molecule conjugated to one or more aminoethylmannose (AEM) ligands. In certain embodiments, a conjugate of the present disclosure comprises an insulin molecule conjugated to one or more aminoethylbimannose (AEBM) ligands. In certain embodiments, a conjugate of the present disclosure comprises an insulin molecule conjugated to one or more aminoethyltrimannose (AETM) ligands. In certain embodiments, a conjugate of the present disclosure comprises an insulin molecule conjugated to one or more β-aminoethyl-N-acetylglucosamine (AEGA) ligands. In certain embodiments, a conjugate of the present disclosure comprises an insulin molecule conjugated to one or more aminoethylfucose (AEF) ligands.

In various embodiments, a conjugate of the present disclosure comprises an insulin molecule conjugated to two or more separate ligands. In some embodiments, a conjugate of the present disclosure comprises an insulin molecule conjugated to two separate ligands. In other embodiments, a conjugate of the present disclosure comprises an insulin molecule conjugated to three separate ligands. In certain embodiments, a conjugate of the present disclosure comprises an insulin molecule conjugated to four separate ligands. In certain embodiments, the two or more separate ligands of such a conjugate are aminoethylglucose (AEG). In certain embodiments, the two or more separate ligands of such a conjugate are aminoethylmannose (AEM). In certain embodiments, the two or more separate ligands of such a conjugate are

aminoethylbimannose (AEBM). In certain embodiments, the two or more separate ligands of such a conjugate are aminoethyltrimannose (AETM). In certain embodiments, the two or more separate ligands of such a conjugate are β-aminoethyl-N-acetylglucosamine (AEGA). In certain embodiments, the two or more separate ligands of such a conjugate are aminoethylfucose (AEF).

In various embodiments, a conjugate of the present disclosure comprises two or more separate ligands conjugated to a single conjugate framework that is also conjugated to an insulin molecule. In some embodiments, the two or more separate ligands and insulin molecule of such a conjugate are each located on a separate branch of a single branched conjugate framework. In some embodiments, the two or more separate ligands and insulin molecule of such a conjugate are each located on termini of separate branches of a single branched conjugate framework. In some embodiments, the two or more separate ligands of such a conjugate are conjugated to the insulin molecule via two or more different conjugation points. In certain such embodiments, the insulin molecule is conjugated via the A1 amino acid residue and the epsilon-amino group of Lys^{B29}. In certain such embodiments, the insulin molecule is conjugated to two separate conjugate frameworks that are each conjugated to one or more separate ligands. In other such embodiments, the insulin molecule is conjugated to two separate conjugate frameworks that are each conjugated to one ligand. In yet other such embodiments, the insulin molecule is conjugated to two separate branched conjugate frameworks that are each conjugated to two ligands. In certain such embodiments, the ligands are located on separate branches of the branched conjugate frameworks. In other such embodiments, the ligands are located on termini of separate branches of the branched conjugate frameworks.

In various embodiments, a conjugate of the present disclosure comprises an insulin molecule conjugated to aminoethylglucose (AEG). In certain such embodiments, the insulin molecule is conjugated via the A1 amino acid residue. In certain such embodiments, the insulin molecule is conjugated via the B1 amino acid residue. In certain such embodiments, the insulin molecule is conjugated via the epsilon-amino group of Lys^{B29}. In certain such embodiments, the insulin molecule is insulin glulisine conjugated via the epsilon-amino group of Lys^{B3}. In certain such embodiments, the insulin molecule is conjugated via the A1 amino acid residue and the epsilon-amino group of Lys^{B29}.

In various embodiments, a conjugate of the present disclosure comprises an insulin molecule conjugated to aminoethylmannose (AEM). In certain such embodiments, the insulin molecule is conjugated via the A1 amino acid residue. In certain such embodiments, the insulin molecule is conjugated via the B1 amino acid residue. In certain such embodiments, the insulin molecule is conjugated via the epsilon-amino group of Lys^{B29}. In certain such embodiments, the insulin molecule is insulin glulisine conjugated via the epsilon-amino group of Lys^{B3}. In certain

such embodiments, the insulin molecule is conjugated via the A1 amino acid residue and the epsilon-amino group of Lys^{B29}.

In various embodiments, a conjugate of the present disclosure comprises an insulin molecule conjugated to aminoethylbimannose (AEBM). In certain such embodiments, the insulin molecule is conjugated via the A1 amino acid residue. In certain such embodiments, the insulin molecule is conjugated via the B1 amino acid residue. In certain such embodiments, the insulin molecule is conjugated via the epsilon-amino group of Lys^{B29}. In certain such embodiments, the insulin molecule is insulin glulisine conjugated via the epsilon-amino group of Lys^{B3}. In certain such embodiments, the insulin molecule is conjugated via the A1 amino acid residue and the epsilon-amino group of Lys^{B29}.

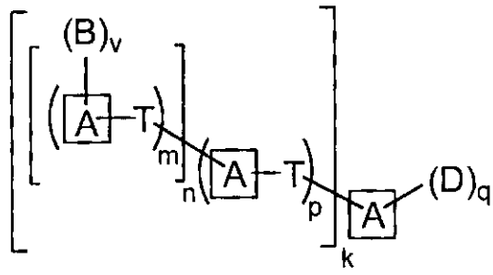
In various embodiments, a conjugate of the present disclosure comprises an insulin molecule conjugated to aminoethyltrimannose (AETM). In certain such embodiments, the insulin molecule is conjugated via the A1 amino acid residue. In certain such embodiments, the insulin molecule is conjugated via the B1 amino acid residue. In certain such embodiments, the insulin molecule is conjugated via the epsilon-amino group of Lys^{B29}. In certain such embodiments, the insulin molecule is insulin glulisine conjugated via the epsilon-amino group of Lys^{B3}. In certain such embodiments, the insulin molecule is conjugated via the A1 amino acid residue and the epsilon-amino group of Lys^{B29}.

In various embodiments, a conjugate of the present disclosure comprises an insulin molecule conjugated to β-aminoethyl-N-acetylglucosamine (AEGA). In certain such embodiments, the insulin molecule is conjugated via the A1 amino acid residue. In certain such embodiments, the insulin molecule is conjugated via the B1 amino acid residue. In certain such embodiments, the insulin molecule is conjugated via the epsilon-amino group of Lys^{B29}. In certain such embodiments, the insulin molecule is insulin glulisine conjugated via the epsilon-amino group of Lys^{B3}. In certain such embodiments, the insulin molecule is conjugated via the A1 amino acid residue and the epsilon-amino group of Lys^{B29}.

In various embodiments, a conjugate of the present disclosure comprises an insulin molecule conjugated to aminoethylfucose (AEF). In certain such embodiments, the insulin molecule is conjugated via the A1 amino acid residue. In certain such embodiments, the insulin molecule is conjugated via the B1 amino acid residue. In certain such embodiments, the insulin molecule is conjugated via the epsilon-amino group of Lys^{B29}. In certain such embodiments, the insulin molecule is insulin glulisine conjugated via the epsilon-amino group of Lys^{B3}. In certain such embodiments, the insulin molecule is conjugated via the A1 amino acid residue and the epsilon-amino group of Lys^{B29}.

Conjugate frameworks

This section describes some exemplary conjugate frameworks. In various embodiments, a conjugate of the present disclosure may have the general formula (I):



I

wherein:

each occurrence of $\left[\left(\boxed{A}-T\right)\right]$ represents a potential branch within the conjugate;

each occurrence of $\left(\boxed{A}-T\right)$ represents a potential repeat within a branch of the conjugate;

each occurrence of $\boxed{A}$ is independently a covalent bond, a carbon atom, a heteroatom, or an optionally substituted group selected from the group consisting of acyl, aliphatic, heteroaliphatic, aryl, heteroaryl, and heterocyclic;

each occurrence of T is independently a covalent bond or a bivalent, straight or branched, saturated or unsaturated, optionally substituted C_{1-30} hydrocarbon chain wherein one or more methylene units of T are optionally and independently replaced by -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, $-S(O)_2-$, $-N(R)SO_2-$, $-SO_2N(R)-$, a heterocyclic group, an aryl group, or a heteroaryl group;

each occurrence of R is independently hydrogen, a suitable protecting group, or an acyl moiety, arylalkyl moiety, aliphatic moiety, aryl moiety, heteroaryl moiety, or heteroaliphatic moiety;

–B is $-T-L^B-X$;

each occurrence of X is independently a ligand;

each occurrence of L^B is independently a covalent bond or a group derived from the covalent conjugation of a T with an X;

–D is $-T-L^D-W$;

each occurrence of W is independently a drug;

each occurrence of L^D is independently a covalent bond or a group derived from the covalent conjugation of a T with a W;

k is an integer from 1 to 12, inclusive;

q is an integer from 1 to 4, inclusive;

each occurrence of p is independently an integer from 1 to 5, inclusive; and

each occurrence of n is independently an integer from 0 to 5, inclusive; and

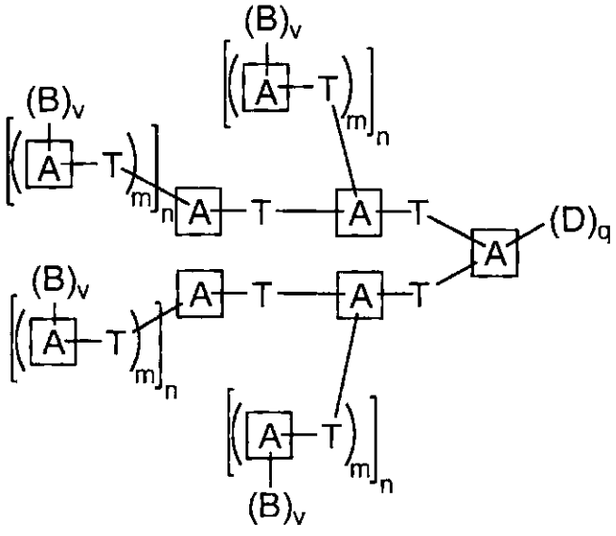
each occurrence of m is independently an integer from 1 to 5, inclusive; and

each occurrence of v is independently an integer from 0 to 5, inclusive, with the proviso that within each k-branch at least one occurrence of n is ≥ 1 and at least one occurrence of v is ≥ 1.

It is to be understood that general formula (I) (and other formulas herein) does not expressly list every hydrogen. For example, if the central A is a C_6 aryl group and $k + q < 6$ it will be appreciated that the open position(s) on the C_6 aryl ring include a hydrogen.

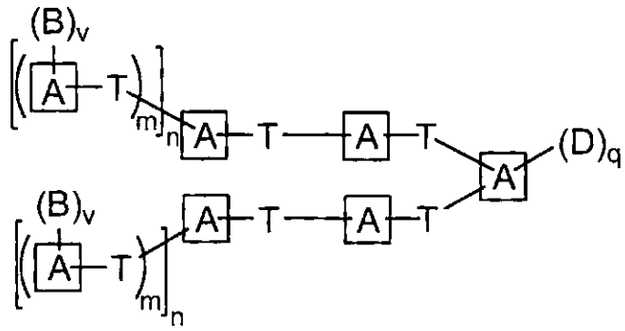
In general, it will be appreciated that each occurrence of A represents a potential branching node and that the number of branches at each node are determined by the values of k for the central A and n for non-central occurrences of A. One of ordinary skill will appreciate that because each occurrence of n may be an integer from 0 to 5, the present disclosure contemplates linear, branched, and hyperbranched (e.g., dendrimer-like) embodiments of these conjugates. The proviso which requires that within each k-branch at least one occurrence of n is ≥ 1 and at least one occurrence of v is ≥ 1 ensures that every conjugate includes at least one occurrence of B (i.e., a ligand).

In certain embodiments, each occurrence of A in a p-bracketed moiety is substituted by a number of n-bracketed moieties corresponding to a value of $n \geq 1$. For example, when $k = 2$ and $p = 2$ in both k-branches, the conjugate may be of the formula (Ia):



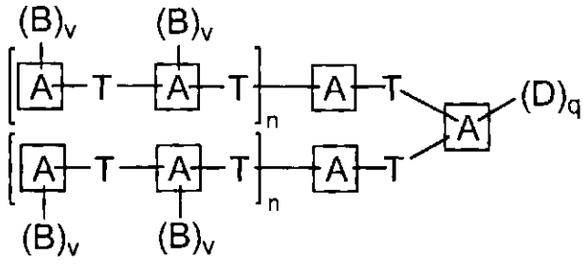
Ia

In other embodiments, only terminal occurrences of [A] in a p-bracketed moiety are substituted by a number of n-bracketed moieties corresponding to a value of $n \geq 1$. For example, when $k = 2$ and $p = 2$ in both k-branches (and $n = 0$ for the first p-bracketed moiety in both k-branches), the conjugate may be of the formula (Ib):



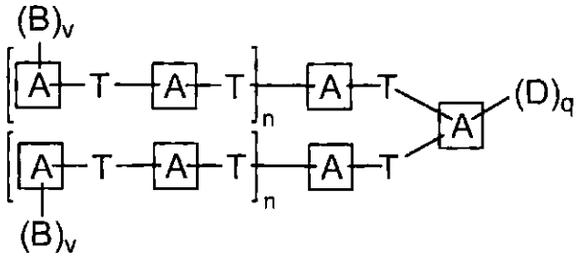
Ib

In certain embodiments, each occurrence of [A] in an m-bracketed moiety is substituted by a number of B moieties corresponding to the value of $v \geq 1$. For example, when $k = 2$, each occurrence of $p = 1$, and each occurrence of $m = 2$, the conjugate may be of the formula (Ic):



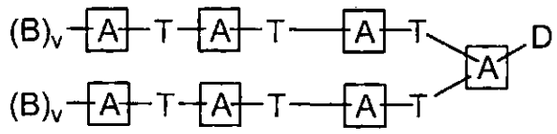
Ic

In other embodiments, only terminal occurrences of [A] in an m-bracketed moiety are substituted by a number of B moieties corresponding to a value of $v \geq 1$. For example, when $k = 2$, each occurrence of $p = 1$, and each occurrence of $m = 2$ (and $v = 0$ for the first m-bracketed moiety in each n-branch), the conjugate may be of the formula (Id):



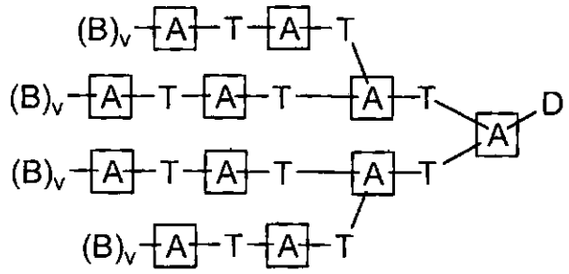
Id

By way of further example, when q =1 and n = 1 in both k-branches of the previous formula, the conjugate may be of the formula (Ie):



Ie

Alternatively, when q =1 and n = 2 in both k-branches of the previous formula, the conjugate may be of the formula (If):



If

In various embodiments, the present disclosure also provides conjugates which include ligands and/or a drug which is non-covalently bound to a conjugate framework.

For example, in some embodiments, the present disclosure provides conjugates of any of the foregoing formulas, wherein:

each of [A], T, D, k, q, p, n, m and v is defined as described above and herein;

–B is –T–LRP^B–X;

each occurrence of X is independently a ligand; and

each occurrence of LRP^B is independently a ligand-receptor pair which forms a non-covalent bond between T and X with a dissociation constant in human serum of less than 1 pmol/L.

In yet other embodiments, the present disclosure provides conjugates of any of the foregoing formulas, wherein:

each of [A], T, B, k, q, p, n, m and v is defined as described above and herein;

–D is –T–LRP^D–W;

each occurrence of W is independently a drug; and

each occurrence of LRP^D is independently a ligand-receptor pair which forms a non-covalent bond between T and W with a dissociation constant in human serum of less than 1 pmol/L.

In other embodiments, the present disclosure provides conjugates of any of the foregoing formulas wherein:

each of [A], T, k, q, p, n, m and v is defined as described above and herein;

–B is –T–LRP^B–X;

each occurrence of X is independently a ligand;

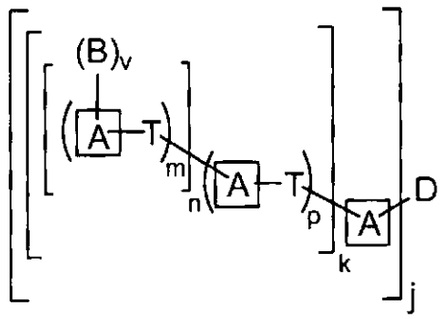
each occurrence of LRP^B is independently a ligand-receptor pair which forms a non-covalent bond between T and X with a dissociation constant in human serum of less than 1 pmol/L;

–D is –T–LRP^D–W;

each occurrence of W is independently a drug; and

each occurrence of LRP^D is independently a ligand-receptor pair which forms a non-covalent bond between T and W with a dissociation constant in human serum of less than 1 pmol/L.

In another aspect, a conjugate of the present disclosure may have the general formula (II):



II

wherein [A], B, T, D, v, m, n, p, and k are as defined and described herein, and j is an integer from 1 to 4 inclusive. Conjugates of formula (II) may have multiple sites of conjugation of ligand to drug (i.e., where two or more ligands are conjugated to a single drug molecule via different sites on the drug, e.g., different amino acids in a biomolecular drug). It will be appreciated that, when q is 1, the subgenera described above (i.e., formulae (Ia)-(If)) apply to conjugates of formula (II) when j is 1. Likewise, similar subgenera can be contemplated by one skilled in the art for conjugates wherein j is 2, 3, or 4.

For purposes of exemplification and for the avoidance of confusion it is to be understood that an occurrence of: –[A]–D–[A]– in a conjugate of formula (II) (i.e., when j is 2) could be represented as: –[A]–T–L^D–W–L^D–T–[A]– (when the drug is covalently bound to the conjugate

framework) or –[A]–T–LRP^D–W–LRP^D–T–[A]– (when the drug is non-covalently bound to the conjugate framework).

Description of Exemplary Groups

[A] *(node)*

In certain embodiments, each occurrence of [A] is independently an optionally substituted group selected from the group consisting of acyl, aliphatic, heteroaliphatic, aryl, heteroaryl, and heterocyclic. In some embodiments, each occurrence of [A] is the same. In some embodiments, the central [A] is different from all other occurrences of [A]. In certain embodiments, all occurrences of [A] are the same except for the central [A].

In some embodiments, [A] is an optionally substituted aryl or heteroaryl group. In some embodiments, [A] is 6-membered aryl. In certain embodiments, [A] is phenyl.

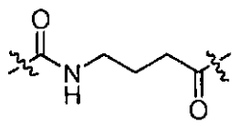
In certain embodiments, [A] is a heteroatom selected from N, O, or S. In some embodiments, [A] is nitrogen atom. In some embodiments, [A] is an oxygen atom. In some embodiments, [A] is sulfur atom. In some embodiments, [A] is a carbon atom.

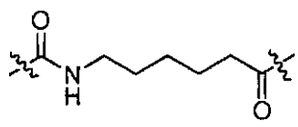
T (spacer)

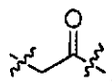
In certain embodiments, each occurrence of T is independently a bivalent, straight or branched, saturated or unsaturated, optionally substituted C_{1-20} hydrocarbon chain wherein one or more methylene units of T are optionally and independently replaced by -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -$S(O)_2$-, -N(R)SO_2-, -SO_2N(R)-, a heterocyclic group, an aryl group, or a heteroaryl group. In certain embodiments, one, two, three, four, or five methylene units of T are optionally and independently replaced. In certain embodiments, T is constructed from a C_{1-10}, C_{1-8}, C_{1-6}, C_{1-4}, C_{2-12}, C_{4-12}, C_{6-12}, C_{8-12}, or C_{10-12} hydrocarbon chain wherein one or more methylene units of T are optionally and independently replaced by -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -$S(O)_2$-, -N(R)SO_2-, -SO_2N(R)-, a heterocyclic group, an aryl group, or a heteroaryl group. In some embodiments, one or more methylene units of T is replaced by a heterocyclic group. In some embodiments, one or more methylene units of T is replaced by a triazole moiety. In certain embodiments, one or more methylene units of T is replaced by -C(O)-. In certain embodiments,

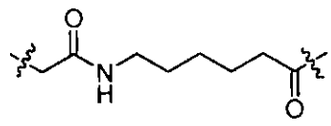
one or more methylene units of T is replaced by -C(O)N(R)-. In certain embodiments, one or more methylene units of T is replaced by -O-.

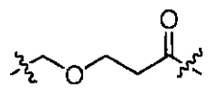
In some embodiments, T is  .

In some embodiments, T is  .

In some embodiments, T is  .

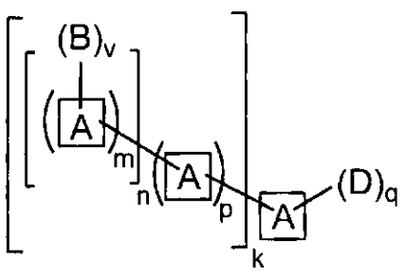
In some embodiments, T is  .

In some embodiments, T is  .

In some embodiments, T is  .

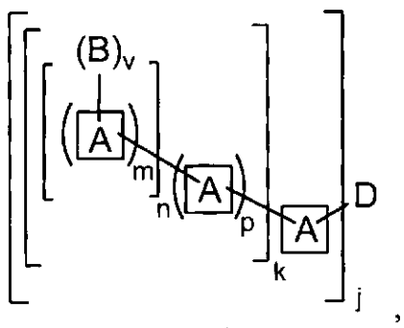
In certain embodiments, each occurrence of T is the same.

In certain embodiments, each occurrence of T (outside groups B and D) is a covalent bond and the conjugate is of the general formula (IV) or (V):



IV

or



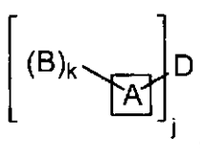
V

wherein [A], B, D, v, m, n, p, k, and j are as defined and described herein.

In certain embodiments of general formulae (IV) and (V), each occurrence of [A] except for the central [A] is a covalent bond, each occurrence of v = 1, and the conjugate is of the formula (VI) or (VII):



or



VI VII

wherein A, B, D, q, k, and j are as defined and described herein.

In certain such embodiments for formula (VI), k = 1 and q = 1.

In other embodiments, k = 2 and q = 1.

In other embodiments, k = 3 and q = 1.

In other embodiments, k = 1 and q = 2.

In other embodiments, k = 2 and q = 2.

In certain such embodiments for formula (VII), k = 1 and j = 2.

In other embodiments, k = 2 and j = 2.

In other embodiments, k = 3 and j = 2.

In other embodiments, k = 1 and j = 1.

In other embodiments, k = 2 and j = 1.

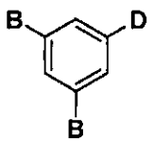
In other embodiments, k = 3 and j = 1.

In other embodiments, k = 1 and j = 3.

In other embodiments, k = 2 and j = 3.

In other embodiments, k = 3 and j = 3.

In some embodiments, the present disclosure provides conjugates of general formula (VIa):

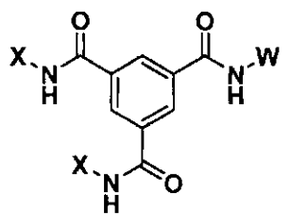


,

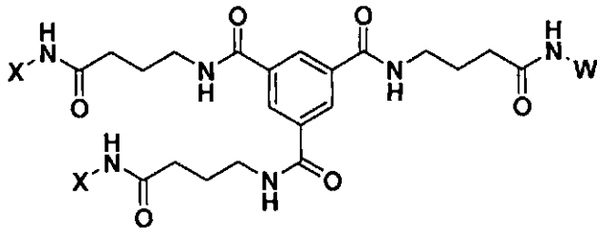
VIa

wherein B and D are as defined and described herein.

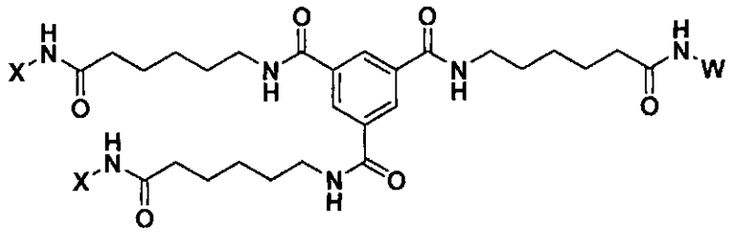
For example, in some embodiments, the present disclosure provides conjugates of formula:



;

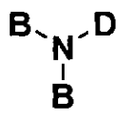


; or



wherein W and X are as defined and described herein.

In some embodiments, the present disclosure provides conjugates of general formula (VIb):

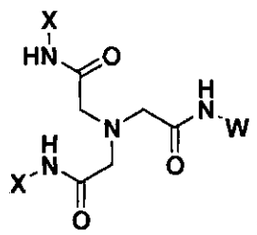


,

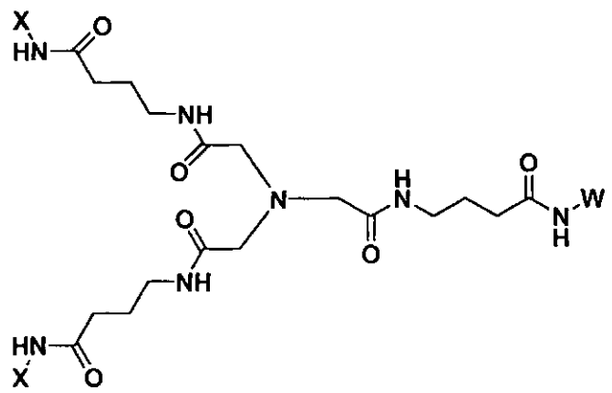
VIb

wherein B and D are as defined and described herein.

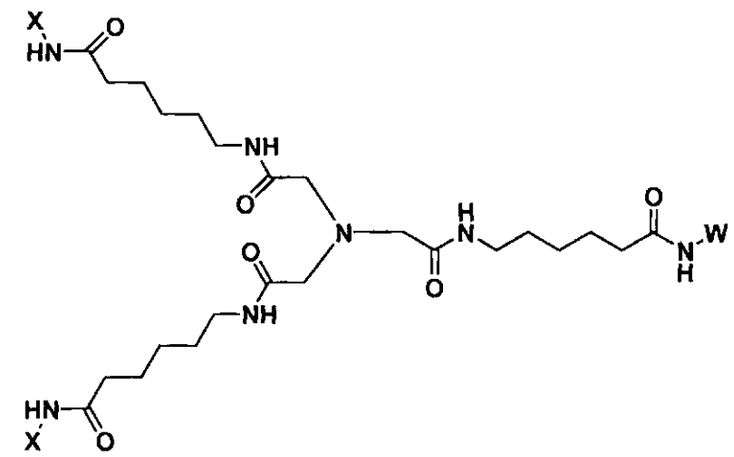
For example, in some embodiments, the present disclosure provides conjugates of formula:



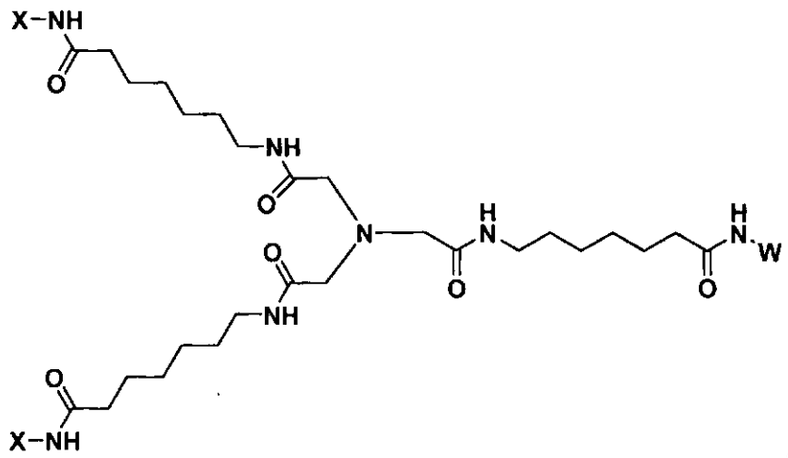
;



;



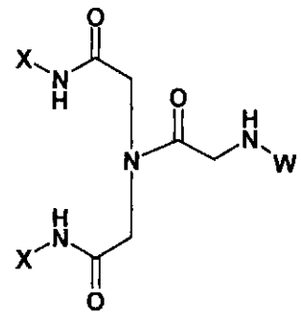
; or



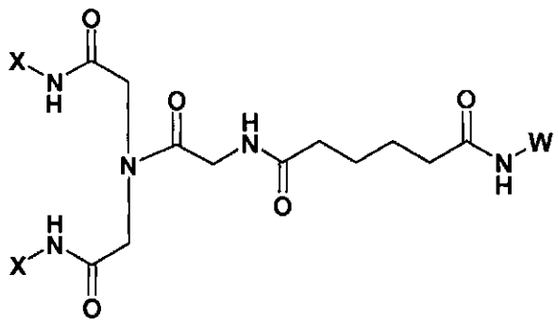
,

wherein W and X are as defined and described herein.

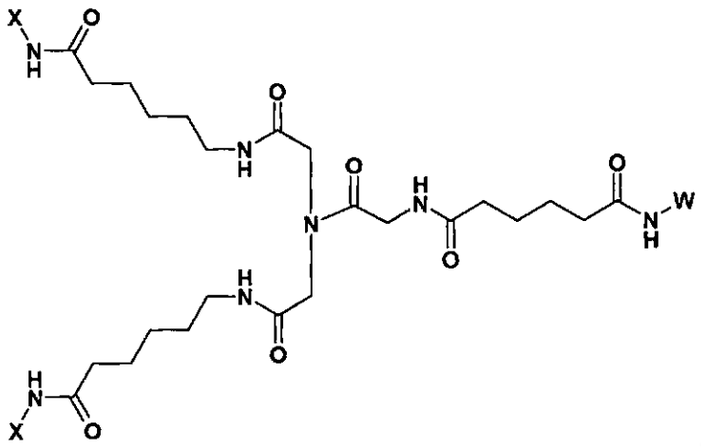
For example, in some embodiments, the present disclosure provides conjugates of formula:



;

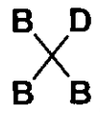


; or



wherein W and X are as defined and described herein.

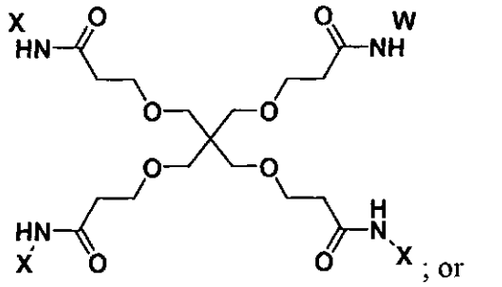
In some embodiments, the present disclosure provides conjugates of general formula (VIc):



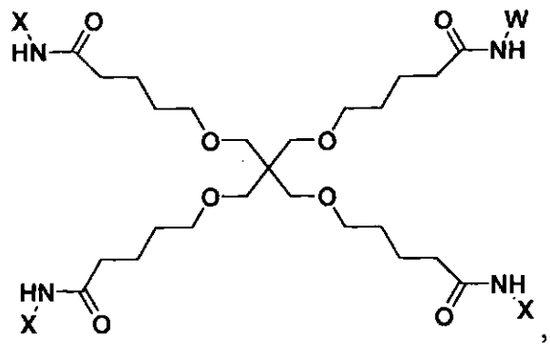
VIc

wherein B and D are as defined and described herein.

For example, in some embodiments, the present disclosure provides conjugates of formula:

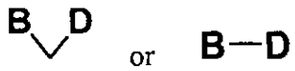


; or



wherein W and X are as defined and described herein.

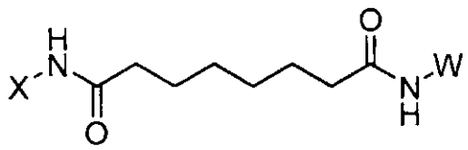
In some embodiments, the present disclosure provides conjugates of general formula (VId) or (VIe):



VId VIe

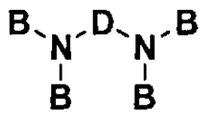
wherein B and D are as defined and described herein.

For example, in some embodiments, the present disclosure provides conjugates of formula:

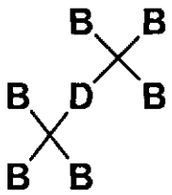


wherein W and X are as defined and described herein.

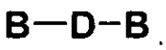
It will be appreciated that subgenera of formulae (VIa), (VIb), (VIc), (VId), and (VIe) and species thereof, apply to conjugates of formula (VII) wherein j is 1. Likewise, similar subgenera and species can be contemplated by one skilled in the art for conjugates of formula (VII) wherein j is 2, 3, or 4. For example, when j is 2, the present disclosure provides conjugates of formula:



VIIb-*i*



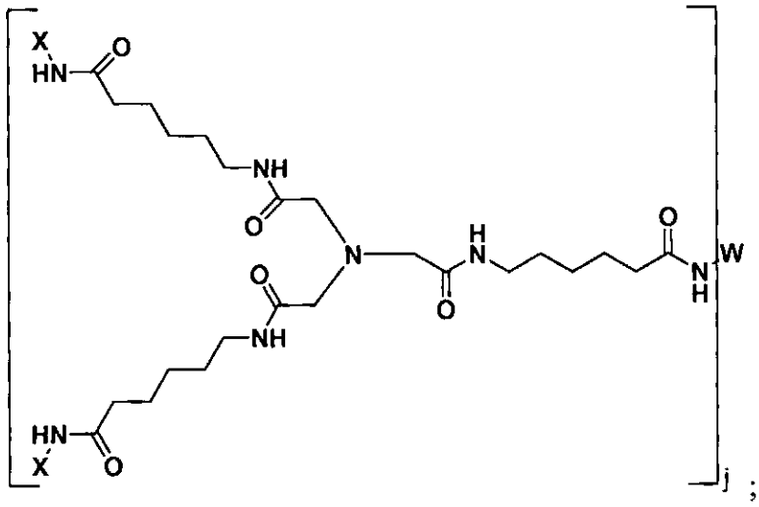
VIIc-*i*

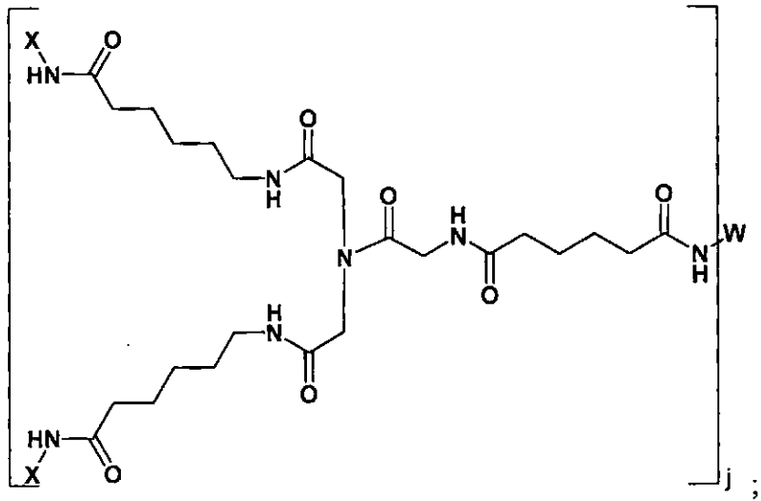


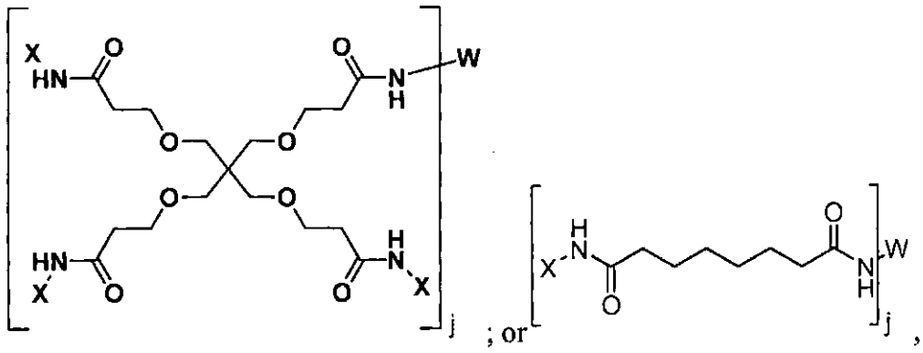
VIIe-*i*

wherein B and D are as defined and described herein.

In certain embodiments, the present disclosure provides conjugates of formula:

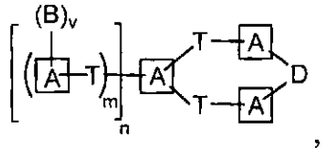






wherein W, X, and j are as defined and described herein.

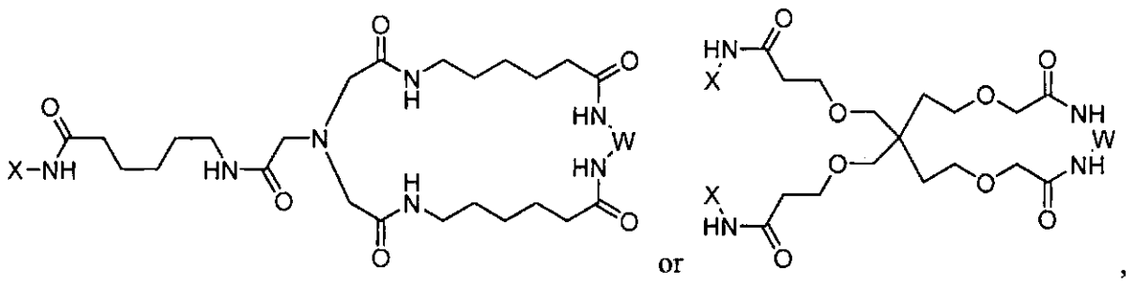
In another aspect, a conjugate of the present disclosure may have the general formula (VIII):



VIII

wherein [A], T, D, v, m, and n are as defined and described for conjugates of formula (I), and B is $-T-L^B-X$, wherein each occurrence of X is independently a ligand that includes a saccharide.

For example, in some embodiments, the present disclosure provides conjugates of formula:

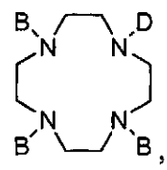


or

,

wherein W and X are as defined and described for conjugates of formula (I).

In yet another aspect, the conjugate scaffold is not of formula (I) or (II), but instead is a macrocycle. In some embodiments, the macrocycle is a polyamine macrocycle. For example, in various embodiments, a conjugate of the present disclosure may have the general formula (IX):



IX

wherein D is as defined and described for conjugates of formula (I), and B is $-T-L^B-X$, wherein each occurrence of X is independently a ligand that includes a saccharide.

B (ligand)

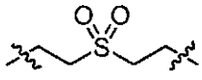
In certain embodiments, –B is $-T-L^B-X$ where X is a ligand and L^B is a covalent bond or a group derived from the covalent conjugation of an X with a T. Exemplary ligands and their saccharide components were described above.

D (drug)

In certain embodiments, –D is $-T-L^D-W$ where W is a drug and L^D is a covalent bond or a group derived from the covalent conjugation of a W with a T. Exemplary drugs were described above.

L^B and L^D (covalent conjugation)

One of ordinary skill will appreciate that a variety of conjugation chemistries may be used to covalently conjugate an X with a T and/or a W with a T (generally "components"). Such

techniques are widely known in the art, and exemplary techniques are discussed below. Components can be directly bonded (i.e., with no intervening chemical groups) or indirectly bonded through a spacer (e.g., a coupling agent or covalent chain that provides some physical separation between the conjugated element and the remainder of the conjugate framework). It is to be understood that components may be covalently bound to a conjugate framework through any number of chemical bonds, including but not limited to amide, amine, ester, ether, thioether, isourea, imine, etc. bonds. In certain embodiments, L^B and/or L^D (generally "L" for the purposes of this section) is a covalent bond. In some embodiments, L is an optionally substituted moiety derived from conjugating an optionally substituted carbonyl-reactive, thiol-reactive, amine-reactive, or hydroxyl-reactive moiety of T with a carboxyl, thiol, amine, or hydroxyl group of X or W. In some embodiments, L is an optionally substituted moiety derived from conjugating an optionally substituted carboxyl-reactive, thiol-reactive, amine-reactive, or hydroxyl-reactive moiety of X or W with a carboxyl, thiol, amine, or hydroxyl group of T. In some embodiments, L is  . In some embodiments, L is a succinimide moiety.

In various embodiments, components may be covalently bound to a conjugate framework using "click chemistry" reactions as is known in the art. These include, for example, cycloaddition reactions, nucleophilic ring-opening reactions, and additions to carbon-carbon multiple bonds (e.g., see Kolb and Sharpless, *Drug Discovery Today* 8:1128-1137, 2003 and references cited therein as well as Dondoni, *Chem. Asian J.* 2:700-708, 2007 and references cited therein). As discussed above, in various embodiments, the components may be bound to a conjugate framework via natural or chemically added pendant groups. In general, it will be appreciated that the first and second members of a pair of reactive groups (e.g., a carboxyl group and an amine group which react to produce an amide bond) can be present on either one of the component and framework (i.e., the relative location of the two members is irrelevant as long as they react to produce a conjugate). Exemplary linkages are discussed in more detail below.

In various embodiments, carboxyl (or reactive ester) bearing components can be conjugated to -OH bearing frameworks (OBFs) using the procedure outlined by Kim et al., *Biomaterials* 24:4843-4851 (2003). Briefly, the OBF is dissolved in DMSO along with the carboxyl bearing component and reacted by means of N',N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) and 4-dimethylaminopyridine (DMAP) as catalysts under a dry atmosphere. Carboxyl bearing components can be conjugated to $-NH_2$ bearing frameworks (NBFs) using a carbodiimide (EDAC) coupling procedure. Using this procedure, the carboxyl bearing component is functionalized by reaction with EDAC in a pH 5 buffer followed by the addition of the NBF. In either of these cases (and in any of the following cases), the resulting products may be purified

by any number of means available to those skilled in the art including, but not limited to, size exclusion chromatography, reversed phase chromatography, silica gel chromatography, ion exchange chromatography, ultrafiltration, and selective precipitation.

In various embodiments, amine bearing components can be coupled to -COOH bearing frameworks (CBFs). CBFs using activated ester moieties (e.g., see Hermanson in *Bioconjugate Techniques, 2nd edition*, Academic Press, 2008 and references cited therein). Briefly, a CBF with terminal activated carboxylic acid esters such as –NHS, –SSC, –NPC, etc. is dissolved in an anhydrous organic solvent such as DMSO or DMF. The desired number of equivalents of amine bearing component are then added and mixed for several hours at room temperature. Amine bearing components can also be conjugated to CBFs to produce a stable amide bond as described by Baudys et al., *Bioconj. Chem.* 9:176-183, 1998. This reaction can be achieved by adding tributylamine (TBA) and isobutylchloroformate to a solution of the CBF and an amine bearing component in dimethylsulfoxide (DMSO) under anhydrous conditions. Amine bearing components can alternatively be coupled to OBFs through cyanalation using reagents including, but not limited to, cyanogen bromide (CNBr), N-cyanotriethylammonium tetrafluoroborate (CTEA), 1-Cyano-4-(Dimethylamino)-pyridinium tetrafluorborate (CDAP), and p-nitrophenylcyanate (pNPC). CNBr reactions can be carried out at mildly basic pH in aqueous solution. CDAP reactions are carried out in a mixture of DMSO and water at mildly basic pH using triethylamine (TEA) as a catalyst. In certain embodiments, amine bearing components can be conjugated to NBFs, e.g., through glutaraldehyde coupling in aqueous buffered solutions containing pyridine followed by quenching with glycine. In certain embodiments, amine bearing components can be conjugated to aldehyde bearing frameworks using a Schiff Base coupling procedure followed by reduction (e.g., see see Hermanson in *Bioconjugate Techniques, 2nd edition*, Academic Press, 2008 and references cited therein as well as Mei et al. in *Pharm. Res.* 16: 1680-1686, 1999 and references cited therein). Briefly, a framework with terminal activated aldehydes (e.g., acetaldehyde, propionaldehyde, butyraldehyde, etc.) is dissolved in an aqueous buffer with the pH at or below neutral to prevent unwanted aldehyde hydrolysis. The desired number of equivalents of an amine bearing component are then added and mixed at room temperature followed by addition of an excess of suitable reducing agent (e.g., sodium borohydride, sodium cyanobrohydride, sodium triacetoxyborohydride pyridine borane, triethylamine borane, etc.).

In various embodiments, hydroxyl bearing components can be conjugated to OBFs according to the divinylsulfone (DVS) procedure. Using this procedure, the OBF is added to a pH 11.4 bicarbonate buffer and activated with DVS followed by addition of a hydroxyl bearing component after which glycine is added to neutralize and quench the reaction. Hydroxyl bearing

components may also be coupled to OBFs using activated ester moieties as described above to produce ester bonds.

In various embodiments, sulfhydryl bearing components can be coupled to maleimide bearing frameworks (MBFs) using a relatively mild procedure to produce thioether bonds (e.g., see Hermanson in *Bioconjugate Techniques, 2nd edition*, Academic Press, 2008 and references cited therein). Because the maleimide group is much less susceptible to hydrolysis than activated esters, the reaction can be carried out under aqueous conditions. Briefly, an MBF is dissolved in a buffered aqueous solution at pH 6.5-7.5 followed by the desired number of equivalents of sulfhydryl bearing component. After mixing at room temperature for several hours, the thioether coupled conjugate may be purified. Sulfhydryl bearing components can also be conjugated to NBFs according to a method described by Thoma et al., *J. Am. Chem. Soc.* 121:5919-5929, 1999. This reaction involves suspending the NBF in anhydrous dimethylformamide (DMF) followed by the addition of 2,6-lutidine and acid anhydride and subsequent purification of the reactive intermediate. A sulfhydryl bearing component is then added to a solution of the intermediate in DMF with triethylamine.

In various embodiments, azide bearing components can be coupled to an alkyne bearing framework (ABF) using the copper(I)-catalyzed modern version of the Huisgen-type azide–alkyne cycloaddition to give a 1,4-di-substituted 1,2,3-triazole (e.g., see Dondoni, *Chem. Asian J.* 2:700 – 708, 2007 and references cited therein as well as Dedola et al., *Org. Biomol. Chem.* 5: 1006–1017, 2007). This reaction, commonly referred to as a "click" reaction, may be carried out for example in neat THF using N,N-diisopropylethylamine and $Cu(PPh_3)_3Br$ as the catalyst system (e.g., see Wu et al., *Chem. Commun.* 5775-5777, 2005). The reaction may also be carried out in a 3:1 (THF:water) mixture using sodium ascorbate and $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ as the catalyst system (e.g., see Wu et al., *supra*). In either case, the azide bearing component is added to the ABF at the desired number of equivalents followed by mixing for 12-48 hours at room temperature. Alternatively, alkyne bearing components may be conjugated to an azide bearing framework using exactly the same conditions described above.

Certain components may naturally possess more than one of the same chemically reactive moiety. In some examples, it is possible to choose the chemical reaction type and conditions to selectively react the component at only one of those sites. For example, in the case where insulin is conjugated through reactive amines, in certain embodiments, the N-terminal α-Phe-B1 is a preferred site of attachment over the N-terminal α-Gly-A1 and ε-Lys-B29 to preserve insulin bioactivity (e.g., see Mei et al., *Pharm. Res.* 16: 1680-1686, 1999 and references cited therein as well as Tsai et al., *J. Pharm. Sci.* 86: 1264-1268, 1997). In an exemplary reaction between insulin with hexadecenal (an aldehyde-terminated molecule), researchers found that mixing the

two components overnight in a 1.5M pH 6.8 sodium salicylate aqueous solution containing 54% isopropanol at a ratio of 1:6 (insulin:aldehyde mol/mol) in the presence of sodium cyanoborohydride resulted in over 80% conversion to the single-substituted Phe-B1 secondary amine-conjugated product (Mei et al., *Pharm. Res.* 16:1680-1686, 1999). Their studies showed that the choice of solvent, pH, and insulin:aldehyde ratio all affected the selectivity and yield of the reaction. In most cases, however, achieving selectivity through choice of chemical reaction conditions is difficult. Therefore, in certain embodiments it may be advantageous to selectively protect the component (e.g., insulin) at all sites other than the one desired for reaction followed by a deprotection step after the material has been reacted and purified. For example, there are numerous examples of selective protection of insulin amine groups available in the literature including those that may be deprotected under acidic (BOC), slightly acidic (citraconic anhydride), and basic (MSC) conditions (e.g., see Tsai et al., *J. Pharm. Sci.* 86: 1264-1268, 1997; Dixon et al., *Biochem. J.* 109: 312-314, 1968; and Schuettler et al., *D. Brandenburg Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 360: 1721, 1979). In one example, the Gly-A1 and Lys-B29 amines may be selectively protected with tert-butoxycarbonyl (BOC) groups which are then removed after conjugation by incubation for one hour at 4 C in a 90% trifluoroacetic acid (TFA)/10% anisole solution. In one embodiment, a dry powder of insulin is dissolved in anhydrous DMSO followed by an excess of triethylamine. To this solution, approximately two equivalents of di-tert-butyl dicarbonate solution in THF are added slowly and the solution allowed to mix for 30-60 minutes. After reaction, the crude solution is poured in an excess of acetone followed by dropwise addition of dilute HCl to precipitate the reacted insulin. The precipitated material is centrifuged, washed with acetone and dried completely under vacuum. The desired di-BOC protected product may be separated from unreacted insulin, undesired di-BOC isomers, and mono-BOC and tri-BOC byproducts using preparative reverse phase HPLC or ion exchange chromatography (e.g., see Tsai et al., *J. Pharm. Sci.* 86: 1264-1268, 1997). In the case of reverse phase HPLC, a solution of the crude product in 70% water/30% acetonitrile containing 0.1% TFA is loaded onto a C8 column and eluted with an increasing acetonitrile gradient. The desired di-BOC peak is collected, rotovapped to remove acetonitrile, and lyophilized to obtain the pure product.

LRP^B and LRP^D (non-covalent conjugation)

One of ordinary skill will appreciate that a variety of conjugation chemistries may be used to non-covalently conjugate an X with a T and/or W with a T (generally "components"). Such techniques are widely known in the art, and exemplary techniques are discussed below. In certain embodiments, the dissociation constant (K_d) of the non-covalent linkage in human serum

Drug loading

In general, the amount of drug that is loaded onto a conjugate can be controlled by adjusting the molecular weight of the conjugate framework and/or the level of chemical activation (i.e., when pendant groups are added to the framework). In various embodiments, the drug loading level may be in the range of 5 to 99% w/w of drug to conjugate. In various embodiments, loading levels within the narrower range of 50 to 99% may be used, e.g., in the range of 80 to 99%.

Other

It is to be understood that while the preceding sections describe components of the conjugates (e.g., ligand, drug, framework) under separate headings, the present disclosure encompasses conjugates that are comprised of any and all of the disclosed ligands, drugs and frameworks.

Intermediates for preparing conjugates

In one aspect, the present disclosure provides reagents for preparing conjugates. Thus, in various embodiments, a compound of general formula (I) is provided wherein:

each of [A], T, D, k, q, k + q, p, n, m and v is defined as described above and herein;

–B is $-T-L^{B'}$; and

each occurrence of $L^{B'}$ is independently hydrogen, an alkyne-containing moiety, an azide-containing moiety, or an optionally substituted carbonyl-reactive, thiol-reactive, amine-reactive, or hydroxyl-reactive moiety.

In other embodiments, a compound of general formula (I) is provided wherein:

each of [A], T, B, k, q, k + q, p, n, m and v is defined as described above and herein;

–D is $-T-L^{D'}$; and

each occurrence of $L^{D'}$ is independently hydrogen, an alkyne-containing moiety, an azide-containing moiety, or an optionally substituted carbonyl-reactive, thiol-reactive, amine-reactive, or hydroxyl-reactive moiety.

Methods for preparing conjugates

As described in the Examples, we have exemplified methods for preparing the aforementioned conjugates using insulin as an exemplary drug and aminoethylglucose (AEG), aminoethylmannose (AEM), aminoethylbimannose (AEBM), aminoethyltrimannose (AETM), aminoethylfucose (AEF), and/or β-aminoethyl-N-acetylglucosamine (AEGA) as exemplary

ligands. Without limitation, conjugates with two ligands per conjugation site and with short distances between all framework components may be prepared using tris(hydroxymethyl) aminomethane (Tris), tris-succinimidyl aminotriacetate (TSAT), tris-succinimidyl-1,3,5-benzenetricarboxylate (TSB), and benzene-1, 3, 5-tricarboxy-(N-4-butyric-NHS-ester)amide (TSB-C4) as conjugate frameworks. If more space between framework components is desired, then succinimidyl (6-aminocaproyl)aminotriacetate (TSAT-C6), succinimidyl (6-amino(PEO-6))aminotriacetate (TSAT-PEO-6), benzene-1, 3, 5-tricarboxy-(N-6-aminocaproic-NHS ester)amide (TSB-C6), and benzene-1, 3, 5-tricarboxy-(N-10-aminodecanoic-NHS ester)amide (TSB-C10) may be used. The TSAT-C6 spacer arm chemistry imparts more hydrophobic character to the conjugate as compared to TSAT-PEO-6.

For example, for purposes of illustration, in one embodiment, both the ligand (e.g., AEG, AEM, AEMB and AETM) and insulin may be reacted to a TSAT-C6 framework through the terminal activated esters to produce insulin-TSAT-C6-AEG-2, insulin-TSAT-C6-AEM-2, insulin-TSAT-C6-AEMB-2, and insulin-TSAT-C6-AETM-2 conjugates. The various ligands are synthesized ahead of time as discussed in the Examples. In some embodiments, the A1 and B29 amino groups of insulin are BOC-protected as described in the Examples so that each insulin can only react at the Phe-B1 α-amino group. In some embodiments, the B1 and B29 amino groups of insulin are BOC-protected as described in the Examples so that each insulin can only react at the Gly-A1 α-amino group. Approximately one equivalent of BOC-insulin as a 40-50 mg/ml solution in DMSO is added at room temperature to a 50 mg/ml solution of TSAT-C6 in DMSO containing excess triethylamine and allowed to react for approximately one hour. Next, an excess of AEG, AEM, AEBM, and/or AETM (2-10 equivalents) as a 100 mg/ml solution in DMSO is added and allowed to react for an additional 2 hours. After reaction, the DMSO solution is superdiluted by 10x into a pH 5 saline buffer after which the pH is adjusted to 8.0 and the solution passed through a Biogel P2 column to remove low molecular reactants and salts. The material eluting in the void fraction is concentrated using a 3K ultrafiltration apparatus after which it is injected on a prep scale reverse phase HPLC column (C8, acetonitrile/water mobile phase containing 0.1% TFA) to purify the desired product from unreacted BOC2-insulin. The desired elution peak is collected pooled and rotovapped to remove acetonitrile followed by lyophilization to obtain a dry powder. Finally, the BOC protecting groups are removed by dissolving the lyophilized powder in 90% TFA/10% anisole for one hour at 4 C followed by 10x superdilution in HEPES pH 8.2 buffer containing 0.150 M NaCl. The pH is adjusted to between 7.0 and 8.0 using NaOH solution after which the material is passed through a Biogel P2 column to remove anisole, BOC, and any other contaminating salts. The deprotected, purified aqueous conjugate solution is then concentrated to the desired level and stored at 4 C until needed.

In another aspect, reaction may take place at the B29 epsilon-amino group using unprotected insulin in carbonate buffer, since under those conditions the B29 amino group is the most reactive of the three amino groups present in wild-type insulin. In an exemplary synthesis, the framework containing N-terminal activated esters is dissolved at 60 mM in anhydrous DMSO followed by the addition of triethylamine (TEA). The solution is stirred rapidly for 10 minutes at room temperature. In parallel, a 448 mM solution of ligand is prepared in an appropriate volume of anhydrous DMSO. Once dissolved, enough ligand solution is added dropwise over the course of ten minutes to provide a number of reactive equivalents equal to 1.5 times the number of activated ester groups on the framework, N, minus one. For example, if there are N=3 initial activated ester groups per framework, then (3x(3-1)x60mM/370 mM)=0.973 ml of ligand solution are added. If there are N=4 initial activated ester groups per framework, then (3x(4-1)x60mM/370 mM)=1.46 ml of ligand solution are added, and so on. After the ligand solution is added, the solution is stirred for one hour at room temperature.

The amine-bearing drug is then dissolved separately at 17.2 mM in sodium carbonate buffer (0.1 M, pH 11) and the pH subsequently adjusted to 10.8 with 1.0 N sodium hydroxide. Once dissolved, the entire framework/DMSO/ligand/TEA solution is added dropwise over the course of 75 minutes to the drug/carbonate buffer solution. During the addition, the pH of the resulting mixture is adjusted every 5 minutes to 10.8 if necessary using dilute HCl or NaOH. The solution is allowed to stir for an additional 15 minutes after the dropwise addition to ensure complete reaction.

The resulting solution is then superdiluted by 10x into a 20 mM pH 5.0 HEPES buffered saline solution containing 0.150 M NaCl followed by pH adjustment with dilute HCl to a final pH of 8.0. The aqueous solution is first purified by size exclusion using an appropriate solid phase for the desired separation of conjugated and unconjugated materials. The solution passing through the column void volume is then concentrated using an appropriately sized ultrafiltration membrane to approximately 40 ml. This solution is further purified to obtain the desired product using preparative reverse phase HPLC. Once collected, the solution is rotovapped to remove acetonitrile and lyophilized to obtain pure conjugate.

Furthermore, under the carbonate buffer conditions, the A1 amino group is the second most reactive amino group of wild-type insulin. Thus, in certain embodiments, A1,B29-disubstituted insulin-conjugates are synthesized using the conditions described above with approximately ten times the amount of multivalent active ester framework and ligand per insulin molecule compared to the B29-monosubstituted insulin-conjugate synthesis.

In another aspect, B29-monosubstituted insulin-conjugates are synthesized using N-terminal protecting amino acid sequences using similar methods to those reported in U.S. Patent

No. 7,402,565. Specifically, N-terminal peptide sequences are engineered onto the insulin A-chain and B-chain such that the protecting amino acid sequences contain Arg^{A0} and Arg^{B0} to give an insulin intermediate. Conjugation takes places at Lys^{B29} on the insulin intermediate, while the N-termini are protected from conjugation side-products. The conjugated insulin intermediate is treated with trypsin to cleave the N-terminal protecting amino acid sequences to give an insulin-conjugate wherein solely Lys^{B29} is conjugated. In some embodiments, the insulin intermediate is derived from a single chain insulin precursor as described in U.S. Patent No. 7,402,565. In some embodiments, the insulin intermediate is a mutant that contains a conjugation site other than Lys^{B29} and an analogous synthesis to the one described for Lys^{B29} is performed.

It will be appreciated that these exemplary procedures may be used to produce other conjugates with different ligands and drugs, different conjugation chemistries, different separations between framework components, and/or different valencies by substituting the TSAT-C6 framework with a different framework as described below.

For example, if yet more distance is required between framework components and/or a preserved charge is required at the site of conjugation, then an appropriately-sized amine-bearing diethyl acetal (e.g., aminopropionaldehyde diethyl acetal (APDA) or aminobutyraldehyde diethyl acetal (ABDA)) may be conjugated to one of the reactive groups on the frameworks listed here followed by complete reaction of the remaining reactive groups with the ligand of interest (e.g., AEM, AEBM, or AETM). A reactive aldehyde group can then be revealed from the diethyl acetal under acidic conditions followed by a reductive amination with insulin to complete the drug conjugation step then ABDA-TSAT, ABDA-LCTSAT, etc. may be employed.

In yet another example, tetrakis-(N-succinimidyl carboxypropyl)pentaerythritol (TSPE), may be used to attach three ligands per conjugation site for increased multivalency. It will also be appreciated by those skilled in the art that any of the above teachings may be used to produce hyperbranched (e.g., dendrimer-like) conjugates with even higher order valencies. For example, Röckendorf and Lindhorst provide a comprehensive review of current approaches for producing hyperbranched structures in *Topics in Current Chemistry*. 217: 202-238, 2001.

Furthermore, ligands already containing a predetermined degree of multivalency may again be reacted according to the procedures described above to produce even higher orders of ligand multiplicity. For example, a divalent AEM-2, AEBM-2, or AETM-2 molecule containing a terminal reactive amine may be prepared by conjugating two of each ligand to a suitable framework to which a reactive amine is also conjugated. A trivalent AEM-3, AEBM-3, or AETM-3 molecule containing a terminal reactive amine may be prepared by conjugating three of each ligand to a suitable framework to which a reactive amine is also conjugated. The NH_2-divalent saccharides may be reacted with the same frameworks described above to produce drug

conjugates with 4 and 6 ligands per drug molecule. The NH_2-trivalent saccharides may be reacted with the same frameworks described above to produce drug conjugates with 6 and 9 ligands per drug molecule.

In all cases, it should be recognized that a mixture of different ligands may be conjugated to the same drug via a multivalent framework by adjusting the framework chemistry, valency, and the ligand:framework stoichiometry. For example, Insulin-AEM-1-AEBM-1, Insulin-AEBM-1-AETM-1, Insulin-AEM-2-AETM-2, and Insulin-AEM-1-AETM-2 may all be synthesized according to this mixed ligand method.

In some cases, it may be desirable to conjugate the ligand to the framework through a different means than the drug. For example, a divalent maleimide/monovalent activate ester functionalized framework (e.g., succinimidyl-3,5-dimaleimidophenyl benzoate (SDMB)) may be used to conjugate two sulfhydryl functionalized ligands and one amine-functionalized drug in separate steps. For example, insulin or another amine-containing drug may be conjugated to the activated ester portion of the framework using methods described herein. In a separate step, the aminoethyl saccharide (AEM, AEBM, AETM) may be converted to a terminal sulfhydryl-bearing ligand by reaction with 4-iminothiolane. Finally, the framework-di-maleimide-insulin conjugate may be mixed with an excess of sulfhydryl-functionalized saccharide to produce the resulting divalent-ligand-insulin conjugate.

Sustained release formulations

As discussed in the Examples, in certain embodiments it may be advantageous to administer a conjugate in a sustained fashion (i.e., in a form that exhibits an absorption profile that is more sustained than soluble recombinant human insulin). This will provide a sustained level of conjugate that can respond to fluctuations in glucose on a timescale that it more closely related to the typical glucose fluctuation timescale (i.e., hours rather than minutes). In certain embodiments, the sustained release formulation may exhibit a zero-order release of the conjugate when administered to a mammal under non-hyperglycemic conditions (i.e., fasted conditions).

It will be appreciated that any formulation that provides a sustained absorption profile may be used. In certain embodiments this may be achieved by combining the conjugate with other ingredients that slow its release properties into systemic circulation.

For example, PZI (protamine zinc insulin) formulations may be used for this purpose. As described in the Examples, we have found that in certain embodiments the absorption profile and stability of PZI formulations prepared with conjugates of the present disclosure are sensitive to the absolute and relative amounts of protamine and zinc included in the formulation. For example, whereas commercial PZI and NPH (neutral protamine Hagedorn) insulin formulations

require only about 0.05 to about 0.2 mg protamine/mg insulin, some PZI-conjugate preparations required about 1 to about 5 mg protamine/mg conjugate in order to effectively sustain the absorption profile. Furthermore, while commercial protamine insulin preparations contain about 0.006 mg zinc/mg insulin, we have found that increasing the zinc concentration along with the protamine concentration can, in certain embodiments, lead to more stable, easily dispersible formulations. In some cases, the zinc content is in the range of about 0.05 to about 0.5 mg zinc/mg conjugate. Furthermore, we have also unexpectedly found that in certain embodiments, insulin conjugates substituted at the B1-amine group require more protamine and zinc to effectively sustain the release profile versus an insulin conjugate substituted at the B29-amine group. The present disclosure encompasses amorphous and crystalline forms of these PZI formulations.

Thus, in certain embodiments, a formulation of the present disclosure includes from about 0.05 to about 10 mg protamine/mg conjugate. For example, from about 0.2 to about 10 mg protamine/mg conjugate, e.g., about 1 to about 5 mg protamine/mg conjugate.

In certain embodiments, a formulation of the present disclosure includes from about 0.006 to about 0.5 mg zinc/mg conjugate. For example, from about 0.05 to about 0.5 mg zinc/mg conjugate, e.g., about 0.1 to about 0.25 mg zinc/mg conjugate.

In certain embodiments, a formulation of the present disclosure includes protamine and zinc in a ratio (w/w) in the range of about 100:1 to about 5:1, for example, from about 50:1 to about 5:1, e.g., about 40:1 to about 10:1. In certain embodiments, a PZI formulation of the present disclosure includes protamine and zinc in a ratio (w/w) in the range of about 20:1 to about 5:1, for example, about 20:1 to about 10:1, about 20:1 to about 15:1, about 15:1 to about 5:1, about 10:1 to about 5:1, about 10:1 to about 15:1.

The Examples also describe the benefits of including one or more of the following components in a PZI formulation: an antimicrobial preservative, an isotonic agent, and/or an unconjugated insulin molecule.

In certain embodiments a formulation of the present disclosure includes an antimicrobial preservative (e.g., m-cresol, phenol, methylparaben, or propylparaben). In certain embodiments the antimicrobial preservative is m-cresol. For example, in certain embodiments, a formulation may include from about 0.1 to about 1.0% v/v m-cresol. For example, from about 0.1 to about 0.5% v/v m-cresol, e.g., about 0.15 to about 0.35% v/v m-cresol.

In certain embodiments a formulation of the present disclosure includes a polyol as isotonic agent (e.g., mannitol, propylene glycol or glycerol). In certain embodiments the isotonic agent is glycerol. In certain embodiments, the isotonic agent is a salt, e.g., NaCl. For example, a

formulation may comprise from about 0.05 to about 0.5 M NaCl, e.g., from about 0.05 to about 0.25 M NaCl or from about 0.1 to about 0.2 M NaCl.

In certain embodiments a formulation of the present disclosure includes an amount of unconjugated insulin molecule. In certain embodiments, a formulation includes a molar ratio of conjugated insulin molecule to unconjugated insulin molecule in the range of about 100:1 to 1:1, e.g., about 50:1 to 2:1 or about 25:1 to 2:1.

The present disclosure also encompasses the use of standard sustained (also called extended) release formulations that are well known in the art of small molecule formulation (e.g., see *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995). The present disclosure also encompasses the use of devices that rely on pumps or hindered diffusion to deliver a conjugate on a gradual basis. In certain embodiments, a long acting formulation may (additionally or alternatively) be provided by using a modified insulin molecule. For example, one could use insulin glargine (LANTUS®) or insulin detemir (LEVEMIR®) instead of wild-type human insulin in preparing the conjugate. Insulin glargine is an exemplary long acting insulin analog in which Asp-A21 has been replaced by glycine, and two arginines have been added to the C-terminus of the B-chain. The effect of these changes is to shift the isoelectric point, producing a solution that is completely soluble at pH 4. Insulin detemir is another long acting insulin analog in which Thr-B30 has been deleted, and a C14 fatty acid chain has been attached to Lys-B29.

Uses of conjugates

In another aspect, the present disclosure provides methods of using conjugates. In general, the conjugates can be used to controllably provide a bioactive drug in response to a saccharide (e.g., glucose or an exogenous saccharide such as mannose, alpha-methyl mannose, L-fucose, etc. as described herein). The disclosure encompasses treating a disease or condition by administering a conjugate of the present disclosure. Although the conjugates can be used to treat any patient (e.g., dogs, cats, cows, horses, sheep, pigs, mice, etc.), they are most preferably used in the treatment of humans. A conjugate can be administered to a patient by any route. In general the most appropriate route of administration will depend upon a variety of factors including the nature of the disease or condition being treated, the nature of the drug, the condition of the patient, etc. In general, the present disclosure encompasses administration by oral, intravenous, intramuscular, intra-arterial, subcutaneous, intraventricular, transdermal, rectal, intravaginal, intraperitoneal, topical (as by powders, ointments, or drops), buccal, or as an oral or nasal spray or aerosol. General considerations in the formulation and manufacture of pharmaceutical compositions for these different routes may be found, for example, in

Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. In various embodiments, the conjugate may be administered subcutaneously, e.g., by injection. The conjugate can be dissolved in a carrier for ease of delivery. For example, the carrier can be an aqueous solution including, but not limited to, sterile water, saline or buffered saline.

In general, a therapeutically effective amount of a drug in the form of a conjugate will be administered. By a "therapeutically effective amount" of a drug is meant a sufficient amount of the drug to treat the disease or condition at a reasonable benefit/risk ratio, which involves a balancing of the efficacy and toxicity of the drug. In general, therapeutic efficacy and toxicity may be determined by standard pharmacological procedures in cell cultures or with experimental animals, e.g., by calculating the ED_{50} (the dose that is therapeutically effective in 50% of the treated subjects) and the LD_{50} (the dose that is lethal to 50% of treated subjects). The ED_{50}/LD_{50} represents the therapeutic index of the drug. Although in general drugs having a large therapeutic index are preferred, as is well known in the art, a smaller therapeutic index may be acceptable in the case of a serious disease or condition, particularly in the absence of alternative therapeutic options. Ultimate selection of an appropriate range of doses for administration to humans is determined in the course of clinical trials.

In various embodiments, the drug is insulin and the average daily dose of insulin is in the range of 10 to 200 U, e.g., 25 to 100 U (where 1 Unit of insulin is ~ 0.04 mg). In certain embodiments, an amount of conjugate with these insulin doses is administered on a daily basis. In certain embodiments, an amount of conjugate with 5 to 10 times these insulin doses is administered on a weekly basis. In certain embodiments, an amount of conjugate with 10 to 20 times these insulin doses is administered on a bi-weekly basis. In certain embodiments, an amount of conjugate with 20 to 40 times these insulin doses is administered on a monthly basis. Those skilled in the art will recognize that this same approach may be extrapolated to other approved drugs with known dose ranges, e.g., any of the approved insulin sensitizers and insulin secretagogues described herein. Typically, the dose of conjugated drug will be higher than the normal dose of unconjugated drug.

In certain embodiments, a conjugate of the present disclosure may be used to treat hyperglycemia in a patient (e.g., a mammalian patient). In certain embodiments, the patient is diabetic. However, the present methods are not limited to treating diabetic patients. For example, in certain embodiments, a conjugate may be used to treat hyperglycemia in a patient with an infection associated with impaired glycemic control. In certain embodiments, a conjugate may be used to treat diabetes.

In certain embodiments, when a conjugate or formulation of the present disclosure (with an insulin molecule as the drug) is administered to a patient (e.g., a mammalian patient) it

induces less hypoglycemia than an unconjugated version of the insulin molecule. In certain embodiments, a formulation of the present disclosure (with a conjugate that includes an insulin molecule as the drug) induces a lower HbA1c value in a patient (e.g., a mammalian patient) than a formulation comprising an unconjugated version of the insulin molecule. In certain embodiments, the formulation leads to an HbA1c value that is at least 10% lower (e.g., at least 20% lower, at least 30% lower, at least 40% lower, at least 50% lower) than a formulation comprising an unconjugated version of the insulin molecule. In certain embodiments, the formulation leads to an HbA1c value of less than 7%, e.g., in the range of about 4 to about 6%. In certain embodiments, a formulation comprising an unconjugated version of the insulin molecule leads to an HbA1c value in excess of 7%, e.g., about 8 to about 12%.

It will be understood that the total daily usage of a drug for any given patient will be decided by the attending physician within the scope of sound medical judgment. The specific therapeutically effective amount for any particular patient will depend upon a variety of factors including the disease or condition being treated; the activity of the specific drug employed; the specific composition employed; the age, body weight, general health, sex and diet of the patient; the time of administration, route of administration and rate of excretion of the specific drug employed; the duration of the treatment; drugs used in combination or coincidental with the specific drug employed; and like factors well known in the medical arts. In various embodiments, a conjugate of the present disclosure may be administered on more than one occasion. For example, the present disclosure specifically encompasses methods in which a conjugate is administered by subcutaneous injection to a patient on a continuous schedule (e.g., once a day, once every two days, once a week, once every two weeks, once a month, etc.).

In various embodiments, a conjugate of the present disclosure may be administered to a patient who is receiving at least one additional therapy. In various embodiments, the at least one additional therapy is intended to treat the same disease or disorder as the administered conjugate. In various embodiments, the at least one additional therapy is intended to treat a side-effect of the primary drug. The two or more therapies may be administered within the same, overlapping or non-overlapping timeframes as long as there is a period when the patient is receiving a benefit from both therapies. The two or more therapies may be administered on the same or different schedules as long as there is a period when the patient is receiving a benefit from both therapies. The two or more therapies may be administered within the same or different formulations as long as there is a period when the patient is receiving a benefit from both therapies. In certain embodiments, a single conjugate of the present disclosure may include more than one drug for treating the same disease or disorder. In certain embodiments, two or more separate conjugates of the present disclosure may be administered (as a mixture or separately) that include different

drugs for treating the same disease or disorder. In certain embodiments, an unconjugated secondary drug may be admixed with a conjugate of the present disclosure (i.e., a drug which is simply mixed with the conjugate formulation and not covalently bound to the conjugate). For example, in certain embodiments, any of these approaches may be used to administer more than one anti-diabetic drug to a subject. Certain exemplary embodiments of this approach are described in more detail below in the context of insulin-related therapies; however, it will be appreciated from the foregoing that other therapies will benefit from such combination approaches.

Insulin sensitizers (e.g., biguanides such as metformin, glitazones) act by increasing a patient's response to a given amount of insulin. A patient receiving an insulin sensitizer will therefore require a lower dose of an insulin conjugate of the present disclosure than an otherwise identical patient would. Thus, in certain embodiments, an insulin conjugate may be administered to a patient who is also being treated with an insulin sensitizer. In various embodiments, the conjugate of the present disclosure may be administered at up to 75% of the normal dose required in the absence of the insulin sensitizer. In various embodiments, up to 50, 40, 30 or 20% of the normal dose may be administered.

Insulin resistance is a disorder in which normal amounts of insulin are inadequate to produce a normal insulin response. For example, insulin-resistant patients may require high doses of insulin in order to overcome their resistance and provide a sufficient glucose-lowering effect. In these cases, insulin doses that would normally induce hypoglycemia in less resistant patients fail to even exert a glucose-lowering effect in highly resistant patients. Similarly, the conjugates of the present disclosure are only effective for this subclass of patients when they provide high levels of bioactive insulin in a suitable timeframe. In certain embodiments, the treatment of this subclass of patients may be facilitated by combining the two approaches. Thus in certain embodiments, a traditional insulin-based therapy is used to provide a baseline level of insulin and a conjugate of the present invention is administered to provide a controlled supplement of bioactive insulin when needed by the patient. Thus, in certain embodiments, insulin conjugates may be administered to a patient who is also being treated with insulin. In various embodiments, the insulin may be administered at up to 75% of the normal dose required in the absence of a conjugate of the present disclosure. In various embodiments, up to 50, 40, 30 or 20% of the normal dose may be administered. It will be appreciated that this combination approach may also be used with insulin resistant patients who are receiving an insulin secretagogue (e.g., a sulfonylurea, GLP-1, exendin-4, etc.) and/or an insulin sensitizer (e.g., a biguanide such as metformin, a glitazone).

Exogenous trigger

As mentioned previously, the methods, conjugates and compositions that are described herein are not limited to glucose responsive-conjugates. As demonstrated in the Examples, several exemplary glucose-responsive conjugates were also responsive to exogenous saccharides such as alpha-methyl mannose and L-fucose. It will therefore be appreciated that in certain embodiments a conjugate may be triggered by exogenous administration of a saccharide other than glucose such as alpha-methyl mannose and L-fucose or any other saccharide that can alter the PK or PD properties of the conjugate.

Once a conjugate has been administered as described above (e.g., as a sustained release formulation) it can be triggered by administration of a suitable exogenous saccharide. In a certain embodiment, a triggering amount of the exogenous saccharide is administered. As used herein, a "triggering amount" of exogenous saccharide is an amount sufficient to cause a change in at least one PK and/or PD property of the conjugate (e.g., C_{max}, AUC, half-life, etc. as discussed previously). It is to be understood that any of the aforementioned methods of administration for the conjugate apply equally to the exogenous saccharide. It is also be to be understood that the methods of administration for the conjugate and exogenous saccharide may be the same or different. In various embodiments, the methods of administration are different (e.g., for purposes of illustration the conjugate may be administered by subcutaneous injection on a weekly basis while the exogenous saccharide is administered orally on a daily basis). The oral administration of an exogenous saccharide is of particular value since it facilitates patient compliance. In general, it will be appreciated that the PK and PD properties of the conjugate will be related to the PK profile of the exogenous saccharide. Thus, the conjugate PK and PD properties can be tailored by controlling the PK profile of the exogenous saccharide. As is well known in the art, the PK profile of the exogenous saccharide can be tailored based on the dose, route, frequency and formulation used. For example, if a short and intense activation of the conjugate is desired then an oral immediate release formulation might be used. In contrast, if a longer less intense activation of conjugate is desired then an oral extended release formulation might be used instead. General considerations in the formulation and manufacture of immediate and extended release formulation may be found, for example, in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995.

It will also be appreciated that the relative frequency of administration of a conjugate of the present disclosure and an exogenous saccharide may be the same or different. In certain embodiments, the exogenous saccharide is administered more frequently than the conjugate. For example, in certain embodiment, the conjugate may be administered daily while the exogenous saccharide is administered more than once a day. In certain embodiment, the conjugate may be

administered twice weekly, weekly, biweekly or monthly while the exogenous saccharide is administered daily. In certain embodiments, the conjugate is administered monthly and the exogenous saccharide is administered twice weekly, weekly, or biweekly. Other variations on these schemes will be recognized by those skilled in the art and will vary depending on the nature of the conjugate and formulation used.

EXAMPLES

The structures of exemplary conjugates **I-1** to **I-17** and **II-1** to **II-7** that are described and used in the Examples are shown in Figure 45.

I. Methods of making exemplary conjugates

This first set of examples describes various methods for making exemplary conjugates. The examples also include assays for purifying and assaying the starting ingredients and final products. It is to be understood that these methods can be modified to produce other conjugates that fall within the scope of the invention.

Example 1 – Synthesis of Azidoethylglucose (AzEG)

a. Synthesis of bromoethyleglucose

DOWEX 50Wx4 resin (Alfa Aesar, Ward Hill, MA) was washed with deionized water to remove color. A mixture of 225 gm D-glucose (1.25 mol; 1 equiv., Alfa Aesar) and 140 gm DOWEX 50Wx4 was treated with 2.2 L 2-bromoethanol (30.5 mol, 25 equiv.; 124.97 gm/mol; 1.762 gm/mL; BP = 150 C; Alfa Aesar) and the stirred mixture heated to 80 C for 4 hours. The reaction was monitored by TLC (20% methanol/dichloromethane (DCM)). Reaction was complete after about four hours, and it was allowed to cool to room temperature. The solution was filtered to remove the resin, and the resin washed with ethyl acetate and DCM. The resulting filtrate was stripped to an amber oil in a rotory evaporator. A total of 400 gm after stripping.

The amber oil was purified on silica gel (4 kg silica packed in DCM) in the following manner. The crude was dissolved in DCM and loaded onto the column, and then eluted with 2 x 4L 10% methanol/DCM; 2 x 4L 15% methanol/DCM; and 3 x 4L 20% methanol/DCM. Product containing fractions (on the basis of TLC) were pooled and stripped to dryness to afford 152 gm of 1-α-bromoethyl-glucose (42%).

b. Conversion of bromoethylglucose to azidoethylglucose (AzEM)

A 5L round bottom three-necked flask, equipped with a heating mantle, an overhead stirrer, and a thermometer, was charged with 150 gm bromoethylglucose (525 mmol). The oil was dissolved in 2 L water and treated with 68.3 gm sodium azide (1.05 mol, 2 equiv.; 65 gm/mol; Alfa-Aesar) followed by 7.9 gm sodium iodide (52.5 mmol, 0.08 equiv.; 149.89 gm/mol; Alfa-Aesar) and the solution warmed to 50 C and stirred overnight. The solution was cooled to room temperature and concentrated to dryness on the rotovap. The solid residue was digested with 3 x 500 mL of 5:1 vol. $CHCl_3$:MeOH at 40 C. The combined organic portions were filtered and evaporated to dryness to afford azidoethylglucose (86 gm) as an off-white solid. TLC (20% MeOH/DCM; char with H_2SO_4): single spot, indistinguishable from the starting material.

c. Repurification of azidoethylglucose

32 gm of azidoethylglucose was taken into 100 mL water. The turbid solution was filtered through a glass microfibre filter (Whatman GF/B). The golden filtrate was evaporated to a solid on a rotovapor. The solid was taken into methanol (100 mL) and the turbid solution was again filtered through a glass microfibre filter. The resulting pale yellow filtrate was stripped to a solid under vacuum.

The solid was taken into a minimum of methanol (50 mL) and ethyl acetate (150 mL) was added slowly with stirring. The heavy slurry was cooled and filtered. The solid was air dried (hygroscopic) and put in a 60 C oven overnight. TLC has very little origin material. Yield 15.4 gm. The Mother Liquor was evaporated under vacuum to a yellow gum. No attempt was made to further purify this material at this time.

Example 2 – Synthesis of Azidoethylmannose (AzEM)

a. Synthesis of bromoethylmannose

DOWEX 50Wx4 resin (Alfa Aesar, Ward Hill, MA) is washed with deionized water to remove color. A mixture of 225 gm D-mannose (1.25 mol; 1 equiv., Alfa Aesar) and 140 gm DOWEX 50Wx4 is treated with 2.2 L 2-bromoethanol (30.5 mol, 25 equiv.; 124.97 gm/mol; 1.762 gm/mL; BP = 150 C; Alfa Aesar) and the stirred mixture heated to 80 C for 4 hours. The reaction is monitored by TLC (20% methanol/dichloromethane (DCM)). Reaction is complete after about four hours, and then allowed to cool to room temperature. The solution is filtered to remove the resin, and the resin washed with ethyl acetate and DCM. The resulting filtrate is stripped to an amber oil in a rotory evaporator.

The amber oil is purified on silica gel (4 kg silica packed in DCM) in the following manner. The crude is dissolved in DCM and loaded onto the column, and then eluted with 2 x 4L 10% methanol/DCM; 2 x 4L 15% methanol/DCM; and 3 x 4L 20% methanol/DCM. Product containing fractions (on the basis of TLC) are pooled and stripped to dryness to afford 152 gm of 1-α-bromoethyl-mannose (42%).

b. Conversion of bromoethylmannose to azidoethylmannose (AzEM)

A 5L round bottom three-necked flask, equipped with a heating mantle, an overhead stirrer, and a thermometer, is charged with 150 gm bromoethylmannose (525 mmol). The oil is dissolved in 2 L water and treated with 68.3 gm sodium azide (1.05 mol, 2 equiv.; 65 gm/mol; Alfa-Aesar) followed by 7.9 gm sodium iodide (52.5 mmol, 0.08 equiv.; 149.89 gm/mol; Alfa-Aesar) and the solution warmed to 50 C and stirred overnight. The solution is cooled to room temperature and concentrated to dryness on the rotovap. The solid residue is digested with 3 x 500 mL of 5:1 vol. $CHCl_3$:MeOH at 40 C. The combined organic portions are filtered and evaporated to dryness to afford azidoethylmannose as an off-white solid.

c. Repurification of azidoethylmannose

32 gm of azidoethylmannose is taken into 100 mL water. The turbid solution is filtered through a glass microfibre filter (Whatman GF/B). The filtrate is evaporated to a solid on a rotovapor. The solid is taken into Methanol (100 mL) and the turbid solution is again filtered through a glass microfibre filter. The resulting pale yellow filtrate is stripped to a solid under vacuum.

The solid is taken into a minimum of methanol (50 mL) and ethyl acetate (150 mL) is added slowly with stirring. The heavy slurry is cooled and filtered. The solid is air dried (hygroscopic) and put in a 60 C oven overnight. The Mother Liquor is evaporated under vacuum to a yellow gum.

Example 3 – Synthesis of Azidoethylmannobiose (AzEBM)

The AzEM compound from Example 2 is selectively protected using benzene dimethyl ether, purified by column chromatography and subsequently reacted with benzyl bromide to give 1-α-(2-azidoethyl)-4,6-benzaldehyde diacetal-3-benzyl-mannopyranoside. The product is subsequently glycosylated with 1-α-bromo-2,3,4,6-tetrabenzoylmannopyranoside using silver triflate chemistry under rigorously anhydrous conditions to give the protected-azidoethylmannobiose product. The intermediate product is then deprotected to remove the benzoyl groups to give AzEBM.

Example 4 – Synthesis of Azidoethylmannotriose (AzETM)

a. 1-α-bromo-2,3,4,6-tetrabenzoyl-mannose

To a 500 mL 3-neck flask containing a stir bar and nitrogen inlet was added 40 gm (60.9 mmole) of pentabenzoylmannose and 80 mL methylene chloride. The resulting solution was cooled in an ice bath to < 5 C, and 80 mL 33% HBr-acetic acid solution was added via an addition funnel at such a rate to maintain the reaction temperature < 10 C. Upon complete addition (~ 30 min.) the ice bath was removed and stirring was continued for 3 hours.

The reaction solution was diluted with an equal volume (160 mL) of DCM and extracted successively with water (2x 500 mL), saturated bicarbonate (2x 50 mL) and Brine (1x50 mL), dried over magnesium sulfate and the solvent evaporated to give 41 gm of solid foam. (Theoretical yield 40.1 gm) and was stored under N_2 in a freezer. This material was used without further purification. The reaction was monitored by TLC: silica gel (Hexane/Ethyl Acetate, 7/3) starting material R_f 0.65, product R_f 0.8 UV visualization. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 8.11(d, 2H),8.01(m, 4H), 7.84(d, 2H), 7.58(m, 4H), 7.41(m, 6H), 7.28(t, 2H), 6.58(s, 1H), 6.28(m, 2H), 5.8(m, 1H), 4.75(dd, 1H) 4.68 (dd, 1H) 4.5(dd, 1H).

b. 1-Azidoethyl-2,4-dibenzoylmannose

To a 1.0L, 3-neck flask containing a stir bar, nitrogen inlet and 300 mL of anhydrous acetonitrile was added 25 gm 1-azidoethylmannose (100.4 mmole), and 50 mL triethyl orthobenzoate (220 mmole, 2.2 equiv.). The resulting slurry was stirred at room temperature and 0.8mL (10 mmole) trifluoroacetic acid (TFA) was added neat. The solution cleared within 10 minutes and stirring was continued for an additional two hours, then 25 mL of 10% aqueous TFA was added and stirring was continued for an additional 2 hours to hydrolyze the intermediate to the ester isomers. The solvent was evaporated under vacuum to a viscous oil, which was triturated with 50 mL DCM and again evaporated to a viscous oil.
Toluene (70 mL) was added to the residue and the viscous solution was seeded with 2,4-dibenzoylazidoethylmannose. A fine precipitate formed within 15 minutes and stirring was continued overnight at room temperature. The resulting heavy suspension was set in the freezer for 2-4 hours, then filtered and the solid washed with ice cold toluene (2x10 mL). The solid was air dried to a constant weight to give 21 gm (TY 22.85 gm @ 50% isomeric purity) of ~95% isomeric purity. The product was taken into 40 mL toluene, stirred for 1 hour and then set in the freezer for an additional 2 hours. The solid was filtered and washed (2x10 mL) with ice cold toluene and air dried to a constant weight to give 18.5 gm of the single isomer product 2,4-dibenzoylazidoethylmannose in 83% yield. The mother liquors contained the undesired isomer

and a small amount of the desired isomer. The reaction was monitored by TLC: SG (Hexane/Ethyl Acetate 7/3) Starting Material R_f 0.0, orthoester intermediate R_f 0.9. (Hexane/Ethyl Acetate: 8/2) SM R_f 0.8, desired isomer R_f 0.4, un-desired isomer R_f 0.2 ^{1}H NMR 300MHz ($CDCl_3$) δ 8.12(t, 4H), 7.66(t, 2H), 7.5(m, 4H), 5.56(t, 1H), 5.48(m, 1H), 5.14(m, 1H), 4.5(dd, 1H), 4.0(m, 2H), 3.8(m, 3H), 3.56(m, 1H), 3.44(m, 1H).

c. Perbenzoylated-man(α-1,3)-man(α-1.6)-α-1-azidoethylmannopyranoside

To a 1.0 L 3-neck flask with a stir bar, nitrogen inlet was added 41 gm crude 1-bromo-tetrabenzoymannose (60.9 mmole, ~2.5 equiv.) in 185 mL DCM. To this was added 11.2 gm 2,4-dibenzoylazidoethylmannose (24.5 mmole) followed by 11.2 gm 4A sieves. The slurry was stirred a room temperature for 10 minutes and cooled to –15°C in a methanol/ice bath.

In a separate dark vessel was added 190 mL toluene followed by 15.1 gm silver-trifluoromethanesulfonate (AgOTf) (58.8 mmole, 2.4 equiv.) and was stirred into solution in the dark. This solution was transferred to a large addition funnel, and added drop-wise to the stirring suspension while protecting the reaction from light. The reaction temperature was maintained < -10 C by adjusting the AgOTf addition rate. Upon complete addition (~30 minutes) the cold bath was removed and the reaction stirred for an additional 2 hours until a single product remained by TLC (SG, Hexane/Ethyl Acetate: 7/3, Bromo R_f 0.9, azido R_f 0.4, trios product R_f 0.5, uv visualization).

Triethylamine (7 mL, 5.0 equiv.) was added followed by 200 mL DCM. The resulting slurry was filtered through a pad of silica gel and celite and washed with 2x 75 mL DCM. The solvent was evaporated under vacuum and the residue taken into ethyl acetate and washed sequentially with water (2x100 mL), bicarb (2x50 mL), brine (1x75 mL) and dried over magnesium sulfate. The solvent was evaporated under vacuum to give 39 gm of solid foam (TY 39.5 gm). ^{1}H NMR 300MHz ($CDCl_3$) δ 8.3(d, 2H), 8.2(m, 8H), 7.85(d, 4H), 7.75(dd, 4H), 7.3-7.65(m, 30H), 7.2(t, 2H), 6.05(m, 4H), 5.9(t, 2H), 5.63(m, 2H), 5.38(s, 2H), 5.18(d, 1H), 4.65(m, 4H), 4.5(m, 2H), 4.35(m, 4H), 3,8(m, 2H), 3.54(m, 2H).

d. Man(α-1,3)-man(α-1.6)-α-1-azidoethylmannopyranoside

To a stirring suspension of 3.0 gm perbenzoylated-man (α-1,3)-man(α-1.6)-α-1-azidoethylmannopyranoside (1.86 mmole) in 40 mL methanol was added 0.2 mL 4.28M sodium methoxide in methanol. The resulting suspension was stirred 20 hours at room temperature giving a clear solution. The completion of the reaction was monitored by TLC, (SG, hexane/ethyl acetate: 8/2 SM R_f 0.4, product R_f 0.0).

The methanol was evaporated under vacuum giving an oily semi-solid. The residue was taken into ethyl acetate (50 mL) and stirred for 3 hours. The solid was filtered, washed with fresh ethyl acetate (2x20 mL) and air dried to a constant weight to give 1.09 gm (TY 1.07 gm) of product. The mother liquors contained residual methyl benzoate, the de-protection by-product.

Example 5 – Synthesis of aminoethyl-saccharides (AEG, AEM, AEBM, AETM) from azidoethyl-saccharides (AzEG, AzEM, AzEBM, AzETM)

The azido-terminated compounds from Examples 1-4 are readily hydrogenated at room temperature by using palladium/carbon catalyst, a small amount of acetic acid, and ethanol as a solvent to give the corresponding amine-terminated compounds. Figure 10 shows the chemical structures of AEG, AEM, AEBM, AETM. The process is identical to the one described for AETM below, except that those skilled in the art will understand that the amounts of reagents, solvents, etc. should be scaled to the number of moles of saccharide-ligand to be hydrogenated.

a. Man (α-1,3)-Man(α-1.6)-α-1-aminoethylmannopyranoside ("aminoethyltrimannose", AETM)

To a solution of 5.3 gm (9.25 mmole) man(α-1,3)-man(α-1.6)-α-1-azidoethylmannopyranoside in 100 mL water and 50 mL ethanol was added 0.8 gm 5% Pd/C. The vigorously stirring suspension was hydrogenated at 30-40 psi for 48 hours or until no starting material was apparent by TLC (SG, Methanol, SM R_f 0.75, Pdt R_f 0.0, PMA vis.). The suspension was filtered over celite, which was rinsed with ethanol (2x50 mL) and the filtrate concentrated under vacuum.

HPLC of this material (C18, 3% Acetonitrile/97% 0.1% H_3P0_4, 220 nm, 2 ml/min) gave uv adsorption of the injection column void material, Rt 2.5 minutes, indicative of benzoate ester.

The filtrate was diluted with 70 mL water and 12 mL of 1N NaOH and the solution stirred overnight at room temperature (HPLC: no uv material at column void Rt 2.5 min., uv material at Rt 10.5 minutes co-eluting with benzoic acid). 2 gm of decolorizing charcoal were added and the stirring suspension heated to 80 C, cooled to room temperature and filtered over celite. The filtrate pH was adjusted to 8.0 with 2N HCl and the colorless solution concentrated under vacuum to about 50% volume.

The solution was loaded onto a resin column (Dowex 50W, 50 gm) and washed with water until eluting fractions were neutral to pH (6x75 mL) removing any residual acid by-products. The amine product was washed off the column with 0.25N ammonium hydroxide (6x75 mL) and the fractions containing the amine product-ninhydrin detection were combined and concentrated to 25-30 mL under vacuum. This concentrated solution was added drop-wise

to 300 mL stirring ethanol and stirring continued for an additional 2 hours. The product was filtered, washed with fresh ethanol (2x50 mL) and air dried to a constant weight. The resulting white amorphous solid was dried further in a vacuum oven at 80 C for 5 hours to give 4.1 gm of a white granular solid (TY 5.1 gm). The NMR was clean of any aromatic protons. ^{1}H NMR 300 MHz (D_2O) δ 5.08(s, 1H), 4.87(s, 1H), 4.81(s, 1H), 4.8-3.6(m, 18H), 2.9(m, 2H).

Example 6 – Dipropargyl saccharide synthesis and production of AE-ligand

a. Synthesis of diethyl dipropargylmalonate

Diethylmalonate (122.5g, 0.7648 mol) was added to absolute ethanol (800ml) containing sodium ethoxide (prepared from sodium metal, 38.5 g, 1.67mol). After 30 min, propargyl bromide (200g, 1.68 mol) was slowly added to the stirred suspension, keeping the temperature under 60 C. The mixture was refluxed overnight (15 hours). The precipitated salts were removed by filtration and washed with ethanol. Solvent was removed *in vacuo*, and the residue diluted with water and extracted with ethanol (2x 200ml). The combined extracts were dried over MgSO4, filtered, washed with Et2O and the solvent removed *in vacuo* to afford a golden colored oil. The oil was placed on high vacuum (40 C) for 3 hours and allowed to stand. Solids began to crystallize forming an oily solid. Let stand overnight (16 hours). Cyclohexane was charged to flask, solids broken-up, filtered, and washed with cyclohexane to afford white crystalline product (81 gm, 44.8% yield). Reaction was followed by GC.

b. Synthesis of dipropargylmalonic acid

Diethyl dipropargyl malonate (80 gm, 0.339 mol) was refluxed in 600 ml of 10% alcoholic potassium hydroxide overnight (15 hours). Solvent was removed *in vacuo* and the residue was acidified with 3N HCl. The residue was extracted with Et2O (2x 300ml). The combined extracts were dried over MgSO4, filtered, washed with Et2O and concentrated *in vacuo* to an oil. Placed on high vac (40 C) for 2 hours and let stand to afford dipropargylmalonic acid as an oil (46 gm, 75.4 % yield). Reaction was followed by GC.

c. Synthesis of dipropargylacetic acid

The dipropargylmalonic acid (26 gm, 0.443 mol) was heated neat at 135 C until CO_2 stopped evolving. It was then allowed to cool to an oil. The oil was distilled at 0.5 psi. The remaining oily residue in the distillation flask and solid were combined (15.7 gm, 79.9% yield) and was used as is in the next step.

d. Synthesis of [2-(3-prop-2-ynyl-hex-5-ynoylamino)-ethyl]-carbamic acid t-butyl ester

N-boc-ethylenediamine (18.3 gm, 0.1143 mol) in 50 ml of CH_3CN was added slowly via an addition funnel to a stirred solution containing dipropargylacetic acid (15.56 gm, 0.1143 mol), TBTU (36.74 gm, 0.114 mol) and DIPEA (29.6 gm, 0.229 mol) in 300ml of CH_3CN at 0 C. Precipitation occurred. The ice bath was removed and the product was stirred at ambient temperature overnight (16 hours). The reaction was now totally homogeneous. The solution was concentrated *in vacuo* and the residue was diluted with 800ml of water. The resulting solids were filtered, washed copiously with water, and vacuum dried to give 14.3 gm of crude product. Re-crystallization (2x) from DCM, filtration and washing with hexanes affords the product (9.85 gm, 31% yield, 98% purity by HPLC (214nm)).

e. Click reaction of azidosaccharide to [2-(3-prop-2-ynyl-hex-5-ynoylamino)-ethyl]-carbamic acid t-butyl ester

To 1,1 dipropargyl-acetyl-(-1N, 2N-BOC-1,2-diaminoethyl)amide (DP, 418 mg, 1.5 mmole) in DCM (20 mL) was added drop-wise TFA (4 mL) over 5 minutes at 0 C. The darkening solution was stirred at room temperature overnight. The volatiles were evaporated under reduced pressure. Toluene (20 mL) was added to the residue and stripped under reduced pressure two times. The resulting dark oil was used without further purification.

To this residue was added THF (20 mL) and water (20 mL) with stirring for 15 minutes. Copper Sulfate (225 mg, 0.9 mmole) was added followed by sodium ascorbate (180 mg, 0.9 mmole). The resulting mixture was heated to 55-60 C for 6 hours and then stirred at room temperature for 18 hours. The solution was evaporated under reduced pressure to approx. half volume and filtered through a microfibre glass filter. The resulting clear solution was placed on a resin column (Dowex 50X-2) which was washed with water (6x 75 mL) until neutral pH, and then washed with 10% NH_4OH (8 x 75 mL). The fractions staining positive with Ninhydrin were combined and evaporated under reduced pressure to a glassy solid. The glass residue was taken into water (250 mL) and treated with 0.5 gm charcoal and heated to reflux. The cooled slurry was filtered over celite and a microfibre filter. The resulting pale yellow solution was evaporated to a glassy solid under reduced pressure and methanol was added and evaporated (2x) to give a off white foam (0.9 gm, TY 1.0 gm).

Example 7 – Tripropargyl saccharide synthesis and production of AE-ligand

a. 2-(2-BOC-aminoethyl)thioacetamide-tris[(propargyloxy)methyl] aminomethane

To a solution of t-butyl N-(2-mercaptoethyl)carbamate (Frontrun Organix, Ipswich, MA; 177.26 mg, 1 mmole) in ethanol (5 mL) was added NaOH (1.1 mmole) with stirring at room

temperature. To this solution was added 2-bromoacetamide-tris[(propargyloxy)methyl]aminomethane (356 mg, 1.0 mmole, see *J. Org. Chem.* 73, 5602, 2008) and stirring was continued for 20 hours (TLC SG 8/2 hexane/ethyl acetate, pdt R_f 0.4). The solvent was evaporated under vacuum and the residue was taken into ethyl acetate (40 mL) and washed successively with water (25 mL), 0.5 N NaOH (25 mL) and Brine (25 mL), dried over Na_2SO_4 filtered and concentrated to an oil (360 mg, TY 452.3 mg). NMR $CDCl_3$, (ppm): 7.05(s, 1H, N-H); 5.25 ((s, 1H,N-H); 4.85 (s,6H); 3.85(s, 6H); 3.3 (m,2H); 3.15 (s, 2H); 2.7 (m, 2H); 2.42 (s, 3H); 1.22 (s, 9H).

b. 2-(2-aminoethyl)thioacetamide-tris[(triazolo-1-(2-ethylmannose) 4-methoxy)methyl] aminomethane

To a stirring solution of 2-(2-BOC-aminoethyl)thioacetamide-tris[(propargyloxy)methyl] aminomethane (1 gm, 2.21 mmole) in DCM (40 mL) at room temperature was added TFA (4 mL) dropwise. The resulting solution was stirred overnight. The solvents were removed under vacuum and the residue taken into toluene (15 mL) and evaporated to dryness.

The residue was taken into THF (40 mL), water (40 mL) and stirred into solution. Azidoethylmannose (3.75 eq., 2.0 gm, 8.3 mmole) was added followed by copper sulfate (500 mg, 2.0 mmole) and sodium ascorbate (400 mg, 2.0 mmole) and the resultant mixture stirred at 55-60 C (oil bath) for 6 hours, cooled to room temperature and stirred overnight. The resulting mixture was concentrated under vacuum to one half volume and filtered thru a micro-glass filter. The filtrate was loaded on a resin column (Dowex 50w 50x4-100) and eluted with water (6x75 mL) until neutral. The column was then eluted with 15% Ammonium Hydroxide (10x75 mL) and the fractions positive to ninhydrin were pooled and concentrated to a glassy foam (1.29 gm, TY (MW 1099 g/mol), 53% over two steps).

Example 8 – Synthesis of NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulin

In a typical synthesis, 4 g of powdered insulin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) is dissolved in 100 ml of anhydrous DMSO at room temperature followed by the addition of 4 ml of triethylamine (TEA). The solution is stirred for 30 minutes at room temperature. Next, 1.79 ml (2.6 equivalents) of di-tert-butyl-dicarbonate/THF solution (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) is slowly added to the insulin-TEA solution and mixed for approximately one hour. The reaction is quenched via the addition of 4 ml of a stock solution containing 250 ul of ethanolamine in 5 ml of DMSO followed by mixing for five minutes. After quenching, the entire solution is poured into 1600 ml of acetone and mixed briefly with a spatula. Next, 8 x 400 µl aliquots of a 18.9% HCl:water solution are added dropwise over the surface of the mixture to precipitate the reacted

insulin. The precipitated material is then centrifuged and the supernatant decanted into a second beaker while the precipitate cake is set aside. To the supernatant solution, another 8 x 400 µl aliquots of a 18.9% HCl:water solution are added dropwise over the surface of the mixture to obtain a second precipitate of reacted insulin. This second precipitate is centrifuged and the supernatant is discarded. The combined centrifuge cakes from the two precipitation steps are washed once with acetone followed by drying under vacuum at room temperature to yield the crude powder which typically contains 60% of the desired BOC2 product and 40% of the BOC3 material.

A preparative reverse phase HPLC method is used to isolate the pure BOC2-insulin from the crude powder. Buffer A is deionized water containing 0.1% TFA and Buffer B is acetonitrile containing 0.1% TFA. The crude powder is dissolved at 25 mg/ml in a 70%A/30%B mixture and syringe filtered prior to injection on the column. Before purification, the column (Waters SymmetryPrep C18, 7 um, 19 x 150 mm) is equilibrated at 15 ml/minutes with a 70%A/30%B mobile phase using a Waters DeltraPrep 600 system. Approximately 5 ml of the crude powder solution is injected onto the column at a flow rate of 15 ml/minutes over the course of 5 minutes after which a linear gradient is employed from 70%A/30%B to 62%A/38%B over the course of the next 3.5 minutes and held there for an additional 2.5 minutes. Using this method, the desired BOC2 peak elutes at approximately 10.6 minutes followed closely by the BOC3 peak. Once collected, the solution is rotovapped to remove acetonitrile and lyophilized to obtain pure BOC2-insulin powder. Identity is verified by LC-MS (HT Laboratories, San Diego, CA) and site of conjugation determined by N-terminal sequencing (Western Analytical, St. Louis, MO).

Example 9 – Synthesis of benzene-1,3,5-tricarboxy-(N-ω-aminoacid-NHS ester) amide frameworks

A solution of 1,3,5-benzenetricarbonyl chloride (1 gm, 3.8 mmole) in dichloromethane (DCM) (5 mL) is added drop-wise to a vigorously stirring solution of an ω-aminoacid (3.1 equivalents) in 1N NaOH (25 mL) in an ice bath. The ice bath is removed and stirring is continued for 4 hours at room temperature. 2N HCl (~15 mL) is added dropwise to approximately pH 2 and the resulting slurry is stirred for an additional 2 hours. The precipitate is filtered, washed with cold water (2x20 mL) and dried in air under vacuum and then in a 60 C oven overnight. The resulting white solid is used without further purification. Yield for each ω-aminoacid (4-aminobutyric acid: yield 1.6 gm, 91%; 6-aminocaproic acid: yield 1.9 gm, 92%)

The above material is taken into DMSO (5 mL) containing N-hydroxysuccinimide (3.1 mmole, 3.1 equiv.) and N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide (EDCI, 3.6 mmole, 3.6 equiv.) is added at room temperature. The resulting solution is stirred for 24 hours, diluted

with water (125 mL) and extracted with ethyl acetate (3x50 mL). The combined organic phase is washed with water (2x50 mL), brine (1x50 mL) and dried over $MgSO_4$. The solvent is evaporated and the semi-solid residue triturated with acetonitrile (10 mL). The solid is filtered and washed with cold solvent, dried in air under vacuum and then in a 60 C oven overnight. The product is free of urea bi-product. Benzene-1,3,5-tricarboxy-(N-6-aminocaproic-NHS ester)amide (TSB-C6): 304 mg, 36%, mp 140-142 C. Benzene-1, 3, 5-tricarboxy-(N-4-butyric-NHS-ester)amide (TSB-C4): 245 mg, 45%, mp 182-184 C.

Example 10 – Dendritic framework synthesis

a. Hydrogenation of nitro-group containing, alkyne-terminally functionalized dendrons

Dendrons containing either n=2, 4, or 8 terminal alkynes and a nitropropionic acid core are obtained (e.g., from Polymer Factory, Sweden) and used without further purification. The dendron is dissolved in 100 mL a 50:50 vol. mixture of DCM and ethanol, and 0.8 gm of 5% Pd/C is added. The vigorously stirring suspension is hydrogenated at 30-40 psi for 48 hours or until no starting material is apparent by TLC. The suspension is filtered over celite, which is rinsed with ethanol (2x50 mL) and the filtrate concentrated under vacuum.

The filtrate is diluted with 70 mL water and 12 mL of 1N NaOH and the solution stirred overnight at room temperature. 2 gm of decolorizing charcoal are added and the stirring suspension heated to 80 C, cooled to room temperature and filtered over celite. The filtrate pH is adjusted to 8.0 with 2N HCl and the colorless solution concentrated under vacuum to about 50% volume.

The solution is loaded onto a resin column (Dowex 50W, 50 gm) and washed with water until eluting fractions are neutral to pH (6x75 mL) removing any residual acid by-products. The amine product is washed off the column with 0.25N ammonium hydroxide (6x75 mL) and the fractions containing the amine product (ninhydrin detection) are combined and evaporated to vacuum using a rotary evaporator.

b. Reaction of dendron (amine, alkyne-4) with azidoethyl mannose

The dendron product containing the amino core and four terminal alkyne groups obtained after hydrogenation (8.3 mmol) is taken into THF (40 mL), water (40 mL) and stirred into solution. Azidoethylmannose (4.75 eq., 2.53 gm, 10.51 mmole) is added followed by copper sulfate (500 mg, 2.0 mmole) and sodium ascorbate (400 mg, 2.0 mmole) and the resultant mixture stirred at 55-60 C (oil bath) for 6 hours, cooled to room temperature and stirred overnight. The resulting mixture is concentrated under vacuum to one half volume and filtered

thru a micro-glass filter. The filtrate is loaded on a resin column (Dowex 50w 50x4-100) and eluted with water (6x 75 mL) until neutral. The column is then eluted with 15% ammonium hydroxide (10x75 mL) and the fractions positive to ninhydrin are pooled and concentrated to a glassy foam.

Example 11 – Amine-functionalized drug conjugation with multivalent activated esters in organic solvent (drug added first)

A framework containing N-terminal activated esters is dissolved at 60 mM in 1.0 ml of anhydrous DMSO followed by the addition of 400 ul (excess) of triethylamine (TEA). The solution is stirred rapidly for 10 minutes at room temperature. The amine-bearing drug is then dissolved separately in 7.9 ml of DMSO at a concentration of 7.4 mM. Once dissolved, the entire drug solution is added dropwise over the course of 10 minutes to the framework/DMSO/TEA solution followed by room temperature mixing for two hours. The remaining activated esters are then reacted with amine-functionalized ligands in the following manner. A 370 mM solution of ligand is prepared in an appropriate volume of dry DMSO. Once dissolved, enough solution is added to provide a number of reactive equivalents equal to three times the number of initial activated ester groups, N, minus one. For example, if there are N=3 initial activated ester groups per framework, then (3x(3-1)x60mM/370 mM)=0.973 ml of ligand solution are added. If there are N=4 initial activated ester groups per framework, then (3x(4-1)x60mM/370 mM)=1.46 ml of ligand solution are added, and so on. After the ligand solution is added, the solution is stirred for one more hour at room temperature to ensure complete reaction.

The resulting solution is then superdiluted by 10x into a 20 mM pH 5.0 HEPES buffered saline solution containing 0.150 M NaCl followed by pH adjustment with dilute HCl to a final pH of 8.0. The aqueous solution is first purified by size exclusion using an appropriate solid phase for the desired separation of conjugated and unconjugated materials. The solution passing through the column void volume is then concentrated using an appropriately sized ultrafiltration membrane to approximately 10 ml. This solution is further purified to obtain the desired product using preparative reverse phase HPLC on a Waters C8, 7 um, 19 x 150 mm column. Buffer A is deionized water containing 0.1% TFA and Buffer B is acetonitrile containing 0.1% TFA. Before purification, the column is equilibrated at 15 ml/minutes with a 80%A/20%B mobile phase using a Waters DeltraPrep 600 sytem. Approximately 5 ml of the crude solution is injected onto the column over the course of 2 minutes at a flow rate of 15 ml/minutes after which a linear gradient is employed from 80%A/20%B to 75%A/25%B over the next 5 minutes followed by a slower linear gradient from 75%A/25%B to 62%A/38%B over the next 22 minutes. The retention time

of the desired peak will vary depending on the drug, framework, and ligand used. Once collected, the solution is rotovapped to remove acetonitrile and lyophilized to obtain pure conjugate whose identity may be verified by LC-MS (HT Laboratories, San Diego, CA).

Example 12 – B1-insulin conjugates with multivalent saccharides - homogeneous ligand

Using the method described in Example 11 and the amine-bearing drug, NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulin (MW=6,008 g/mol) of Example 8, insulin conjugates were prepared with the following frameworks and ligands. Tris-Succinimidyl-1,3,5-benzenetricarboxylate (TSB), tris-Succinimidyl aminotriacetate (TSAT), tris-Succinimidyl (6-aminocaproyl)aminotriacetate (TSAT-C6), and tetrakis-(N-succinimidyl carboxypropyl)pentaerythritol TSPE activated ester frameworks were purchased from Molecular Biosciences (Boulder, CO) and used without further purification. The TSB-C4 and TSB-C6 frameworks were synthesized according to Example 9. The AEM, AEBM, and AETM ligands were synthesized according to Examples 1-5. The appropriately sized size exclusion medium is Biogel P2 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), and the appropriately sized ultrafiltration membrane molecular weight cutoff is 3 kD.

In all cases, the BOC protecting groups were removed by dissolving the lyophilized powder obtained according to Example 11 in 90% TFA/10% anisole for one hour at 4 C followed by 10x superdilution in 25 mM HEPES pH 8.2 buffer containing 0.150M NaCl. The pH was adjusted to between 7.0 and 8.0 using NaOH solution after which the material is passed through a Biogel P2 column to remove anisole, BOC and other low MW byproducts of deprotection, as well as any other contaminating salts. The deprotected, purified aqueous conjugate solution was then concentrated using Amicon 3K membranes (Millipore, Billerica, MA) to approximately 58 U of insulin/ml (based on A280 measurements) and stored at 4 C until needed. Because the starting NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulin material only possesses one free amine group at the Phe-B1 terminus, the Phe-B1 is the only site of insulin conjugation to the framework as verified in each deprotected final product by N-terminal sequencing.

In the following table (and others like it in the Examples) the framework MW values are for the activated esters of the frameworks. This is so one can immediately calculate the mass of activated ester framework to add to the reaction mixture. Once reacted, the framework loses the activated esters and so the MW contribution in the final product is much lower.

Conjugate	Framework	Frame-work MW	Ligand	AE-sugar MW	Purity (HPLC)	MW (LC-MS)	Sugar/ Insulin
TSB-AEM-2 (B1)	TSB	501	AEM	223	97%	6410	2.0
TSB-AEBM-2 (B1)	TSB	501	AEBM	385	94%	6734	2.0
TSB-AETM-2 (B1)	TSB	501	AETM	547	96%	7057	2.0
TSB-C4-AEM-2 (B1)	TSB-C4	755	AEM	223	95%	6665	2.0
TSB-C4-AEBM-2 (B1)	TSB-C4	755	AEBM	385	97%	6989	2.0
TSB-C4-AETM-2 (B1)	TSB-C4	755	AETM	547	95%	7313	2.0
TSB-C6-AEM-2 (B1)	TSB-C6	882	AEM	223	99%	6791	2.0
TSB-C6-AEBM-2 (B1)	TSB-C6	882	AEBM	385	99%	7114	2.0
TSB-C6-AETM-2 (B1)	TSB-C6	882	AETM	547	95%	7438	2.0
TSAT-AEM-2 (B1)	TSAT	482	AEM	223	98%	6390	2.0
TSAT-AEBM-2 (B1)	TSAT	482	AEBM	385	95%	6714	2.0
TSAT-AETM-2 (B1)	TSAT	482	AETM	547	94%	7038	2.0
I-1: TSAT-C6-AEM-2 (B1)	TSAT-C6	822	AEM	223	97%	6730	2.0
I-3: TSAT-C6-AEBM-2 (B1)	TSAT-C6	822	AEBM	385	99%	7054	2.0
I-2: TSAT-C6-AETM-2 (B1)	TSAT-C6	822	AETM	547	97%	7378	2.0
I-16: TSPE-AEM-3 (B1)	TSPE	813	AEM	223	98%	6829	3.0
TSPE-AEBM-3 (B1)	TSPE	813	AEBM	385	97%	7314	3.0
TSPE-AETM-3 (B1)	TSPE	813	AETM	547	94%	7802	3.0

Example 13 – B1-insulin conjugates with multivalent saccharides – mixed ligands

Using the method described in Example 11 and the amine-bearing drug, NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-Insulin (MW=6,008 g/mol) of Example 8, insulin conjugates were prepared which possessed a mixture of saccharide ligands connected to the framework.

The TSAT-C6 and TSPE activated ester frameworks were purchased from Molecular Biosciences (Boulder, CO) and used without further purification. The AEM, AEBM, and AETM were synthesized according to Examples 1-5. The appropriately sized size exclusion medium is Biogel P2 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), and the appropriately sized ultrafiltration membrane molecular weight cutoff is 3 kD.

In all cases, the BOC protecting groups were removed by dissolving the lyophilized powder obtained according to Example 11 in 90% TFA/10% anisole for one hour at 4 C followed by 10x superdilution in 25 mM HEPES pH 8.2 buffer containing 0.150M NaCl. The pH was adjusted to between 7.0 and 8.0 using NaOH solution after which the material was passed through a Biogel P2 column to remove anisole, BOC and other low MW byproducts of deprotection, as well as any other contaminating salts. The deprotected, purified aqueous conjugate solution was then concentrated using Amicon 3K membranes (Millipore, Billerica, MA) to the desired level and stored at 4 C until needed. Because the starting NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulin material only possesses one free amine group at the Phe-B1 terminus, the Phe-B1 is the only site of insulin conjugation to the framework as verified in each deprotected final product by N-terminal sequencing.

Conjugate Identity	Framework	Frame-work MW	Mixed Ligand	AE-sugar MW	Purity (HPLC)	MW (LC-MS)	Sugar / Insulin
TSPE-AEM-1-AETM-2 (B1)	TSPE	813	AEM/AETM (33/67 mol/mol)	223/547	94%	7478	1.0 AEM, 2.0 AETM
TSPE-AEM-2-AETM-1 (B1)	TSPE	813	AEM/AETM (67/33 mol/mol)	223/547	94%	7152	2.0 AEM, 1.0 AETM
TSAT-C6-AEM-1-AEBM-1 (B1)	TSAT-C6	822	AEM/AEBM (50/50 mol/mol)	223/385	96%	6892	1.0 AEM, 1.0 AEBM
I-4: TSAT-C6-AEBM-1-AETM-1 (B1)	TSAT-C6	822	AEBM/AETM (50/50 mol/mol)	385/547	95%	7216	1.0 AEBM, 1.0 AETM

Example 14 – B1-insulin conjugates with multivalent saccharides using premade multivalent saccharides

Using the method described in Example 11 and the amine-bearing drug, NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulin (MW=6,008 g/mol) of Example 8, the following insulin conjugates are prepared from pre-synthesized multivalent amine-containing ligands. The disuccinimidyl suberate (DSS) and TSAT-C6 activated ester frameworks are purchased from Molecular Biosciences (Boulder, CO) and used without further purification. Divalent AEM-2, AEBM-2, and AETM-2 molecules containing a terminal reactive amine are prepared by conjugating two of each ligand to a suitable framework to which a reactive amine is also conjugated. Trivalent AEM-3, AEBM-3, and AETM-3 molecules containing a terminal reactive amine are prepared by conjugating three of each ligand to a suitable framework to which a reactive amine is also conjugated. The appropriately sized size exclusion medium is Biogel P2 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), and the appropriately sized ultrafiltration membrane molecular weight cutoff is 3 kD.

In all cases, the BOC protecting groups are removed by dissolving the lyophilized powder obtained according to Example 11 in 90% TFA/10% anisole for one hour at 4 C followed by 10x superdilution in 25 mM HEPES pH 8.2 buffer containing 0.150 M NaCl. The pH is adjusted to between 7.0 and 8.0 using NaOH solution after which the material is passed through a Biogel P2 column to remove anisole, BOC and other low MW byproducts of deprotection, as well as any other contaminating salts. The deprotected, purified aqueous conjugate solution is then concentrated using Amicon 3K membranes (Millipore, Billerica, MA) to the desired level and stored at 4 C until needed. Because the starting NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-Insulin material only possesses one free amine group at the Phe-B1 terminus, the Phe-B1 is the only site of insulin conjugation to the framework as verified in each deprotected final product by N-terminal sequencing.

Conjugate	Synthesis Conditions				Expected Conjugate Characterization	
Identity	Framework	Framework MW	Ligand	AE-sugar MW	MW (LC-MS)	Sugar/ Insulin
DSS-(AEM-2)-1 (B1)	DSS	368	AEM-2	676	6621	2.0 AEM
DSS-(AEM-2)-1 (B1)	DSS	368	AEBM-2	1000	6945	2.0 AEBM
DSS-(AEM-2)-1 (B1)	DSS	368	AETM-2	1324	7269	2.0 AETM
DSS-(AEM-3)-1 (B1)	DSS	368	AEM-3	1085	7031	3.0 AEM
DSS-(AEM-3)-1 (B1)	DSS	368	AEBM-3	1571	7517	3.0 AEBM
DSS-(AEM-3)-1 (B1)	DSS	368	AETM-3	2057	8003	3.0 AETM
TSAT-C6-(AEM-2)-2 (B1)	TSAT-C6	822	AEM-2	676	7637	4.0 AEM
TSAT-C6-(AEBM-2)-2 (B1)	TSAT-C6	822	AEBM-2	1000	8285	4.0 AEBM
TSAT-C6-(AEM-2)-2 (B1)	TSAT-C6	822	AETM-2	1324	8933	4.0 AETM
TSAT-C6-(AEM-3)-2 (B1)	TSAT-C6	822	AEM-3	1085	8046	6.0 AEM
TSAT-C6-(AEBM-3)-2 (B1)	TSAT-C6	822	AEBM-3	1571	9018	6.0 AEBM
TSAT-C6-(AEM-3)-2 (B1)	TSAT-C6	822	AETM-3	2057	9990	6.0 AETM

Example 15 – B1-insulin conjugates with multivalent saccharides using dendritic framework – homogeneous ligand

0.1 gm (0.098 mmol) dendron containing an amino core and four terminal alkyne groups prepared in Example 10b is dissolved at 100 mg/ml in anhydrous DMSO. The solution is added dropwise to a solution containing disuccinimidyl suberate (DSS, Molecular Biosciences, 0.098 mmol) and triethylamine (400 uL) and allowed to react for 1 hour at room temperature. This mixture is then added dropwise to a 50 mg/ml solution containing the NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulin (MW=6,008 g/mol) of Example 8 (0.588g, 0.098 mmol) and allowed to react for 2 hours.

The resulting conjugate is superdiluted in water, and the pH adjusted to 8.0. The solution is desalted using BioGel P2, followed by concentration using Amicon 3k ultrafiltration devices. The resulting solution is purified by reverse phase chromatography, rotovapped to remove acetonitrile, and lyophilized. The BOC protecting groups are removed by dissolving the lyophilized powder in 90% TFA/10% anisole for one hour at 4 C followed by 10x superdilution in 25 mM HEPES pH 8.2 buffer containing 0.150 M NaCl. The pH is adjusted to between 7.0 and 8.0 using NaOH solution after which the material is passed through a Biogel P2 column to remove anisole, BOC and other low MW byproducts of deprotection, as well as any other contaminating salts. The deprotected, purified aqueous conjugate solution is then concentrated using Amicon 3K membranes (Millipore, Billerica, MA) to the desired level and stored at 4 C until needed. Because the starting NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulin material only possesses one free amine group at the Phe-B1 terminus, the Phe-B1 is the only site of insulin conjugation to the framework and is verified in each deprotected final product by N-terminal sequencing.

Example 16 – Synthesis of NH_2-B29-BOC2(A1,B1)-insulin

a. Fmoc-1-(B29)-insulin

In a typical synthesis, 4 gm of powdered insulin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) is dissolved in 100 ml of anhydrous DMSO at room temperature followed by the addition of 4 ml of triethylamine (TEA). The solution is stirred for 30 minutes at room temperature. Next, 1.2 equivalents of 9-fluorenylmethyl *N*-succinimidyl carbonate (Fmoc-NHS) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) is slowly added to the insulin-TEA solution as a 1.0 M solution of the Fmoc-NHS in THF. The reaction is mixed for approximately one hour. The reaction is quenched via the addition of 4 ml of a stock solution containing 250 ul of ethanolamine in 5 ml of DMSO followed by mixing for five minutes. After quenching, the entire solution is poured into 1600 ml of acetone and mixed briefly with a spatula. Next, 8 x 400 µl aliquots of a 18.9% HCl:water solution are added dropwise over the surface of the mixture to precipitate the reacted insulin. The precipitated material is then centrifuged and the supernatant decanted into a second beaker while the precipitate cake is set aside. To the supernatant solution, another 8 x 400 µl aliquots of a 18.9% HCl:water solution are added dropwise over the surface of the mixture to obtain a second precipitate of reacted insulin. This second precipitate is centrifuged and the supernatant is discarded. The combined centrifuge cakes from the two precipitation steps are washed once with acetone followed by drying under vacuum at room temperature to yield the crude powder which typically contains 20% of the Fmoc1 product, 65% of the Fmoc2 product, and 15% of unreacted insulin.

A preparative reverse phase HPLC method is used to isolate the pure desired Fmoc1-insulin from the crude powder. Buffer A is deionized water containing 0.1% TFA and Buffer B is acetonitrile containing 0.1% TFA. The crude powder is dissolved at 25 mg/ml in a 70%A/30%B mixture and syringe filtered prior to injection on the column. Before purification, the column (Waters SymmetryPrep C18, 7 um, 19 x 150 mm) is equilibrated at 15 ml/minutes with a 70%A/30%B mobile phase using a Waters DeltraPrep 600 system. Approximately 5 ml of the crude powder solution is injected onto the column at a flow rate of 15 ml/minutes over the course of 5 minutes after which a linear gradient is employed from 70%A/30%B to 62%A/38%B over the course of the next 3.5 minutes and held there for an additional 2.5 minutes. Using this method, the desired Fmoc1 peak elutes at approximately 3 minutes after the unreacted RHI peak, followed closely by the Fmoc2-insulin peak. Once collected, the solution is rotovapped to remove acetonitrile and lyophilized to obtain pure Fmoc1-insulin powder. Identity is verified by LC-MS (HT Laboratories, San Diego, CA) and site of conjugation determined by N-terminal sequencing (Western Analytical, St. Louis, MO).

b. BOC2(A1,B1)-Fmoc-(B29)-insulin

In a typical synthesis, 1 g of Fmoc1-(B29)-insulin is dissolved in 25 ml of anhydrous DMSO at room temperature followed by the addition of 1 ml of triethylamine (TEA). The solution is stirred for 30 minutes at room temperature. Next, 0.379 ml (2.2 equivalents) of di-tert-butyl-dicarbonate/THF solution (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) is slowly added to the insulin-TEA solution and mixed for approximately one hour. The reaction is quenched via the addition of 1 ml of a stock solution containing 250 ul of ethanolamine in 5 ml of DMSO followed by mixing for five minutes. After quenching, the entire solution is poured into 400 ml of acetone and mixed briefly with a spatula. Next, 8 x 100 µl aliquots of a 18.9% HCl:water solution are added dropwise over the surface of the mixture to precipitate the reacted insulin. The precipitated material is then centrifuged and the supernatant decanted into a second beaker while the precipitate cake is set aside. To the supernatant solution, another 8 x 100 µl aliquots of a 18.9% HCl:water solution are added dropwise over the surface of the mixture to obtain a second precipitate of reacted insulin. This second precipitate is centrifuged and the supernatant is discarded. The combined centrifuge cakes from the two precipitation steps are washed once with acetone followed by drying under vacuum at room temperature to yield the crude powder which typically contains greater than 90% of the desired BOC2-Fmoc-1 product.

A preparative reverse phase HPLC method is used to isolate the pure BOC2-Fmoc-1-insulin from the crude powder. Buffer A is deionized water containing 0.1% TFA and Buffer B is acetonitrile containing 0.1% TFA. The crude powder is dissolved at 25 mg/ml in a

70%A/30%B mixture and syringe filtered prior to injection on the column. Before purification, the column (Waters SymmetryPrep C18, 7 um, 19 x 150 mm) is equilibrated at 15 ml/minutes with a 70%A/30%B mobile phase using a Waters DeltraPrep 600 system. Approximately 5 ml of the crude powder solution is injected onto the column at a flow rate of 15 ml/minutes over the course of 5 minutes after which a linear gradient is employed from 70%A/30%B to 62%A/38%B over the course of the next 3.5 minutes and held there for an additional 2.5 minutes. Using this method, the desired BOC2-Fmoc-1 peak elutes at approximately 5 minutes after the Fmoc1-insulin starting material. Once collected, the solution is rotovapped to remove acetonitrile and lyophilized to obtain pure BOC2(A1,B1)-Fmoc(B29)-insulin powder. Identity is verified by LC-MS (HT Laboratories, San Diego, CA) and site of conjugation determined by N-terminal sequencing (Western Analytical, St. Louis, MO).

c. NH_2-(B29)-BOC2(A1,B1)-insulin

The Fmoc protecting group of the BOC2(A1,B1)-Fmoc(B29) is removed by dissolving the lyophilized powder obtained according to the previous step in 20% piperidine in dimethylformamide (DMF) for 30 minutes at 4 C followed by 10x superdilution in 25 mM HEPES pH 8.2 buffer containing 0.150 M NaCl. The pH is adjusted to between 7.0 and 8.0 using NaOH solution after which the material is passed through a Biogel P2 column to remove Fmoc, DMF, and any other contaminating salts. The NH_2-(B29)-BOC2(A1,B1)-insulin is lyophilized into a powder if needed or used directly in aqueous solution if desired.

Example 17 – Synthesis of NH_2-B29-BOC2(A1,B1)-insulin conjugates

All of the multivalent-ligand-drug conjugates described in previous examples using the NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulin of Example 8 may be prepared instead using the NH_2-B29-BOC2(A1,B1)-insulin of Example 16. All of the resulting conjugates will possess the same MW and degree of substitution characteristics, but the site of conjugation to the insulin molecule will be at the epsilon B29 amino group and not the N-terminal Phe-B1. This can be confirmed by N-terminal sequencing.

Example 18 – Amine-functionalized drug conjugation with multivalent activated esters in organic solvent (drug added last)

This example describes an alternative to the method described in Example 11 in which the drug is added to the framework before the ligand(s). In this example the ligand(s) are added to the framework before the drug.

A framework containing N terminal activated esters is dissolved at 60 mM in 1 ml of anhydrous DMSO followed by the addition of 400 ul (excess) of triethylamine (TEA). The solution is stirred rapidly for 10 minutes at room temperature. In parallel, a 122 mM solution of ligand is prepared in an appropriate volume of anhydrous DMSO. Once dissolved, enough ligand solution is added dropwise over the course of ten minutes to provide a number of reactive equivalents equal to exactly the number of activated ester groups on the framework, N, minus one. For example, if there are N=3 activated ester groups on the framework, then (1x(3-1)x60mM/122 mM)=0.98 ml of ligand solution are added. If there are N=4 activated ester groups on the framework, then (1x(4-1)x60mM/122 mM)=1.5 ml of ligand solution are added, and so on. After the ligand solution is added, the solution is stirred for two hours at room temperature.

The amine-bearing drug is then dissolved separately in 7.5 ml of anhydrous DMSO at a concentration of 8.1 mM. Once dissolved, the entire drug solution is added over the course of one minute to the framework/DMSO/ligand/TEA solution followed by room temperature mixing for an additional two hours to ensure complete reaction.

The resulting solution is then superdiluted by 10x into a 20 mM pH 5.0 HEPES buffered saline solution containing 0.150 M NaCl followed by pH adjustment with dilute HCl to a final pH of 8.0. The aqueous solution is first purified by size exclusion using an appropriate solid phase for the desired separation of conjugated and unconjugated materials. The solution passing through the column void volume is then concentrated using an appropriately sized ultrafiltration membrane to approximately 10 ml. This solution is further purified to obtain the desired product using preparative reverse phase HPLC on a Waters SymmetryPrep C18, 7 um column, 19 x 150 mm. Buffer A is deionized water containing 0.1% TFA and Buffer B is acetonitrile containing 0.1% TFA. Before purification, the column is equilibrated at 15 ml/minutes with a 80%A/20%B mobile phase using a Waters DeltraPrep 600 sytem. Approximately 5 ml of the crude solution is injected onto the column over the course of 2 minutes at a flow rate of 15 ml/minutes after which a linear gradient is employed from 80%A/20%B to 75%A/25%B over the next 5 minutes followed by a slower linear gradient from 75%A/25%B to 62%A/38%B over the next 22 minutes. The retention time of the desired peak will vary depending on the drug, framework, and ligand used. Once collected, the solution is rotovapped to remove acetonitrile and lyophilized to obtain pure conjugate whose identity may be verified by LC-MS (HT Laboratories, San Diego, CA).

Example 19 – B29-insulin conjugates with multivalent saccharides produced in organic solvent from unprotected insulin

This example makes use of the fact that in unprotected insulin, the Lys-B29 epsilon-amino moiety is the most reactive amine, followed by the A1 and then the B1. Therefore, when unprotected insulin is used as the amine-containing drug the resulting conjugate should be predominantly substituted at the Lys-B29 position. Using the method described in Example 18 and recombinant human insulin (MW=5808 Da, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) as the amine-containing drug, the following insulin conjugates were prepared using the TSAT-C6 activated ester framework purchased from Molecular Biosciences (Boulder, CO). The AEM and AETM were synthesized as described previously. The appropriately sized size exclusion medium was Biogel P2 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), and the appropriately sized ultrafiltration membrane molecular weight cutoff was 3kDa.

Conjugate	Framework	Framework MW	Ligand	AE-sugar MW	Purity (HPLC)	MW (LC-MS)	Sugar/ Insulin
I-7: TSAT-C6-AEM-2 (B29)	TSAT-C6	822	AEM	223	93%	6729	2.0
I-6: TSAT-C6-AETM-2 (B29)	TSAT-C6	822	AETM	547	95%	7378	2.0

According to N-terminal sequencing, approximately 85 % of the AEM-containing framework was conjugated to insulin via the Lys-B29 and approximately 87 % of the AETM-containing framework was conjugated to insulin via the Lys-B29.

Example 20 – Amine-functionalized drug conjugation with multivalent activated esters in aqueous solvent (drug added last)

This example describes an alternative to the method described in Example 18 in which the reaction is performed in aqueous solvent instead of organic solvent.

The framework containing N terminal activated esters is dissolved at 60 mM in 6.25 ml of anhydrous DMSO followed by the addition of 2 ml (excess) of triethylamine (TEA). The solution is stirred rapidly for 10 minutes at room temperature. In parallel, a 448 mM solution of ligand is prepared in an appropriate volume of anhydrous DMSO. Once dissolved, enough ligand solution is added dropwise over the course of ten minutes to provide a number of reactive equivalents equal to 1.5 times the number of activated ester groups on the framework, N, minus

one. For example, if there are N=3 activated ester groups on the framework, then (1.5x(3-1)x60mM/448 mM)x6.25ml = 2.5 ml of ligand solution are added. If there are N=4 activated ester groups on the framework, then (1.5x(4-1)x60mM/448 mM)x6.25ml = 3.8 ml of ligand solution are added, and so on. After the ligand solution is added, the solution is stirred for one hour at room temperature.

The amine-bearing drug is then dissolved separately at 17.2 mM in 2.67 ml of a 0.1M, pH 11 sodium carbonate buffer and the pH subsequently adjusted to 10.8 with 1.0N sodium hydroxide. Once dissolved, the entire framework/DMSO/ligand/TEA solution is added dropwise over the course of 75 minutes to the drug/carbonate buffer solution. During the addition, the pH of the resulting mixture is adjusted every 5 minutes to 10.8 if necessary using dilute HCl or NaOH. The solution is allowed to stir for an additional 15 minutes after the dropwise addition to ensure complete reaction.

The resulting solution is then superdiluted by 10x into a 20 mM pH 5.0 HEPES buffered saline solution containing 0.150 M NaCl followed by pH adjustment with dilute HCl to a final pH of 8.0. The aqueous solution is first purified by size exclusion using an appropriate solid phase for the desired separation of conjugated and unconjugated materials. The solution passing through the column void volume is then concentrated using an appropriately sized ultrafiltration membrane to approximately 40 ml. This solution is further purified to obtain the desired product using preparative reverse phase HPLC on a Waters SymmetryPrep C18, 7 um, 19 x 150 mm column. Buffer A is deionized water containing 0.1% TFA and Buffer B is acetonitrile containing 0.1% TFA. Before purification, the column is equilibrated at 15 ml/minutes with a 80%A/20%B mobile phase using a Waters DeltraPrep 600 sytem. Approximately 5 ml of the crude solution is injected onto the column over the course of 2 minutes at a flow rate of 15 ml/minutes after which a linear gradient is employed from 80%A/20%B to 75%A/25%B over the next 5 minutes followed by a slower linear gradient from 75%A/25%B to 62%A/38%B over the next 22 minutes. The retention time of the desired peak will vary depending on the drug, framework, and ligand used. Once collected, the solution is rotovapped to remove acetonitrile and lyophilized to obtain pure conjugate whose identity may be verified by LC-MS (HT Laboratories, San Diego, CA).

Example 21 – B29-AEM-2-insulin conjugate synthesized in aqueous solvent from unprotected insulin

This example makes use of the fact that in unprotected insulin, the Lys-B29 epsilon-amino moiety is the most reactive amine, followed by the A1 and then the B1. Therefore, when unprotected insulin is used as the amine-containing drug the resulting conjugate should be

predominantly substituted at the Lys-B29 position. Using the method described in Example 20 and recombinant human insulin (MW = 5808, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) as the amine-containing drug, an AEM-2 insulin conjugate was prepared using the TSAT-C6 activated ester framework purchased from Molecular Biosciences (Boulder, CO). The AEM used as the insulin analog was synthesized as described previously. The appropriately sized size exclusion medium was Biogel P2 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), and the appropriately sized ultrafiltration membrane molecular weight cutoff was 3 kD. The final product (95% pure by HPLC) was found to have the desired MW of 6729 g/mol (LC-MS), representing a total of 2.0 AEM molecules conjugated per insulin, with greater than 85% of the conjugate molecules conjugated at the Lys-B29 site (N-terminal sequencing).

Example 22 – Generalized amine-functionalized drug conjugation with aldehyde-containing framework

a. Framework functionalized with more than one ligand and one terminal aldehyde

First, a framework containing N terminal activated esters is dissolved at 60 mM in 27.0 ml of anhydrous DMSO followed by the addition of 800 ul (excess) of triethylamine (TEA). The solution is stirred rapidly for 10 minutes at room temperature. A stock solution of amine-bearing diethyl acetal is prepared at 580 mM in 5 ml of anhydrous DMSO. Once dissolved, 2.9 ml of the diethyl acetal solution are added dropwise over the course of 5 minutes to the framework/DMSO/TEA solution followed by room temperature mixing for an additional 15 minutes. The remaining activated esters are then reacted with amine-functionalized ligands in the following manner. A 370 mM solution of ligand is prepared in an appropriate volume of dry DMSO. Once dissolved, enough solution is added to provide a number of reactive equivalents equal to 1.5 times the number of initial activated ester groups, N, minus one. For example, if there are N=3 initial activated ester groups per framework, then (1.5x(3-1)x60mMx27/370 mM)= 13 ml of ligand solution are added. If there are N=4 initial activated ester groups per framework, then (1.5x(4-1)x60mMx27/370 mM)= 20 ml of ligand solution are added, and so on. After the ligand solution is added, the solution is stirred for an additional hour and 45 minutes at room temperature to ensure complete reaction. After reaction, the entire solution is diluted by a factor of ten with diethyl ether, mixed vigorously, and centrifuged to separate the dense bottom phase containing the desired material from the supernatant. After discarding the supernatant, the same volume of ethanol is added to generate a solid precipitated mass. After centrifuging and discarding the supernatant, the material is washed extensively with ethanol and ether and then dried under vacuum to yield the crude framework containing multiple ligands and a diethyl acetal group.

b. Conjugation of amine-functionalized drug with terminal aldehyde

Once dried, the aldehyde group is generated from the diethyl acetal by dissolving the collected material in 60 ml of DI water with the solution pH adjusted to 1.0. The solution is mixed for 30 minutes after which 6 ml of a 200 mM HEPES pH 8.2 buffer containing 1.5 M NaCl is added and the solution pH adjusted to 6.5 using dilute NaOH solution. 48 mmol of the amine containing drug are added to the solution and the pH readjusted to 6.5 if necessary. Separately, a stock solution of reducing agent is prepared by dissolving 1.5 g of sodium cyanoborohydride (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) in 15 ml of a 20 mM HEPES pH 7.0 buffer containing 0.150 M NaCl and the pH carefully adjusted to 6.5 with dilute HCl solution. 13 ml of the cyanoborohydride stock solution are added to the drug/framework/aldehyde solution and allowed to react overnight at room temperature.

The resulting aqueous solution is first purified by size exclusion using an appropriate solid phase for the desired separation of conjugated and unconjugated materials. The solution passing through the column void volume is then concentrated using an appropriately sized ultrafiltration membrane to approximately 10 ml. This solution is further purified to obtain the desired product using preparative reverse phase HPLC on a Waters SymmetryPrep C18, 7 um column, 19 x 150 mm. Buffer A is deionized water containing 0.1% TFA and Buffer B is acetonitrile containing 0.1% TFA. Before purification, the column is equilibrated at 15 ml/minutes with a 80%A/20%B mobile phase using a Waters DeltraPrep 600 sytem. Approximately 5 ml of the crude solution is injected onto the column over the course of 2 minutes at a flow rate of 15 ml/minutes after which a linear gradient is employed from 80%A/20%B to 75%A/25%B over the next 5 minutes followed by a slower linear gradient from 75%A/25%B to 62%A/38%B over the next 22 minutes. The retention time of the desired peak will vary depending on the drug, framework, and ligand used. Once collected, the solution is rotovapped to remove acetonitrile and lyophilized to obtain pure conjugate whose identity may be verified by LC-MS (HT Laboratories, San Diego, CA).

Example 23 – AEM-2-framework containing a terminal reactive aldehyde group and subsequent insulin conjugation at B1

a. TSAT functionalized with 2 AEM and 1 aminobutyraldehyde diethyl acetal (ABDA)

This material was synthesized according to the method described in Example 22a using TSAT (Molecular Biosciences, Boulder, CO) as the multivalent activated ester framework and 4-aminobutyraldehyde diethyl acetal (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) as the amine-bearing diethyl acetal. AEM (MW = 223 g/mol), synthesized as described previously was used as the ligand.

b. Conjugation of TSAT-AEM-2-ABDA with NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulin

This material was synthesized using the method described in Example 22b and the TSAT-AEM-2-ABDA produced in (a) above along with the amine-bearing drug, NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulin (MW = 6,008 g/mol), synthesized according to Example 8. The appropriately sized size exclusion medium was Biogel P2 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), and the appropriately sized ultrafiltration membrane molecular weight cutoff was 3 kD. Because the starting NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulin material only possesses one free amine group at the Phe-B1 terminus, the Phe-B1 is the only site of insulin conjugation to the framework. The BOC protecting groups were removed by dissolving the lyophilized powder in 90% TFA/10% anisole for one hour at 4 C followed by 10x superdilution in 25 mM HEPES pH 8.2 buffer containing 0.150 M NaCl. The pH was adjusted to between 7.0 and 8.0 using NaOH solution after which the material was passed through a Biogel P2 column to remove anisole, BOC and other low MW byproducts of deprotection, as well as any other contaminating salts. The deprotected, purified aqueous conjugate solution was then concentrated using Amicon 3K membranes (Millipore, Billerica, MA) to the desired level and stored at 4 C until needed.

The final product (95% pure by HPLC) was found to have the desired MW of 6462 g/mol (LC-MS), representing a total of 2.0 AEM molecules conjugated per insulin, 99% of which were conjugated at the Phe-B1 site (N-terminal sequencing).

Example 24 – AEM-3-framework containing a terminal reactive aldehyde group and subsequent insulin conjugation at B1

a. TSPE functionalized with 3 AEM and 1 aminobutyraldehyde diethyl acetal (ABDA)

This material was synthesized according to the method described in Example 22a using TSPE (Molecular Biosciences, Boulder, CO) as the multivalent activated ester framework and 4-aminobutyraldehyde diethyl acetal (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) as the amine-bearing diethyl acetal. AEM (MW = 223 g/mol), synthesized as described previously, was used as the ligand.

b. Conjugation of TSPE-AEM-3-ABDA with NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-Insulin

This material was synthesized using the method described in Example 22b and the TSPE-AEM-3-ABDA produced in (a) above along with the amine-bearing drug, NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulin (MW = 6,008 g/mol), synthesized according to Example 8. The appropriately sized size exclusion medium was Biogel P2 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), and the appropriately sized ultrafiltration membrane molecular weight cutoff was 3 kD. Because the starting NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulin material only possesses one free amine group at the

Phe-B1 terminus, the Phe-B1 is the only site of insulin conjugation to the framework. The BOC protecting groups are removed by dissolving the lyophilized powder in 90% TFA/10% anisole for one hour at 4 C followed by 10x superdilution in 25 mM HEPES pH 8.2 buffer containing 0.150 M NaCl. The pH was adjusted to between 7.0 and 8.0 using NaOH solution after which the material was passed through a Biogel P2 column to remove anisole, BOC and other low MW byproducts of deprotection, as well as any other contaminating salts. The deprotected, purified aqueous conjugate solution was then concentrated using Amicon 3K membranes (Millipore, Billerica, MA) to the desired level and stored at 4 C until needed.

The final product (95% pure by HPLC) was found to have the desired MW of 6897 g/mol (LC-MS), representing a total of 3.0 AEM molecules conjugated per insulin, 99% of which were conjugated at the Phe-B1 site (N-terminal sequencing).

Example 25 – AEM-3-scaffold containing a terminal reactive aldehyde group and subsequent insulin conjugation at B1 using unprotected insulin

a. TSPE functionalized with 3 AEM and 1 aminobutyraldehyde diethyl acetal (ABDA)

This material is synthesized according to the method described in Example 22a using TSPE (Molecular Biosciences, Boulder, CO) as the multivalent activated ester scaffold and 4-aminobutyraldehyde diethyl acetal (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) as the amine-bearing diethyl acetal. AEM (MW = 223 g/mol), synthesized as described previously, was used as the ligand.

b. Conjugation of TSPE-AEM-3-ABDA with NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-Insulin

This material was synthesized using the method described in Example 22b and the TSPE-AEM-3-ABDA produced in (a) above along with the amine-bearing drug, unmodified insulin (MW = 5,808 g/mol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). The appropriately sized size exclusion medium was Biogel P2 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), and the appropriately sized ultrafiltration membrane molecular weight cutoff was 3 kD. Although the starting unprotected insulin material possesses three free amine groups, the Phe-B1 is the predominant site of insulin conjugation to the scaffold due to the fact that the Phe-B1 (pKa ~ 6.8) is the most reactive amine at pH 6.5. The lyophilized powder was dissolved in 25 mM HEPES pH 8.2 buffer containing 0.150 M NaCl. The pH was adjusted to between 7.0 and 8.0 using NaOH solution after which the material was then concentrated using Amicon 3K membranes (Millipore, Billerica, MA) to the desired level and stored at 4 C until needed.

The final product (95% pure by HPLC) was found to have the desired MW of 6897 g/mol (LC-MS), representing a total of 3.0 AEM molecules conjugated per insulin, >85% of which were conjugated at the Phe-B1 site (N-terminal sequencing).

Example 26 – Mixed framework chemistry and corresponding separate conjugation of drug and ligands

Succinimidyl-3,5-dimaleimidophenyl benzoate (SDMB) can be purchased from Molecular Biosciences (Boulder, CO) and used in the following example without further purification. SDMB is dissolved at 60 mM in 1.0 ml of anhydrous DMSO followed by the addition of 400 ul (excess) of triethylamine (TEA). The solution is stirred rapidly for 10 minutes at room temperature. The amine-bearing drug is then dissolved separately in 7.5 ml of anhydrous DMSO at a concentration of 8.1 mM. Once dissolved, the entire SDMB solution is added dropwise over the course of ten minutes to the DMSO-drug solution followed by room temperature mixing for an additional two hours to ensure complete reaction.

The resulting solution is then superdiluted by 10x into a 20 mM pH 5.0 HEPES buffered saline solution containing 0.150 M NaCl followed by pH adjustment with dilute HCl to a final pH of 8.0. The aqueous solution is first purified by size exclusion using an appropriate solid phase for the desired separation of conjugated and unconjugated materials. The solution passing through the column void volume is then concentrated using an appropriately sized ultrafiltration membrane to approximately 10 ml.

Separately, 6.0 mmol of an amine-containing ligand is dissolved in a 20 mM pH 8.2 HEPES buffered saline solution containing 0.150 M NaCl at a concentration of 450 mM. To this solution, 6.6 mmol of iminothiolane (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) is added and allowed to react at pH 8.2 for 30 minutes at room temperature to convert the amine-terminal groups to terminal sulfhydryl groups. The resulting material is mixed with the 10 ml solution of drug-framework-di-maleimide conjugate produced in the previous step. The maleimide groups are allowed to react with the indicator-anolog sulfydryl groups at pH 8.2 for 2 hours to ensure complete reaction. The resulting solution is then purified by size exclusion using an appropriate solid phase for the desired separation of conjugated and unconjugated materials. The solution passing through the column void volume is then concentrated using an appropriately sized ultrafiltration membrane to approximately 10 ml.

Finally, this solution is further purified to obtain the desired product using preparative reverse phase HPLC on a Waters SymmetryPrep C18, 7 um column, 19 x 150 mm. Buffer A is deionized water containing 0.1% TFA and Buffer B is acetonitrile containing 0.1% TFA. Before purification, the column is equilibrated at 15 ml/minutes with a 80%A/20%B mobile phase using a Waters DeltraPrep 600 sytem. Approximately 5 ml of the crude solution is injected onto the column over the course of 2 minutes at a flow rate of 15 ml/minutes after which a linear gradient is employed from 80%A/20%B to 75%A/25%B over the next 5 minutes followed by a slower

linear gradient from 75%A/25%B to 62%A/38%B over the next 22 minutes. The retention time of the desired peak will vary depending on the drug, framework, and ligand used. Once collected, the solution is rotovapped to remove acetonitrile and lyophilized to obtain pure conjugate whose identity may be verified by LC-MS (HT Laboratories, San Diego, CA).

Example 27 – Insulin-conjugated to aminoethyl saccharides using mixed framework chemistry

Using the method described in Example 26 and the amine-bearing drug, NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulin (MW = 6,008 g/mol), synthesized according to Example 8, the following specific drug conjugates are obtained. AEM (MW = 223 g/mol), AEBM (MW = 385 g/mol), and AETM (MW = 547 g/mol) are synthesized as previously described and used as the ligands in the synthesis. The appropriately sized size exclusion medium is Biogel P2 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), and the appropriately sized ultrafiltration membrane molecular weight cutoff is 3 kD.

In all cases, the BOC protecting groups are removed by dissolving the lyophilized powder obtained according to Example 26 in 90% TFA/10% anisole for one hour at 4 C followed by 10x superdilution in 25 mM HEPES pH 8.2 buffer containing 0.150 M NaCl. The pH is adjusted to between 7.0 and 8.0 using NaOH solution after which the material is passed through a Biogel P2 column to remove anisole, BOC and other low MW byproducts of deprotection, as well as any other contaminating salts. The deprotected, purified aqueous conjugate solution is then concentrated using Amicon 3K membranes (Millipore, Billerica, MA) to approximately 58 U of insulin/ml (based on A280 measurements) and stored at 4 C until needed. Because the starting NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulin material only possesses one free amine group at the Phe-B1 terminus, the Phe-B1 will be the only site of insulin conjugation to the framework. This can be verified in each deprotected final product by N-terminal sequencing.

Synthesis Conditions			Expected Conjugate Characterization	
Ligand	**AE-sugar MW**	**AE-iminothiolane intermediate MW**	**MW (LC-MS)**	**Sugar/ Insulin**
AEM	223	360	6822	2.0 AEM
AEBM	385	522	7146	2.0 AEBM
AETM	547	684	7470	2.0 AETM

Example 28 – Generalized click chemistry for drug conjugation with complementary frameworks

A framework (8.3 mmol) containing at least one amino functionality and one or more terminal alkyne groups is taken into THF (40 mL), water (40 mL) and stirred into solution. An azidoethyl group-bearing drug (10.51 mmole) is added followed by copper sulfate (500 mg, 2.0 mmole) and sodium ascorbate (400 mg, 2.0 mmole). The resulting mixture is stirred at 55-60 C (oil bath) for 6 hours, cooled to room temperature, stirred overnight and concentrated under vacuum to one half volume and filtered thru a micro-glass filter. The filtrate is loaded on a resin column (Dowex 50w 50x4-100) and eluted with water (6x 75 mL) until neutral. The column is then eluted with 15% ammonium hydroxide (10x75 mL) and the fractions positive to ninhydrin are pooled and concentrated to a glassy foam.

Example 29 – Conjugates prepared using natural insulins from other species such as bovine and porcine

Insulins from other species which contain at least one reactive amine functionality (e.g., bovine and porcine insulin) may be coupled using any of the methods used to conjugate human insulin. Those skilled in the art will appreciate that the molecular weights of the resulting conjugates made from bovine or porcine insulins will differ from those made from human insulin by the amounts listed in the following table.

Type of Insulin	Molecular Weight (g/mol)	Difference in MW human insulin (g/mol)
Human insulin	5808	-
Porcine insulin	5778	-30
Bovine insulin	5733	-75

Those skilled in the art will also appreciate that the resulting conjugates made from bovine or porcine insulin may have chromatographic peak retention times that differ slightly from those conjugates made from human insulin, due to the small differences in structures between the insulins.

Example 30 – Conjugates prepared with insulin analogs such as lispro, aspart, glulysine, glargine, and detemir

All known insulin analogs which contain at least one reactive amine functionality (e.g., lispro, aspart, glulisine, glargine, and detemir) may be coupled using any of the methods used to conjugate human insulin. Those skilled in the art will appreciate that the molecular weights of

the resulting conjugates made from insulin analogs will differ from those made from human insulin by the amounts listed in the following table.

Type of Insulin	Molecular Weight (g/mol)	Difference in MW human insulin (g/mol)
Human insulin	5808	-
Insulin lispro	5808	-
Insulin aspart	5832	+24
Insulin glulisine	5823	+15
Insulin glargine	6063	+255
Insulin detemir	5913	+105

Those skilled in the art will also appreciate that the resulting conjugates made from insulin analogs may have chromatographic peak retention times that differ slightly from those conjugates made from human insulin, due to the small differences in structures between the insulins.

The use of insulin glulisine (which does not contain a B29 lysine, but rather a B3 lysine) will give predominantly B3 conjugates when using unprotected insulin glulisine. However, if B1-insulin glulisine conjugates are desired, then BOC-(A1,B3)-insulin glulisine is first synthesized using the same protocol as BOC-(A1,B29)-human insulin as described in Example 8.

Example 31 – Conjugates prepared with peptidic insulin secretagogue conjugates

Peptidic insulin secretagogues (e.g., without limitation GLP-1 or the GLP-1 analog exanitide) which contain an N-terminal amine functionality may be coupled using any of the methods used to conjugate insulin.

II. In vitro assays of exemplary conjugates

This second set of examples describes various experiments investigating the *in vitro* properties of some exemplary conjugates.

Example 32 – Synthesis of insulin-glycogen conjugates

This comparative example describes the synthesis of an insulin-glycogen conjugate according to U.S. Patent Application Publication No. 20070099820. Briefly, 1 gm of commercially available, unpurified oyster glycogen (Type II, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) is dissolved in deionized water at a concentration of 10 mg/ml. Solid CNBr is added to the

resulting solution at a CNBr to glycogen mass ratio of 0.68 and the pH maintained constant at 10.7 +/- 0.2 using 3N sodium hydroxide (NaOH) solution. After stirring for 15 minutes, another equal mass of solid CNBr equal is added and the pH maintained constant at 10.7 +/- 0.2 while stirring for 45 minutes. Insulin is then added to the solution at an insulin to glycogen mass ratio of 0.60 and the pH adjusted to 9.15 using solid sodium bicarbonate. The solution is stirred overnight, ultrafiltered exhaustively against deionized water using a 50 kDa MWCO polyethersulfone disc membrane filter (Millipore, Bedford, MA), and lyophilized. The resulting powder is then purified from unconjugated insulin by gel filtration HPLC (Waters, Milford, MA) using a 1 M acetic acid mobile phase over a Superdex™ 30 HiLoad 16/60 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) packed column. The insulin glycogen fraction is then lyophilized to obtain the conjugate as a pure white powder. The resulting purified material contained 1.0 wt% of insulin per insulin-glycogen conjugate as measured using amino acid analysis (UCLA Biopolymers Laboratory, Los Angeles, CA).

Example 33 – Liquid chromatography analysis

This example describes the differences between the RP-HPLC profiles of insulin-glycogen synthesized according to Example 32 and an exemplary conjugate synthesized according to the present invention. 100 ul of a 5 mg/ml solution of insulin-glycogen synthesized according to Example 32 and 100 ul of a 1 mg/ml solution of exemplary conjugate were injected separately onto a Waters Symmetry C8 5um column (4.6 mm x 250 mm), equilibrated with a 80% Water/20% Acetonitrile (CH3CN) mobile phase (each containing 0.1% TFA). The exemplary conjugate used in this study was synthesized using TSAT-C6 as the framework, AEM as the ligand, and NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulin as the drug.

The samples were eluted at 1.0 ml/minutes using the following gradient method: 0-5 minutes – constant 80% Water/20% CH3CN, 5-35 minutes – linear gradient to 50% Water/50% CH3CN. The elution profiles in Figure 1 show a single spike for the exemplary conjugate indicating a single chemically distinct species as compared to a broad and heterogenous elution profile for the insulin-glycogen conjugate, indicating a broad distribution of different chemical and/or molecular weight entitites.

Example 34 – Molecular weight distribution analysis

This example describes the difference in MW and MW distribution between the insulin-glycogen synthesized according to Example 32 and the same exemplary conjugate. The MW and MW distribution of the insulin-glycogen conjugate was determined by injecting 1 ml of a 25 mg/ml solution in pH 7 HEPES buffered saline onto an Ultrahydrogel Size Exclusion Column

(Waters Corporation, Millford, MA) equilibrated with HEPES buffered saline. The column was eluted over the course of 30 minutes at 0.5 ml per min, and the elution profile was measured as an absorbance at 280 nm. In separate experiments using the same protocol, dextran MW standards of 1000, 5000, 12000, 25000, 50000, 80000, 150000, 270000, and 410000 g/mol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) were injected to establish a calibration curve of MW versus retention time. Based on the calibration curve and the clution profile of the insulin-glycogen conjugate, the average MW was determined to be 500,000 g/mol with 67% of the distribution eluting over the broad range of 250,000 to 1,000,000 g/mol (data not shown). In contrast, the exemplary conjugate was determined to have just a single MW of exactly 6,730 g/mol as determined by LC/MS (HT Laboratories, San Diego, CA) (data not shown).

Example 35 – Chemical and physical stability of conjugates

This example compares the stability of an exemplary conjugate with that of unconjugated insulin under accelerated conditions according to the method described in Hinds et al. (*Bioconj. Chem.* 11:195-201, 2000) at 37 C and a mechanical agitation rate of 150 strokes/min. Pharmaceutical grade recombinant human insulin (RHI) was selected as the control for the accelerated stability study. Holcombe et al. (*Diabetes Care* 27:1241-1242, 2004) describes that under non-accelerated conditions RHI stability is maintained for at least 30 days at room temperature (RT) and considerably longer when refrigerated. Figure 2 shows the results from the aggregation stability assay for RHI and two exemplary conjugates in pH 7.4 phosphate buffered saline (PBS) at 50 U/ml. In all cases, the % remaining in solution was determined by centrifuging (4500xg, 5 min) the solution at a given time point, measuring the A280 of the supernatant, and dividing the supernatant A280 by that of the original starting solution. Conjugate **I-1** (see Figure 45) was synthesized using TSAT-C6 as the framework, AEM as the ligand, and NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulin as the drug. Conjugate **I-16** (see Figure 45) was synthesized using TSPE as the framework, AEM as the ligand, and NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulin as the drug.

After 48 hours of continuous agitation at 37 C, less than 6% of the RHI remained stable in solution, while the majority of the RHI precipitated out as insoluble aggregates. After the same amount of time, both conjugates remained substantially more stable, as 96%- 99% of the conjugates remained intact and soluble in the PBS solution. The data conclusively show that the conjugates are significantly more stable than RHI under these conditions.

RP-HPLC was used to assess the chemical stability of the conjugates (see Figure 3a). After 48 hours of accelerated stability the conjugate solutions were analyzed using a C8-reverse phase column using a water-acetonitrile elution gradient. The retention times of the pre- and

post-stability conjugate samples are shown along with the percentage of unconjugated (free) insulin and desamido insulin found in the resulting LC traces. No detectable amounts of free insulin or desamido were observed, indicating that (i) the covalent linkage between the saccharides and the insulin molecule is stable, and (ii) no significant chemical degradation of the conjugate occurs during the accelerated stability test (AST). Prior to and in parallel with the AST, the conjugate was also subjected to a 90-day non-accelerated stability test that included daily thermal cycling between 4°C and RT. At the conclusion of the parallel study, RP-HPLC demonstrated that the conjugate was still chemically and physically stable (data not shown).

Further confirmation of the conjugate chemical stability in HEPES buffer is provided from the LC-MS data obtained before and after subjecting the conjugate to the AST. Interestingly, the 48 hour AST conjugate samples in PBS showed that substantial degradation had occurred, while the 48 hour AST conjugate samples in HEPES buffer were completely intact and stable (see Figure 3b). Conjugate **I-7** stored in HEPES has a MW of 6730 Da before and after the AST, demonstrating that both mannose residues, the conjugate framework, and insulin are all chemically unchanged and quite stable. To ensure conjugate stability, all buffers used for storage, *in vitro* testing, and *in vivo* testing contain HEPES as the buffering agent. In certain embodiments, the present disclosure provides a composition comprising an inventive conjugate in a HEPES buffer.

The LC-MS data greatly enhances FDA manufacturing regulatory compliance, as the LC-MS test can readily act as the chemical identity assay of the conjugate. Since the drug (e.g., insulin), conjugate framework, and conjugate all have discrete molecular weights, the resulting ligand ratio can be readily calculated by subtracting the conjugate framework MW from the conjugate MW to give the remaining mass due to the saccharide groups. In the case of conjugate **I-7**, the mannose:insulin molar ratio is calculated as exactly 2.0.

Example 36 – Functional stability of conjugates

After demonstrating that the conjugate was chemically and physically stable, a 72 hour AST conjugate was assessed for its subcutaneous bioactivity *in vivo* vs. fresh conjugate using Sprague-Dawley rats at 5 U/kg (see Figure 4).

Analysis of the 72 hour HEPES AST conjugate data showed that the time to reach the glucose nadir (T_{nadir}) was 60 minutes, and the time to return to 70% of the fasting blood glucose values ($T_{70\%BG}$) was less than 128 $\pm$ 15 min. A comparison of fresh conjugate vs. 72 hour AST conjugate bioactivity curves at each timepoint using the student t-test (n=4 for each group) showed no significant differences (all p-values > 0.21). These results were within specified

targets for the formulation, indicating that preserved conjugate chemical stability translates into preserved *in vivo* functional performance.

III. In vivo assays of exemplary conjugates

This third set of examples describes various experiments investigating the *in vivo* properties of some exemplary conjugates.

Example 37 – Conjugate bioactivity versus RHI and dextran or glycogen conjugates

(a) Insulin-dextran bioactivity

This comparative example evaluates the *in vivo* pharmacodynamic profile of subcutaneously administered insulin-dextran (Sigma-Aldrich, MW ~ 70K). As shown below, the insulin-dextran conjugates synthesized according to U.S. Patent Publication No. 20040202719 act relatively slowly after subcutaneous injection, because the high MW of the conjugate polymer significantly hinders the absorption rate into systemic circulation. Insulin-dextran was synthesized using a modified cyanogen bromide (CNBr) coupling reaction. Briefly, 500 mg of dextran (MW = 70K, Sigma-Aldrich) was dissolved in 50 ml of deionized water. 56 mg of solid CNBr was added to the resulting solution and the pH was maintained at 10.7 ± 0.2 using 5 N NaOH solution. After stirring for 15 min, another 56 mg of solid CNBr was added and the pH was maintained at 10.7 ± 0.2 while stirring for 45 minutes. 300 mg of recombinant human insulin (RHI) was then added to the solution, and the pH was adjusted to 9.15 using solid sodium bicarbonate. The solution was stirred overnight, ultrafiltered exhaustively against DI water using a 10K MWCO polyethersulfone disc membrane filter (Millipore, Bedford, MA), and lyophilized. The resulting powder was then purified from unconjugated insulin by high performance liquid chromatography (Waters, Milford, MA) using a 1 M acetic acid mobile phase over a Superdex™ 75 packed column (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). The insulin-dextran fraction was then lyophilized to obtain the conjugate as a pure powder. The degree of insulin conjugation was 10 % (w/w) as determined by amino acid analysis (UCLA Biopolymers Laboratory, Los Angeles, CA).

Subcutaneous injections of the insulin-dextran were administered using 0.25 ml of a sterilized 1x PBS solution (20 U of equivalent insulin/ml) behind the neck of fasted normal non-diabetic rats (Male Sprague-Dawley, 200-250 g, n = 4). Blood samples were collected via tail vein bleeding at -15 and 0 minutes, and at 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300 and 360 minutes after injection. Blood glucose values were measured using commercially available test strips (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). As shown in Figure 5, the times to reach

the glucose nadir (T_{nadir}) concentration was found to be about 3 hours after injection, and the serum glucose levels remain depressed for at least five hours post injection.

(b) Insulin-glycogen bioactivity

This example evaluates the *in vivo* pharmacodynamic profile of subcutaneously administered insulin-glycogen. The insulin-glycogen conjugate was synthesized according to Example 32. The bioactivity of the insulin-glycogen conjugate was evaluated by injecting a 2.5 equivalent U of insulin/kg dose behind the neck of fasted normal non-diabetic rats (Male Sprague-Dawley, 200-250 g, n = 4). Blood samples were collected via tail vein bleeding at -15 and 0 minutes, and at 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300 and 360 minutes after injection. Blood glucose values were measured using commercially available test strips (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). As compared to the insulin-dextran conjugates above, the high MW insulin-glycogen conjugates lower glucose levels much more rapidly and to a greater extent (see Figure 6). This rapid action and elimination profile is due to the rapid enzymatic digestion of the high MW glycogen polymer chain following subcutaneous injection.

(c) An exemplary conjugate and RHI Bioactivity

This example evaluates and compares the *in vivo* pharmacodynamic profile of a subcutaneously administered exemplary conjugate and recombinant human insulin (RHI). The exemplary conjugate, **I-1** in Figure 45, was synthesized using TSAT-C6 as the scaffold, AEM as the indicator analog, and NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulin as the drug. In each case, the conjugate or RHI was injected at 3.5 U/kg behind the neck of fasted normal non-diabetic rats (Male Sprague-Dawley, 400-500 g, n = 6). Blood samples were collected via tail vein bleeding at 0 minutes and at 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, and 300 minutes after injection. Blood glucose values were measured using commercially available test strips (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). As shown in Figure 7, the glucose depression profiles for RHI and the exemplary conjugate are nearly identical despite the inability for the exemplary conjugate to be enzymatically digested *in vivo*. The rapid action and elimination profiles of the conjugate are most likely due to the fact that the conjugate is only 14% larger than RHI making any effect of increased MW almost negligible in terms of pharmacodynamic properties.

Example 38 – PK comparison with RHI

This example describes and compares the serum insulin profiles obtained for a subcutaneously administered exemplary conjugate and recombinant human insulin (RHI). The

exemplary conjugate, **I-1** in Figure 45, was synthesized using TSAT-C6 as the framework, AEM as the ligand, and NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulin as the drug. In each case, the conjugate or RHI was injected at 3.5 U/kg behind the neck of fasted normal non-diabetic rats (Male Sprague-Dawley, 400-500 g, n = 6). Blood samples were collected via tail vein bleeding at 0 minutes and at 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, and 300 minutes after injection. Blood from each timepoint was centrifuged at 4 C to collect the serum. Serum insulin concentrations were subsequently measured with a commercially available ELISA kit (Human Insulin ELISA, Mercodia, Uppsala, Sweden). As can be seen in Figure 8, the pharmacokinetic profile for the conjugate is statistically indistinguishable from that of RHI, demonstrating that this conjugate is rapidly absorbed into and eliminated from serum following a subcutaneous injection.

Example 39 – PK and bioactivity of a B29-substituted version of the AEM-2-TSAT-C6-insulin conjugate

This example describes the serum insulin and blood glucose depression profiles obtained for a subcutaneously administered exemplary conjugate. The exemplary conjugate, **I-7** in Figure 45, was synthesized using TSAT-C6 as the framework, AEM as the ligand, and recombinant human insulin as the drug (to produce a B29-substituted conjugate instead of a B1-substituted conjugate as in Examples 37 and 38). In this case, the conjugate was injected at 5 U/kg behind the neck of fasted normal non-diabetic rats (Male Sprague-Dawley, 400-500 g, n = 3). Blood samples were collected via tail vein bleeding at 0 minutes and at 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, and 300 minutes after injection. Blood glucose values were measured using commercially available test strips (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). In addition, blood from each timepoint was centrifuged at 4 C to collect the serum. Serum insulin concentrations were subsequently measured with a commercially available ELISA kit (Human Insulin ELISA, Mercodia, Uppsala, Sweden). As can be seen in Figure 9, the pharmacokinetic profile for the B29-substituted conjugate is statistically indistinguishable from that of RHI as well as the B1-substituted conjugate from Example 38, demonstrating that this conjugate is also rapidly absorbed into and eliminated from serum following a subcutaneous injection.

Example 40 – PK and bioactivity comparison with Lispro

This example compares the serum insulin and blood glucose profiles obtained for a subcutaneously administered exemplary conjugate and insulin lispro. Insulin lispro (HUMALOG®) is a rapid acting insulin analog in which the penultimate lysine and proline residues on the C-terminal end of the B-chain have been reversed. This modification blocks the

formation of insulin multimers. Data from soluble recombinant human insulin (RHI) is also provided for comparison (see Example 38 and Figure 8).

The exemplary conjugate, **I-1** in Figure 45, was synthesized using TSAT-C6 as the framework, AEM as the ligand, and NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulin as the drug. In each case, the conjugate or insulin lispro was injected at 3.5 U/kg behind the neck of fasted normal non-diabetic rats (Male Sprague-Dawley, 400-500 gm, n = 6). Blood samples were collected via tail vein bleeding at 0 minutes and at 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, and 300 minutes after injection. Blood glucose values were measured using commercially available test strips (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). In addition, blood from each timepoint was centrifuged at 4 C to collect the serum. Serum insulin concentrations were subsequently measured with a commercially available ELISA kit (Human Insulin ELISA, Mercodia, Uppsala, Sweden). As can be seen in Figure 12, the pharmacokinetic profile for the conjugate is statistically indistinguishable from that of insulin lispro.

Example 41 – Effect of ligand on bioactivity

This example compares the blood glucose profiles obtained for a series of subcutaneously administered exemplary conjugates. The exemplary conjugates were synthesized using TSAT-C6 as the framework, and NH_2-B1-BOC2(A1,B29)-insulin as the drug. The ligand composition was varied across the conjugates to cover a range of affinities: AEM-2, AEBM-2, AETM-1-AEBM-1 and AETM-2 (from lowest to higest affinity). The insulin conjugates are shown as **I-1**, **I-2**, **I-3**, and **I-4** in Figure 45. In each case, the conjugates were injected at 5 U/kg (3.5 U/kg for AEM-2) behind the neck of fasted normal non-diabetic rats (Male Sprague-Dawley, 400-500 gm, n = 6). Blood samples were collected via tail vein bleeding at 0 minutes and at 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, and 300 minutes after injection. Blood glucose values were measured using commercially available test strips (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). In addition, blood from each timepoint was centrifuged at 4 C to collect the serum. Serum insulin concentrations were subsequently measured with a commercially available ELISA kit (Human Insulin ELISA, Mercodia, Uppsala, Sweden).

As can be seen in Figure 13, the glucose lowering response decreased as the affinity of the ligand increased. This data provided the first indication that the nature of the ligand may affect the bioactivity of the conjugate. Figures 14-16 show the blood glucose levels alongside the serum insulin levels for each of the four conjugates tested. These results show quite clearly that the reduced glucose response for conjugates with higher affinity ligands results from the reduced PK profile of the conjugate (compare Figure 14 for AEM-2 with Figure 17 for AETM-2).

Example 42 – Effect of exogenous inhibitors on PK and bioactivity

In view of the data described in Example 41 we hypothesized that the reduced PK profile and bioactivity observed with conjugates having higher ligands might result from stronger binding to endogenous saccharide binding molecules. For example, without wishing to be limited to any particular theory, we hypothesized that binding to endogenous "lectin-like" proteins such as surfactant proteins A and D or members of the selectin family might be causing these conjugates to be cleared more rapidly than conjugates with lower affinity ligands.

In order to test this hypothesis we ran a set of experiments to determine whether exogenous ligands could compete for binding to these proposed endogenous saccharide binding molecules and thereby increase the PK profile of the conjugates post-administration. The high affinity AETM-2 conjugate **I-2** was used for all experiments. In each case, the same dose of conjugate was injected behind the neck of fasted normal non-diabetic rats (Male Sprague-Dawley, 400-500 gm, n = 6). After a 15 minute delay a dose of the exogenous ligand was injected IP. Blood samples were collected via tail vein bleeding at 0 minutes and at 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, and 300 minutes after the initial conjugate injection. Blood glucose values were measured using commercially available test strips (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). In addition, blood from each timepoint was centrifuged at 4 C to collect the serum. Serum insulin concentrations were subsequently measured with a commercially available ELISA kit (Human Insulin ELISA, Mercodia, Uppsala, Sweden). A control was performed by injecting saline instead of the exogenous ligand after 15 minutes.

Figure 18 shows the results obtained when alpha-methyl mannose was administered. Alpha-methyl mannose is a very high affinity saccharide which is capable of competing with AETM for binding to lectins such as Con A. As shown, the change in PK/PD profile that resulted from injection of alpha-methyl mannose was very significant ($p<0.05$).

Figure 19 is a control experiment in which soluble recombinant human insulin (RHI) was used for the initial injection instead of the AETM-2 conjugate. As shown, there was no change in PK/PD profile when alpha-methyl mannose was injected ($p>>0.05$).

The endogenous mannan-binding lectin (MBL) is known to bind saccharides with the following relative affinities: D-mannose, L-fucose > D-glucose, N-acetyl-D-glucosamine >> D-galactose. We therefore decided to run two experiments comparing the effects of L-fucose (high affinity ligand), D-glucose (intermediate affinity ligand) and D-galactose (low affinity ligand) on the PK/PD profile for the AETM-2 conjugate. The results with L-fucose are compared with the results obtained with alpha-methyl mannose in Figure 20. As shown, alpha-methyl mannose and L-fucose appear to exhibit the same kind of effect. The results with D-glucose and D-galactose

are compared in Figure 21. Galactose exhibits no effect as compared to saline. Glucose appears to exhibit a small effect; however, this is complicated by the fact that the exogenous insulin from the conjugate quickly lowers the glucose, so the sustained effect observed with alpha-methyl mannose and L-fucose does not occur.

Example 43 – Effect of exogenous inhibitor at the local injection site

In view of the data described in Example 42, we set out to determine whether the alpha-methyl mannose (a-MM) induced increase in serum conjugate concentration and bioactivity was a result of an increased rate of absorption from the subcutaneous injection site. The high affinity TSAT-C6-AETM-2 conjugate **I-2** was used for this experiment. First, the conjugate was diluted to a concentration of 5 U/ml (0.2 mg/ml insulin equivalent) using either a buffered saline solution or a buffered saline solution containing 1 M a-MM. Each solution was injected sub-Q at a dose of 5 U/kg into the back of the neck of each of three non-diabetic, male SD rats at time 0 and blood samples were collected via tail vein bleeding at 0 minutes and at 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, and 300 minutes after injection. Blood glucose values were measured using commercially available test strips (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). In addition, blood from each timepoint was centrifuged at 4 C to collect the serum. Serum insulin concentrations were subsequently measured with a commercially available ELISA kit (Iso Insulin ELISA, Mercodia, Uppsala, Sweden). In this experiment, rats that received the a-MM conjugate solution also received an injection of buffered saline solution sub-Q at a separate hind quarter injection site at 15 minutes. Rats that received the saline conjugate solution also received an injection of a-MM solution sub-Q at a separate hind quarter injection site at 15 minutes. These 15-minute delayed injections were used to make sure that the amount of a-MM injected sub-Q with the conjugate solution would not raise the systemic concentration of a-MM high enough to invoke the kind of a-MM induced effects exhibited in Figure 18.

The results shown in Figure 22 indicate that within experimental error, the conjugate PK and bioactivity profiles were not enhanced at all by purposefully co-injecting a high concentration of a-MM inhibitor with the conjugate. These results are consistent with the hypothesis that the exogenous saccharides do not act on the conjugates by changing the absorption profile into systemic circulation from the site of injection.

Example 44 – Effect of delaying the exogenous inhibitor injection after the initial conjugate injection

Based on the results in Figure 22, the a-MM-enhanced PK and bioactivity results cannot be explained by increased injection site absorption but rather must be the result of a systemic

effect that occurs after the conjugate has been absorbed. The following two hypotheses could explain such behavior: (a) the conjugate is being eliminated from the body via a lectin dependent mechanism that can be disrupted by the competitive saccharide or (b) the conjugate is binding to lectins within the body and is only released into circulation in the presence of the competitive saccharide. In the case of (b) one would expect that introduction of a-MM into the animal after the conjugate has been fully absorbed from the sub-Q depot would cause the absorbed conjugate to release from the lectin sites in the body thereby increasing its serum concentration and bioactivity. However, if an elimination mechanism is at work as described in (a) then injecting a-MM after the conjugate has been fully absorbed from the sub-Q depot will not produce any increase in serum concentration or bioactivity because the conjugate will have already been completely eliminated from the body.

To determine the likely mechanism, the high affinity TSAT-C6-AETM-2 conjugate **I-2** was injected at 5 U/kg behind the neck of fasted normal non-diabetic rats (Male Sprague-Dawley, 400-500 gm, n = 3 per group). After four different delay times (15 minutes, 60 minutes, 120 minutes, and 240 minutes) a 4 g/kg dose of a-MM solution was injected IP. Blood samples were collected via tail vein bleeding at 0 minutes and at the following intervals for each experiment:

IP a-MM injection delay time (min)	Sample time points (min post injection)
15	15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 360
60	15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 360
120	15, 30, 45, 60, 90, 120, 135, 150, 180, 240, 300, 360
240	15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 255, 270, 300, 360

Blood glucose values were measured using commercially available test strips (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). In addition, blood from each timepoint was centrifuged at 4 C to collect the serum. Serum insulin concentrations were subsequently measured with a commercially available ELISA kit (Iso Insulin ELISA, Mercodia, Uppsala, Sweden).

As shown in Figure 23, the increase in serum conjugate concentration and bioactivity due to IP a-MM injection is less and less prevalent the longer the delay time between the conjugate injection and the IP a-MM injection. For example, after 240 minutes no increase in serum conjugate concentration is observed indicating that there is no lectin-bound depot of conjugate present in the body after complete conjugate absorption. These results are consistent with proposed mechanism (a) and inconsistent with proposed mechanism (b). It is to be understood

that while we hypothesize that mechanism (a) may be responsible for the PK properties observed with the conjugates of the present disclosure, the claims presented herein are in no way limited to a specific mechanism of action.

Example 45 – Effect of a-MM on PK and bioactivity as a function of ligand affinity

In view of the data described in Example 42, we set out to determine the pharmacokinetic and pharmacodynamic behavior of conjugates synthesized using different saccharide ligands than the AETM ligand used in Example 42. In this example, the TSAT-C6 framework was used and the following conjugates were synthesized according to the methods described in Example 20 (note glucosamine-HCl or GA-HCl was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) and used without further purification):

Conjugate	Framework	Framework MW	Ligand	AE-sugar MW	Purity (HPLC)	MW (LC-MS)	Sugar/ Insulin
I-7: TSAT-C6-AEM-2 (B29)	TSAT-C6	822	AEM	223	95%	6729	2.0
I-5: TSAT-C6-GA-2 (B29)	TSAT-C6	822	GA-HCl	216	95%	6641	2.0

According to N-terminal sequencing, approximately 90% of each saccharide-containing framework was conjugated to insulin via the Lys-B29. TSAT-C6-AEM-2 (B29) and TSAT-C6-GA-2 (B29) are shown in Figure 45 as conjugates **I-7** and **I-5**, respectively.

The same type of experiments described in Example 42 were repeated for the conjugates described in the table above. In each case, the same dose of conjugate (5 U/kg) was injected behind the neck of fasted normal non-diabetic rats (Male Sprague-Dawley, 400-500 gm, n = 3). After a 15 minute delay a 4g/kg dose of a-MM was injected IP. Blood samples were collected via tail vein bleeding at 0 minutes and at 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, and 300 minutes after the initial conjugate injection. Blood glucose values were measured using commercially available test strips (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). In addition, blood from each timepoint was centrifuged at 4 C to collect the serum. Serum insulin concentrations were subsequently measured with a commercially available ELISA kit (ISO Insulin ELISA, Mercodia, Uppsala, Sweden). A control was performed by injecting saline instead of a-MM after 15 minutes.

Figures 24 and 25 show the results obtained when a-MM was administered by IP injection 15 minutes after the sub-Q injection of **I-7** and **I-5**, respectively. As shown, the increase in PK/PD profile that resulted from injection of a-MM was very significant ($p<0.05$) for

conjugate **I-7** when compared to the saline injection control group. However, the extent of the a-MM-induced increase in serum conjugate concentration was less than that obtained for the AETM-2 conjugates from Example 42. The **I-5** conjugate profile was unaffected by the a-MM injection, just like the results obtained for RHI in Figure 19. Taken together, these data illustrate that both mannose-derived conjugates (AEM-2 and AETM-2) exhibit the a-MM-enhanced PK/PD profile while the lower affinity-glucosamine derived conjugates do not. Furthermore, the relative change in PK profile for the lower affinity AEM-2 conjugates is less than the change observed for the higher affinity AETM-2 conjugates.

Example 46 – Effect of a-MM on PK and bioactivity as a function of ligand valency

In this example, we set out to determine the pharmacokinetic and pharmacodynamic behavior of conjugates to which an increasing number of exemplary saccharide ligands have been covalently attached. All conjugates were synthesized according to the methods described in Example 20 using the frameworks and saccharide ligands specified below:

Conjugate	Framework	Frame-work MW	Ligand	AE-sugar MW	Purity (HPLC)	MW (LC-MS)	Sugar/ Insulin
I-8: DSS-AEM-1 (B29)	DSS	368	AEM	223	>95%	6168	1.0
I-9: TSPE-AEM-3 (B29)	TSPE	813	AEM	223	>95%	6829	3.0
I-10: DSS-AETM-1 (B29)	DSS	368	AETM	547	>95%	6491	1.0
I-11: TSPE-AETM-3 (B29)	TSPE	813	AETM	547	>95%	7800	3.0

According to N-terminal sequencing, approximately 90% of each saccharide-containing framework was conjugated to insulin via the Lys-B29. The conjugates are shown in Figure 45 as **I-8**, **I-9**, **I-10**, and **I-11**.

The same type of experiment described in Example 45 was repeated for the conjugates described in the table above. In each case, the same dose of conjugate (5 U/kg) was injected behind the neck of fasted normal non-diabetic rats (Male Sprague-Dawley, 400-500 gm, n = 3). After a 15 minute delay a 4g/kg dose of a-MM was injected IP. Blood samples were collected via tail vein bleeding at 0 minutes and at 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, and 300 minutes after the initial conjugate injection. Blood glucose values were measured using commercially available test strips (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). In addition, blood from each timepoint was centrifuged at 4 C to collect the serum. Serum insulin concentrations

were subsequently measured with a commercially available ELISA kit (ISO Insulin ELISA, Mercodia, Uppsala, Sweden). A control was performed by injecting saline instead of a-MM after 15 minutes.

Figures 26 and 27 show the results obtained when a-MM was administered by IP injection 15 minutes after the sub-Q injection of **I-8** and **I-9**, respectively. As shown, the increase in PK/PD profile that resulted from injection of a-MM was very significant ($p<0.05$) for **I-9** and less so for **I-8** when compared to the saline injection control group. Furthermore, the **I-9** conjugate exhibited approximately the same a-MM-induced PK profile as the **I-2** conjugate from Example 42, both of which were much more pronounced than that obtained from **I-8**.

Figures 28 and 29 show the results obtained when a-MM was administered by IP injection 15 minutes after the sub-Q injection of **I-10** and **I-11**, respectively. As shown, the increase in PK/PD profile that resulted from injection of a-MM was very significant ($p<0.05$) for **I-11** and slightly less so for **I-10** when compared to the saline injection control group. Furthermore, the **I-11** conjugate exhibited approximately the same a-MM-induced PK profile as the **I-2** conjugate from Example 42, both of which were slightly more pronounced than that obtained from **I-10**.

Example 47 – In vivo half life/elimination rate comparison

The results obtained in Example 44 are consistent with the exemplary conjugates being eliminated from the body via a lectin dependent mechanism that can be disrupted by the presence of a competitive saccharide. In order to explore this mechanism in more detail, we conducted the following experiments on exemplary conjugates to determine the rate at which they were cleared from serum *in vivo* versus unconjugated insulin. All conjugates used in this study were synthesized according to the general methods described in Example 20.

In each case the soluble conjugate was dosed at 0.4 mg conjugate/kg body weight into dual jugular vein cannulated male Sprague-Dawley rats (Taconic, JV/JV, 350-400g, n=3). A sterile conjugate solution or control insulin was injected intravenously via one JV cannula, followed immediately by a chase solution of heparin-saline to ensure that all of the conjugate dose was administered into the animal. The second cannula was used to collect blood samples at t = 0 (pre-dose), and at 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90, 120, and 180 minutes post-dose.

Blood glucose values were measured using commercially available test strips (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). In addition, blood from each timepoint was centrifuged at 4 C to collect the serum. Serum insulin or serum conjugate concentrations were subsequently measured with a commercially available ELISA kit (Iso-Insulin ELISA, Mercodia, Uppsala, Sweden).

Figure 30 shows the serum concentration of either RHI or TSAT-C6-AETM-2 conjugate, shown as **I-6** in Figure 45, as a function of time following the intravenous injection. Clearly, **I-6** is eliminated much more rapidly from serum than is RHI. The data is best fit using a two-compartment bi-exponential model with the following general formula: $C(t) = A_o EXP(-at) + B_o EXP(-bt)$ where t is time, C(t) is the concentration in serum as a function of time, A_o is the first compartment concentration constant, a is the first compartment exponential time constant, B_o is the second compartment concentration constant, and b is the second compartment exponential time constant. The elimination half-lives (in minutes) associated with each compartment are t1/2(a) = 0.693/a and t1/2(b) = 0.693/b. In Figure 30, for RHI the t1/2(a) = 0.76 and t1/2(b) = 11.46 and for **I-6** the t1/2(a) = 0.47 and t1/2(b) = 2.87. In other words, the t1/2(b) for **I-6** is about four times shorter than the t1/2(b) for RHI.

The following table summarizes the t1/2 parameters for a number of conjugates tested using exactly the same procedure described above (structures are shown in Figure 45):

Formulation	t1/2 (a)	t1/2 (b)	Ratio to RHI t1/2 (a)	Ratio to RHI t1/2 (b)
RHI	0.76	11.46	1.00	1.00
I-5: TSAT-C6-GA-2	0.81	12.02	1.07	1.05
I-8: DSS-AEM-1	0.90	9.61	1.18	0.84
I-7: TSAT-C6-AEM-2	0.45	2.77	0.60	0.24
I-9: TSPE-AEM-3	0.66	2.62	0.87	0.23
I-10: DSS-AETM-1	0.82	4.48	1.08	0.39
I-6: TSAT-C6-AETM-2	0.47	2.87	0.62	0.25
I-11: TSPE-AETM-3	0.22	1.33	0.29	0.12

This data is consistent with the hypothesis that the exemplary conjugates are eliminated from serum more rapidly than unconjugated insulin, the extent of which is governed by the affinity of the particular conjugate for the endogenous lectin and the number of ligands substituted per conjugate. Furthermore, the a-MM induced increase in PK/PD profiles demonstrated in Examples 42, and 44-46 correlates well with the reduction in Phase b half-life for each of the conjugates tested.

Example 48 – In vivo half life/elimination rate under glucose infusion

In this example, it was further hypothesized that the clearance rate of exemplary conjugates could be inhibited by the presence of physiological concentrations of glucose. In order to determine the rate at which the conjugates were cleared from serum *in vivo* under

hyperglycemic conditions, the following experiment was conducted. In each case, **I-7** was dosed at 0.4 mg conjugate/kg body weight into dual jugular vein cannulated male Sprague-Dawley rats (Taconic, JV/JV, 350-400g, n=3).

One hour before the start of the experiment one rat cannula was connected to a syringe infusion pump containing a sterile 50% w/v glucose solution. The pump infusion rate was adjusted by the experimenter to ensure that the blood glucose levels in the animal remained above 300 mg/dL at all times during the experiment. Blood glucose was measured using commercially available test strips (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). In a typical experiment, it was found that the infusion pump rate required to keep the animals above 300 mg/dL was typically greater than 85 uL/min. A blood sample was taken at t = 0 min, after which a sterile conjugate solution or control insulin was injected intravenously via the second rat cannula, followed immediately by a chase solution of heparin-saline to ensure that all of the conjugate dose was administered into the animal. After an additional flush of the cannula line with heparin-saline, the second cannula was used to collect blood samples at t = 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90, 120, and 180 minutes post-dose.

Blood from each timepoint was centrifuged at 4C to collect the serum, and serum insulin or serum conjugate concentrations were subsequently measured with a commercially available ELISA kit (Iso-Insulin ELISA, Mercodia, Uppsala, Sweden). Insulin or conjugate serum concentration vs. time data was best fit with the sum of two independent decaying exponentials ($C(t) = a \exp(-k_a t) + b \exp(-k_b t)$) according to the two-compartment model, where $t1/2(a) = (\ln 2)/k_a$ and $t1/2(b) = (\ln 2)/k_b$. The following table summarizes the t1/2 parameters for **I-7** with and without the glucose infusion along with those obtained for RHI from Example 47:

Infusion	Formulation	t1/2 (a)	t1/2 (b)	Ratio to RHI t1/2 (a)	Ratio to RHI t1/2 (b)
None	RHI	0.76	11.46	1.00	1.00
Saline	TSAT-C6-AEM-2 (**I-7**)	0.45	2.77	0.60	0.24
Glucose (400 mg/dl)	TSAT-C6-AEM-2 (**I-7**)	0.64	5.11	0.84	0.45

We can conclude from these data that glucose is able to inhibit the accelerated serum elimination for this conjugate thereby doubling the Phase b elimination half life from 2.77 to 5.11 minutes.

Example 49 – In vivo half life/elimination rate under a-MM infusion

In this example, it was further hypothesized that the clearance rate of insulin- saccharide conjugates could be inhibited by the presence of arbitrarily high concentrations of inhibitory

saccharides other than glucose, such as α-methyl-mannose (a-MM). In order to determine the rate at which exemplary conjugates were cleared from serum *in vivo* in the presence of a-MM, the following experiment was conducted. In each case the soluble conjugate was dosed at 0.4 mg conjugate/kg body weight into dual jugular vein cannulated male Sprague-Dawley rats (Taconic, JV/JV, 350-400g, n=3).

One hour before the start of the experiment one rat cannula was connected to a syringe infusion pump containing a sterile 25% w/v a-MM solution. The pump infusion rate was adjusted by the experimenter, but was typically set at 85 uL/min. A blood sample was taken at t = 0 min, after which a sterile conjugate solution or control insulin was injected intravenously via the second rat cannula, followed immediately by a chase solution of heparin-saline to ensure that all of the conjugate dose was administered into the animal. After an additional flush of the cannula line with heparin-saline, the second cannula was used to collect blood samples at t = 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90, 120, and 180 minutes post-dose.

In addition, blood glucose was measured using commercially available test strips (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Blood from each timepoint was centrifuged at 4C to collect the serum, and serum insulin or serum conjugate concentrations were subsequently measured with a commercially available ELISA kit (Iso-Insulin ELISA, Mercodia, Uppsala, Sweden). Insulin or conjugate serum concentration vs. time data was best fit with the sum of two independent decaying exponentials ($C(t) = a \exp(-k_a t) + b \exp(-k_b t)$) according to the two-compartment model, where $t1/2(a) = (\ln 2)/k_a$ and $t1/2(b) = (\ln 2)/k_b$. The following table summarizes the t1/2 parameters for the TSAT-C6-AEM-2 conjugate with and without the a-MM infusion along with those obtained with glucose infusion from Example 48 and those obtained for RHI with no saccharide infusion from Example 47:

Infusion	Formulation	t1/2 (a)	t1/2 (b)	Ratio to RHI t1/2 (a)	Ratio to RHI t1/2 (b)
None	RHI	0.76	11.46	1.00	1.00
Saline	TSAT-C6-AEM-2 (**I-7**)	0.45	2.77	0.60	0.24
a-MM	TSAT-C6-AEM-2 (**I-7**)	0.92	10.09	1.21	0.88
Glucose (400 mg/dl)	TSAT-C6-AEM-2 (**I-7**)	0.64	5.11	0.84	0.45

We can conclude from these data that not only does a-MM inhibit the accelerated serum elimination for this conjugate, it does so to an even greater extent than does glucose. In this case, the Phase b elimination half life nearly quadruples from 2.77 to 10.09 minutes.

IV. Other Examples

This fourth set of examples describes various experiments investigating the synthesis, formulation, and properties of some exemplary conjugates.

Example 50 – Long acting insulin conjugates using protamine, zinc, and other excipients

Given that the data from previous examples is consistent with a saccharide-dependent serum elimination mechanism, we set out to develop formulations of conjugates that would provide a steady, sustained rate of absorption from a subcutaneous injection site. At a steady absorption rate, the serum conjugate concentration at any point in time will be governed primarily by the saccharide-dependent elimination rate. In such a way, we can formulate a long acting, sustained-release insulin exhibiting a saccharide-responsive PK profile.

In order to generate long acting conjugates, we prepared PZI (protamine zinc insulin) formulations from the conjugate solutions. Conjugates substituted with insulin at the B1-terminus do not form amorphous or crystalline PZI formulations as readily, so we used B29-substituted conjugates prepared based on the methods of Example 20. The excipients used in these formulations comprise protamine, zinc, m-cresol, and salt all of which were obtained commercially from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). The concentrations of these components may be varied in order to obtain an optimally flat, sustained absorption rate. In addition, in some cases it was found that the addition of a small amount of unmodified insulin helped stabilize the formulation. In these cases, the concentration of unmodified insulin contained in the sample was varied to obtain an optimally flat, sustained absorption rate. In all formulations tested, the following recipe was used:

Component	Variable	Volume (ml)
Conjugate solution at 2.7 mg/ml	% unmodified insulin content (M/M)	1.000
250 mM HEPES buffered saline	NaCl concentration (M)	0.111
Zinc acetate solution	Zinc concentration (mg/ml)	0.124
Cresol solution in water	v/v %	0.159
pH 7.2 Protamine solution in 25 mM HEPES buffered saline	Protamine concentration (mg/ml)	4 x 0.194 aliquots

Unless otherwise specified, once the formulations were prepared after addition of the components in the order described in the table above, they were gently mixed for 30 minutes prior to *in vivo* testing.

To test the sustained release profile for a given formulation as well as the glucose-responsive PK profile, the following experiment was conducted. The formulation was injected at a predetermined dose (~ 15 U/kg in most cases unless otherwise specified) behind the neck of fasted normal non-diabetic rats (Male Sprague-Dawley, 400-500 gm, n = 3). After a 240 minute delay, a glucose dose (4 g/kg) was injected IP. Blood samples were collected via tail vein bleeding at 0 minutes and at 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, and 300 minutes after the initial conjugate injection. Blood glucose values were measured using commercially available test strips (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). In addition, blood from each timepoint was centrifuged at 4 C to collect the serum. Serum insulin concentrations were subsequently measured with a commercially available ELISA kit (Iso-Insulin ELISA, Mercodia, Uppsala, Sweden). According to the manufacturer's assay specifications, the Iso-Insulin ELISA is 71% cross-reactive with rat insulin. The serum samples were diluted by 10× in order to minimize the amount of endogenous rat insulin detected in each sample but the possibility of rat insulin detection could not be completely ruled out. Therefore, the results are generally reported as "measured insulin," which can consist of some amount of endogenous rat insulin in addition to the conjugate or RHI, depending on the experiment. Nevertheless, all samples collected in each of the following examples were treated identically and can be directly compared for differences in performance.

Example 51 – Effect of protamine concentration on long acting insulin conjugate performance

The purpose of this example was to demonstrate the effect of protamine concentration on the time action and glucose-responsive PK profile of an exemplary conjugate. In this example **I-6**, synthesized according to the methods described in Example 20, was tested using the generalized formulation and *in vivo* protocol described in Example 50:

Component	Variable	Volume (ml)
TSAT-C6-AETM-2 (**I-6**) solution at 2.7 mg/ml	unmodified insulin = 16.7%	1.000
250 mM HEPES buffered saline	NaCl concentration = 1.5 M	0.111
Zinc acetate solution	Zinc concentration (mg/ml) = see below	0.124
Cresol solution in water	3 % v/v	0.159
pH 7.2 Protamine solution in 25 mM HEPES buffered saline	Protamine concentration (mg/ml) = see below	4 x 0.194 aliquots

Formulation	Zinc concentration (mg/ml)	Protamine concentration (mg/ml)
1xP-1xZ	1.15	1.25
4xP-4xZ	4.60	5.00
10xP-4xZ	4.60	12.50

The four hour IP glucose injection (4 g/kg) experiments were performed by dosing 15 U/kg (body weight in grams/1.87 = microliters of injection volume) of each of the three formulations described above. The results shown in Figure 31a-c demonstrate that as the protamine concentration in the formulation increases, the more protracted the resulting formulation and the more pronounced the measured increase in serum insulin profile after the four hour glucose injection. The 1xP-1xZ formulation released a significant portion of the insulin conjugate payload over a short period of time immediately following the injection such that very little signal was detected after the IP glucose challenge. On the other hand, the 10xP-4xZ formulation released a low basal amount of insulin over the first four hours with no hypoglycemia and subsequently attained > 4x increase in measured insulin concentration immediately following the IP glucose injection.

Example 52 – Effect of zinc concentration on long acting insulin conjugate performance

The purpose of this example was to demonstrate the effect of zinc concentration on the formulation stability, time action and glucose-responsive PK profile of an exemplary conjugate. In this example **I-6**, synthesized according to the methods described in Example 20, was tested using the generalized formulation and *in vivo* protocol described in Example 50:

Component	Variable	Volume (ml)
TSAT-C6-AETM-2 (**I-6**) solution at 2.7 mg/ml	unmodified insulin = 0%	1.000
250 mM HEPES buffered saline	NaCl concentration = 1.5 M	0.111
Zinc acetate solution	Zinc concentration (mg/ml) = see below	0.124
Cresol solution in water	3 % v/v	0.159
pH 7.2 Protamine solution in 25 mM HEPES buffered saline	Protamine concentration (mg/ml) = see below	4 x 0.194 aliquots

Formulation	Zinc concentration (mg/ml)	Protamine concentration (mg/ml)
4xP-1xZ	1.15	5.00
4xP-2xZ	2.30	5.00
10xP-1xZ	1.15	12.5
10xP-2xZ	2.30	12.5

The four hour IP glucose injection (4 g/kg) experiments were performed by dosing 15 U/kg (body weight in grams/1.87 = microliters of injection volume) of each of the four formulations described above. The results shown in Figure 32a-b and 33a-b demonstrate that within experimental error, the concentration of zinc did not have a significant effect on the overall sustained release nature of the formulation or the glucose-responsive profile. In all cases, a statistically significant increase in measured insulin concentration was observed following the IP glucose injection. As demonstrated in Example 51, the higher protamine (10xP) formulations released less conjugate over time than the lower protamine (4xP) formulations regardless of the zinc concentration. However, when the formulations were left at room temperature for greater than 24 hours, both 10xP formulations transformed from an easily dispersible particulate solution into a sticky, agglomerated, two-phase solution. This did not happen with the corresponding 10xP-4xZ formulation. Similarly, the 4xP-1xZ formulation was found to transform the same way as the 10xP-1xZ formulation whereas the 4xP-2xZ was relatively stable at room temperature for weeks. Therefore, the zinc concentration for a given protamine concentration can be adjusted to prepare easily dispersible formulations that are stable over long periods of time.

Example 53 – Effect of m-cresol concentration on long acting insulin conjugate performance

The purpose of this example was to demonstrate the effect of m-cresol concentration on the time action and glucose-responsive PK profile of an exemplary conjugate. In this example **I-6**, synthesized according to the methods described in Example 20, was tested using the generalized formulation and in vivo protocol described in Example 50:

Component	Variable	Volume (ml)
TSAT-C6-AETM-2 (**I-6**) solution at 2.7 mg/ml	unmodified insulin = 0%	1.000
250 mM HEPES buffered saline	NaCl concentration = 1.5 M	0.111
Zinc acetate solution	Zinc concentration = 4.6 mg/ml	0.124
Cresol solution in water	v/v % = see below	0.159
pH 7.2 Protamine solution in 25 mM HEPES buffered saline	Protamine concentration = 12.5 mg/ml	4 x 0.194 aliquots

Formulation	Cresol concentration
No cresol	0
4x cresol	12% v/v

The four hour IP glucose injection (4 g/kg) experiments were performed by dosing 15 U/kg (body weight in grams/1.87 = microliters of injection volume) of the two formulations described above. The results shown in Figure 34a-b demonstrate that the presence of m-cresol maintains a more protracted formulation. The no cresol formulation releases a significant portion of the insulin conjugate payload over a short period of time immediately following the injection such that very little increase in measured insulin concentration was observed when challenged with IP glucose. On the other hand, the 4x cresol formulation releases a low basal amount of insulin over the first four hours with no hypoglycemia and subsequently attains a 3-4x increase in measured insulin concentration immediately following the IP glucose injection.

Example 54 – Effect of salt/isotonic agent concentration on long acting insulin conjugate performance

The purpose of this example was to demonstrate the effect of salt concentration and choice of isotonic agent on the time action and glucose-responsive PK profile of an exemplary conjugate. In this example **I-6**, synthesized according to the methods described in Example 20, was tested using the generalized formulation and in vivo protocol described in Example 50:

Component	Variable	Volume (ml)
TSAT-C6-AETM-2 (**I-6**) solution at 2.7 mg/ml	unmodified insulin = 16.7%	1.000
250 mM HEPES buffered saline	NaCl or glycerol concentration (M) = see below	0.111
Zinc acetate solution	Zinc concentration = 4.6 mg/ml	0.124
Cresol solution in water	3% v/v	0.159
pH 7.2 Protamine solution in 25 mM HEPES buffered saline	Protamine concentration = 12.5 mg/ml	4 x 0.194 aliquots

Formulation	NaCl concentration
No salt	0.0 M
3.3x salt	5.0 M
Glycerol	Neat glycerol solution instead of buffered saline

The four hour IP glucose injection (4 g/kg) experiments were performed by dosing 15 U/kg (body weight in grams/1.87 = microliters of injection volume) of each of the three formulations described above. The results shown in Figure 35a-c demonstrate that the presence of salt in the formulation maintains a more protracted formulation. The no salt formulation released a significant portion of the insulin conjugate payload over the first four hours of the experiment such that very little increase in measured insulin concentration was observed when challenged with IP glucose. On the other hand, the 3.3x salt formulation released a low basal amount of conjugate over the first four hours with no hypoglycemia and subsequently attained a ~4x increase in measured insulin concentration immediately following the IP glucose injection. This performance was similar to that obtained with the 10xP-4xZ formulation from Example 51, which was exactly the same as the 3.3x salt formulation but contained approximately 1/3 the salt concentration (1.5 M as compared to 5.0 M). Finally, substituting glycerol for NaCl as the isotonic agent does not appear to adversely affect the protracted nature of the formulation.

Example 55 – Effect of unmodified insulin concentration on long acting insulin conjugate performance

The purpose of this example was to demonstrate the effect of including different concentrations of unmodified insulin on the time action and glucose-responsive PK profile of an exemplary conjugate. In this example **I-6**, synthesized according to the methods described in

Example 20, was tested using the generalized formulation and in vivo protocol described in Example 50:

Component	Variable	Volume (ml)
TSAT-C6-AETM-2 (**I-6**) solution at 2.7 mg/ml	% unmodified insulin = see below	1.000
250 mM HEPES buffered saline	NaCl concentration = 1.5 M	0.111
Zinc acetate solution	Zinc concentration = 4.6 mg/ml	0.124
Cresol solution in water	3% v/v	0.159
pH 7.2 Protamine solution in 25 mM HEPES buffered saline	Protamine concentration = 12.5 mg/ml	4 x 0.194 aliquots

Formulation	% unmodified insulin
1/24	4.17
1/12	8.33
1/6	16.7

The four hour IP glucose injection (4 g/kg) experiments were performed by dosing 15 U/kg (body weight in grams/1.87 = microliters of injection volume) of each of the three formulations described above. The results shown in Figure 36a-c demonstrate that the presence of unmodified insulin in the formulation beneficially produces a more protracted formulation with substantial increase in measured insulin concentration following an IP glucose injection. Furthermore, the presence of unmodified insulin helps preserve the formulation performance even after several weeks of room temperature incubation (see Example 57 below).

Example 56 – Long acting insulin conjugates – Dose response effect

In this example, we evaluated the dose-response effect of a particular formulation of a long-acting exemplary conjugate. Conjugate **I-6**, synthesized according to the methods described in Example 20, was tested using the generalized formulation and in vivo protocol described in Example 50:

Component	Variable	Volume (ml)
TSAT-C6-AETM-2 (1-6) solution at 2.7 mg/ml	unmodified insulin = 16.7%	1.000
250 mM HEPES buffered saline	NaCl concentration = 1.5 M	0.111
Zinc acetate solution	Zinc concentration = 4.6 mg/ml	0.124
Cresol solution in water	3% v/v	0.159
pH 7.2 Protamine solution in 25 mM HEPES buffered saline	Protamine concentration = 12.5 mg/ml	4 x 0.194 aliquots

The four hour IP glucose injection (4 g/kg) experiment was performed by dosing 5 or 15 U/kg (body weight in grams/1.87 = microliters of injection volume) of the formulation described above.

As shown in Figure 37, the conjugate exhibited a flat PK profile until the glucose was injected. The increase in measured insulin concentration following the IP glucose challenge was dramatic and dose-dependent (compare data obtained with a 5 U/kg (left) and 15 U/kg (right) dose of conjugate). No hypoglycemia was observed at early or late time points.

Example 57 – Stability of exemplary long-acting, glucose-responsive conjugates

In this example, we synthesized the same exact long acting formulation from Example 56 at a 2x scale. Half of the material was stored at 2-8 C and the other half stored at room temperature for one week or two weeks. After the specified storage time, the material was redispersed and tested using the same four hour IP glucose injection protocol described in Example 56 at a 15 U/kg dose (body weight in grams/1.87 = microliters of injection volume). As shown in Figures 38-39, this formulation demonstrates similar performance even after being stored refrigerated (Figure 38) or at room temperature (Figure 39) for at least two weeks.

Example 58 – Performance of long acting conjugates prepared from conjugates with varying ligand affinity and multivalency

In this example, we set out to determine the time action and glucose-responsive PK profile of long-acting formulations of conjugates constructed from different types and numbers of ligands. All conjugates for this example were synthesized according to the methods described in Example 20 using the frameworks and saccharide ligands specified below:

Conjugate	Framework	Frame-work MW	Ligand	AE-sugar MW	Purity (HPLC)	MW (LC-MS)	Sugar/ Insulin
I-8: DSS-AEM-1 (B29)	DSS	368	AEM	223	>95%	6168	1.0
I-7: TSAT-C6-AEM-2 (B29)	TSAT-C6	822	AEM	223	95%	6729	2.0
I-9: TSPE-AEM-3 (B29)	TSPE	813	AEM	223	>95%	6829	3.0
I-10: DSS-AETM-1 (B29)	DSS	368	AETM	547	>95%	6491	1.0
I-11: TSPE-AETM-3 (B29)	TSPE	813	AETM	547	>95%	7800	3.0
I-17: C6-amide-AEM-2 (B29)	C6-amide	838	AEM	223	95%	6745	2.0

The following long-acting formulation was used for each conjugate:

Component	Variable	Volume (ml)
Conjugate solution at 2.7 mg/ml	unmodified insulin = 16.7%	1.000
250 mM HEPES buffered saline	NaCl concentration = 1.5 M	0.111
Zinc acetate solution	Zinc concentration = 4.6 mg/ml	0.124
Cresol solution in water	3% v/v	0.159
pH 7.2 Protamine solution in 25 mM HEPES buffered saline	Protamine concentration = 12.5 mg/ml	4 x 0.194 aliquots

The four hour IP glucose injection (4 g/kg) experiments were performed by dosing 15 U/kg (body weight in grams/1.87 = microliters of injection volume) of each of the conjugates described above. As shown in Figure 40a-e, all conjugates exhibited a protracted absorption profile with some element of increase in measured serum insulin concentration following the 4 hour glucose injection. It appears that there was some significant conjugate absorption in the first four hours after injection of the long acting TSPE-AETM-3 conjugate **I-11**. However, all other conjugates exhibited flat absorption profiles like the ones observed for TSAT-C6-AETM-2 conjugates. These results correlate well with the fact that the half-lives of these conjugates are all less than unmodified insulin as described in Examples 47-48 and that each of them demonstrates an a-MM-induced increase in PK/PD profile as described in Examples 45-46.

Example 59 – Performance of long acting conjugates under IP a-MM testing conditions

In this example, we tested the a-MM-responsive profile of long-acting formulations of conjugates constructed from TSAT-C6-AETM-2 (**I-6**) and TSAT-C6-GA-2 (**I-5**) conjugates. Both conjugates were prepared according to the general methods described in Example 20. In addition, the following long-acting formulation was used for each conjugate:

Component	Variable	Volume (ml)
Conjugate solution at 2.7 mg/ml	unmodified insulin = 16.7%	1.000
250 mM HEPES buffered saline	NaCl concentration = 1.5 M	0.111
Zinc acetate solution	Zinc concentration = 4.6 mg/ml	0.124
Cresol solution in water	3% v/v	0.159
pH 7.2 Protamine solution in 25 mM HEPES buffered saline	Protamine concentration = 12.5 mg/ml	4 x 0.194 aliquots

To test the sustained release nature of the formulations as well as the a-MM-responsive PK profile, the following experiment was conducted. The formulations were injected at 15 U/kg (body weight in grams/1.87 = microliters of injection volume) behind the neck of fasted normal non-diabetic rats (Male Sprague-Dawley, 400-500 gm, n = 3). After a 240 minute delay, an a-MM dose (4 g/kg) was injected IP. Blood samples were collected via tail vein bleeding at 0 minutes and at 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, and 300 minutes after the initial conjugate injection. Blood glucose values were measured using commercially available test strips (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). In addition, blood from each timepoint was centrifuged at 4 C to collect the serum. Serum insulin concentrations were subsequently measured with a commercially available ELISA kit (Iso-Insulin ELISA, Mercodia, Uppsala, Sweden).

As shown in Figure 41a, the peak:baseline serum concentration ratio following the IP a-MM injection for the long-acting TSAT-C6-AETM-2 (**I-6**) formulation was even higher than that observed for the same formulation when glucose is substituted for a-MM. Furthermore, the TSAT-C6-GA-2 (**I-5**) formulation (Figure 41b) did not demonstrate any increase in serum conjugate concentration following the a-MM challenge. These results correlate well with the fact that that the elimination half life of the TSAT-C6-GA-2 (**I-5**) conjugate was nearly identical

to unmodified insulin (Example 47), and that it exhibited no a-MM-induced change in PK (Example 45).

Example 60 – Long acting conjugates in diabetics and non-diabetics

In order to confirm the *in vivo* utility of the long acting TSAT-C6-AETM-2 (**I-6**) formulation, we administered it (5, 10 and 20 U/kg) to normal and STZ-induced diabetic rats (Male Sprague-Dawley, 400-500 gm, n = 6). The formulation was prepared using the following procedure:

Component	Variable	Volume (ml)
TSAT-C6-AETM-2 (**I-6**) solution at 2.7 mg/ml	unmodified insulin = 0%	1.000
250 mM HEPES buffered saline	NaCl concentration = 1.5 M	0.111
Zinc acetate solution	Zinc concentration = 4.6 mg/ml	0.124
Cresol solution in water	3% v/v	0.159
pH 7.2 Protamine solution in 25 mM HEPES buffered saline	Protamine concentration = 12.5 mg/ml	4 x 0.194 aliquots

No external IP injections of glucose were used to trigger the bioactivity of the conjugates. Instead we relied on the endogenous levels of glucose in the rats to control the PK and PD profile of the conjugate formulation. Blood samples were collected via tail vein bleeding at various time points after the initial conjugate injection. Blood glucose values were measured using commercially available test strips (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). As shown in Figure 42, no hypoglycemia was observed at early or late time points for the normal or diabetic rats. The glucose profiles observed with the diabetic rats are dramatic and demonstrate that the conjugates were activated by the higher glucose concentrations and exerted their glucose-lowering effect in a dose proportional manner over a long time period (over 8 hours at the highest dose).

The experiment was repeated using different doses (7, 14 and 28 U/kg) and a longer time period (24 hours). Results from that experiment are shown in Figure 43.

Example 61 – Conjugation with fatty acid esters to generate long acting formulations

It will be appreciated that we could have used an alternative approach to protamine zinc insulin for making a long acting form of an exemplary conjugate. In this example, we demonstrate how to convert a B1-substituted insulin conjugate into a long-acting formulation by

covalently modifying the B29-epsilon-amine group with a long chain fatty acid. As described in U.S. Patent No. 6,869,930, insulin acylation with C14-myristic acid, for example, leads to a soluble material with a flat, protracted time action profile. B1-substituted TSAT-C6-AETM-2 (**I-2**) is synthesized according to the methods in Example 12. The material may then be lyophilized into a dry powder and used as the starting material in the following procedure.

Myristic acid-NHS ester is dissolved at 60 mM in 1 ml of anhydrous DMSO followed by the addition of 400 ul (excess) of triethylamine (TEA). The solution is stirred rapidly for 10 minutes at room temperature. Conjugate **I-2** is then dissolved separately in 7.5 ml of anhydrous DMSO at a concentration of 8.1 mM. Once dissolved, the entire solution is added over the course of one minute to the myristic acid-NHS ester solution followed by room temperature mixing for an additional two hours to ensure complete reaction.

The resulting solution is then superdiluted by 10x into a 20 mM pH 5.0 HEPES buffered saline solution containing 0.150 M NaCl followed by pH adjustment with dilute HCl to a final pH of 8.0. The aqueous solution is first purified by size exclusion using an appropriate solid phase for the desired separation of conjugated and unconjugated materials. The solution passing through the column void volume is then concentrated using an appropriately sized ultrafiltration membrane to approximately 10 ml. This solution is further purified to obtain the desired product using preparative reverse phase HPLC on a Waters SymmetryPrep C18, 7 um column, 19 x 150 mm. Buffer A is deionized water containing 0.1% TFA and Buffer B is acetonitrile containing 0.1% TFA. Before purification, the column is equilibrated at 15 ml/minutes with a 80%A/20%B mobile phase using a Waters DeltraPrep 600 sytem. Approximately 5 ml of the crude solution is injected onto the column over the course of 2 minutes at a flow rate of 15 ml/minutes after which a linear gradient is employed from 80%A/20%B to 75%A/25%B over the next 5 minutes followed by a slower linear gradient from 75%A/25%B to 62%A/38%B over the next 22 minutes. The retention time of the desired peak will vary depending on the drug, framework, and ligand used. Once collected, the solution is rotovapped to remove acetonitrile and lyophilized to obtain pure conjugate whose identity may be verified by LC-MS (HT Laboratories, San Diego, CA). The protracted and saccharide-responsive PK/PD profile of the resulting conjugate may then be evaluated using the 4 hour IP glucose or a-MM conditions described in Examples 50 and 59.

Example 62 – Long-acting conjugates with insulin possessing a neutral isoelectric point

It will be appreciated that we could have used yet other alternative approaches to protamine zinc insulin for making a long acting form of the conjugate. In this example, we demonstrate how to synthesize long-acting conjugates by substituting insulin glargine

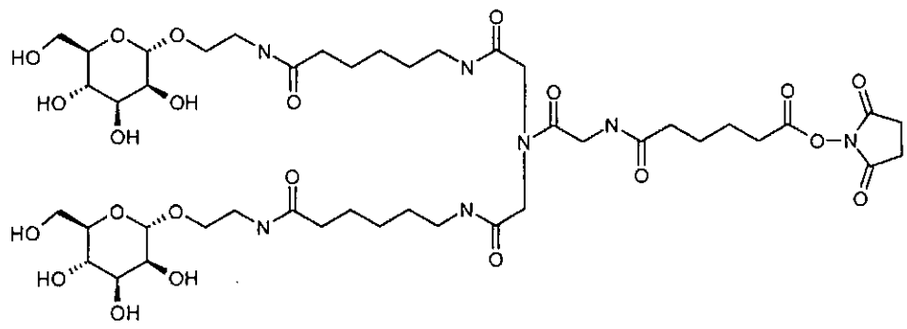
(LANTUS®), for example, instead of wild-type human insulin in preparing the conjugate. Any and all synthesis methods described in the preceding examples may be used to form insulin glargine-conjugates. Insulin glargine is an exemplary long acting insulin analog in which Asp-A21 has been replaced by glycine, and two arginines have been added to the C-terminus of the B-chain. The effect of these changes is to shift the isoelectric point, producing a solution that is completely soluble at pH 4 but insoluble at physiological pH. Once synthesized and purified, the protracted and saccharide-responsive PK/PD profile of the resulting conjugate may then be evaluated using the 4 hour IP glucose or a-MM conditions described in Examples 50 and 59.

Example 63 – Use of soluble conjugates in a pump delivery system

Instead of formulating the saccharide-responsive conjugates into long acting formulations, each may be continuously infused intravenously, subcutaneously, or intraperitoneally using a pump delivery system. The sterile solution of conjugate at a known concentration (typically 25-100 U/ml) is loaded into the pump reservoir and continuously delivered into the compartment of choice at a steady rate. This rate is adjusted to the maximal level at which no hypoglycemia is observed in the subject. Then, using the 4 hour IP glucose or a-MM conditions described in Examples 50 and 59, the glucose-responsive PK/PD profile may be evaluated. The pump method is advantageous in that no excipients are required to provide a steady input and absorption rate for the conjugates. A variety of insulin pumps have been described in the art and may be used for this purpose. For example, see any one of the pumps described in U.S. Patent Nos. 4,435,173, 4,498,843, 4,923,375, 5,062,841, 6,650,951, 6,744,350, 6,852,104, 7,377,907, and 7,515,060, and U.S. Patent Publication Nos. 20080172028, 20090005726, 20090112165, 20090137957, 20090177142, 20090177154, and 20100004598, each of which is incorporated herein by reference.

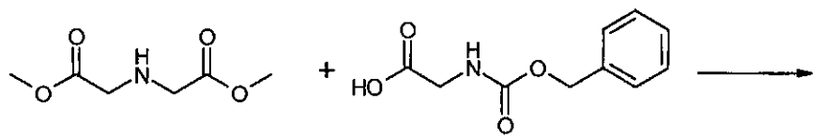
Example 64 – Synthesis of C6-Amide-AEM-2 intermediate

This example describes a synthetic process for making a ZC-AEM-2 intermediate having the following chemical structure:

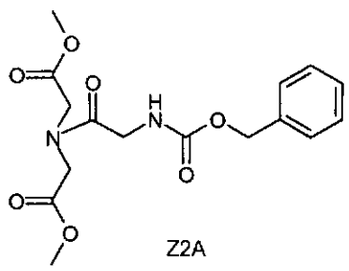


a. Intermediate Z2A

The first phase of the process involved combining reagents Z1A and Z1B to produce intermediate Z2A as shown in the following reaction scheme:



Z1A Z1B



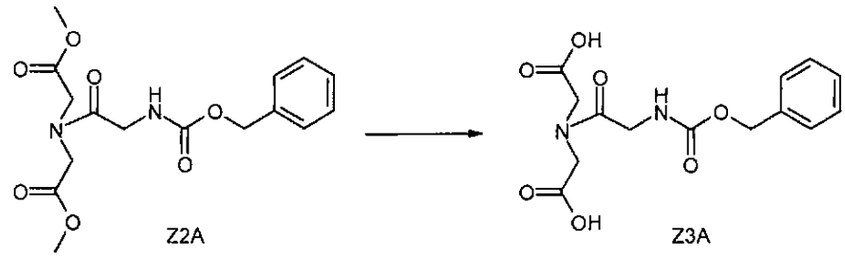
Z2A

This was achieved as follows. To a 250 mL two neck flask was added compound Z1B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 13.9 g), 1-hydroxybenzotriazole hydrate (HOBT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 11.0 g) and dimethylformamide (DMF, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at room temperature under nitrogen. The mixture was cooled to 0 C, after which time Compound Z1A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 9.5 mL) and di-isopropylcarbodiimide (DIC, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 9.8 ml) were added to the mixture under nitrogen. The reaction solution was stirred at room temperature overnight. After 36 hours of reaction, (dimethylamino)pyridine (DMAP, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 7.71 g) was added, and after 48 hours the reaction mixture was filtered with a Buchner funnel. The filtrate was kept at 4 C overnight and worked up the following day.

The filtrate was evaporated, and the resulting residue was taken up in 120 mL of ethyl acetate and washed successively with 10% aqueous HCl solution (3 x 30 mL), saturated aqueous $NaHCO_3$ solution (3 x 30 mL), brine (3 x 20 mL), and dried over anhydrous sodium sulfate. The solution was concentrated to dryness in vacuo to yield the product which could be used without further purification.

b. Intermediate Z3A

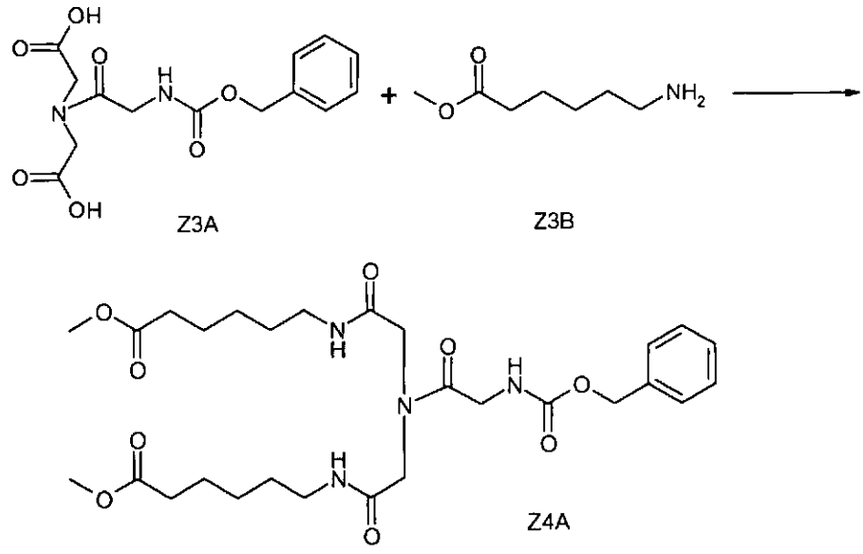
The second phase of the process involved converting intermediate Z2A to intermediate Z3A as shown in the following reaction scheme:



Compound Z2A (16.0 g) was dissolved in methanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 85 mL), and the solution was cooled to 0 C. A 10% aqueous solution of sodium hydroxide (19 mL) was added dropwise and the reaction was stirred at 0 C for 3 hours. Afterwards, the suspension was dissolved with a minimum amount of water (15 mL). To this solution was added Amberlite IR-120 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, H+ form), in 15 x 2 g aliquots at 0 C. The bead suspension was stirred for 0.5 hr, resulting in a solution pH of ~ 5. The resulting mixture was filtered to remove the Amberlite beads, and the filtrate concentrated and dried in vacuo to yield a white-red solid, 13.0 g yield.

c. Intermediate Z4A

The third phase of the process involved combining intermediate Z3A with reagent Z3B to produce intermediate Z4A as shown in the following reaction scheme:



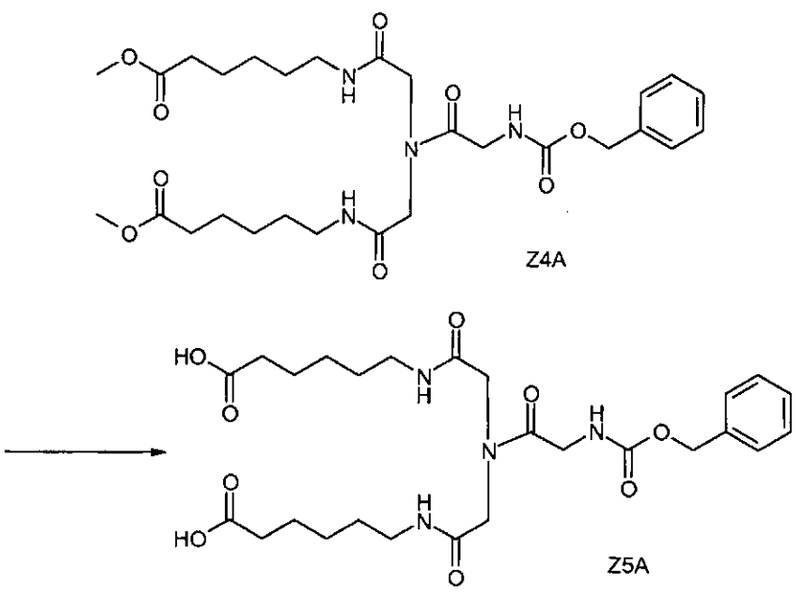
Compound Z3B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 19.0 g) was dissolved in DMF (50 mL). The suspension was cooled to 0 C, after which time triethylamine (15.0 mL) was added to the solution. The temperature of the solution was maintained at 0°C for 0.75 hours. Next, the solution was charged with a solution of Compound Z3A (13.0 g) dissolved in DMF (24 mL) at 0 C, followed by HOBT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 15.9 g), DMF (50 mL), and DIC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 15.0 mL). The resulting solution was stirred for an additional hour at 0 C and then allowed to warm to room temperature and react overnight for an additional 18 hours.

Next the reaction was recooled to 0 C, and N,N-diisopropylethylamine (DIPEA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 15 mL) was added and the resulting solution stirred for 0.5 hr until the pH of the solution was approximately 9.0. Anhydrous methylene chloride (25 mL) and DIC (3.5 mL) were added and stirring was continued for another 10 hours. More compound Z3B was added (free base, 2.5 g) and the reaction was allowed to proceed for an additional 50 hours at room temperature under a nitrogen atmosphere.

Finally, the reaction mixture was filtered, and the filtrate concentrated via rotary evaporation. The residue was dissolved in methylene chloride (CH_2Cl_2, 400 mL), and the organic phase washed with a 5% HCl solution (3 x 200 mL). The organic layer was cooled to 0°C and neutralized with a saturated sodium bicarbonate solution (3 x 100 mL) and brine (2 x 200 mL). The organic solution was dried over magnesium sulfate, which was then separated by filtration and concentrated using rotary evaporation. The residue was purified by column chromatography on silica gel (eluent phase: methylene chloride/methanol 50:1 to 5:1). Column fractions were concentrated and dried in vacuo overnight. A white solid was obtained as Z4A (18.9g, yield 81%).

d. Intermediate Z5A

The fourth phase of the process involved converting intermediate Z4A to intermediate Z5A as shown in the following reaction scheme:



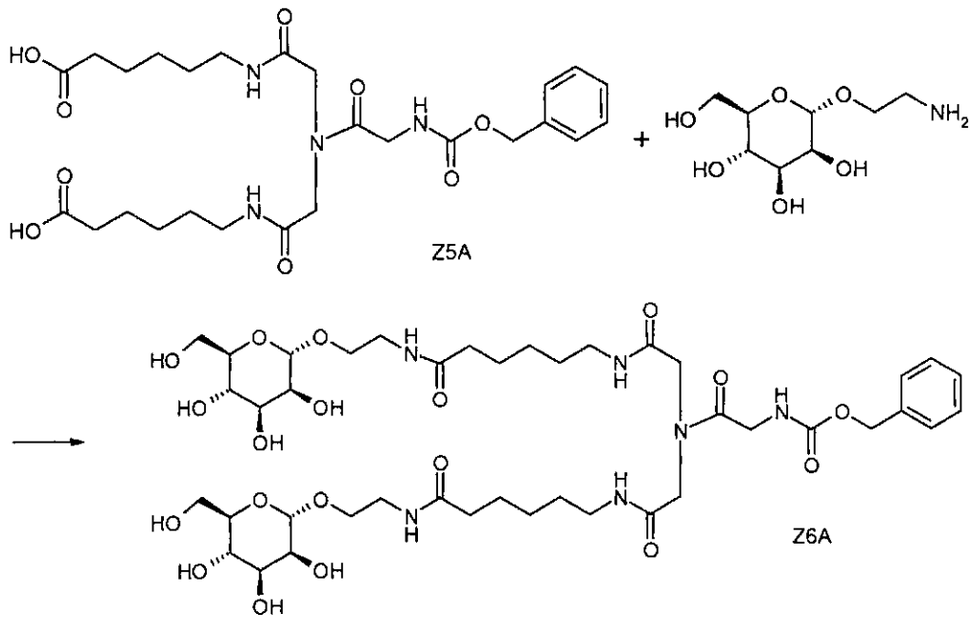
Ester Z4A (2.27 g) was dissolved in methanol (10 mL), and to this solution 5.0 mL of 1.0M sodium hydroxide solution was added at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 38 hours. At the end of this time, an additional 1.5 mL of 2.0M aqueous

sodium hydroxide solution was added, and the mixture was stirred at room temperature for another 14 hours.

Next, the reaction mixture was acidified with a 10% aqueous solution of HCl at 0°C. The product was extracted with ethyl acetate (3 x 25 mL). The combined organic layers were dried over magnesium sulfate, and then concentrated to dryness in vacuo overnight to yield Z5A as a white solid (2.2 g).

e. Intermediate Z6A

The fifth phase of the process involved combining intermediate Z5A with aminoethylmannose (AEM) to produce intermediate Z6A as shown in the following reaction scheme:

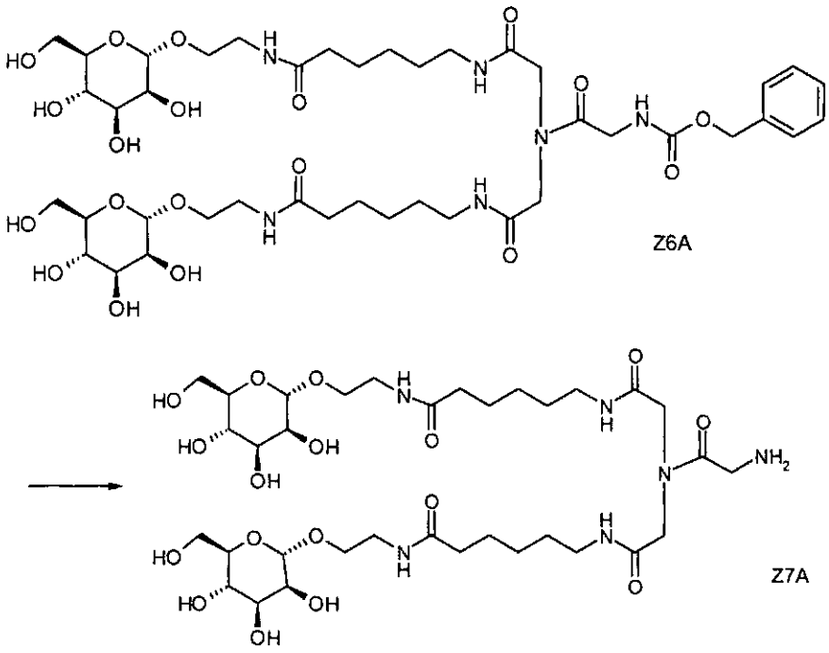


Diacid compound Z5A (2.0 g), aminoethylmannose (1.46 g), O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium hexafluorophosphate (HATU, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 2.7 g) were dissolved in dry DMF (80 mL) under nitrogen at 0°C. DIPEA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 3.0 mL) was added dropwise to the mixture at 0°C under a nitrogen atmosphere. The mixture was stirred for 1 hr at 0°C and then an additional 4 hr at room temperature. At this point, another aliquot of aminoethylmannose (0.5 g) and HATU (0.52 g) was added to the reaction solution at room temperature, and the solution was stirred for another 3 hours. The mixture was concentrated via rotary evaporation and the residue was purified by column chromatography on silica gel (methylene chloride/methanol 20:1, then 6:1 eluting to 1:1). Fractions were collected and evaporated in vacuo to yield purified product (TLC: upper spot, Rf 0.6, methylene chloride:methanol 1:3).

It will be appreciated that this entire process can be repeated to obtain conjugates with different ligands by replacing AEM with another amine containing reagent (e.g., without limitation AEG, AEBM, AETM, etc.) when converting intermediate Z5A to intermediate Z6A.

f. Intermediate Z7A

The sixth phase of the process involved converting intermediate Z6A to intermediate Z7A as shown in the following reaction scheme:

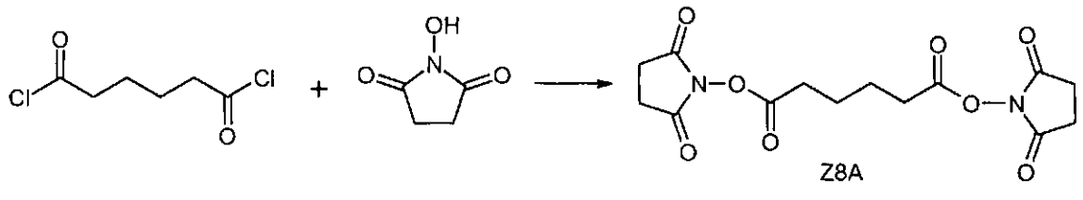


Compound Z6A (1.43 g) was dissolved in anhydrous methanol (100 mL). To this solution was added (1.00g palladium on carbon (Pd/C)), and hydrogen gas was bubbled into the solution to reduce the protecting group to give the corresponding amine. It was found that the reaction had reached complete conversion after approximately 9 hours of reaction.

The reaction mixture was filtered through a pad of Celite, and the filtrate was concentrated and dried in vacuo. Compound Z7A was obtained as a brown solid (1.16g, yield 94%).

g. Intermediate Z8A

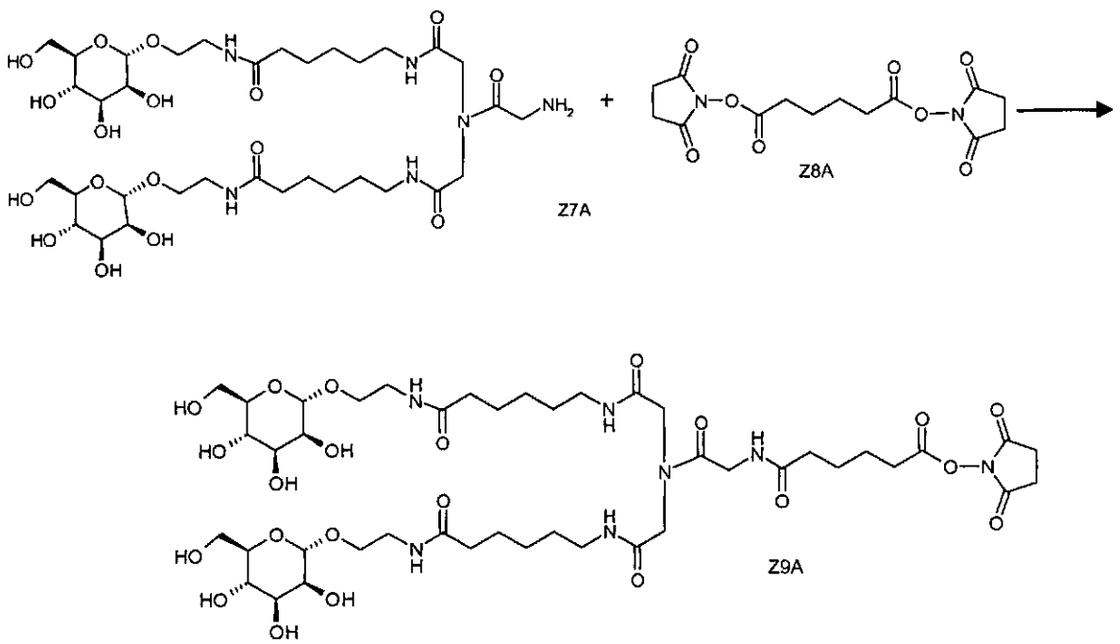
The following scheme shows how the coupling agent Z8A was prepared:



To a cooled solution of N-hydroxysuccinimide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, NHS, 7.0 g) in dry CH_2Cl_2 (65 mL) at 0 C was added triethylamine (9.5 mL) and adipoyl chloride (3.97 mL, 5.0 g). The resulting mixture was stirred for 2 hr at 0 C. The mixture was washed with a saturated aqueous solution of NaCl (3 x 30 mL) and dried over magnesium sulfate. The solution was filtered and concentrated in vacuo, and then the residue purified via silica gel chromatography to obtain a white solid (6.6 g) as product Z8A.

h. Intermediate Z9A

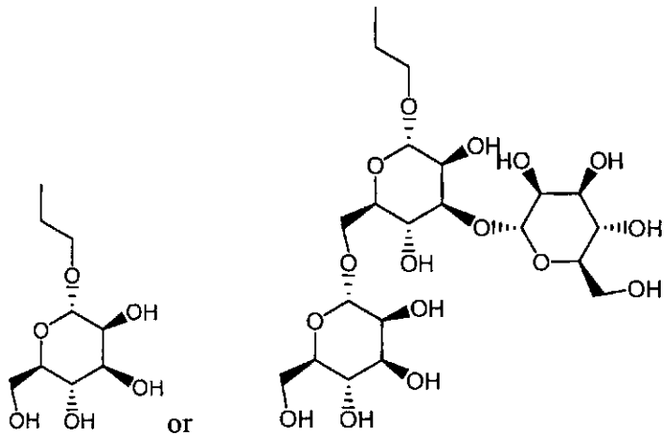
The following scheme shows how the coupling agent Z8A was combined with intermediate Z7A to produce intermediate Z9A:



Compound Z7A (0.256 g) was dissolved in dry DMF, and the solution was cooled to 0 C. To this solution was added a solution of Z8A (0.710 g) in anhydrous DMF (15 mL) under a nitrogen atmosphere. The mixture was stirred at 0 C for 2 hours.

The solution volume was concentrated to one third and filtered off excess unreacted DSS. The filtrate was further concentrated to approximately 3 mL of column and purified by silica gel chromatography (eluent: methylene chloride/methanol 20:1 to 4:1, then 3:1 to 1:1). Collected fractions were concentrated and dried in vacuo to give 151 mg of purified product. ^{1}H NMR (300MHz, DMSO) δ 1.28-1.63 (band, 20H), 2.07-2.22 (band, 6H), 2.85 (s, 4H), 3.08-3.64 (band, 22H), 3.91 (s, 4H), 4.08 (s, 2H), 4.49 (s, 2H), 4.57(d, 2H, J=5.70 Hz), 4.64 (s, 2H), 4.73 (t, 4H, J= 5.10 Hz), 7.85 (s, 2H, amide NH), 8.68, 8.19, 7.98 (s, 3H, amide NH). LC-MS (Found 1074.67 [M + Na+], M = 1051.57 Da; Calculated 1052.08 Da).

each occurrence of -X is



In certain embodiments, the insulin molecule is selected from the group consisting of human insulin, porcine insulin, and bovine insulin. In certain embodiments, the insulin molecule is insulin glargine or insulin detemir. In certain embodiments, the insulin molecule includes three disulfide bridges.

Example 71 – Exemplary conjugate I-6

In certain embodiments the present disclosure provides conjugate **I-6**:

2 minutes at a flow rate of 15 ml/minutes after which a linear gradient is employed from 80%A/20%B to 75%A/25%B over the next 5 minutes followed by a slower linear gradient from 75%A/25%B to 62%A/38%B over the next 22 minutes. The retention time of the desired peak will vary depending on the insulin, framework, and ligand used. Once collected, the solution is rotovapped to remove acetonitrile and lyophilized to obtain pure mono-protected insulin-conjugate.

Step 4

In all cases the protecting group is then removed from the insulin-conjugate. In cases where a BOC protecting group is used in Step 1, the BOC groups are removed by dissolving the lyophilized powder obtained according to Step 3 in 90% TFA/10% anisole for one hour at 4 C followed by 10x superdilution in 25 mM HEPES pH 8.2 buffer containing 0.150M NaCl. (If a protecting group other than BOC is present on the amine-bearing drug, then the appropriate deprotection conditions are employed instead of TFA/anisole. A listing of protection agents and deprotection conditions may be found in *Protecting Groups in Organic Synthesis*, T. W. Greene and P. G. M. Wuts, 3rd edition, John Wiley & Sons, 1999, as described in the Definitions section.) The pH was adjusted to between 7.0 and 8.0 using NaOH solution after which the material is passed through a Biogel P2 column to remove anisole, BOC and other low MW byproducts of deprotection, as well as any other contaminating salts. The deprotected, purified aqueous conjugate solution was then concentrated using Amicon 3K membranes (Millipore, Billerica, MA) to approximately 66 U of insulin/ml (based on A280 measurements) and stored at 4 C until needed. The identity of the final conjugate is verified by LC-MS (HT Laboratories, San Diego, CA). The A1 site of conjugation is confirmed by N-terminal sequencing (Western Analytical, St. Louis, MO), which reveals > 95% of the Phe-B1-chain terminus present and < 5% of the Gly^{A1}-chain terminus present due to the substitution of Gly^{A1} with the ligand-containing framework.

One of ordinary skill in the art will appreciate that other amine-functionalized drugs can be conjugated to ligand-containing frameworks using analogous procedures to that described in Example 75. One of ordinary skill in the art will also appreciate that Example 75 is relevant not only to wild-type insulin, but also to insulin mutants as described herein.

The following insulin-conjugates were prepared according to the procedure in Example 75 using BOC-NHS as the protecting reagent.

Conjugate	Framework	Framework MW	Ligand	AE-sugar MW	Purity (HPLC)	MW (LC-MS)	Sugar/ Insulin
I-13: TSAT-C6-AEM-2 (A1)	TSAT-C6	822	AEM	223	97%	6730	2.0
I-12: TSAT-C6-AETM-2 (A1)	TSAT-C6	822	AETM	547	97%	7378	2.0
I-15: TSPE-AEM-3 (A1)	TSPE	813	AEM	223	98%	6829	3.0
I-14: TSPE-AETM-3 (A1)	TSPE	813	AETM	547	94%	7802	3.0

The following insulin-conjugates can be prepared according to the procedure in Example 75. In some embodiments, the insulin-conjugates are prepared using BOC-NHS as the protecting reagent.

Conjugate	Framework	Framework MW	Ligand	AE-sugar MW	MW (LC-MS) (expected)	Sugar/ Insulin (expected)
DSS-AEM-1 (A1)	DSS	368	AEM	223	6169	1.0
DSS-AEBM-1 (A1)	DSS	368	AEBM	385	6331	1.0
DSS-AETM-1 (A1)	DSS	368	AETM	547	6493	1.0
TSAT-C6-AEBM-2 (A1)	TSAT-C6	822	AEBM	385	7054	2.0
TSPE-AEBM-3 (A1)	TSPE	813	AEBM	385	7314	3.0

Example 76 – Insulin conjugation with multivalent activated esters in organic solvent (drug added first) to give A1,B29-substituted insulin conjugates – General procedure

Step 1

A framework containing N-terminal activated esters is dissolved at 147 mM in 2.5 ml of anhydrous DMSO followed by the addition of 1.0 mL (excess) of triethylamine (TEA). The solution is stirred rapidly for 10 minutes at room temperature. In another vial, a 272 mM solution of ligand is prepared in an appropriate volume of dry DMSO. Once dissolved, enough solution is added to provide a number of reactive equivalents equal to three times the number of initial activated ester groups, N, minus one. For example, if there are N=3 initial activated ester groups per framework, then (3x(3-1)x60mM/370 mM)=0.973 ml of ligand solution are added. If there are N=4 initial activated ester groups per framework, then (3x(4-1)x60mM/370 mM)=1.46 ml of ligand solution are added, and so on. After the ligand solution is added, the solution is stirred for one more hour at room temperature to ensure complete reaction.

Step 2

Insulin is dissolved in 1.5 mL of 100 mM sodium carbonate buffer (pH 11) at a concentration of 17.2 mM. Solution pH is maintained at ~11 by addition of 0.1 M NaOH as needed. Once the insulin is dissolved, small aliquots of the framework-ligand solution are added to the insulin solution. The pH is monitored throughout the process and is maintained between 10.2-11.0 through the addition of 0.1M sodium hydroxide. The reaction is monitored by reverse-phase HPLC. Aliquots of framework-ligand solution are added until the HPLC chromatogram shows that substantially all of the unmodified insulin has been reacted and that a substantial portion of the reaction mixture has been converted to a small portion of mono-reacted insulin/framework/ligand conjugate and the majority product is di-reacted insulin/framework/ligand conjugate. Typically the framework-ligand construct will be more hydrophilic than the unmodified insulin, causing the mono and di-reacted amine-bearing drug products to elute at HPLC retention times shorter than that of the unmodified insulin. Likewise, the HPLC peak of the desired product, the disubstituted insulin-conjugate, will appear at a retention time that is shorter than that of the mono-substituted insulin-conjugate.

Step 3

Once the insulin has been sufficiently reacted with framework ligand as described in Step 2, the solution is then superdiluted by 10x into a 20 mM pH 5.0 HEPES buffered saline solution containing 0.150 M NaCl followed by pH adjustment with dilute HCl to a final pH of 8.0. The aqueous solution is first purified by size exclusion using an appropriate solid phase for the desired separation of conjugated and unconjugated materials. The solution passing through the column void volume is then concentrated using an appropriately sized ultrafiltration membrane to approximately 10 ml. This solution is further purified to obtain the desired product using preparative reverse phase HPLC on a Waters C8, 7 um, 19 x 150 mm column. Buffer A is deionized water containing 0.1% TFA and Buffer B is acetonitrile containing 0.1% TFA. Before purification, the column is equilibrated at 15 ml/minutes with a 80%A/20%B mobile phase using a Waters DeltraPrep 600 sytem. Approximately 5 ml of the crude solution is injected onto the column over the course of 2 minutes at a flow rate of 15 ml/minutes after which a linear gradient is employed from 80%A/20%B to 75%A/25%B over the next 5 minutes followed by a slower linear gradient from 75%A/25%B to 62%A/38%B over the next 22 minutes. The retention time of the desired peak will vary depending on the insulin, framework, and ligand used. Once collected, the solution is rotovapped to remove acetonitrile and lyophilized to obtain pure conjugate. The identity of the final conjugate is verified by LC-MS (HT Laboratories, San Diego, CA). The A1, B29 sites of conjugation are confirmed by N-terminal sequencing

(Western Analytical, St. Louis, MO), which reveals > 95% of the Phe-B1-chain terminus present and < 5% of the Gly^{A1}-chain terminus present due to the substitution of Gly^{A1} with the ligand-containing framework.

One of ordinary skill in the art will appreciate that other amine-functionalized drugs can be conjugated to ligand-containing frameworks using analogous procedures to that described in Example 76. One of ordinary skill in the art will also appreciate that Example 76 is relevant not only to wild-type insulin, but also to insulin mutants as described herein.

The following insulin-conjugates were prepared according to the procedure in Example 76.

Conjugate	Frame-work	Frame-work MW	Ligand	AE-sugar MW	Purity (HPLC)	MW (LC-MS)	Sugar/ Insulin
II-4: DSS-Di-sub-AEM-1 (A1, B29)	DSS	368	AEM	223	92%	6531	2.0
II-3: DSS-Di-sub-AETM-1 (A1, B29)	DSS	368	AETM	547	94%	7179	2.0
II-1: TSAT-C6-Di-sub-AEM-2 (A1, B29)	TSAT-C6	822	AEM	223	97%	7653	4.0
II-2: TSAT-C6-Di-sub-AETM-2 (A1, B29)	TSAT-C6	822	AETM	547	97%	8949	4.0

The following insulin-conjugates can be prepared according to the procedure in Example 76.

Conjugate	Frame-work	Framework MW	Ligand	AE-sugar MW	MW (LC-MS)	Sugar/ Insulin
DSS-Di-sub-AEBM-1 (A1, B29)	DSS	368	AEBM	385	6855	2.0
TSAT-C6-Di-sub-AEBM-2 (A1, B29)	TSAT-C6	822	AEBM	385	8301	4.0
TSPE-Di-sub-AEM-3 (A1, B29)	TSPE	813	AEM	223	7852	6.0
TSPE-Di-sub-AEBM-3 (A1, B29)	TSPE	813	AEBM	385	8824	6.0
TSPE-Di-sub-AETM-3 (A1, B29)	TSPE	813	AETM	547	9796	6.0

Example 77 – Insulin conjugation with multivalent activated esters in organic solvent (drug added first) to give A1,B1-substituted insulin conjugates

Step 1

A framework containing N-terminal activated esters is dissolved at 147 mM in 2.5 ml of anhydrous DMSO followed by the addition of 1.0 mL (excess) of triethylamine (TEA). The solution is stirred rapidly for 10 minutes at room temperature. In another vial, a 272 mM solution of ligand is prepared in an appropriate volume of dry DMSO. Once dissolved, enough solution is added to provide a number of reactive equivalents equal to three times the number of initial activated ester groups, N, minus one. For example, if there are N=3 initial activated ester groups per framework, then (3x(3-1)x60mM/370 mM)=0.973 ml of ligand solution are added. If there are N=4 initial activated ester groups per framework, then (3x(4-1)x60mM/370 mM)=1.46 ml of ligand solution are added, and so on. After the ligand solution is added, the solution is stirred for one more hour at room temperature to ensure complete reaction.

Step 2

An insulin containing three reactive amine groups each with a distinguishable pKa (e.g., in the case of wild-type insulin, pKa Gly^{A1} = 8.0, Phe^{B1} = 6.7, Lys^{cB29} = 11.2; see Mei et al., *Pharm. Res.* 16:1680-1686, 1999) that has been previously mono-protected at the highest pKa amine group (e.g., Lys^{B29}) with a monofunctional protecting group-activated ester (e.g., BOC-NHS) is dissolved in 1.5 mL of DMSO at a concentration of 17.2 mM. Once the B29-BOC-insulin is dissolved, small aliquots of the framework-ligand solution are added to the B29-BOC-insulin solution. The reaction is monitored by reverse-phase HPLC. Aliquots of framework-ligand solution are added until the HPLC chromatogram shows that substantially all of the B29-BOC-insulin has been reacted and that a substantial portion of the reaction mixture has been converted to a small portion of mono-reacted B29-BOC-insulin/framework/ligand conjugate and the majority product is di-reacted B29-BOC-insulin/framework/ligand conjugate. Typically the framework-ligand construct will be more hydrophilic than the B29-BOC-insulin, causing the mono-conjugated and di-conjugated B29-BOC-insulin-conjugates to elute at HPLC retention times shorter than that of the unmodified B29-BOC-insulin. Likewise, the HPLC peak for the desired product, the disubstituted B29-BOC-insulin-conjugate, will appear at a retention time that is shorter than that of the mono-substituted B29-BOC-insulin-conjugate.

Step 3

Once the B29-BOC-insulin has been sufficiently reacted with ligand-containing framework as described in Step 2, the solution is then superdiluted by 10x into a 20 mM pH 5.0 HEPES buffered saline solution containing 0.150 M NaCl followed by pH adjustment with dilute HCl to a final pH of 8.0. The aqueous solution is first purified by size exclusion using an

appropriate solid phase for the desired separation of conjugated and unconjugated materials. The solution passing through the column void volume is then concentrated using an appropriately sized ultrafiltration membrane to approximately 10 ml. This solution is further purified to obtain the desired product using preparative reverse phase HPLC on a Waters C8, 7 um, 19 x 150 mm column. Buffer A is deionized water containing 0.1% TFA and Buffer B is acetonitrile containing 0.1% TFA. Before purification, the column is equilibrated at 15 ml/minutes with a 80%A/20%B mobile phase using a Waters DeltraPrep 600 sytem. Approximately 5 ml of the crude solution is injected onto the column over the course of 2 minutes at a flow rate of 15 ml/minutes after which a linear gradient is employed from 80%A/20%B to 75%A/25%B over the next 5 minutes followed by a slower linear gradient from 75%A/25%B to 62%A/38%B over the next 22 minutes. The retention time of the desired peak will vary depending on the insulin, framework, and ligand used. Once collected, the solution is rotovapped to remove acetonitrile and lyophilized to obtain pure conjugate.

Step 4

In all cases the protecting group is then removed from the conjugate. In cases where a BOC protecting group is used in Step 1, the BOC groups are removed by dissolving the lyophilized powder obtained according to Step 3 in 90% TFA/10% anisole for one hour at 4 C followed by 10x superdilution in 25 mM HEPES pH 8.2 buffer containing 0.150M NaCl. (If a protecting group other than BOC is present on the amine-bearing drug, then the appropriate deprotection conditions are employed instead of TFA/anisole. A listing of protection agents and deprotection conditions may be found in *Protecting Groups in Organic Synthesis*, T. W. Greene and P. G. M. Wuts, 3rd edition, John Wiley & Sons, 1999, as described in the Definitions section.) The pH was adjusted to between 7.0 and 8.0 using NaOH solution after which the material is passed through a Biogel P2 column to remove anisole, BOC and other low MW byproducts of deprotection, as well as any other contaminating salts. The deprotected, purified aqueous conjugate solution was then concentrated using Amicon 3K membranes (Millipore, Billerica, MA) to approximately 66 U of insulin/ml (based on A280 measurements) and stored at 4 C until needed. The identity of the final conjugate is verified by LC-MS (HT Laboratories, San Diego, CA). The A1, B1 sites of conjugation are confirmed by N-terminal sequencing (Western Analytical, St. Louis, MO), which reveals essentially no Phe-B1-chain terminus present and no Gly-A1-chain terminus present due to the substitution at both termini with the ligand-containing framework.

One of ordinary skill in the art will appreciate that other amine-functionalized drugs can be conjugated to ligand-containing frameworks using analogous procedures to that described in

Example 77. One of ordinary skill in the art will also appreciate that Example 77 is relevant not only to wild-type insulin, but also to insulin mutants as described herein.

Conjugate **II-5** was prepared according to the procedure in Example 77 using BOC-NHS as the protecting reagent.

Conjugate	Frame-work	Frame-work MW	Ligand	AE-sugar MW	Purity (HPLC)	MW (LC-MS)	Sugar/ Insulin
II-5: TSAT-C6-Di-sub-AETM-2 (A1, B1)	TSAT-C6	822	AETM	547	97%	8949	4.0

The following insulin-conjugates can be prepared according to the procedure in Example 77.

Identity	Frame-work	Framework MW	Ligand	AE-sugar MW	MW (LC-MS) (expected)	Sugar/ Insulin (expected)
DSS-Di-sub-AEM-1 (A1, B1)	DSS	368	AEM	223	6531	2.0
DSS-Di-sub-AEBM-1 (A1, B1)	DSS	368	AEBM	385	6855	2.0
DSS-Di-sub-AETM-1 (A1, B1)	DSS	368	AETM	547	7179	2.0
TSAT-C6-Di-sub-AEM-2 (A1, B1)	TSAT-C6	822	AEM	223	7653	4.0
TSAT-C6-Di-sub-AEBM-2 (A1, B1)	TSAT-C6	822	AEBM	385	8301	4.0
TSAT-C6-Di-sub-AETM-2 (A1, B1)	TSAT-C6	822	AETM	547	8949	4.0
TSPE-Di-sub-AEM-3 (A1, B1)	TSPE	813	AEM	223	7852	6.0
TSPE-Di-sub-AEBM-3 (A1, B1)	TSPE	813	AEBM	385	8824	6.0
TSPE-Di-sub-AETM-3 (A1, B1)	TSPE	813	AETM	547	9796	6.0

Example 78 – Insulin conjugation with multivalent activated esters in organic solvent (drug added first) to give B1,B29-substituted insulin conjugates

Step 1

A framework containing N-terminal activated esters is dissolved at 147 mM in 2.5 ml of anhydrous DMSO. No base is added, in contrast with previous examples. The solution is stirred rapidly for 10 minutes at room temperature. In another vial, a 272 mM solution of ligand is

prepared in an appropriate volume of dry DMSO. Once dissolved, enough solution is added to provide a number of reactive equivalents equal to three times the number of initial activated ester groups, N, minus one. For example, if there are N=3 initial activated ester groups per framework, then (3x(3-1)x60mM/370 mM)=0.973 ml of ligand solution are added. If there are N=4 initial activated ester groups per framework, then (3x(4-1)x60mM/370 mM)=1.46 ml of ligand solution are added, and so on. After the ligand solution is added, the solution is stirred for one more hour at room temperature to ensure complete reaction.

Step 2

An insulin containing three reactive amine groups each with a distinguishable pKa (e.g., in the case of wild-type insulin, pKa Gly^{A1} = 8.0, Phe^{B1} = 6.7, $Lys^{\varepsilon B29}$ = 11.2; see Mei et al., *Pharm. Res.* 16:1680-1686, 1999) that has been previously mono-protected at the amine group with the intermediate pKa (e.g., Gly^{A1} for wild-type insulin) with a monofunctional protecting group-activated ester (e.g., BOC-NHS) is dissolved in 1.5 mL of DMSO at a concentration of 17.2 mM. (A1-BOC-insulin can be prepared using the procedure in Example 8 but reacting with fewer equivalents of the BOC reagent in order to yield a distribution of A1,B29-diBOC-insulin, A1-BOC-insulin, and B29-BOC-insulin products. A1-BOC-insulin can be isolated by RP-HPLC and confirmed by N-terminal sequencing.) Once the A1-BOC-insulin is dissolved, small aliquots of the framework-ligand solution are added to the A1-BOC-insulin solution. The reaction is monitored by reverse-phase HPLC. Aliquots of framework-ligand solution are added until the HPLC chromatogram shows that substantially all of the unmodified A1-BOC-insulin has been reacted and that a substantial portion of the reaction mixture has been converted to a small portion of mono-conjugated A1-BOC-insulin/framework/ligand conjugate and the majority product is di-conjugated A1-BOC-insulin/framework/ligand conjugate. Typically the framework-ligand construct will be more hydrophilic than the A1-BOC-insulin, causing the mono and di-substituted A1-BOC-insulin-conjugates to elute at HPLC retention times shorter than that of the unmodified A1-BOC-insulin. Likewise, the HPLC peak of the desired product, the di-substituted A1-BOC-insulin-conjugate, will appear at a retention time that is shorter than that of the mono-substituted A1-BOC-insulin-conjugate.

Step 3

Once the A1-BOC-insulin has been sufficiently reacted with framework ligand as described in Step 2, the solution is then superdiluted by 10x into a 20 mM pH 5.0 HEPES buffered saline solution containing 0.150 M NaCl followed by pH adjustment with dilute HCl to a final pH of 8.0. The aqueous solution is first purified by size exclusion using an appropriate solid phase for the desired separation of conjugated and unconjugated materials. The solution passing through the column void volume is then concentrated using an appropriately sized

ultrafiltration membrane to approximately 10 ml. This solution is further purified to obtain the desired product using preparative reverse phase HPLC on a Waters C8, 7 um, 19 x 150 mm column. Buffer A is deionized water containing 0.1% TFA and Buffer B is acetonitrile containing 0.1% TFA. Before purification, the column is equilibrated at 15 ml/minutes with a 80%A/20%B mobile phase using a Waters DeltraPrep 600 sytem. Approximately 5 ml of the crude solution is injected onto the column over the course of 2 minutes at a flow rate of 15 ml/minutes after which a linear gradient is employed from 80%A/20%B to 75%A/25%B over the next 5 minutes followed by a slower linear gradient from 75%A/25%B to 62%A/38%B over the next 22 minutes. The retention time of the desired peak will vary depending on the drug, framework, and ligand used. Once collected, the solution is rotovapped to remove acetonitrile and lyophilized to obtain pure conjugate.

Step 4

In all cases the protecting group is then removed from the conjugate. In cases where a BOC protecting group is used in Step 1, the BOC groups are removed by dissolving the lyophilized powder obtained according to Step 3 in 90% TFA/10% anisole for one hour at 4 C. If a protecting group other than BOC is present on the amine-bearing drug, then the appropriate deprotection conditions are employed instead of TFA/anisole. A listing of protection agents and deprotection conditions may be found in *Protecting Groups in Organic Synthesis*, T. W. Greene and P. G. M. Wuts, 3rd edition, John Wiley & Sons, 1999, as described in the Definitions section. The deprotection step is followed by 10x superdilution in 25 mM HEPES pH 8.2 buffer containing 0.150M NaCl. The pH is adjusted to between 7.0 and 8.0 using NaOH solution after which the material is passed through a Biogel P2 column to remove anisole, BOC and other low MW byproducts of deprotection, as well as any other contaminating salts. The deprotected, purified aqueous conjugate solution is then concentrated using Amicon 3K membranes (Millipore, Billerica, MA) to approximately 66 U of insulin/ml (based on A280 measurements) and stored at 4 C until needed. The identity of the final conjugate is verified by LC-MS (HT Laboratories, San Diego, CA). The B1 site of conjugation is confirmed by N-terminal sequencing (Western Analytical, St. Louis, MO), which reveals > 95% of the Gly-A1-chain terminus present and < 5% of the Phe-B1-chain terminus present due to the substitution of Phe-B1 with the ligand-containing framework.

One of ordinary skill in the art will appreciate that other amine-functionalized drugs can be conjugated to ligand-containing frameworks using analogous procedures to that described in Example 78. One of ordinary skill in the art will also appreciate that Example 78 is relevant not only to wild-type insulin, but also to insulin mutants as described herein.

The following insulin-conjugates can be prepared according to the procedure in Example 78.

Conjugate	Frame-work	Frame-work MW	Ligand	AE-sugar MW	MW (LC-MS) (expected)	Sugar/ Insulin (expected)
II-7: DSS-Di-sub-AETM-1 (B1, B29)	DSS	368	AETM	547	7179	2.0
II-6: TSAT-C6-Di-sub-AETM-2 (B1, B29)	TSAT-C6	822	AETM	547	8949	4.0
DSS-Di-sub-AEM-1 (B1, B29)	DSS	368	AEM	223	6531	2.0
DSS-Di-sub-AEBM-1 (B1, B29)	DSS	368	AEBM	385	6855	2.0
TSAT-C6-Di-sub-AEM-2 (B1, B29)	TSAT-C6	822	AEM	223	7653	4.0
TSAT-C6-Di-sub-AEBM-2 (B1, B29)	TSAT-C6	822	AEBM	385	8301	4.0
TSPE-Di-sub-AEM-3 (B1, B29)	TSPE	813	AEM	223	7852	6.0
TSPE-Di-sub-AEBM-3 (B1, B29)	TSPE	813	AEBM	385	8824	6.0
TSPE-Di-sub-AETM-3 (B1, B29)	TSPE	813	AETM	547	9796	6.0

Example 79 – In vivo half life/elimination rate comparison

In order to determine the rate at which the **I-6** conjugate was cleared from serum *in vivo* in the presence or absence of inhibitory sugars such as glucose or a-MM, the following experiment was conducted. In each case the soluble conjugate (or RHI as a control) was dosed at 0.4 mg conjugate/kg body weight into dual jugular vein cannulated male Sprague-Dawley rats (Taconic, JV/JV, 350-400g, n=3).

To determine the elimination rate in the presence of elevated glucose levels, one hour before the start of the experiment one rat cannula was connected to a syringe infusion pump containing a sterile 50% w/v glucose solution. The pump infusion rate was adjusted by the experimenter to ensure that the blood glucose levels in the animal remained above 300 mg/dL at all times during the experiment. Blood glucose was measured using commercially available test strips (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). In a typical experiment, it was found that the infusion pump rate required to keep the animals above 300 mg/dL was typically greater than 85 uL/min. A blood sample was taken at t = 0 min, after which a sterile conjugate

solution or control insulin was injected intravenously via the second rat cannula, followed immediately by a chase solution of heparin-saline to ensure that all of the conjugate dose was administered into the animal. After an additional flush of the cannula line with heparin-saline, the second cannula was used to collect blood samples at t = 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90, 120, and 180 minutes post-dose.

To determine the elimination rate in the presence of a-MM, one hour before the start of the experiment one rat cannula was connected to a syringe infusion pump containing a sterile 25% w/v a-MM solution. The pump infusion rate was adjusted by the experimenter, but was typically set at 85 uL/min. A blood sample was taken at t = 0 min, after which a sterile conjugate solution or control insulin was injected intravenously via the second rat cannula, followed immediately by a chase solution of heparin-saline to ensure that all of the conjugate dose was administered into the animal. After an additional flush of the cannula line with heparin-saline, the second cannula was used to collect blood samples at t = 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90, 120, and 180 minutes post-dose.

Throughout the experiment, blood glucose was measured using commercially available test strips (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Blood from each timepoint was centrifuged at 4C to collect the serum, and serum insulin or serum conjugate concentrations were subsequently measured with a commercially available ELISA kit (Iso-Insulin ELISA, Mercodia, Uppsala, Sweden). Insulin or conjugate serum concentration vs. time data was best fit with the sum of two independent decaying exponentials ($C(t) = a \exp(-k_a t) + b \exp(-k_b t)$) according to the two-compartment model, where $t1/2(a) = (\ln 2)/k_a$ and $t1/2(b) = (\ln 2)/k_b$. Results are shown in Figure 46. The left panel demonstrates the significantly higher (> 5x) elimination rate for the I-6 conjugate versus RHI in the absence of a-MM or glucose. The right panel shows that the elimination rate decreases somewhat (~ 50%) in the presence of glucose (G400 infusion) and quite substantially (~ 400%) in the presence of a-MM (a-MM infusion).

Example 80 – Glucose-responsive PK for I-6 i.v. infusion

In this example, the i.v. elimination rate experiment described in Example 79 was modified from a single i.v. bolus of 0.4 mg conjugate/kg body weight to a continuous i.v. infusion. The goal of the experiment was to maintain a constant input rate of conjugate (or RHI as a control) for six hours with an i.p. injection of glucose administered at the four hour time point to determine the resulting effect on serum conjugate (or RHI) concentration. Dual jugular vein cannulated male Sprague-Dawley rats (Taconic, JV/JV, 350-400g, n=3) were used in each experiment such that one jugular vein line was used for conjugate or RHI infusion and the other for blood collection.

For RHI, a 50 mU/ml solution was sterile filtered through a 0.2 um filtration membrane and infused at 0.07 ml/min to provide a constant input rate of 3.5 mU/min for the entire six hour experiment. A blood sample was taken at t = 0 min, after which the constant i.v. infusion was initiated. The second cannula was used to collect blood samples at t = 30, 60, 120, 180 and 240 min. At t = 240 min, a 4 g/kg dose of glucose was administered via i.p. injection followed by blood collection at t = 255, 270, 300, 330 and 360 min.

For the **I-6** conjugate, a 150 mU/ml solution was sterile filtered through a 0.2 μm filtration membrane and infused at 0.10 ml/min to provide a constant input rate of 15 mU/min for the entire six hour experiment. A blood sample was taken at t = 0 min, after which the constant i.v. infusion was initiated. The second cannula was used to collect blood samples at t = 30, 60, 120, 180 and 240 min. At t = 240 min, a 1, 2, or 4 g/kg dose of glucose was administered via i.p. injection followed by blood collection at t = 255, 270, 300, 330 and 360 min.

Throughout the experiments, blood glucose was measured using commercially available test strips (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Blood from each timepoint was centrifuged at 4C to collect the serum, and serum insulin or serum conjugate concentrations were subsequently measured with a commercially available ELISA kit (Iso-Insulin ELISA, Mercodia, Uppsala, Sweden).

The first two panels of Figure 47 compare the blood glucose and serum insulin/conjugate concentration profiles for a 3.5 mU/min infusion of RHI and 15 mU/min infusion of **I-6** before and after a 4 g/kg i.p. glucose injection. RHI infusion causes significant hypoglycemia prior to glucose injection compared to the **I-6** infusion. Following the i.p. glucose injection, the measured serum insulin concentration of **I-6** immediately increases by over 300% as the blood glucose concentration increases followed by a rapid return to baseline levels as the glucose concentration decreases. On the other hand, there is no significant change in measured serum insulin concentration for RHI after i.p. glucose injection under the same experimental conditions. The next three panels of Figure 47 show that the extent to which the measured insulin concentration increases during i.p. glucose injection is directly related to the dose of glucose administered and the resulting blood glucose levels. For example, only a 50% peak to baseline change in serum insulin concentration is observed for the 1 g/kg glucose injection versus the 300% peak to baseline change observed for the 4 g/kg dose.

Example 81 – In vivo elimination rate for insulin-conjugates with and without sugar

In order to determine the rate at which the **I-9** conjugate was cleared from serum *in vivo* in the presence or absence of inhibitory sugars such as glucose or a-MM, the following experiment was conducted. In each case the soluble conjugate (or RHI as a control) was dosed at

0.4 mg conjugate/kg body weight into dual jugular vein cannulated male Sprague-Dawley rats (Taconic, JV/JV, 350-400g, n=3).

To determine the elimination rate in the presence of elevated glucose levels, one hour before the start of the experiment one rat cannula was connected to a syringe infusion pump containing a sterile 50% w/v glucose solution. The pump infusion rate was adjusted by the experimenter to ensure that the blood glucose levels in the animal remained above 300 mg/dL at all times during the experiment. Blood glucose was measured using commercially available test strips (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). In a typical experiment, it was found that the infusion pump rate required to keep the animals above 300 mg/dL was typically greater than 85 μL/min. A blood sample was taken at t = 0 min, after which a sterile conjugate solution or control insulin was injected intravenously via the second rat cannula, followed immediately by a chase solution of heparin-saline to ensure that all of the conjugate dose was administered into the animal. After an additional flush of the cannula line with heparin-saline, the second cannula was used to collect blood samples at t = 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90, 120, and 180 minutes post-dose.

To determine the elimination rate in the presence of a-MM, one hour before the start of the experiment one rat cannula was connected to a syringe infusion pump containing a sterile 25% w/v a-MM solution. The pump infusion rate was adjusted by the experimenter, but was typically set at 85 uL/min. A blood sample was taken at t = 0 min, after which a sterile conjugate solution or control insulin was injected intravenously via the second rat cannula, followed immediately by a chase solution of heparin-saline to ensure that all of the conjugate dose was administered into the animal. After an additional flush of the cannula line with heparin-saline, the second cannula was used to collect blood samples at t = 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90, 120, and 180 minutes post-dose.

Throughout the experiment, blood glucose was measured using commercially available test strips (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Blood from each timepoint was centrifuged at 4C to collect the serum, and serum insulin or serum conjugate concentrations were subsequently measured with a commercially available ELISA kit (Iso-Insulin ELISA, Mercodia, Uppsala, Sweden). Insulin or conjugate serum concentration vs. time data was best fit with the sum of two independent decaying exponentials ($C(t) = a \exp(-k_a t) + b \exp(-k_b t)$) according to the two-compartment model, where $t1/2(a) = (\ln 2)/k_a$ and $t1/2(b) = (\ln 2)/k_b$. The first panel of Figure 48 shows that the elimination rate of unmodified insulin is not affected in the presence of sugars (glucose G400 or a-MM). For the sake of comparison, the last panel of Figure 48 showing conjugate **I-6** with sugar infusion is replotted from the Example 79 results. The middle panel of Figure 48 showing conjugate **I-9** with sugar infusion shows a much more

pronounced decrease in elimination rate (~ 350% vs. ~ 50%) in the presence of glucose (G400 infusion) versus the **I-6** conjugate. Conjugate **I-9** also demonstrates a more significant decrease in elimination rate (~ 700% vs. ~ 400%) in the presence of a-MM (a-MM infusion) versus the **I-6** conjugate.

Example 82 – Mechanism verification and glucose-responsive performance in miniature swine

In order to determine whether the glucose-responsive insulin-conjugate results that are described above could be extended to other species beyond rats, we focused on exploring the sugar-dependent *in vivo* elimination rate in human-representative, non-diabetic, male miniature swine (Yucatan strain), also called "minipigs" herein. A subset of insulin-conjugates summarized in Figure 49 were tested to initially determine the effects of sugar affinity and multivalency on sugar-dependent elimination rates. The conjugates are shown in Figure 45 as **I-7**, **I-6**, **I-11**, and **II-2**. All conjugates used in this study were synthesized according to the general methods described in Example 20. To produce the A1,B29-disubstituted AETM-2 insulin-conjugate **II-2**, approximately ten times the amount of multivalent active ester framework and AETM ligand per insulin molecule was used compared to the B29-monosubstituted AETM-2 insulin-conjugate (**I-6**) synthesis.

In each experiment, the insulin-conjugate was dosed i.v. at 0.1 U/kg into non-diabetic, dual-vascular access ported minipigs and blood was collected at frequent time intervals post-injection. To determine the serum elimination rate in the presence of glucose, a sterile 50% w/v glucose solution was infused i.v. into one port using a syringe pump one hour prior to administering the insulin-conjugate, and the rate was adjusted throughout the entire experiment to ensure that the blood glucose levels in the animal remained at or near 400 mg/dl (typically 80-150 ml/h). To determine the serum elimination rate in the presence of a-MM, the glucose solution was replaced with a sterile 25% w/v a-MM solution and the pump infusion rate held constant throughout the experiment at 80 ml/h. In each case, the resulting insulin-conjugate concentration vs. time data was fit with the sum of two independent decaying exponentials ($C(t) = \alpha \exp(-k_\alpha t) + \beta \exp(-k_\beta t)$) according to the two-compartment model.

At 400 mg/dl the high levels of endogenous glucose-induced porcine insulin crossreacted with our insulin-conjugate immunoassay. As such, the PK results from the glucose infusion experiments required subtraction of values obtained from a porcine insulin-only assay leading to a particularly "noisy" set of data. Since a-MM does not induce endogenous porcine insulin secretion, data from the a-MM infusion studies were used as our primary indicator of sugar-responsive changes in insulin-conjugate half-life. Interestingly, in the pigs, the AETM-2 insulin-

conjugate (**I-6**) showed only a modest 1.7x increase in $t_{1/2}$ in the presence of a-MM compared to a 4.0x increase in the rats (Figure 56). However, in the pigs, the A1,B29-di-substituted AETM-2 insulin-conjugate (**II-2**) demonstrated an almost 10-fold increase in $t_{1/2}$ in the presence of a-MM (Figures 50 and 51). Tabular results for other conjugates are shown in Figure 57.

The area over the glucose lowering curve for the i.v. dose of di-substituted AETM-2 insulin-conjugate (**II-2**) in the presence of a-MM was approximately 2.6x higher than in the absence of sugar (Figure 52). Figure 59 compares the differences in bioactivity between RHI, **I-6**, and **II-2** (di-substituted AETM-2 insulin-conjugate), and **II-3**. All three of the insulin-conjugates contain the high affinity AETM sugar ligands. In this selected set of insulin-conjugates, there is no correlation between sugar-dependent half-life and bioactivity.

Conjugate **II-2** was injected sub-Q as a soluble solution at doses of 0.25, 0.50, and 1.00 U/kg in both non-diabetic, normoglycemic and alloxan-diabetic, hyperglycemic minipigs to determine its ability to lower glucose in diabetics without causing hypoglycemia in non-diabetic animals. The insulin-conjugate demonstrated a significant dose-dependent reduction in blood glucose levels in the diabetics with absolutely no hypoglycemia or signs of glucose-lowering in the non-diabetics (Figure 53). In comparison, RHI injected at 0.063 and 0.125 U/kg caused significant glucose-lowering in the diabetic animals with noticeable hypoglycemia and significant glucose-lowering and hypoglycemia in the non-diabetic animals (Figure 54). Based on these preliminary results, a single injection of approximately 0.5 U/kg of soluble insulin-conjugate **II-2** provided hypoglycemia-free glucose control for 6-8 hours in diabetic minipigs. Serum elimination rates of sub-Q injected **II-2** were determined in diabetic and normal minipigs (Figure 58). Similar PK profiles were observed between diabetics and normals for all doses.

Taken together, these early results demonstrate that an endogenous lectin-based mechanism exists in the minipigs that can be exploited through selection of sugar affinity and multivalency. It appears that insulin-conjugates with higher affinities and multivalencies provide improved hypoglycemia-free glycemic control in minipigs as compared to rats.

Example 83 – Optimization studies in miniature swine

Based on the stark difference in performance of **II-2** versus the other conjugates in Figure 49, it is desirable to separate and quantify the effect of insulin conjugation site (A1 vs. B29) from the effects of sugar affinity and valency. Using similar conjugation techniques as were used to produce the insulin-conjugates in Figure 49, we therefore have synthesized the array of insulin-conjugates listed in Figure 55 (shown in Figure 45 as **I-12**, **I-13**, **I-14**, **I-15**, **II-1**, **II-3**, and **II-4**), as well as the control compounds shown in Figure 60. All the di-substituted conjugates to be used in this study were synthesized according to the general methods described in Example 20.

To produce the A1, B29-disubstituted insulin-conjugates, approximately ten times the amount of multivalent active ester framework and sugar affinity ligand per insulin molecule was used compared to the B29-monosubstituted insulin-conjugate synthesis. The A1-only substituted materials were also prepared according to the general methods described Example 20. However, in this case B29-mono-BOC protected insulin isolated from a BOC protection synthesis described in Example 8 using half the number of equivalents of di-tert-butyl-dicarbonate was used. Once purified, the BOC groups were removed from the conjugate using a TFA/anisole method described in Example 12.

In general, the sugar-responsive half-lives and glucose-lowering effects of each of these insulin-conjugates were determined as follows. As described above, each insulin-conjugate was dosed i.v. at 0.1 U/kg into non-diabetic, dual-vascular access ported minipigs and blood was collected at frequent time intervals post-injection. To determine the serum elimination rate in the presence of a-MM, a sterile 25% w/v a-MM solution was infused i.v. into one port using a syringe pump (80 ml/h) one hour prior to administering the insulin-conjugate, and the rate was held constant throughout the entire experiment. In each case, the resulting insulin-conjugate concentration vs. time data was fit with the sum of two independent decaying exponentials ($C(t) = \alpha \exp(-k_\alpha t) + \beta \exp(-k_\beta t)$) according to the two-compartment model. Comparison of the β-phase elimination rates with and without a-MM infusion was used to identify suitable conjugates.

Figure 61 shows a comparison of glucose levels when various insulin-conjugates were injected i.v. into minipigs. Conjugate **I-12** (A1 substitution with AETM-2) was slightly more effective in lowering glucose than conjugate **I-6** (B29 substitution with AETM-2). Substitution of conjugate **I-6** at the A1 position with polyethylene oxide to give conjugate C3 reduced overall bioactivity but did not increase the a-MM induced bioactivity. Substitution of conjugate **I-6** at the A1 position with another TSAT-C6-AETM-2 scaffold to give conjugate **II-2** reduced overall bioactivity but increased the a-MM induced bioactivity.

Figure 62 shows a comparison of glucose levels when various A1,B29 di-substituted insulin-conjugates were injected i.v. into minipigs. A1,B29 di-substitution of insulin with acetyl (conjugate C7) or PEO (conjugate C4) groups did not substantially reduce overall bioactivity. Furthermore, the C7 and C4 conjugates did not display distinguishable a-MM-induced bioactivity effects. Conjugate **II-3** had substantially reduced bioactivity versus conjugates C7 and C4, but its bioactivity was virtually restored in the presence of a-MM.

OTHER EMBODIMENTS

Other embodiments of the invention will be apparent to those skilled in the art from a consideration of the specification or practice of the invention disclosed herein. It is intended that

CLAIMS

We claim:

1. A conjugate comprising a drug and a ligand including a first saccharide; wherein the conjugate is characterized in that, when the conjugate is administered to a mammal, at least one pharmacokinetic or pharmacodynamic property of the conjugate is sensitive to serum concentration of a second saccharide.

2. The conjugate of claim 1, wherein the second saccharide is glucose.

3. The conjugate of claim 1, wherein the second saccharide is mannose.

4. The conjugate of claim 1, wherein the second saccharide is L-fucose.

5. The conjugate of claim 1, wherein the second saccharide is N-acetyl glucosamine.

6. The conjugate of claim 1, wherein the second saccharide is alpha-methyl mannose.

7. The conjugate of claim 1, wherein the molecular weight of the conjugate absent the drug is less than about 10,000 Da.

8. The conjugate of claim 1, wherein the molecular weight of the conjugate absent the drug is in the range of about 250 to about 5,000 Da.

9. The conjugate of claim 1, wherein the molecular weight of the conjugate absent the drug is in the range of about 900 to about 2,000 Da.

10. The conjugate of claim 1, wherein the molecular weight of the conjugate including the drug is less than about 20,000 Da.

11. The conjugate of claim 1, wherein the molecular weight of the conjugate including the drug is in the range of about 2,000 to about 18,000 Da.

12. The conjugate of claim 1, wherein the molecular weight of the conjugate including the drug is in the range of about 6,500 to about 8,000 Da.

13. The conjugate of claim 1, wherein the conjugate has a unique molecular weight.

14. The conjugate of claim 1, wherein the conjugate has a substantially different serum concentration curve under fasted and hyperglycemic conditions.

15. The conjugate of claim 14, wherein the hyperglycemic conditions are induced by concurrent administration of conjugate and glucose to the mammal.

16. The conjugate of claim 14, wherein the conjugate has a serum C_{max} that is higher under hyperglycemic conditions as compared to fasted conditions.

17. The conjugate of claim 14, wherein the conjugate has a serum AUC that is higher under hyperglycemic conditions as compared to fasted conditions.

18. The conjugate of claim 14, wherein the conjugate has a serum elimination rate that is slower under hyperglycemic conditions as compared to fasted conditions.

19. The conjugate of claim 14, wherein the conjugate has a serum concentration curve that can be fit using a two-compartment bi-exponential model with one short and one long half-life and the long half-life is longer under hyperglycemic conditions as compared to fasted conditions.

20. The conjugate of any one of claims 14-19, wherein the fasted conditions involve a serum glucose C_{max} of less than 100 mg/dL.

21. The conjugate of any one of claims 14-19, wherein the hyperglycemic conditions involve a serum glucose C_{max} in excess of 200 mg/dL.

22. The conjugate of claim 1, wherein the conjugate has a serum concentration curve that is substantially different at 100 and 300 mg/dL glucose.

23. The conjugate of claim 22, wherein the conjugate has a C_{max} that is higher at 300 mg/dL glucose than at 100 mg/dL glucose.

24. The conjugate of claim 23, wherein the C_{max} of the conjugate is at least 50% higher at 300 mg/dL glucose.

25. The conjugate of claim 22, wherein the conjugate has an AUC that is higher at 300 mg/dL glucose than at 100 mg/dL glucose.

26. The conjugate of claim 25, wherein the AUC of the conjugate is at least 50% higher at 300 mg/dL glucose.

27. The conjugate of claim 22, wherein the conjugate has a serum elimination rate that is faster at 100 mg/dL glucose than at 300 mg/dL glucose.

28. The conjugate of claim 27, wherein the serum elimination rate of the conjugate is at least 25% faster at 100 mg/dL glucose.

29. The conjugate of claim 22, wherein the serum concentration curve of the conjugate can be fit using a two-compartment bi-exponential model with one short and one long half-life and the long half-life is longer at 300 mg/dL.

30. The conjugate of claim 29, wherein the long half-life is at least 50% longer at 300 mg/dL glucose.

31. The conjugate of claim 1, wherein the conjugate and an unconjugated version of the drug have serum concentration curves that are substantially the same under hyperglycemic conditions.

32. The conjugate of claim 1, wherein the conjugate and an unconjugated version of the drug have serum concentration curves that are substantially different under fasted conditions.

33. The conjugate of claim 1, wherein the conjugate and an unconjugated version of the drug have serum concentration curves that are substantially the same under hyperglycemic conditions and substantially different under fasted conditions.

34. The conjugate of any one of claims 31-33, wherein the fasted conditions involve a serum glucose C_{max} of less than 100 mg/dL.

35. The conjugate of any one of claims 31-33, wherein the hyperglycemic conditions involve a serum glucose C_{max} in excess of 200 mg/dL.

36. The conjugate of claim 1, wherein the conjugate has lower bioactivity under fasted conditions as compared to hyperglycemic conditions.

37. The conjugate of claim 36, wherein the fasted conditions involve a serum glucose C_{max} of less than 100 mg/dL.

38. The conjugate of claim 36, wherein the hyperglycemic conditions involve a serum glucose C_{max} in excess of 200 mg/dL.

39. The conjugate of claim 1, wherein the conjugate has lower bioactivity at 100 mg/dL glucose than 300 mg/dL glucose.

40. The conjugate of claim 39, wherein the bioactivity of the conjugate is at least 25% higher at 300 mg/dL glucose.

41. The conjugate of any one of claims 1-40, wherein the mammal is a human, dog, cat, rat, or minipig.

42. The conjugate of any one of claims 1-40, wherein the mammal is a human.

43. The conjugate of claim 1, wherein the drug is an anti-diabetic drug.

44. The conjugate of claim 1, wherein the drug is an insulin sensitizer.

45. The conjugate of claim 1, wherein the drug is an insulin secretatogue.

46. The conjugate of claim 1, wherein the drug is insulin-type growth factor 1 (IGF-1).

47. The conjugate of claim 1, wherein the drug is an insulin molecule.

48. The conjugate of claim 47, wherein the insulin molecule is selected from the group consisting of human insulin, porcine insulin, and bovine insulin.

49. The conjugate of claim 47, wherein the insulin molecule is selected from the group consisting of insulin lispro, insulin aspart and insulin glulisine.

50. The conjugate of claim 47, wherein the insulin molecule is insulin glargine or insulin detemir.

51. The conjugate of claim 47, wherein the insulin molecule includes three disulfide bridges.

52. The conjugate of claim 47, wherein the insulin molecule is conjugated via the A1 amino acid residue.

53. The conjugate of claim 47, wherein the insulin molecule is conjugated via the B1 amino acid residue.

54. The conjugate of claim 47, wherein the insulin molecule is conjugated via the epsilon-amino group of Lys^{B29}.

55. The conjugate of claim 47, wherein the insulin molecule is insulin glulisine conjugated via the epsilon-amino group of Lys^{B3}.

56. The conjugate of claim 47, wherein the insulin molecule is truncated.

57. The conjugate of claim 56, wherein the insulin molecule is des(B30)-insulin, des(B28-B30)-insulin, des(B27)-insulin, des(B1)-insulin, or des(B1-B3)-insulin.

58. The conjugate of claim 47, wherein conjugation results in decreased insulin receptor affinity *in vitro* as compared to wild-type human insulin.

59. The conjugate of claim 47, wherein the insulin molecule is conjugated via the A3, A4, A5, A8, A9, or B30 amino acid residue.

60. The conjugate of claim 47, wherein the insulin molecule is conjugated via the A1 amino acid residue and the epsilon-amino group of Lys^{B29}.

61. The conjugate of claim 1, wherein the conjugate includes a single ligand.

62. The conjugate of claim 1, wherein the conjugate includes at least two separate ligands each of which includes a saccharide.

63. The conjugate of claim 1, wherein the conjugate includes two separate ligands each of which includes a saccharide.

64. The conjugate of claim 1, wherein the conjugate includes three separate ligands each of which includes a saccharide.

65. The conjugate of claim 1, wherein the conjugate includes four separate ligands each of which includes a saccharide.

66. The conjugate of claim 1, wherein the conjugate includes five separate ligands each of which includes a saccharide.

67. The conjugate of any one of claims 62-66, wherein the separate ligands are the same.

68. The conjugate of claim 62, wherein the at least two separate ligands are conjugated to the drug via different conjugation points.

69. The conjugate of claim 62, wherein the at least two separate ligands are conjugated to a single conjugate framework that is also conjugated to the drug.

70. The conjugate of claim 62, wherein the at least two separate ligands and drug are each located on a separate branch of a branched conjugate framework.

71. The conjugate of claim 70, wherein the at least two separate ligands and drug are each located on termini of separate branches of a branched conjugate framework.

72. The conjugate of claim 70, wherein the conjugate framework is hyperbranched.

73. The conjugate of claim 62, wherein the conjugate framework is non-polymeric.

74. The conjugate of claim 1, wherein the ligand includes a first saccharide selected from the group consisting of glucose, mannose and L-fucose.

75. The conjugate of claim 1, wherein the ligand includes a first saccharide selected from the group consisting of mannosamine and beta-linked N-acetyl mannosamine.

76. The conjugate of claim 1, wherein the ligand includes a first saccharide selected from the group consisting of methylglucose, methylmannose, ethylglucose, ethylmannose, propylglucose and propylmannose.

77. The conjugate of claim 1, wherein the ligand includes alpha-L-fucopyranoside.

78. The conjugate of claim 1, wherein the ligand includes a bimannose.

79. The conjugate of claim 1, wherein the ligand includes a trimannose.

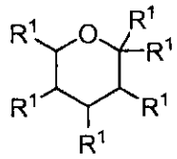
80. The conjugate of claim 1, wherein the ligand includes a linear trimannose.

81. The conjugate of claim 1, wherein the ligand includes a branched trimannose.

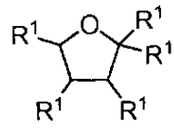
82. The conjugate of claim 1, wherein the ligand includes a first saccharide and an amine group.

83. The conjugate of claim 82, wherein the first saccharide and amine group are separated by a C_1-C_6 alkyl group.

84. The conjugate of claim 1, wherein the ligand is of formula (IIIa) or (IIIb):



IIIa



IIIb

wherein:

each R^1 is independently hydrogen, $-OR^y$, $-N(R^y)_2$, $-SR^y$, -O-Y, -G-Z, or $-CH_2R^x$;

each R^x is independently hydrogen, $-OR^y$, $-N(R^y)_2$, $-SR^y$, or -O-Y;

each R^y is independently $-R^2$, $-SO_2R^2$, $-S(O)R^2$, $-P(O)(OR^2)_2$, $-C(O)R^2$, $-CO_2R^2$, or $-C(O)N(R^2)_2$;

each Y is independently a monosaccharide, disaccharide, or trisaccharide;

each G is independently a covalent bond or an optionally substituted C_{1-9} alkylene, wherein one or more methylene units of G is optionally replaced by $-O-$, $-S-$, $-N(R^2)-$, $-C(O)-$, $-OC(O)-$, $-C(O)O-$, $-C(O)N(R^2)-$, $-N(R^2)C(O)-$, $-N(R^2)C(O)N(R^2)-$, $-SO_2-$, $-SO_2N(R^2)-$, $-N(R^2)SO_2-$, or $-N(R^2)SO_2N(R^2)-$;

each Z is independently halogen, $-N(R^2)_2$, $-OR^2$, $-SR^2$, $-N_3$, $-C\equiv CR^2$, $-CO_2R^2$, $-C(O)R^2$, or $-OSO_2R^2$; and

each R^2 is independently hydrogen or an optionally substituted group selected from C_{1-6} aliphatic, phenyl, a 4-7 membered heterocyclic ring having 1-2 heteroatoms selected from nitrogen, oxygen, or sulfur, or a 5-6 membered monocyclic heteroaryl ring having 1-4 heteroatoms selected from nitrogen, oxygen, or sulfur,

with the proviso that the ligand comprises no more than a total of four monosaccharide moieties.

85. The conjugate of claim 84, wherein R^1 is hydrogen, -OH, $-NHC(O)CH_3$, -O-Y, -G-Z, $-CH_2OH$, -CH2-O-Y, or $-NH_2$.

86. The conjugate of claim 84, wherein R^x is hydrogen, -OH, or –O-Y.

87. The conjugate of claim 84, wherein R^y is hydrogen, $-R^2$, $-C(O)R^2$, or acetyl.

88. The conjugate of claim 84, wherein Y is a monosaccharide.

89. The conjugate of claim 88, wherein Y is mannose, glucose, fructose, galactose, rhamnose, or xylopyranose.

90. The conjugate of claim 88, wherein Y is mannose.

91. The conjugate of claim 88, wherein Y is D-mannose.

92. The conjugate of claim 84, wherein Y is a disaccharide.

93. The conjugate of claim 92, wherein Y is sucrose, maltose, turanose, trehalose, cellobiose, or lactose.

94. The conjugate of claim 84, wherein G is a covalent bond.

95. The conjugate of claim 84, wherein G is $-O-C_{1-8}$ alkylene.

96. The conjugate of claim 95, wherein G is $-OCH_2CH_2-$.

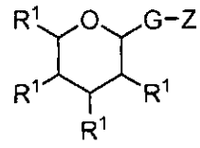
97. The conjugate of claim 84, wherein Z is $-N(R^2)_2$, $-OR^2$, or $-SR^2$.

98. The conjugate of claim 97, wherein Z is –SH.

99. The conjugate of claim 97, wherein Z is $-NH_2$.

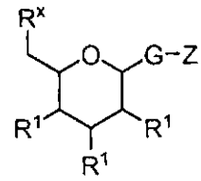
100. The conjugate of claim 84, wherein –G-Z is $-OCH_2CH_2NH_2$.

101. The conjugate of claim 84, wherein the ligand is of formula (IIIa-*i*):



IIIa-*i*

102. The conjugate of claim 84, wherein the ligand is of formula (IIIa-*ii*):



IIIa-*ii*

103. The conjugate of claim 1, wherein the ligand includes aminoethylglucose (AEG), aminoethylmannose (AEM), aminoethylbimannose (AEBM) or aminoethyltrimannose (AETM).

104. The conjugate of claim 1, wherein the ligand includes aminoethyltrimannose (AETM).

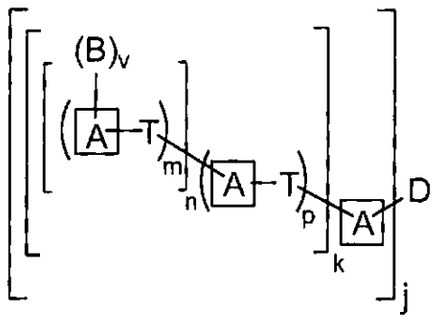
105. The conjugate of claim 1, wherein the conjugate includes two or three separate ligands each of which includes aminoethyltrimannose (AETM).

106. The conjugate of any one of the preceding claims, wherein the ligand includes a first saccharide that is conjugated via an anomeric carbon.

107. The conjugate of claim 106, wherein the anomeric carbon is an alpha anomer.

108. The conjugate of claim 106, wherein the saccharide is indirectly conjugated to the drug via a conjugate framework.

109. The conjugate of any one of the preceding claims, wherein the conjugate has the general formula (II):



II

wherein:

each occurrence of $\left[\left(\boxed{A}-T\right)\right]$ represents a potential branch within the conjugate;

each occurrence of $\left(\boxed{A}-T\right)$ represents a potential repeat within a branch of the conjugate;

each occurrence of $\boxed{A}$ is independently a covalent bond, a carbon atom, a heteroatom, or an optionally substituted group selected from the group consisting of acyl, aliphatic, heteroaliphatic, aryl, heteroaryl, and heterocyclic;

each occurrence of T is independently a covalent bond or a bivalent, straight or branched, saturated or unsaturated, optionally substituted C_{1-30} hydrocarbon chain wherein one or more methylene units of T are optionally and independently replaced by -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, $-S(O)_2-$, $-N(R)SO_2-$, $-SO_2N(R)-$, a heterocyclic group, an aryl group, or a heteroaryl group;

each occurrence of R is independently hydrogen, a suitable protecting group, or an acyl moiety, arylalkyl moiety, aliphatic moiety, aryl moiety, heteroaryl moiety, or heteroaliphatic moiety;

–B is $-T-L^B-X$;

each occurrence of X is independently a ligand;

each occurrence of L^B is independently a covalent bond or a group derived from the covalent conjugation of a T with an X;

–D is $-T-L^D-W$;

each occurrence of W is independently a drug;

each occurrence of L^D is independently a covalent bond or a group derived from the covalent conjugation of a T with a W;

k is an integer from 1 to 12, inclusive;

j is an integer from 1 to 4, inclusive;

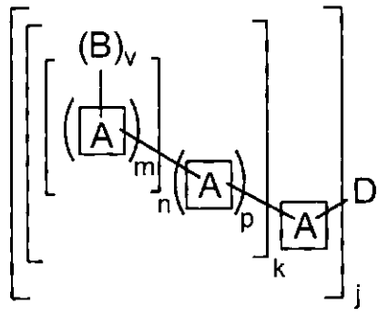
each occurrence of p is independently an integer from 1 to 5, inclusive; and

each occurrence of n is independently an integer from 0 to 5, inclusive; and

each occurrence of m is independently an integer from 1 to 5, inclusive; and

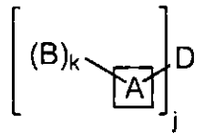
each occurrence of v is independently an integer from 0 to 5, inclusive, with the proviso that within each k-branch at least one occurrence of n is ≥ 1 and at least one occurrence of v is ≥ 1.

110. The conjugate of claim 109, wherein each occurrence of T outside groups B and D is a covalent bond and the conjugate is of the formula (V):



V

111. The conjugate of claim 109, wherein each occurrence of [A] except for the central [A] is a covalent bond, each occurrence of v = 1, and the conjugate is of the formula (VII):



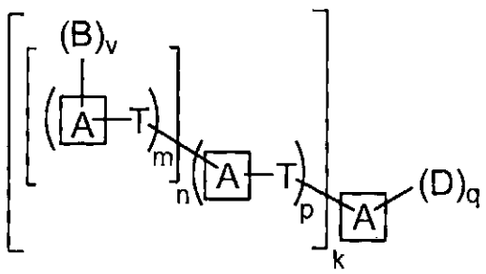
VII

112. The conjugate of claim 109, wherein k = 1 and j = 2.

113. The conjugate of claim 109, wherein k = 2 and j = 2.

114. The conjugate of claim 109, wherein k = 3 and j = 2.

115. The conjugate of any one of the preceding claims, wherein the conjugate has the general formula (I):



I

wherein:

each occurrence of $\left[\left(\boxed{A}-T\right)\right]$ represents a potential branch within the conjugate;

each occurrence of $\left(\boxed{A}-T\right)$ represents a potential repeat within a branch of the conjugate;

each occurrence of $\boxed{A}$ is independently a covalent bond, a carbon atom, a heteroatom, or an optionally substituted group selected from the group consisting of acyl, aliphatic, heteroaliphatic, aryl, heteroaryl, and heterocyclic;

each occurrence of T is independently a covalent bond or a bivalent, straight or branched, saturated or unsaturated, optionally substituted C_{1-30} hydrocarbon chain wherein one or more methylene units of T are optionally and independently replaced by -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, $-S(O)_2-$, $-N(R)SO_2-$, $-SO_2N(R)-$, a heterocyclic group, an aryl group, or a heteroaryl group;

each occurrence of R is independently hydrogen, a suitable protecting group, or an acyl moiety, arylalkyl moiety, aliphatic moiety, aryl moiety, heteroaryl moiety, or heteroaliphatic moiety;

–B is $-T-L^B-X$;

each occurrence of X is independently a ligand;

each occurrence of L^B is independently a covalent bond or a group derived from the covalent conjugation of a T with an X;

–D is $-T-L^D-W$;

each occurrence of W is independently a drug;

each occurrence of L^D is independently a covalent bond or a group derived from the covalent conjugation of a T with a W;

k is an integer from 1 to 12, inclusive;

q is an integer from 1 to 4, inclusive;

each occurrence of p is independently an integer from 1 to 5, inclusive; and

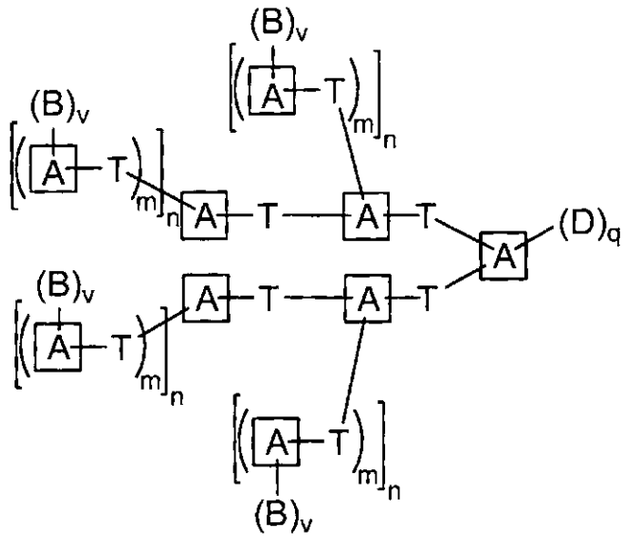
each occurrence of n is independently an integer from 0 to 5, inclusive; and

each occurrence of m is independently an integer from 1 to 5, inclusive; and

each occurrence of v is independently an integer from 0 to 5, inclusive, with the proviso that within each k-branch at least one occurrence of n is ≥ 1 and at least one occurrence of v is ≥ 1.

116. The conjugate of claim 115, wherein each occurrence of A in a p-bracketed moiety is substituted by a number of n-bracketed moieties corresponding to a value of n ≥ 1.

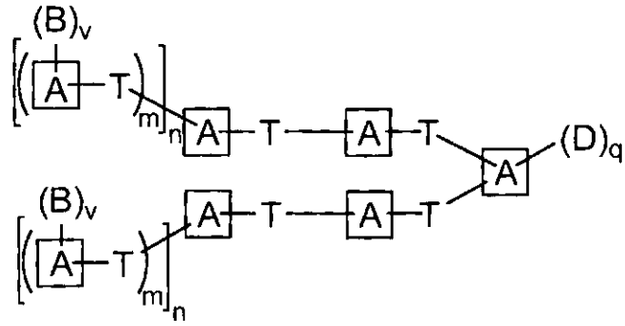
117. The conjugate of claim 116, wherein k = 2 and p = 2 in both k-branches and the conjugate is of the formula (Ia):



Ia

118. The conjugate of claim 115, wherein only terminal occurrences of A in a p-bracketed moiety are substituted by a number of n-bracketed moieties corresponding to a value of n ≥ 1.

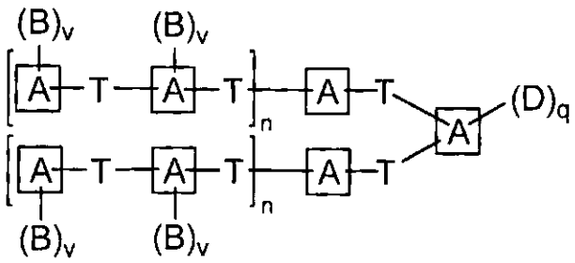
119. The conjugate of claim 118, wherein k = 2 and p = 2 in both k-branches, n = 0 for the first p-bracketed moiety in both k-branches and the conjugate is of the formula (Ib):



Ib

120. The conjugate of claim 115, wherein each occurrence of [A] in an m-bracketed moiety is substituted by a number of B moieties corresponding to the value of $v \geq 1$.

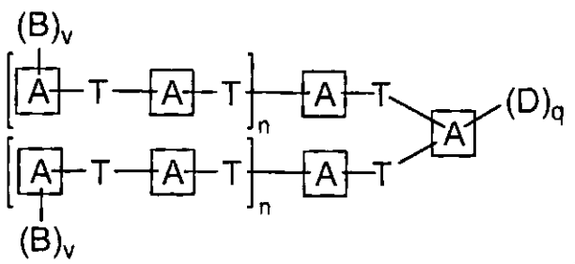
121. The conjugate of claim 120, wherein k = 2, each occurrence of p = 1, and each occurrence of m = 2 and the conjugate is of the formula (Ic):



Ic

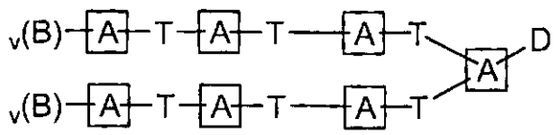
122. The conjugate of claim 115, wherein only terminal occurrences of [A] in an m-bracketed moiety are substituted by a number of B moieties corresponding to a value of $v \geq 1$.

123. The conjugate of claim 122, wherein k = 2, each occurrence of p = 1, each occurrence of m = 2, v = 0 for the first m-bracketed moeity in each n-branch and the conjugate is of the formula (Id):



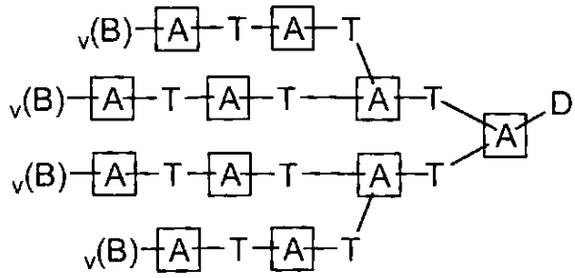
Id

124. The conjugate of claim 123, wherein q =1 and n = 1 in both k-branches and the conjugate is of the formula (Ie):



Ie

125. The conjugate of claim 123, wherein q =1 and n = 2 in both k-branches and the conjugate is of the formula (If):



If

126. The conjugate of claim 115, wherein each occurrence of [A] is an optionally substituted group selected from the group consisting of acyl, aliphatic, heteroaliphatic, aryl, heteroaryl, and heterocyclic.

127. The conjugate of claim 115, wherein each occurrence of [A] is the same.

128. The conjugate of claim 115, wherein the central [A] is different from all other occurrences of [A].

129. The conjugate of claim 128, wherein all occurrences of [A] are the same except for the central [A].

130. The conjugate of claim 115, wherein [A] is an optionally substituted aryl or heteroaryl group.

131. The conjugate of claim 130, wherein [A] is 6-membered aryl.

132. The conjugate of claim 131, wherein [A] is phenyl.

133. The conjugate of claim 115, wherein [A] is a heteroatom selected from N, O, or S.

134. The conjugate of claim 115, wherein [A] is a nitrogen atom.

135. The conjugate of claim 115, wherein A is a carbon atom.

136. The conjugate of claim 115, wherein each occurrence of T is independently a bivalent, straight or branched, saturated or unsaturated, optionally substituted C_{1-20} hydrocarbon chain wherein one or more methylene units of T are optionally and independently replaced by –O–, –S–, –N(R)–, –C(O)–, –C(O)O–, –OC(O)–, –N(R)C(O)–, –C(O)N(R)–, –S(O)–, –S(O)$_2$–, –N(R)SO$_2$–, –SO$_2$N(R)–, a heterocyclic group, an aryl group, or a heteroaryl group.

137. The conjugate of claim 136, wherein one, two, three, four, or five methylene units of T are optionally and independently replaced.

138. The conjugate of claim 136, wherein T is constructed from a C_{1-10} hydrocarbon chain wherein one or more methylene units of T are optionally and independently replaced by –O–, –S–, –N(R)–, –C(O)–, –C(O)O–, –OC(O)–, –N(R)C(O)–, –C(O)N(R)–, –S(O)–, –S(O)$_2$–, –N(R)SO$_2$–, –SO$_2$N(R)–, a heterocyclic group, an aryl group, or a heteroaryl group.

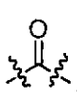
139. The conjugate of claim 136, wherein one or more methylene units of T is replaced by a heterocyclic group.

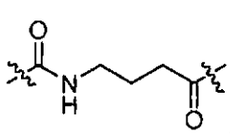
140. The conjugate of claim 136, wherein one or more methylene units of T is replaced by a triazole moiety.

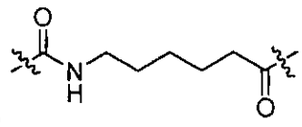
141. The conjugate of claim 136, wherein one or more methylene units of T is replaced by –C(O)–.

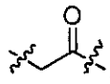
142. The conjugate of claim 136, wherein one or more methylene units of T is replaced by –C(O)N(R)–.

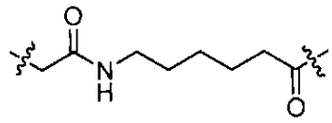
143. The conjugate of claim 136, wherein one or more methylene units of T is replaced by –O–.

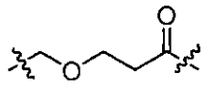
144. The conjugate of claim 136, wherein T is  .

145. The conjugate of claim 136, wherein T is  .

146. The conjugate of claim 136, wherein T is  .

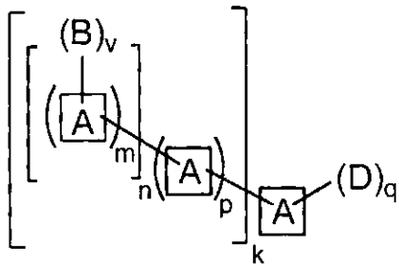
147. The conjugate of claim 136, wherein T is  .

148. The conjugate of claim 136, wherein T is  .

149. The conjugate of claim 136 wherein T is  .

150. The conjugate of claim 136, wherein each occurrence of T is the same.

151. The conjugate of claim 136, wherein each occurrence of T outside groups B and D is a covalent bond and the conjugate is of the formula (IV):



IV

152. The conjugate of claim 151, wherein each occurrence of [A] except for the central [A] is a covalent bond, each occurrence of v = 1, and the conjugate is of the formula (VI):



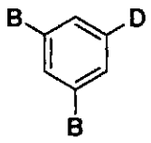
VI

153. The conjugate of claim 152, wherein k = 1 and q = 1.

154. The conjugate of claim 152, wherein k = 2 and q = 1.

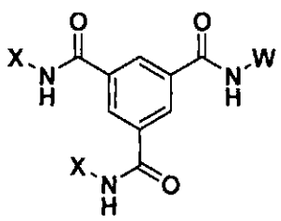
155. The conjugate of claim 152, wherein k = 3 and q = 1.

156. The conjugate of claim 154, wherein the conjugate is of the formula (VIa):



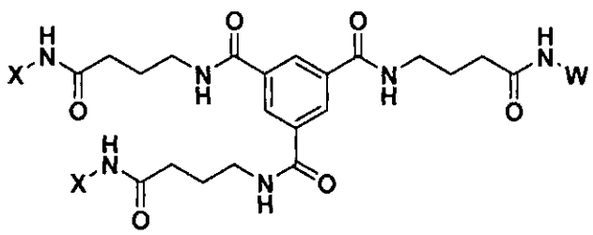
VIa

157. The conjugate of claim 156, wherein the conjugate is of the formula (VIa-1):



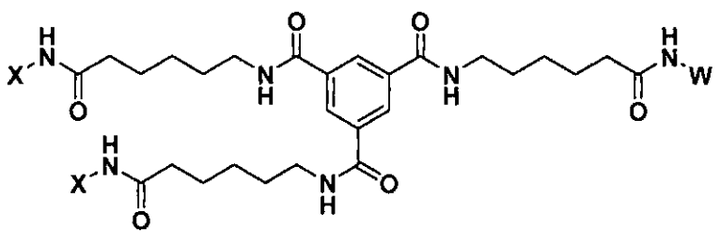
VIa-1

158. The conjugate of claim 156, wherein the conjugate is of the formula (VIa-2):



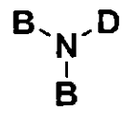
VIa-2

159. The conjugate of claim 156, wherein the conjugate is of the formula (VIa-3):



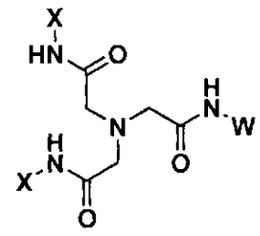
VIa-3

160. The conjugate of claim 154, wherein the conjugate is of the formula (VIb):



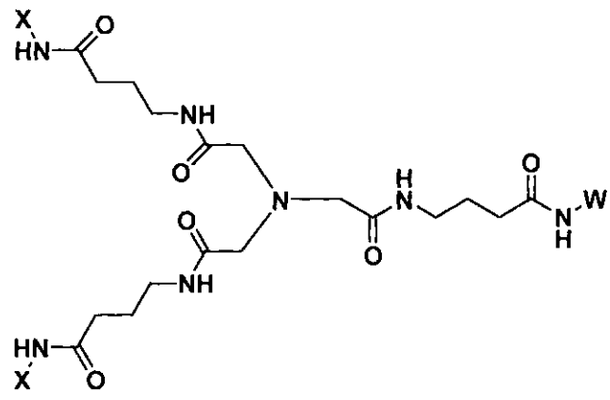
VIb

161. The conjugate of claim 160, wherein the conjugate is of the formula (VIb-1):



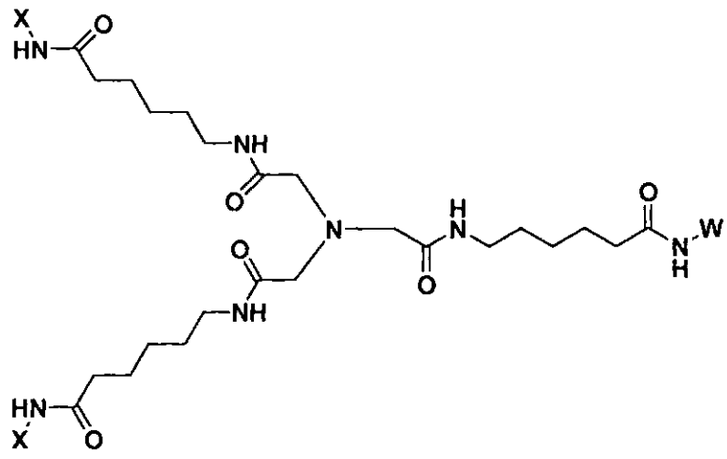
VIb-1

162. The conjugate of claim 160, wherein the conjugate is of the formula (VIb-2):



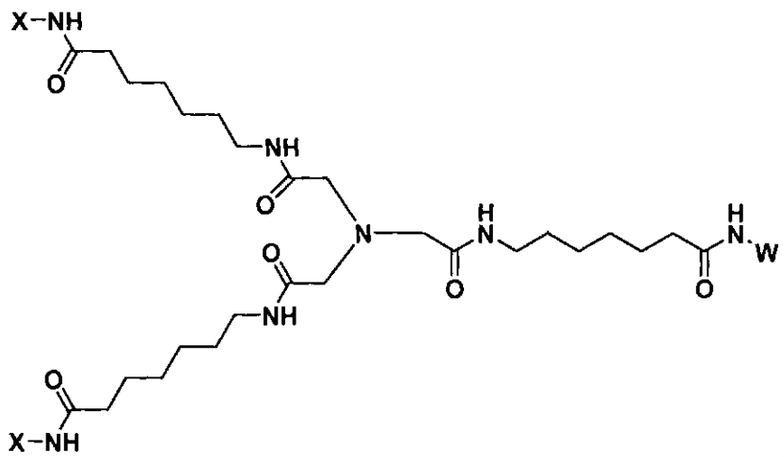
VIb-2

163. The conjugate of claim 160, wherein the conjugate is of the formula (VIb-3):



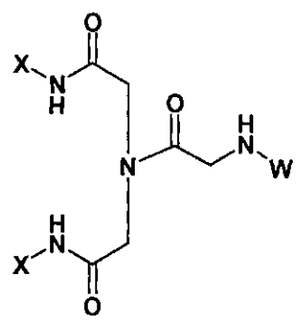
VIb-3

164. The conjugate of claim 160, wherein the conjugate is of the formula (VIb-4):



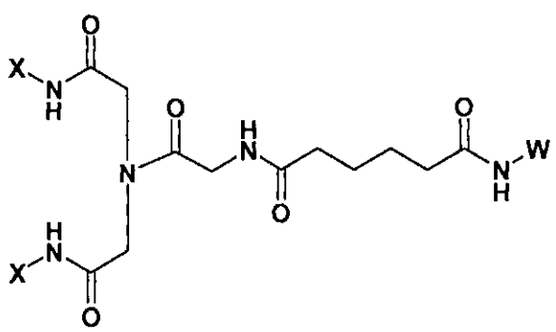
VIb-4

165. The conjugate of claim 160, wherein the conjugate is of the formula (VIb-5):



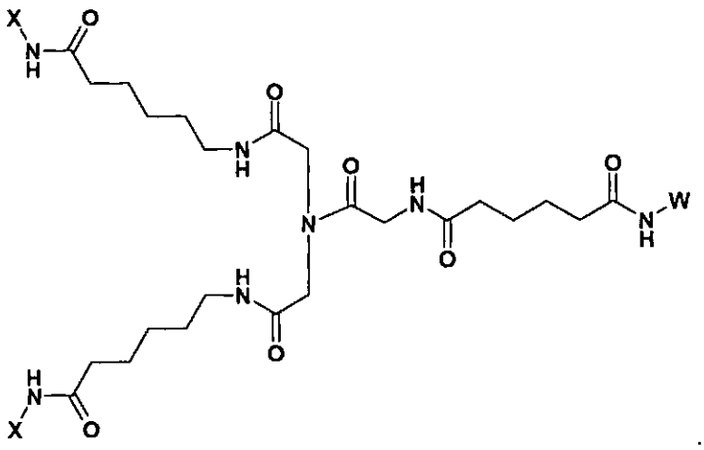
VIb-5

166. The conjugate of claim 160, wherein the conjugate is of the formula (VIb-6):



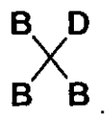
VIb-6

167. The conjugate of claim 160, wherein the conjugate is of the formula (VIb-7):



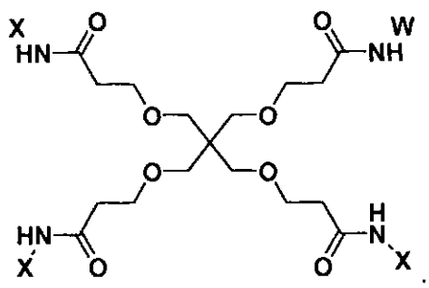
VIb-7

168. The conjugate of claim 155, wherein the conjugate is of the formula (VIc):



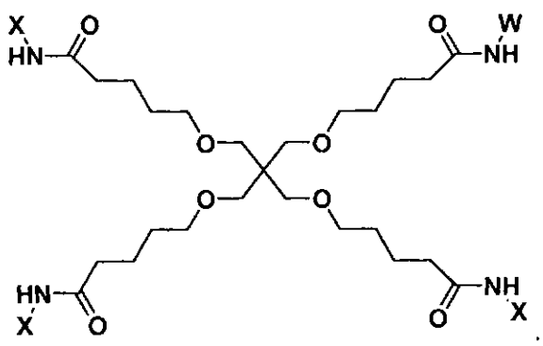
VIc

169. The conjugate of claim 168, wherein the conjugate is of the formula (VIc-1):



VIc-1

170. The conjugate of claim 168, wherein the conjugate is of the formula (VIc-2):

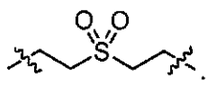


VIc-2

171. The conjugate of claim 115, wherein at least one of L^B and L^D is a covalent bond.

172. The conjugate of claim 115, wherein at least one of L^B and L^D is an optionally substituted moiety derived from conjugating an optionally substituted carbonyl-reactive, thiol-reactive, amine-reactive, or hydroxyl-reactive moiety of T with a carboxyl, thiol, amine, or hydroxyl group of X or W.

173. The conjugate of claim 115, wherein at least one of L^B and L^D is an optionally substituted moiety derived from conjugating an optionally substituted carboxyl-reactive, thiol-reactive, amine-reactive, or hydroxyl-reactive moiety of X or W with a carboxyl, thiol, amine, or hydroxyl group of T.

174. The conjugate of claim 172, wherein at least one of L^B and L^D is  .

175. The conjugate of claim 172, wherein at least one of L^B and L^D is a succinimide moiety.

176. The conjugate of claim 115, wherein k + q is an integer from 2 to 6, inclusive.

177. The conjugate of claim 176, wherein k + q is 2, 3 or 4.

178. The conjugate of claim 115, wherein each occurrence of p is 1, 2 or 3.

179. The conjugate of claim 115, wherein each occurrence of p is 1.

180. The conjugate of claim 115, wherein each occurrence of p is the same.

181. The conjugate of claim 115, wherein each occurrence of m is 1, 2 or 3.

182. The conjugate of claim 115, wherein each occurrence of m is 1.

183. The conjugate of claim 115, wherein each occurrence of m is the same.

184. The conjugate of any one of claims 109-183, wherein each occurrence of X is a ligand that includes aminoethylglucose (AEG), aminoethylmannose (AEM), aminoethylbimannose (AEBM) or aminoethyltrimannose (AETM).

185. The conjugate of any one of claims 109-183, wherein each occurrence of X is a ligand that includes aminoethyltrimannose (AETM).

186. The conjugate of claim 185, wherein W is an insulin molecule.

187. The conjugate of claim 186, wherein the insulin molecule is conjugated via the A1 amino acid residue.

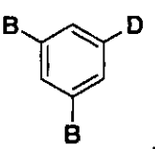
188. The conjugate of claim 186, wherein the insulin molecule is conjugated via the B1 amino acid residue.

189. The conjugate of claim 186, wherein the insulin molecule is conjugated via the epsilon-amino group of Lys^{B29}.

190. The conjugate of claim 186, wherein the insulin molecule is insulin glulisine conjugated via the epsilon-amino group of Lys^{B3}.

191. The conjugate of claim 115, wherein each occurrence of X is aminoethyltrimannose (AETM) conjugated to the conjugate framework via an alpha anomeric carbon; and W is an insulin molecule conjugated to the conjugate framework via the epsilon-amino group of Lys^{B29}.

192. A conjugate of formula (VIa):



VIa

wherein:

–B is $–T–L^B–X$;

each occurrence of X is independently a ligand that includes a saccharide;

each occurrence of L^B is independently a covalent bond or a group derived from the covalent conjugation of a T with an X;

–D is $–T–L^D–W$;

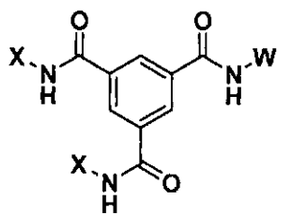
W is a drug;

each occurrence of L^D is independently a covalent bond or a group derived from the covalent conjugation of a T with a W;

each occurrence of T is independently a covalent bond or a bivalent, straight or branched, saturated or unsaturated, optionally substituted C_{1-30} hydrocarbon chain wherein one or more methylene units of T are optionally and independently replaced by -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -$S(O)_2$-, -N(R)SO_2-, -SO_2N(R)-, a heterocyclic group, an aryl group, or a heteroaryl group; and

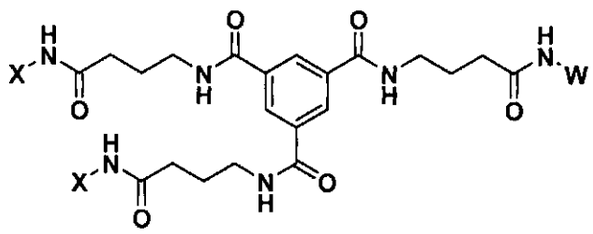
each occurrence of R is independently hydrogen, a suitable protecting group, or an acyl moiety, arylalkyl moiety, aliphatic moiety, aryl moiety, heteroaryl moiety, or heteroaliphatic moiety.

193. The conjugate of claim 192, wherein the conjugate is of the formula (VIa-1):



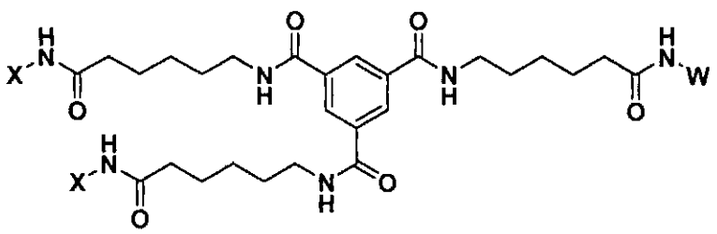
VIa-1

194. The conjugate of claim 192, wherein the conjugate is of the formula (VIa-2):



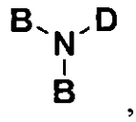
VIa-2

195. The conjugate of claim 192, wherein the conjugate is of the formula (VIa-3):



VIa-3

196. A conjugate of formula (VIb):



VIb

wherein:

–B is –T–L^B–X;

each occurrence of X is independently a ligand that includes a saccharide;

each occurrence of L^B is independently a covalent bond or a group derived from the covalent conjugation of a T with an X;

–D is –T–L^D–W;

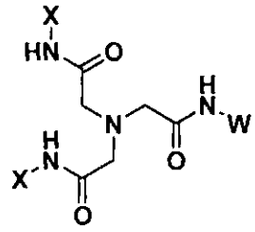
W is a drug;

each occurrence of L^D is independently a covalent bond or a group derived from the covalent conjugation of a T with a W;

each occurrence of T is independently a covalent bond or a bivalent, straight or branched, saturated or unsaturated, optionally substituted C_{1-30} hydrocarbon chain wherein one or more methylene units of T are optionally and independently replaced by -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -$S(O)_2$-, -N(R)SO_2-, -SO_2N(R)-, a heterocyclic group, an aryl group, or a heteroaryl group; and

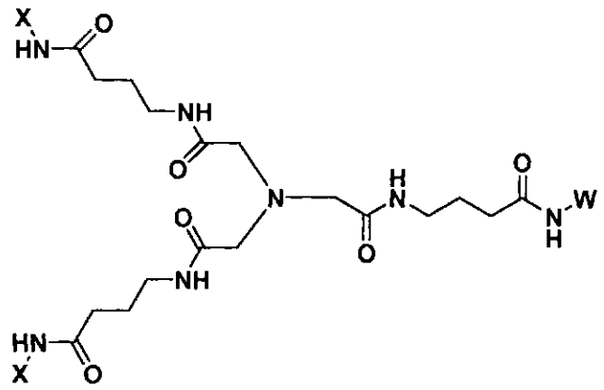
each occurrence of R is independently hydrogen, a suitable protecting group, or an acyl moiety, arylalkyl moiety, aliphatic moiety, aryl moiety, heteroaryl moiety, or heteroaliphatic moiety.

197. The conjugate of claim 196, wherein the conjugate is of the formula (VIb-1):



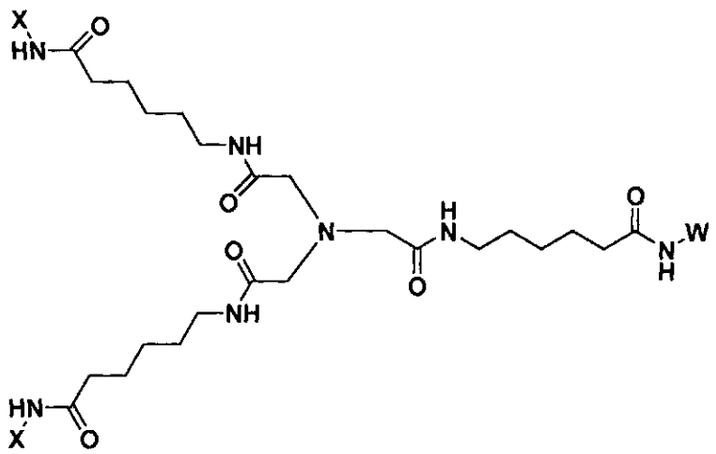
VIb-1

198. The conjugate of claim 196, wherein the conjugate is of the formula (VIb-2):



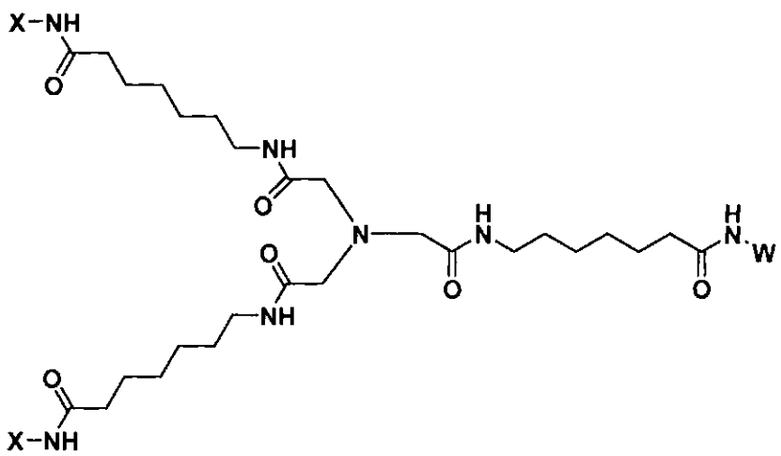
VIb-2

199. The conjugate of claim 196, wherein the conjugate is of the formula (VIb-3):



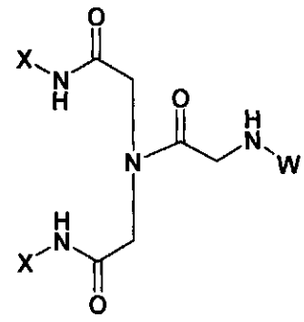
VIb-3

200. The conjugate of claim 196, wherein the conjugate is of the formula (VIb-4):



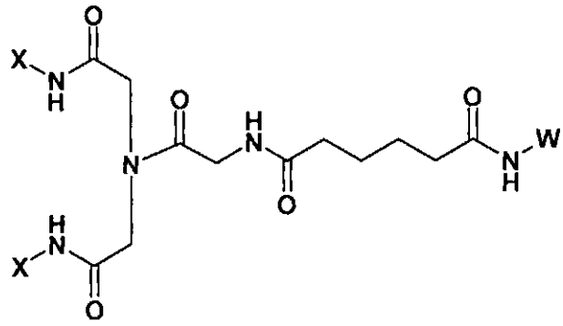
VIb-4

201. The conjugate of claim 196, wherein the conjugate is of the formula (VIb-5):



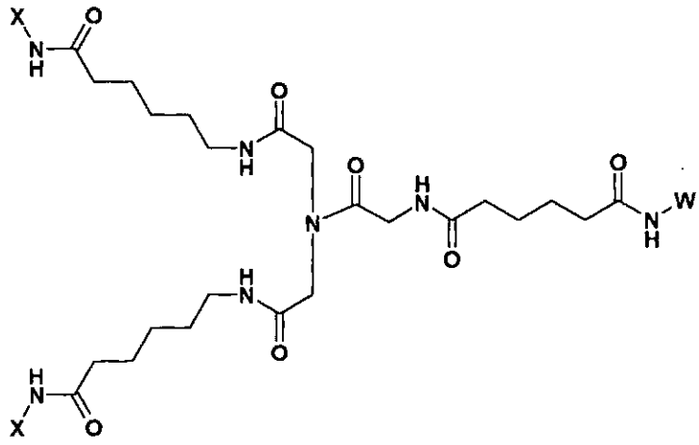
VIb-5

202. The conjugate of claim 196, wherein the conjugate is of the formula (VIb-6):



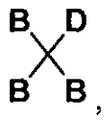
VIb-6

203. The conjugate of claim 196, wherein the conjugate is of the formula (VIb-7):



VIb-7

204. A conjugate of formula (VIc):



VIc

wherein:

–B is –T–L^B–X;

each occurrence of X is independently a ligand that includes a saccharide;

each occurrence of L^B is independently a covalent bond or a group derived from the covalent conjugation of a T with an X;

–D is –T–L^D–W;

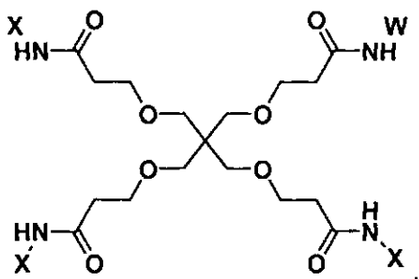
W is a drug;

each occurrence of L^D is independently a covalent bond or a group derived from the covalent conjugation of a T with a W;

each occurrence of T is independently a covalent bond or a bivalent, straight or branched, saturated or unsaturated, optionally substituted C_{1-30} hydrocarbon chain wherein one or more methylene units of T are optionally and independently replaced by -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, $-S(O)_2-$, $-N(R)SO_2-$, $-SO_2N(R)-$, a heterocyclic group, an aryl group, or a heteroaryl group; and

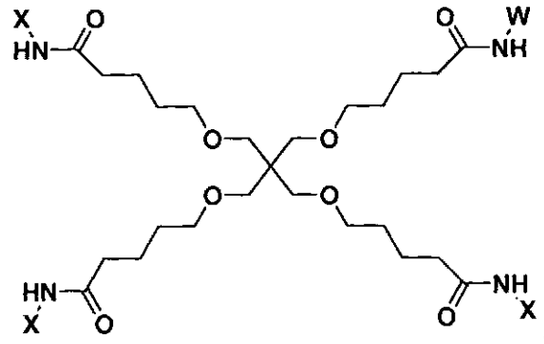
each occurrence of R is independently hydrogen, a suitable protecting group, or an acyl moiety, arylalkyl moiety, aliphatic moiety, aryl moiety, heteroaryl moiety, or heteroaliphatic moiety.

205. The conjugate of claim 204, wherein the conjugate is of the formula (VIc-1):



VIc-1

206. The conjugate of claim 204, wherein the conjugate is of the formula (VIc-2):



VIc-2

207. The conjugate of claim 192, 196 or 204, wherein each occurrence of T is independently a bivalent, straight or branched, saturated or unsaturated, optionally substituted C_{1-20} hydrocarbon chain wherein one or more methylene units of T are optionally and independently replaced by –O–, –S–, –N(R)–, –C(O)–, –C(O)O–, –OC(O)–, –N(R)C(O)–, –C(O)N(R)–, –S(O)–, –$S(O)_2$–, –N(R)SO_2–, –SO_2N(R)–, a heterocyclic group, an aryl group, or a heteroaryl group.

208. The conjugate of claim 207, wherein one, two, three, four, or five methylene units of T are optionally and independently replaced.

209. The conjugate of claim 207, wherein T is constructed from a C_{1-10} hydrocarbon chain wherein one or more methylene units of T are optionally and independently replaced by –O–, –S–, –N(R)–, –C(O)–, –C(O)O–, –OC(O)–, –N(R)C(O)–, –C(O)N(R)–, –S(O)–, –$S(O)_2$–, –N(R)SO_2–, –SO_2N(R)–, a heterocyclic group, an aryl group, or a heteroaryl group.

210. The conjugate of claim 207, wherein one or more methylene units of T is replaced by a heterocyclic group.

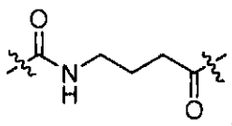
211. The conjugate of claim 207, wherein one or more methylene units of T is replaced by a triazole moiety.

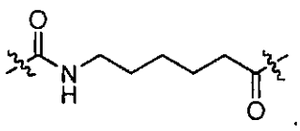
212. The conjugate of claim 207, wherein one or more methylene units of T is replaced by –C(O)–.

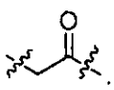
213. The conjugate of claim 207, wherein one or more methylene units of T is replaced by –C(O)N(R)–.

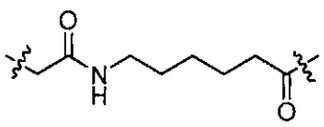
214. The conjugate of claim 207, wherein one or more methylene units of T is replaced by –O–.

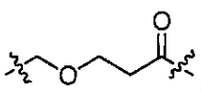
215. The conjugate of claim 207, wherein T is  .

216. The conjugate of claim 207, wherein T is  .

217. The conjugate of claim 207, wherein T is  .

218. The conjugate of claim 207, wherein T is  .

219. The conjugate of claim 207, wherein T is  .

220. The conjugate of claim 207, wherein T is  .

221. The conjugate of claim 207, wherein each occurrence of T is the same.

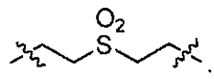
222. The conjugate of claim 192, 196 or 204, wherein at least one of L^B and L^D is a covalent bond.

223. The conjugate of claim 192, 196 or 204, wherein at least one of L^B and L^D is an optionally substituted moiety derived from conjugating an optionally substituted carbonyl-reactive, thiol-reactive, amine-reactive, or hydroxyl-reactive moiety of T with a carboxyl, thiol, amine, or hydroxyl group of X or W.

224. The conjugate of claim 192, 196 or 204, wherein at least one of L^B and L^D is an optionally substituted moiety derived from conjugating an optionally substituted carboxyl-

reactive, thiol-reactive, amine-reactive, or hydroxyl-reactive moiety of X or W with a carboxyl, thiol, amine, or hydroxyl group of T.

225. The conjugate of claim 192, 196 or 204, wherein at least one of L^B and L^D is



226. The conjugate of claim 192, 196 or 204, wherein at least one of L^B and L^D is a succinimide moiety.

227. The conjugate of any one of claims 192-226, wherein the drug is an anti-diabetic drug.

228. The conjugate of any one of claims 192-226, wherein the drug is an insulin sensitizer.

229. The conjugate of any one of claims 192-226, wherein the drug is an insulin secretatogue.

230. The conjugate of any one of claims 192-226, wherein the drug is an insulin molecule.

231. The conjugate of claim 230, wherein the insulin molecule is selected from the group consisting of human insulin, porcine insulin, and bovine insulin.

232. The conjugate of claim 230, wherein the insulin molecule is selected from the group consisting of insulin lispro, insulin aspart and insulin glulisine.

233. The conjugate of claim 230, wherein the insulin molecule is insulin glargine or insulin detemir.

234. The conjugate of claim 230, wherein the insulin molecule includes three disulfide bridges.

235. The conjugate of claim 230, wherein the insulin molecule is conjugated via the A1 amino acid residue.

236. The conjugate of claim 230, wherein the insulin molecule is conjugated via the B1 amino acid residue.

237. The conjugate of claim 230, wherein the insulin molecule is conjugated via the epsilon-amino group of Lys^{B29}.

238. The conjugate of claim 230, wherein the insulin molecule is insulin glulisine conjugated via the epsilon-amino group of Lys^{B3}.

239. The conjugate of any one of claims 192-226, wherein each occurrence of X is independently a ligand that includes a saccharide selected from the group consisting of glucose, mannose and L-fucose.

240. The conjugate of claim 239, wherein each occurrence of X is independently a ligand that includes a saccharide selected from the group consisting of mannosamine and beta-linked N-acetyl mannosamine.

241. The conjugate of claim 239, wherein each occurrence of X is independently a ligand that includes a saccharide selected from the group consisting of methylglucose, methylmannose, ethylglucose, ethylmannose, propylglucose and propylmannose.

242. The conjugate of claim 239, wherein each occurrence of X is a ligand that includes alpha-L-fucopyranoside.

243. The conjugate of claim 239, wherein each occurrence of X is a ligand that includes a bimannose.

244. The conjugate of claim 239, wherein each occurrence of X is a ligand that includes a trimannose.

245. The conjugate of claim 239, wherein each occurrence of X is a ligand that includes a linear trimannose.

246. The conjugate of claim 239, wherein each occurrence of X is a ligand that includes a branched trimannose.

247. The conjugate of claim 239, wherein each occurrence of X is a ligand that includes a saccharide and an amine group.

248. The conjugate of claim 247, wherein the saccharide and amine group are separated by a C_1-C_6 alkyl group.

249. The conjugate of claim 248, wherein each occurrence of X is independently a ligand that includes aminoethylglucose (AEG), aminoethylmannose (AEM), aminoethylbimannose (AEBM) or aminoethyltrimannose (AETM).

250. The conjugate of claim 249, wherein each occurrence of X is a ligand that includes aminoethyltrimannose (AETM).

251. The conjugate of claim 250, wherein the conjugate includes two or three occurrences where X is a ligand that includes aminoethyltrimannose (AETM).

252. The conjugate of any one of claims 192-226, wherein each occurrence of X is a ligand that includes a saccharide that is conjugated via an anomeric carbon.

253. The conjugate of claim 252, wherein the anomeric carbon is an alpha anomer.

254. The conjugate of any one of claims 192-226, wherein each occurrence of X is aminoethyltrimannose (AETM) conjugated to the conjugate framework via an alpha anomeric carbon; and W is an insulin molecule conjugated to the conjugate framework via the epsilon-amino group of Lys^{B29}.

255. A sustained release formulation comprising a conjugate of any one of the preceding claims.

256. The formulation of claim 255, wherein the formulation exhibits a zero-order release of the conjugate when administered to a mammal under fasting conditions.

257. The formulation of claim 255, wherein the formulation exhibits a zero-order release of the conjugate when administered subcutaneously to a mammal under fasting conditions.

258. The formulation of claim 255, wherein the drug is an insulin molecule and the formulation comprises protamine and zinc.

259. The formulation of claim 258, wherein the insulin molecule is selected from the group consisting of human insulin, porcine insulin, and bovine insulin.

260. The formulation of claim 258, wherein the insulin molecule is insulin glargine or insulin detemir.

261. The formulation of claim 258, wherein the insulin molecule includes three disulfide bridges.

262. The formulation of claim 258, wherein the formulation includes from about 0.05 to about 10 mg protamine/mg conjugate.

263. The formulation of claim 258, wherein the formulation includes from about 1 to about 5 mg protamine/mg conjugate

264. The formulation of claim 258, wherein the formulation includes from about 0.006 to about 0.5 mg zinc/mg conjugate.

265. The formulation of claim 258, wherein the formulation includes from about 0.1 to about 0.25 mg zinc/mg conjugate.

266. The formulation of claim 258, wherein the formulation includes protamine and zinc in a ratio (w/w) in the range of about 100:1 to about 5:1.

267. The formulation of claim 258, wherein the formulation includes protamine and zinc in a ratio (w/w) in the range of about 40:1 to about 10:1.

268. The formulation of any one of claims 258-267, wherein the formulation further comprises an antimicrobial preservative.

269. The formulation of claim 268, wherein the antimicrobial preservative is selected from the group consisting of m-cresol, phenol, methylparaben, and propylparaben.

270. The formulation of claim 268, wherein the antimicrobial preservative is m-cresol.

271. The formulation of claim 270, wherein the formulation comprises from about 0.1 to about 1.0% v/v m-cresol.

272. The formulation of claim 270, wherein the formulation comprises from about 0.15 to about 0.35% v/v m-cresol.

273. The formulation of any one of claims 258-267, wherein the formulation further comprises an isotonic agent.

274. The formulation of claim 273, wherein the isotonic agent is a polyol.

275. The formulation of claim 274, wherein the isotonic agent is selected from the group consisting of mannitol, propylene glycol and glycerol.

276. The formulation of claim 275, wherein the isotonic agent is glycerol.

277. The formulation of claim 273, wherein the isotonic agent is a salt.

278. The formulation of claim 277, wherein the salt is NaCl.

279. The formulation of claim 278, wherein the formulation comprises from about 0.05 to about 0.5 M NaCl.

280. The formulation of claim 278, wherein the formulation comprises from about 0.1 to about 0.2 M NaCl.

281. The formulation of any one of claims 258-267, wherein the formulation further comprises an amount of unconjugated insulin molecule.

282. The formulation of claim 281, wherein the formulation comprises a molar ratio of conjugated insulin molecule to unconjugated insulin molecule in the range of about 100:1 to about 1:1.

283. The formulation of claim 281, wherein the formulation comprises a molar ratio of conjugated insulin molecule to unconjugated insulin molecule in the range of about 25:1 to about 2:1.

284. The formulation of any one of claims 255-283, wherein the conjugate is as defined in any one of claims 327-350.

285. A pump delivery system comprising a conjugate of any one of claims 1-254, wherein the pump delivery system operates by infusing the conjugate into a mammal.

286. The pump of claim 285, wherein the pump operates by infusing the conjugate intravenously, subcutaneously, or intraperitoneally.

287. The pump of claim 285, wherein the conjugate is as defined in any one of claims 327-350.

288. A method of treating hyperglycemia comprising administering a formulation of any one of claims 255-284 to a mammalian patient in need thereof.

289. The method of claim 288, wherein the patient is diabetic.

290. The method of claim 288, wherein the patient has an infection associated with impaired glycemic control.

291. The method of claim 288, wherein the formulation does not include a lectin.

292. The method of claim 288, wherein the formulation is administered by subcutaneous injection.

293. The method of claim 288, wherein the patient is a human.

294. The method of claim 288, wherein the drug is an anti-diabetic drug.

295. The method of claim 288, wherein the drug is an insulin sensitizer.

296. The method of claim 288, wherein the drug is an insulin secretatogue.

297. The method of claim 288, wherein the drug is an insulin molecule.

298. The method of claim 297, wherein the conjugate is administered such that the average daily dose of the insulin molecule is in the range of 10 to 200 U.

299. The method of claim 298, wherein the conjugate is administered daily.

300. The method of claim 298, wherein the conjugate is administered weekly.

301. The method of claim 298, wherein the conjugate is administered monthly.

302. The method of claim 298, wherein the patient is also receiving an insulin sensitizer.

303. The method of claim 298, wherein the patient is also receiving an insulin secretagogue.

304. The method of any one of claims 288-303, wherein the formulation does not include a lectin.

305. The method of any one of claims 288-304, wherein the conjugate is as defined in any one of claims 327-350.

306. A method comprising administering a conjugate of any one of claims 1-254 to a mammalian patient in need thereof.

307. The method of claim 306, wherein the drug is an insulin molecule.

308. The method of claim 307, wherein the conjugate induces less hypoglycemia than an unconjugated version of the insulin molecule.

309. The method of claim 307 or 308, wherein the conjugate is as defined in any one of claims 327-350.

310. A method comprising administering a formulation of any one of claims 255-283 to a mammalian patient in need thereof.

311. The method of claim 310, wherein the drug is an insulin molecule.

312. The method of claim 311, wherein the formulation induces less hypoglycemia than a formulation comprising an unconjugated version of the insulin molecule.

313. The method of claim 311, wherein the formulation induces a lower HbA1c than a formulation comprising an unconjugated version of the insulin molecule.

314. The method of any one of claims 311-313, wherein the conjugate is as defined in any one of claims 327-350.

315. The method of any one of claims 306-314, further comprising administering a triggering amount of an exogenous saccharide to the patient.

316. The method of claim 315, wherein the exogenous saccharide is mannose.

317. The method of claim 315, wherein the exogenous saccharide is L-fucose.

318. The method of claim 315, wherein the exogenous saccharide is N-acetyl glucosamine.

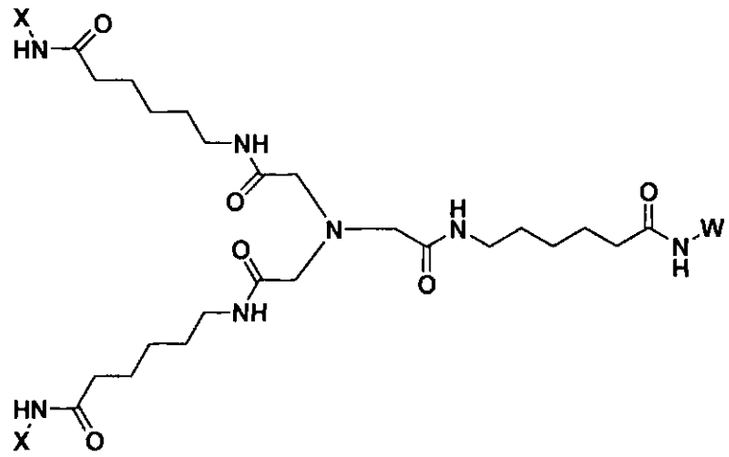
319. The method of claim 315, wherein the exogenous saccharide is alpha-methyl mannose.

320. The method of claim 315, wherein the conjugate or formulation and the exogenous saccharide are administered to the mammal via different routes.

321. The method of claim 320, wherein the conjugate or formulation is administered subcutaneously and the exogenous saccharide is administered orally.

322. The method of claim 320, wherein the conjugate or formulation is administered subcutaneously and the exogenous saccharide is administered intravenously.

323. A conjugate of formula (VIb-3):

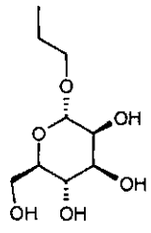


VIb-3

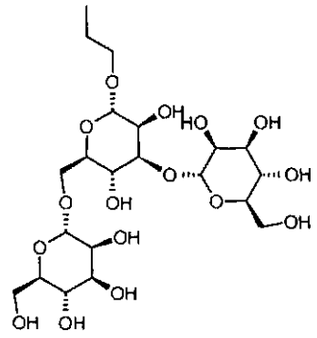
wherein:

W is an insulin molecule; and

each occurrence of -X is



or



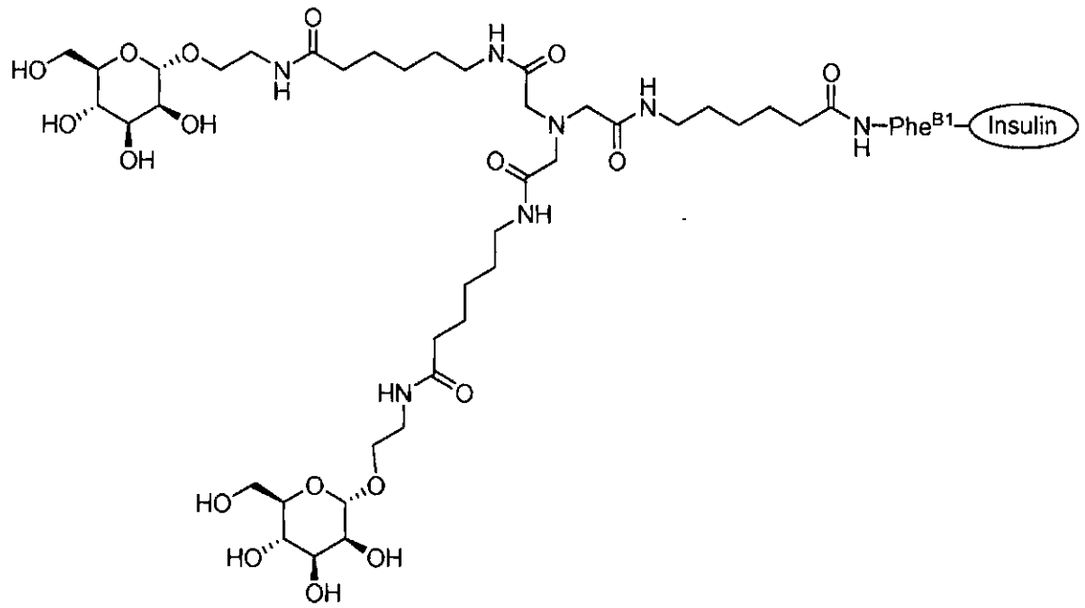
.

324. The conjugate of claim 323, wherein the insulin molecule is selected from the group consisting of human insulin, porcine insulin, and bovine insulin.

325. The conjugate of claim 323, wherein the insulin molecule is insulin glargine or insulin detemir.

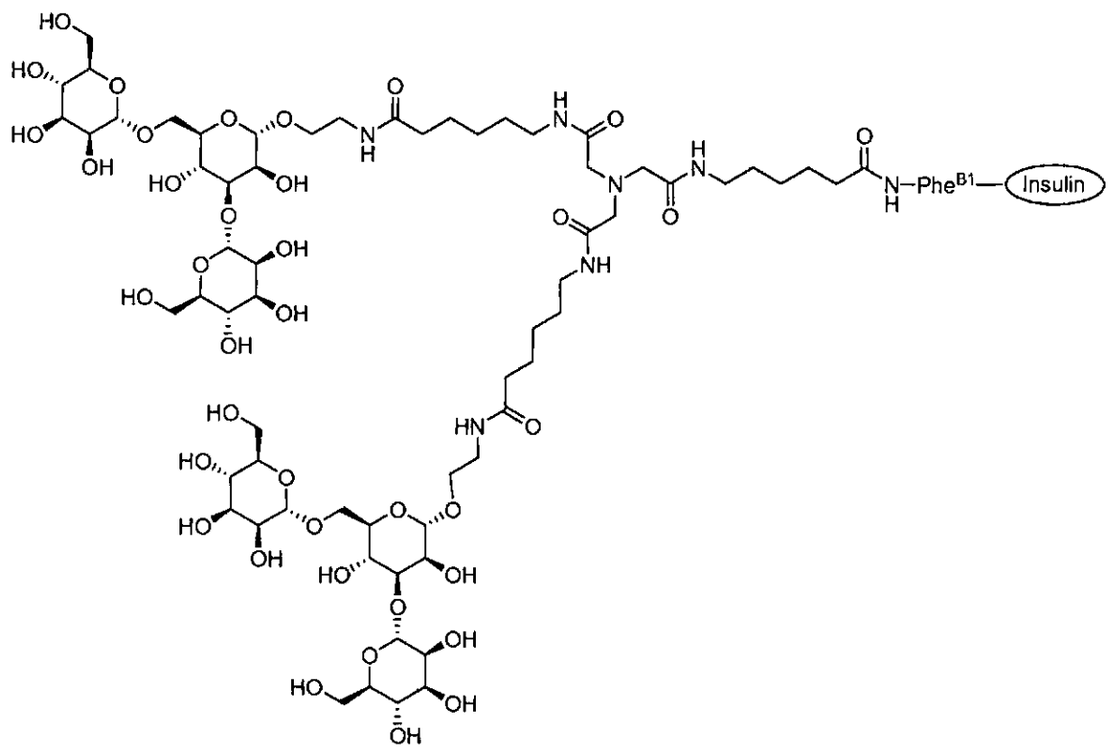
326. The conjugate of claim 323, wherein the insulin molecule includes three disulfide bridges.

327. A conjugate of formula:



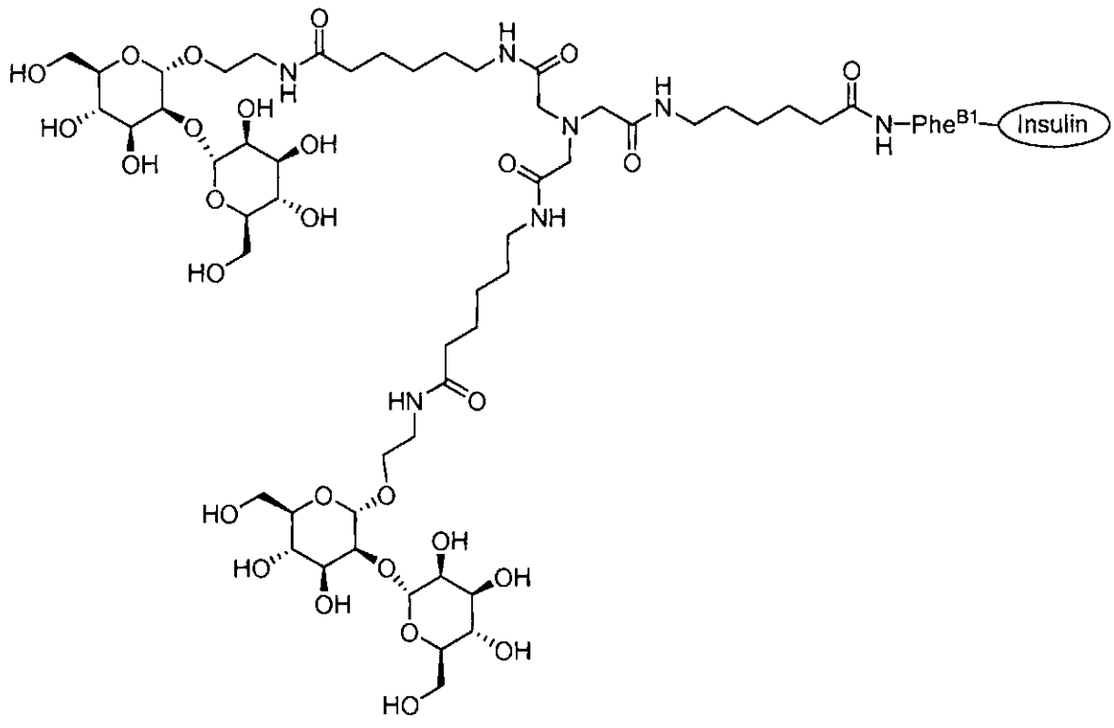
I-1

328. A conjugate of formula:



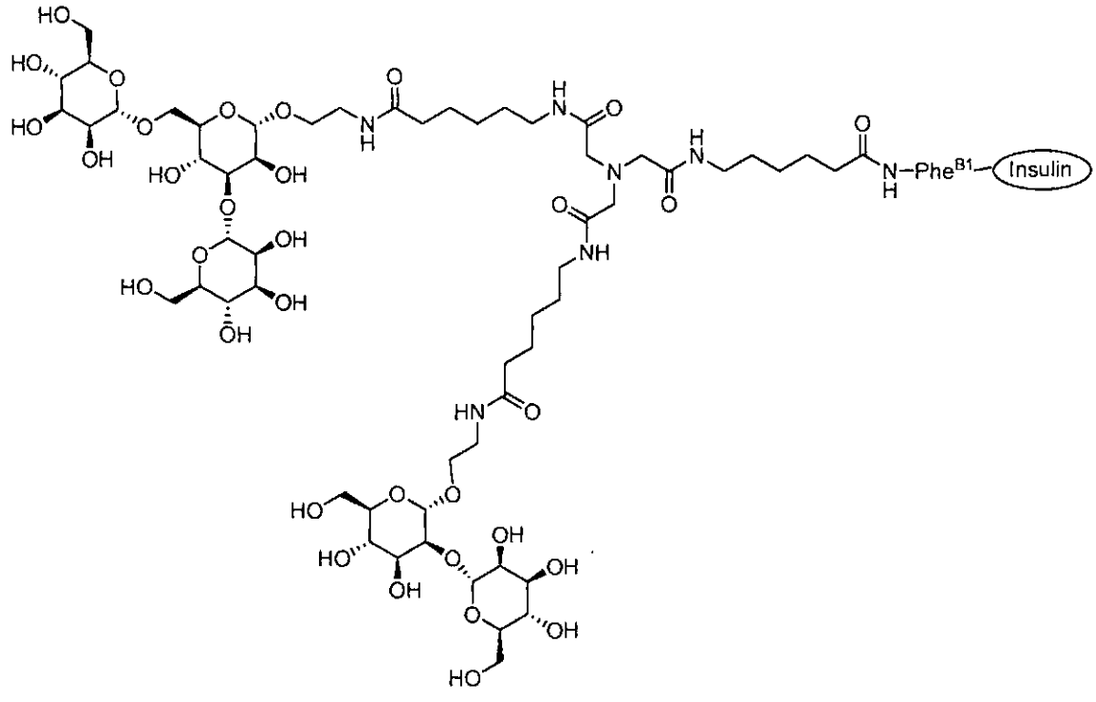
I-2

329. A conjugate of formula:



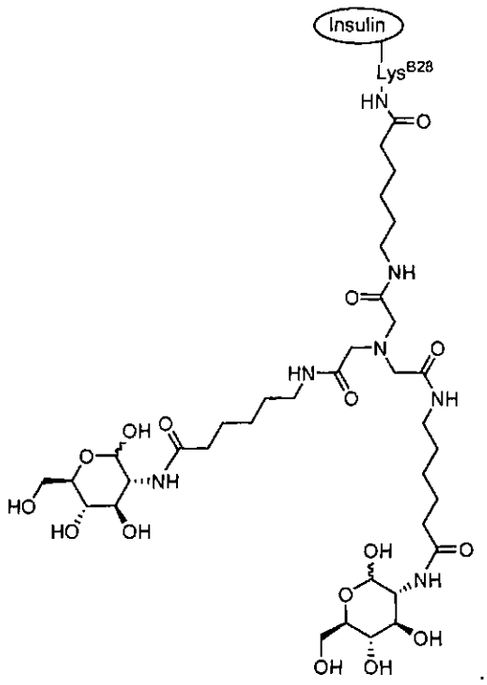
I-3

330. A conjugate of formula:



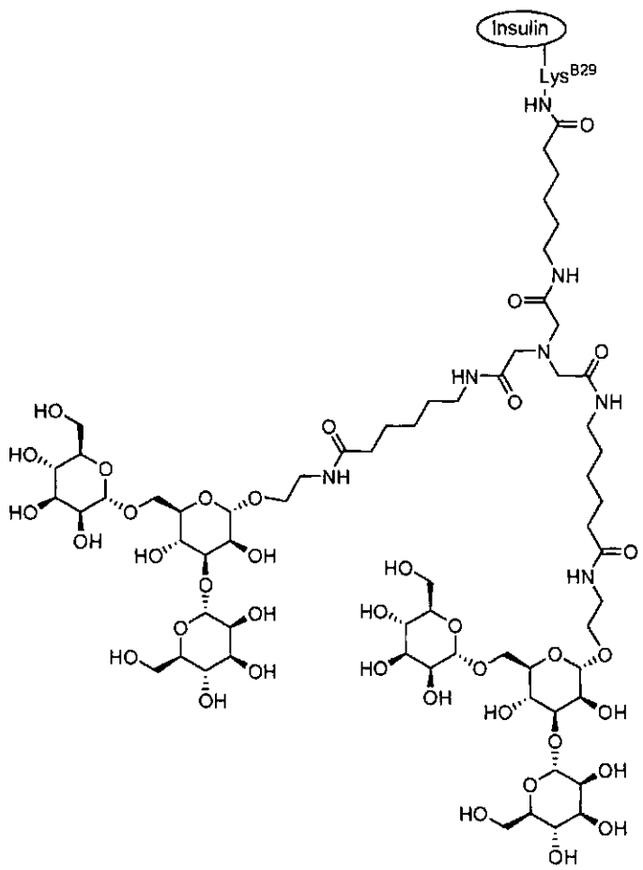
I-4

331. A conjugate of formula:



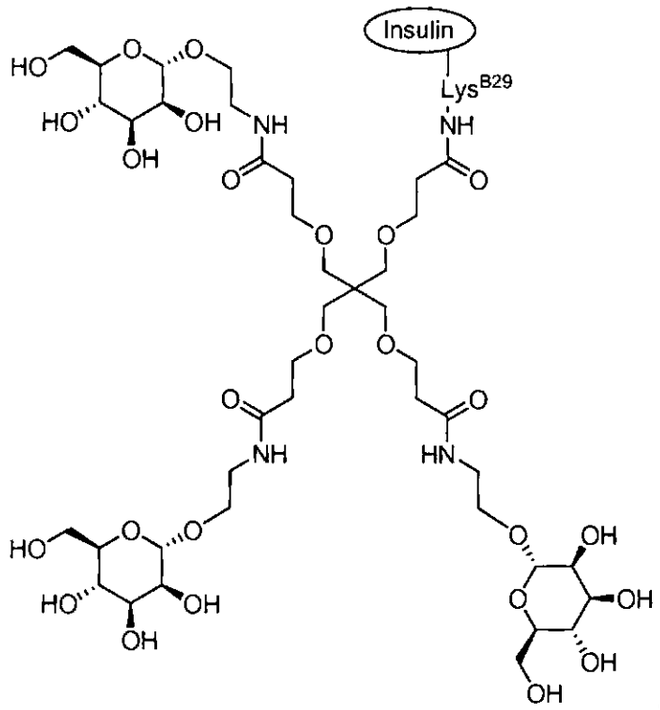
I-5

332. A conjugate of formula:



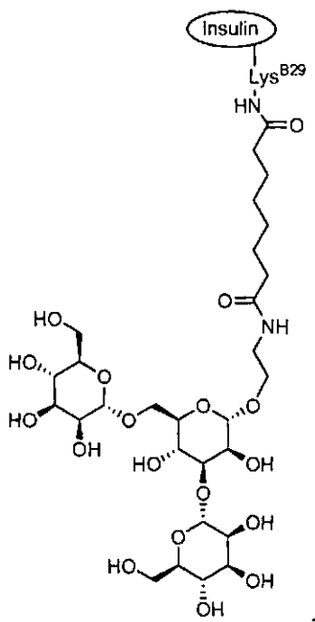
I-6

335. A conjugate of formula:



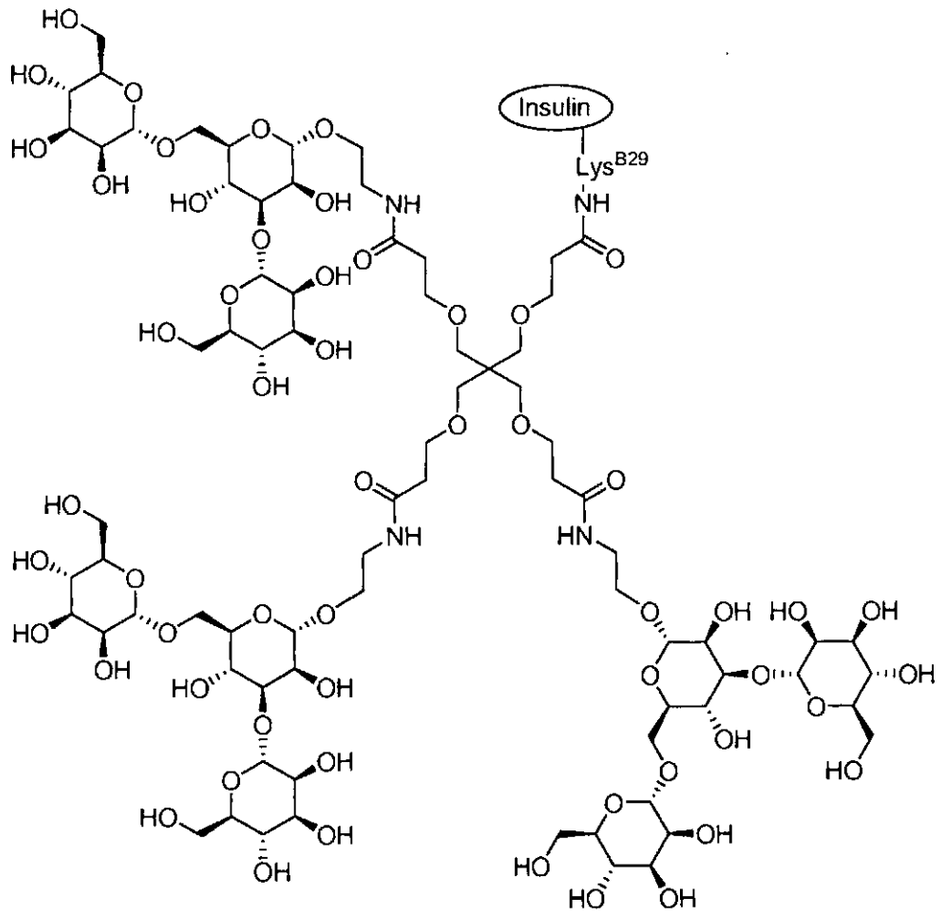
I-9

336. A conjugate of formula:



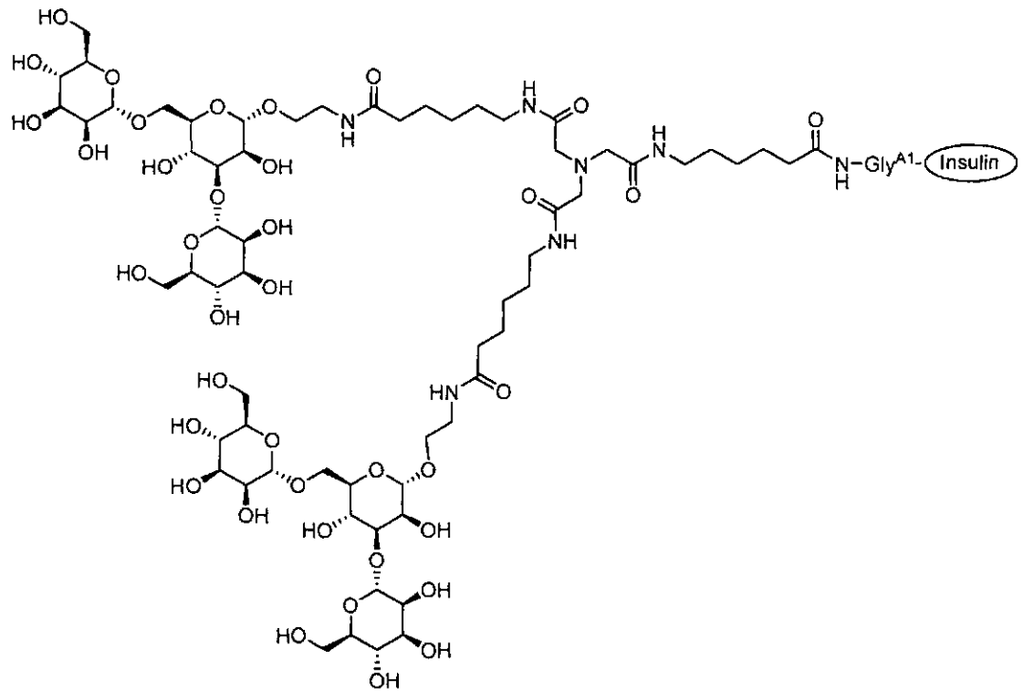
I-10

337. A conjugate of formula:



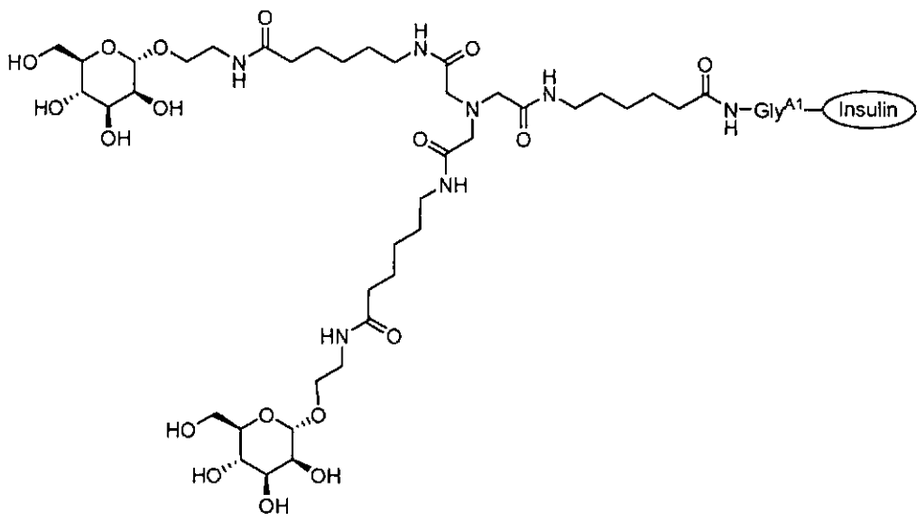
I-11

338. A conjugate of formula:



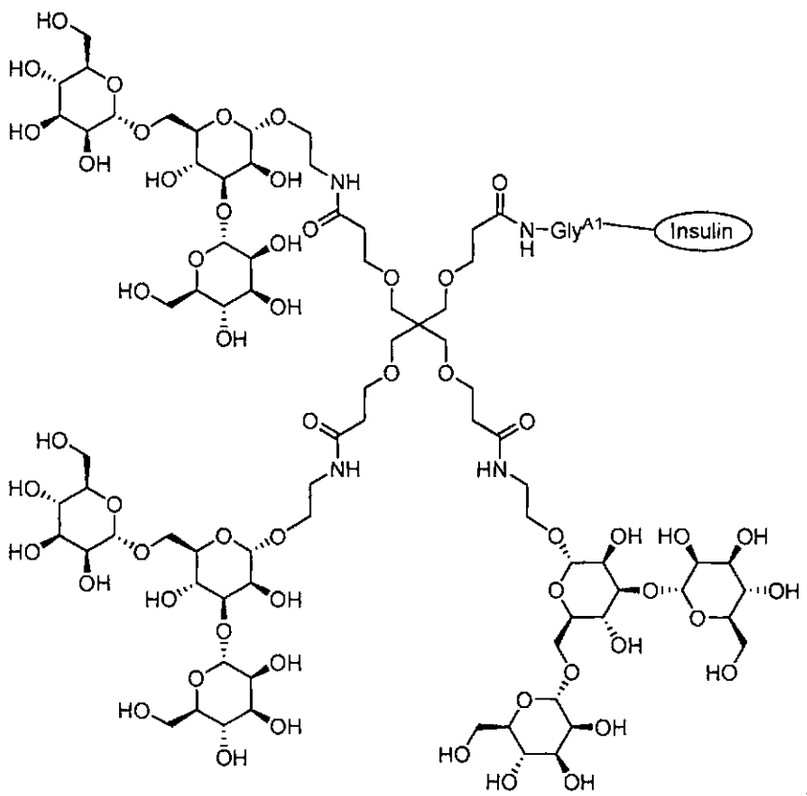
I-12

339. A conjugate of formula:



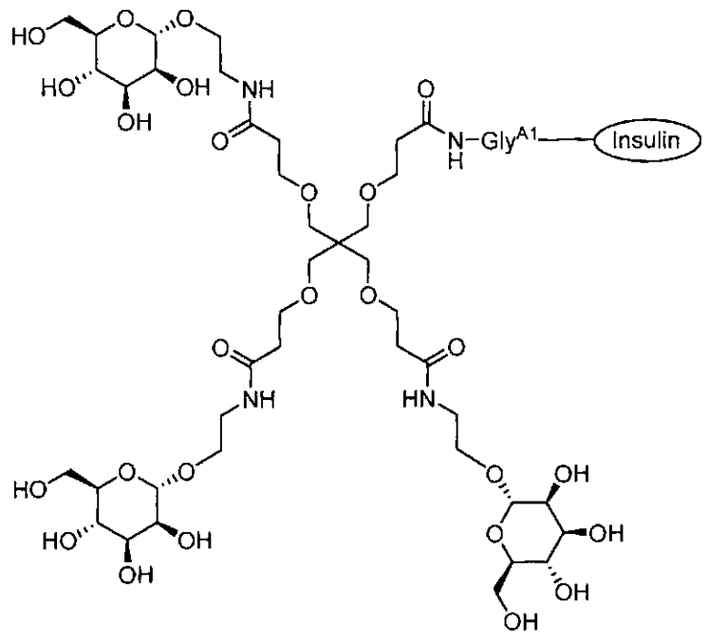
I-13

340. A conjugate of formula:



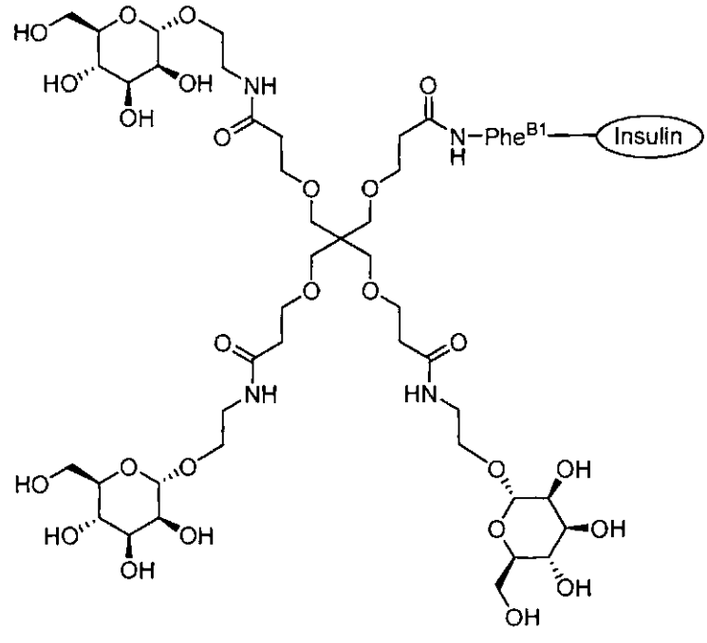
I-14

341. A conjugate of formula:



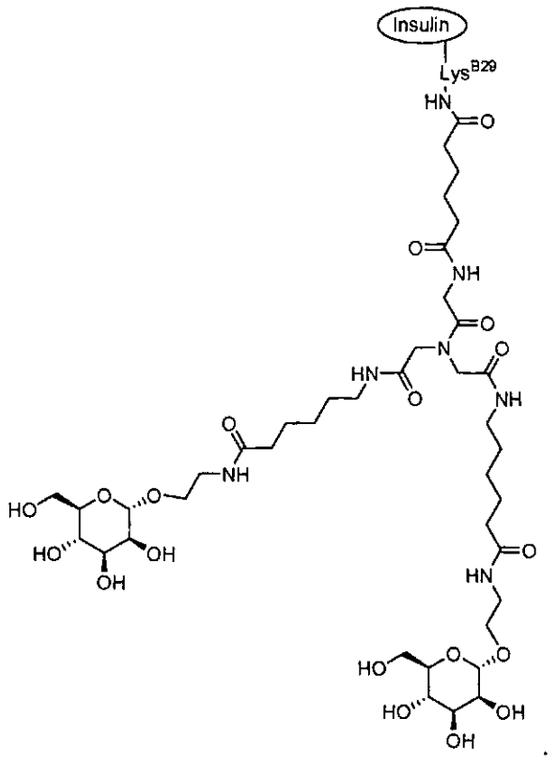
I-15

342. A conjugate of formula:



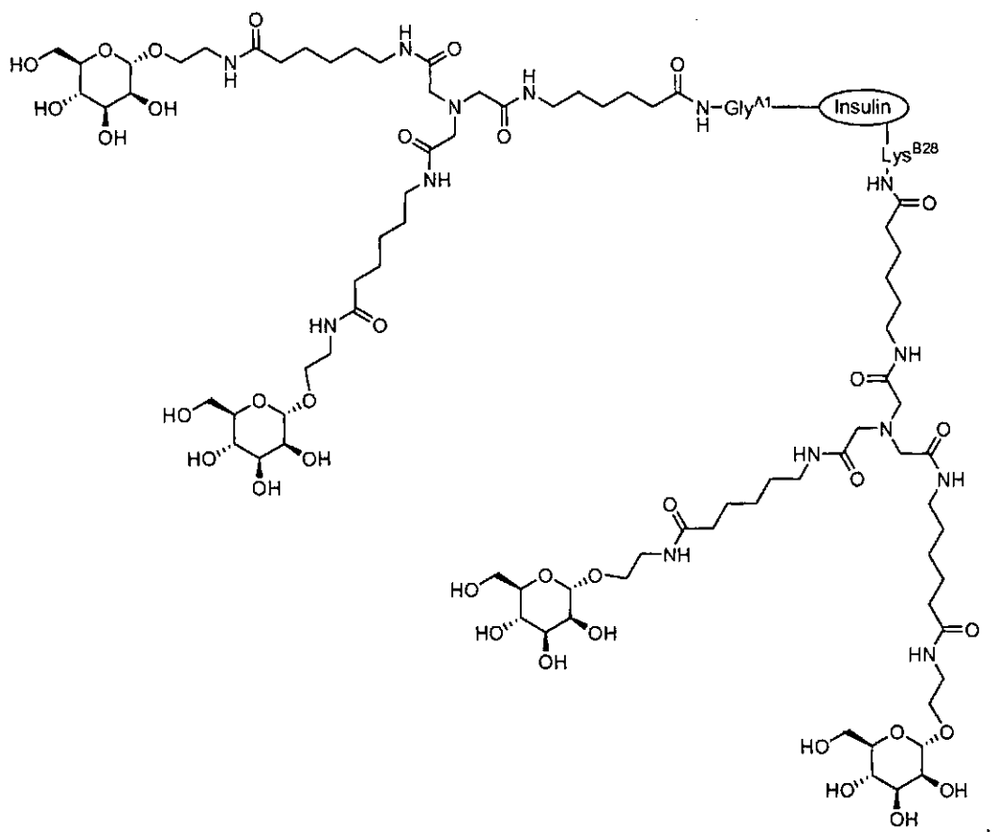
I-16

343. A conjugate of formula:



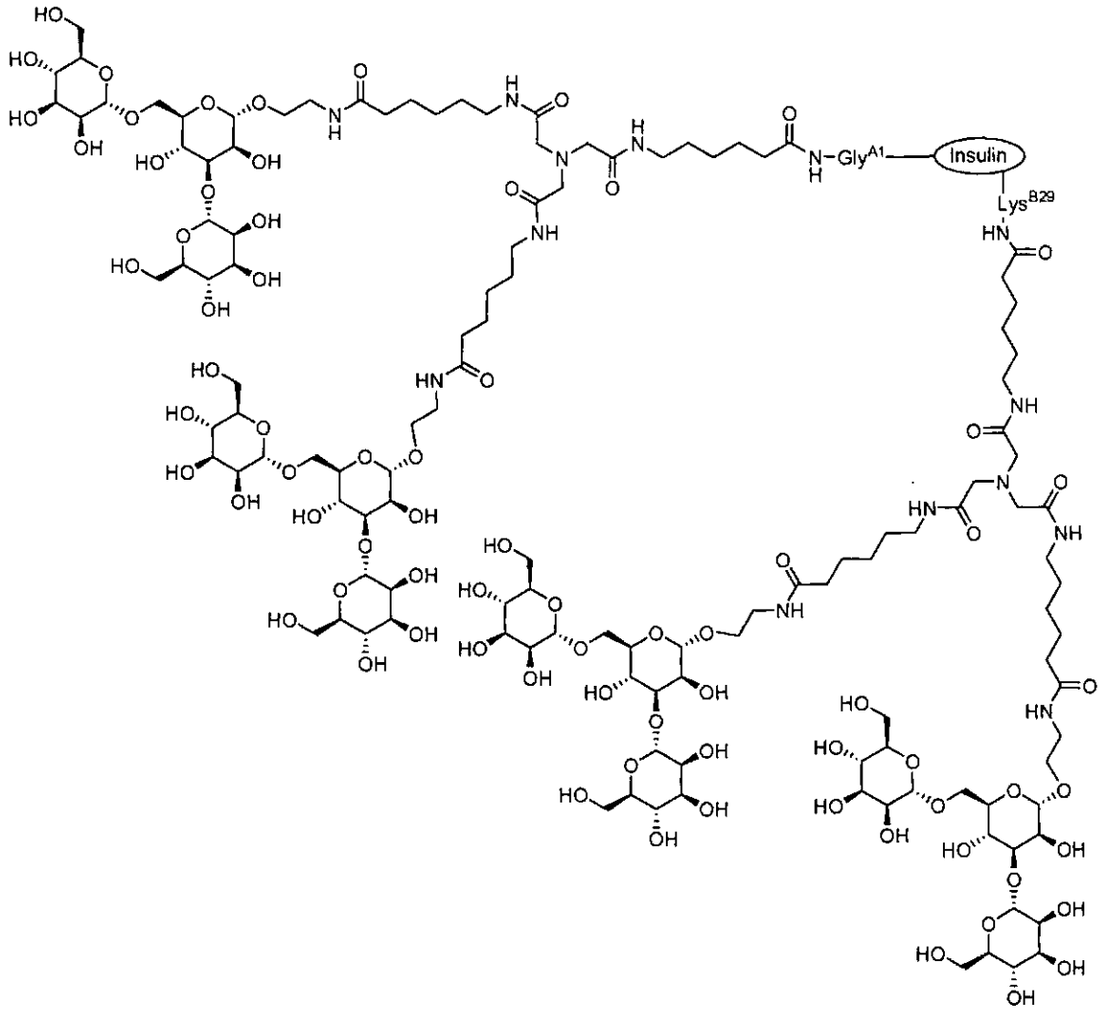
I-17

344. A conjugate of formula:



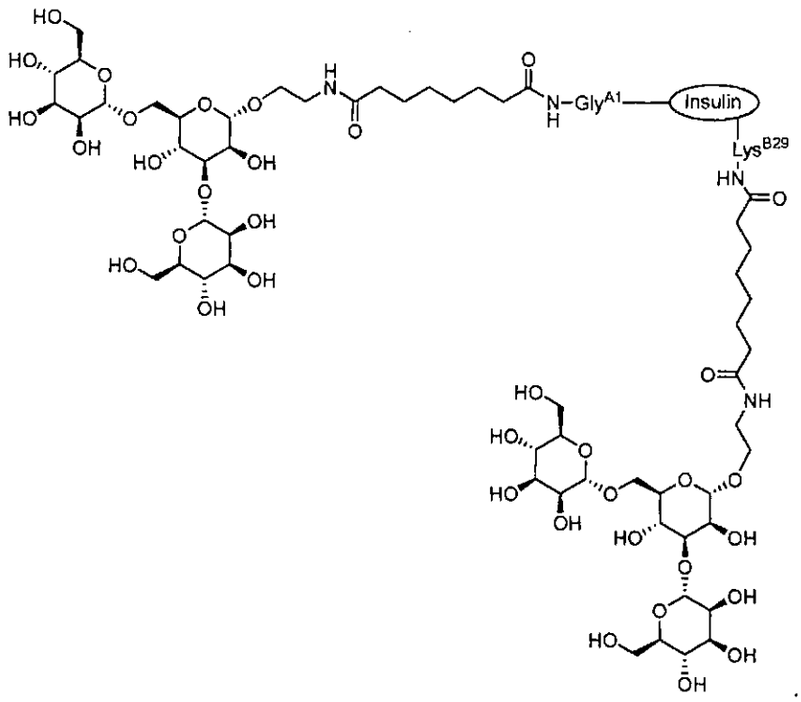
II-1

345. A conjugate of formula:



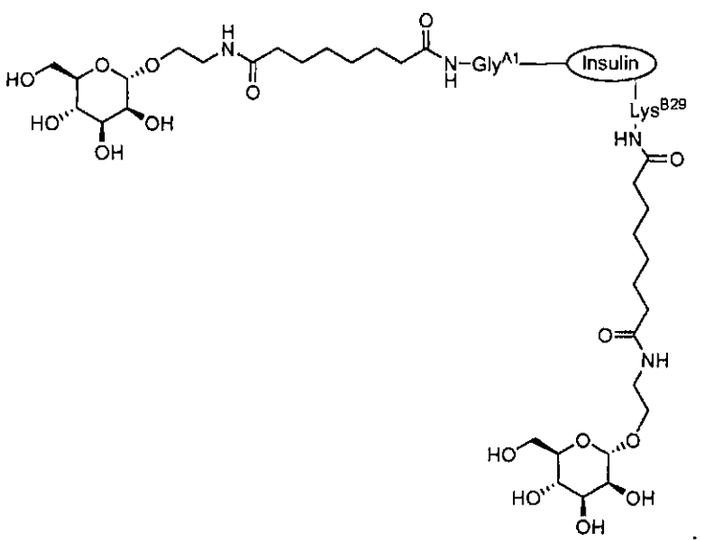
II-2

346. A conjugate of formula:



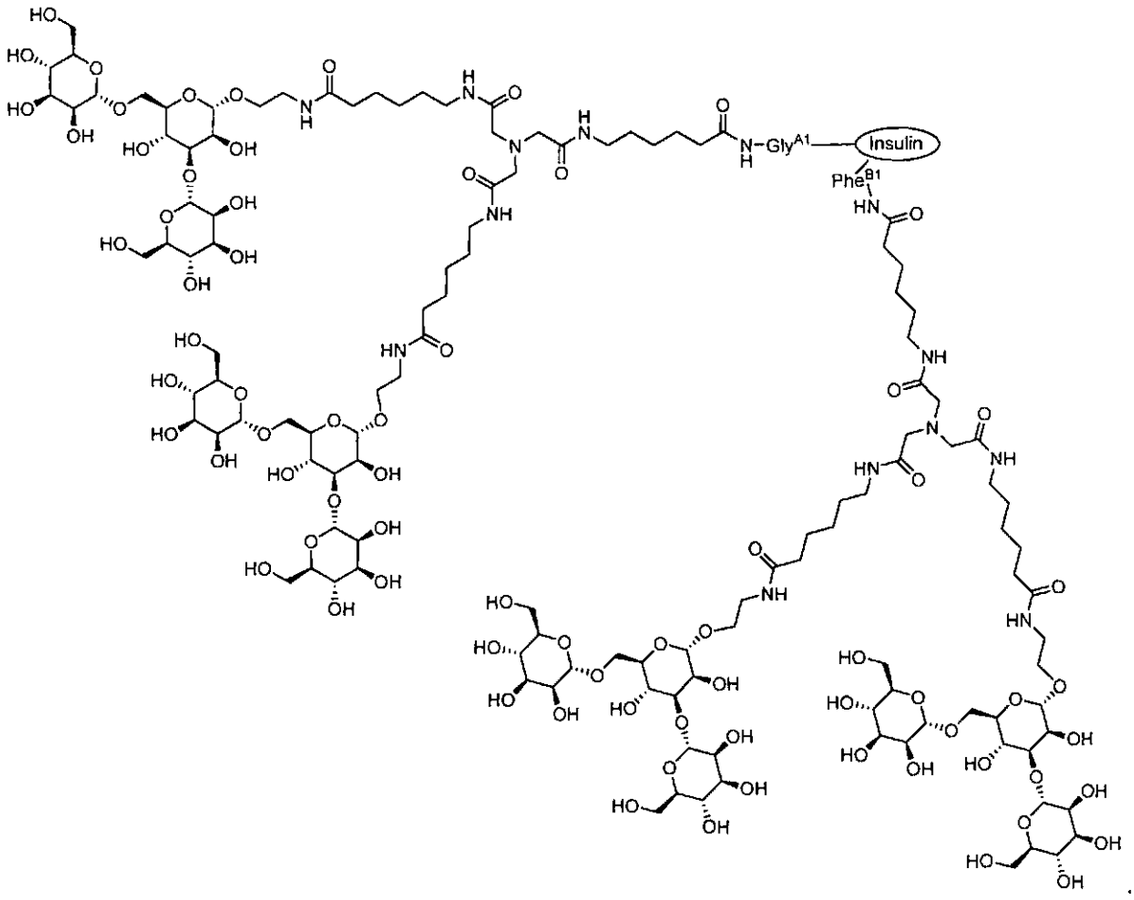
II-3

347. A conjugate of formula:



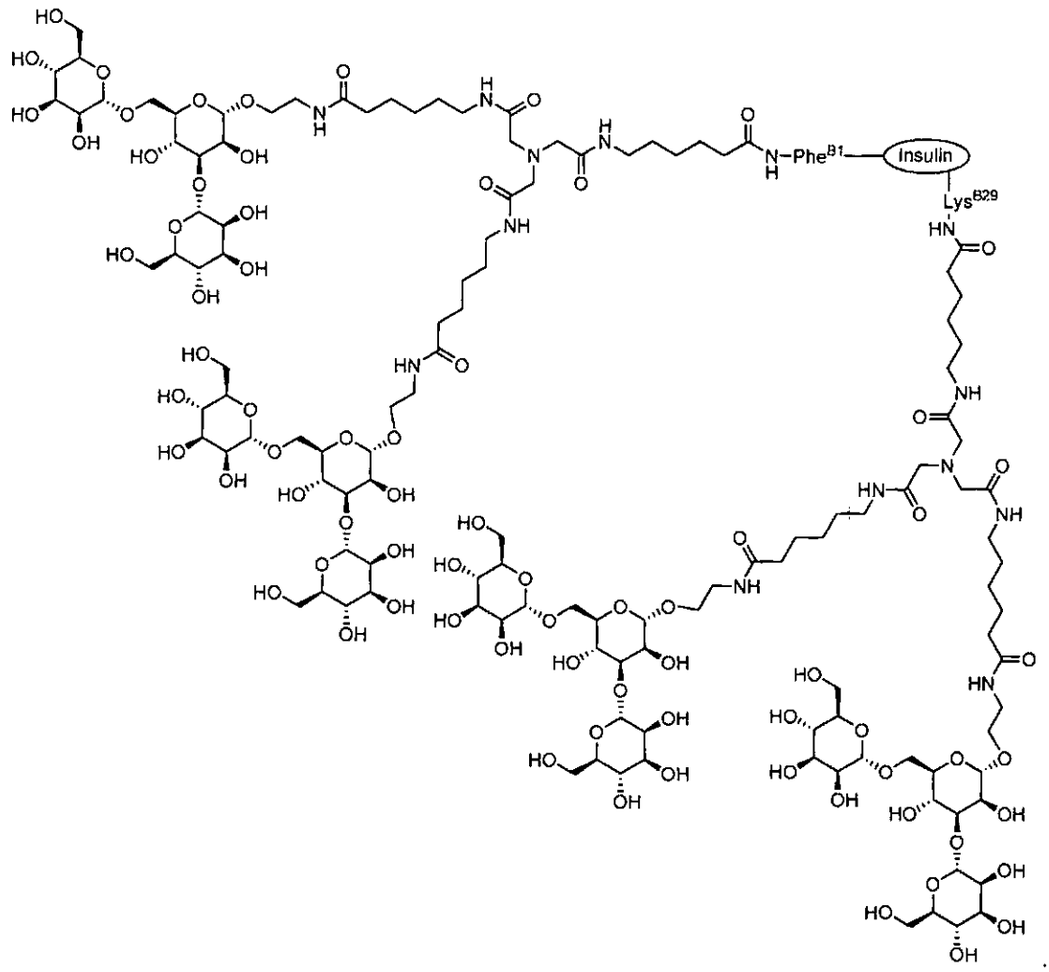
II-4

348. A conjugate of formula:



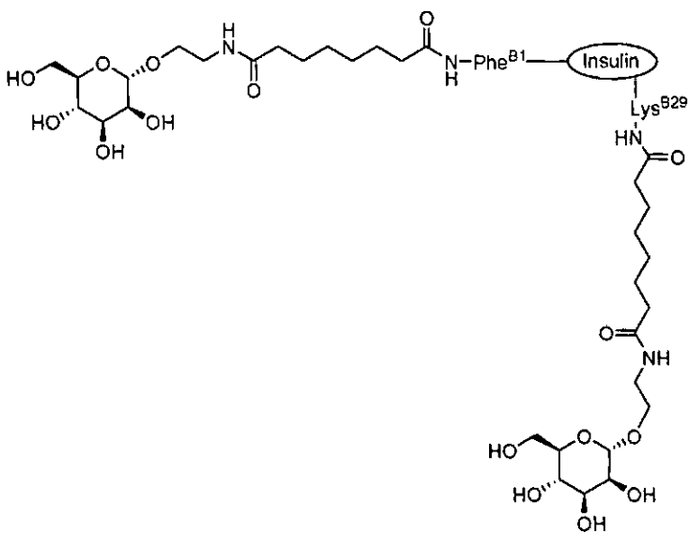
II-5

349. A conjugate of formula:



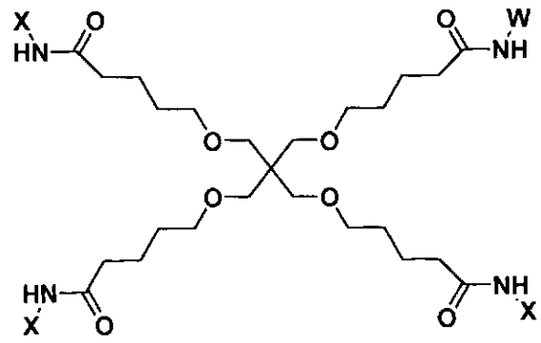
II-6

350. A conjugate of formula:



II-7

351. A conjugate of formula (VIc-2):

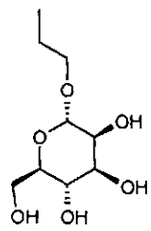


VIc-2

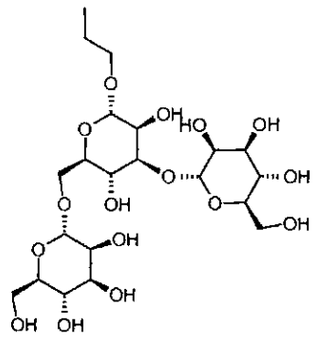
wherein:

W is an insulin molecule; and

each occurrence of -X is



or



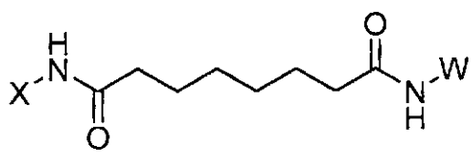
.

352. The conjugate of claim 351, wherein the insulin molecule is selected from the group consisting of human insulin, porcine insulin, and bovine insulin.

353. The conjugate of claim 351, wherein the insulin molecule is insulin glargine or insulin detemir.

354. The conjugate of claim 351, wherein the insulin molecule includes three disulfide bridges.

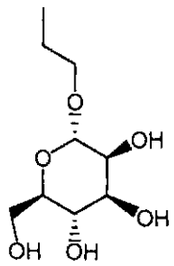
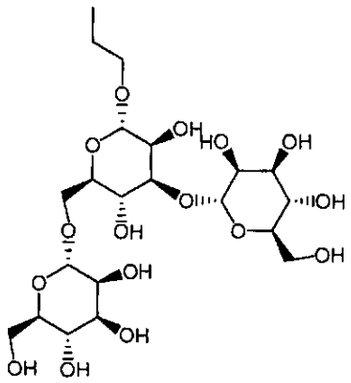
355. A conjugate of formula (VId-1):



VId-1

wherein:

W is an insulin molecule; and

-X is  or  .

356. The conjugate of claim 355, wherein the insulin molecule is selected from the group consisting of human insulin, porcine insulin, and bovine insulin.

357. The conjugate of claim 355, wherein the insulin molecule is insulin glargine or insulin detemir.

358. The conjugate of claim 355, wherein the insulin molecule includes three disulfide bridges.

359. A sustained release formulation comprising the conjugate of any one of claims 327-350, wherein the formulation comprises protamine and zinc.

360. The formulation of claim 359, wherein the formulation includes:
from about 1 to about 5 mg protamine/mg conjugate; and
from about 0.1 to about 0.25 mg zinc/mg conjugate.

361. The formulation of claim 359, wherein the formulation includes protamine and zinc in a ratio (w/w) in the range of about 40:1 to about 10:1.

362. The formulation of any one of claims 359-361, wherein the formulation further comprises an amount of unconjugated insulin molecule.

363. The formulation of claim 362, wherein the formulation comprises a molar ratio of conjugated insulin molecule to unconjugated insulin molecule in the range of about 25:1 to about 2:1.

364. The formulation of any one of claims 359-363, wherein the formulation further comprises an antimicrobial preservative.

365. The formulation of claim 364, wherein the antimicrobial preservative is m-cresol.

366. The formulation of claim 365, wherein the formulation comprises from about 0.15 to about 0.35% v/v m-cresol.

367. The formulation of any one of claims 359-366, wherein the formulation further comprises an isotonic agent.

368. The formulation of claim 367, wherein the isotonic agent is glycerol.

369. The formulation of claim 367, wherein the isotonic agent is NaCl.

370. The formulation of claim 369, wherein the formulation comprises from about 0.1 to about 0.2 M NaCl.

371. The formulation of claim 359, wherein the formulation further comprises an amount of unconjugated insulin molecule.

372. The formulation of claim 371, wherein the formulation comprises a molar ratio of conjugated insulin molecule to unconjugated insulin molecule in the range of about 25:1 to about 2:1.

373. The formulation of claim 372, wherein the formulation further comprises an antimicrobial preservative.

374. The formulation of claim 373, wherein the antimicrobial preservative is m-cresol.

375. The formulation of claim 374, wherein the formulation comprises from about 0.15 to about 0.35% v/v m-cresol.

376. The formulation of claim 375, wherein the formulation further comprises an isotonic agent.

377. The formulation of claim 376, wherein the isotonic agent is glycerol.

378. The formulation of claim 376, wherein the isotonic agent is NaCl.

379. The formulation of claim 378, wherein the formulation comprises from about 0.1 to about 0.2 M NaCl.

380. A sustained release formulation comprising the conjugate of any one of claims 327-350, wherein the formulation comprises:

about 3.6 mg protamine/mg conjugate; and

about 0.2 mg zinc/mg conjugate.

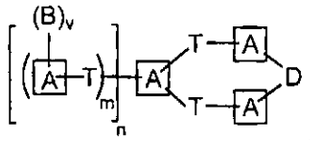
381. The formulation of claim 380, wherein the formulation further comprises an amount of unconjugated insulin molecule, and the molar ratio of conjugated insulin molecule to unconjugated insulin molecule is about 5:1.

382. The formulation of claim 381, wherein the formulation further comprises about 0.2% v/v m-cresol.

383. The formulation of claim 382, wherein the formulation further comprises glycerol.

384. The formulation of claim 382, wherein the formulation further comprises about 0.15 M NaCl.

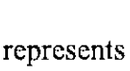
385. A conjugate of formula (VIII):



,

VIII

each occurrence of represents a potential branch within the conjugate;

each occurrence of  represents a potential repeat within a branch of the conjugate;

each occurrence of [A] is independently a covalent bond, a carbon atom, a heteroatom, or an optionally substituted group selected from the group consisting of acyl, aliphatic, heteroaliphatic, aryl, heteroaryl, and heterocyclic;

each occurrence of T is independently a covalent bond or a bivalent, straight or branched, saturated or unsaturated, optionally substituted C_{1-30} hydrocarbon chain wherein one or more methylene units of T are optionally and independently replaced by -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, $-S(O)_2-$, $-N(R)SO_2-$, $-SO_2N(R)-$, a heterocyclic group, an aryl group, or a heteroaryl group;

each occurrence of R is independently hydrogen, a suitable protecting group, or an acyl moiety, arylalkyl moiety, aliphatic moiety, aryl moiety, heteroaryl moiety, or heteroaliphatic moiety;

–B is $–T–L^B–X$;

each occurrence of X is independently a ligand that includes a saccharide;

each occurrence of L^B is independently a covalent bond or a group derived from the covalent conjugation of a T with an X;

–D is $–T–L^D–W$;

each occurrence of W is independently a drug;

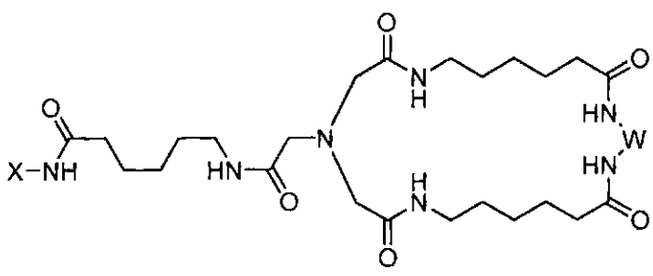
each occurrence of L^D is independently a covalent bond or a group derived from the covalent conjugation of a T with a W;

each occurrence of n is independently an integer from 0 to 5, inclusive;

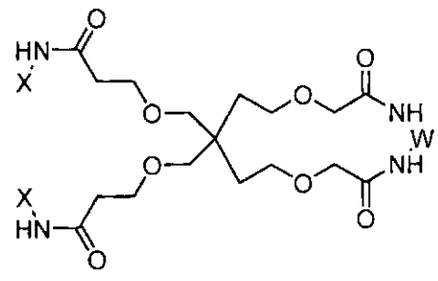
each occurrence of m is independently an integer from 1 to 5, inclusive; and

each occurrence of v is independently an integer from 0 to 5, inclusive, with the proviso that at least one occurrence of n is ≥ 1 and at least one occurrence of v is ≥ 1.

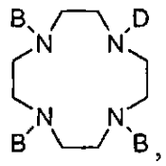
386. The conjugate of claim 385, wherein the conjugate is of formula:



or



387. A conjugate of formula (IX):



IX

wherein:

–B is –T–L^B–X;

each occurrence of T is independently a covalent bond or a bivalent, straight or branched, saturated or unsaturated, optionally substituted C_{1-30} hydrocarbon chain wherein one or more methylene units of T are optionally and independently replaced by -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -$S(O)_2$-, -N(R)SO_2-, -SO_2N(R)-, a heterocyclic group, an aryl group, or a heteroaryl group;

each occurrence of R is independently hydrogen, a suitable protecting group, or an acyl moiety, arylalkyl moiety, aliphatic moiety, aryl moiety, heteroaryl moiety, or heteroaliphatic moiety;

each occurrence of X is independently a ligand that includes a saccharide;

each occurrence of L^B is independently a covalent bond or a group derived from the covalent conjugation of a T with an X;

–D is –T–L^D–W;

each occurrence of W is independently a drug; and

each occurrence of L^D is independently a covalent bond or a group derived from the covalent conjugation of a T with a W.

388. A conjugate comprising an insulin molecule conjugated to one or more ligands that are independently selected from the group consisting of aminoethylglucose (AEG), aminoethylmannose (AEM), aminoethylbimannose (AEBM), aminoethyltrimannose (AETM), β-aminoethyl-N-acetylglucosamine (AEGA), and aminoethylfucose (AEF).

389. The conjugate of claim 388, wherein the insulin molecule is conjugated via the A1 amino acid residue.

390. The conjugate of claim 388, wherein the insulin molecule is conjugated via the B1 amino acid residue.

391. The conjugate of claim 388, wherein the insulin molecule is conjugated via the epsilon-amino group of Lys^{B29}.

392. The conjugate of claim 388, wherein the insulin molecule is insulin glulisine conjugated via the epsilon-amino group of Lys^{B3}.

393. The conjugate of any one of claim 389-392, wherein the one or more ligands are aminoethylglucose (AEG).

394. The conjugate of any one of claim 389-392, wherein the one or more ligands are aminoethylmannose (AEM).

395. The conjugate of any one of claim 389-392, wherein the one or more ligands are aminoethylbimannose (AEBM).

396. The conjugate of any one of claim 389-392, wherein the one or more ligands are aminoethyltrimannose (AETM).

397. The conjugate of any one of claim 389-392, wherein the one or more ligands are β-aminoethyl-N-acetylglucosamine (AEGA).

398. The conjugate of any one of claim 389-392, wherein the one or more ligands are aminoethylfucose (AEF).

399. The conjugate of claim 388, wherein the insulin molecule is conjugated to two or more separate ligands.

400. The conjugate of claim 399, wherein the insulin molecule is conjugated to two separate ligands.

401. The conjugate of claim 399, wherein the insulin molecule is conjugated to three separate ligands.

402. The conjugate of claim 399, wherein the insulin molecule is conjugated to four separate ligands.

403. The conjugate of claim 399, wherein the two or more separate ligands are conjugated to a single conjugate framework that is also conjugated to the insulin molecule.

404. The conjugate of claim 399, wherein the two or more separate ligands and insulin molecule are each located on a separate branch of a single branched conjugate framework.

405. The conjugate of claim 404, wherein the two or more separate ligands and insulin molecule are each located on termini of separate branches of a single branched conjugate framework.

406. The conjugate of claim 399, wherein the two or more separate ligands are conjugated to the insulin molecule via two or more different conjugation points.

407. The conjugate of claim 406, wherein the insulin molecule is conjugated via the A1 amino acid residue and the epsilon-amino group of Lys^{B29}.

408. The conjugate of claim 407, wherein the insulin molecule is conjugated to two separate conjugate frameworks that are each conjugated to one or more separate ligands.

409. The conjugate of claim 407, wherein the insulin molecule is conjugated to two separate conjugate frameworks that are each conjugated to one ligand.

410. The conjugate of claim 407, wherein the insulin molecule is conjugated to two separate branched conjugate frameworks that are each conjugated to two ligands.

411. The conjugate of claim 410, wherein the ligands are located on separate branches of the branched conjugate frameworks.

412. The conjugate of claim 411, wherein the ligands are located on termini of separate branches of the branched conjugate frameworks.

413. The conjugate of any one of claims 399-412, wherein the two or more separate ligands are aminoethylglucose (AEG).

414. The conjugate of any one of claims 399-412, wherein the two or more separate ligands are aminoethylmannose (AEM).

415. The conjugate of any one of claims 399-412, wherein the two or more separate ligands are aminoethylbimannose (AEBM).

416. The conjugate of any one of claims 399-412, wherein the two or more separate ligands are aminoethyltrimannose (AETM).

417. The conjugate of any one of claims 399-412, wherein the two or more separate ligands are β-aminoethyl-N-acetylglucosamine (AEGA).

418. The conjugate of any one of claims 399-412, wherein the two or more separate ligands are aminoethylfucose (AEF).

419. A conjugate comprising an insulin molecule conjugated to aminoethylglucose (AEG).

420. A conjugate comprising an insulin molecule conjugated to aminoethylmannose (AEM).

421. A conjugate comprising an insulin molecule conjugated to aminoethylbimannose (AEBM).

422. A conjugate comprising an insulin molecule conjugated to aminoethyltrimannose (AETM).

423. A conjugate comprising an insulin molecule conjugated to β-aminoethyl-N-acetylglucosamine (AEGA).

424. A conjugate comprising an insulin molecule conjugated to aminoethylfucose (AEF).

425. The conjugate of any one of claims 419-424, wherein the insulin molecule is conjugated via the A1 amino acid residue.

426. The conjugate of any one of claims 419-424, wherein the insulin molecule is conjugated via the B1 amino acid residue.

427. The conjugate of any one of claims 419-424, wherein the insulin molecule is conjugated via the epsilon-amino group of Lys^{B29}.

428. The conjugate of any one of claims 419-424, wherein the insulin molecule is insulin glulisine conjugated via the epsilon-amino group of Lys^{B3}.

429. The conjugate of any one of claims 419-424, wherein the insulin molecule is conjugated via the A1 amino acid residue and the epsilon-amino group of Lys^{B29}.

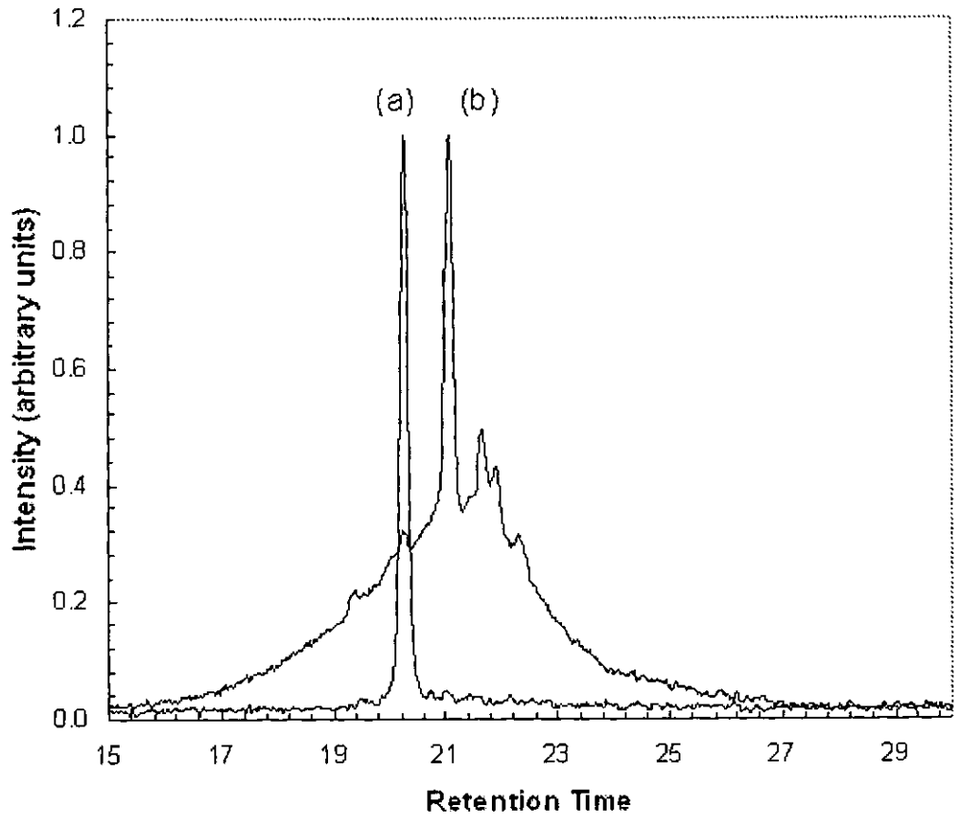

1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Intensity (arbitrary units)
(a)
(b)
15
17
19
21
23
25
27
29
Retention Time

Figure 1

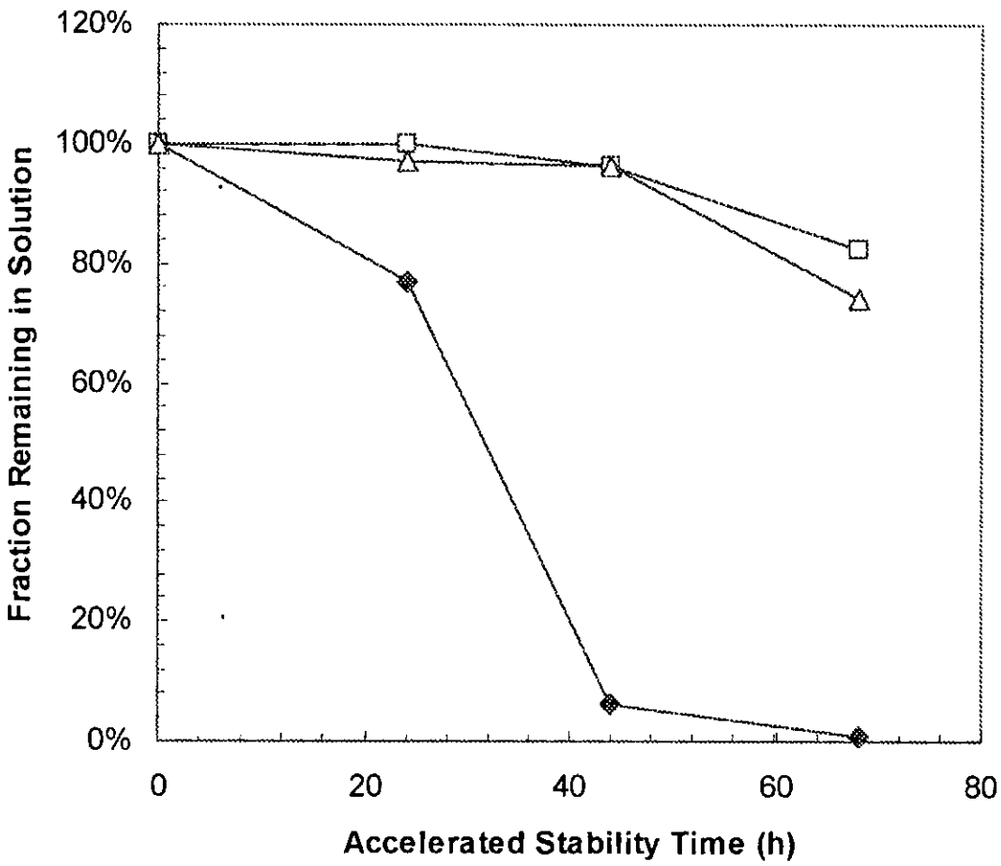

120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
Fraction Remaining in Solution
0
20
40
60
80
Accelerated Stability Time (h)

Figure 2

(a) IPC Peak Retention Times, %Free Insulin, and %Desamido Insulin

Sample	Peak 1 RT[1] (min)	Peak 2 RT (min)	Peak 3 RT (min)	% Purity IPC	% Free Insulin	% Desamido Insulin
HS-1-60-1 (fresh)	20.62	-	-	>99	<0.1	<0.1
HS-1-60-1 (AST, PBS)	20.61	19.19	-	85	<0.1	<0.1
HS-1-60-1 (AST, HEPES)	20.65	-	-	>99	<0.1	<0.1
TL-13-85 (fresh)	20.46	-	-	>99	<0.1	<0.1
TL-13-85 (AST, PBS)	20.40	19.84	18.91	30	<0.1	<0.1
TL-13-85 (AST, HEPES)	20.46	-	-	>99	<0.1	<0.1

[1]C8 reverse phase column, water:acetonitrile (0.1% TFA) elution gradient, RT = Retention Time

(b) Mass Spectroscopy Data on IPC's and IPC Breakdown Products

Sample	Peak 1 MW (Da)	Peak 2 MW (Da)	Peak 3 MW (Da)
HS-1-60-1 (fresh)	6730 [2]	-	-
HS-1-60-1 (AST, PBS)	6730	5947	-
HS-1-60-1 (AST, HEPES)	6730	-	-
TL-13-85 (fresh)	6829 [2]	-	-
TL-13-85 (AST, PBS)	6829	5944	7928
TL-13-85 (AST, HEPES)	6829	-	-

[2]The two IPC's shown here have different structures and, therefore, different MW's

Figure 3

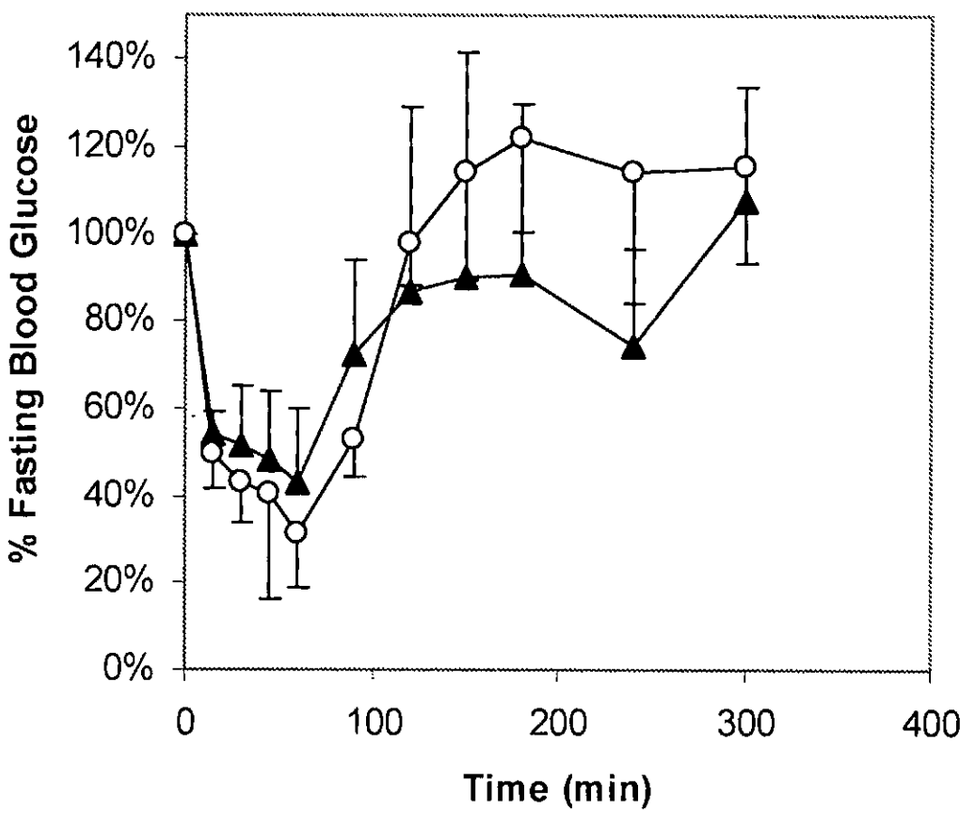

% Fasting Blood Glucose
140%
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0
100
200
300
400
Time (min)

Figure 4

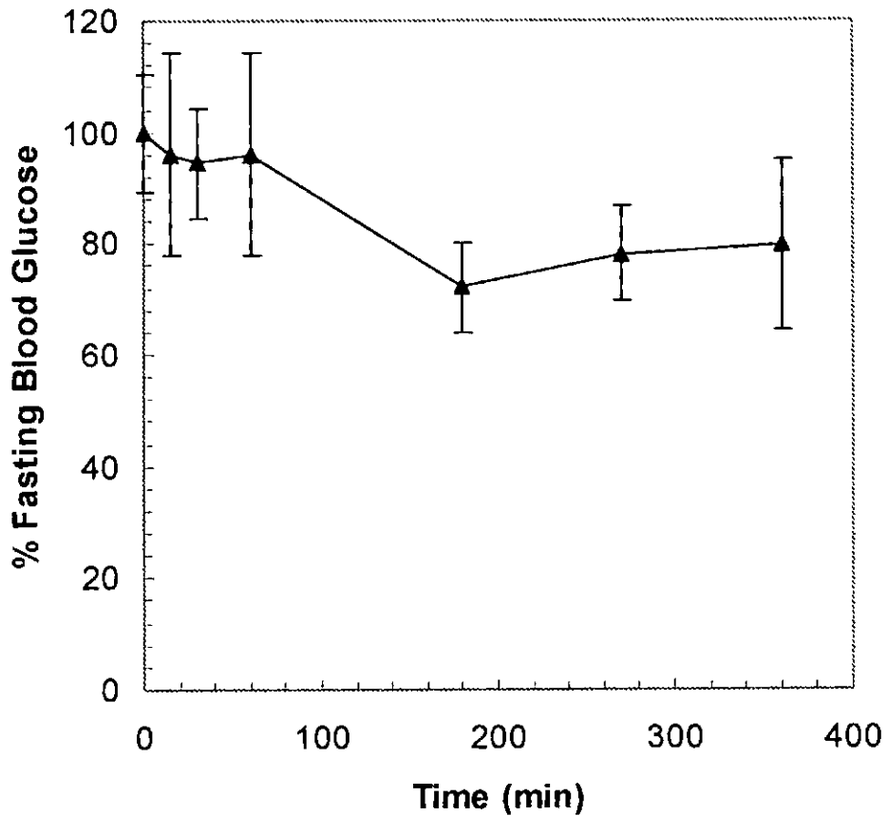

120
100
80
60
40
20
0
% Fasting Blood Glucose
0
100
200
300
400
Time (min)

Figure 5

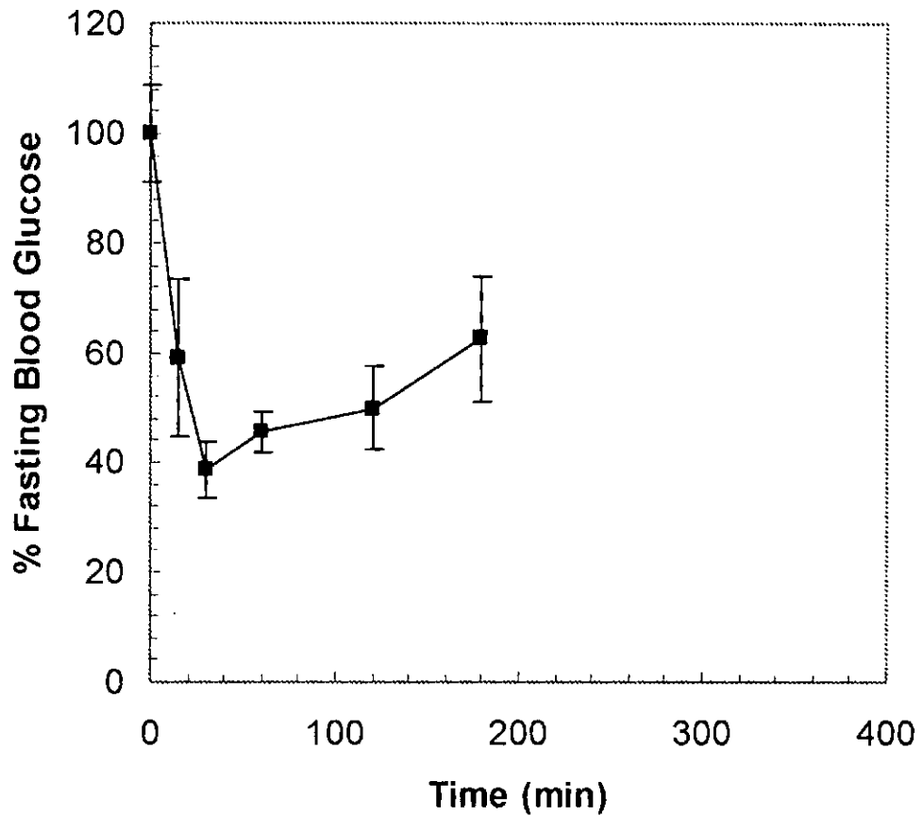

120
100
80
60
40
20
0
% Fasting Blood Glucose
0
100
200
300
400
Time (min)

Figure 6

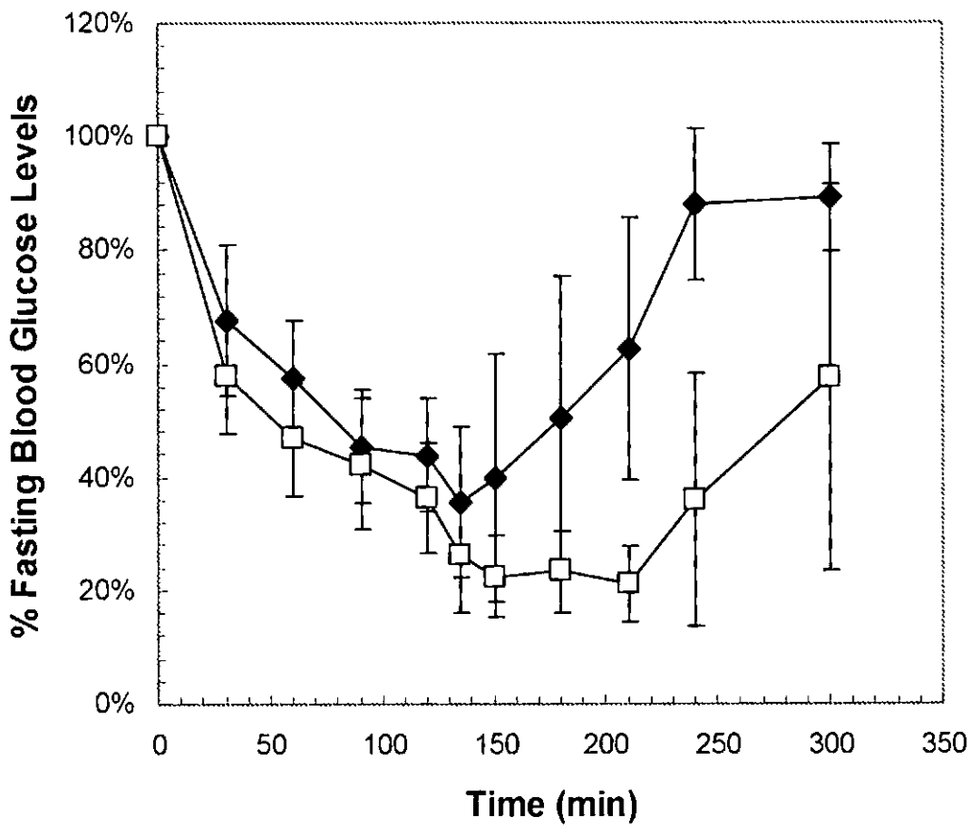

120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
% Fasting Blood Glucose Levels
0
50
100
150
200
250
300
350
Time (min)

Figure 7

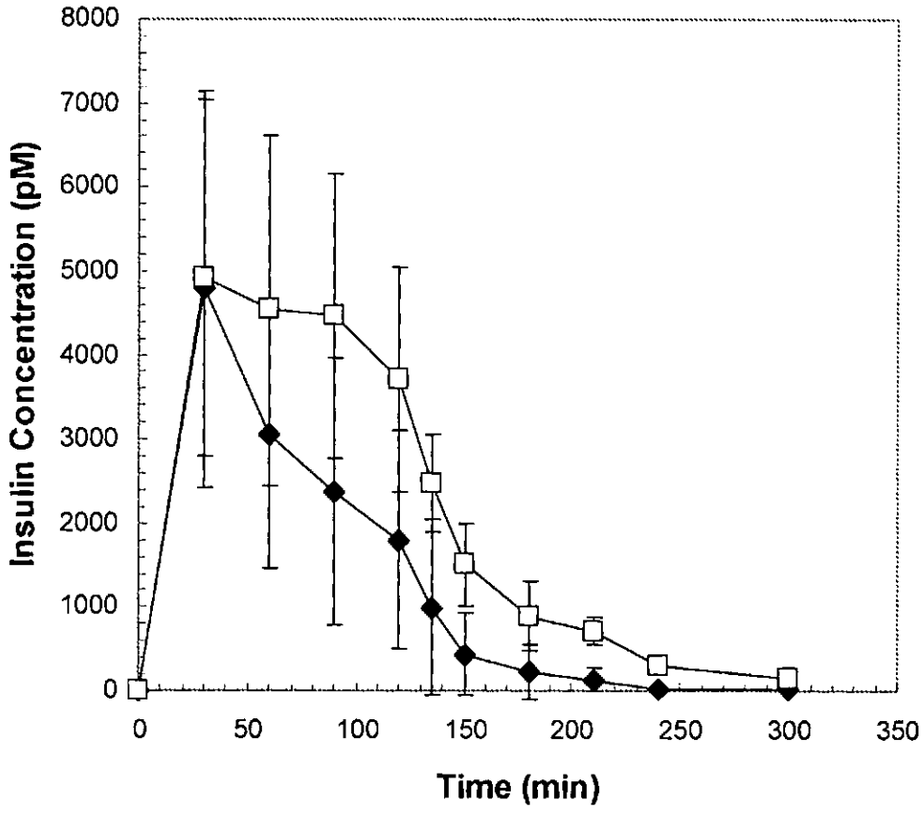

8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Insulin Concentration (pM)
0
50
100
150
200
250
300
350
Time (min)

Figure 8

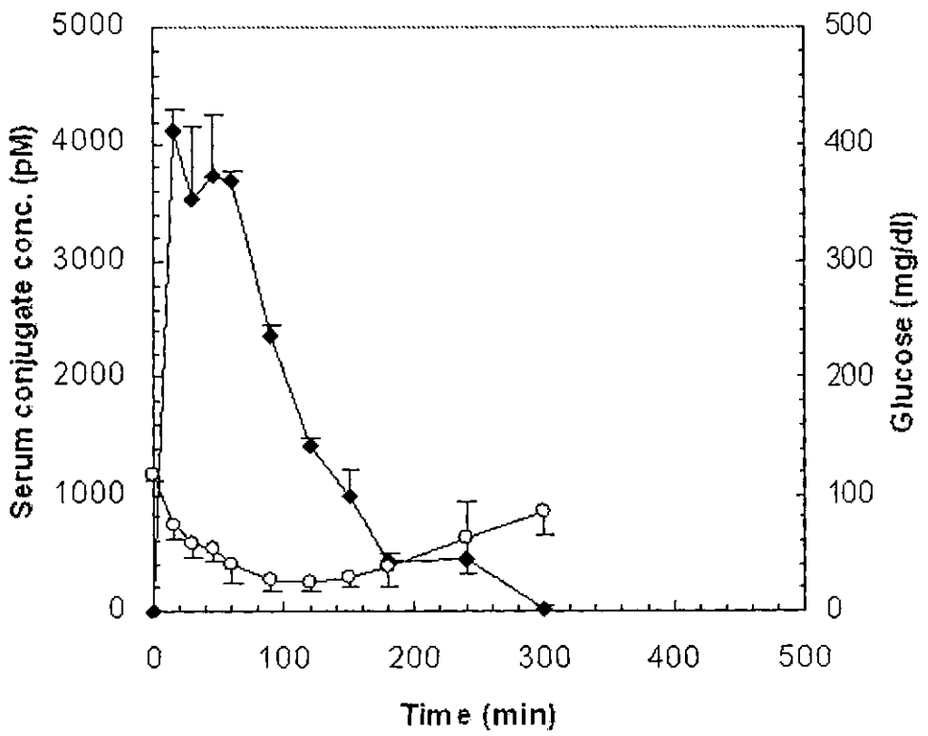

5000
4000
3000
2000
1000
0
Serum conjugate conc. (pM)
500
400
300
200
100
0
Glucose (mg/dl)
0
100
200
300
400
500
Time (min)

Figure 9

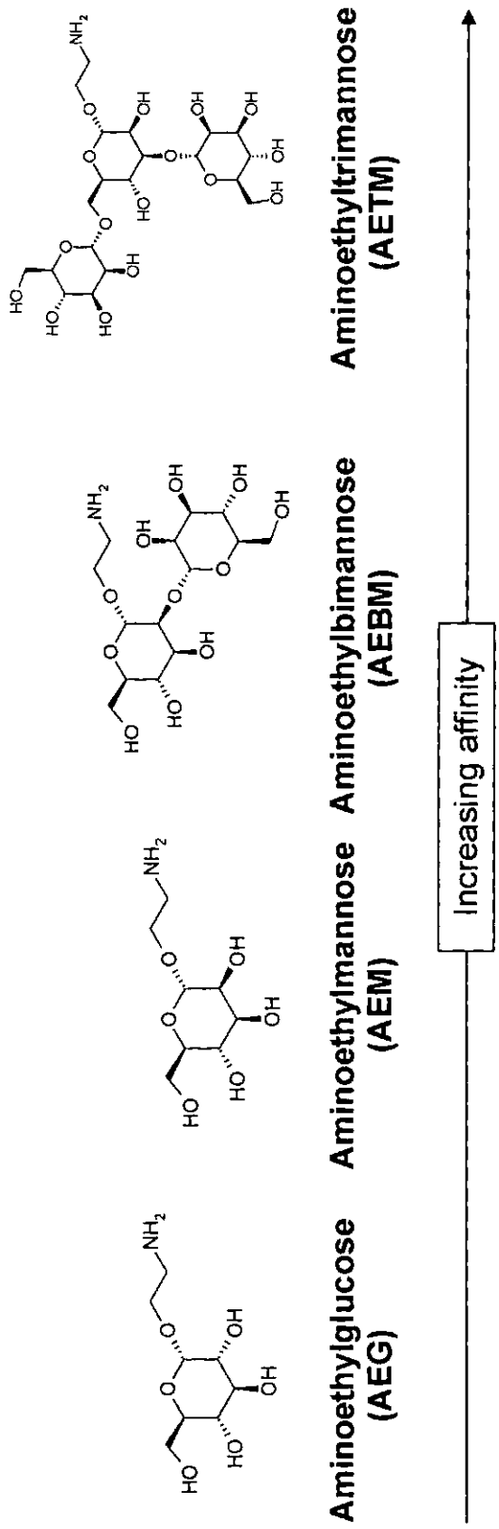

Aminoethylglucose (AEG)
Aminoethylmannose (AEM)
Aminoethylbimannose (AEBM)
Aminoethyltrimannose (AETM)
Increasing affinity

Figure 10

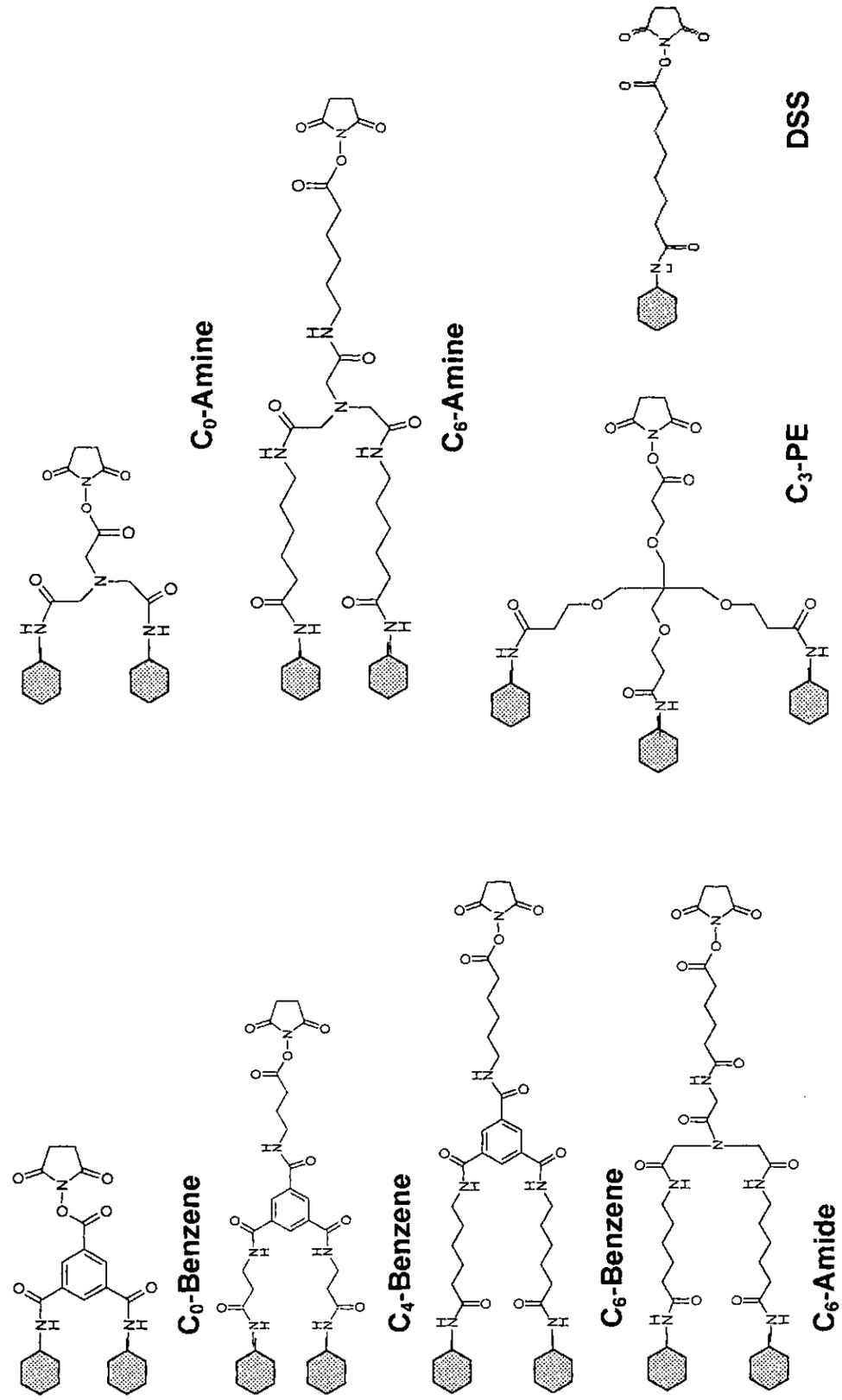

C0-Amine
C6-Amine
DSS
C3-PE
C0-Benzene
C4-Benzene
C6-Benzene
C6-Amide
= AEG, AEM, AEBM, AETM, AEGA, AEF

Figure 11

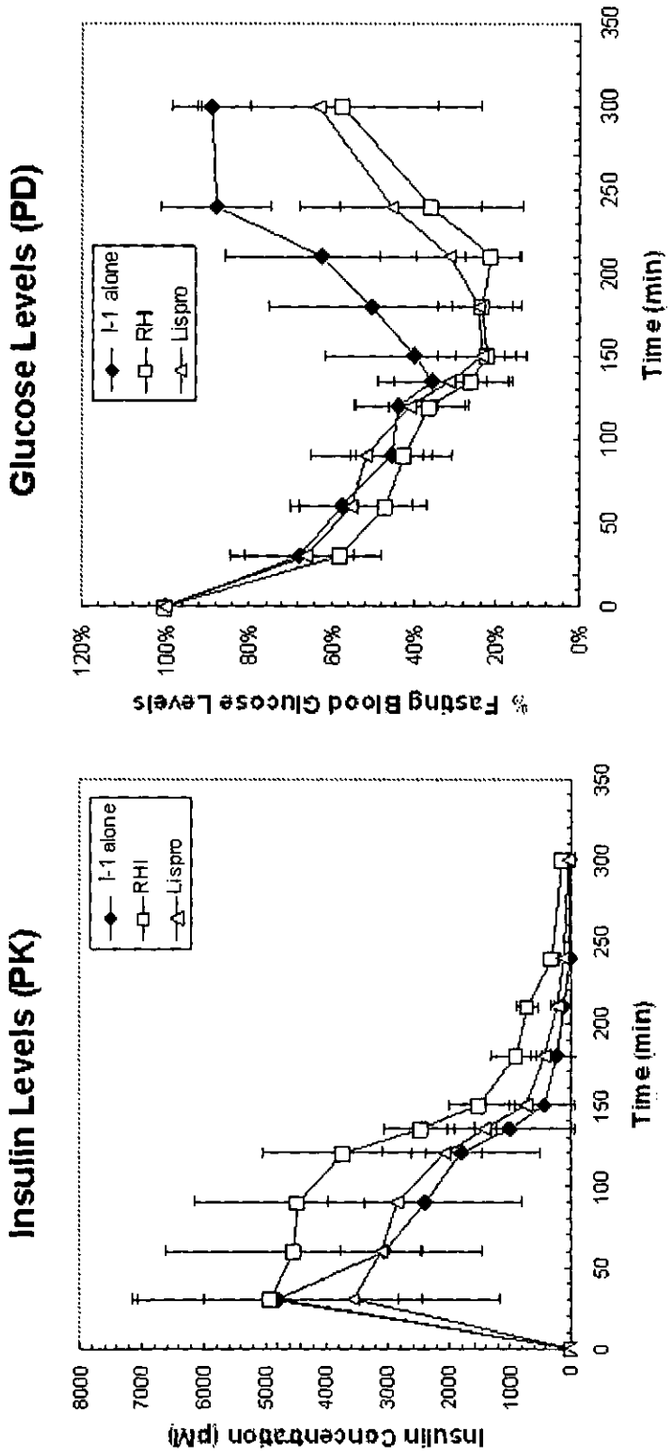

Glucose Levels (PD)
% Fasting Blood Glucose Levels
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0
50
100
150
200
250
300
350
Time (min)
I-1 alone
RHI
Lispro
Insulin Levels (PK)
Insulin Concentration (pM)
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
50
100
150
200
250
300
350
Time (min)
I-1 alone
RHI
Lispro

Figure 12

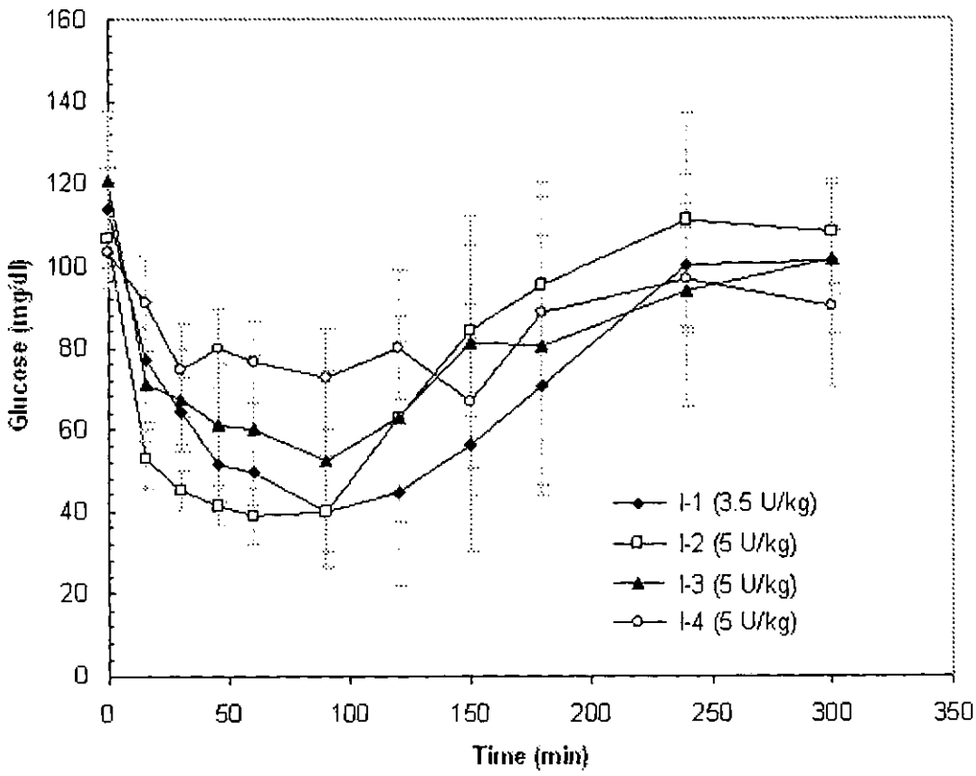

160
140
120
100
80
60
40
20
0
Glucose (mg/dl)
0
50
100
150
200
250
300
350
Time (min)
I-1 (3.5 U/kg)
I-2 (5 U/kg)
I-3 (5 U/kg)
I-4 (5 U/kg)

Figure 13

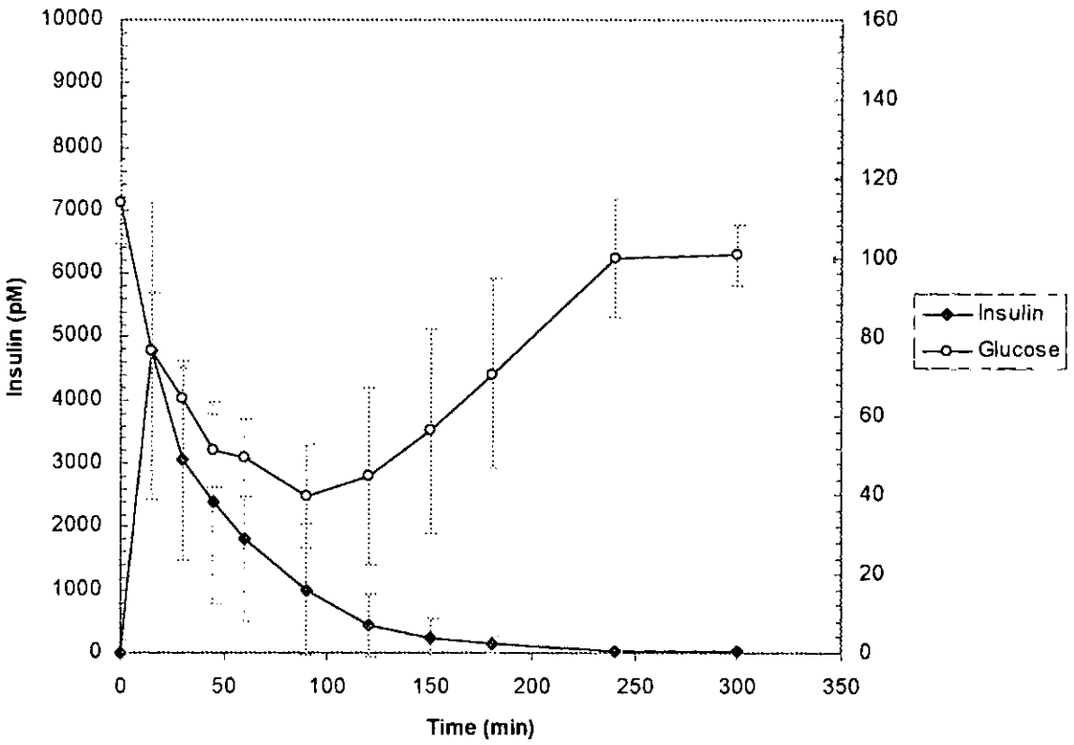

10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Insulin (pM)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
50
100
150
200
250
300
350
Time (min)
Insulin
Glucose

Figure 14

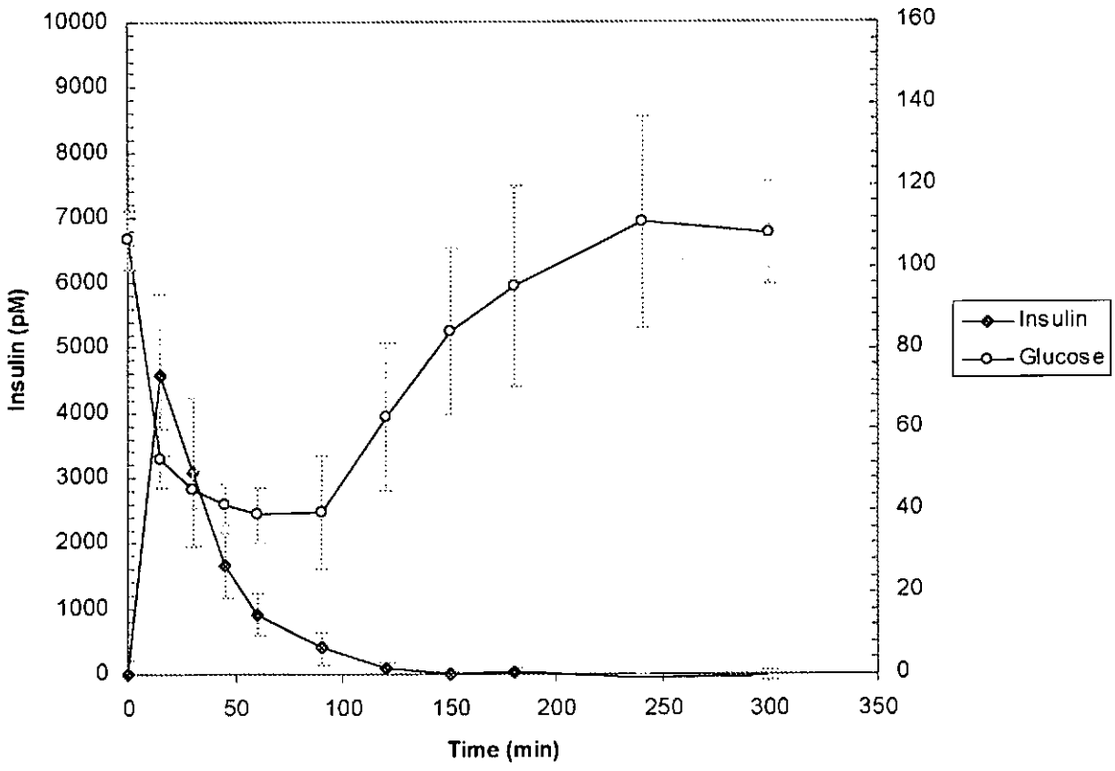

10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Insulin (pM)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
50
100
150
200
250
300
350
Time (min)
Insulin
Glucose

Figure 15

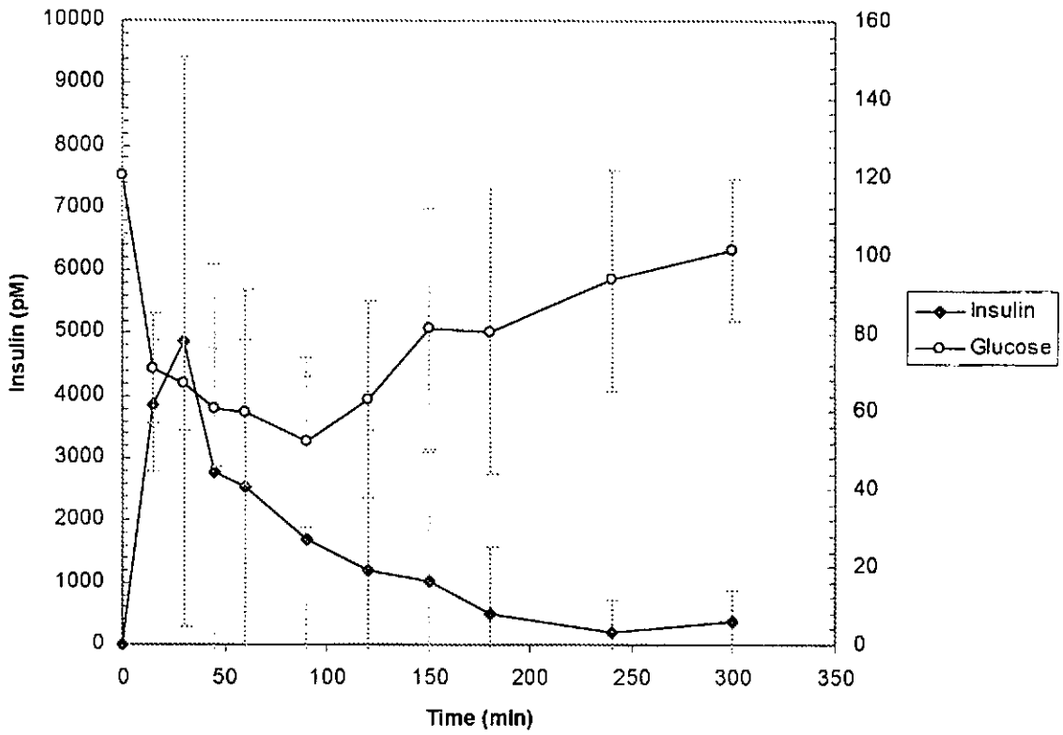

10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Insulin (pM)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
50
100
150
200
250
300
350
Time (min)
Insulin
Glucose

Figure 16

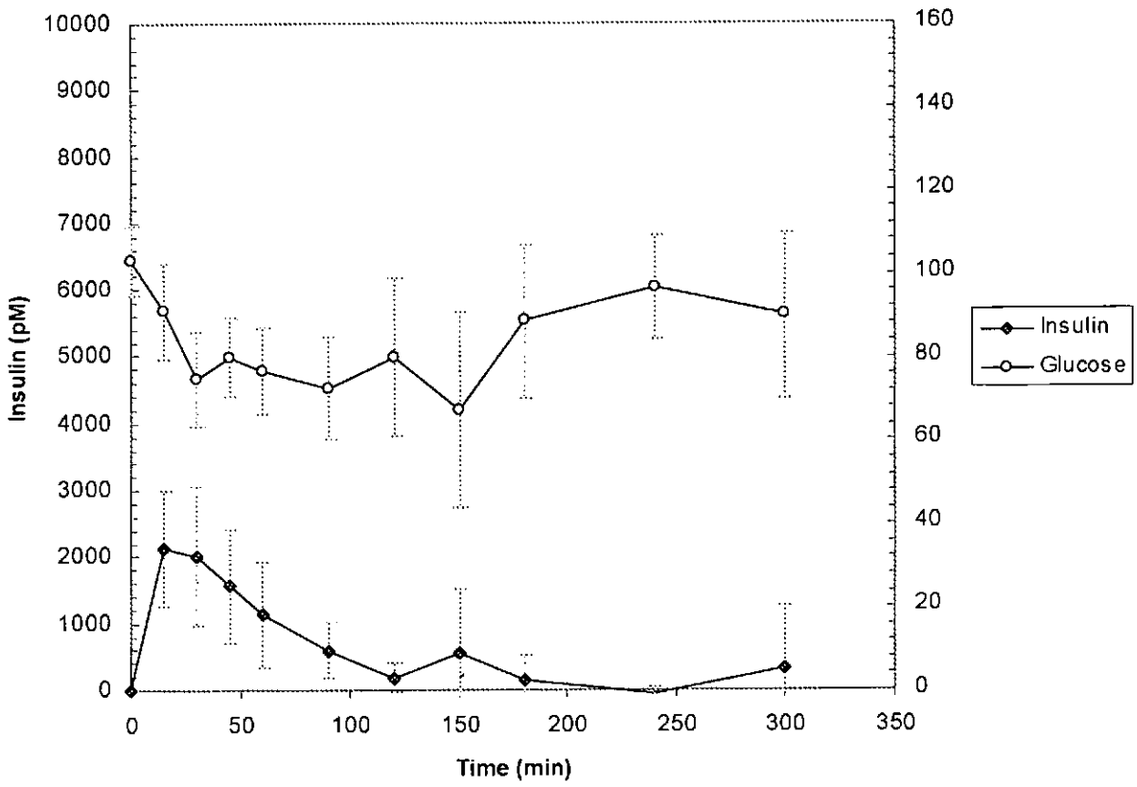

10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Insulin (pM)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
50
100
150
200
250
300
350
Time (min)
Insulin
Glucose

Figure 17

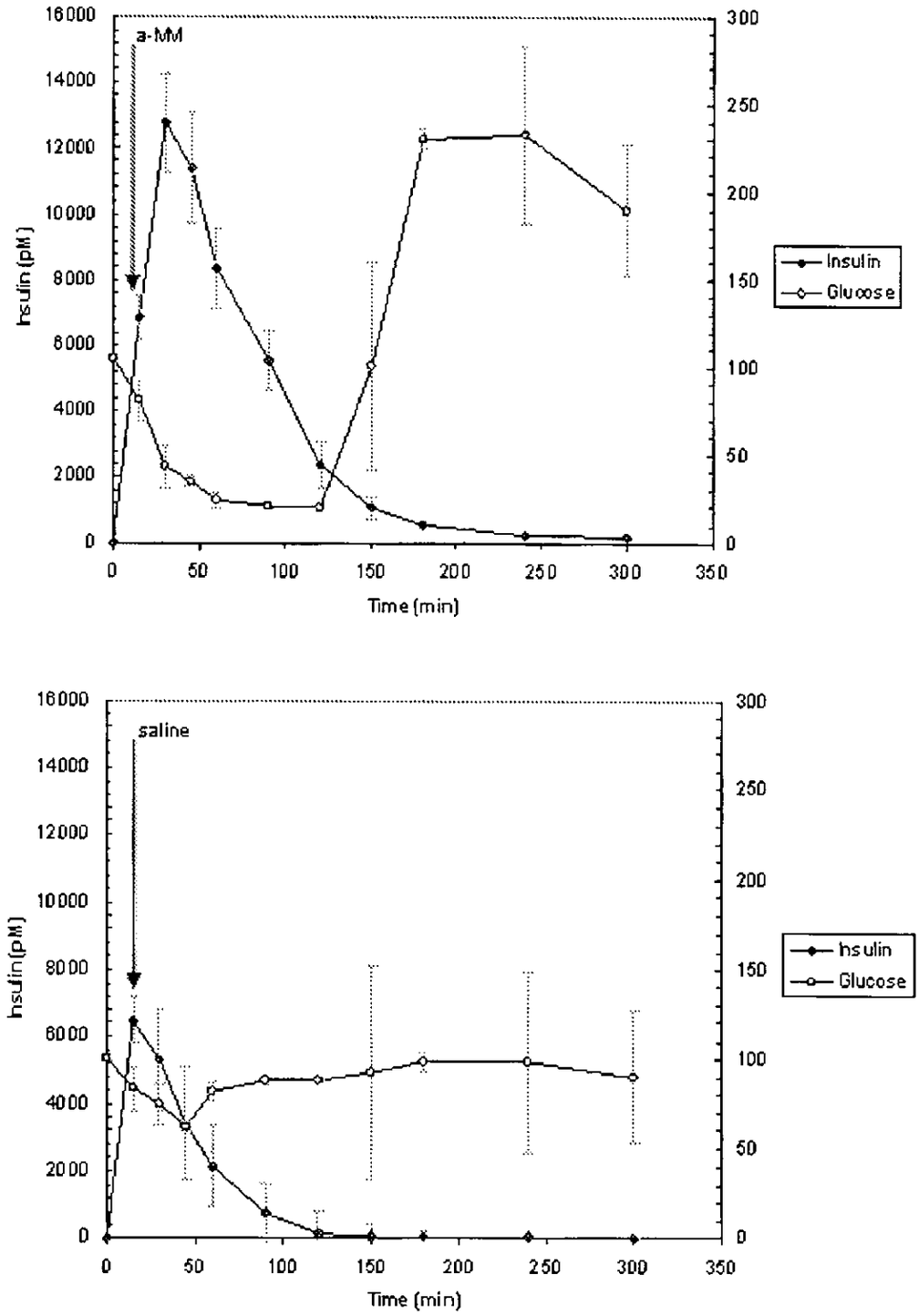

a-MM
Insulin (pM)
Time (min)
Insulin
Glucose
saline
Insulin (pM)
Time (min)
Insulin
Glucose

Figure 18

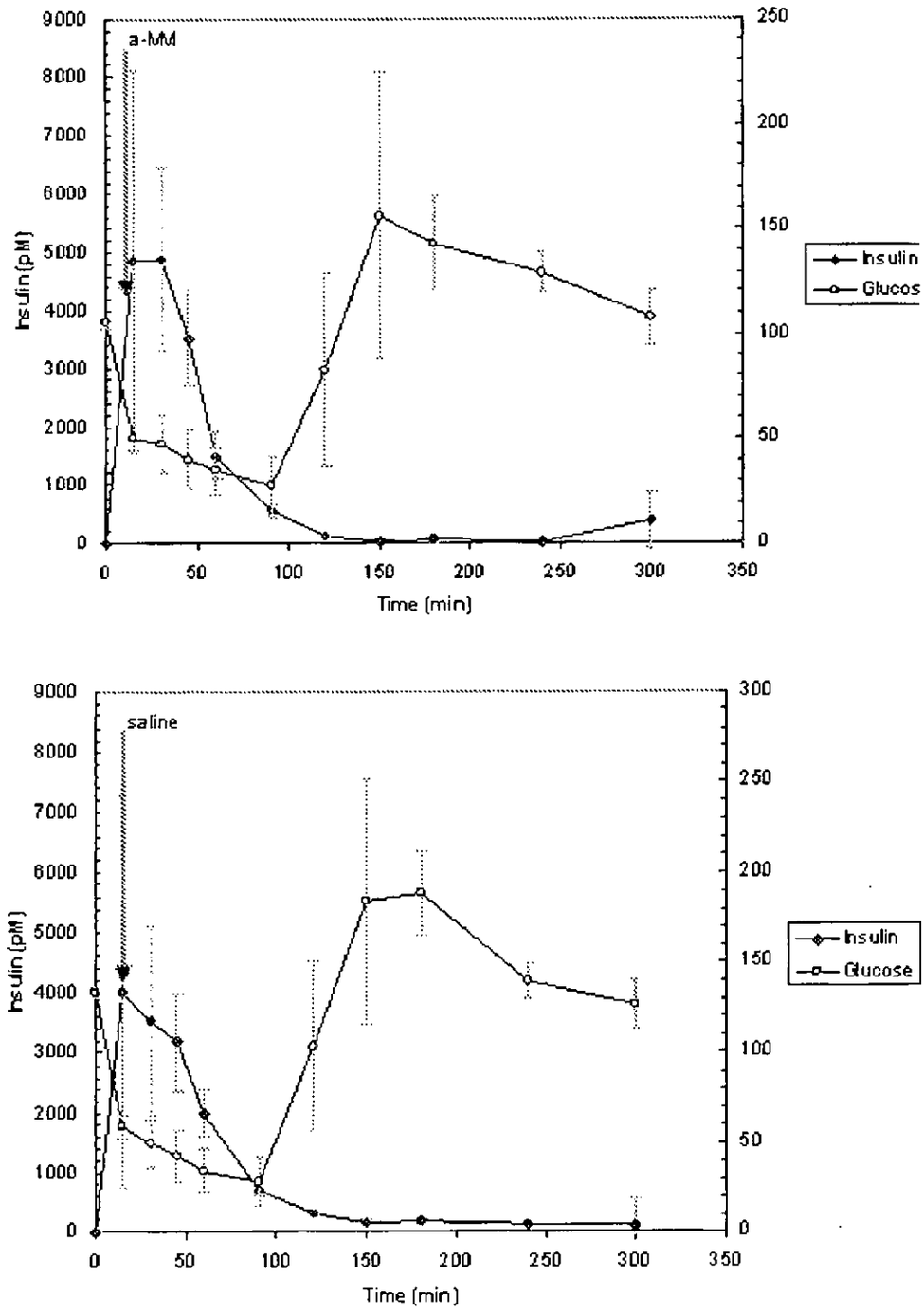

a-MM
Insulin (pM)
Time (min)
Insulin
Glucos
saline
Insulin (pM)
Time (min)
Insulin
Glucose

Figure 19

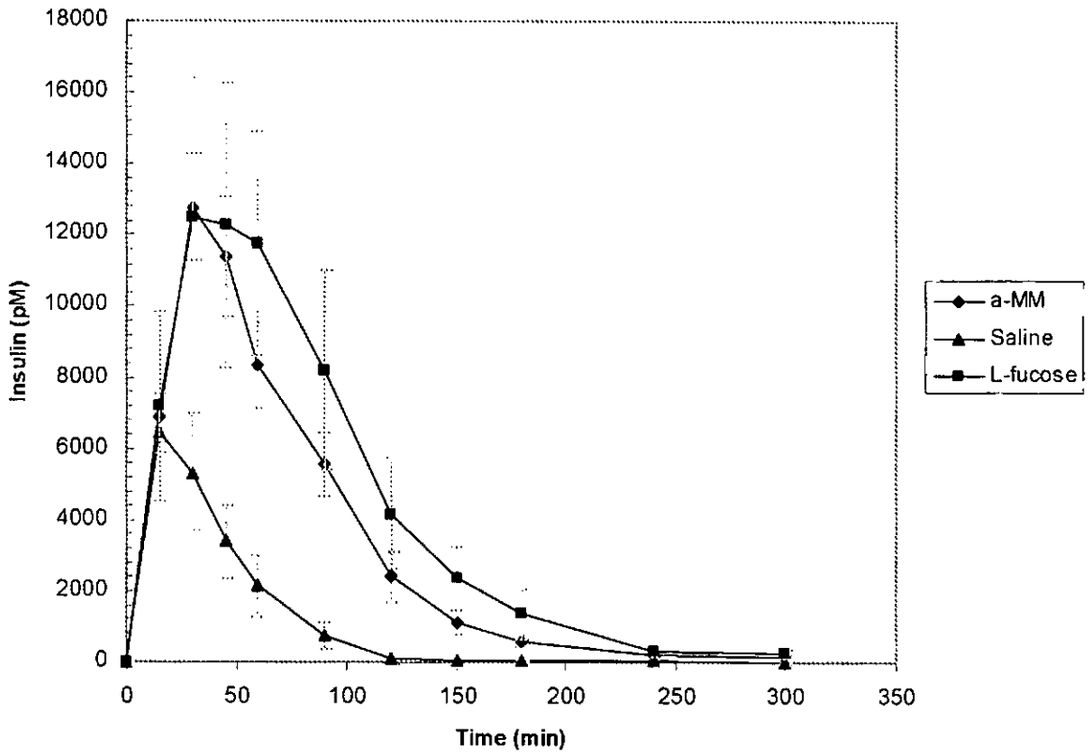

18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
Insulin (pM)
0
50
100
150
200
250
300
350
Time (min)
a-MM
Saline
L-fucose

Figure 20

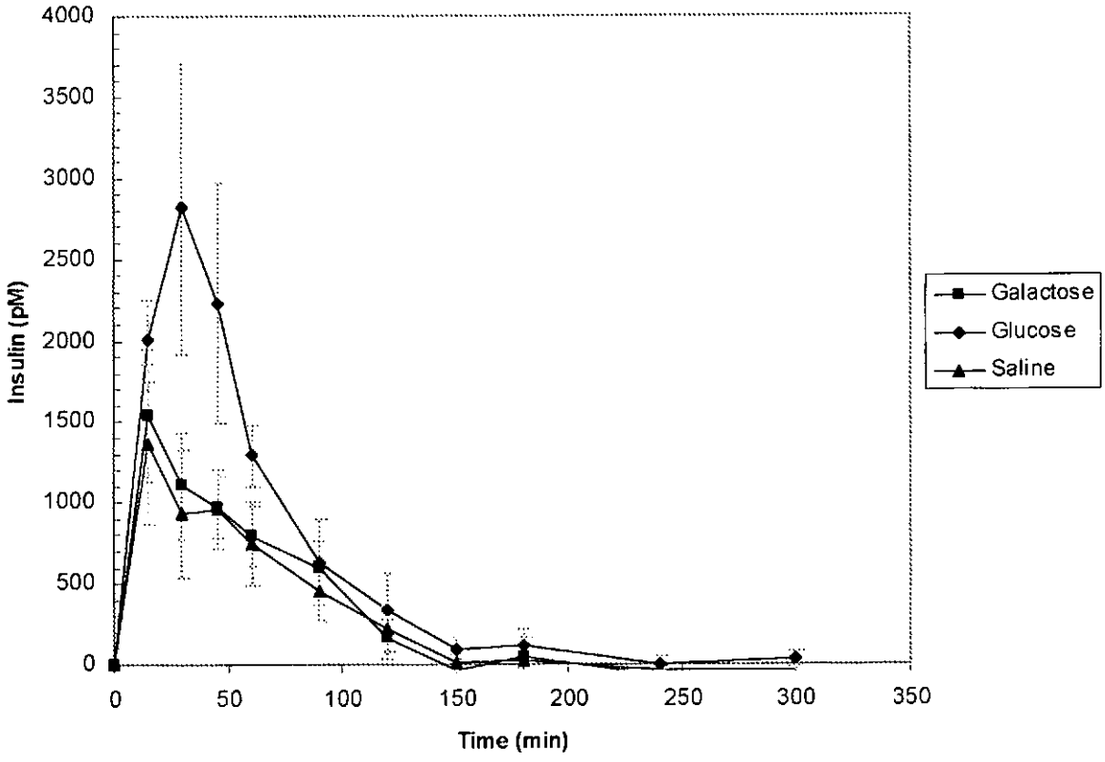

4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Insulin (pM)
0
50
100
150
200
250
300
350
Time (min)
Galactose
Glucose
Saline

Figure 21

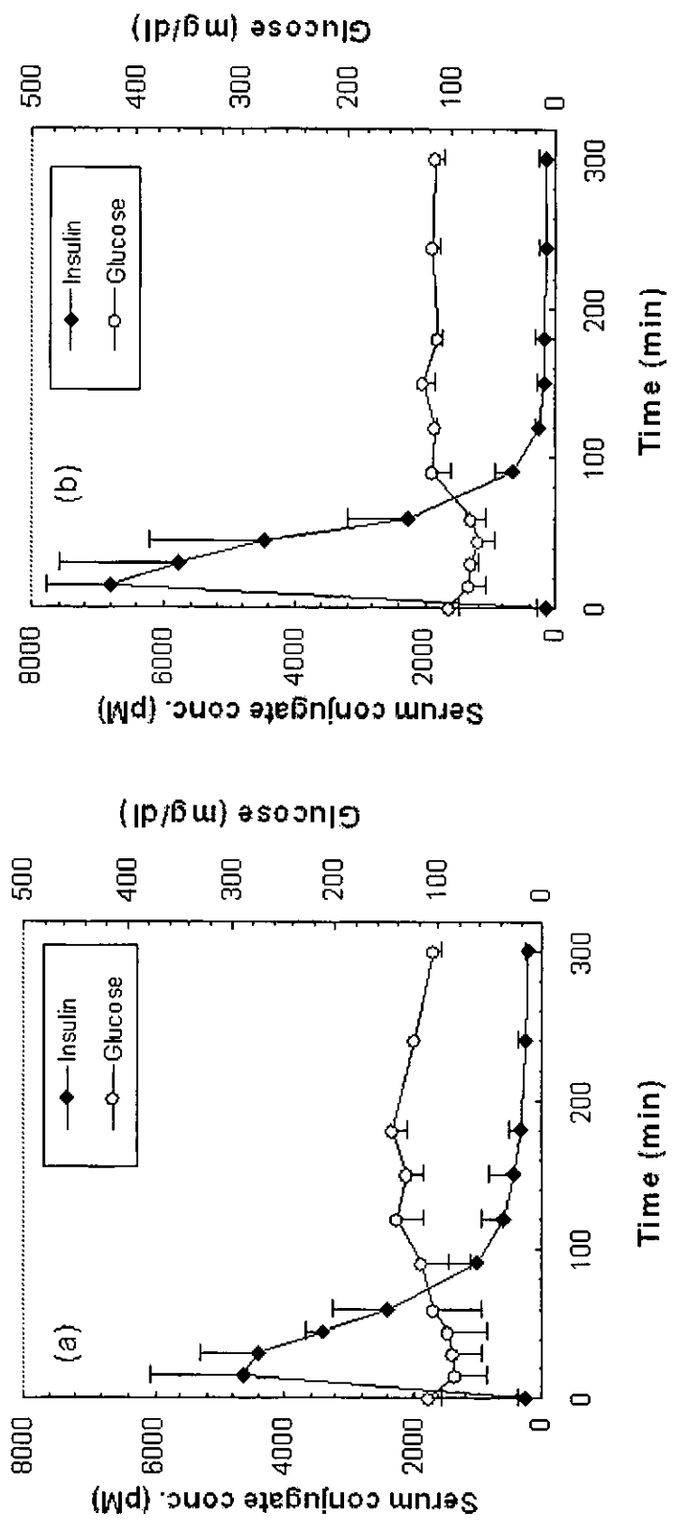

Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
Insulin
Glucose
(a)
(b)
0
2000
4000
6000
8000
100
200
300
400
500

Figure 22

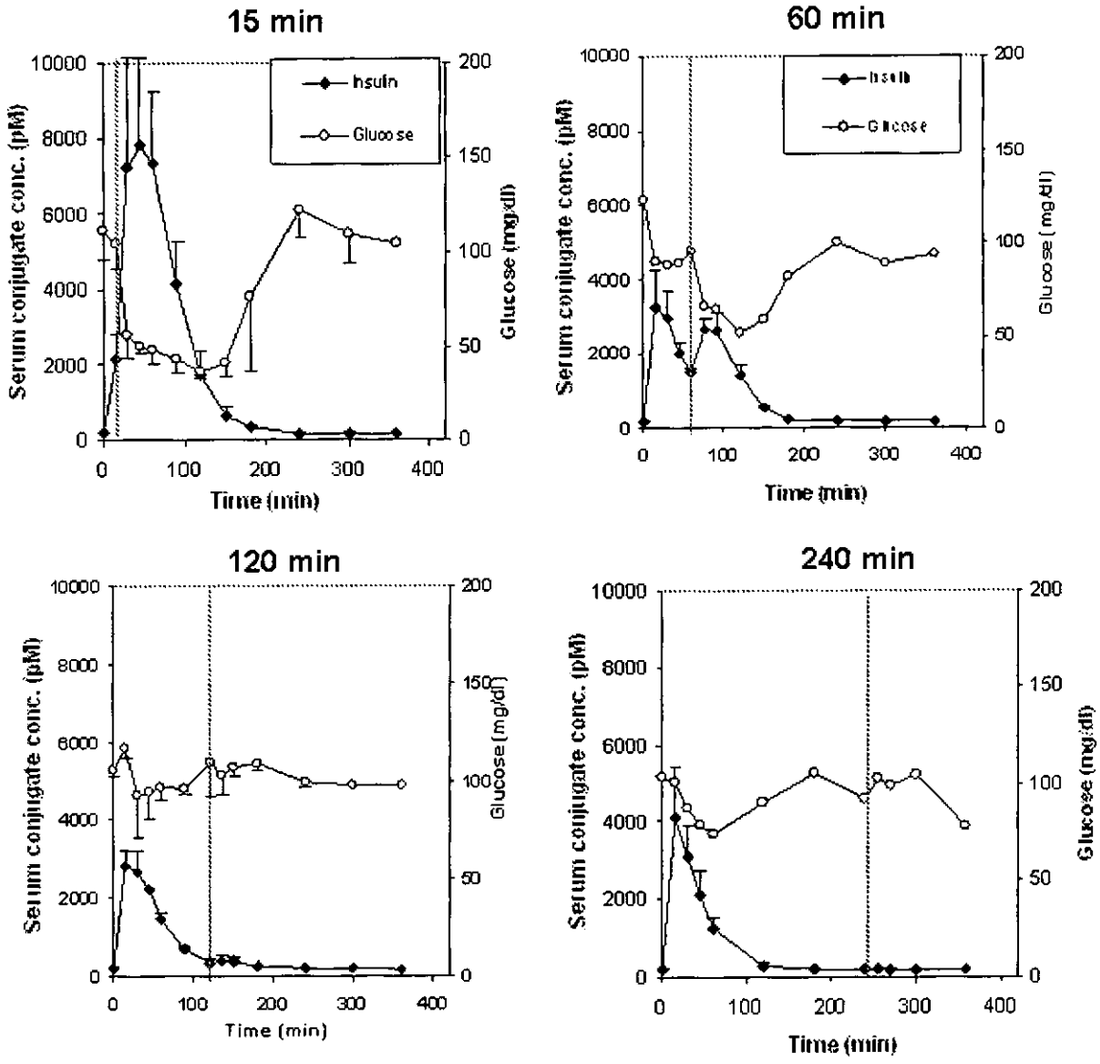

15 min
60 min
120 min
240 min
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
0
2000
4000
6000
8000
10000
0
50
100
150
200
0
100
200
300
400

Figure 23

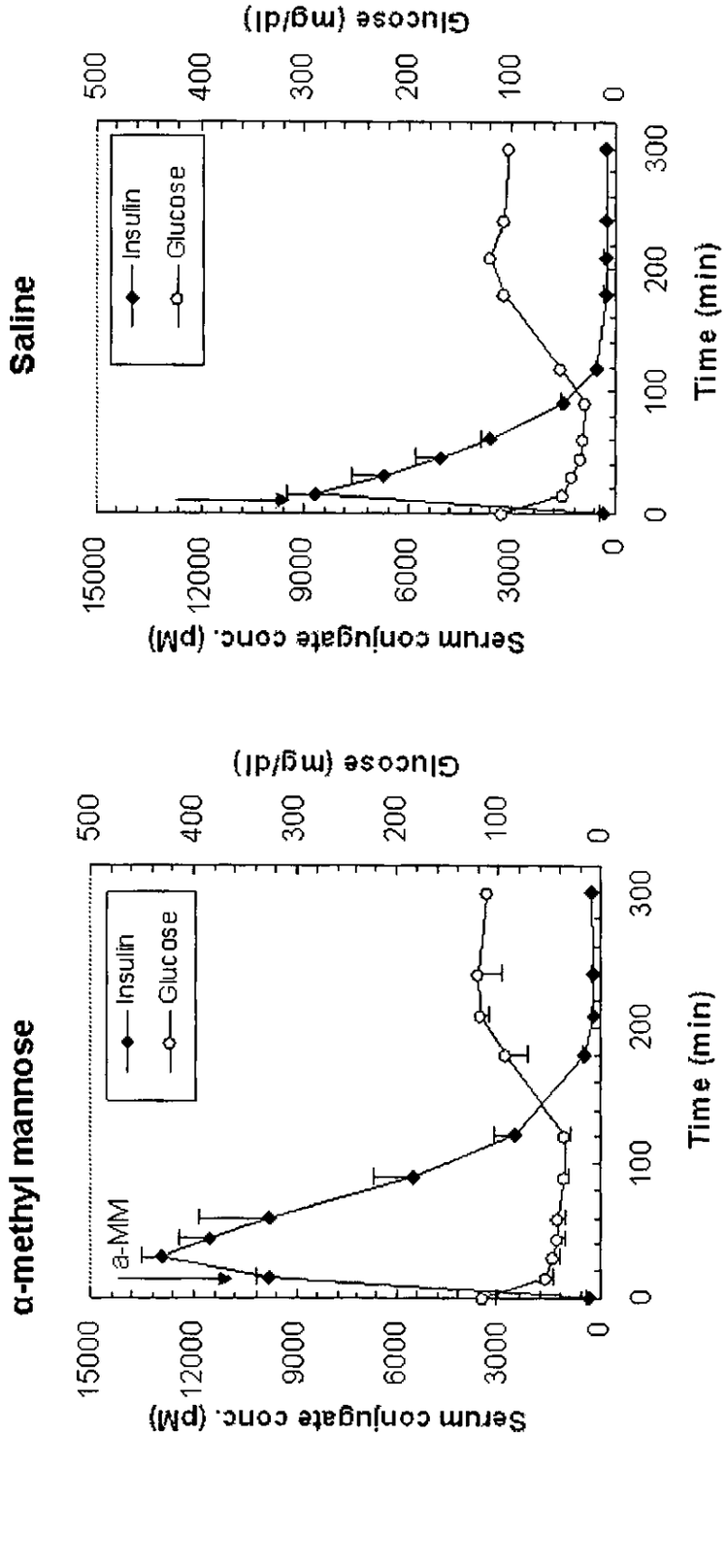

α-methyl mannose
Saline
Insulin
Glucose
a-MM
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
0
3000
6000
9000
12000
15000
100
200
300
400
500

Figure 24

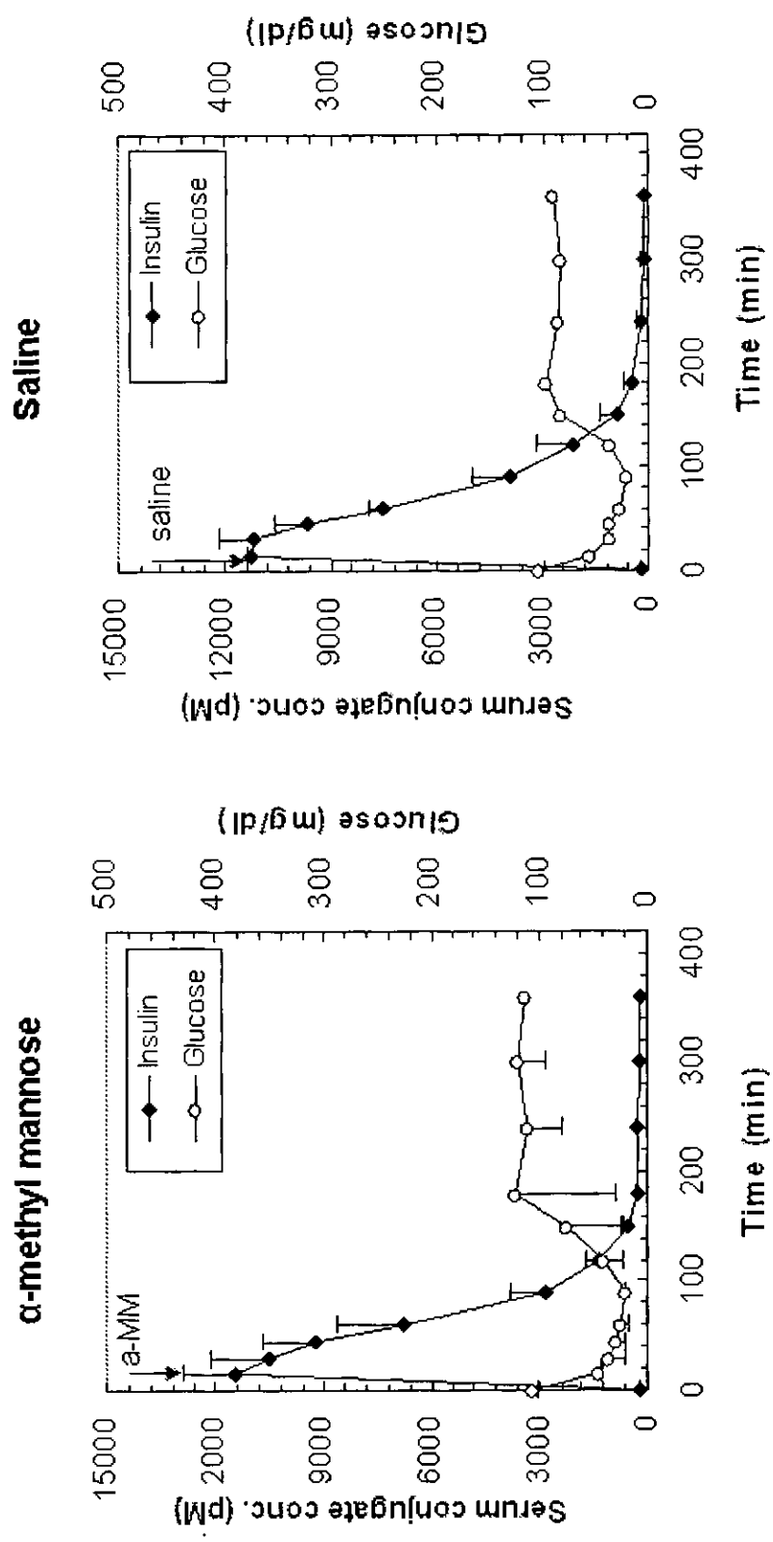

α-methyl mannose
a-MM
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
Saline
saline
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)

Figure 25

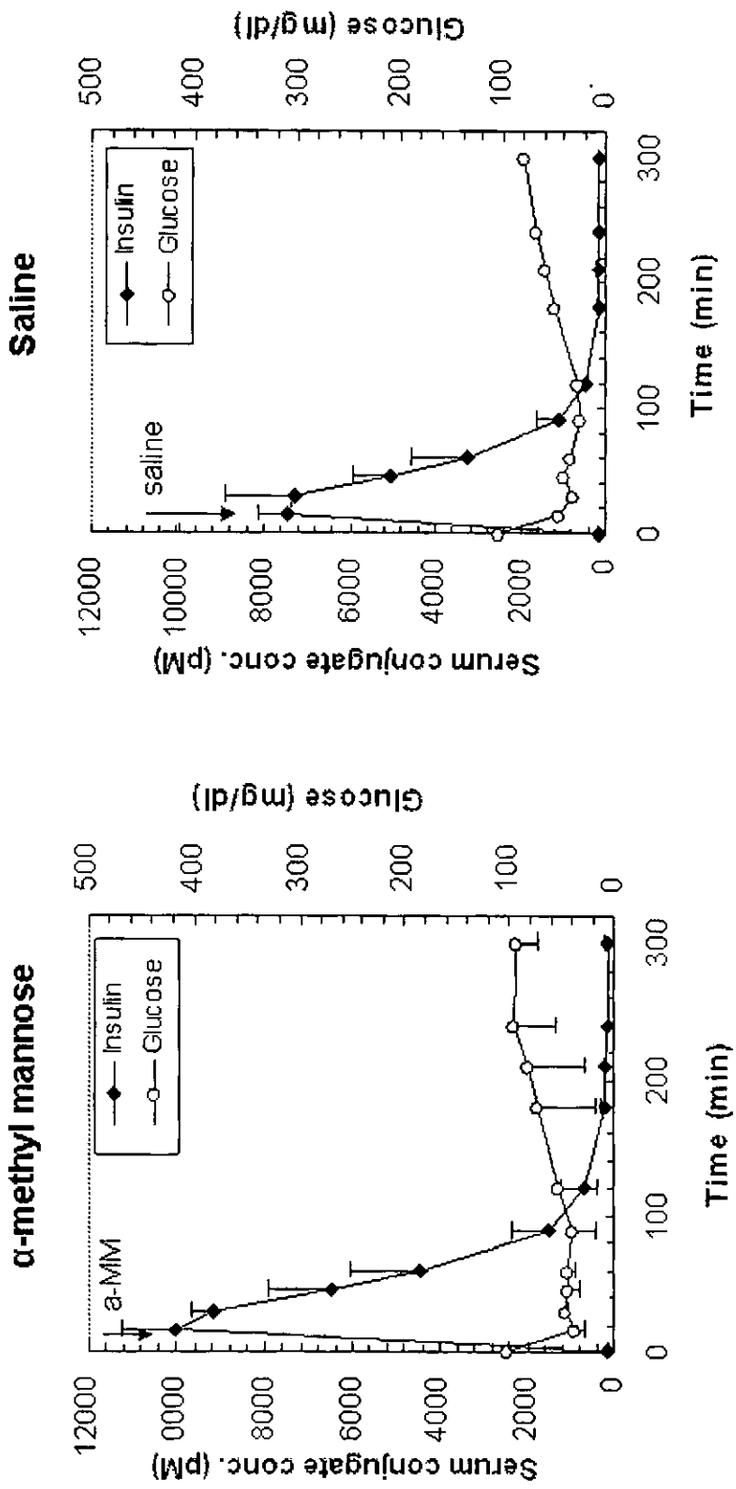

Saline
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
Insulin
Glucose
saline
α-methyl mannose
a-MM

Figure 26

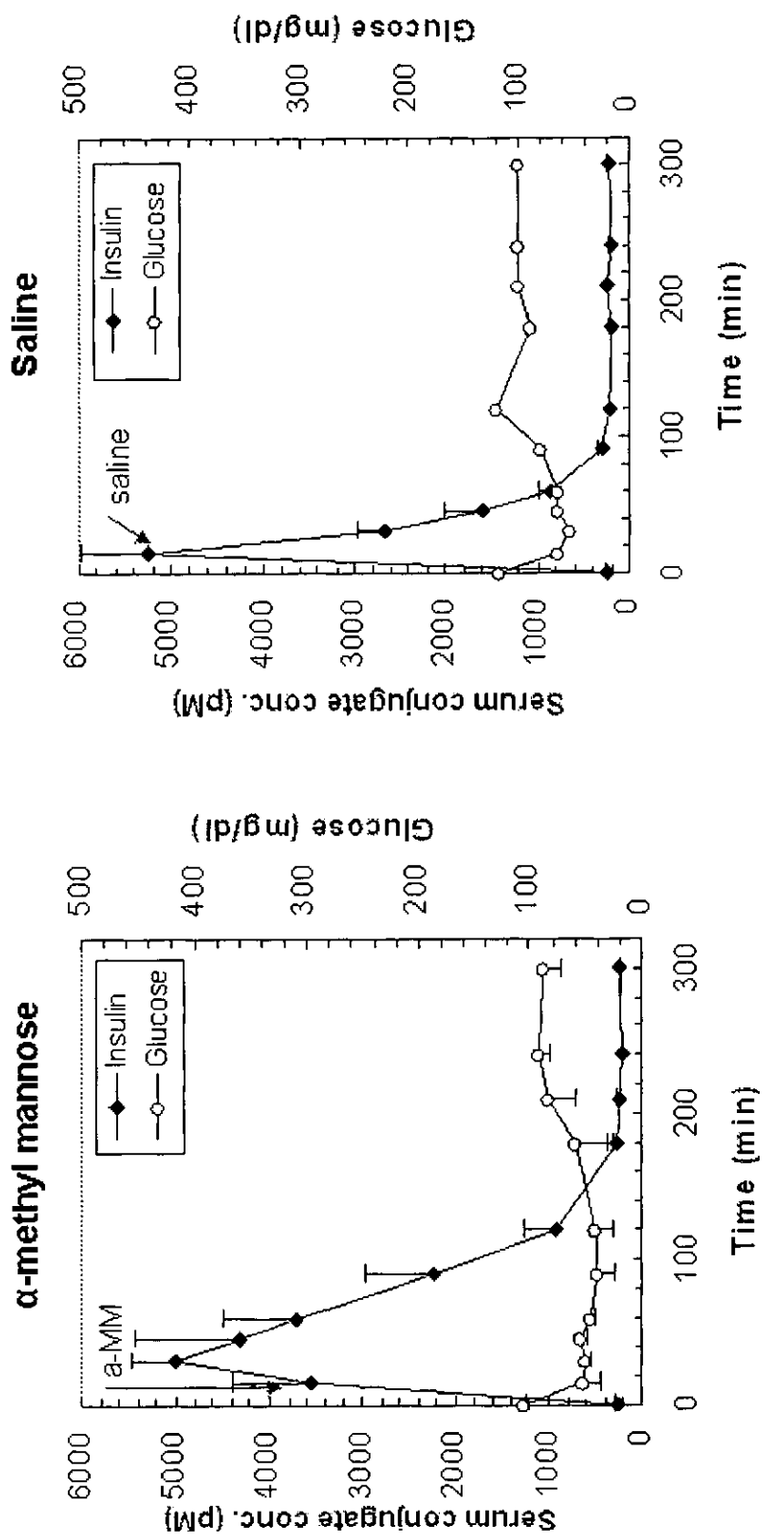

α-methyl mannose
a-MM
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
Saline
saline
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)

Figure 27

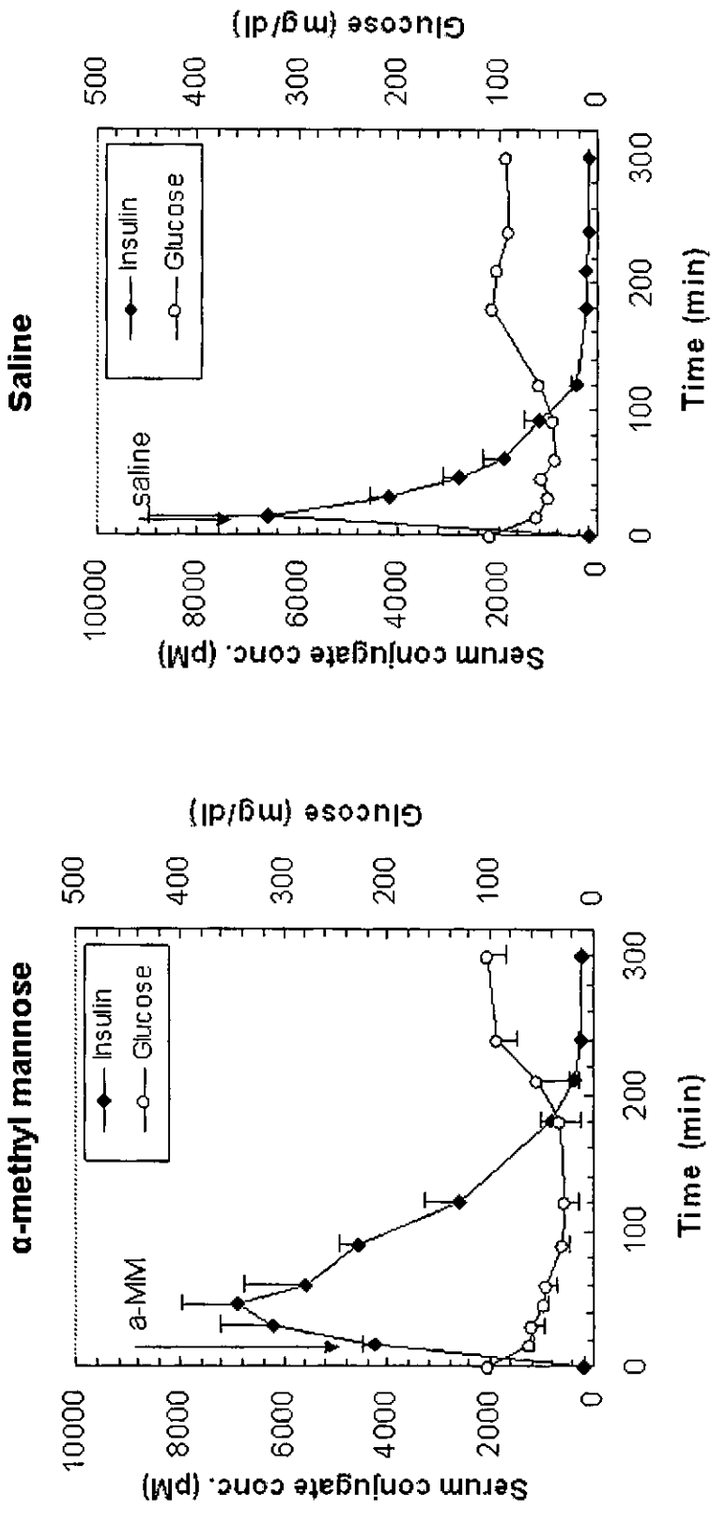

α-methyl mannose
Saline
Insulin
Glucose
a-MM
saline
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
0
2000
4000
6000
8000
10000
100
200
300
400
500

Figure 28

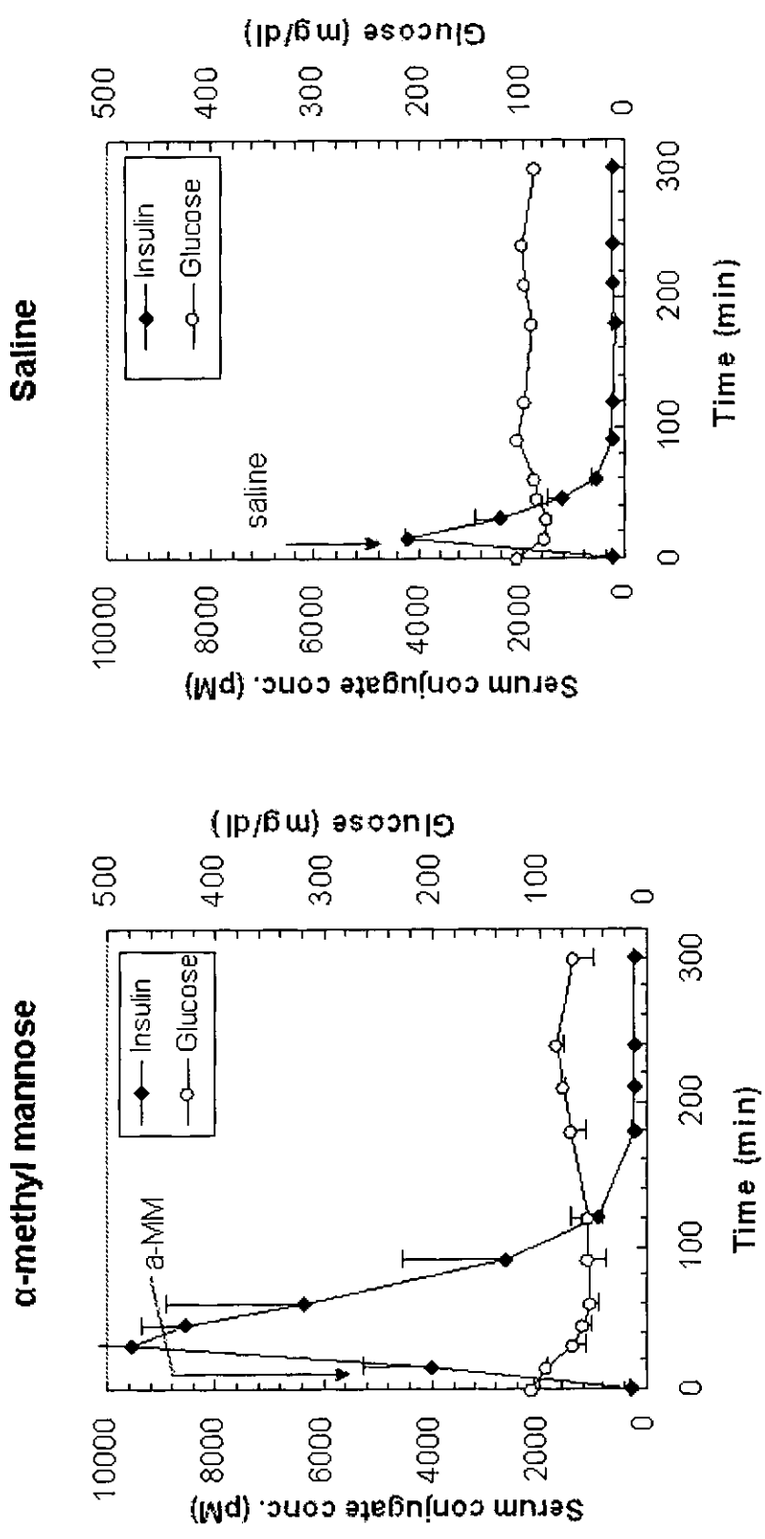

Saline
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
Insulin
Glucose
saline
α-methyl mannose
a-MM

Figure 29

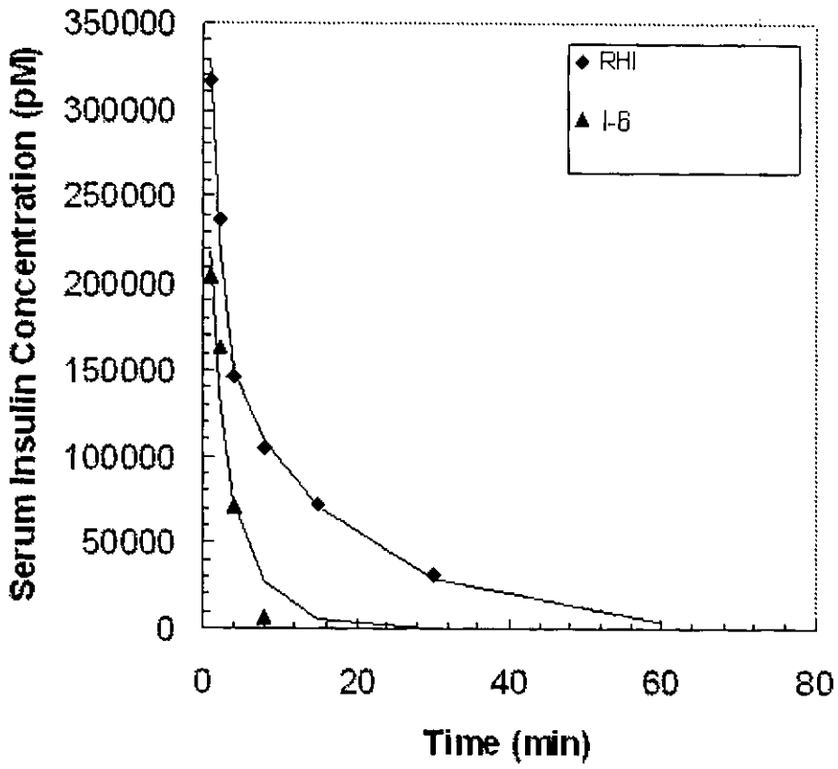

350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
Serum Insulin Concentration (pM)
RHI
I-6
0
20
40
60
80
Time (min)

Figure 30

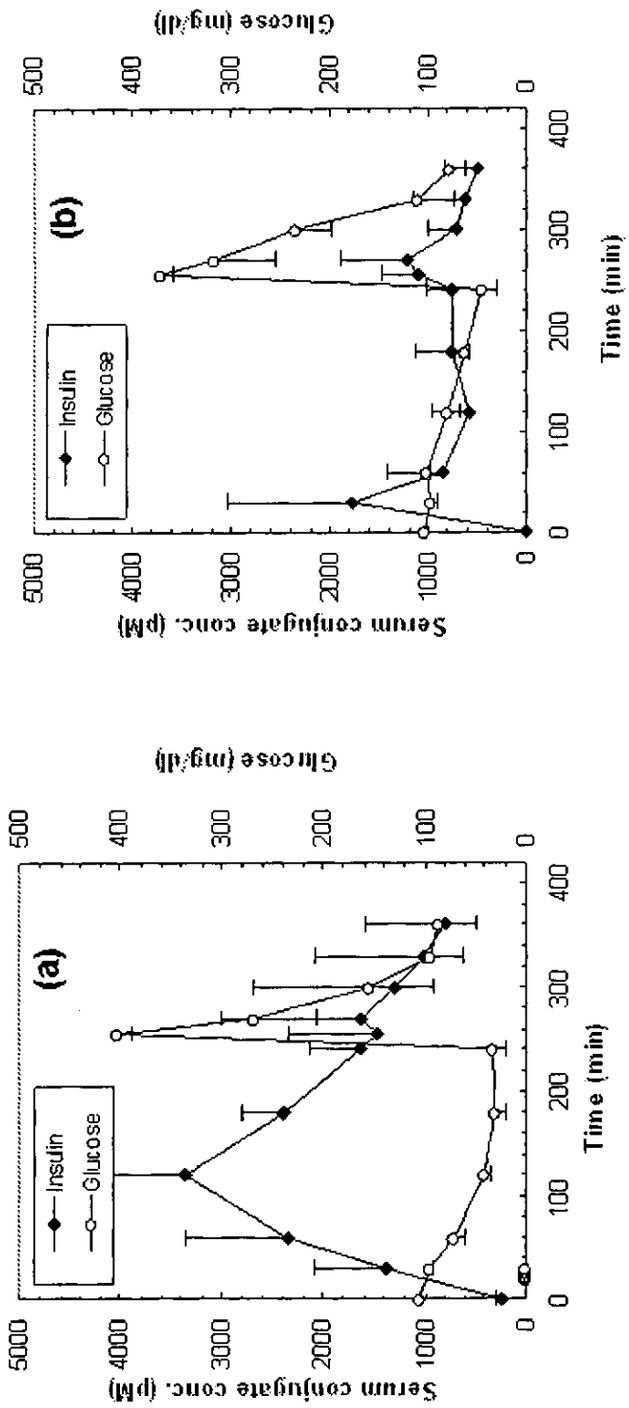

(a)
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
100
200
300
400
500
(b)
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)

Figure 31

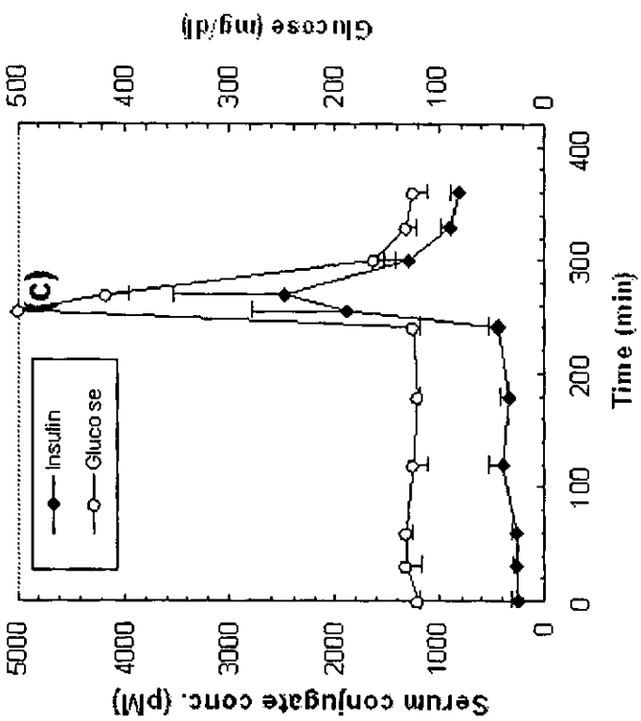


Figure 31 (continued)

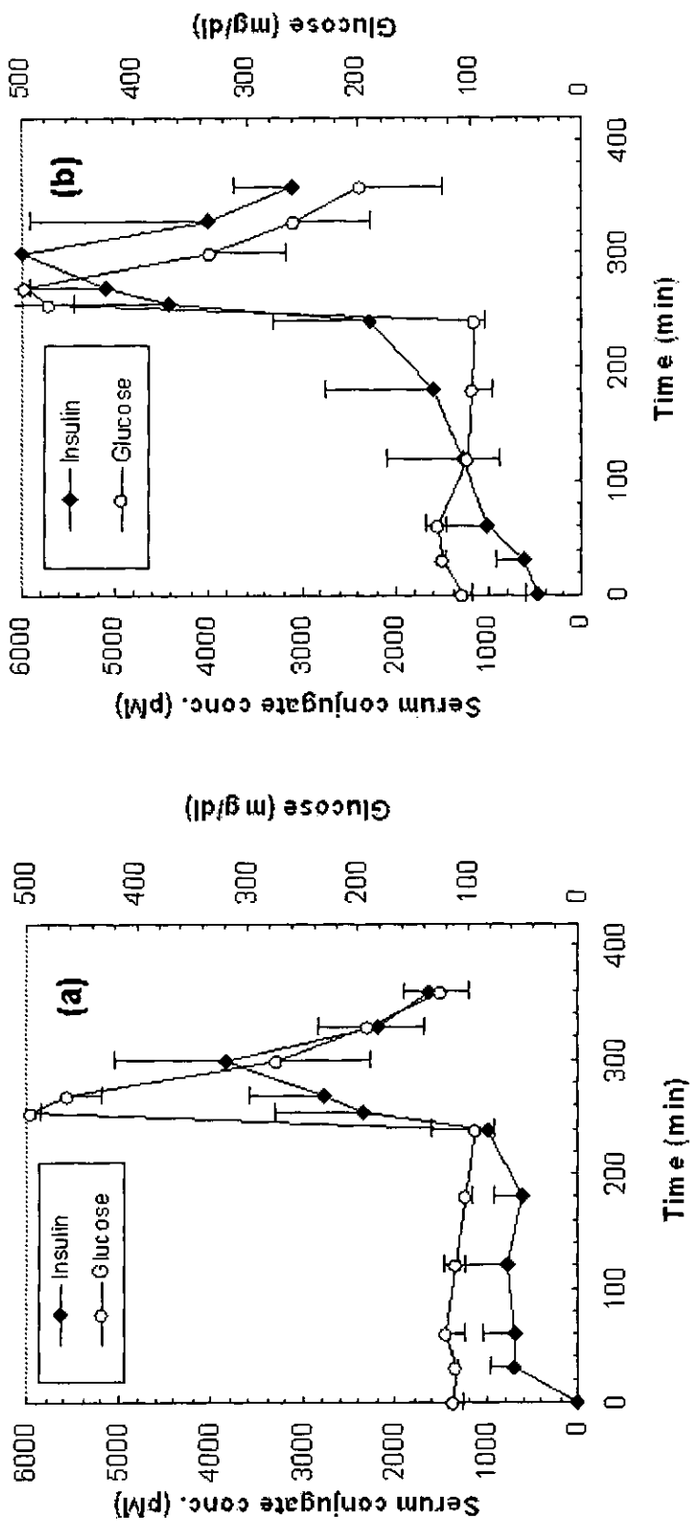

(a)
(b)
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
100
200
300
400
500

Figure 32

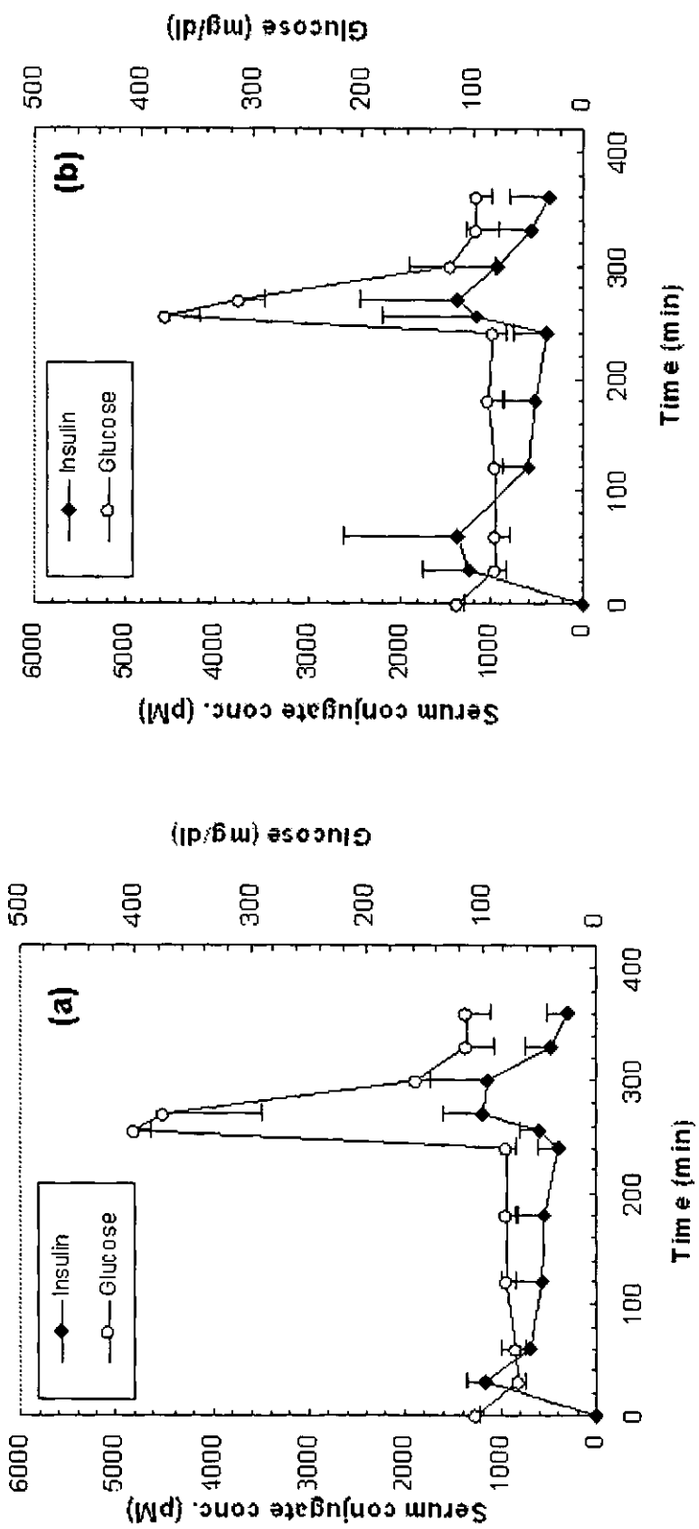

(a)
(b)
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
100
200
300
400
500

Figure 33

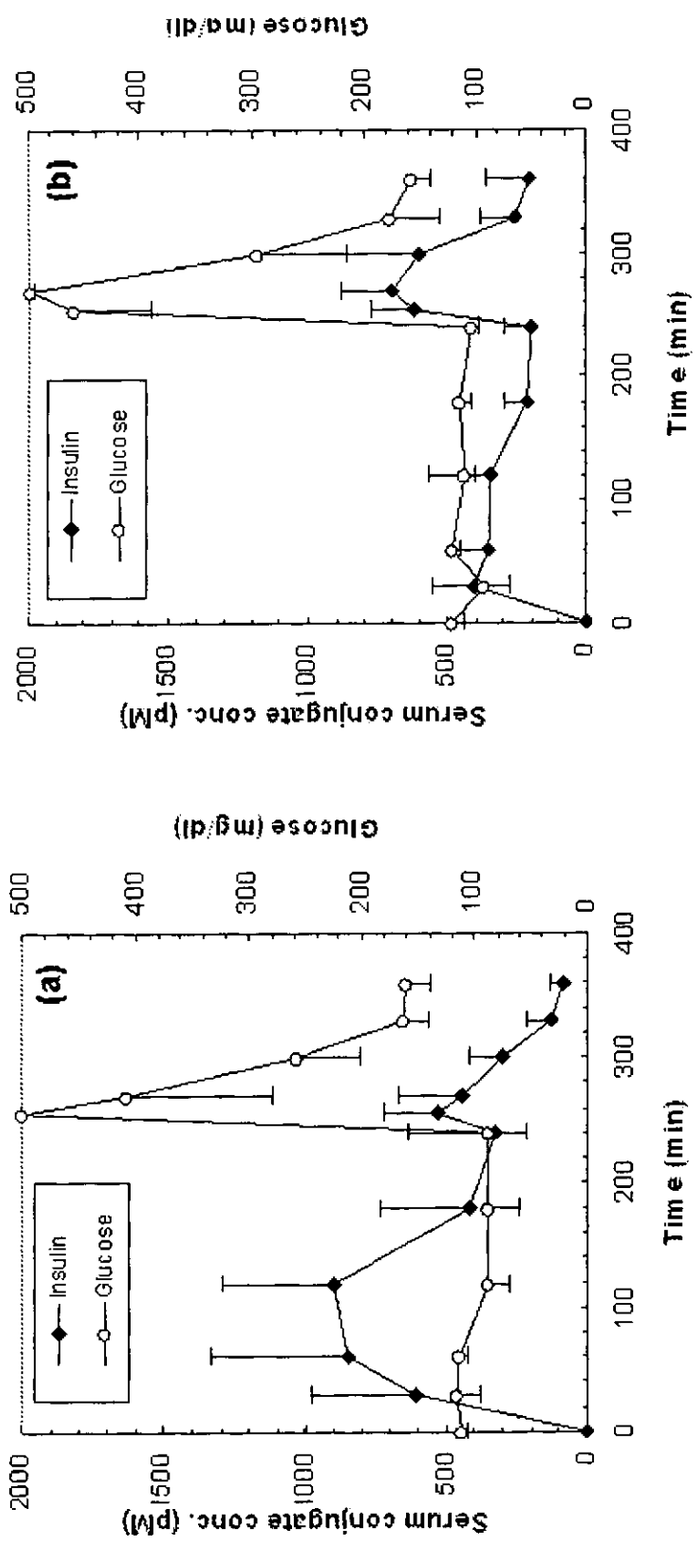

(a)
(b)
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
0
500
1000
1500
2000
100
200
300
400

Figure 34

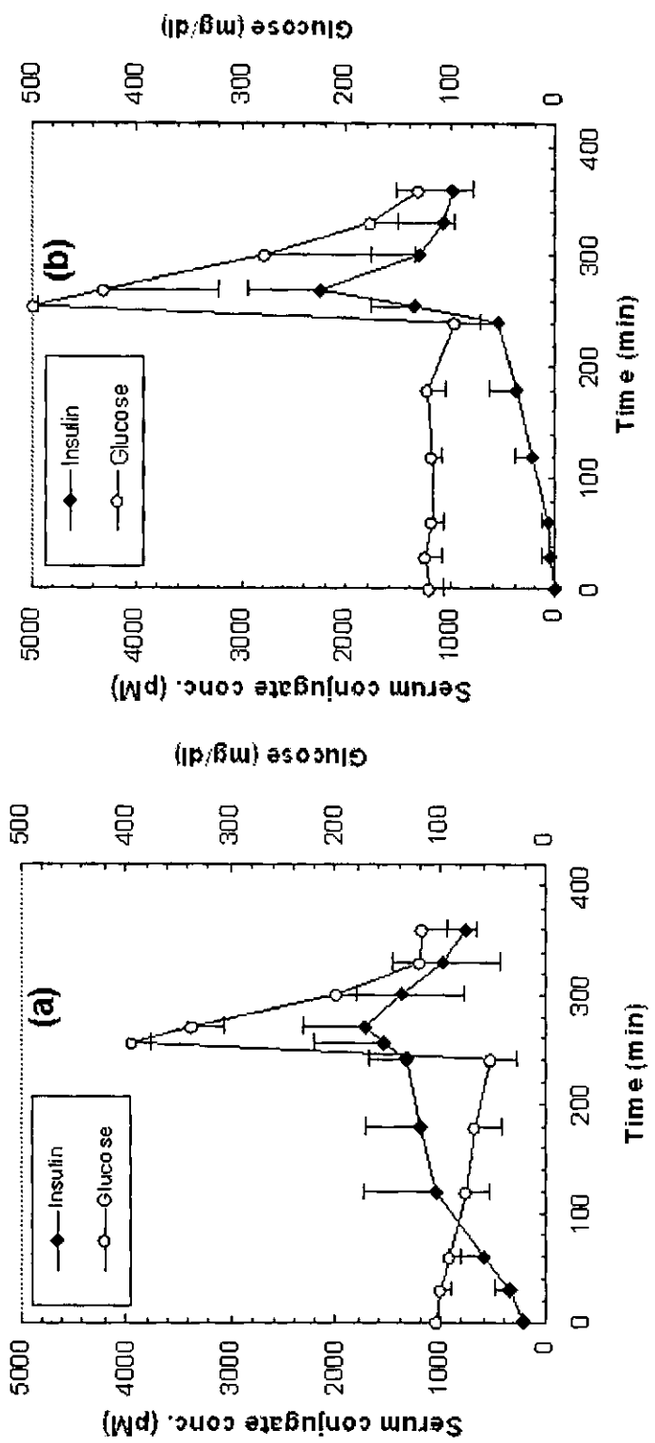

(a)
(b)
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
100
200
300
400
500

Figure 35

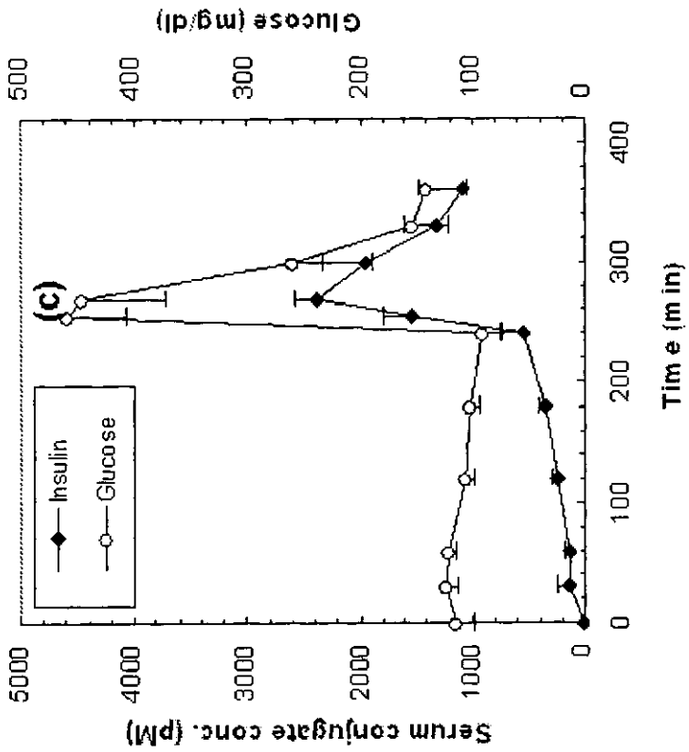


Figure 35 (continued)

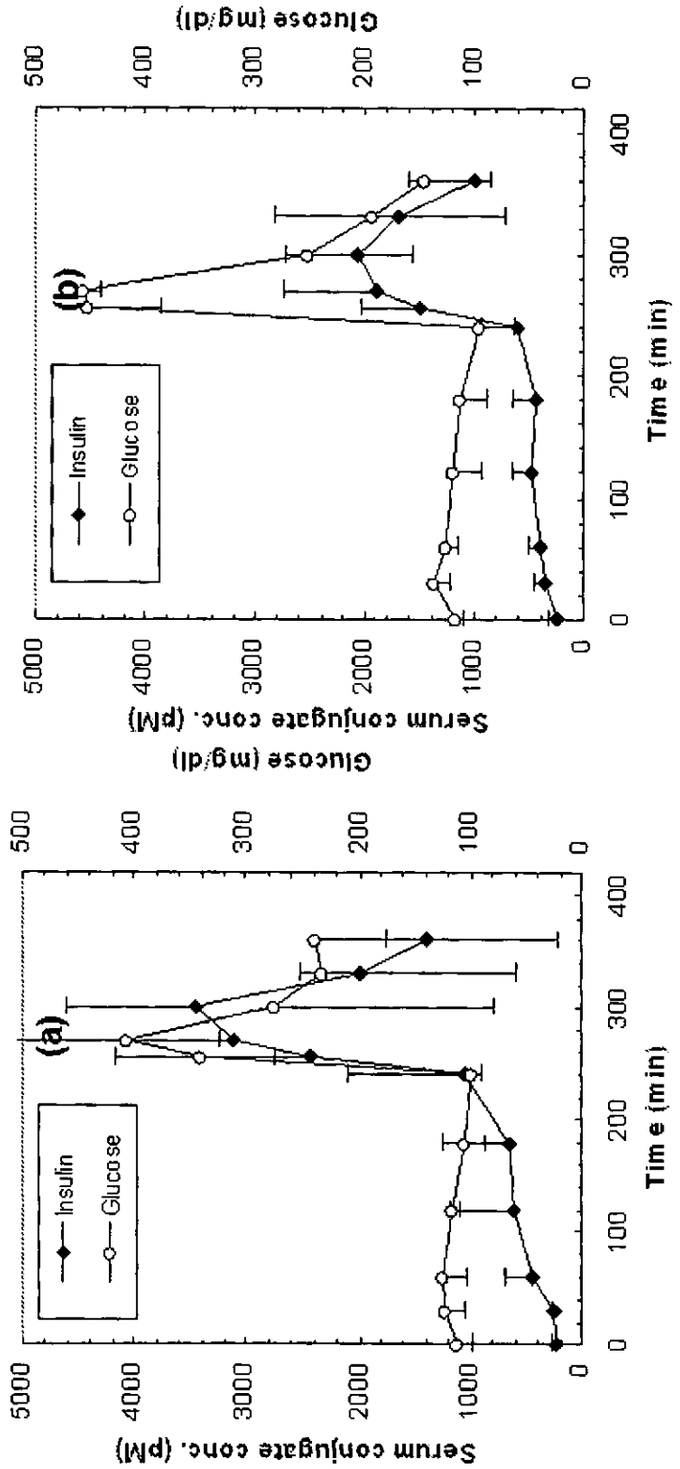

(a)
(b)
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
100
200
300
400
500

Figure 36

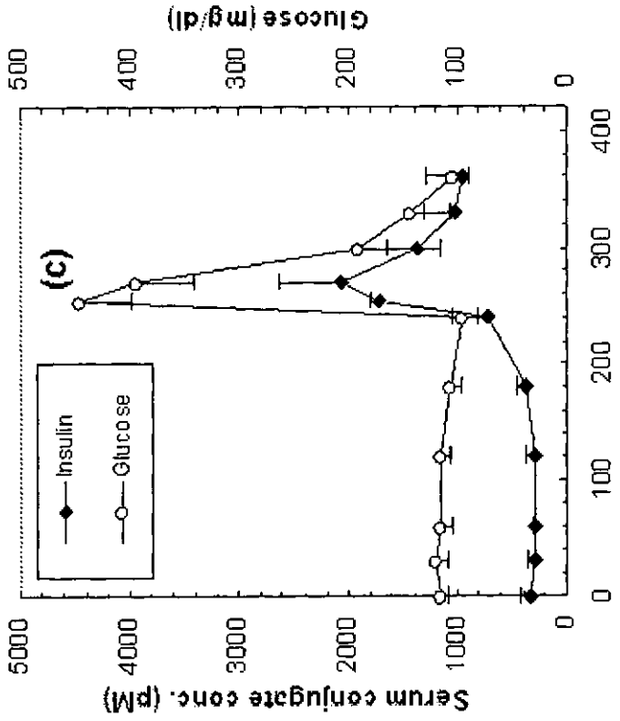


Figure 36 (continued)

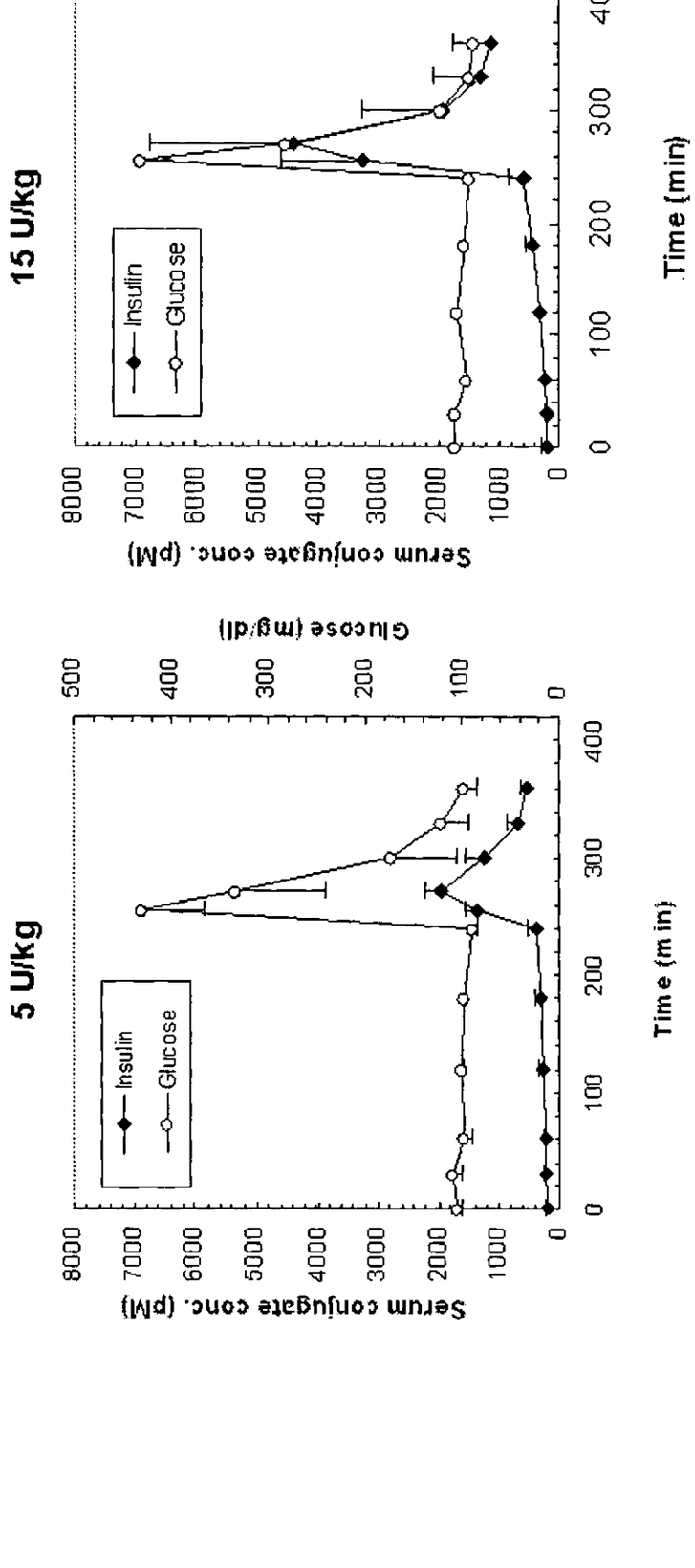

5 U/kg
15 U/kg
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
100
200
300
400
500

Figure 37

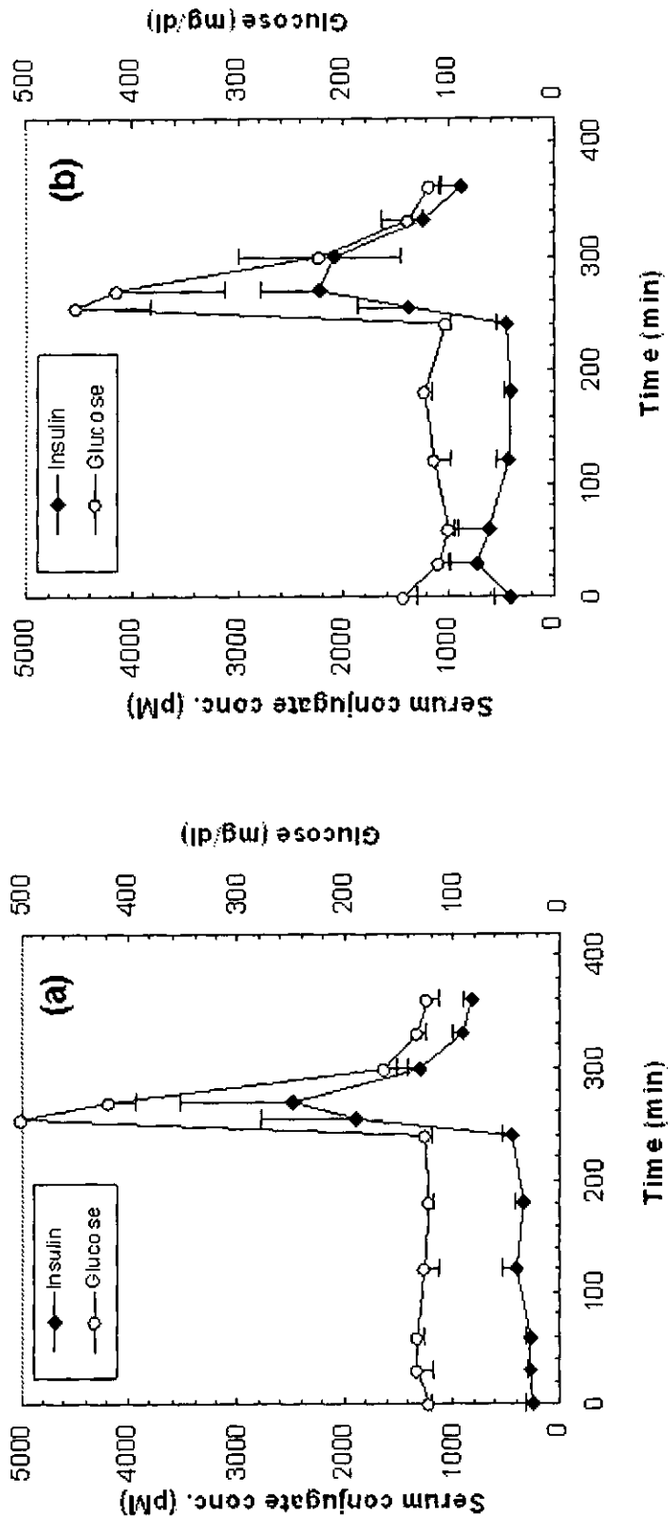

(a)
(b)
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
100
200
300
400
500

Figure 38

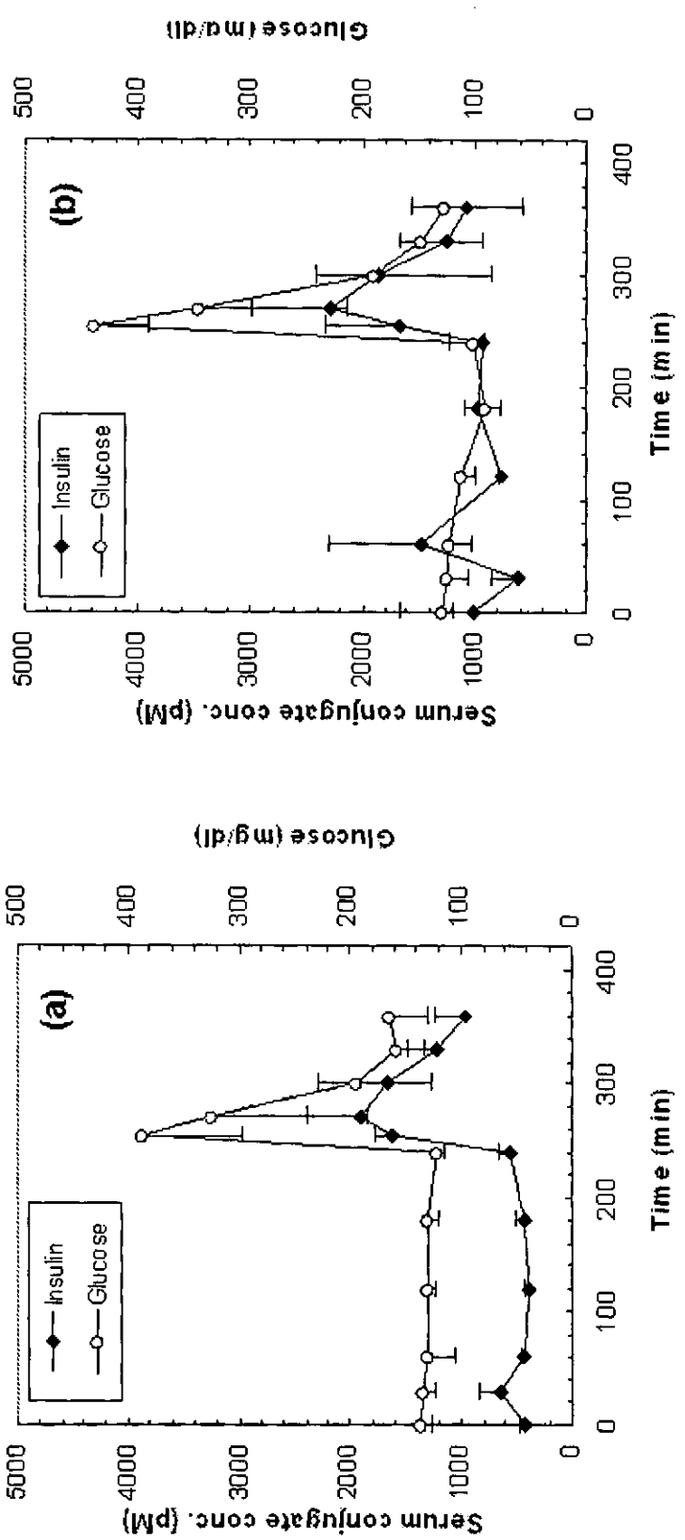

(a)
(b)
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
100
200
300
400
500

Figure 39

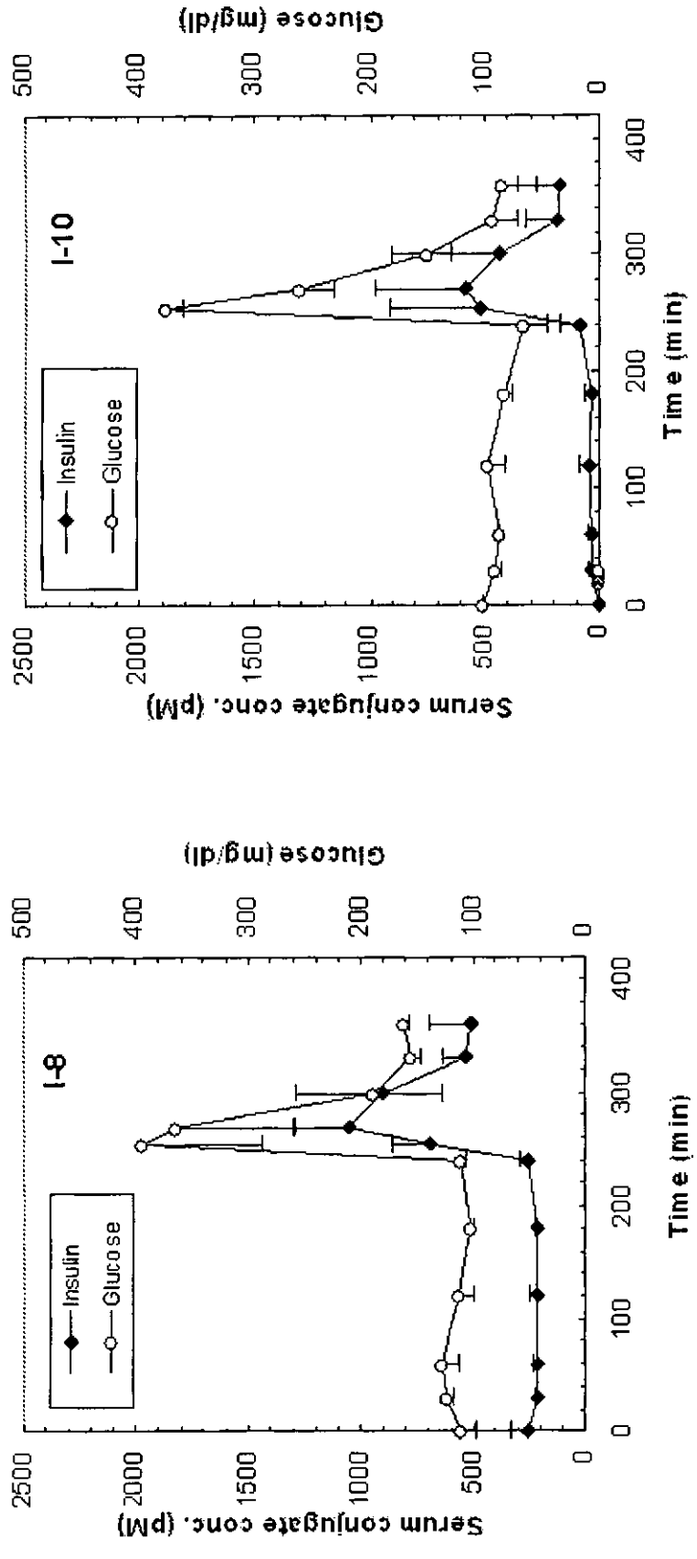

I-8
I-10
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
0
500
1000
1500
2000
2500
100
200
300
400

Figure 40

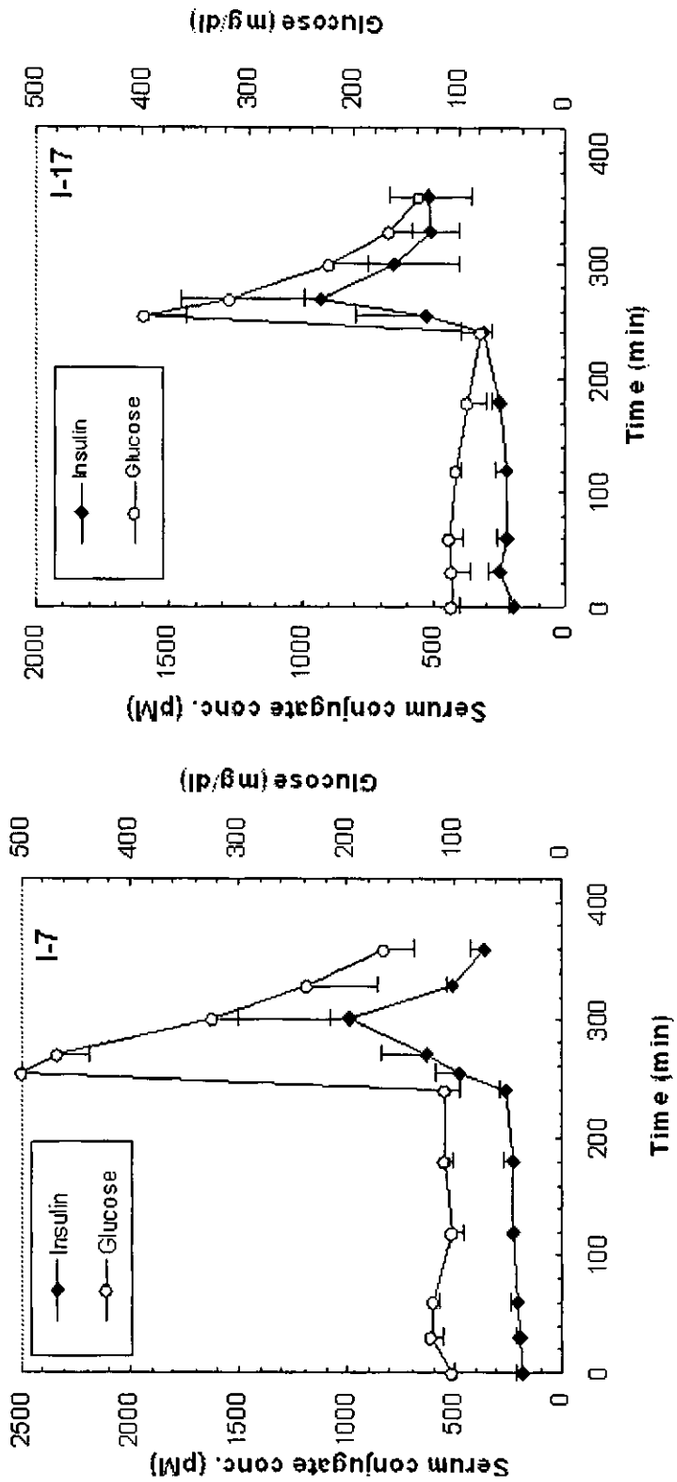


Figure 40 (continued)

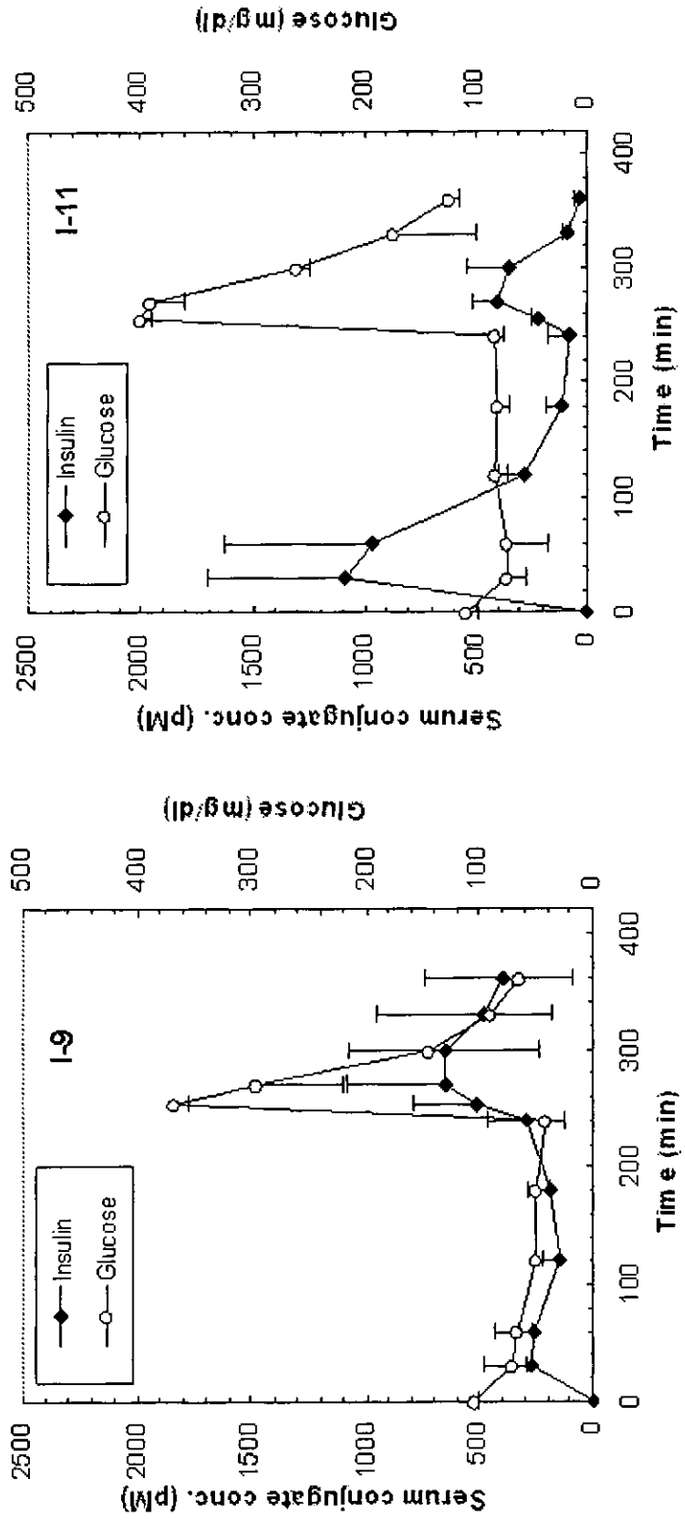


Figure 40 (continued)

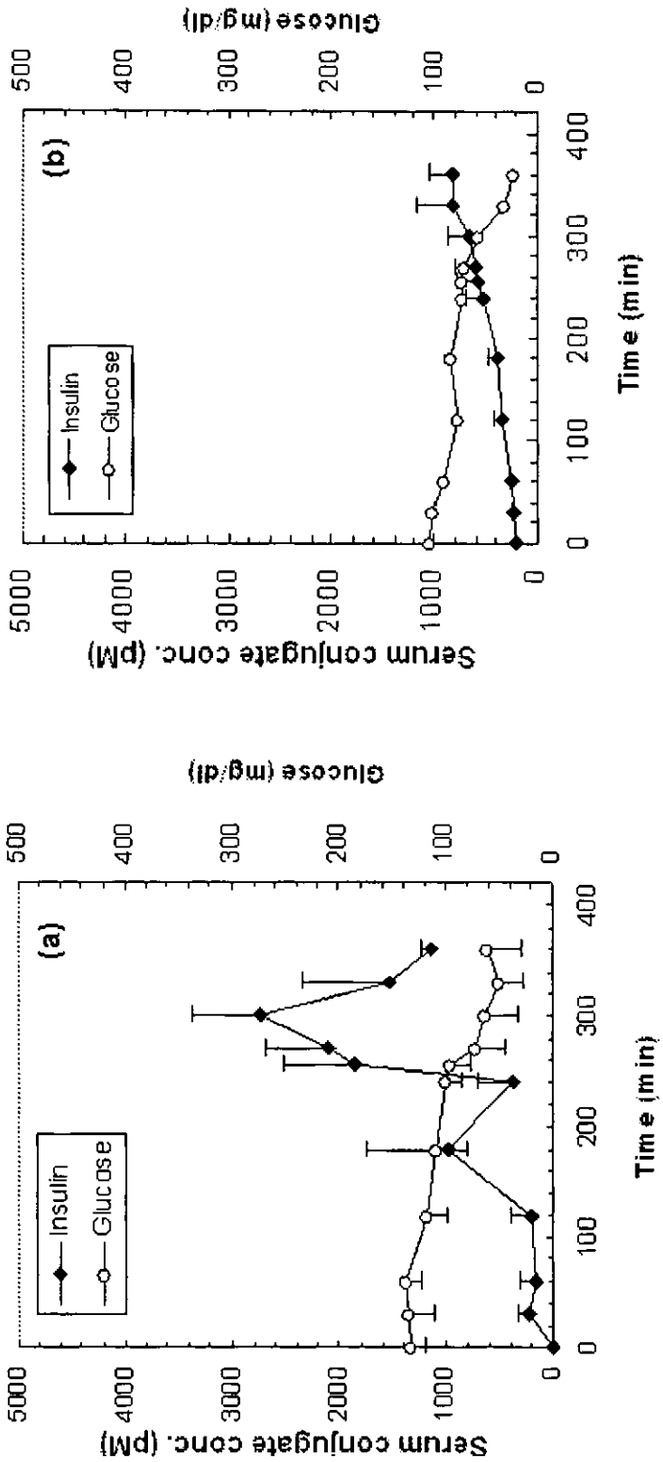
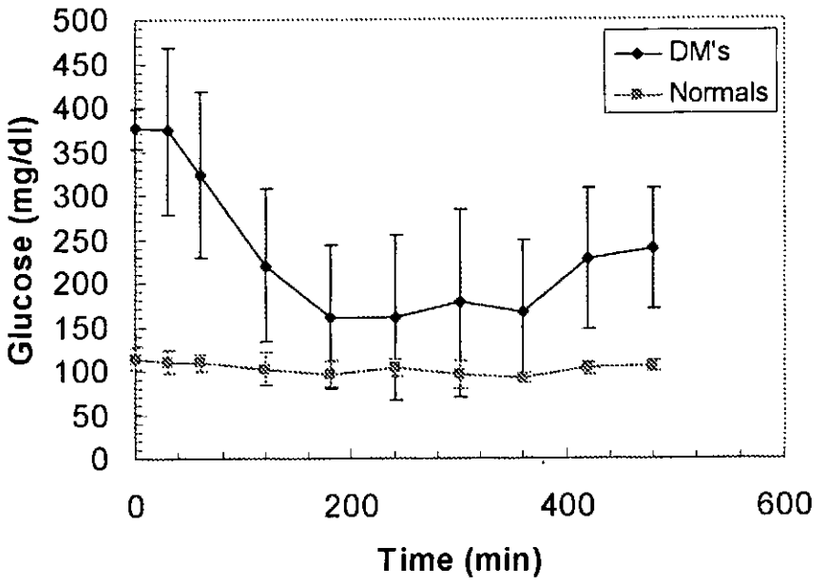

(a)
(b)
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
100
200
300
400
500

Figure 41

5 U/kg



10 U/kg

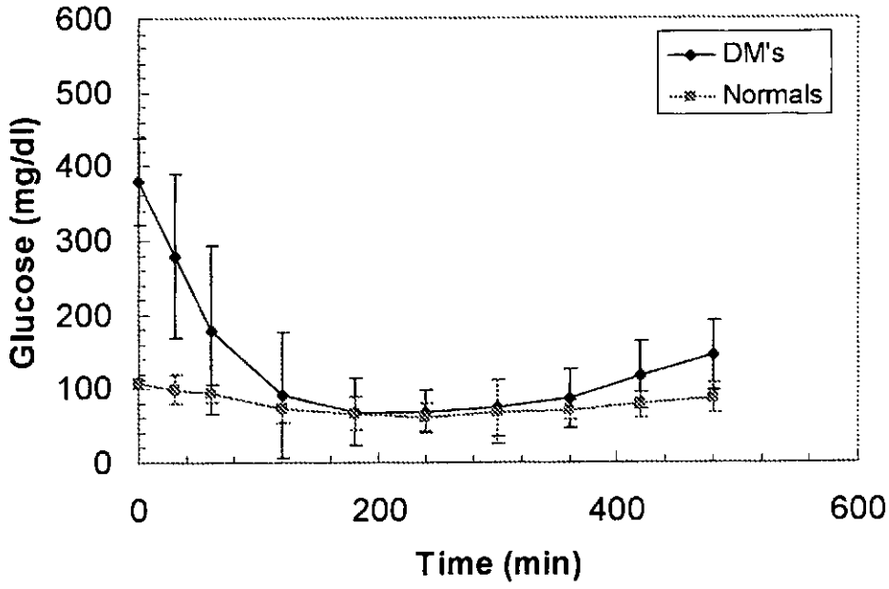


Figure 42

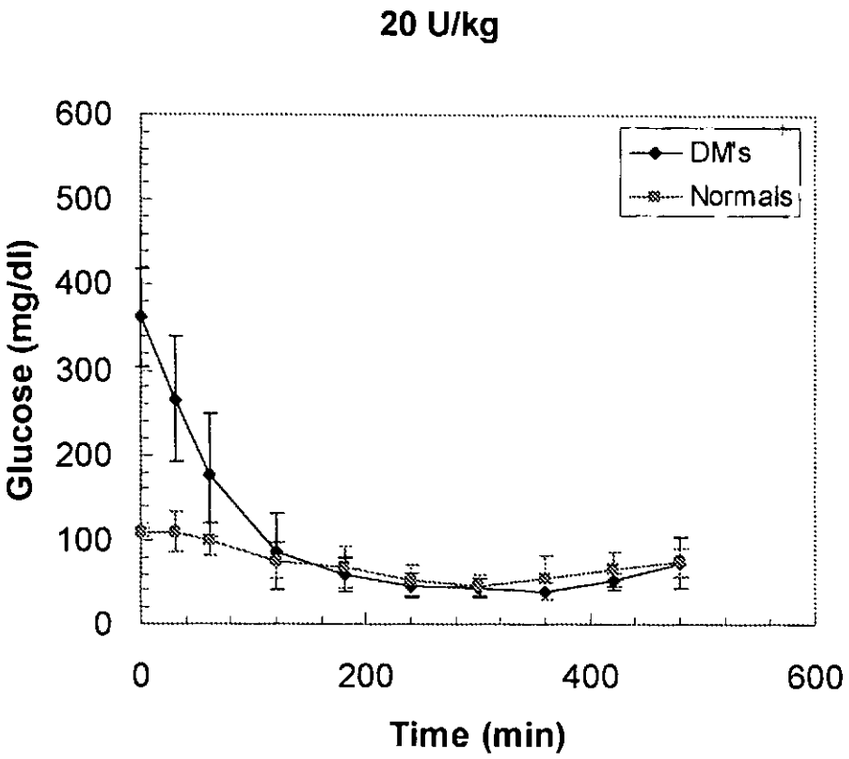


Figure 42 (continued)

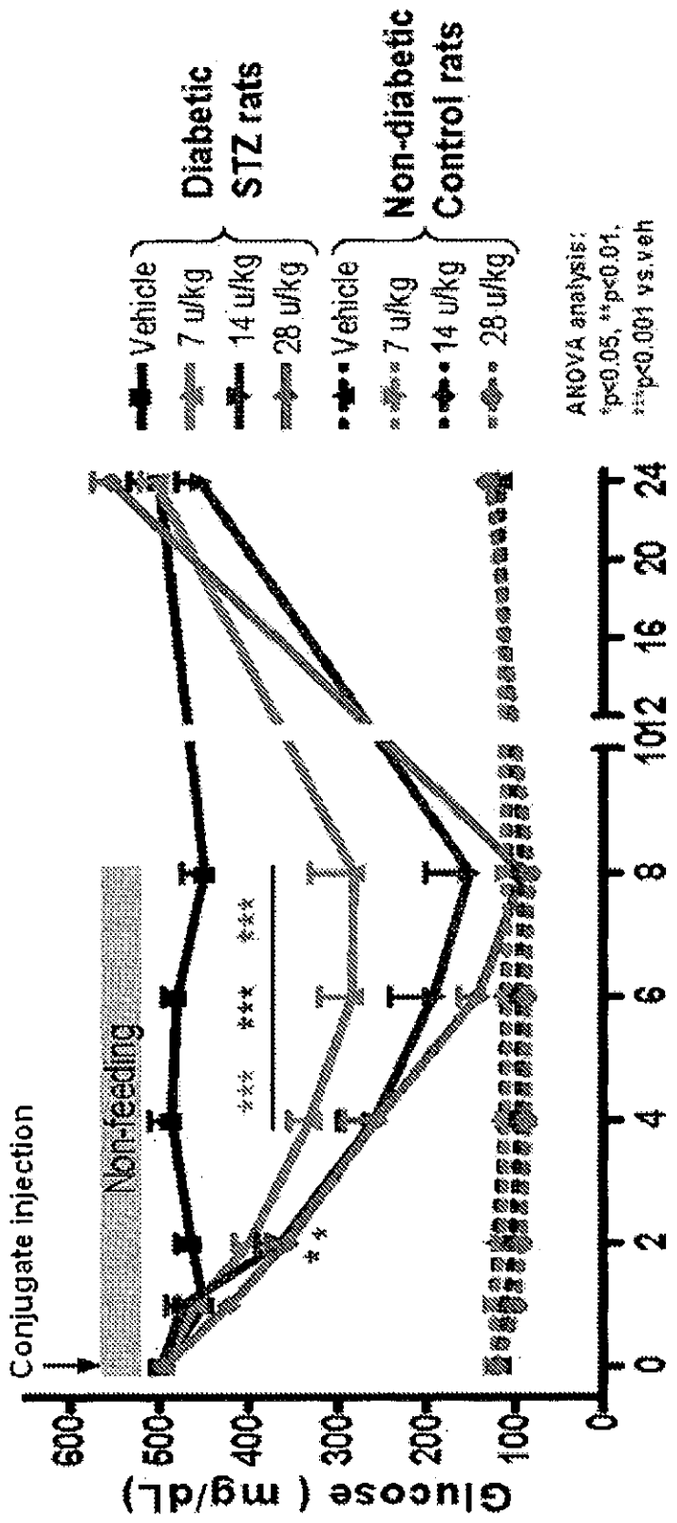

Conjugate injection
Non-feeding
Glucose (mg/dL)
600
500
400
300
200
100
0
0
2
4
6
8
10
12
16
20
24
Time (hour)
Vehicle
7 u/kg
14 u/kg
28 u/kg
Diabetic STZ rats
Vehicle
7 u/kg
14 u/kg
28 u/kg
Non-diabetic Control rats
ANOVA analysis:
*p<0.05, **p<0.01,
***p<0.001 vs.veh

Figure 43

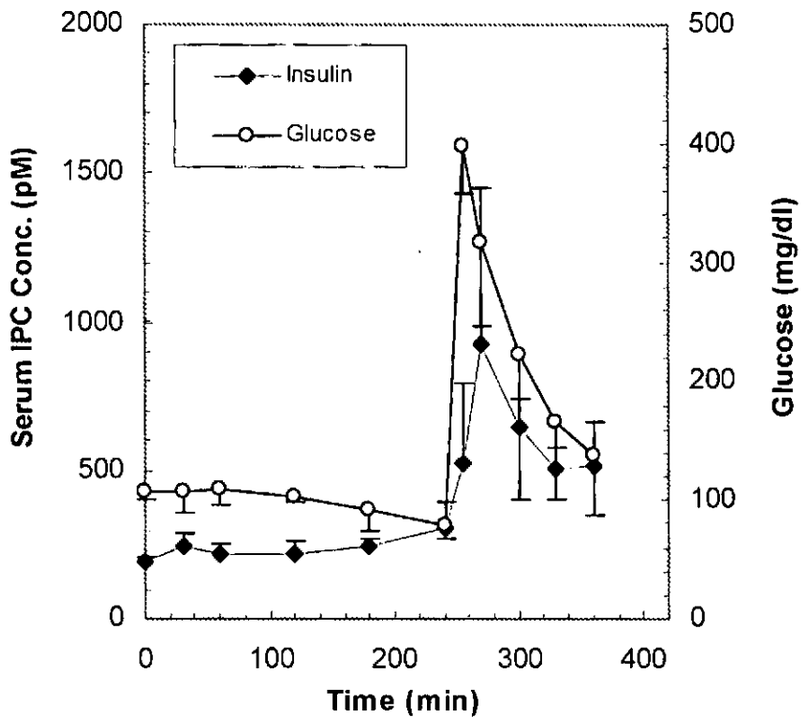
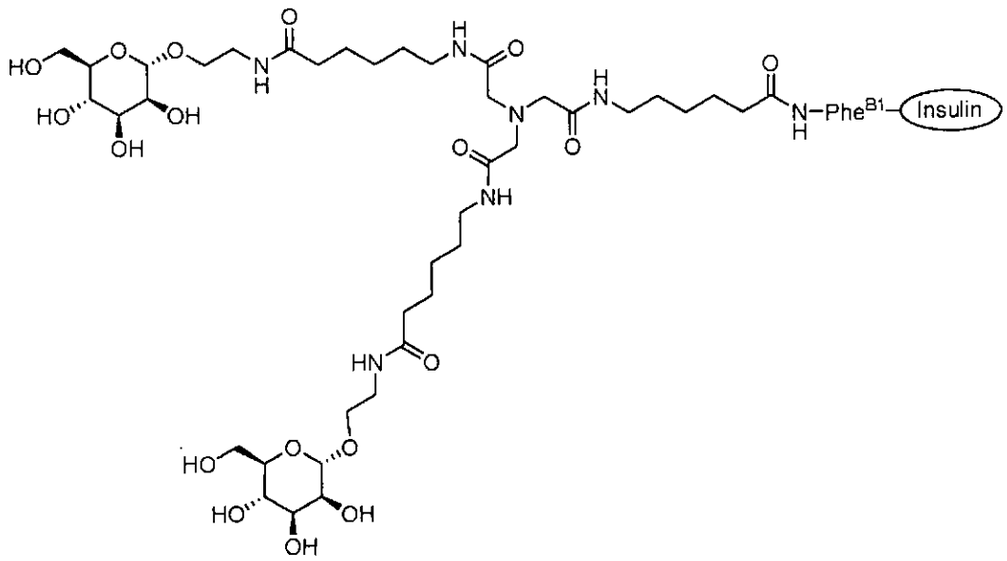
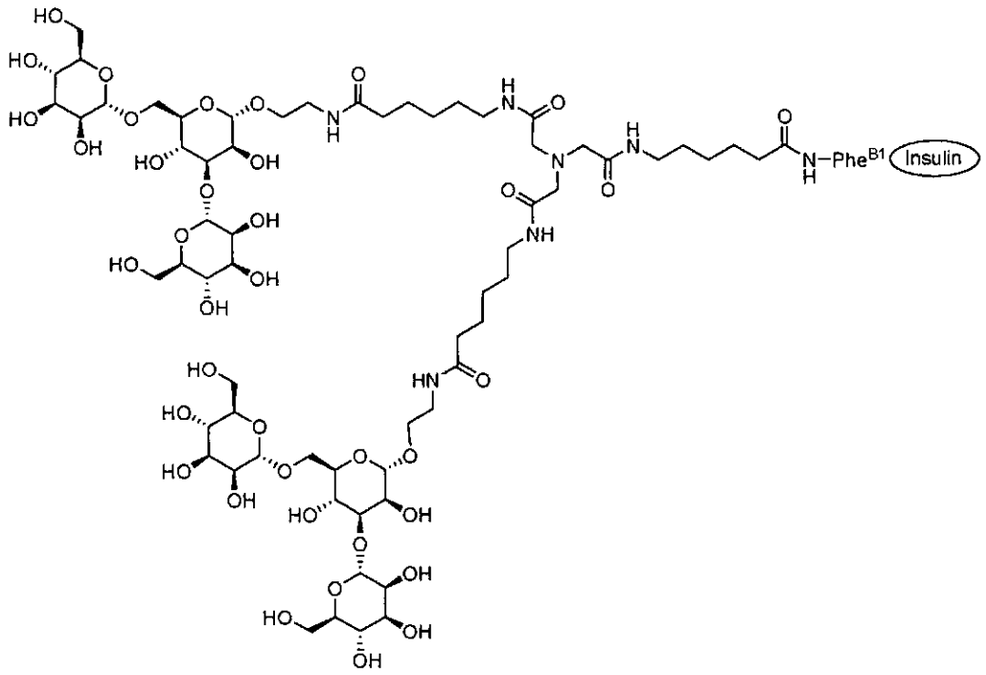

Insulin
Glucose
Serum IPC Conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
2000
1500
1000
500
0
500
400
300
200
100
0
0
100
200
300
400

Figure 44

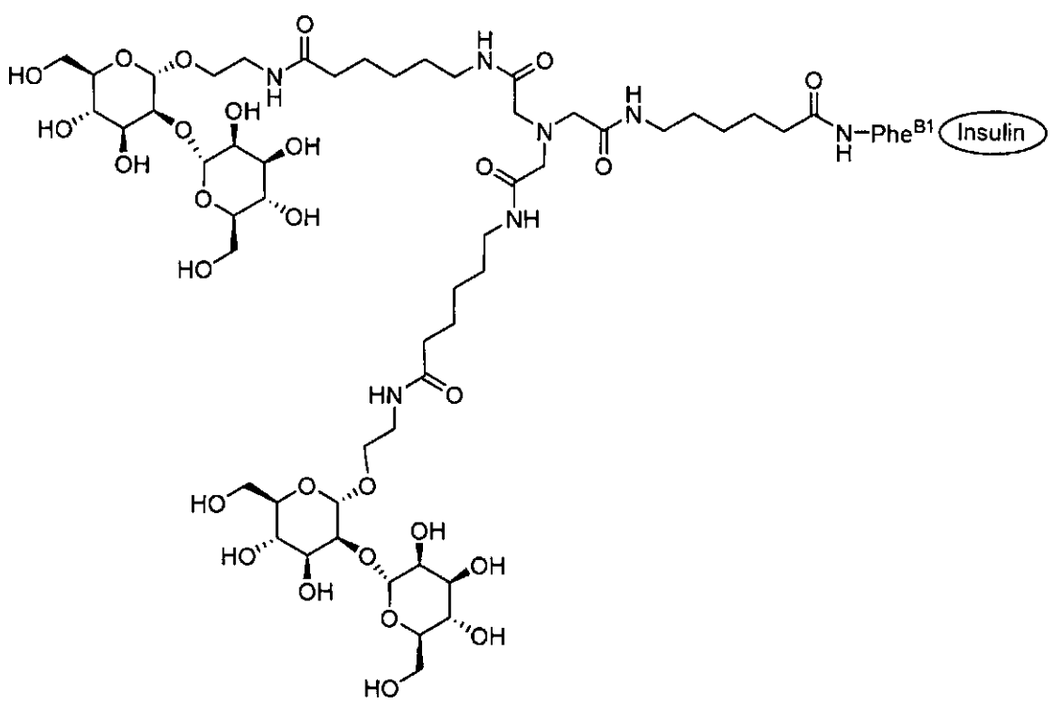


Conjugate I-1
TSAT-C6-AEM-2 (B1)

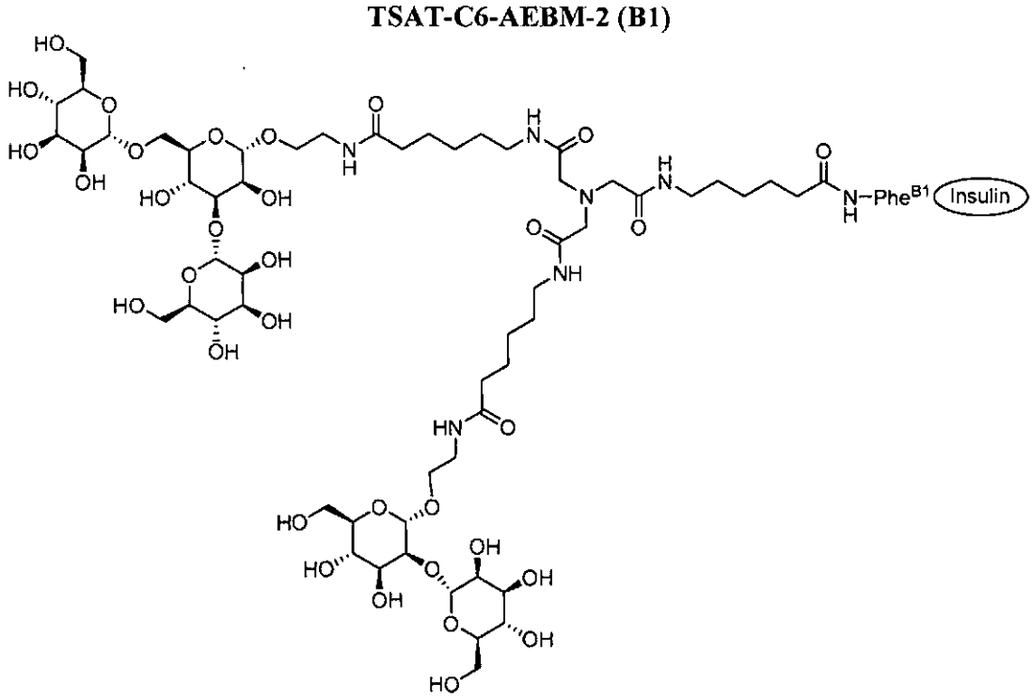


Conjugate I-2
TSAT-C6-AETM-2 (B1)

Figure 45

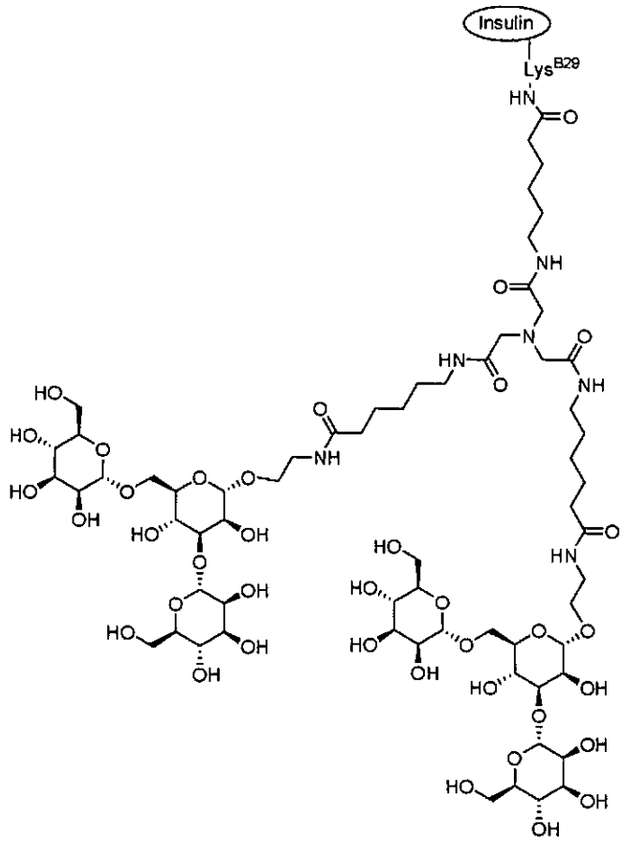


Conjugate I-3
TSAT-C6-AEBM-2 (B1)



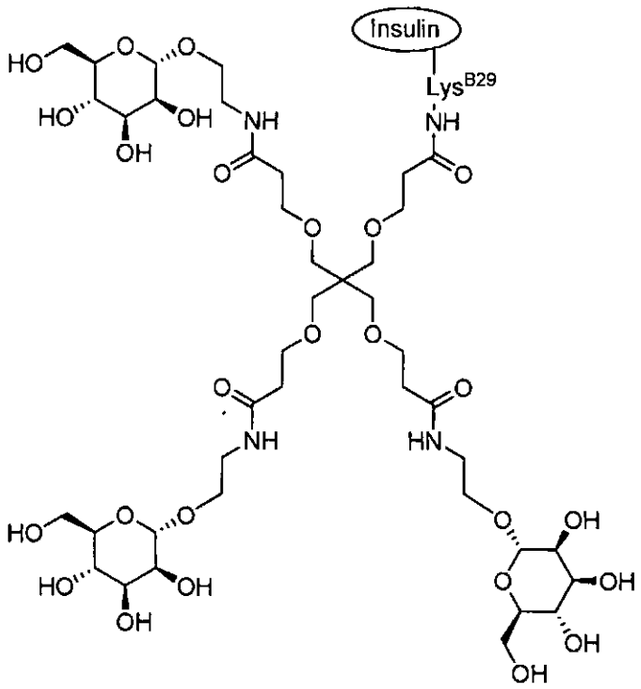
Conjugate I-4
TSAT-C6-AEBM-1-AETM-1 (B1)

Figure 45 (continued)

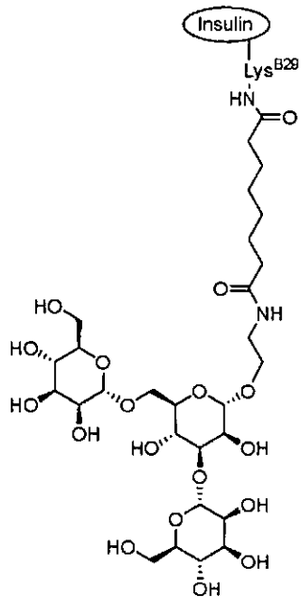


Conjugate I-6
TSAT-C6-AETM-2 (B29)

Figure 45 (continued)

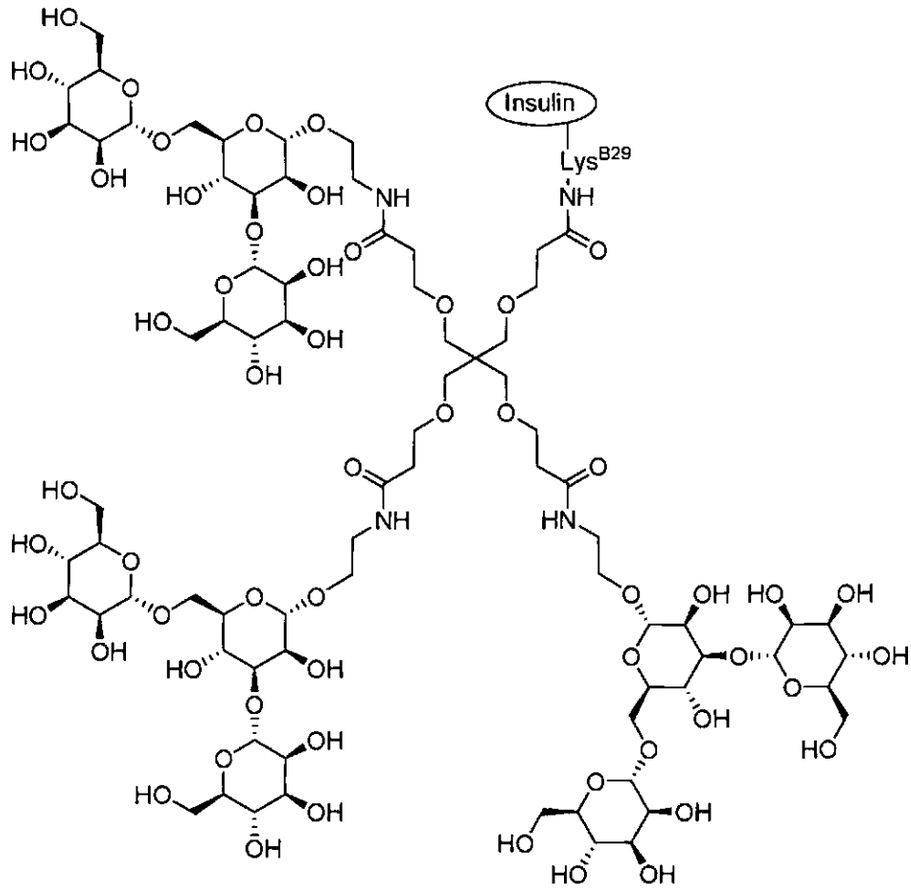


Conjugate I-9
TSPE-AEM-3 (B29)



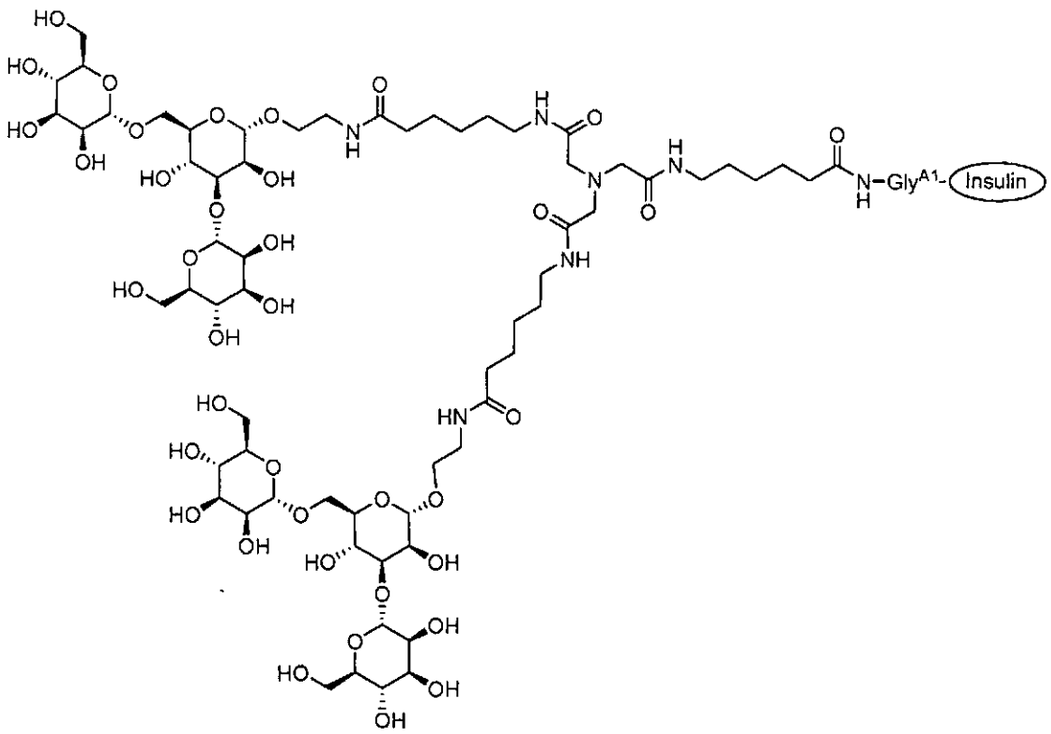
Conjugate I-10
DSS-AETM-1 (B29)

Figure 45 (continued)

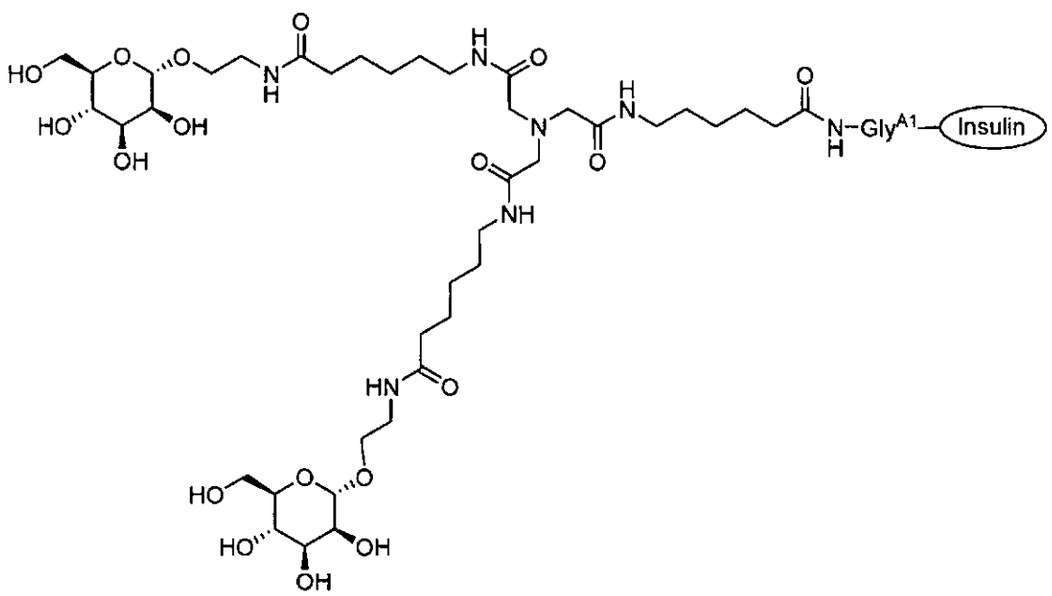


Conjugate I-11
TSPE-AETM-3 (B29)

Figure 45 (continued)

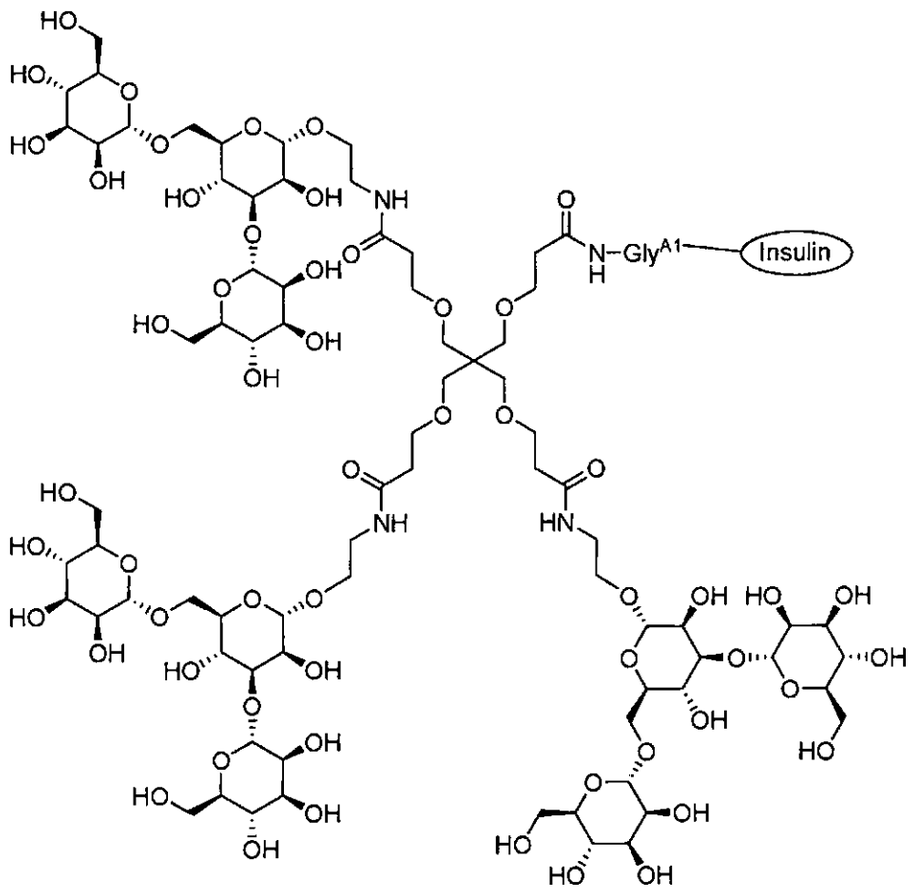


Conjugate I-12
TSAT-C6-AETM-2 (A1)



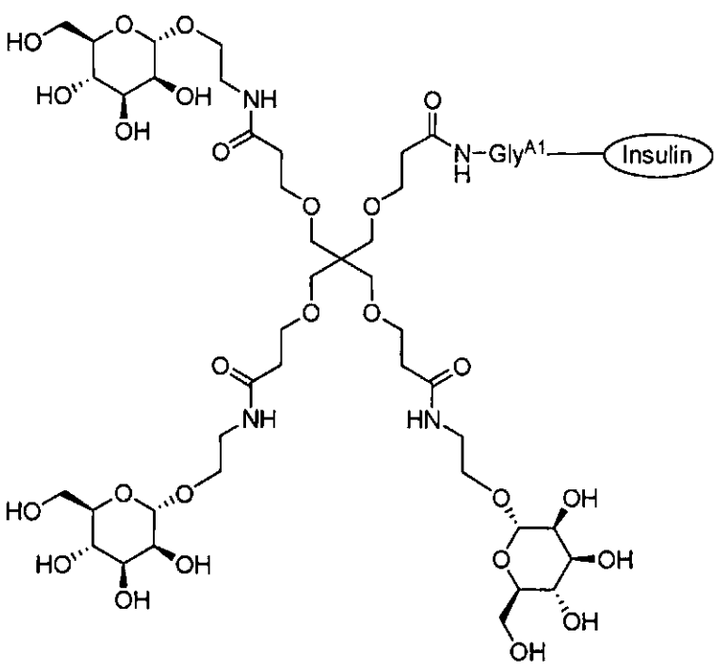
Conjugate I-13
TSAT-C6-AEM-2 (A1)

Figure 45 (continued)

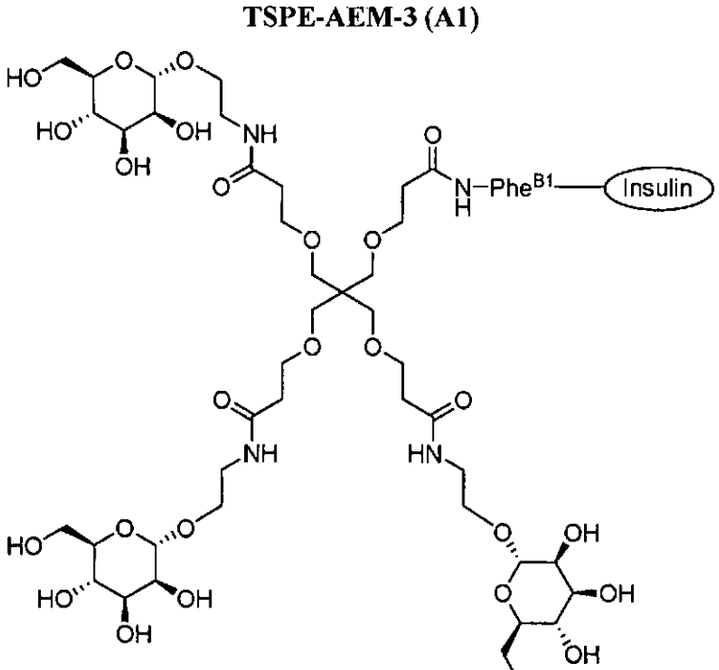


Conjugate I-14
TSPE-AETM-3 (A1)

Figure 45 (continued)

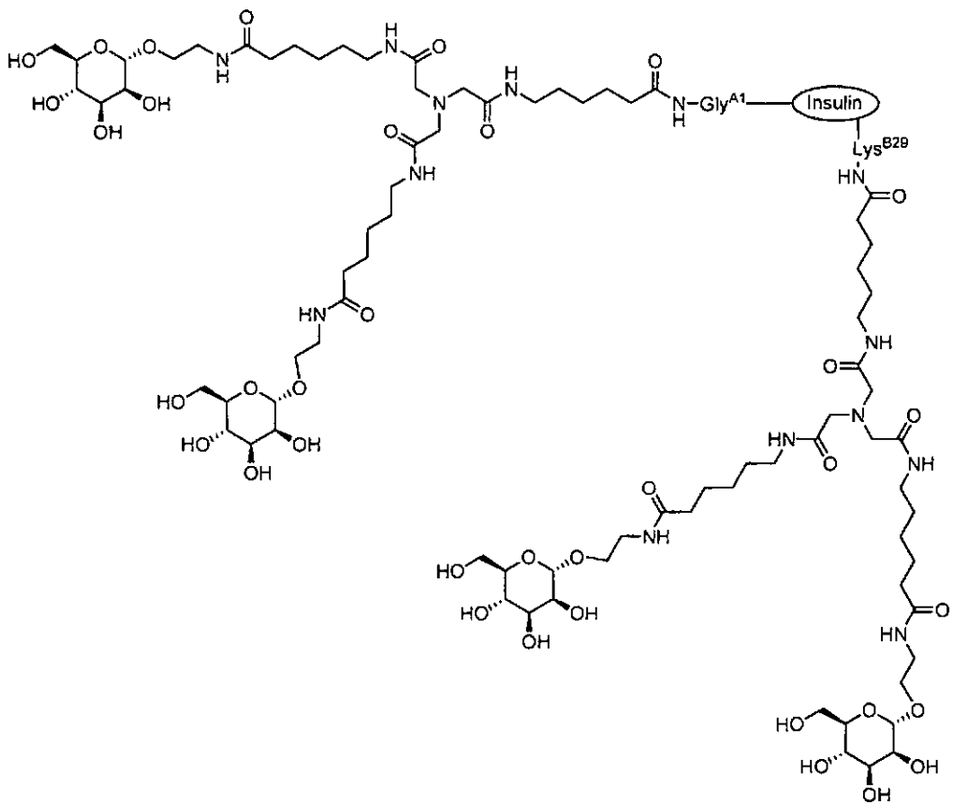


Conjugate I-15
TSPE-AEM-3 (A1)



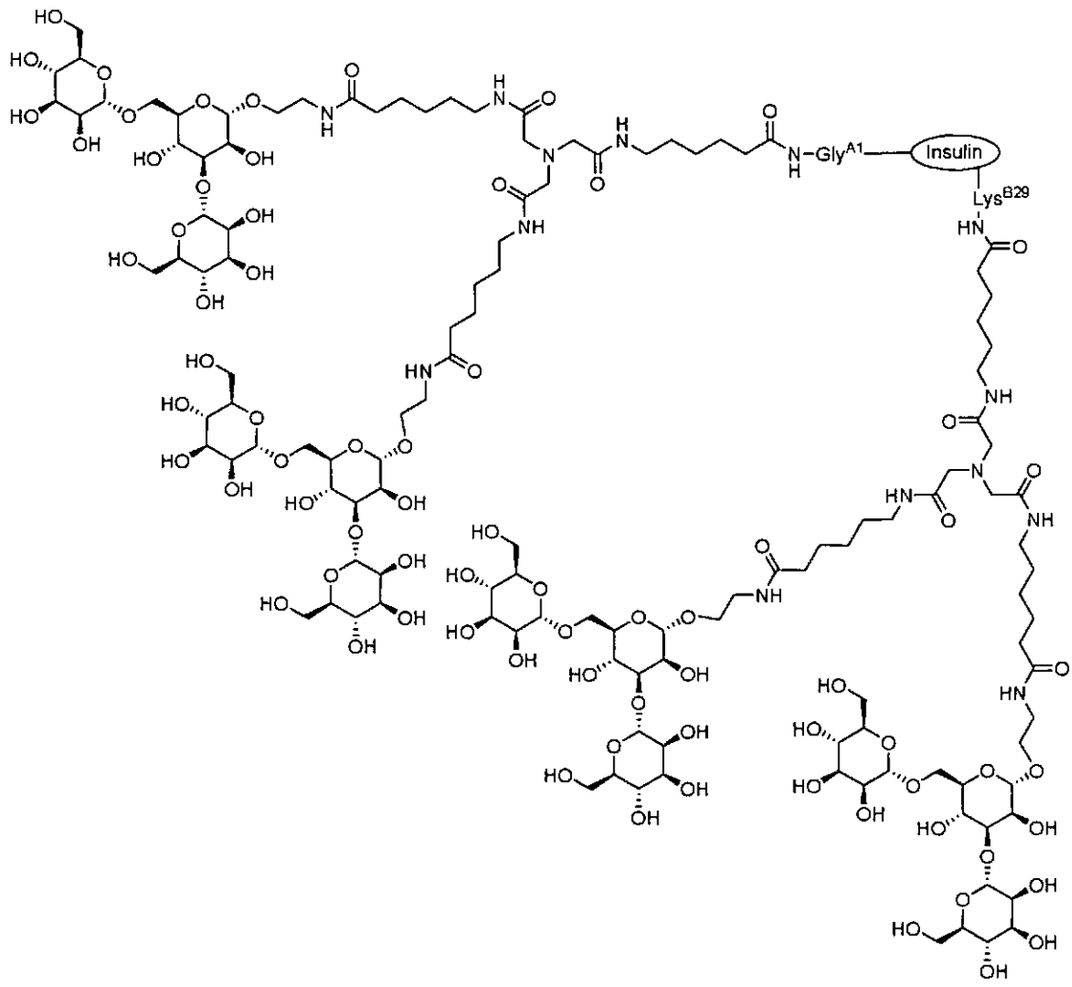
Conjugate I-16
TSPE-AEM-3 (B1)

Figure 45 (continued)



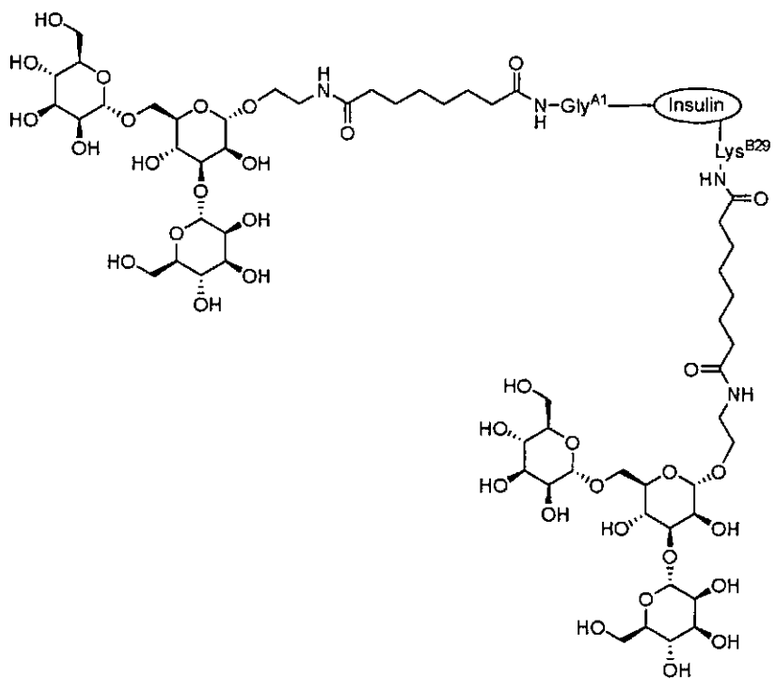
Conjugate II-1
TSAT-C6-Di-sub-AEM-2 (A1,B29)

Figure 45 (continued)

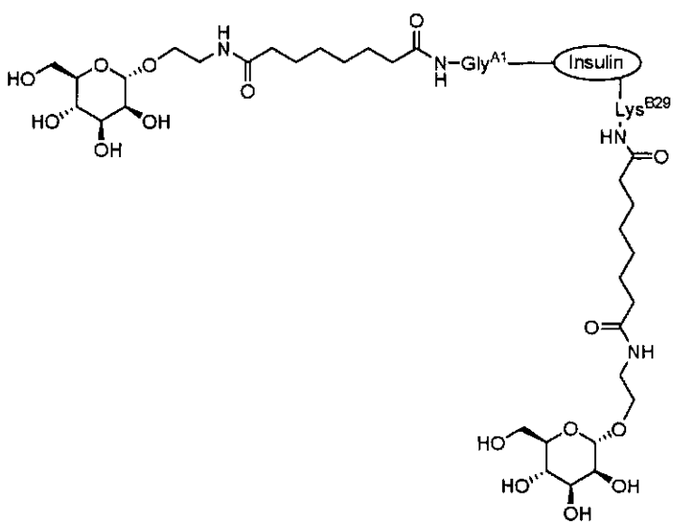


Conjugate II-2
TSAT-C6-Di-sub-AETM-2 (A1,B29)

Figure 45 (continued)

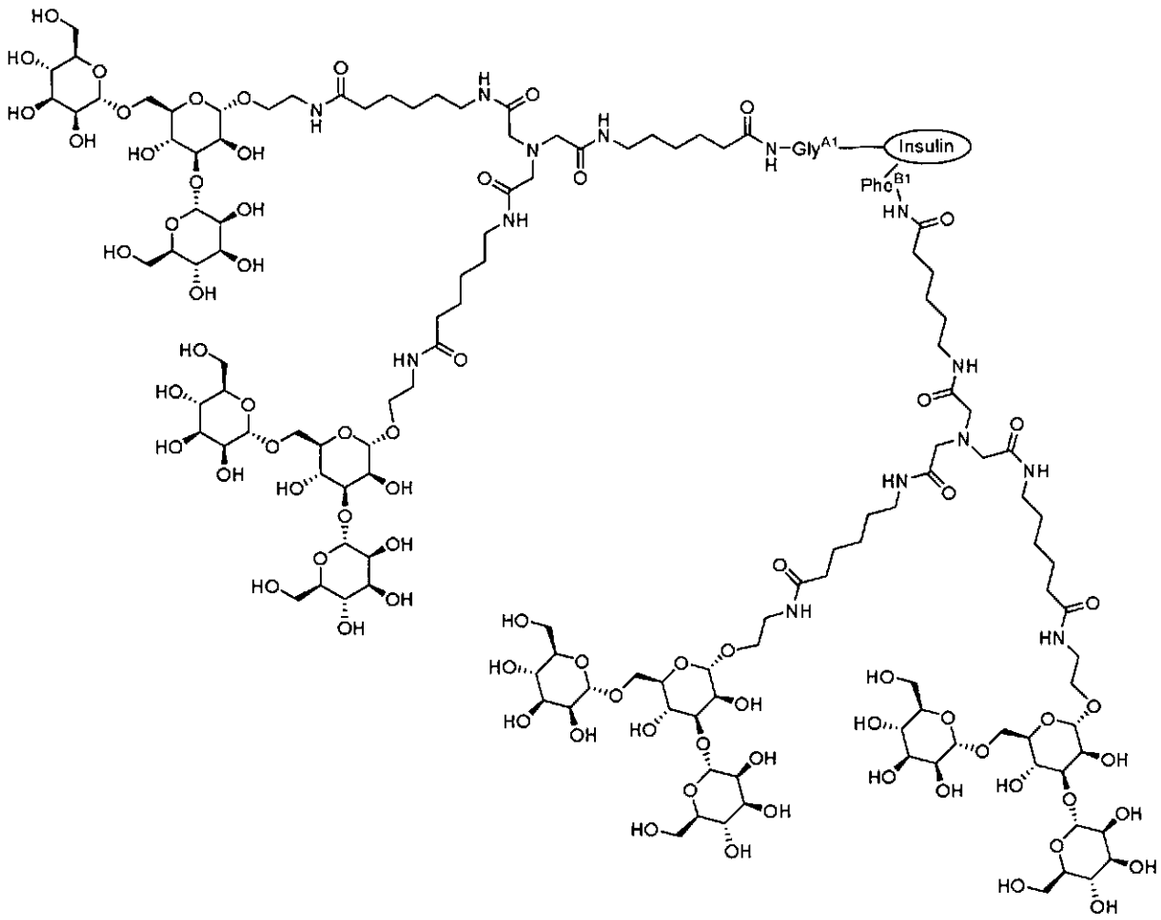


Conjugate II-3
DSS-Di-sub-AETM-1 (A1,B29)



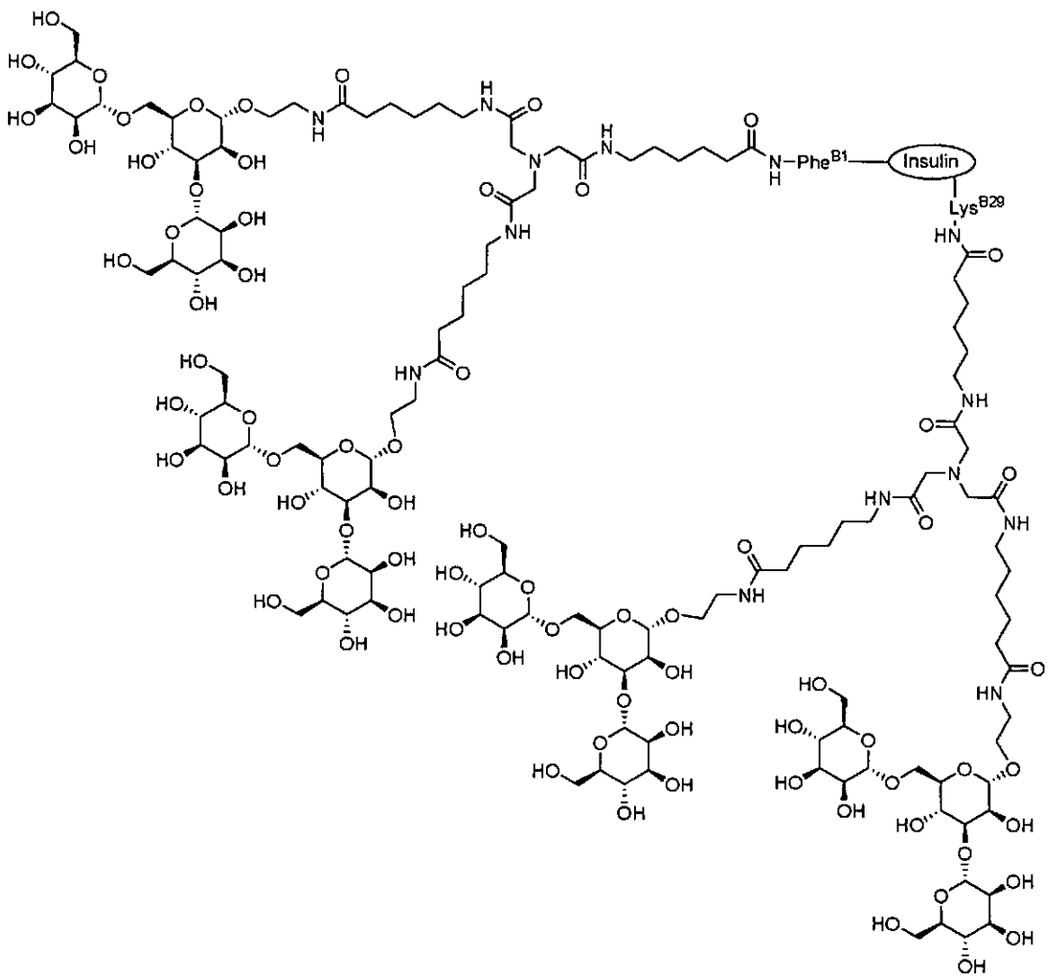
Conjugate II-4
DSS-Di-sub-AEM-1 (A1,B29)

Figure 45 (continued)



Conjugate II-5
TSAT-C6-Di-sub-AETM-2 (A1,B1)

Figure 45 (continued)



Conjugate II-6
TSAT-C6-Di-sub-AETM-2 (B1,B29)

Figure 45 (continued)

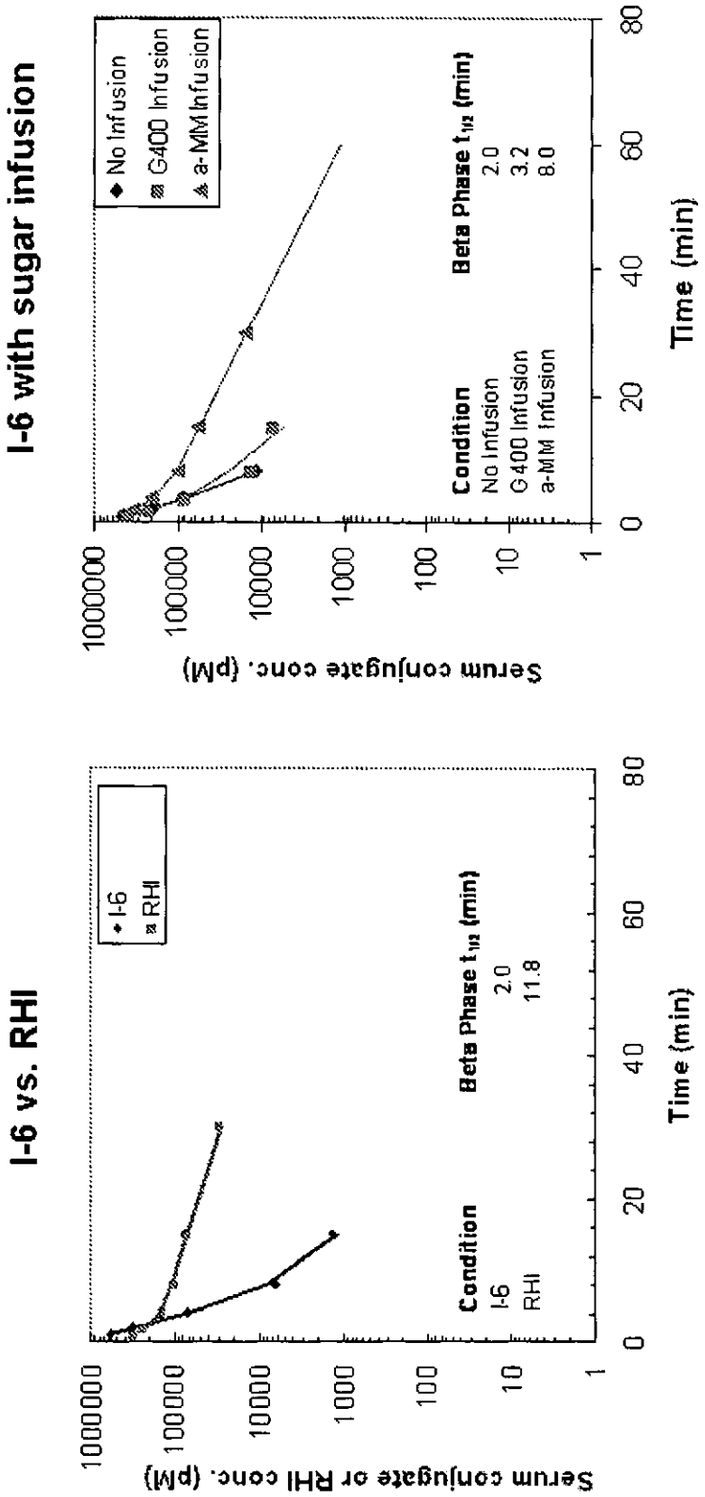

I-6 vs. RHI
Serum conjugate or RHI conc. (pM)
Time (min)
I-6
RHI
Condition
Beta Phase t1/2 (min)
I-6 2.0
RHI 11.8
I-6 with sugar infusion
Serum conjugate conc. (pM)
Time (min)
No Infusion
G400 Infusion
a-MM Infusion
Condition
Beta Phase t1/2 (min)
No Infusion 2.0
G400 Infusion 3.2
a-MM Infusion 8.0

Figure 46

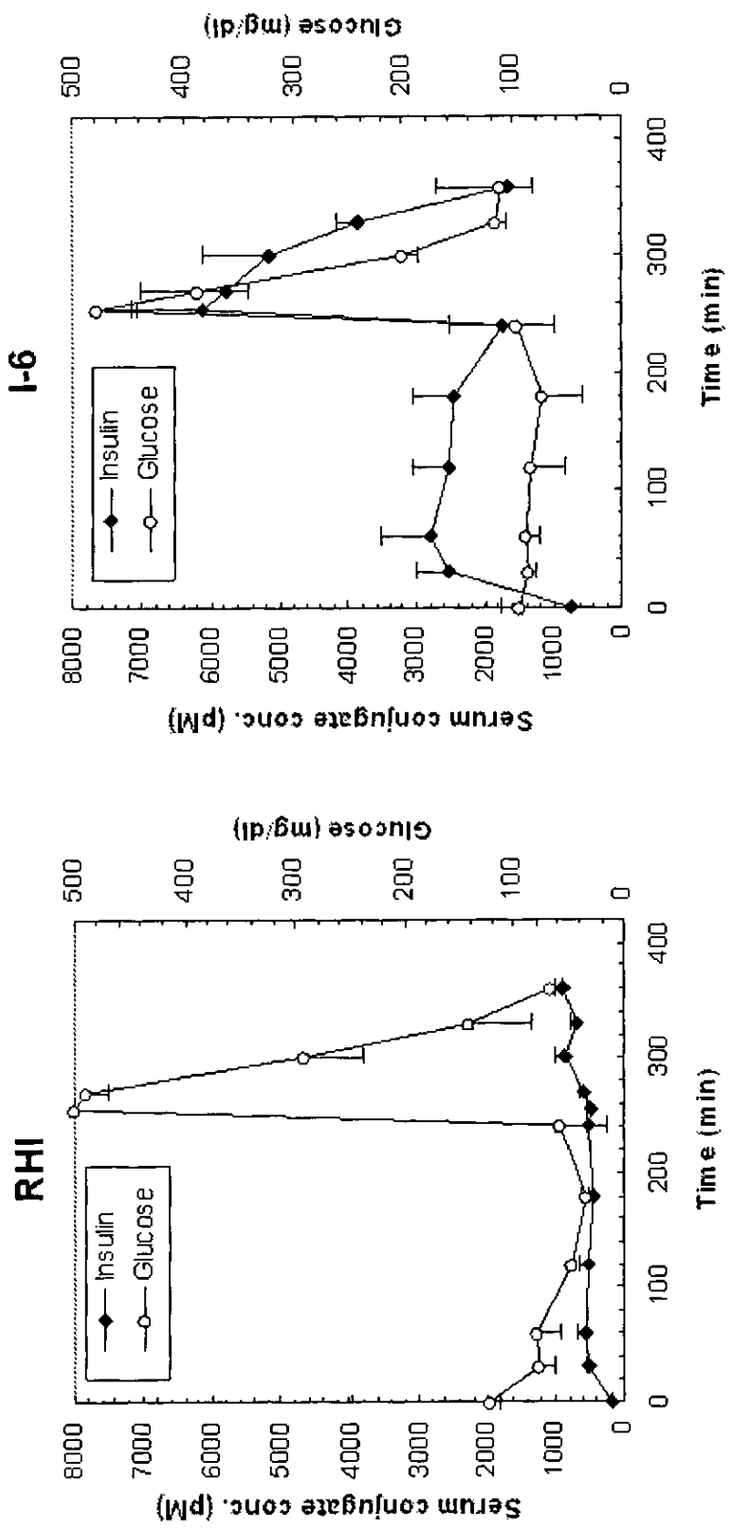

I-6
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
0
100
200
300
400
500
0
100
200
300
400
RHI
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)

Figure 47

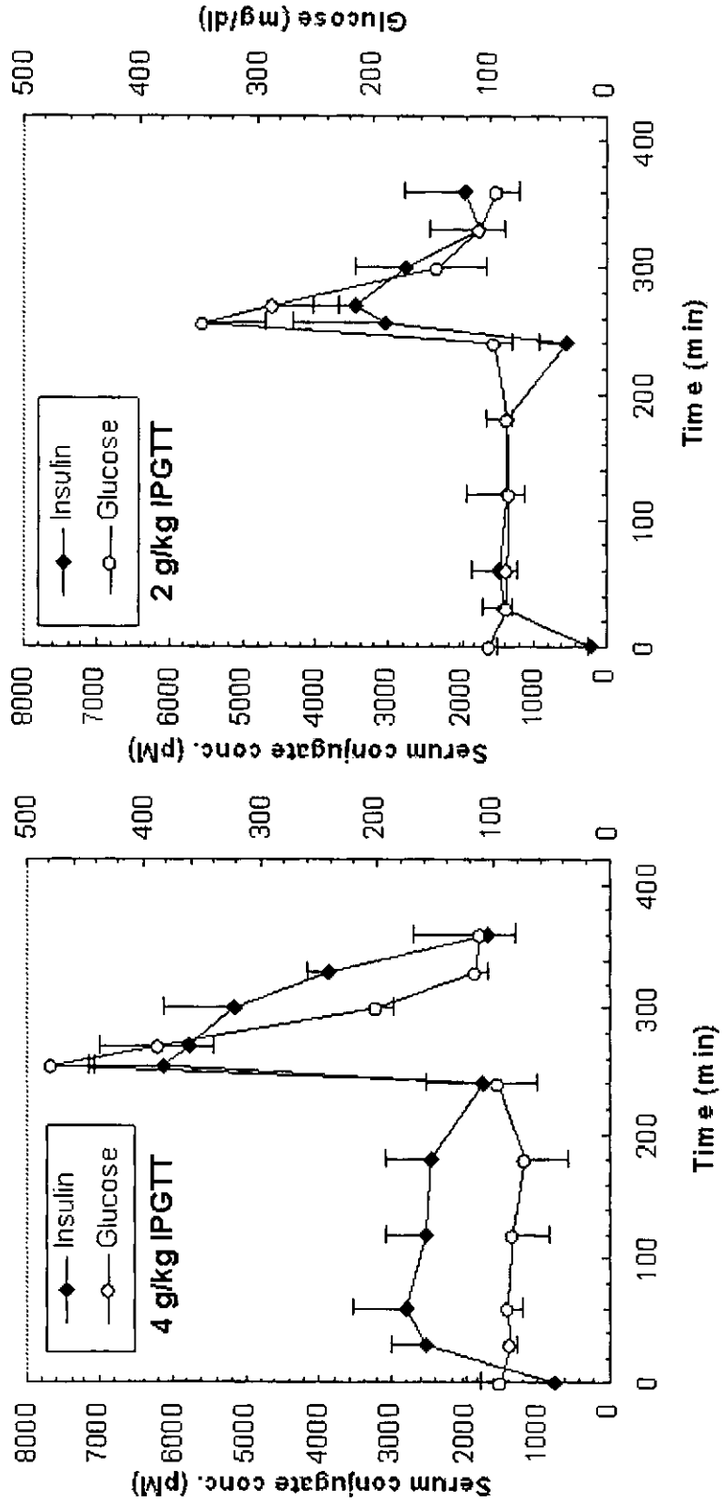


Figure 47 (continued)

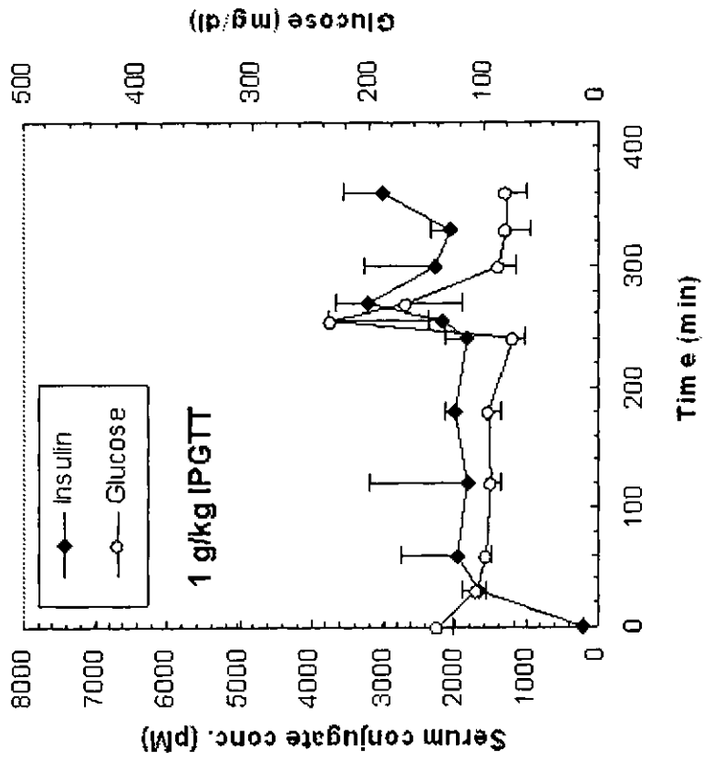
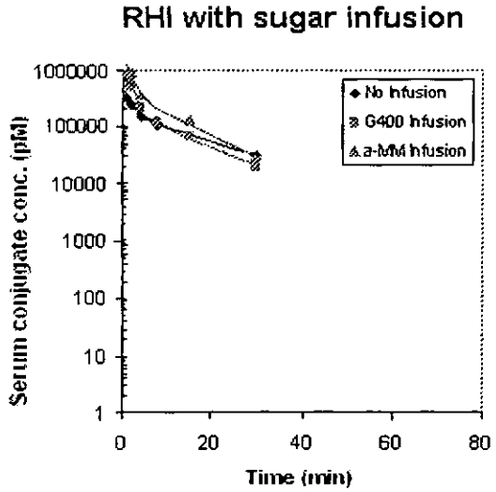
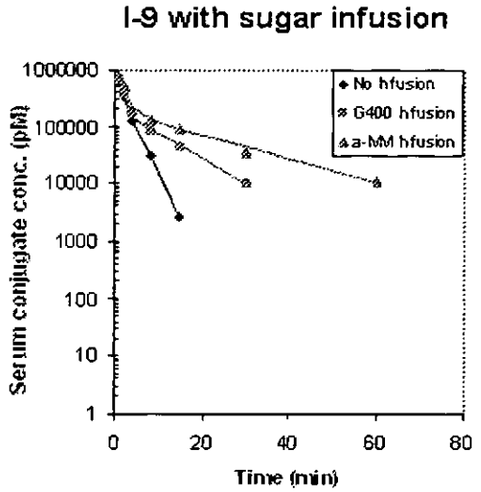


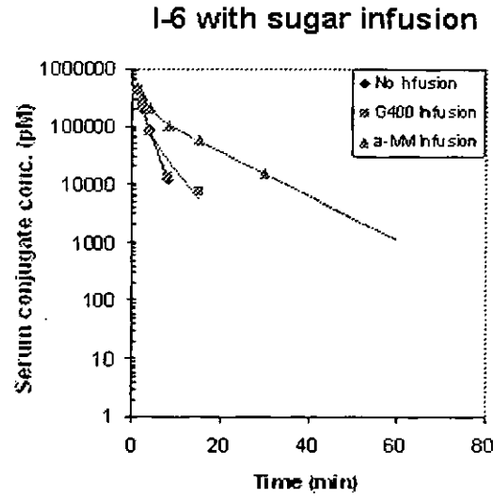
Figure 47 (continued)



Condition	Beta Phase $t_{1/2}$ (min)
No Infusion	11.8
G400 Infusion	8.6
a-MM Infusion	8.0

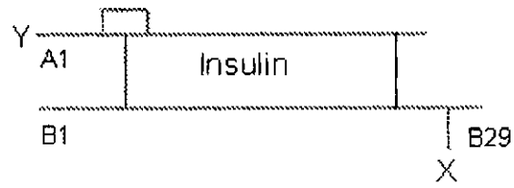


Condition	Beta Phase $t_{1/2}$ (min)
No Infusion	2.0
G400 Infusion	6.9
a-MM Infusion	14.4



Condition	Beta Phase $t_{1/2}$ (min)
No Infusion	2.0
G400 Infusion	3.2
a-MM Infusion	8.0

Figure 48



Formulation	Scaffold – X	Scaffold – Y	Sugar (n)
RHI	n/a	n/a	n/a
I-7: AEM-2	n/a	TSAT-C_6	AEM (2)
I-6: AETM-2	n/a	TSAT-C_6	AETM (2)
I-11: AETM-3	n/a	TSPE	AETM (3)
II-2: Di-sub-AETM-2	TSAT-C_6	TSAT-C_6	AETM (2x2)

Figure 49

	β-phase half-life (min) for each type of infusion		
Formulation	Saline	Glucose	α-methyl mannose
RHI	2.7	2.3	3.3
I-7: AEM-2	5.5	5.8	5.4
I-6: AETM-2	4.8	3.3	8.1
I-11: AETM-3	6.7	3.7	10.8
II-2: Di-sub-AETM-2	2.5	n/a	20.3

Figure 50

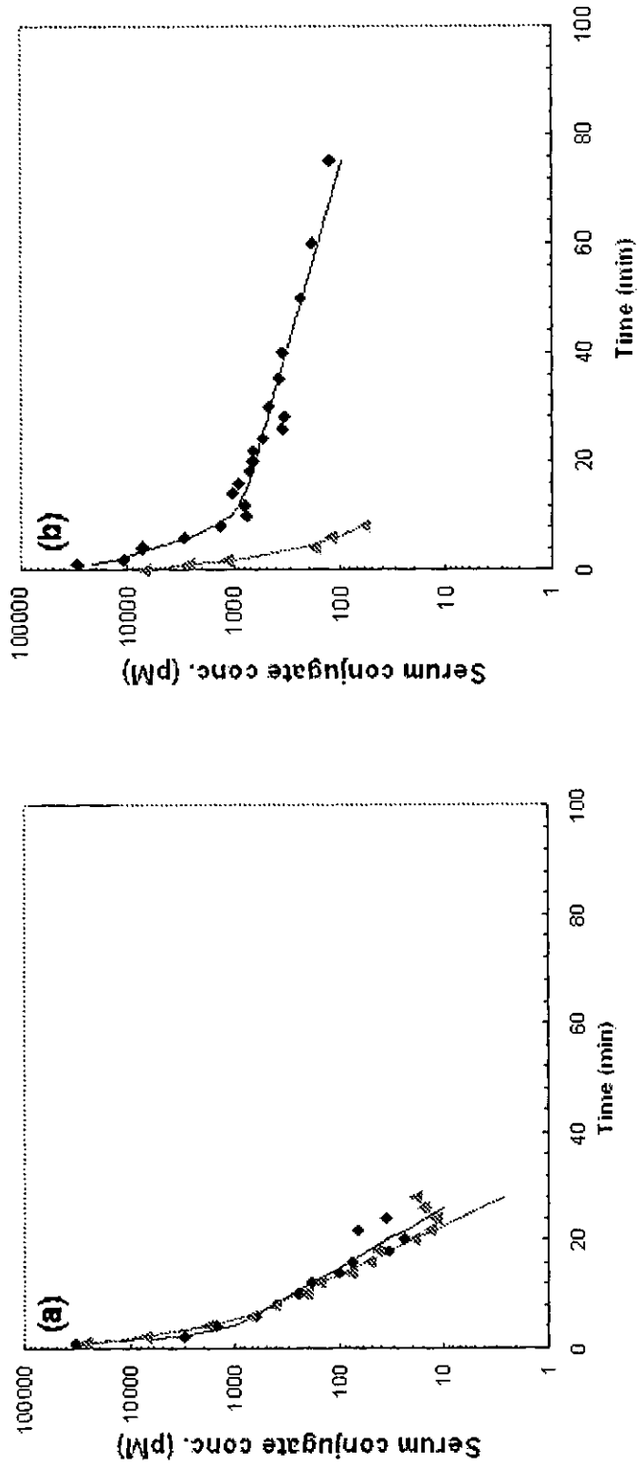

(a)
(b)
Serum conjugate conc. (pM)
100000
10000
1000
100
10
1
0
20
40
60
80
100
Time (min)

Figure 51

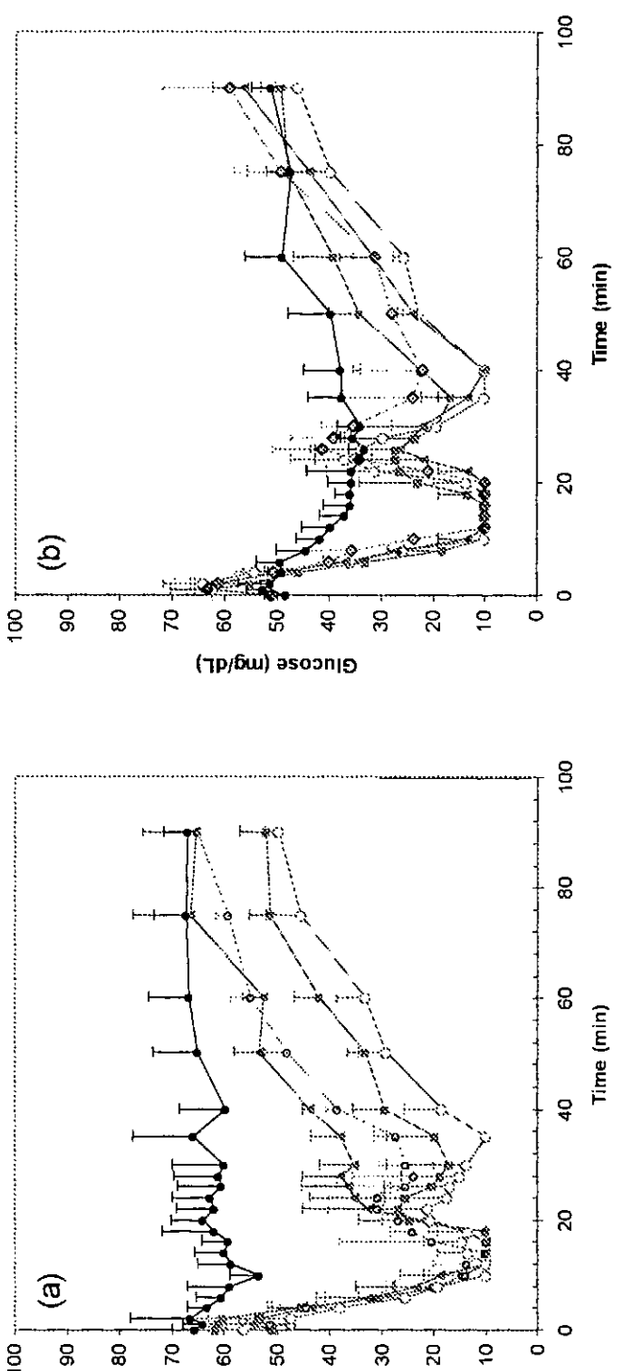

(a)
(b)
Glucose (mg/dL)
Time (min)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
0
20
40
60
80
100

Figure 52

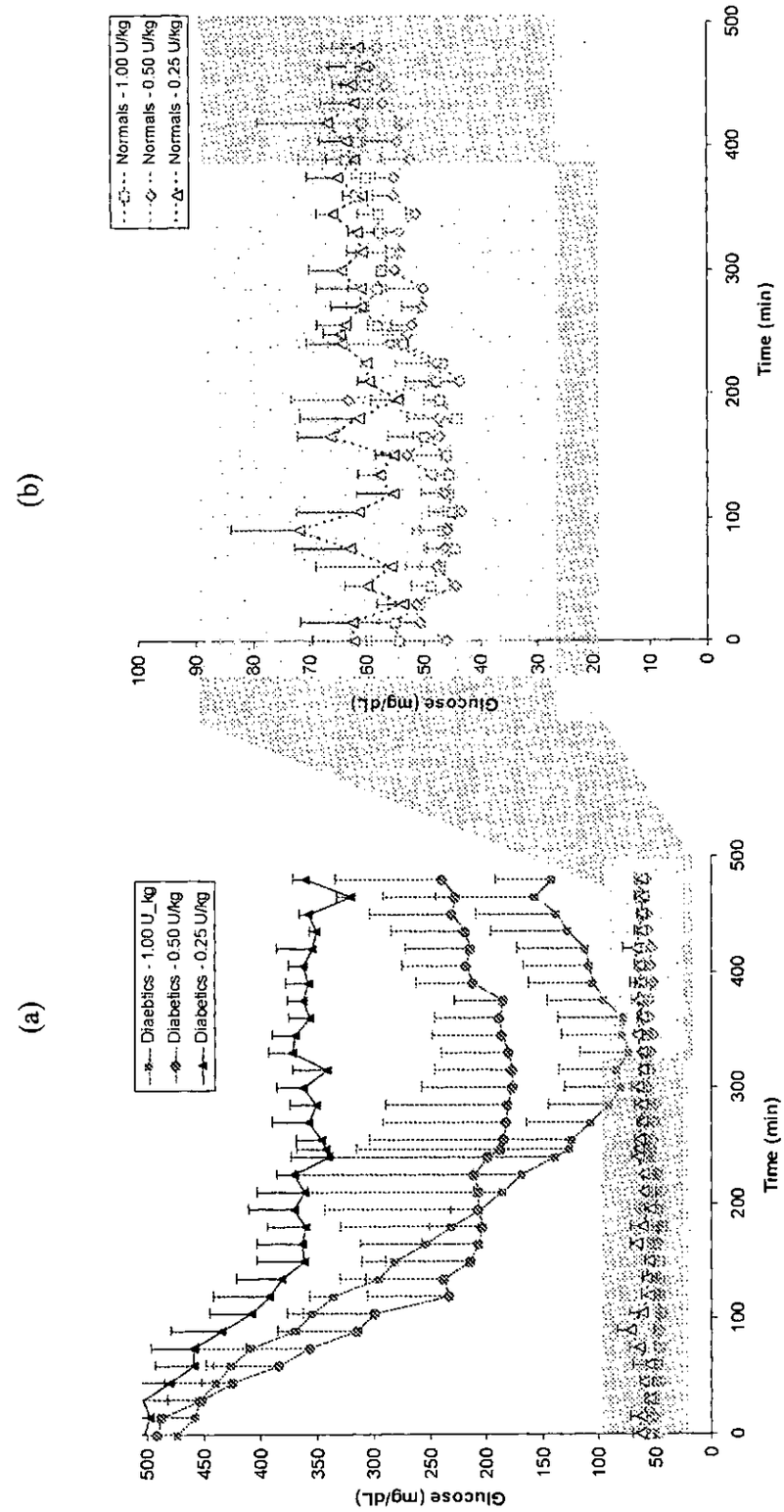

(a)
Diaebtics - 1.00 U_kg
Diabetics - 0.50 U/kg
Diabetics - 0.25 U/kg
Glucose (mg/dL)
Time (min)
(b)
Normals - 1.00 U/kg
Normals - 0.50 U/kg
Normals - 0.25 U/kg
Glucose (mg/dL)
Time (min)

Figure 53

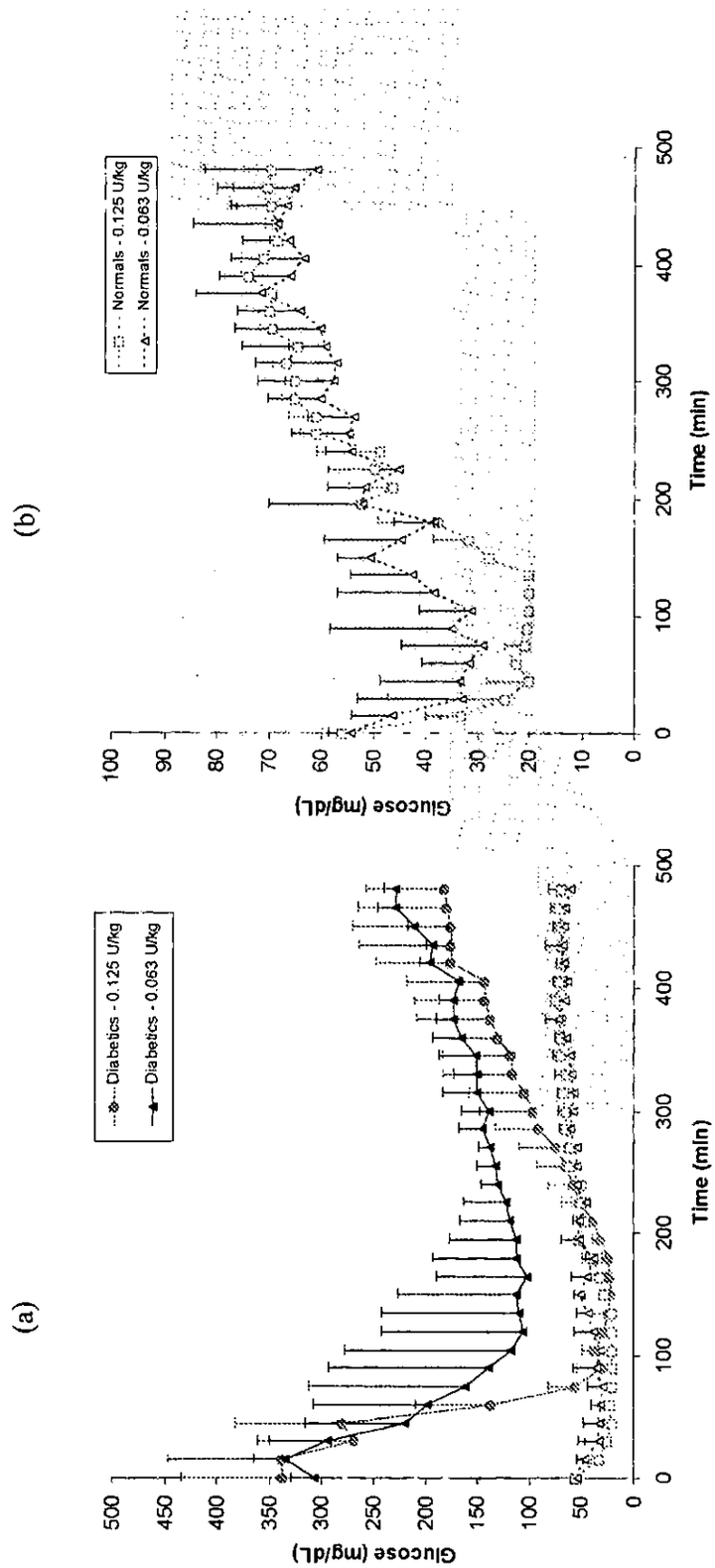
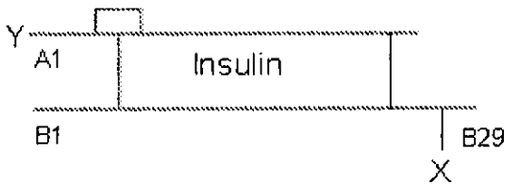
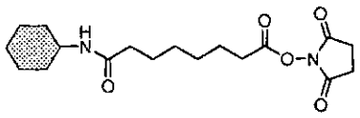

(a)
Diabetics - 0.125 U/kg
Diabetics - 0.063 U/kg
Glucose (mg/dL)
Time (min)
(b)
Normals - 0.125 U/kg
Normals - 0.063 U/kg
Glucose (mg/dL)
Time (min)

Figure 54





DSS

Formulation	Scaffold – X	Scaffold – Y	Sugar (n)
I-12: AETM-2	n/a	TSAT-C_6	AETM (2)
I-13: AEM-2	n/a	TSAT-C_6	AEM (2)
I-15: AEM-3	n/a	TSPE	AEM (3)
I-14: AETM-3	n/a	TSPE	AETM (3)
II-1: Di-sub-AEM-2	TSAT-C_6	TSAT-C_6	AEM (2x2)
II-3: Di-sub-AETM-1	DSS	DSS	AETM (2x1)
II-4: Di-sub-AEM-1	DSS	DSS	AEM (2x1)

Figure 55

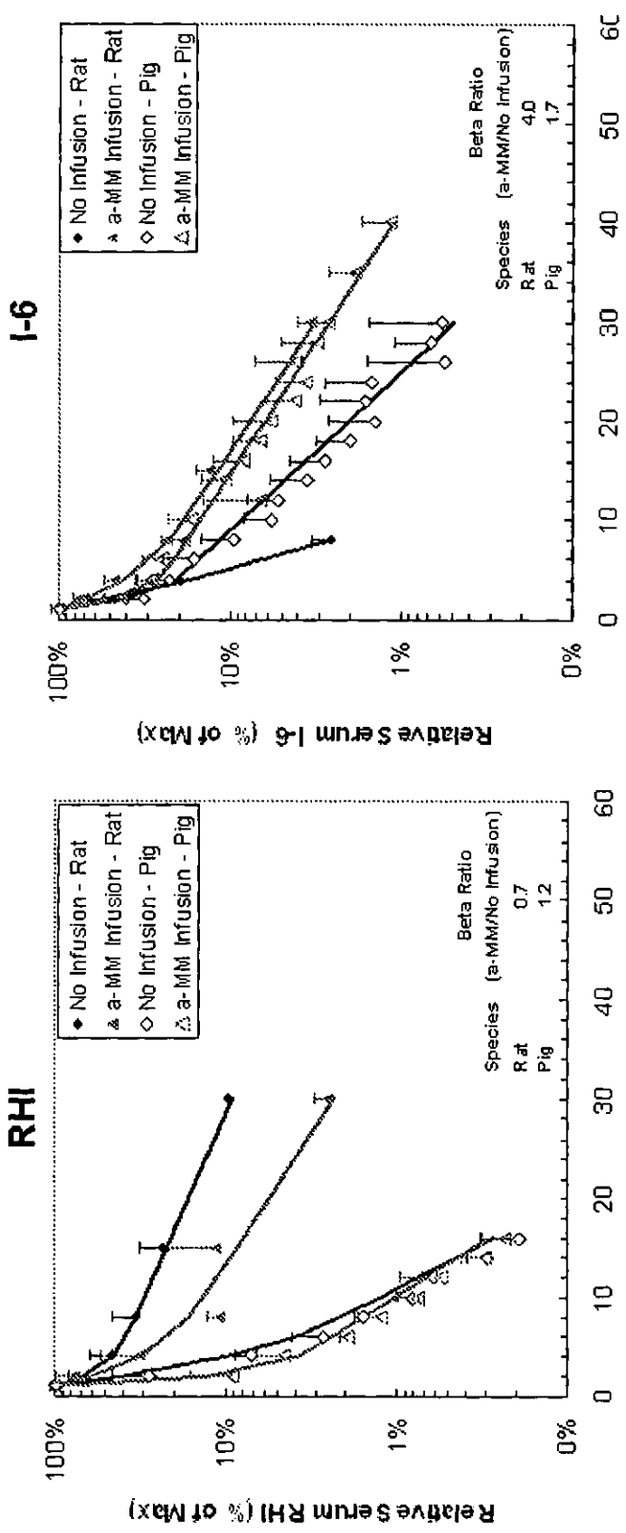

RHI
Relative Serum RHI (% of Max)
100%
10%
1%
0%
0
10
20
30
40
50
60
Time (min)
◆ No Infusion - Rat
▲ a-MM Infusion - Rat
◇ No Infusion - Pig
△ a-MM Infusion - Pig
Beta Ratio
Species (a-MM/No Infusion)
Rat 0.7
Pig 1.2
I-6
Relative Serum I-6 (% of Max)
100%
10%
1%
0%
0
10
20
30
40
50
60
Time (min)
◆ No Infusion - Rat
▲ a-MM Infusion - Rat
◇ No Infusion - Pig
△ a-MM Infusion - Pig
Beta Ratio
Species (a-MM/No Infusion)
Rat 4.0
Pig 1.7

Figure 56

Insulin-conjugate	Sugar Composition	$t_{1/2,\beta}$ (a-MM)/ $t_{1/2,\beta}$ (No Inf)
II-2	B29: AETMx2, A1: AETMx2	8.1
I-12	A1: AETMx2	2.3
I-6	B29: AETMx2	1.7
I-11	B29: AETMx3	1.6
I-9	B29: AEMx3	1.6
II-1	B29: AEMx2, A1: AEMx2	1.5
II-3	B29: AETMx1, A1: AETMx1	1.3
RHI	n/a	1.2
I-7	B29: AEMx2	1.0
II-4	B29: AEMx1, A1: AEMx1	0.9

Figure 57

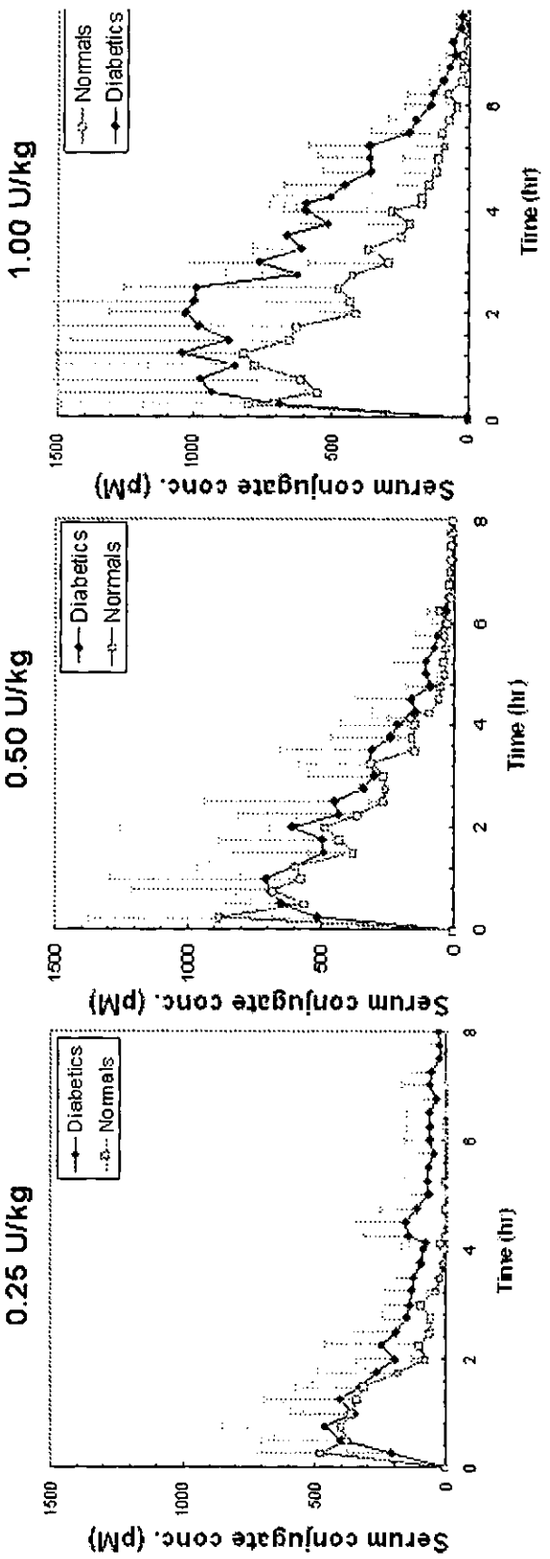
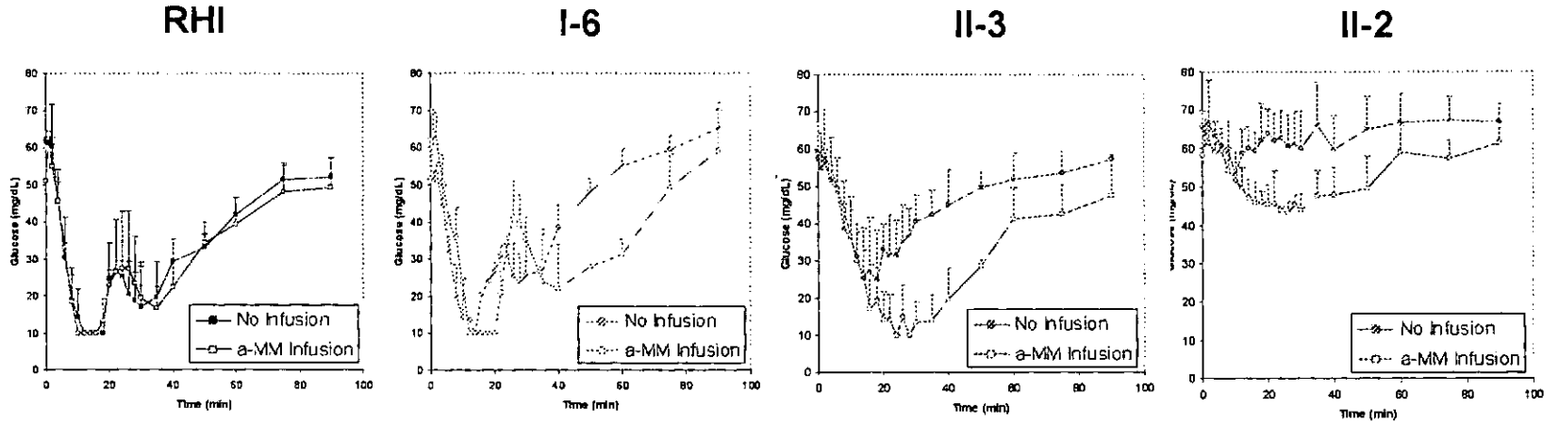

0.25 U/kg
0.50 U/kg
1.00 U/kg
Diabetics
Normals
Serum conjugate conc. (pM)
Time (hr)
0
500
1000
1500
2
4
6
8

Figure 58



Formulation	AOC Ratio (a-MM/no infusion)	$t_{1/2,\beta}$ (a-MM)/ $t_{1/2,\beta}$ (no infusion)
RHI	0.99	1.2
I-6	1.36	1.6
II-3	2.34 ←	1.3 ←
II-2	2.58 ←	8.1 ←

Lack of correlation between sugar-dependent half-life and bioactivity

Figure 59

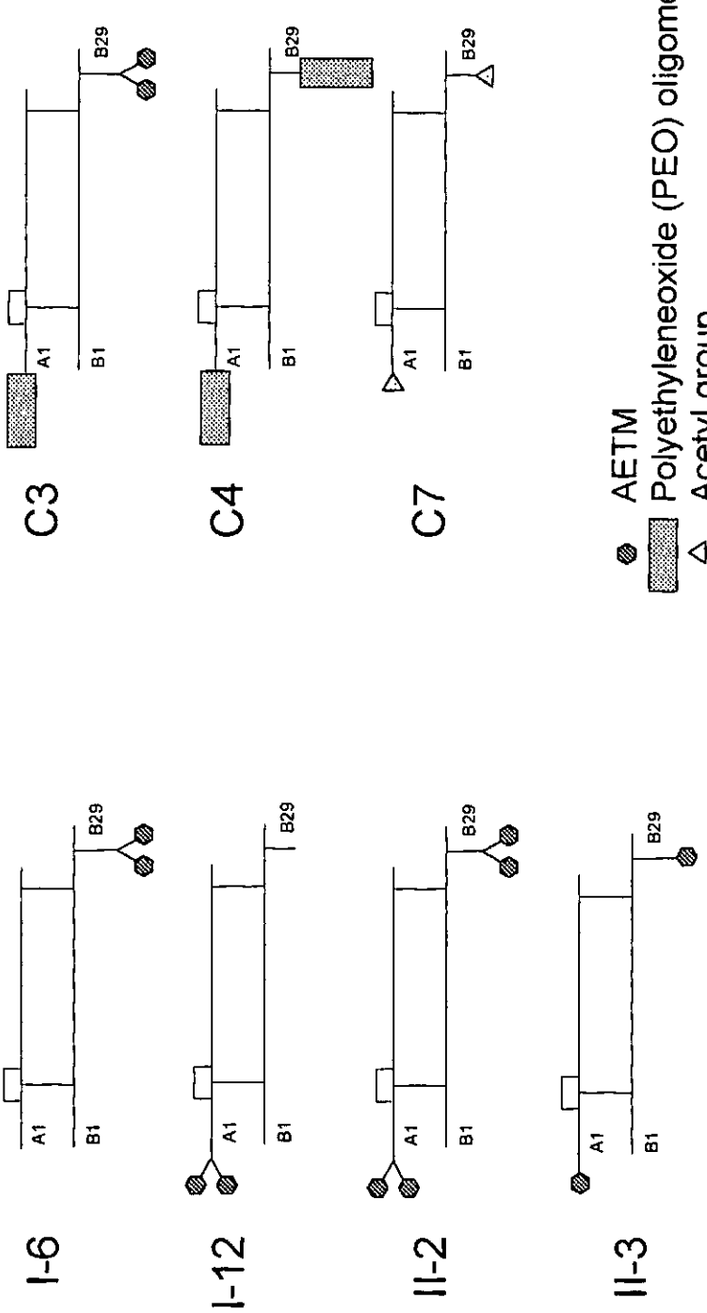

C3
C4
C7
I-6
I-12
II-2
II-3
A1
B1
B29
AETM
Polyethyleneoxide (PEO) oligomer
Acetyl group

Figure 60

I-6
I-12
II-2
C3
No Infusion
a-MM Infusion
Glucose (mg/dL)
Time (min)
A1
B1
B29

Figure 61

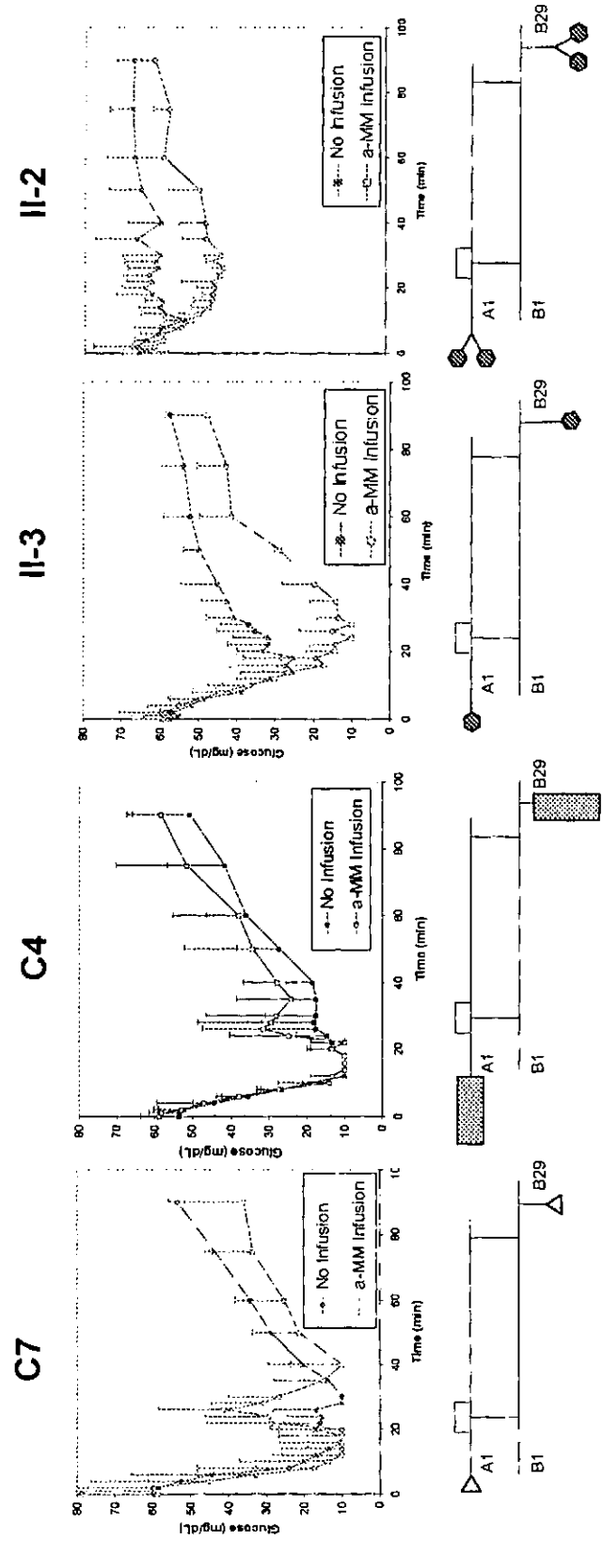

C7
C4
II-3
II-2
No Infusion
a-MM Infusion
Glucose (mg/dL)
Time (min)
A1
B1
B29

Figure 62

A-Chain
Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21
B-Chain
Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

Figure 63

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 10/22268

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A01N 45/00 (2010.01)
USPC - 514/26; 514/32
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC(8): A01N 45/00 (2010.01)
USPC: 514/26; 514/32

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
IPC(8): A61K 38/00; A01N 43/04; C12N 5/00; C07H 1/00, C07H 17/00; C07J 41/00; C40B 30/04; C07K 17/00; C08H 1/00
USPC: 514/12; 435/375; 536/17.4, 536/5, 536/1.11; 506/9; 530/395, 530/396, 530/411

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWEST; PGPB, USPT, EPAB, JPAB; GoogleScholar; Dialog: drug conjugate, saccharide, glucose, pharmacokinetic, pharmacodynamic, PK/PD, serum concentration curve, AUC, area under curve, fasted, hyperglycemic, insulin sensitizer, biguanides, antihyperglycemic, metformin, Phenformin, buformin, proguanil, glitazones

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ----- Y	US 2007/0099820 A1 (LANCASTER et al.) 3 May 2007 (03.05.2007) Abstract, para [0024], [0049], [00067]-[0070], [0072], [0090], [0104], [0134]	1-3, 7-10, 13-40, 43-44, 61, 74, 76 and 84-87 ---------- 4-6, 11-12
Y	PubChem Entry "L-fucose" (01 June 2005) [Retrieved from the Internet 5 May 2010: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=17106&loc=ec_rcs>]; Entire document	4
Y	PubChem Entry "N-acetylglucosamine" (24 June 2005) [Retrieved from the Internet 5 May 2010:<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=439174&loc=ec_rcs>]; Entire document	5
Y	PubChem Entry "alpha Methyl Mannose" (25 March 2005) [Retrieved from the Internet 5 May 2010: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=2108&loc=ec_rcs>]; Entire document	6
Y	US 3,697,502 A (CHRISTENSEN) 10 October 1972 (10.10.1972) col 4, ln 1-5	11-12
A	PubChem entr "glucose". (8 June 2005) Retrieved from internet 7 May 2010 [http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5793&loc=ec_rcs]; Entire document	7-9 and 11-12
A	PubChem Entry "Metformin" (24 June 2005) [Retrieved from the Internet 5 May 2010:<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=14219&loc=ec_rcs>]; Entire document	7-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
6 May 2010 (06.05.2010)	17 JUN 2010
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 10/22268

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 41-42, 106-191, 227-322, 362-379
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Group I+: claims 1-40, 43-105, 388-429, drawn to a conjugate comprising a drug and a ligand including a first saccharide; wherein the conjugate is characterized in that, when the conjugate is administered to a mammal, at least one pharmacokinetic or pharmacodynamic property of the conjugate is sensitive to serum concentration of a second saccharide. The first invention encompasses a conjugate, wherein the anti-diabetic drug is an insulin sensitizer, and wherein the ligand is glucose. Should an additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect an additional drug(s) to be searched and/or ligand(s) to be searched. The exact claims searched will depend on the specifically elected drug(s): and ligand(s).
[NOTE: Claims 45-60, 62-73, 75, 77-83, 88-105 and 388-429 were excluded from Group I, because they are drawn to a non-elected subject matter.]

---------- Continued in the Supplemental Box ----------

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Claims 1-40, 43-44, 61, 74, 76 and 84-87, restricted to an insulin sensitizer, and glucose

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US 10/22268

---------- Supplemental Box ----------

Continued from Box III:

Group II+, claims 192-226, 323-361, 380-387, drawn to a conjugate of a specific formula. Should an additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect a conjugate of a specific formula, i.e. any of the formulae VIa-VId, VIII, IX, to be searched. The exact claims searched will depend on the specifically elected formulae.

The inventions listed as Groups I+ and II+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The inventions of Groups I+ and II+ share the technical feature of a conjugate comprising a drug and a ligand including a first saccharide. However, this shared technical feature does not represent a contribution over the prior art of 2007/0099820 A1 to Lancaster et al. (hereinafter 'Lancaster') discloses a conjugate (para [0011]) comprising a drug (para [0011]) and a ligand (para [0012], [0066] and [0067]) including a first saccharide (para [0068], indicator analog); wherein the conjugate is characterized in that, when the conjugate is administered to a mammal, at least one pharmacokinetic or pharmacodynamic property (para [0043]-[0045]) of the conjugate is sensitive to serum concentration of a second saccharide (para [0067] and [0068], indicator). As said conjugate was known at the time of the invention, there is no special technical feature that would otherwise unify the groups.

In addition and with respect to Group I+, there are two other special technical features, a specific drug and a specific ligand recited therein. The inventions do not share these two special technical features, because Lancaster further discloses that the anti-diabetic drug is an insulin sensitizer (para [0049]) and the ligand is either glucose, or bimannose, or trimannose (para [0068]). Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

The special technical feature of the inventions listed as Group II+ is the specific formulae of conjugates recited therein. The inventions do not share these two special technical features, because no significant structural similarities can readily be ascertained among the formulae. Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Groups I+ and II+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

SEQUENCE LISTING

<110> Lancaster, Thomas M.
Zion, Todd C.

<120> Insulin-Conjugates

<130> 2005700-0040

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Glu Asn Tyr Cys Asn
20

<210> 2
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
20 25 30

SISTEMAS BASADOS EN CONJUGADOS PARA ENTREGA FARMACOLÓGICA CONTROLADA

SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica prioridad sobre la Solicitud Provisional estadounidense No. 61/147.878 presentada el 28 de enero de 2009, Solicitud Provisional estadounidense No. 61/159.643 presentada el 12 de marzo de 2009, Solicitud Provisional estadounidense No. 61/162.107 presentada el 20 de marzo 2009, Solicitud Provisional estadounidense No. 61/163.084 presentada el 25 de marzo de 2009, Solicitud Provisional estadounidense No. 61/219.897, presentada el 24 de junio de 2009, Solicitud Provisional estadounidense No. 61/223.572 presentada el 7 de julio de 2009, y Solicitud Provisional estadounidense No. 61/252.857 presentada el 19 de octubre de 2009, el contenido de cada una de éstas se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

FUNDAMENTO

La mayoría de sistemas de entrega farmacológica de "entrega controlada" conocidos en el estado de la técnica anterior (ej., Patente estadounidense No. 4.145.410 de Sears la cual describe la entrega farmacológica desde cápsulas que son enzimáticamente lábiles) no pueden suministrar fármacos a un paciente a intervalos y concentraciones que están en proporción directa con la cantidad de un indicador molecular (ej., un metabolito) presente en el cuerpo humano. Por lo tanto, los fármacos en estos sistemas del estado de la técnica anterior no son literalmente "controlados" sino simplemente suministrados en un formato de entrega lenta el cual es independiente de factores externos o internos.

El tratamiento de la diabetes mellitus con insulina inyectable es un ejemplo bien conocido y estudiado donde la entrega lenta no controlada de insulina es indeseable. En realidad, es manifiesto que el simple reemplazo de la hormona no es suficiente para prevenir las secuelas patológicas asociadas con esta enfermedad. Se cree que el desarrollo de estas secuelas reflejan una incapacidad para proporcionar insulina exógena proporcional a concentraciones variables de glucosa en sangre experimentadas por el paciente. Para resolver esta problema se han sugerido diferentes enfoques biológicos y de bioingeniería para desarrollar un sistema de entrega de insulina más fisiológico (ej., ver Patente estadounidense No. 4.348.387 otorgada a Brownlee;

Patentes estadounidenses No. 5.830.506, 5.902.603, y 6.410.053 otorgadas a Taylor y Publicación de Solicitud de Patente estadounidense No. 2004- 0202719 otorgada a Zion).

Cada uno de estos sistemas depende de la combinación de una molécula fijadora de glucosa multivalente (ej., la lectina Con A) y un componente basado en azúcar que es reversiblemente unido por la molécula fijadora de glucosa multivalente. Desafortunadamente, Con A y muchas de las otras lectinas fácilmente disponibles tienen el potencial de estimular la proliferación de linfocitos. Al unirse a receptores carbohidratos sobre las superficies de ciertos tipos de linfocitos, estas lectinas "mitogénicas" pueden potencialmente inducir la mitosis de linfocitos y producir su proliferación. La mayoría de lectinas mitogénicas incluyendo Con A son mitógenos de linfocitos T selectivos. Unas pocas lectinas son menos selectivas y estimulan ambas las células T y células B. La exposición in vivo local o sistémica a lectinas mitogénicas puede resultar en inflamación, citotoxicidad, digestión macrófaga, y reacciones alérgicas incluyendo la anafilaxis. Además, las lectinas vegetales son conocidas en ser particularmente inmunogénicas, dando origen a la producción de altos títulos de anticuerpos específicos anti-lectina. Se apreciará que las lectinas mitogénicas por lo tanto no pueden utilizarse en su forma nativa para dispositivos y métodos *in vivo* a menos que se tenga mucho cuidado para evitar su entrega. Por ejemplo, en la Patente estadounidense No. 5.830.506, Taylor destaca los riesgos tóxicos que están involucrados al utilizar Con A y enfatiza la importancia y dificultad de contener Con A dentro de un dispositivo de entrega farmacológica que también requiere moléculas de glucosa e insulina que se difundan libremente hacia dentro y hacia fuera del dispositivo.

Los riesgos y dificultades que están involucrados con estos y otros usos in vivo de lectinas podrían disminuirse significativamente si pudiera proporcionarse un sistema de entrega farmacológica controlada que no requiera lectinas.

RESUMEN

En un aspecto, la divulgación proporciona métodos para controlar los perfiles farmacocinéticos (PK) y/o farmacodinámicos (PD) de insulina en una forma que es sensible a las concentraciones sistémicas de un sacárido tal como la glucosa. Como se discutió en los Ejemplos, se descubrió que cuando la insulina fuera conjugada con ligandos sacáridos de alta afinidad, pudo hacerse exhibir perfiles PK/PD que respondieran a cambios de concentración sacárida aún en ausencia de una molécula multivalente y exógena fijadora de sacáridos tal como

Con A. Este hallazgo fue inesperado y proporciona una oportunidad sin precedentes para generar sistemas simples de insulina sensibles a sacáridos libres de lectina. En otro aspecto, la divulgación proporciona conjugados y métodos de ejemplo para la fabricación de los mismos. En general, estos conjugados incluyen un fármaco y uno o más ligandos separados en donde cada uno incluye un sacárido. En ciertas realizaciones, los ligandos son capaces de competir con un sacárido (por ejemplo, glucosa o manosa) para unirse a una molécula fijadora de sacáridos endógenos. En ciertas realizaciones, los ligandos son capaces de competir con la glucosa o manosa por la unión a Con A. Como se explica en detalle más adelante, en ciertas realizaciones, los ligandos y el fármaco pueden estar covalente o no covalentemente unidos a una estructura de conjugado. En ciertas realizaciones, la estructura es no polimérica. En ciertas realizaciones, un conjugado puede tener un índice de polidispersidad de uno y un peso molecular de menos de 20.000 Da aproximadamente. En ciertas realizaciones, el conjugado es de larga duración (es decir, presenta un perfil farmacocinético que es más sostenido que la insulina humana recombinante soluble o RHI).

Como está discutido en detalle más adelante, se debe entender que los métodos, conjugados y formulaciones que se describen en este documento no están limitados de ninguna manera a solamente la entrega de insulina y se debe entender que pueden ser utilizados para liberar cualquier medicamento. También se debe entender que los métodos se pueden utilizar para liberar fármacos en respuesta a sacáridos diferentes de la glucosa. En particular, como se indica en los ejemplos, se ha demostrado que los conjugados de ejemplo responden a sacáridos exógenos como el alfa- metil manosa y L- fucosa. En ciertas realizaciones, esto puede utilizarse para preparar conjugados que pueden ser controlados por la administración de uno de estos sacáridos exógenos (es decir, en lugar de o además de ser controlados por las fluctuaciones en la glucosa endógena).

DEFINICIONES

Las definiciones de grupos funcionales específicos, términos químicos, y términos generales utilizados a lo largo de la especificación se describen con mayor detalle a continuación. Para propósitos de este invento, los elementos químicos se identifican según la Tabla Periódica de los Elementos, CAS version, Handbook of Chemistry and Physics, 75th Ed., y los grupos funcionales específicos generalmente se definen como se describen en la misma.

Adicionalmente, los principios generales de química orgánica, así como también las fracciones funcionales y reactividad, se describen en Organic Chemistry, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito, 1999; Smith and March March's Advanced Organic Chemistry, 5th Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2001; Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers, Inc., New York, 1989; Carruthers, Some Modern Methods of Organic Synthesis, 3rd Edition, Cambridge University Press, Cambridge, 1987.

Acilo - Como se utiliza en la presente, el término "acilo," se refiere a un grupo que tiene la fórmula general - $C(=O)R^{X1}$, - $C(=O)OR^{xl}$, - C(=O)- O- $C(=O)R^{xl}$, - $C(=O)SR^{X1}$, - $C(=O)N(R^{X1})_2$, - $C(=S)R^{X1}$, - $C(=S)N(R^{X1})_2$, y - $C(=S)S(R^{X1})$, - $C(=NR^{X1})R^{X1}$, - $C(=NR^{X1})OR^{X1}$, - $C(=NR^{X1})SR^{X1}$, y - $C(=NR^{X1})N(R^{X1})_2$, en donde R^{X1} es hidrógeno; halógeno; hidroxilo sustituido o no sustituido; tiol sustituido o no sustituido; amino sustituido o no sustituido; acilo sustituido o no sustituido; alifático cíclico o acíclico, sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado; heteroalifático cíclico o acíclico, sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado; alquilo cíclico o acíclico, sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado; alquenilo cíclico o acíclico, sustituido o no sustituido, ramificado o no ramificado; alquinilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, alifaticoxilo, heteroalifaticoxilo, alquiloxilo, heteroalquiloxilo, ariloxilo, heteroariloxilo, alifaticotioxilo, heteroalifaticotioxilo, alquiltioxilo, heteroalquiltioxilo, ariltioxilo, heteroariltioxilo, mono- o di- alifaticamino, mono- o di- heteroalifaticamino, mono- o di- alquilamino, mono- o di- heteroalquilamino, mono- o di- arilamino, o mono- o di- heteroarilamino; o dos grupos R^{X1} tomados juntos forman un anillo heterocíclico de 5 o 6 miembros. Grupos acilo de ejemplo incluyen aldehidos (- CHO), ácidos carboxílicos (- CO_2H), cetonas, haluros de acilo, ésteres, amidas, iminas, carbonatos, carbamatos, y ureas. Sustituyentes de acilo incluyen, pero no están limitados a, cualquiera de los sustituyentes descritos en la presente, que resultan en la formación de una fracción estable (ej., alifático, alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalifático, heterocíclico, arilo, heteroarilo, acilo, oxo, imino, tiooxo, ciano, isociano, amino, azido, nitro, hidroxilo, tiol, halo, alifaticamino, heteroalifaticamino, alquilamino, heteroalquilamino, arilamino, heteroarilamino, alquilarilo, arilalquilo, alifaticoxilo, heteroalifaticoxilo, alquiloxilo, heteroalquiloxilo, ariloxilo, heteroariloxilo, alifatictioxilo, heteroalifatictioxilo, alquiltioxilo, heteroalquiltioxilo, ariltioxilo, heteroariltioxilo, aciloxilo, y similares, cada uno de los cuales puede o no sustituirse adicionalmente).

Alifático - Como se utiliza en la presente, el término "alifático" o "grupo alifático" denota una fracción de hidrocarburo opcionalmente sustituida que puede ser de cadena lineal (es decir, no ramificada), ramificada, o cíclica ("carbocíclica") y puede ser completamente saturada o puede contener una o más unidades de insaturación, pero la cual no es aromática. A menos que se especifique lo contrario, los grupos alifáticos contienen 1- 12 átomos de carbono. En algunas realizaciones, los grupos alifáticos contienen 1- 6 átomos de carbono. En algunas realizaciones, los grupos alifáticos contienen 1- 4 átomos de carbono, y en aún otras realizaciones los grupos alifáticos contienen 1- 3 átomos de carbono. Grupos alifáticos apropiados incluyen, pero no están limitados a, grupos alquilo, alquenilo, y alquinilo lineales o ramificados, e híbridos de los mismos tal como (cicloalquil)alquilo, (cicloalquenil)alquilo o (cicloalquil)alquenilo.

Alquenilo - Como se utiliza en la presente, el término "alquenilo" denota un grupo monovalente opcionalmente sustituido derivado a partir de una fracción alifática lineal o ramificada que tiene al menos un enlace doble carbono- carbono mediante el retiro de un único átomo de hidrógeno. En ciertas realizaciones, el grupo alquenilo empleado en el invento contiene 2- 6 átomos de carbono. En ciertas realizaciones, el grupo alquenilo empleado en el invento contiene 2- 5 átomos de carbono. En algunas realizaciones, el grupo alquenilo empleado en el invento contiene 2- 4 átomos de carbono. En otra realización, el grupo alquenilo empleado contiene 2- 3 átomos de carbono. Grupos alquenilo incluyen, por ejemplo, etenilo, propenilo, butenilo, l- metil- 2- buten- l- ilo, y similares.

Alquilo - Como se utiliza en la presente, el término "alquilo" se refiere a radicales de hidrocarburo de cadena lineal o ramificada saturados opcionalmente sustituidos derivados a partir de una fracción alifática que contiene entre 1- 6 átomos de carbono mediante el retiro de un único átomo de hidrógeno. En algunas realizaciones, el grupo alquilo empleado en el invento contiene 1- 5 átomos de carbono. En otra realización, el grupo alquilo empleado contiene 1- 4 átomos de carbono. En aún otras realizaciones, el grupo alquilo contiene 1- 3 átomos de carbono. En otra realización, el grupo alquilo contiene 1- 2 carbonos. Ejemplos de radicales alquilo incluyen, pero no están limitados a, metilo, etilo, n- propilo, isopropilo, n- butilo, iso- butilo, sec- butilo, sec- pentilo, iso- pentilo, tert- butilo, n- pentilo, neopentilo, n- hexilo, sec- hexilo, n- heptilo, n- octilo, n- decilo, n- undecilo, dodecilo, y similares.

Alquinilo - Como se utiliza en la presente, el término "Alquinilo" se refiere a un grupo monovalente opcionalmente sustituido derivado a partir de una fracción alifática lineal o

ramificada que tiene al menos un enlace triple carbono- carbono mediante el retiro de un único átomo de hidrógeno. En ciertas realizaciones, el grupo alquinilo empleado en el invento contiene 2- 6 átomos de carbono. En ciertas realizaciones, el grupo alquinilo empleado en el invento contiene 2- 5 átomos de carbono. En algunas realizaciones, el grupo alquinilo empleado en el invento contiene 2- 4 átomos de carbono. En otra realización, el grupo alquinilo empleado contiene 2- 3 átomos de carbono. Grupos alquinilo representativos incluyen, pero no están limitados a, etenilo, 2- propinilo (propargilo), 1- propinilo, y similares.

Arilo - Como se utiliza en la presente, el término "arilo" utilizado solo o como parte de una fracción mayor como en "aralquilo", "aralcoxilo", o "ariloxilalquilo", se refiere a un sistema cíclico monocíclico y bicíclico opcionalmente sustituido que tiene un total de cinco a diez miembros cíclicos, en donde al menos un anillo en el sistema es aromático y en donde cada anillo en el sistema contiene tres a siete miembros cíclicos. El término "arilo" puede utilizarse intercambiablemente con el término "anillo de arilo". En ciertas realizaciones del presente invento, "arilo" se refiere a un sistema de anillo aromático el cual incluye, pero no está limitado a, fenilo, bifenilo, naftilo, antracilo y similares, el cual puede llevar uno o más sustituyentes.

Arilalquilo - Como se utiliza en la presente, el término "arilalquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo arilo (ej., un grupo aromático o heteroaromático).

Cadena de hidrocarburo bivalente - Como se utiliza en la presente, el término "cadena de hidrocarburo bivalente" (también conocida como un "grupo alquileno bivalente") es un grupo de polimetileno, es decir, - $(CH_2)_z$- , en donde z es un entero positivo entre 1 y 30, entre 1 y 20, entre 1 y 12, entre 1 y 8, entre 1 y 6, entre 1 y 4, entre 1 y 3, entre 1 y 2, entre 2 y 30, entre 2 y 20, entre 2 y 10, entre 2 y 8, entre 2 y 6, entre 2 y 4, o entre 2 y 3. Una cadena de hidrocarburo bivalente sustituida es un grupo de polimetileno en el cual uno o más átomos de hidrógeno de metileno son reemplazados por un sustituyente. Sustituyentes apropiados incluyen aquellos descritos a continuación para un grupo alifático sustituido.

Carbonilo - Como se utiliza en la presente, el término "carbonilo" se refiere a una fracción monovalente o bivalente que contiene un enlace doble carbono- oxigeno. Ejemplos no limitantes de grupos carbonilo incluyen aldehidos, cetonas, ácidos carboxílicos, ester, amida, enonas, haluros de acilo, anhidridos, ureas, carbamatos, carbonatos, tioésteres, lactonas, lactamas, hidroxamatos, isocianatos, y cloroformatos.

Cicloalifático - Como se utilizan en la presente, los términos "cicloalifático", "carbociclo", o "carbocíclico", utilizados solos o como parte de una fracción mayor, se refieren a un sistema saturado o parcialmente no saturado alifático monocíclico o bicíclico opcionalmente sustituido, como se describió en la presente, que tiene entre 3 y 10 miembros. Grupos cicloalifáticos incluyen, sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo, cicloheptenilo, ciclooctilo, ciclooctenilo, y ciclooctadienilo. En algunas realizaciones, el cicloalquilo tiene 3- 6 carbonos.

Halógeno - Como se utiliza en la presente, los términos "halo" y "halógeno" se refieren a un átomo seleccionado a partir de fluor (fluoro, - F), cloro (cloro, - Cl), bromo (bromo, - Br), y yodo (yodo, - I).

Heteroalifático - Como se utiliza en la presente, los términos "heteroalifático" o "grupo heteroalifático", denotan una fracción de hidrocarburo opcionalmente sustituida que tiene, además de átomos de carbono, entre uno y cinco heteroátomos, que pueden ser de cadena lineal (es decir, no ramificada), ramificada, o cíclica ("heterocíclica") y puede ser completamente saturada o puede contener una o más unidades de insaturación, pero la cual no es aromática. A menos que se especifique lo contrario, grupos alifáticos heterólogos contienen 1- 6 átomos de carbono en donde 1- 3 átomos de carbono son opcionalmente e independientemente reemplazados con heteroátomos seleccionados a partir de oxígeno, nitrógeno y azufre. En algunas realizaciones, los grupos alifáticos heterólogos contienen 1- 4 átomos de carbono, en donde 1- 2 átomos de carbono son opcionalmente e independientemente reemplazados con heteroátomos seleccionados a partir de oxígeno, nitrógeno y azufre. En aún otras realizaciones, los grupos alifáticos heterólogos contienen 1- 3 átomos de carbono, en donde 1 átomo de carbono es opcional e independientemente reemplazado por un heteroátomo seleccionado a partir de oxígeno, nitrógeno y azufre. Grupos alifáticos heterólogos apropiados incluyen, pero no están limitados a, grupos heteroalquilo, heteroalquenilo, y heteroalquinilo lineales o ramificados.

Heteroaralquilo - Como se utiliza en la presente, el término "heteroaralquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido por un heteroarilo, en donde las porciones alquilo y heteroarilo independientemente son opcionalmente sustituidas.

Heteroarilo - Como se utiliza en la presente, el término "heteroarilo" utilizado solo o como parte de una fracción mayor, ej., "heteroaralquilo", o "heteroaralcoxilo", se refiere a un grupo opcionalmente sustituido que tiene 5 a 10 átomos cíclicos, preferiblemente 5, 6, o 9

átomos cíclicos; que tiene 6, 10, o 14 electrones π compartidos en un arreglo cíclico; y que tiene, además de átomos de carbono, entre uno y cinco heteroátomos. Grupos heteroarilo incluyen, sin limitación, tienilo, furanilo, pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, tetrazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, oxadiazolil, tiazolilo, isotiazolilo, tiadiazolilo, piridilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, indolizinilo, purinilo, naftiridinilo, y pteridinilo. Los términos "heteroarilo" y "heteroar- ", como se utilizan en la presente, también incluyen grupos en los cuales un anillo heteroaromático es fusionado a uno o más anillos de arilo, carbocíclicos o heterocíclicos, donde el radical o punto de unión es sobre el anillo heteroaromático. Ejemplos no limitantes incluyen indolilo, isoindolilo, benzotienilo, benzofuranilo, dibenzofuranilo, indazolilo, benzimidazolilo, benztiazolilo, quinolilo, isoquinolilo, cinnolinilo, pftalazinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, *4H*-quinolizinilo, carbazolilo, acridinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, fenoxazinilo, tetrahidroquinolinilo, y tetrahidroisoquinolinilo. Un grupo heteroarilo puede ser mono- o bicíclico. El término "heteroarilo" puede utilizarse intercambiablemente con los términos "anillo heteroarilo", "grupo heteroarilo", o "heteroaromático", cualquiera de los términos incluyen anillos que son opcionalmente sustituidos.

Heteroátomo - Como se utiliza en la presente, el término "heteroátomo" se refiere a nitrógeno, oxigeno, o azufre, e incluye cualquier forma oxidada de nitrógeno o azufre, y cualquier forma cuaternizada de un nitrógeno básico. El término "nitrógeno" también incluye un nitrógeno sustituido.

Heterocíclico - Como se utiliza en la presente, los términos "heterociclo", "heterociclilo", "radical heterocíclico", y "anillo heterocíclico" se utilizan intercambiablemente y se refiere a una fracción monocíclica de 5- a 7- miembros o bicíclica heterocíclica de 7 a 10 miembros opcionalmente sustituida que es ya sea saturada o parcialmente saturada, y que tiene, además de átomos de carbono, uno o más heteroátomos, como se definió anteriormente. Un anillo heterocíclico puede fijarse a su grupo colgante en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que resulta en una estructura estable y cualquiera de los átomos cíclicos puede opcionalmente sustituirse. Ejemplos de tales radicales heterocíclicos saturados o parcialmente no saturados incluyen, sin limitación, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotienilo, pirrolidinilo, pirrolidonilo, piperidinilo, pirrolinilo, tetrahidroquinolinilo, tetrahidroisoquinolinilo, decahidroquinolinilo, oxazolidinilo, piperazinilo, dioxanilo, dioxolanilo, diazepinilo, oxazepinilo, tiazepinilo, morfolinilo, y quinuclidinilo. Los términos "heterociclo",

"heterociclilo", "anillo heterociclilo", "grupo heterocíclico", "fracción heterocíclica", y "radical heterocíclico", se utilizan intercambiablemente en la presente, y también incluyen grupos en los cuales un anillo heterociclilo es fusionado a uno o más anillos arilo, heteroarilo, o carbocíclico, tal como indolinilo, 3*H*- indolilo, cromanilo, fenantridinilo, o tetrahidroquinolinilo, donde el radical o punto de unión está sobre el anillo heterociclilo. Un grupo heterociclilo puede ser mono- o bicíclico. El término "heterocicliloalquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido por un heterociclilo, en donde las porciones alquilo y heterociclilo independientemente son opcionalmente sustituidas.

No saturado - Como se utiliza en la presente, el término "no saturado", significa que una fracción tiene uno o más enlaces dobles o triples.

Parcialmente no saturado - Como se utiliza en la presente, el término "parcialmente no saturado" se refiere a una fracción de anillo que incluye al menos un enlace doble o triple. El término "parcialmente no saturado" pretende incluir anillos que tienen múltiples sitios de insaturación, pero no pretende incluir fracciones de arilo o heteroarilo, como se define en la presente.

Opcionalmente sustituido - Como se describió en la presente, los compuestos del invento pueden contener fracciones "opcionalmente sustituidas". En general, el término "sustituido", ya sea que esté precedido por el término "opcionalmente" o no, significa que uno o más hidrógenos de la fracción designada son reemplazados por un sustituyente apropiado. A menos que se indique lo contrario, un grupo "opcionalmente sustituido" puede tener un sustituyente apropiado en cada posición sustituible del grupo, y cuando más de una posición en cualquier estructura dada puede sustituirse con más de un sustituyente seleccionado a partir de un grupo especificado, el sustituyente puede ser igual o diferente en cada posición. Combinaciones de sustituyentes contemplados por este invento son preferiblemente aquellos que resultan en la formación de compuestos estables o químicamente factibles. El término "estable", como se utiliza en la presente, se refiere a compuestos que no son sustancialmente alterados cuando se someten a condiciones para permitir su producción, detección, y, en ciertas realizaciones, su recuperación, purificación, y uso para uno o más de los propósitos divulgados en la presente.

Sustituyentes monovalentes apropiados sobre un átomo de carbono sustituible de un grupo "opcionalmente sustituido" son independientemente halógeno; - $(CH_2)_{0-4}R°$; - $(CH_2)_{0-4}OR°$; - O- $(CH_2)_{0-4}C(O)OR°$; - $(CH_2)_{0-4}CH(OR°)_2$; - $(CH_2)_{0-4}SR°$; - $(CH_2)_{0-4}Ph$, los cuales

pueden ser sustituidos con R°; - $(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-4}Ph$ los cuales pueden ser sustituido con R°; - CH=CHPh, los cuales pueden ser sustituidos con R°; - NO_2; - CN; - N_3; - $(CH_2)_{0-4}N(R°)_2$; - $(CH_2)_{0-4}N(R°)C(O)R°$; - $N(R°)C(S)R°$; - $(CH_2)_{0-4}N(R°)C(O)NR°_2$; - $N(R°)C(S)NR°_2$; - $(CH_2)_{0-4}N(R°)C(O)O°$; - $N(R°)N(R°)C(O)R°$; - $N(R°)N(R°)C(O)NR°_2$; - $N(R°)N(R°)C(O)O°$; - $(CH_2)_{0-4}C(O)R°$; - $C(S)R°$; - $(CH_2)_{0-4}C(O)O°$; - $(CH_2)_{0-4}C(O)SR°$; - $(CH_2)_{0-4}C(O)OSiR°_3$; - $(CH_2)_{0-4}OC(O)R°$; - $OC(O)(CH_2)_{0-4}SR-$, $SC(S)SR°$; - $(CH_2)_{0-4}SC(O)R°$; - $(CH_2)_{0-4}C(O)NR°_2$; - $C(S)NR°_2$; - $C(S)SR°$; - $SC(S)SR°$, - $(CH_2)_{0-4}OC(O)NR°_2$; - $C(O)N(O°)R°$; - $C(O)C(O)R°$; - $C(O)CH_2C(O)R°$; - $C(NOR°)R°$; - $(CH_2)_{0-4}SSR°$; - $(CH_2)_{0-4}S(O)_2R°$; - $(CH_2)_{0-4}S(O)_2OR°$; - $(CH_2)_{0-4}OS(O)_2R°$; - $S(O)_2NR°_2$; - $(CH_2)_{0-4}S(O)R°$; - $N(R°)S(O)_2NR°_2$; - $N(R°)S(O)_2R°$; - $N(O°)R°$; - $C(NH)NR°_2$; - $P(O)_2R°$; - $P(O)R°_2$; - $OP(O)R°_2$; - $OP(O)(O°)_2$; $SiR°_3$; - (alquileno C_{1-4} lineal o ramificado)O- $N(R°)_2$; o - (alquileno C_{1-4} lineal o ramificado)C(O)O- $N(R°)_2$, en donde cada R° puede ser sustituido como se definió a continuación y es independientemente hidrógeno, C_{1-6} alifático, - CH_2Ph, - $O(CH_2)_{0-1}Ph$, o anillo arilo de 5- 6 miembros parcialmente no saturado que tiene 0- 4 heteroátomos independientemente seleccionados a partir nitrógeno, oxigeno, o azufre, o, no obstante la definición anterior, dos ocurrencias independientes de R°, tomadas junto con sus átomos involucrados, forman un anillo arilo mono o bicíclico de 3- 12 miembros, saturado, parcialmente no saturado que tiene 0- 4 heteroátomos independientemente seleccionados a partir nitrógeno, oxigeno, o azufre, los cuales pueden ser sustituidos como se define a continuación.

Sustituyentes monovalentes apropiados sobre R° (o el anillo formado al tomar dos ocurrencias independientes de R° junto con sus átomos involucrados), son independientemente halógeno, - $(CH_2)_{0-2}R^•$, - (haloR$^•$), - $(CH_2V_2OH, (CH_2)_{0-2}OR^•$, - $(CH_2)_{0-2}CH(O^•)_2$; - O(haloR$^•$), - CN, - N_3, - $(CH_2)_{0-2}C(O)R^•$, - $(CH_2)_{0-2}C(O)OH$, - $(CH_2)_{0-2}C(O)OR^•$, - $(CH_2)_{0-2}SR^•$, - $(CH_2)_{0-2}SH$, - $(CH_2)_{0-2}NH_2$, - $(CH_2)_{0-2}NHR^•$, - $(CH_2)_{0-2}NR^•_2$, - NO_2, - $SiR^•_3$, - $OSiR^•_3$, - $C(O)SR^•$ - (alquileno C_{1-4} lineal o ramificado)C(O)O, o - $SSR^•$ en donde cada R$^•$ no es sustituido o donde está precedido por "halo" es sustituido solamente por uno o más halógenos, y es independientemente seleccionado a partir C_{1-4} alifático, - CH_2Ph, - $O(CH_2)_{0-1}Ph$, o anillo arilo de 5- 6 miembros parcialmente no saturado que tiene 0- 4 heteroátomos indepcndientemente seleccionados a partir nitrógeno, oxigeno, o azufre. Sustituyentes divalentes apropiados sobre un átomo de carbono saturado de R° incluyen =O y =S.

Sustituyentes divalentes apropiados sobre un átomo de carbono saturado de un grupo "opcionalmente sustituido" incluyen los siguientes: =O, =S, =NNR*$_2$, =NNHC(O)R*, =NNHC(O)O*, =NNHS(O)$_2$R*, =NR*, =NOR*, - 0(C(R*$_2$))$_{2-3}$O- , o - S(C(R*$_2$))$_{2-3}$S- , en donde cada ocurrencia independiente de R* es seleccionada a partir hidrógeno, C_{1-6} alifático el cual puede ser sustituido como se define a continuación, o un anillo de arilo de 5- 6 miembros saturado, parcialmente no saturado, no sustituido que tiene 0- 4 heteroátomos independientemente seleccionados a partir nitrógeno, oxigeno, o azufre. Sustituyentes divalentes apropiados que están unidos a carbonos sustituibles adyacentes de un grupo "opcionalmente sustituido" incluyen: - O(CR* $_2$)$_{2-30}$- , en donde cada ocurrencia independiente de R* es seleccionada a partir hidrógeno, C_{1-6} alifático el cual puede ser sustituido como se define a continuación, o un anillo de arilo de 5- 6 miembros saturado, parcialmente no saturado, no sustituido que tiene 0- 4 heteroátomos independientemente seleccionados a partir nitrógeno, oxigeno, o azufre.

Sustituyentes apropiados sobre el grupo alifático de R* incluyen halógeno, - R*, - (haloR*), - OH, - OR*, - O(haloR*), - CN, - C(O)OH, - C(O)OR*, - NH_2, - NHR*, - NR*$_2$, o - NO_2, en donde cada R* no es sustituido o donde está precedido por "halo" es sustituido solamente por uno o más halógenos, y es independientemente C_{1-4} alifático, - CH_2Ph, - O(CH$_2$)$_{1-0}$Ph, o anillo arilo de 5- 6 miembros parcialmente no saturado que tiene 0- 4 heteroátomos independientemente seleccionados a partir nitrógeno, oxigeno, o azufre.

Sustituyentes apropiados sobre un nitrógeno sustituible de un grupo "opcionalmente sustituido" incluyen - R$^\tau$, - NR$^\tau_2$, - C(O)R$^\tau$, - C(O)OR$^\tau$, - C(O)C(O)R$^\tau$, - C(O)CH$_2$C(O)R$^\tau$, - S(O)$_2$R$^\tau$, - S(O)$_2$NR$^\tau_2$, - C(S)NR$^\tau_2$, - C(NH)NR$^\tau_2$, o - N(R$^\tau$)S(O)$_2$R$^\tau$; en donde cada R$^\tau$ es independientemente hidrógeno, C_{1-6} alifático el cual puede ser sustituido como se define a continuación, - OPh no sustituido, o un anillo de arilo de 5- 6 miembros saturado, parcialmente no saturado, no sustituido que tiene 0- 4 heteroátomos independientemente seleccionados a partir nitrógeno, oxigeno, o azufre, o, no obstante la definición anterior, dos ocurrencias independientes de R$^\tau$, tomadas junto con sus átomos involucrados forman un anillo arilo mono o bicíclico no sustituido de 3- 12- miembros, saturado, parcialmente no saturado que tiene 0- 4 heteroátomos independientemente seleccionados a partir de nitrógeno, oxigeno, o azufre.

Sustituyentes apropiados sobre el grupo alifático de R$^\tau$ son independientemente halógeno, - R$^\bullet$, - (haloR$^\bullet$), - OH, - OR$^\bullet$, - O(haloR$^\bullet$), - CN, - C(O)OH, - C(O)OR$^\bullet$, - NH_2, - NHR$^\bullet$, - NR$^\bullet_2$, o

- NO_2, en donde cada $R^{\bullet}$ no es sustituido o donde está precedido por "halo" es sustituido solamente por uno o más halógenos, y es independientemente C_{1-4} alifático, - CH_2Ph, - $O(CH_2)_{0-1}Ph$, o anillo arilo de 5- 6 miembros parcialmente no saturado que tiene 0- 4 heteroátomos independientemente seleccionados a partir nitrógeno, oxigeno, o azufre.

Grupo protector apropiado - Como se utiliza en la presente, el término "grupo protector apropiado," se refiere a grupos protectores amino o grupos protectores hidroxilo que dependen de su ubicación dentro del compuesto e incluye aquellos descritos en detalle en *Protecting Groups in Organic Synthesis,* T. W. Greene y P. G. M. Wuts, 3ra edición, John Wiley & Sons, 1999.

Grupos protectores amino apropiados incluyen carbamato de metilo, carbamato de etilo, 9- fluorenilcarbamato de metilo (Fmoc), 9- (2- sulfo)fluorenilcarbamato de metilo, 9- (2.7- dibromo)fluoroenilcarbamato de metilo, 2.7- di- Z- butil- [9- (10.10- dioxo- l0.10.10.10- tetrahidrotioxantil)]carbamato de metilo (DBD- Tmoc), carbamato de 4- metoxifenacilo (Phenoc), carbamato de 2,2,2- tricloroetilo (Troc), carbamato de 2- trimetilsililetilo (Teoc), carbamato de 2- feniloetilo (hZ), carbamato de l- (l- adamantil)- l- metiletilo (Adpoc), carbamato de 1,1- dimetil- 2- haloetilo, carbamato de l,l- dimetil- 2,2- dibromoetilo (DB- £- BOC), carbamato de 1,1- dimetil- 2,2,2- tricloroetilo (TCBOC), carbamato de l- metil- 1- (4- bifeniloil)etilo (Bpoc), carbamato de 1- (3.5- di- t- butilfenilo)- 1- metiletilo (*t*- Bumeoc), carbamato de 2- (2'- y 4'- piridil)etilo (Pyoc), carbamato de 2- (*N,N*- diciclohexilcarboxamido)etilo, carbamato de *t*- butilo (BOC), carbamato de 1- adamantilo (Adoc), carbamato de vinilo (Voc), carbamato de alilo (Alloc), carbamato de 1- isopropilalilo (Ipaoc), carbamato de cinamilo (Coc), carbamato de 4- nitrocinamilo (Noc), carbamato de 8- quinolilo, carbamato de N- hidroxipiperidinilo, carbamato de alquilditio, carbamato de bencilo (Cbz), carbamato de *p*- metoxibencilo (Moz), carbamato de p- nitrobencilo, carbamato de p- bromobencilo, *carbamato de p- clorobencilo*, carbamato de 2,4- diclorobencilo, carbamato de 4- metilsulfinilbencilo (Msz), carbamato 9- antrilmetilo, carbamato de difenilmetilo, carbamato de 2- metiltioetilo, carbamato de 2- metilsulfoniletilo, carbamato de 2- (p- toluensulfonil)etilo, carmabato de [2- (1,3- ditianil)]metilo (Dmoc), carbamato de 4- metiltiofenilo (Mtpc), carbamato de 2,4- dimetiltiofenilo (Bmpc), carbamato de 2- fosfonioetilo (Peoc), carbamato de 2- trifenilfosfonioisopropilo (Ppoc), carbamato de 1,1- dimetil- 2- cianoetilo, *carbamato de m- cloro- p- aciloxibencilo*, carbamato de p- (dihidroxiboril)bencilo, carbamato de 5-

bencisoxazolilmetilo, carbamato de 2- (trifluorometil)- 6- cromonilmetilo (Tcroc), carbamato de m- nitrofenilo, carbamato de 3.5- dimetoxibencilo, carbamato de o- nitrobencilo, carbamato de 3,4- dimetoxi- 6- nitrobencilo, carbamato de fenil(*o*- nitrofenil)metilo, derivado de fenotiazinil-(10)- carbonilo, derivado de *N*- *p*- toluensulfonilaminocarbonilo, derivado de *N'*- fenilaminotiocarbonilo, carbamato de *t*- amilo, tiocarbamato de S- bencilo, carbamato p-cianobencilo, carbamato de ciclobutilo, carbamato de ciclohexilo, carbamato de ciclopentilo, carbamato de ciclopropilmetilo, carbamato de *p*- deciloxibencilo, carbamato de 2,2-dimetoxicarbonilvinilo, carbamato de *o*- (*N,N*- dimetilcarboxamido)bencilo, carbamato de l,l-dimetil- 3- (*N,N*- dimetilcarboxamido)propilo, carbamato de 1,1- dimetilpropinilo, carbamato de di(2- piridil)metilo, carbamato de 2- furanilmetilo, carbamato de 2- yodoetilo, carbamato de isoborilo, carbamato de isobutilo, carbamato de isonicotinilo, carbamato *de p- (p* '-metoxifeniloazo)bencilo, carbamato de 1- metilciclobutilo, carbamato de 1- metilciclohexilo, carbamato de 1- metil- 1- ciclopropilmetilo, carbamato de 1- metil- 1- (3.5- dimetoxifenil)etilo, carbamato de 1 - metil- 1- (p- fenilazofenil)etilo, carbamato de 1- metil- 1- feniletilo, carbamato de 1- metil- 1- (4- piridil)etilo, carbamato de fenilo, carbamato de p- (fenilazo)bencilo, carbamato de 2,4,6- tri- t- butilfenilo, carbamato de 4- (trimetilamonio)bencilo, carbamato de 2,4,6- trimetilbencilo, formamida, acetamida, cloroacetamida, tricloroacetamida, trifluoroacetamida, fenilacetamida, 3- fenilpropanamida, picolinamida, 3- piridilcarboxamida, *derivado de N- benzoilfenilalanilo*, benzamida, *p*- fenilbenzamida, *o*- nitofenilacetamida, *o*-nitrofenoxiacetamida, acetoacetamida, *(N*- ditiobenziloxicarbonilamino)acetamida, *3- (p*-hidroxifenil)propanamida, 3- (*o*- nitrofenil)propanamida, 2- metil- 2- (o-nitrofenoxi)propanamida, 2- metil- 2- (o- fenilazofenoxi)propanamida, 4- clorobutanamida, 3-metil- 3- nitrobutanamida, o- nitrocinamida, derivado de N- acetilmetionina, o- nitrobenzamida, *o*- (benzoiloximetil)benzamida, 4,5- difenil- 3- oxazolin- 2- ona, N- ftalimida, N-ditiasuccinimida (Dts), N- 2,3- difenilmaleimida, *N- 2,5*- dimetilpirrola, aducto de N- 1,1,4,4-tetrametildisililazaciclopentano (STABASE), 5- sustituido l,3- dimetil- l,3.5- triazaciclohexan- 2-ona, 5- sustituido l,3- dibenzil- l,3.5- triazaciclohexan- 2- ona, 1- sustituido 3.5- dinitro- 4-piridona, N- metilamina, N- alilamina, N- [2- (trimetilsilil)etoxi]metilamina (SEM), N- 3-acetoxipropilamina, N- (l- isopropil- 4- nitro- 2- oxo- 3- pirrolin- 3- il)amina, sales de amonio cuaternario, N- benzilamina, *N- di(4*- metoxifenil)metilamina, N- 5- dibenzosuberilamina, N-trifenilmetilamina (Tr), *N- [(4*- metoxifenil)difenilometil]amina (MMTr), N- 9-

fenilfluorenilamina (PhF), *N- 2,1*- dicloro- 9- fluorenilmetileneamina, N- ferrocenilmetilamino (Fcm), N'- oxido de N- 2- picolilamino, N- l,l- dimetiltiometileneamina, N- benzilideneamina, *N- p*- metoxibenzilideneamina, N- difenilmetileneamina, *N- [(2*- piridil)mesitil]metileneamina, N- (N',N'- dimetilaminometilen)amina, *N,N'*- isopropilidenediamina, N- p-nitrobenzilideneamina, N- salicilideneamina, *N- 5*- clorosalicilideneamina, *N*- (5- cloro- 2-hidroxifenil)fenilmetileneamina, *N*- ciclohexilideneamina, N- (5,5- dimetil- 3- oxo- l-ciclohexenil)amina, derivado de N- borano, derivado de ácido N- difenilborínico, N-[fenil(pentacarbonilcromio- o tungsten)carbonil]amina, quelato de N- cobre, quelato de N- zinc, N- nitroamina, N- nitrosoamina, N- óxido amina, difenilfosfinamida (Dpp), dimetiltiofosfinamida (Mpt), difenilotiofosfinamida (Ppt), fosforamidatos de dialquilo, fosforamidato de dibencilo, fosforamidato de difenilo, bencenosulfenamida, o-nitrobencenosulfenamida (Nps), 2,4- dinitrobencenosulfenamida, pentaclorobencenosulfenamida, 2- nitro- 4- metoxibencenosulfenamida, trifenilmetilsulfenamida, 3- nitropiridinasulfenamida (Npys), *p*- toluenosulfonamida (Ts), bencenosulfonamida, 2,3,6,-trimetil- 4- metoxibencenosulfonamida (Mtr), 2,4,6- trimetoxibencenosulfonamida (Mtb), 2,6-dimetil- 4- metoxibencenosulfonamida (Pme), 2,3.5,6- tetrametil- 4- metoxibencenosulfonamida (Mte), 4- metoxibencenosulfonamida (Mbs), 2,4,6- trimetilbencenosulfonamida (Mts), 2,6-dimetoxi- 4- metilbencenosulfonamida (iMds), 2,2,5,7,8- pentametilcroman- 6- sulfonamida (Pmc), metanosulfonamida (Ms), β- trimetilsililetanosulfonamida (SES), 9-antracenosulfonamida, 4- (4', 8 '- dimetoxinaftilmetil)bencenosulfonamida (DNMB S), benzilsulfonamida, trifluorometilsulfonamida, y fenacilsulfonamida.

Grupos protectores hidroxilo apropiados incluyen metilo, metoxilmetili (MOM), metiltiometilo (MTM), *t*- butiltiometilo, (fenildimetilsilil)metoximetilo (SMOM), benciloximetilo (BOM), *p*- metoxibenciloximetilo (PMBM), (4- metoxifenoxi)metilo *(p- AOM),* guaiacolmetilo (GUM), *t*- butoximetilo, 4- penteniloximetilo (POM), siloximetilo, 2-metoxietoximetilo (MEM), 2,2,2- tricloroetoximetilo, bis(2- cloroetoxi)metilo, 2-(trimetilsilil)etoximetilo (SEMOR), tetrahidropiranilo (THP), 3- bromotetrahidropiranilo, tetrahidrotiopiranilo, 1- metoxiciclohexilo, 4- metoxitetrahidropiranilo (MTHP), 4-metoxitetrahidrotiopiranilo, S,S- dióxido 4- metoxitetrahidrotiopiranilo, l- [(2- cloro- 4-metil)fenil]- 4- metoxipiperidin- 4- ilo (CTMP), 1,4- dioxan- 2- ilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotiofuranilo, 2,3,3a,4,5,6,7,7a- octahidro- 7,8,8- trimetil- 4,7- metanobenzofuran- 2- ilo,

1- etoxietilo, 1- (2- cloroetoxi)etilo, 1- metil- l- metoxietilo, 1- metil- 1- benciloxietilo, 1- metil- 1- benciloxi- 2- fluoroetilo, 2,2,2- tricloroetilo, 2- trimetilsililetilo, 2- (fenilselenil)etilo, *t*- butilo, alilo, p- clorofenilo, p- metoxifenilo, 2,4- dinitrofenilo, bencilo, p- metoxibencilo, 3,4- dimetoxibencilo, o- nitrobencilo, p- nitrobencilo, p- halobencilo, 2,6- diclorobencilo, *p*- cianobencilo, *p*- fenilbencilo, 2- picolilo, 4- picolilo, N- óxido de 3- metil- 2- picolilo, difenilmetilo, *p,p'*- dinitrobenzhidrilo, 5- dibenzosuberilo, trifenilmetilo, α- naftildifenilmetilo, *p*- metoxifenildifenilmetilo, di(*p*- metoxifenil)fenilmetilo, tri(p- metoxifenil)metilo, 4- (4'- bromofenaciloxifenil)difenilmetilo, 4,4',4"- tris(4,5- dicloroftalimidofenil)metilo, 4,4',4"- tris(levulinoiloxifenil)metilo, 4,4',4"- tris(benzoiloxifenil)metilo, 3- (imidazol- l- il)bis(4',4"- dimetoxifenil)metilo, 1,1- bis(4- metoxifenil)- l'- pirenilmetilo, 9- antrilo, 9- (9- fenil)xantenilo, 9- (9- fenil- 10- oxo)antrilo, l,3- benzoditiolan- 2- ilo, S,S- dióxido bencisotiazolilo, trimetilsililo (TMS), trietilsililo (TES), triisopropilsililo (TIPS), dimetilisopropilsililo (IPDMS), dietilisopropilsililo (DEIPS), dimetilthexilsililo, *t*- butildimetilsililo (TBDMS), *t*- butildifenilsililo (TBDPS), tribencilsililo, tri- *p*- xililsililo, trifenilsililo, difenilmetilsililo (DPMS), *t*- butilmetoxifenilsililo (TBMPS), formato, benzoilformato, acetato, cloroacetato, dicloroacetato, tricloroacetato, trifluoroacetato, metoxiacetato, trifenilmetoxiacetato, fenoxiacetato, *p*- clorofenoxiacetato, 3- fenilpropionato, 4- oxopentanoato (levulinato), 4,4- (etileneditio)pentanoato (levulinoilditioacetal), pivaloato, adamantoato, crotonato, 4- metoxicrotonato, benzoato, p- fenilbenzoato, 2,4,6- trimetilbenzoato (mesitoato), alquilmetil carbonato, 9- fluorenilmetil carbonato (Fmoc), alquiletil carbonato, alquil- 2,2,2- tricloroetil carbonato (Troc), 2- (trimetilsilil)etil carbonato (TMSEC), 2- (fenilsulfonil)etil carbonato (Psec), 2- (trifenilfosfonio)etil carbonato (Peoc), alquilisobutil carbonato, alquilvinil carbonato, alquilalil carbonato, alquil- p- nitrofenil carbonato, alquilbencil carbonato, alquil- *p*- metoxibencil carbonato, alquil- 3,4- dimetoxibencil carbonato, alquil- *o*- nitrobencil carbonato, alquil- *p*- nitrobencil carbonato, alquil- S- bencil tiocarbonato, 4- etoxi- 1- nafttil carbonato, ditiocarbonato de metilo, 2- yodobenzoato, 4- azidobutirato, 4- nitro- 4- metilpentanoato, o- (dibromometil)benzoato, 2- formilbencenosulfonato, 2- (metiltiometoxi)etilo, 4- (metiltiometoxi)butirato, 2- (metiltiometoximetil)benzoato, 2,6- dicloro- 4- metilfenoxiacetato, 2,6- dicloro- 4- (1,1,3,3- tetrametilbutil)fenoxiacetato, 2,4- bis(l,l- dimetilpropil)fenoxiacetato, clorodifenilacetato, isobutirato, monosuccinoato, (E)- 2- metil- 2- butenoato, *o*- (metoxicarbonil)benzoato, a- naftoato, nitrato, N,N,N',N'- tetrametilfosforodiamidato de

alquilo, N- fenilcarbamato de alquilo, borato, dimetilfosfinotioilo, 2,4- dinitrofenilsulfonato de alquilo, sulfato, metanosulfonato (mesilato), bencilsulfonato, y tosilato (Ts). Para 1,2- o 1,3- dioles protectores, los grupos protectores incluyen acetal de metileno, acetal de etilideno, cetal de 1- t- butiletilideno, cetal de 1- feniletilideno, acetal de (4- metoxifenil)etilideno, acetal de 2,2,2- tricloroetilideno, acetonida, cetal de ciclopentilideno, cetal de ciclohexilideno, cetal de cicloheptilideno, acetal de bencilideno, acetal de p- metoxibencilideno, cetal de 2,4- dimetoxibencilideno, acetal de 3,4- dimetoxibencilideno, acetal de 2- nitrobencilideno, acetal de metoximetileno, acetal de etoximetileno, orto éster de dimetoximetileno, orto ester de 1- metoxietilideno, orto éster de 1- etoxietilidino, orto éster de 1,2- dimetoxietilideno, orto éster de α- metoxibencilideno, derivado de 1- (N,N- dimetilamino)etilideno, derivado de α- (N,N'- dimetilamino)bencilideno, orto éster de 2- oxaciclopentilideno, grupo di- Z- butilsilileno (DTBS), derivado de 1,3- (1,1,3,3- tetraisopropildisiloxanilideno) (TIPDS), derivado de tetra- t- butoxidisiloxano- 1,3- diilideno (TBDS), carbonatos cíclicos, boronatos cíclicos, boronato de etilo, y boronato de fenilo.

En cualquier caso donde una variable química (ej., un grupo R) se muestra unida a un enlace que cruza un enlace de anillo, esto significa que una o más de tales variables están opcionalmente unidas al anillo que tiene el enlace cruzado. Cada grupo R sobre tal anillo puede unirse en cualquier posición apropiada, esto generalmente se entiende para significar que el grupo es fijado en cambio de un átomo de hidrógeno sobre el anillo precursor. Esto incluye la posibilidad que dos grupos R pueden fijarse al mismo átomo cíclico. Además, cuando más de un grupo R está presente en el anillo, cada uno puede ser igual o diferente que otros grupos R fijados al mismo, y cada grupo se define independientemente de otros grupos que pueden fijarse en cualquier parte sobre la misma molécula, aún cuando pueden presentarse por el mismo identificador.

Biodegradable - Como se utilize en la presente, el término "biodegradable" se refiere a moléculas que se degradan (es decir, pierden al menos parte de su estructura covalente) bajo condiciones fisiológicas o endosomales. Moléculas biodegradables no son necesariamente hidrolíticamente degradables y pueden requerir una acción enzimática para degradarse.

Biomolécula - Como se utiliza en la presente, el término "biomolécula" se refiere a moléculas (ej., polipéptidos, aminoácidos, polinucleotidos, nucleotidos, polisacaridos, azúcares, lípidos, nucleoproteínas, glicoproteínas, lipoproteínas, esteroides, metabolitos, etc.) ya sea de

ocurrencia natural o creados de manera artificial (ej., médiente métodos sintéticos o recombinantes) que comúnmente se encuentran en células y tejidos. Clases específicas de biomoléculas incluyen, pero no están limitados a, enzimas, receptores, neurotransmisores, hormonas, citoquinas, modificadores de respuesta celular tales como factores de crecimiento y factores quimiotácticos, anticuerpos, vacunas, haptenos, toxinas, interferonas, ribosomas, agentes anti- sentido, plásmidos, ADN, y ARN.

Fármaco- Como se utiliza en la presente, el término "fármaco" se refiere a moléculas o biomoléculas pequeñas que alteran, inhiben, activan, o de otra forma afectan un evento biológico. Por ejemplo, los fármacos pueden incluir, pero no están limitados a, sustancias anti-SIDA, sustancias anti- cáncer, antibioticos, sustancias anti- diabéticas, inmunosupresores, sustancias anti- virales, inhibidores de enzimas, neurotoxinas, opiodes, hipnóticos, anti-histaminas, lubricantes, tranquilizantes, anti- convulsivos, relajantes musculares y sustancias anti- Parkinson, anti- espasmódicos y contractores musculares incluyendo bloqueadores de canales, mioticos y anti- colinérgicos, compuestos anti- glaucoma, compuestos anti- parasitarios y/o anti- protozoarios, moduladores de interacciones célula- matriz extracelular incluyendo inhibidores de crecimiento celular y moléculas anti- adhesión, agentes vasodilatadores, inhibidores de ADN, ARN o síntesis de proteínas, anti- hipertensivos, analgésicos, anti-piréticos, agentes anti- inflamatorios esteroideos y no esteroideos, factores anti- angiogénicos, factores anti- secretorios, anticoagulantes y/o agentes anti- trombóticos, anestésicos locales, oftálmicos, prostaglandinas, anti- depresivos, sustancias anti- psicóticas, anti- eméticos, y agentes trazadores. Un listado más completo de fármacos de ejemplo apropiados para utilizar en el presente invento puede encontrarse en "Pharmaceutical Substances: Syntheses, Patents, Applications" por Axel Kleemann and Jurgen Engel, Tieme Medical Publishing, 1999; *the "Merck Index: An Enciclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals"*, editado por Susan Budavari, CRC Press, 1996, y la Pharmacopeia estadounidense - 25/National Formulary- 20, publicado por the United States Pharmcopeial Convention, Inc., Rockville MD, 2001.

Exógeno - Como se utiliza en la presente, una molécula "exógena" es aquella que no está presente a niveles significativos en un paciente a menos que se administre al paciente. En ciertas realizaciones el paciente es un mamífero, ej., un humano, un perro, un gato, una rata, etc. Como se utiliza en la presente, una molécula no está presente a niveles significativos en un paciente si el suero normal para ese tipo de paciente incluye menos de 0.1 mM de la molécula. En ciertas

realizaciones el suero normal para el paciente puede incluir menos de 0.08 mM, menos de 0.06 mM, o menos de 0.04 mM de la molécula.

Hiperramificada - Como se utiliza en la presente, una estructura "hiperramificada" es una estructura covalente que incluye al menos un brazo ramificado (ej., una estructura dendrítica). Una estructura hiperramificada puede incluir subestructuras poliméricas y/o no poliméricas.

Suero normal - Como se utiliza en la presente, "suero normal" es suero obtenido al agrupar cantidades aproximadamente iguales de la porción líquida de sangre entera coagulada a partir de cinco o más pacientes no diabéticos. Un paciente humano no diabético es aquel aleatoriamente seleccionado entre 18 y 30 años de edad que no presente síntomas diabéticos en el momento de recolectar su sangre.

Polímero - Como se utiliza en la presente, un "polímero" o "estructura polimérica" es una estructura que incluye una tira de monómeros covalentemente unidos. Un polímero puede fabricarse a partir de un tipo de monómero o más de un tipo de monómero. El término "polímero" por lo tanto comprende copolímeros, incluyendo copolímeros de bloque en los cuales diferentes tipos de monómero son agrupados de manera separada dentro del polímero general. Un polímero puede ser lineal o ramificado.

Polinucleótido - como se utilize en la presente, un "polinucleótido" es un polímero de nucleótidos. Los términos "polinucleótido", "ácido nucleico", y "oligonucleótido" se pueden usar intercambiablemente. El polímero puede incluir nucleósidos naturales (es decir, adenosina, timidina, guanosina, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina, y desoxicitidina), análogos de los nucleósidos (por ejemplo, 2- aminoadenosina, 2- tiotimidina, inosina, pirrolo- pirimidina, 3 - metil adenosina, 5- metilcitidina, C5- bromouridina, C5- fluorouridina, C5 yodouridina, C5- propinil uridina, C5- propinil citidina, C5- metilcitidina, 7- deazaadenosina, 7- deazaguanosina, 8- oxoadenosina, 8- oxoguanosina , O(6)- metilguanina, 4- acetilcitidina, 5 - (carboxihidroximetil)uridina, dihidrouridina, metilpseudouridina, 1- metil adenosina, 1- metil guanosina, N6- metil adenosina, y 2 tiocitidina), bases modificadas químicamente, bases modificadas biológicamente (por ejemplo, bases metiladas), bases intercaladas, azúcares modificados (por ejemplo, 2'- fluororibosa, ribosa, 2'- desoxirribosa, 2'- O- metilcitidina, arabinosa, y hexosa), o grupos fosfato modificados (por ejemplo, enlaces de fosforotioatos y 5 '- N- fosforamidita).

Polipéptido - como se utiliza en la presente, un "polipéptido" es un polímero de aminoácidos. Los términos "polipéptido", "proteínas", "oligopéptido", y "péptido" pueden utilizarse indistintamente.

Los polipéptidos pueden contener aminoácidos naturales y no naturales (es decir, compuestos que no se producen en la naturaleza, sino que se pueden incorporar en una cadena de polipéptidos) y/o análogos de aminoácidos que se conocen en el estado de la técnica. También, uno o más de los residuos de aminoácidos en un polipéptido puede ser modificados, por ejemplo, mediante la adición de una entidad química como un grupo carbohidrato, un grupo fosfato, un grupo farnesilo, un grupo de isofarnesilo, un grupo de ácidos grasos, un conector para la conjugación, funcionalización, o cualquier otra modificación, etc Estas modificaciones pueden incluir la ciclación del péptido, la incorporación de D- aminoácidos, etc

Polisacarido - Como se utiliza en la presente, un "polisacarido" es un polímero de sacaridos. Los términos "polisacarido", "carbohidrato", y "oligosacarido", pueden utilizarse intercambiablemente. El polímero puede incluir sacaridos naturales (ej., arabinosa, lixosa, ribosa, xilosa, ribulosa, xilulosa, alosa, altrosa, galactosa, glucosa, gulosa, idosa, manosa, talosa, fructosa, psicosa, sorbosa, tagatosa, manoheptulosa, sedoheptulosa, octolosa, y sialosa) y/o sacaridos modificados (ej., 2'- fluororibosa, 2'- deoxiribosa, y hexosa). Disacaridos de ejemplo incluyen sacarosa, lactosa, malosa, trehalosa, gentiobiosa, isomalosa, kojibiosa, laminaribiosa, mannobiosa, melibiosa, nigerosa, rutinosa, y xilobiosa.

Molécula pequeña - Como se utiliza en la presente, el término "molécula pequeña" se refiere a moléculas, ya sea de ocurrencia natural o creadas de manera artificial (ej., vía síntesis química), que tienen un peso molecular relativamente bajo. Típicamente, las moléculas pequeñas son monomélicas y tienen un peso molecular de menos de 1500 Da aproximadamente. Moléculas pequeñas preferidas biológicamente activas en que producen un efecto local o sistémico en animales, preferiblemente mamíferos, más preferiblemente humanos. En ciertas realizaciones preferidas, la molécula pequeña es un fármaco. Preferiblemente, aunque no necesariamente, el fármaco es uno que haya sido considerado seguro y efectivo para utilizar por la agencia o cuerpo gubernamental apropiado. Por ejemplo, fármacos para uso humano listados por la FDA bajo 21 C.F.R. §§ 330.5,331 a 361, y 440 a 460; fármacos para uso veterinario listados por la FDA bajo 21 C.F.R. §§ 500 a 589, son todos considerados aceptables para utilizar según el presente invento.

Tratar - Como se utiliza en la presente, el término "tratar" (o "tratamiento", "tratado", etc.) se refiere a la administración de un conjugado de insulina de la presente divulgación a un sujeto en necesidad del mismo con el propósito de aliviar, mitigar, alterar, mejorar o afectar una condición (ej., diabetes), un síntoma o síntomas de una condición (ej., hiperglicemia), o la predisposición a una condición.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Comparación entre cromatogramas RP- HPLC obtenidos para (a) conjugado de ejemplo sintetizado utilizando TSAT- C6 como el andamiaje, AEM como el ligando, y NH_2- B1- BOC_2 (Al, B29) - insulina como el fármaco (conjugado **I- 1**) y (b) un conjugado de la insulin-glucógeno sintetizado según el Ejemplo 32.

Figura 2: Ensayo de agregación de prueba de estabilidad acelerada (AST) de I- 1 conjugado (□), conjugado **I- 16** (Δ), y RHI (♦) en buffer PBS. Los conjugados demostraron estabilidad altamente aumentada sobre RHI grado farmacéutico.

Figura 3: Resultados de estabilidad química de prueba de estabilidad acelerada (AST): (a) estabilidad de conjugado RP- HPLC AST y (b) datos LC/MS sobre conjugados AST.

Figura 4: Bioactividad *in vivo* en (n = 4) ratas macho no diabéticas, Sprague- Dawley (SD) para conjugado fresco (▲) y conjugado AST de 72 horas (O). La bioactividad de conjugado AST 72 horas fue indistinguible de la del conjugado fresco (p> 0,21 para todos los puntos de tiempo).

Figura 5: Perfil depresión de glucosa en la sangre en ratas macho SD no diabéticas (n = 3) para insulina- dextrano inyectada por vía subcutánea (▲) (70 K) a una dosis de ~ 20 U equivalents de insulina/kg.

Figura 6: Perfil de depresión de glucosa en sangre en ratas macho SD no diabéticas (n = 3) para insulina glucógeno inyectada por vía subcutánea (■) (ostra tipo II) a una dosis de ~ 2,5 U de equivalentes de insulina/kg.

Figura 7: Niveles de glucosa en la sangre como resultado de una dosis subcutánea de insulina equivalente 3.5 U/kg de (♦) conjugado I- 1 de TSAT- C6- AEM- 2- insulina e (□) insulina humana recombinante soluble (RHI) en ratas SD macho no diabéticas. Cada conjunto dc datos representa la media y desviación estándar para n = 6 ratas.

Figura 8: Concentraciones séricas de insulina como resultado de una dosis subcutánea 3.5 U de insulina equivalente/kg de (♦) conjugado de insulina I- 1 TSAT- C6- AEM- 2 e (□) insulina humana recombinante soluble (RHI) en ratas SD macho no diabéticas. Cada conjunto de datos representa la media y desviación estándar para n = 6 ratas.

Figura 9: Diagrama de insulina en suero (♦) y niveles de glucosa en sangre (O) después de inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas en el tiempo 0 con conjugado de insulina 1- 7 TSAT- C6- AEM- 2 (B29- sustituido) (5 U/kg). Los datos representan la media y desviación estándar para n = 3 ratas.

Figura 10: Estructuras químicas de AEG, AEM, AEBM y AETM. La afinidad de estos ligandos basados en sacáridos para Con A aumenta como se muestra.

Figura 11: Estructuras químicas de algunos intermedios de conjugados no dendriméricos de ejemplo. Ligandos de conjugados de ejemplo que incluyen un sacárido también se muestran para fines ilustrativos (AEG, AEM, AEBM, AETM, AEGA y AEF).

Figura 12: Gráfica de niveles de insulina en suero (izquierda) y de glucosa en sangre (derecha) después de la inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas en el tiempo 0 con un conjugado de la insulina I- 1 TSAT- C6- AEM- 2 (♦), insulina humana recombinante soluble, (O) y la insulina lispro (▲) (todos 3.5 U/kg). Los datos representan la media y desviación estándar para n = 6 ratas.

Figura 13: Representación de los niveles de glucosa en sangre después de la inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n = 3 para cada formulación) en el tiempo 0 con conjugados de insulina basados en TSAT- C6 con los ligandos diferentes como se muestra. La respuesta de disminución de glucosa disminuye a medida que la afinidad del ligando aumenta.

Figura 14: Gráfica de los niveles de insulina en suero (izquierda) y de glucosa en sangre (derecha) después de la inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n = 3) en el tiempo 0 con conjugado I- 1 TSAT- C6- AEM- 2 (3.5 U/kg).

Figura 15: Gráfica de los niveles de insulina en suero (izquierda) y la glucosa en sangre (derecha) después de la inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n = 3) en el tiempo 0 con conjugado I- 3 TSAT- C6- AEBM- 2 (5 U/kg).

Figura 16: Gráfica de los niveles de insulina en suero (izquierda) y de glucosa en sangre (derecha) después de la inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n = 3) en el tiempo 0 con conjugado I- 4 TSAT- C6- AEBM- 1 AETM- 1 (5 U/kg).

Figura 17: Gráfica de los niveles de insulina en suero (izquierda) y de glucosa en sangre (derecha) después de la inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n = 3) en el tiempo 0 con conjugada I- 2 TSAT- C6- AETM- 2 (5 U/kg).

Figura 18: Gráfica de los niveles insulina sérica y de glucosa en sangre después de la inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n = 3) en el tiempo 0 con conjugado I- 2 TSAT- C6- AETM- 2 seguida de la inyección IP de la alfa- metil manosa (izquierda) o solución salina (derecha) después de 15 minutos. Alfa- metil- manosa es un sacárido de afinidad muy elevada, que es capaz de competir con AETM por la unión a lectinas tal como Con A. Como se muestra, el cambio en el perfil PK/PD que resulta dc la inyección de alfa- metil metil manosa es muy significativo ($p < 0,05$).

Figura 19: Gráfica de los niveles insulina sérica y de glucosa en sangre después de la inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n = 3) en el tiempo 0 con la insulina humana recombinante soluble (RHI), seguida de una inyección IP de la alfa- metil manosa (izquierda) o solución salina (derecha) después de 15 minutos. Como se muestra, no se produce cambio en perfil PK/PD como resultado de la inyección de alfa- metil- manosa ($p >> 0.05$).

Figura 20: Gráfica de los niveles de insulina en suero después de la inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n = 3 para cada expt) en el tiempo 0 con conjugado I- 2 TSAT- C6- AETM- 2 seguida de la inyección IP de la alfa- metil- manosa (♦), L- fucosa (■) o solución salina (▲) después de 15 minutos. Como se muestra, la alfa- metil- manosa y L- fucosa parecen mostrar el mismo tipo de efecto.

Figura 21: Representación de los niveles de insulina en suero después de la inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticasen en tiempo 0 con conjugado I- 2 TSAT- C6- AETM- 2 seguida de la inyección IP de la glucosa (♦), galactosa (■) o solución salina (▲) después de 15 minutos. Como se muestra, la galactosa no exhibe ningún efecto en comparación con la solución salina. La glucosa parece mostrar un efecto pequeño, sin embargo, esto se complica por el hecho de que la insulina exógena desde el conjugado rápidamente baja la glucosa, por lo que el efecto sostenido observado con alfa- metil- manosa y L- fucosa no se produce.

Figura 22: Gráfica de los niveles insulina sérica y de glucosa en sangre después de la inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n = 3) en el tiempo 0 con solución de conjugado I- 2 TSAT- C6- AETM- 2 a 5 U/kg disuelto en (a) solución salina amortiguada

conteniendo 1M alfa- metil manosa o (b) solución salina amortiguada. En (a) las ratas fueron inyectadas posteriormente a los 15 minutos con el mismo volumen de solución salina utilizada en (b) en un sitio de subcutáneo diferente que el utilizado para la solución de conjugado. En (b) las ratas fueron inyectadas posteriormente a los 15 min. con el mismo volumen de solución 1 M de alfa- metil- manosa utilizada en (a) un sitio de subcutáneo diferente al utilizado para la solución de conjugado. Como puede observarse, los niveles séricos de insulina no aumentan y los niveles de glucosa en la sangre no disminuyen en el experimento (a) en relación con el experimento (b).

Figura 23: Gráfica de los niveles insulina sérica y de glucosa en sangre después de la inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n = 3) en el tiempo 0 con solución de conjugado I- 2 TSAT- C6- AETM- 2 a 5 U/kg. A los 15 min, 60 min, 120 min, o 240 minutos después de la inyección de conjugado, las ratas se les administró una inyección IP 4g/kg a- MM.

Figura 24: Gráfica de los niveles insulina sérica y de glucosa en sangre después de la inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n = 3) en el tiempo 0 con Tconjugado I- 7 SAT- C6- AEM- 2 seguido de la inyección IP de la alfa- metil manosa (izquierda) o solución salina (derecha) después de 15 minutos. La alfa- metil- manosa es un sacárido de afinidad muy elevada, que es capaz de competir con AEM por la unión a lectinas tal como Con A. Como se observa, el cambio en el perfil PK/PD que resulta de la inyección de alfa- metil- manosa es muy significativo ($p < 0,05$).

Figura 25: Gráfica de los niveles insulina sérica y de glucosa en sangre después de la inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n = 3) en el tiempo 0 con conjugado I- 5 TSAT- C6- GA- 2 seguida de la inyección IP de la alfa- metil manosa (izquierda) o solución salina (derecha) después de 15 minutos. La alfa- metil- manosa es un sacárido de afinidad muy elevada, que es capaz de competir con AEM por la unión a lectinas tal como Con A. Como se observa, el cambio en el perfil PK/PD que resulta de la inyección de alfa- metil- manosa no es significativo.

Figura 26: Gráfica de los niveles insulina sérica y de glucosa en sangre después de la inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n = 3) en el tiempo 0 con conjugado I- 8 DSS- C6- AEM- 1 seguida de la inyección IP de la alfa- metil manosa (izquierda) o solución salina (derecha) después de 15 minutos. La alfa- metil- manosa es un sacárido de afinidad muy elevada, que es capaz de competir con AEM por la unión a lectinas tal como Con A. Como se

observa, el cambio en el perfil PK/PD que resulta de la inyección de alfa- metil- manosa es de los menos importantes.

Figura 27: Gráfica de los niveles insulina sérica y de glucosa en sangre después de la inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n = 3) en el tiempo 0 con conjugado I- 9 TSPE- AEM- 1- 9 seguido de una inyección IP de la alfa- metil- manosa (izquierda) o solución salina (derecha) después de 15 minutos. La alfa- metil- manosa es un sacárido de afinidad muy elevada, que es capaz de competir con AEM por la unión a lectinas tal como Con A. Como se observa, el cambio en el perfil PK/PD que resulta de la inyección de alfa- metil- manosa es significativo= ($p < 0.05$).

Figura 28: Gráfica de los niveles insulina sérica y de glucosa en sangre después de la inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n = 3) en el tiempo 0 con conjugado I- 10 DSS- AETM- 1 seguida de la inyección IP de la alfa- metil- manosa (izquierda) o solución salina (derecha) después de 15 minutos. La alfa- metil- manosa es un sacárido de afinidad muy elevada, que es capaz de competir con AEM por la unión a lectinas tal como Con A. Como se observa, el cambio en el perfil PK/PD que resulta de la inyección de alfa- metil- manosa es significativo ($p < 0.05$).

Figura 29: Gráfica de los niveles insulina sérica y de glucosa en sangre después de la inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n = 3) en el tiempo 0 con conjugado I- 11 TSPE- AETM- 3 seguido de la inyección IP de la alfa- metil- manosa (izquierda) o solución salina (derecha) después de 15 minutos. La alfa- metil- manosa es un sacárido de afinidad muy elevada, que es capaz de competir con AEM por la unión a lectinas tal como Con A. Como se observa, el cambio en el perfil PK/PD que resulta de la inyección de alfa- metil- manosa es significativo ($p < 0.05$).

Figura 30: Gráfica de la concentración de insulina sérica en función del tiempo para inyecciones por vía intravenosa de 0.4 mg/kg de (♦) RHI y (▲) conjugado I- 6 TSAT- C6- AETM- 2 en ratas macho SD no diabéticas (n = 3 por grupo). Los datos (promedio de n = 3) se ajustan utilizando un modelo bi- exponencial de dos compartimientos. El conjugado TSAT- C6- AETM- 2 es eliminado del suero mucho más rápido que RHI.

Figura 31: Gráficas de los niveles de insulina en suero (♦) y glucosa en sangre (O) después de la inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n = 3 por dosis) en el tiempo 0 con conjugados (I- 6) TSAT- C6- AETM- 2 de acción prolongada seguida de una

inyección IP de glucosa (4 g/kg) en 240 minutos. Las formulaciones se prepararon como se describe en el Ejemplo 51: (a) LxP- lxZ, (b)- 4xP 4xZ, y (c) 10xP- 4xZ.

Figura 32: Gráficas de los niveles de insulina en suero (♦) y la glucosa en sangre (O) después de la inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n = 3 por dosis) en el tiempo 0 con conjugados (I- 6) TSAT- C6- AETM- 2 de acción prolongada, seguida de una inyección IP de glucosa (4 g/kg) a 240 minutos. Las formulaciones se prepararon como se describe en el Ejemplo 52: (a) 4xP- LxZ y (b)- 4xP- 2xZ.

Figura 33: Gráficas de los niveles de insulina en suero (♦) y glucosa en sangre (O) después de la inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n = 3 por dosis) en el tiempo 0 con conjugados (I- 6) TSAT- C6- AETM- 2 de acción prolongada seguida de una inyección IP de glucosa (4 g/kg) a 240 minutos. Las formulaciones se prepararon como se describe en el Ejemplo 52: (a) l0xP 1xZ y (b) 10xP- 2xZ.

Figura 34: Gráficas de los insulina en suero (♦) y la glucosa en sangre (O) después de la inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n = 3 por dosis) en el tiempo 0 con conjugados (I- 6) TSAT- C6- AETM- 2 de acción prolongada, seguida de una inyección IP de glucosa (4 g/kg) a 240 minutos. Las formulaciones se prepararon como se describe en el Ejemplo 53: (a) no cresol y (b) cresol 4x.

Figura 35: Gráficas de los niveles de insulina en suero (♦) y glucosa en sangre (O) después de la inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n = 3 por dosis) en el tiempo 0 con conjugados (I- 6) TSAT- C6- AETM- 2 de acción prolongada, seguida de una inyección IP de glucosa (4 g/kg) a 240 minutos. Las formulaciones se prepararon como se describe en el ejemplo 54: (a) sin sal, (b) de sal 3.3 x, y (c) glicerol.

Figura 36: Gráficas de los niveles de insulina en suero (♦) y glucosa en sangre (O) después de inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n = 3 por dosis) en el tiempo 0 con conjugados (I- 6) TSAT- C6- AETM- 2 de acción prolongada, seguida de una inyección IP de glucosa (4 g/kg) en 240 minutos. Las formulaciones fueron preparadas conteniendo cantidades crecientes de insulina sin modificar como se describe en el Ejemplo 55: (a) 1/24, (b) 1/12, y (c) 1/6.

Figura 37: Gráfica de los niveles de insulina en suero (♦) y glucosa en sangre (O) después de inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n = 3 por dosis) en el tiempo

0 con un conjugado I- 6 TSAT- C6- AETM- 2 de acción prolongada preparado según el ejemplo 56, seguida de la inyección IP de glucosa (4 g/kg) a 240 minutos.

Figura 38: Gráfica de los niveles de insulina en suero (♦) y glucosa en sangre (O) después de la inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n = 3 por dosis) en el tiempo 0 con un conjugado I- 6 TSAT- C6- AETM- 2 de acción prolongada preparado según el ejemplo 57, seguida de la inyección IP de glucosa (4 g/kg) a 240 minutos. El material fue inyectado después de almacenamiento a 2- 8 ° C durante (a) de una semana o (b) dos semanas.

Figura 39: Gráfica de los niveles de insulina en suero (♦) y glucosa en sangre (O) después de la inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n = 3 por dosis) en el tiempo 0 con un conjugado I- 6 TSAT- C6- AETM- 2 de acción prolongada preparado según el ejemplo 57, seguida de la inyección IP de la glucosa (4 g/kg) a 240 minutos. El material fue inyectado después de almacenamiento a temperatura ambiente durante (a) una semana o (b) dos semanas.

Figura 40: Gráfica de los niveles de insulina en suero (♦) y glucosa en sangre (O) después de la inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n = 3 por dosis) en el tiempo 0 con formulaciones de conjugado de acción prolongada preparadas según el ejemplo 58 seguido por inyección IP de la glucosa (4 g/kg) a 240 minutos. Los conjugados son DSS- AEM- 1 (1- 8), DSS- AETM- 1 (1- 10), TSAT- C6- AEM- 2 (1- 7), C6- amida- AEM- 2 (I- 17) , TSPE- AEM- 3 (1- 9), y TSPE- AETM- 3 (I- 11).

Figura 41: Gráfica de los niveles de insulina en suero (♦) y glucosa en sangre (O) después de inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n = 3 por dosis) en el tiempo 0 con las formulaciones de conjugado de acción prolongada preparadas según el ejemplo 59 seguido por inyección IP de la alfa- metil- manosa (4 g/kg) a 240 minutos. Los conjugados son: (a) TSAT- C6- AETM- 2 (1- 6) y (b) TSAT- C6- GA- 2.

Figura 42: Representación de los niveles de glucosa en sangre después de la inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas (normales) y diabéticas (DMs) en el tiempo 0 con conjugado I- 6 TSAT- C6- AETM- 2 (B29- sustituido, PZI). El conjugado se administró a 5, 10 y 20 U/kg. Como se muestra, las ratas macho no diabéticas SD no mostraron ninguna hipoglicemia mientras que los niveles de glucosa en ratas macho SD diabéticas mostraron una respuesta clara proporcional a dosis que se prolongó por más de 8 horas a la dosis más alta.

Figura 43: Representación de los niveles de glucosa en la sangre durante 24 horas después de inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (normales) y diabéticas (DM) en el tiempo 0 con conjugado I- 6 TSAT- C6- AETM- 2 (B29- sustituido, PZI). El conjugado se administró a 7, 14 y 28 U/kg.

Figura 44: Gráfica de los niveles de insulina en suero (♦) y glucosa en sangre (O) después de la inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n = 3 por dosis) en el tiempo 0 con una formulación de conjugado I- 7 preparada según Ejemplo 67 seguida de la inyección IP de glucosa (4 g/kg) a 240 minutos.

Figura 45: Estructuras de conjugados de insulina de ejemplo. Como se describe en los ejemplos, estos conjugados fueron preparados con insulina humana recombinante tipo silvestre (ver Figura 63 para la estructura de insulina humana tipo silvestre). El símbolo "insulina" dentro de un óvalo, como se muestra en la Figura 45 tiene principalmente la intención de representar una insulina humana tipo silvestre. Como se discutió en la presente, se debe entender que la presente divulgación también incluye, entre otras cosas, las versiones de estos y otros conjugados que incluyen una molécula de insulina diferente de insulina humana tipo silvestre.

Figura 46: Gráficas de la concentración de insulina en suero en función del tiempo después de la inyección de conjugado I- 6 o RHI (izquierda) y conjugado I- 6 con y sin glucosa o alfa- metil- manosa (derecha).

Figura 47: Los dos primeros paneles muestran las gráficas de los niveles de insulina en suero (♦) y glucosa en sangre (O) después de infusion intravenosa (i.v.) constante de RHI (3.5 mU/min) o I- 6 (15 mU/min) en ratas macho SD no- diabéticas (n = 3). La inyección IP de glucosa (4 g/kg) se administró a 240 minutos. Los próximos tres paneles comparan gráficas de niveles de insulina en suero (♦) y glucosa en sangre (O) después de infusion intravenosa constante de RHI (3.5 mU/min) o I- 6 (15 mU/min) en ratas macho SD no diabéticas (n = 3) cuando se administró una inyección IP de glucosa (4, 2, o 1 g/kg) a 240 minutos.

Figura 48: Gráficas de la concentración de insulina en suero en función del tiempo después de inyección de conjugados con y sin glucosa o alfa- metil- manosa. Las ratas fueron infundidas por vía intravenosa con solución de azúcar en t = - 60 min y a lo largo de todo el estudio. Cada conjugado se inyectó por vía intramuscular a 10 U/kg en el tiempo 0, y las concentraciones séricas de conjugado fueron medidas.

Figura 49: Composición de conjugados de insulina probados en studios de vida media de eliminación dependiente de azucar de minicerdos no diabéticos. Como se describe en los ejemplos, estos conjugados fueron preparados con insulina humana recombinante tipo silvestre (ver Figura 63 para la estructura de insulina humana tipo silvestre). El esquema de la Figura 49 principalmente tiene la intención de representar una insulina humana tipo silvestre. Como se discutió en la presente, se debe entender que la presente divulgación también incluye, entre otras cosas, las versiones de estos y otros conjugados que incluyen una molécula de insulina diferente de insulina humana tipo silvestre.

Figura 50: Resultados de vida media de eliminación de β - fase en minicerdos diabéticos durante infusion de glucosa, alfa- metil- manosa o solución salina.

Figura 51: Gráficos de las concentraciones séricas de (a) insulina humana recombinante (RHI) y (b) conjugado II- 2 de insulin Di- Sub- AETM- 2 después de una inyección intravenosa 0.1 U/kg en minicerdos Yucatan machos no diabéticos equipados con puertos duales de acceso vascular (n = 3 por estudio). En cada experimento, los animales fueron infundidos con solución de (♦) alfa metil manosa i.v (a- MM) (25% peso/volumen infundida a una tasa constante de 80 ml/h) o (▲) no solución. Los datos se representan como los valores medios ajustados con una curva deerivada a partir del modelo bi- exponencial de dos compartimientos.

Figura 52: Curvas de depression de glucosa en sangre en minicerdos Yucatan machos no diabéticos equipados con puertos duales de acceso vascular (n = 3 por estudio), después de inyección intravenosa de conjugados a 0.1 U/kg en condiciones de (a) no infusion intravenosa de azúcar o (b) infusion de alfa- metil- manosa (a- MM) (25% peso/volumen, infundida a una tasa constante de 80 ml/h). (■) RHI, (O) 1.7, (◆) 1- 6, (▲) I- 11, y (●) II- 2.

Figura 53: Niveles de glucosa en sangre en (a, ___, símbolos cerrados) minicerdos Yucatan aloxano- diabéticos (n = 3 por dosis) y (b ,- - - - , símbolos abiertos) minicerdos Yucatán no diabéticos (n = 3 por dosis) en condiciones de ayuno después de una inyección subcutánea en el tiempo 0 con el conjugado II- 2 de insulin soluble Di- Sub- AETM- 2 en dosis de 0.25, 0.50, y 1.00 U/kg. Los datos se representan como los valores promedio ± una desviación estándar. NOTA: La escala de la Figura 53 (b) se ha ampliado para mayor claridad.

Figura 54: Los niveles de glucosa en sangre en (a, ____, símbolos cerrados) minicerdos Yucatán aloxano- diabéticos (n = 3 por dosis) y (b ,- - - - , símbolos abiertos) minicerdos Yucatan no diabéticos (n = 3 por dosis) en condiciones de ayuno después de una inyección

subcutánea en el tiempo 0 con la insulina humana recombinante soluble (RHI) a dosis de (▲, Δ) 0.063 y (■, □) 0.125 U/kg. Los datos se representan como los valores promedio ± la desviación estándar. NOTA: La escala de la Figura 54 (b) se ha ampliado para mayor claridad.

Figura 55: Conjugados adicionales de insulina para utilizaar en estudios de vida media de eliminación dependiente de azucar de minicerdos no diabéticos. Como se describe en los ejemplos, estos conjugados fueron preparados con insulina humana recombinante tipo silvestre (ver Figura 63 para la estructura de insulina humana tipo silvestre). El esquema de la Figura 55 principalmente tiene la intención de representar una insulina humana tipo silvestre. Como se analiza en la presente, se debe entender que la presente divulgación también incluye, entre otras cosas, las versiones de estos y otros conjugados que incluyen una molécula de insulina diferente de insulina humana tipo silvestre.

Figura 56: Gráficas de concentración de insulina en suero como una función de tiempo después de administración de RHI o conjugado I- 6 en ratas y minicerdos.

Figura 57: Resumen de resultados de vida media intravenosa en minicerdos para conjugados de insulina adicionales.

Figura 58: Representación de niveles de insulina en suero después de una sola inyección subcutánea de 0.25, 0.5 y 1 U/kg de conjugado de insulina II- 2 en minicerdos diabéticos y normales.

Figura 59: Gráficos de niveles de glucosa en suero después de inyecciones intravenosas de RHI y conjugados I- 6, II- 3 y II- 2 en minicerdos con y sin infusión de a- MM.

Figura 60: Estructuras de conjugados de insulina seleccionados (C3, C4 y C7) probados en minicerdos como controles, junto con conjugados de insulina I- 6, I- 12, II- 2 y II- 3. Como se describe en los ejemplos, estos conjugados fueron preparados con insulina humana recombinante tipo silvestre (ver Figura 63 para la estructura de insulina humana tipo silvestre). El esquema de la Figura 60 principalmente tiene la intención de representar una insulina humana tipo silvestre. Como se analiza en este documento, se debe entender que la presente divulgación también incluye, entre otras cosas, las versiones de estos y otros conjugados que incluyen una molécula de insulina diferente de insulina humana tipo silvestre.

Figura 61: Gráficos de niveles de glucosa en suero después de inyecciones intravenosas de RHI y conjugados de insulina I- 6, I- 12, II- 2 y C3 en minicerdos con y sin infusión de a- MM.

Figura 62: Gráficos de los niveles de glucosa en suero después de inyecciones intravenosas de RHI y conjugados de insulina C7, C4, II- 3 y II- 2 en minicerdos con y sin infusión de a- MM infusión.

Figura 63: Estructura de insulina humana tipo silvestre.

DESCRIPCION DETALLADA DE VARIAS REALIZACIONES

Esta solicitud se refiere a una serie de documentos incluyendo documentos de patentes y no relacionados con patentes. La totalidad de cada uno de estos documentos se incorpora en la presente por referencia.

En un aspecto, la divulgación proporciona métodos para controlar los perfiles farmacocinéticos (PK) y/o farmacodinámicos (PD) de la insulina en una forma que responda a las concentraciones sistémicas de un sacárido como la glucosa. Como se discutió en la presente, estos métodos se basan en parte en el descubrimiento que ciertos conjugados de la insulina sintéticos que incluyen ligandos sacaridos de alta afinidad (ej., ver aquellos en la Figura 1) exhiben perfiles PK/PD que responden a los cambios de concentración de sacáridos aún en ausencia de una molécula multivalente y exógena fijadora de sacáridos tal como Con A. Este hallazgo fue inesperado y constituyó una oportunidad sin precedentes para generar sistemas simples de la insulina sensibles a sacáridos libres de lectina. En otro aspecto, la divulgación proporciona conjugados de ejemplo y métodos para la fabricación de los mismos. En general, estos conjugados incluyen un fármaco y uno o más ligandos separados que incluyen un sacárido. En ciertas realizaciones, los ligandos son capaces de competir con un sacárido (por ejemplo, glucosa o manosa) para unirse a una molécula fijadora de sacáridos endógenos. En ciertas realizaciones, los ligandos son capaces de competir con la glucosa o manosa por la union a Con A. Como se explica en detalle más adelante, en ciertas realizaciones, los ligandos y el fármaco pueden ser unidos de manera covalente o no covalente a una estructura de conjugado. En ciertas realizaciones, la estructura no es polimérica. En ciertas realizaciones, un conjugado puede tener un índice de polidispersidad de uno y un peso molecular de menos de aproximadamente 20.000 Da. En ciertas realizaciones, el conjugado es de fórmula (I) o (II) como se define y describe en este documento. En ciertas realizaciones, el conjugado es de larga duración (es decir, presenta un perfil farmacocinético que es más sostenido que la insulina humana recombinante soluble o RHI).

Como se discutió en detalle más adelante, se debe entender que los métodos, conjugados y formulaciones que se describen en este documento no se limitan en forma alguna a la entrega de insulina y que pueden ser utilizados para liberar cualquier fármaco. También se debe entender que los métodos se pueden utilizar para liberar fármacos en respuesta a sacáridos diferentes de la glucosa. En particular, como se indica en los ejemplos, se ha mostrado que los conjugados de ejemplo responden a sacáridos exógenos tales como el alfa- metil manosa y L- fucosa. En ciertas realizaciones, esto puede utilizarse para preparar conjugados que pueden ser controlados por la administración de uno de estos sacáridos exógenos (es decir, en lugar de o además de ser controlados por las fluctuaciones en la glucosa endógena).

Conjugados

En un aspecto, la divulgación proporciona conjugados que comprenden un fármaco y un ligando que incluye un primer sacárido. El ligando (o ligandos cuando los conjugados incluyen más de un ligando) son tales que cuando el conjugado se administra a un mamífero al menos una propiedad farmacocinéticas o farmacodinámicas del conjugada es sensible a la concentración sérica de un segundo sacárido. En ciertas realizaciones, las PK y/o PD del conjugado son sensibles a la concentración sérica de un sacárido endógenos como la glucosa. En ciertas realizaciones, las propiedades PK y/o PD del conjugado son sensibles a la concentración sérica de un sacárido exógeno, por ejemplo, sin limitación, manosa, L- fucosa, N- acetil glucosamina y/o alfa- metil- manosa.

Como se discutió en detalle más adelante, en ciertas realizaciones, el ligando (s) y los fármacos puede unirse de manera covalente o no covalente a una estructura de conjugado.

En ciertas realizaciones, el peso molecular del conjugado en ausencia del fármaco es menor que aproximadamente 10.000 Da. Por ejemplo, el peso molecular del conjugado en ausencia del fármaco puede estar en el rango de 250 a 5.000 Da, de 450 a 3.500 Da, de 750 a 2.500 Da, o 900 a 2.000 Da.

En ciertas realizaciones, el peso molecular del conjugado que incluye el fármaco es menor que aproximadamente 20.000 Da. Por ejemplo, el peso molecular del conjugado que incluye el fármaco podría estar en el rango de 2.000 a 18.000 Da, aproximadamente 4.000 a 15.000 Da, aproximadamente 5.000 a 10.000 Da, o aproximadamente 6.500 a 8.000 Da.

En ciertas realizaciones, el conjugado tiene un peso molecular único (es decir, tiene un índice de polidispersidad de uno).

PK y propiedades PD

En diversas realizaciones, el comportamiento farmacocinético y/o farmacodinámico de un conjugado (es decir, fármacos conjugado y/o fármaco que ha sido liberado a partir de un conjugado mediante degradación química o enzimática) puede ser modificado por variaciones en la concentración sérica de un sacárido.

Por ejemplo, desde el punto de vista farmacocinético (PK), la curva de concentración sérica puede desplazarse hacia arriba cuando la concentración sérica del sacárido (por ejemplo, glucosa) aumenta o cuando la concentración sérica del sacárido cruza un umbral (por ejemplo, es superior a los niveles normales de glucosa).

En ciertas realizaciones, la curva de concentración sérica de un conjugado es muy diferente cuando se administra a los mamíferos en condiciones de ayuno y de hiperglicemia. Tal como se utiliza en la presente, el término "sustancialmente diferente" significa que las dos curvas son estadísticamente diferentes según lo determinado por una prueba t de Student ($p < 0,05$). Tal como se utiliza en la presente, el término "condiciones de ayuno" significa que la curva de concentración sérica se obtuvo mediante la combinación de datos de cinco o más individuos en ayuno no diabéticos. En ciertas realizaciones, un individuo no diabético en ayuno es un humano de 18- 30 años seleccionado al azar que no presenta síntomas diabéticos en el momento de extraer la sangre y que no ha comido en las 12 horas previas a la extracción de la sangre. Tal como se usa aquí, el término "condiciones de hiperglicemia" significa que la curva de concentración sérica se obtuvo mediante la combinación de datos de cinco o más individuos no diabéticos en ayudo en los que las condiciones de hiperglicemia (glucosa Cmax por lo menos 100 mg/dl por encima de la concentración de glucosa media observada en condiciones de ayuno) fueron inducidas por la administración simultánea de conjugado y glucosa. La administración simultanea de conjugado y glucosa simplemente exige que la Cmax de glucosa se produzca durante el período en que el conjugado se presenta a un nivel detectable en el suero. Por ejemplo, una inyección de glucosa (o ingestión) puede ser programada para ocurrir un poco antes, al mismo tiempo o poco después de que el conjugado se administra. En ciertas realizaciones, el conjugado y la glucosa son administrados por vías diferentes o en diferentes lugares. Por

ejemplo, en ciertas realizaciones, el conjugado se administra por vía subcutánea, mientras que la glucosa se administra por vía oral o intravenosa.

En ciertas realizaciones, la Cmax sérica del conjugado es mayor en condiciones de hiperglicemia en comparación con condiciones de ayuno. Además, o alternativamente, en ciertas realizaciones, el área de suero bajo la curva (AUC) del conjugado es mayor en condiciones de hiperglicemia en comparación con condiciones de ayuno. En diversas realizaciones, la tasa de eliminación del suero del conjugado es más lenta en condiciones de hiperglicemia en comparación con condiciones de ayuno. Como se discutió en los ejemplos, hemos encontrado que en algunas realizaciones, la curva de concentración sérica de los conjugados pueden ser ajustada con un modelo bi- exponencial de dos compartimientos con una corta y una larga vida media. La larga vida media parece ser particularmente sensible a la concentración de glucosa. Así, en ciertas realizaciones, la larga vida media es más larga en condiciones de hiperglicemia en comparación con condiciones de ayuno. En ciertas realizaciones, las condiciones de ayuno implican una Cmax de glucosa inferior a 100 mg/dL (por ejemplo, 80 mg/ dl, 70 mg/dl, 60 mg/dl, 50 mg/dl, etc.) En ciertas realizaciones, las condiciones de hiperglicemia implican una Cmax de glucosa superior a 200 mg/dL (por ejemplo, 300 mg/dL y 400 mg/dL, 500 mg/dL y 600 mg/dl, etc.) Se apreciará que los demás parámetros PK, tales como tiempo medio de residencia en suero (MRT), tiempo medio de absorción de suero (MAT), etc se podrían utilizar en cambio de o junto con cualquiera de los parámetros antes mencionados.

El rango normal de las concentraciones de glucosa en los seres humanos, perros, gatos y ratas es de 60 a 200 mg/dL. Un experto en la técnica será capaz de extrapolar los siguientes valores para las especies con diferentes rangos normales (por ejemplo, el rango normal de las concentraciones de glucosa en cerdos miniatura es de 40 a 150 mg/dl). Las concentraciones de glucosa por debajo de 60 mg/dL se consideran hipoglucémicas. Las concentraciones de glucosa por encima de 200 mg/dL se consideran hiperglucémicas. En ciertas realizaciones, las propiedades PK del conjugado se pueden probar usando un método de la pinza eulucémica y la curva de la concentración sérica del conjugado puede ser muy diferente cuando se administra en las concentraciones de glucosa de 50 y 200 mg/dl, 50 y 300 mg/dL, 50 y 400 mg/dl, 50 y 500 mg/dl, 50 y 600 mg/dL, 100 y 200 mg/dL, 100 y 300 mg/dL, 100 y 400 mg/dL, 100 y 500 mg/dL, 100 y 600 mg/dL, 200 y 300 mg/dL, 200 y 400 mg/dL, 200 y 500 mg/dL, 200 y 600 mg/dL, etc. Además, o alternativamente, el suero T_{max}, suero C_{max}, tiempo medio de residencia

en suero (MRT), tiempo medio de absorción de suero (MAT) y/o vida media en suero puede ser sustancialmente diferente en las dos concentraciones de glucosa. Como se discute más adelante, en ciertas realizaciones, 100 mg/dL y 300 mg/dl pueden utilizarse como las concentraciones de glucosa comparativas. Se debe entender sin embargo, que la presente divulgación abarca cada una de estas realizaciones con un par de alternativo de las concentraciones de glucosa comparativas, incluyendo, sin limitación, cualquiera de los siguientes pares: 50 y 200 mg/dl, 50 y 300 mg/dl, 50 y 400 mg/dl, 50 y 500 mg/dl, 50 y 600 mg/dL, 100 y 200 mg/dL, 100 y 400 mg/dL, 100 y 500 mg/dL, 100 y 600, 200 mg/dL, y 300 mg/dL, 200 y 400 mg/dL, 200 y 500 mg/dL, 200 y 600 mg/dL, etc,

Así, en ciertas realizaciones, la Cmax del conjugado es mayor cuando se administra a los mamíferos en la mayor de las dos concentraciones de glucosa (por ejemplo, 300 frente a 100 mg de glucosa/dl). En ciertas realizaciones, la Cmax del conjugado es al menos el 50% (por ejemplo, por lo menos 100%, por lo menos 200% o por lo menos 400) superior cuando se administra a los mamíferos en la mayor de las dos concentraciones de glucosa (por ejemplo, 300 vs 100 mg de glucosa/dl).

En ciertas realizaciones, el AUC del conjugado es mayor cuando se administra a los mamíferos en la mayor de las dos concentraciones de glucosa (por ejemplo, 300 frente a 100 mg de glucosa / dl). En ciertas realizaciones, el AUC del conjugado es al menos el 50% (por ejemplo, al menos, por ejemplo, por lo menos 100%, por lo menos 200% o por lo menos 400%) superior cuando se administra al mamífero a la más alta de las dos concentraciones de glucosa (por ejemplo, 300 frente a 100 mg de glucosa/dl).

En ciertas realizaciones, la tasa de eliminación del suero del conjugado es más lenta cuando se administra a los mamíferos en la mayor de las dos concentraciones de glucosa (por ejemplo, 300 frente a 100 mg de glucosa/dl). En ciertas realizaciones, la tasa de eliminación del suero del conjugado es al menos el 25% (por ejemplo, al menos el 50%, por lo menos 100%, por lo menos 200%, o por lo menos 400%) más rápida cuando se administra al mamífero a la más baja de las dos concentraciones de glucosa (por ejemplo, 100 frente a 300 de glucosa en mg/dL).

Como se discutió en los ejemplos, se ha encontrado que en algunas realizaciones la curva de concentración sérica de los conjugados puede ajustarse con un modelo bi- exponencial de dos compartimentos con una corta y una larga vida media. La larga vida media parece ser particularmente sensible a la concentración de glucosa. Así, en ciertas realizaciones, la larga vida

media es más larga cuando se administra a los mamíferos en la mayor de las dos concentraciones de glucosa (por ejemplo, 300 frente a 100 mg de glucosa/dl). En ciertas realizaciones, la larga vida media es de al menos el 50% (por ejemplo, por lo menos 100%, por lo menos 200% o por lo menos 400>) mayor cuando se administra al mamífero en la mayor de las dos concentraciones de glucosa (por ejemplo, 300 frente a 100 mg/dl de glucosa).

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un método en el cual se obtiene la curva de concentración sérica de un conjugado en dos diferentes concentraciones de glucosa (por ejemplo, 300 frente a 100 mg de glucosa/dl), las dos curvas se ajustan mediante un modelo bi- exponencial de dos compartimientos con una corta y larga vida media, y las vidas medias largas obtenidas bajo las dos concentraciones de glucosa se comparan. En ciertas realizaciones, este método puede utilizarse como un ensayo para la prueba o la comparación de la sensibilidad a la glucosa de uno o más conjugados.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un método en el que las curvas de concentración sérica de un fármaco conjugado (por ejemplo, un conjugado de la insulina de la presente divulgación) y una versión no conjugada del fármaco (por ejemplo, RHI) se obtienen en las mismas condiciones (por ejemplo, condiciones de ayuno), las dos curvas se ajustan utilizando un modelo bi- exponencial de dos compartimientos con una corta y una larga vida media, y las largas vidas medias obtenidas para el fármaco conjugado y no conjugado se comparan. En ciertas realizaciones, este método puede utilizarse como un ensayo para la identificación de los conjugados que se eliminan más rápidamente que el fármaco no conjugado.

En ciertas realizaciones, la curva de concentración sérica de un conjugado es sustancialmente la misma que la curva de concentración sérica de una versión no conjugada del fármaco cuando se administra al mamífero en condiciones de hiperglicemia. Tal como se utiliza en la presente, el término "sustancialmente la misma" significa que no hay diferencia estadística entre las dos curvas según lo determinado por una prueba t de Student ($p > 0,05$). En ciertas realizaciones, la curva de concentración sérica del conjugado es sustancialmente diferente de la curva de concentración sérica de una versión no conjugada del fármaco cuando se administra en condiciones de ayunas. En ciertas realizaciones, la curva de concentración sérica del conjugado es sustancialmente la misma que la curva de concentración sérica de una versión no conjugada del fármaco cuando se administra en condiciones de hiperglicemia y sustancialmente diferente cuando se administra en ayunas.

En ciertas realizaciones, las condiciones de hiperglicemia implican una Cmax de glucosa superior a 200 mg/dL (por ejemplo, 300 mg/dL y 400 mg/dL, 500 mg/dL y 600 mg/dl, etc.) En ciertas realizaciones, las condiciones de ayuno implican una Cmax de glucosa inferior a 100 mg/dL (por ejemplo, 80 mg/dl, 70 mg/dl, 60 mg/dl, 50 mg/dl, etc.) Se puede apreciar que ninguno de los parámetros PK mencionados tales como suero T_{max}, suero C_{max}, AUC, tiempo medio de permanencia en suero (MRT), tiempo medio de absorción de suero (MAT) y/o vida media en suero pueden compararse.

Desde el punto de vista farmacodinámico (PD), la actividad biológica del conjugado puede ser mayor si aumenta la concentración de glucosa o cuando la concentración de glucosa cruza un umbral, por ejemplo, es más alta que los niveles de glucosa normales. En ciertas realizaciones, la bioactividad de un conjugado es menor cuando se administra en ayunas en comparación con las condiciones de hiperglicemia. En ciertas realizaciones, las condiciones de ayuno implican una Cmax de glucosa inferior a 100 mg/dL (por ejemplo, 80 mg/dl, 70 mg/dl, 60 mg /dl, 50 mg/dl, etc.) En ciertas realizaciones, las condiciones de hiperglicemia implican una Cmax de glucosa superior a 200 mg/dL (por ejemplo, 300 mg/dL y 400 mg/dL, 500 mg/dL y 600 mg/dl, etc.)

En ciertas realizaciones, las propiedades PD del conjugado pueden probarse mediante la medición de la tasa de infusión de glucosa (GIR) requerida para mantener una concentración de glucosa estable. De acuerdo con estas realizaciones, la actividad biológica del conjugado puede ser muy diferente cuando se administra en las concentraciones de glucosa de 50 y 200 mg/dl, 50 y 300 mg/dl, 50 y 400 mg/dl, 50 y 500 mg/dl, 50 y 600 mg/dl, 100 y 200 mg/dl, 100 y 300 mg/dl, 100 y 400 mg/dl, 100 y 500 mg/dl, 100 y 600 mg/dl, 200 y 300 mg/dl, 200 y 400 mg/dl, 200 y 500 mg/dl, 200 y 600 mg/dl, etc. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la bioactividad del conjugado es mayor cuando se administra al mamífero en la mayor de las dos concentraciones de glucosa (por ejemplo, 300 frente a 100 mg/dl de glucosa). En ciertas realizaciones, la bioactividad del conjugado es al menos el 25% (por ejemplo, al menos el 50% o por lo menos 100%) superior cuando se administra al mamífero en la mayor de las dos concentraciones de glucosa (por ejemplo, 300 frente a 100 mg / glucosa dL).

En ciertas realizaciones, el conjugado incluye una molécula de insulina como el fármaco. Según estas realizaciones, el comportamiento farmacodinámico de la insulina se puede observar al comparar el tiempo para alcanzar la concentración mínima de glucosa en sangre (T_{nadir}), la

duración que el nivel de glucosa en sangre se mantiene por debajo de un cierto porcentaje del valor inicial (por ejemplo, el 70% del valor inicial o $T_{70\% BGL}$), etc

En general, se apreciará que cualquiera de las características PK y PD discutidas en esta sección se puede determinar de acuerdo con cualquiera de una variedad de métodos publicados farmacocinéticos y farmacodinámicos (por ejemplo, ver Baudys et al, Bioconjugate Chem. 9:176- 183 de 1998 para los métodos adecuados para entrega por vía subcutánea). También se debe entender que las propiedades PK y/o PD pueden medirse en cualquier mamífero (por ejemplo, un ser humano, una rata, un gato, un minicerdo, un perro, etc.) En ciertas realizaciones, las propiedades PK y/o PD se miden en un ser humano. En ciertas realizaciones, las propiedades PK y/o PD se miden en una rata. En ciertas realizaciones, las propiedades PK y/o PD se miden en un minicerdo. En ciertas realizaciones, las propiedades PK y/o PD se miden en un perro.

También se aprecia que mientras lo anterior se ha descrito en el contexto de conjugados sensibles a glucosa, las mismas propiedades y los ensayos se aplican a conjugados que son sensibles a otros sacáridos incluyendo sacáridos exógenos, por ejemplo, la manosa, L- fucosa, N-acetil glucosamina , alfa- metil- manosa, etc. Como se explica en más detalle a continuación y en los ejemplos, en cambio de comparar propiedades PK y/o PD bajo condiciones de ayuno y de hiperglicemia, las propiedades PK y/o PD se pueden comparar en condiciones de ayuno, con y sin administración del sacárido exógeno. Es de entenderse que los conjugados pueden ser diseñados de forma que respondan a los diferentes valores de C_{max} de un sacárido exógeno dado.

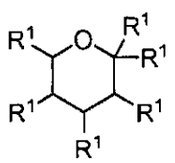
Ligando (s)

En general, los conjugados de insulina incluyen al menos un ligando. En ciertas realizaciones, los conjugados incluyen un único ligando. En ciertas realizaciones, los conjugados incluyen por lo menos dos ligandos separados, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más ligandos. Cuando más de un ligando está presente, los ligandos pueden tener las estructuras químicas iguales o diferentes.

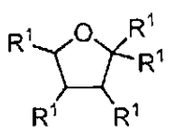
En ciertas realizaciones, los ligandos son capaces de competir con un sacárido (por ejemplo, glucosa o manosa) para unirse a una molécula endógena fijadora de sacáridos (por ejemplo, sin limitación proteínas surfactantes A y D o los miembros de la familia de las selectinas). En ciertas realizaciones, los ligandos son capaces de competir con un sacárido (por ejemplo, glucosa o manosa) por la unión a receptores de azúcar en la superficie celular (por

ejemplo, sin limitación receptores macrófagos de manosa, ligandos transportadores de glucosa, receptors de azúcares celulares endoteliales, o receptores de azúcares hepatocitos). En ciertas realizaciones, los ligandos son capaces de competir con la glucosa por la unión a una molécula fijadora de glucosa endógena (por ejemplo, sin limitación proteínas surfactantes A y D o los miembros de la familia de las selectinas). En ciertas realizaciones, los ligandos son capaces de competir con un sacárido por la unión a una lectina no humana (por ejemplo, Con A). En ciertas realizaciones, los ligandos son capaces de competir con la glucosa o manosa por la unión a una lectina no humana (por ejemplo, Con A). Las lectinas fijadoras de glucosa de ejemplo incluyen calnexina, calreticulina, receptor de N- acetilglucosamina, selectina, receptor de asialoglicoproteína, colectina (lectina fijadora de manosa), receptor de manosa, aggrecan, versicano, pisum sativum aglutinina (PSA), lectina Vicia faba, lectina Lens culinaris, lectina de la soja, lectina de cacahuete, lathyrus ochrus lectina, lectina esparceta, lectina Sophora japonica, bowringia milbraedii lectina, concanavalina A (Con A) y mitógeno de hierba carmín.

En ciertas realizaciones, el ligando es de fórmula (IIIa) o (IIIb):



IIIa



IIIb

en donde:

cada R^1 es independientemente hidrógeno, - OR^y, - $N(R^y)_2$, - SR^y, - O- Y, - G- Z, o - CH_2R^X;

cada R^x es independientemente hidrógeno, - OR^y, - $N(R^y)_2$, - SR^y, o - O- Y;

cada R^y es independientemente - R^2, - $S0_2R^2$, - $S(O)R^2$, - $P(O)(OR^2)_2$, - $C(O)R^2$, - $C0_2R^2$, o - $C(O)N(R^2)_2$;

cada Y es independientemente un monosacárido, disacárido, o trisacárido;

cada G es independientemente un enlace covalente o un C_{1-9} alquileno opcionalmente sustituido, en donde una o más unidades de metileno de G es opcionalmente reemplazada por - O- , - S- , - $N(R^2)$ - , - C(O) - , - OC(O) - , - C(O)O- - $C(O)N(R^2)$ - , - $N(R^2)C(O)$ - , - $N(R^2)C(O)N(R^2)$ - , - SO_2- - $SO_2N(R^2)$- , - $N(R^2)SO_2$- , o - $N(R^2)SO_2N(R^2)$- ;

cada Z es independientemente halógeno, - $N(R^2)_2$, - OR^2, - SR^2, - N_3, - OCR^2, - $C0_2R^2$, - $C(O)R^2$, o -
OSO_2R^2; y

cada R^2 es independientemente hidrógeno o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado a partir C_{1-6} alifático, fenilo, un anillo heterocíclico de 4- 7 miembros que tiene 1 - 2 heteroátomos seleccionados a partir nitrógeno, oxigeno, o azufre, o un anillo heteroarilo monocíclico de 5- 6 miembros que tiene 1- 4 heteroátomos seleccionados a partir nitrógeno, oxigeno, o azufre.

En ciertas realizaciones, el ligando de la formula (IIIa) o (IIb) es un monosacárido. En ciertas realizaciones, el ligando es un disacárido. En ciertas realizaciones, el ligando es un trisacárido. En ciertas realizaciones, el ligando es un tetrasacárido. En ciertas realizaciones, el ligando comprende no más de un total de cuatro fracciones monosacáridas.

Como se definió generalmente antes, cada R^1 es independientemente hidrógeno, - OR^y, - $N(R^y)_2$, - SR^y, - O- Y, - G- Z, o - CH_2R^X. En ciertas realizaciones, R^1 es hidrógeno. En ciertas realizaciones, R^1 es - OH. En otras realizaciones, R^1 es - $NHC(O)CH_3$. En ciertas realizaciones, R^1 es - O- Y. En ciertas otras realizaciones, R^1 es - G- Z. En algunas realizaciones, R^1 es - CH_2OH. En otras realizaciones, R^1 es - CH_2- O- Y. En aún otras realizaciones, R^1 es - NH_2. Alguien con experiencia común en el estado de la técnica apreciará que cada sustituyente R^1 en la fórmula (IVa) o (IVb) puede ser de estereoquímica *(R)* o *(S)*.

Como se definió generalmente antes, cada R^x es independientemente hidrógeno, - OR^y, - $N(R^y)_2$, - SR^y, o - O- Y. En algunas realizaciones, R^x es hidrógeno. En ciertas realizaciones, R^x es - OH. En otras realizaciones, R^x es - O- Y.

Como se definió generalmente antes, cada R^y es independientemente - R^2, - SO_2R^2, - $S(O)R^2$, - $P(O)(OR^2)_2$, - $C(O)R^2$, - $C0_2R^2$, o - $C(O)N(R^2)_2$. En algunas realizaciones, R^y es hidrógeno. En otras realizaciones, R^y es - R^2. En algunas realizaciones, R^y es - $C(O)R^2$. En ciertas realizaciones, R^y es acetilo. En otras realizaciones, R^y es - SO_2R^2, - $S(O)R^2$, - $P(O)(OR^2)_2$, - $C0_2R^2$, o - $C(O)N(R^2)_2$.

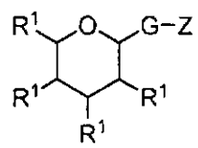
Como se definió generalmente antes, Y es un monosacárido, disacárido, o trisacárido. En ciertas realizaciones, Y es un monosacárido. En algunas realizaciones, Y es un disacárido. En otras realizaciones, Y es un trisacárido. En algunas realizaciones, Y es manosa, glucosa, fructosa, galactosa, ramnosa, o xilopiranosa. En algunas realizaciones, Y es sacarosa, malosa, turanosa,

trehalosa, celobiosa, o lactosa. En ciertas realizaciones, Y es manosa. En ciertas realizaciones, Y es D- manosa. Alguien con experiencia común en el estado de la técnica apreciará que el sacárido Y se une al grupo oxigeno de –O- Y a través de carbono anomérico para formar un enlace gicosídico. En enlace glicosídico puede ser de una configuración alfa o beta.

Como se definió generalmente antes, cada G es independientemente un enlace covalente o un C_{1-9} alquileno opcionalmente sustituido, en donde una o más unidades de metileno de G son opcionalmente reemplazadas por - O- , - S- , - $N(R^2)$ - , - C(O) - , - OC(O) - , - C(O)O- - $C(O)N(R^2)$ - , - $N(R^2)C(O)$ - , - $N(R^2)C(O)N(R^2)$ - , - SO2- , - $SO_2N(R^2)$- , - $N(R^2)SO_2$- o - $N(R^2)SO_2N(R^2)$- . En algunas realizaciones, G es un enlace covalente. En ciertas realizaciones, G es - O- C_{1-8} alquileno. En ciertas realizaciones, G es - OCH_2CH_2- .

Como se definió generalmente antes, cada Z es independientemente halógeno, - $N(R^2)_2$, - OR^2, - SR^2, - N_3, - $C{\equiv}CR^2$, - CO_2R^2, - $C(O)R^2$, o - OSO_2R^2. En algunas realizaciones, Z es un halógeno o - OSO_2R^2. En otras realizaciones, Z es - N_3 o - $C{=}C{\equiv}R^2$. En ciertas realizaciones, Z es - $N(R^2)_2$, - OR^2, o - SR^2. En ciertas realizaciones, Z es - SH. En ciertas realizaciones, Z es - NH_2. En ciertas realizaciones, - G- Z es - $OCH_2CH_2NH_2$.

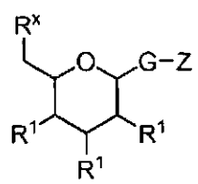
En algunas realizaciones, el sustituyente R^1 sobre el carbono C1 de la fórmula (IIIa) es - G- Z para proporcionar un compuesto de la fórmula (IIIa- z):



IIIa-*i*

en donde R^1, G, y Z son como se definieron y describieron en la presente.

En algunas realizaciones, el ligando es de la fórmula (IIIa- *ii*):

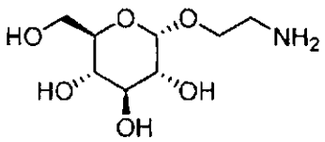


IIIa-*ii*

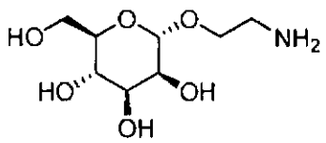
En donde R^1, R^x, G, y Z son como se definieron y describieron en la presente.

En ciertas realizaciones, el ligando (s) puede tener la misma estructura química que la glucosa o puede ser una especie químicamente relacionada de glucosa. En varias realizaciones, puede ser ventajoso para el ligando(s) tener una estructura química diferente a la glucosa, ej., con el fin a afinar la respuesta del conjugado a la glucosa. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, se puede utilizar un ligando que incluye glucosa, manosa, L- fucosa o derivados de estos (ej., alfa-L- fucopiranosida, mannosamina, mannosamina de N- acetilo beta enlazada, metilglucosa, metilmanosa, etilglucosa, etilmanosa, propilglucosa, propilmanosa, etc.) y/o combinaciones de mayor orden de estos (ej., una bimanosa, trimanosa lineal y/o ramificada, etc.).

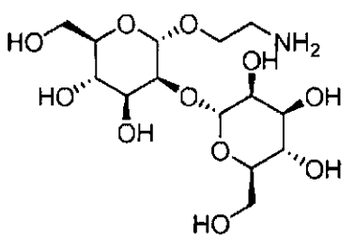
En ciertas realizaciones, el ligando incluye un monosacárido. En ciertas realizaciones, el ligando incluye un disacárido. En ciertas realizaciones, el ligando incluye un trisacárido. En algunas realizaciones, el ligando comprende un sacárido y uno o más grupos amina. En ciertas realizaciones el sacárido y grupo amina son separados por un grupo C_1- C_6 alquilo, ej., un grupo C_1- C_3 alquilo. En algunas realizaciones, el ligando es aminoetilglucosa (AEG). En algunas realizaciones, el ligando es aminoetilmanosa (AEM). En algunas realizaciones, el ligando es aminoetilbimanosa (AEBM). En algunas realizaciones, el ligando es aminoetiltrimanosa (AETM). En algunas realizaciones, el ligando es β- aminoetil- N- acetilglucosamina (AEGA). En algunas realizaciones, el ligando es aminoetilfucosa (AEF). En ciertas realizaciones, un ligando sacárido es de la configuración "D". En otras realizaciones, un ligando sacárido es de la configuración "L". Más adelante se muestran las estructuras de estos ligandos de ejemplo. Otros ligandos de ejemplo serán reconocidos por aquellos con experiencia en el estado de la técnica.



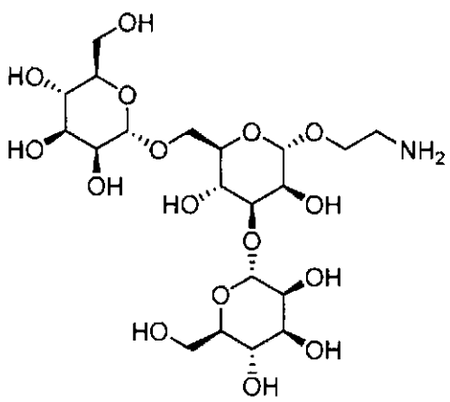
AEG



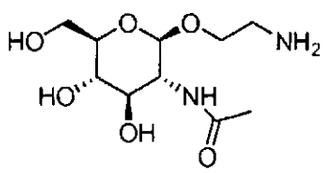
AEM



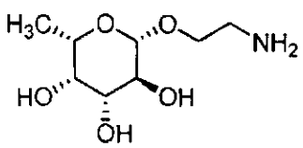
AEBM



AETM



AEGA



AEF

En general, los ligandos pueden ser directa o indirectamente conjugados (es decir, a través de un enlazador o estructura) al fármaco. Como se discutió más adelante, los ligandos pueden estar presentes dentro de una estructura conjugada (ej., como parte de un esqueleto polimérico o como un grupo secundario de un monómero). Alternativamente (o adicionalmente) los ligandos pueden ser artificialmente incorporados en una estructura conjugada (por ejemplo, en la forma de un grupo químico que se agrega de manera sintética a una estructura conjugada). En ciertas realizaciones, un conjugado puede incluir una estructura que comprende 5 o más, 10 o más, o 20 o más ligandos. En ciertas realizaciones, un conjugado puede comprender tan sólo 1, 2, 3, 4 o 5 ligandos por separado.

En ciertas realizaciones, por lo menos dos ligandos por separado se conjugan con el fármaco a través de diferentes puntos de conjugación. En ciertas realizaciones, por lo menos dos ligandos por separado se conjugan con una estructura única de conjugados que también es conjugado con el fármaco. En algunas realizaciones, al menos un ligando, como AETM, AEG, AEM, AEBM, AEGA, o AFI, se conjuga con una molécula de insulina. En ciertas realizaciones,

al menos un ligando AETM se conjuga con una molécula de insulina. En algunas realizaciones, por lo menos dos ligandos, como AETM, AEG, AEM, AEBM, AEGA, o AFI, se conjugan con una molécula de insulina, ya sea a través de un punto de conjugación o varios puntos de la conjugación. En ciertas realizaciones, al menos dos ligandos no son el mismo ligando. En ciertas realizaciones, al menos dos ligandos son el mismo ligando. En ciertas realizaciones, por lo menos dos ligandos AETM se conjugan con una molécula de insulina, ya sea a través de un punto de conjugación o varios puntos de la conjugación. Como se discutió en detalle más adelante en el contexto de ciertas estructuras de conjugados de ejemplo, en ciertas realizaciones, los ligandos separados y el fármaco (por ejemplo, una molécula de insulina) pueden localizarse en una ramificación separada de una estructura conjugada ramificada. Por ejemplo, los ligandos u fármaco pueden estar situados en los extremos de estas ramificaciones. En ciertas realizaciones una estructura conjugada hiperramificados puede ser utilizado. Estructuras de conjugados tanto poliméricos como no poliméricos están incluidos.

Métodos para conjugar ligandos con una estructura conjugada se describen con más detalle a continuación. En ciertas realizaciones, el sacárido dentro de uno o más ligandos se conjuga (directa o indirectamente mediante un conector) a través de la posición de C1, C2 o C6. En ciertas realizaciones, la conjugación implica la posición de C1. La posición C1 de un sacárido también se conoce como el carbono anomérico y puede ser conectado al fármaco o la estructura conjugada en la conformación alfa o beta. En ciertas realizaciones, la posición C1 se configura como el anómero alfa. En otras realizaciones, la posición C1 se configura como el anómero beta.

Fármaco

Se debe entender que un conjugado puede comprender cualquier fármaco. Un conjugado puede comprender más de una copia del mismo fármaco y/o puede comprender más de un tipo de fármaco. Los conjugados no se limitan a cualquier fármaco particular y pueden incluir fármacos de moléculas pequeñas o fármacos biomoleculares. En general, el fármaco utilizado dependerá de la enfermedad o trastorno a tratar. Tal como se utiliza en la presente, el término "fármaco" incluye las formas de sal y no sal del fármaco. Por ejemplo, el término "molécula de la insulina" abarca todas las formas de sal y no sal de la molécula de insulina. Se apreciará que la forma de sal pueden ser aniónica o catiónica dependiendo del fármaco.

Por ejemplo, sin limitación, en diversas realizaciones un conjugado puede comprender cualquiera de los siguientes fármacos: diclofenaco, nifedipina, rivastigmina, metilfenidato, fluoroxetina, rosiglitazona, prednisona, prednisolona, codeína, etilmorfina, dextrometorfano, noscapina, pentoxiverina, acetilcisteína, bromhexina, epinefrina, isoprenalina, orciprenalina, efedrina, fenoterol, rimiterol, ipratropio, colineteofilinato, proxifilina, beclometasona, budesonida, deslanosida, digoxina, digitoxina, disopiramida, Proscilaridina, cinidina, procainamida, mexiletina, flecainida, alprenolol, proproanolol, nadolol, pindolol, oxprenolol, labetalol, timolol, atenolol, pentaeritritiltetranitrato, isosorbiddinitrato, isosorbidmononitrato, nifedipina, fenilamina, verapamilo, diltiazem, ciclandelar, nicotinilalcolhol, inositolnicotinato, alprostatdil, etilefrina, prenalterol, dobutamina, dopamina guanetidina, dihidroergotamina, betanidina, metildopa, reserpina, guanfacina, trimetafán, hidralazina, dihidralazina, prazosina, diazoxid, captopril, nifedipina, enalapril, nitroprusiato, bendroflumetiazida, hidroclorotiazida, meticlotiazida, politiazida, clortalidon, cinetazon, clopamida, mefrusida, metolazona, bumetanida, etacinacida, espironolactona, amilorida, clofibrato, ácido nicotínico, nicheritrol, bromfeniramina, cinarizina, dexclorfeniramina, clemastina, antazolina, ciproheptadina, proethazina, cimetidina, ranitidina, sucralfat, papaverina, moxaverina, atropina, butilscopolamina, emepron, glucopirrona, hiosciamina, mepensolar, metilescopolamina, oxifenciclimina, probantelina, terodilina, senaglicosidas, sagradaextract, dantron, bisacodil , sodiopicosulfat, etulos, difenolxilato, loperamida, salazosulfapiridina, pirvina, mebendazol, dimeticon, ferrofumarato, ferrosucinato, ferritetrasemisodio, cianocobalamina, heparina de ácido folid, co- factor de heparina, diculmarola, warfarina, estreptoquinasa, uroquinasa, factor VIII, factor IX, vitamina K , tiopeta, busulfán, clorambucil, ciclofosfamida, melfalán, carmustina, mercatopurina, tioguanina, azatioprina, citarabina, vinblastina, vincristina, vindesina, procarbazina, dacarbazina, lomustina, estramustina, tenipósido, etopósido, cisplatino, amsacrina, aminoglutetimid, fosfestrol, medroxiprogresterona, hidroxiprogesterona, megesterol, noretisteron, tamoxifen, sulfosomidina, ciclosporina, bencilpenicilina, fenoximetilpenicilina, dicloxacilina, cloxacilina, flucoxacilina, ampicilina, amoxicilina, pivampicilina, bacampicilina, piperacilina, meziocilina, mecilinam, pivmecilinam, cefalotina, cefalexina, cefradin, cefadroxil, cefaclor, cefuroxima, cefotaxim , ceftazidim, cefoxitina, aztreonam, imipenem, cilastatina, tetraciclina, limeciclina, demeclociclina, metaciclina, oxitetraciclina, doxiciclina, cloranfenicol, espiramicina, ácido fusídico, lincomicina, clindamicina, espectinomicina, rifampicina,

anfotericina B, griseofulvina, nistatina, vancomicina, metronidazol, tinidazol , trimetoprim, norfloxacina, salazosulfapiridin, aminosalil, isoniazida, etambutol, nitrofurantoína, ácido nalidíxico, metanamina, cloroquina, hidroxicloroquin, tinidazol, cetoconazol, aciclovir, interferón idoxuridina, retinal, tiamina, dexpantenol, piridoxina, ácido fólico, ácido ascórbico, tocoferol, ftominadion , fenfluramina, corticotropina, tetracosactid, tirotropina, somatotoprina, somatrem, vasopresina, lipresina, desmopresina, oxitocina, cloriongonadotropina, cortisona, hidrocortisona, fluodrocortisona, prednisona, prednisolona, fluoximesterona, mesterolon, Nandrolon, estanozolol, oximetolon, ciproteron, levotiroxina, liotironina, propiltiouracilo, carbimazol, tiamazol, dihidrotaquisterol, alfacalcidol, calcitirol, insulina, tolbutamid, clorpropamid, tolazamid, glipizid, glibenclamid, metiprilona fenobarbital, piritiidion, meprobamat, clordiazepoxid, diazepam, nitrazepam, baclofeno, oxazepam, dicaliumclorazepat, lorazepam, flunitrazepam, alprazolam, midazolam, hidroxizina, dantroleno, clometiazol, propionmazina, alimemazina, clorpromazina, levomepromazina, acetofenazina, fiufenazina, perfenazina, proclorperazina, trifluoperazina, dixirazina, tiodirazina, periciazina, cloprotixeno, tizanidina, zaleplon, zuclopentizol, flupentizol, titixen, haloperidol, trimipramina, opipramol, clomipramina, desipramina, lofepramina, amitriptilina, nortriptilina, protriptilina, maptrotilina, cafeína, cinarizina, ciclizina, dimenhidinato, meclozina, prometazina, tietilperacina, metoclopramida, escopolamina, fenobarbital, fenitoína, etosuximida, primidona, carbamazepina, clonazepam, orfenadrina, atropina, bensatropina, biperideno, metixeno, procilidina, levodopa, bromocriptina, amantadina, ambenon, piridostigmina, sinstigmina, disulfiram, morfina, codeína, pentazocina, buprenorfina, petidina, fenoperidina, fentanilo, metadona, piritramida, dextropropoxifeno, cetobemidona, ácido acetilsalicílico, celecoxib, fenazona, fenilbutazona, azapropazona, piroxicam, ergotamina, dihidroergotamina ciproheptadina, pizitifen, flumedroxon, alopurinol, probenecid, sodiomaurotiomalato, auronofina, penicilamina, estradiol, estradiolvalerianato, estriol, etinilestradiol, dihidrogesteron, linestrenol, medroxiprogesterona, noretisterona, ciclofenilo, clomifeno, levonorgestrel, mestranol, ornidazol, tinidazol, ekonazol, clotrimazol, natamicina, miconazol, sulbentin, metilergotamina, dinoprost, dinoproston, gemeprost, bromocriptina, fenilpropanolamina, sodiocromoglicato, azetasolamida, diclofenamida, betacaroteno, naloxona, calciofolinato, en particular clonidina, tefilina, dipiradamol, hidroclotiazade, escopolamina, indometacina, furosemida, cloruro de potasio, morfina, ibuprofeno, salbutamol, terbutalina, calcitonina, etc. Se debe entender que esta lista

pretende ser de ejemplo y que cualquier fármaco, ya sea conocido o descubierto más tarde, se puede utilizar en un conjugado de la presente divulgación.

En diversas realizaciones, un conjugado puede incluir un fármaco hormonal que puede ser peptídico o no peptídico, por ejemplo, adrenalina, noradrenalina, angiotensina, atriopeptina, aldosterona, dehidroepiandrosterona, androstenediona, testosterona, dihidrotestosterona, calcitonina, calcitriol, calcidiol, corticotropina, cortisol, dopamina, estradiol, estrona, estriol, eritropoyetina, hormona folículo estimulante, gastrina, ghrelina, glucagon, hormona liberadora de gonadotropinas, hormona del crecimiento, hormona liberadora de hormona del crecimiento, gonadotropina coriónica humana, histamine, lactógeno de la placenta humana, insulina, factor de crecimiento tipo insulina, inhibina, leptina, un leucotrieno, lipotropina, melatonina, orexina, oxitocina, hormona paratiroidea, progesterona, prolactina, hormona liberadora de la prolactina, una prostglandina, renina, serotonina, secretina, somatostatina, trombopoyetina, hormona estimulante de la tiroides, hormona liberadora de tirotropina (o tirotropina), hormona liberadora de tirotropina, tiroxina, triyodotironina, vasopresina, etc. En ciertas realizaciones, la hormona se puede seleccionar de glucagon, insulina, factor de crecimiento tipo insulina, leptina, hormona estimulante de la tiroides, hormona liberadora de tirotropina (o tirotropina), hormona liberadora de tirotropina, tiroxina y triyodotironina. En ciertas realizaciones, el fármaco es factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF- 1). Se debe entender que esta lista pretende ser de ejemplo y que cualquier otro fármaco hormonal, ya sea conocido o descubierto más tarde, se puede utilizar en un conjugado de la presente divulgación.

En diversas realizaciones, un conjugado puede incluir una hormona tiroidea.

En diversas realizaciones, un conjugado puede incluir un fármaco contra la diabetes (es decir, un fármaco que tiene un efecto benéfico en pacientes que sufren de diabetes).

En diversas realizaciones, un conjugado puede incluir una molécula de insulina. Como se utiliza en la presente, el término "insulina" o "molécula de insulina" abarca todas las formas de sal y no sal de la molécula de insulina. Se apreciará que la forma de sal puede ser aniónica o catiónica dependiendo de la molécula de insulina. Por "insulina" o "una molécula de insulina" tenemos la intención de abarcar ambas la forma de tipo silvestre y la forma modificada de la insulina, siempre y cuando sean bioactivas (es decir, capaces de causar una reducción perceptible de la glucosa cuando se administra in vivo). Insulina tipo silvestre incluye la insulina de cualquier especie, ya sea en forma purificada, sintética o recombinante (por ejemplo, la insulina

humana, la insulina porcina, la insulina bovina, la insulina de conejo, la insulina ovina, etc.) Algunas de estas están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Sigma- Aldrich (St. Louis, MO). Una gran variedad de formas modificadas de la insulina son conocidos en la técnica (por ejemplo, ver Crotty y Reynolds, Pediatr. Emerg. Care. 23:903- 905, 2007 y Gerich, Am. J. Med. 113:308- 16, 2002 y referencias citadas en los mismos). Las formas modificadas de la insulina pueden modificarse químicamente (por ejemplo, mediante la adición de una fracción química tal como un grupo de PEG o una cadena de acilo graso como se describe a continuación) y/o mutarse (es decir, mediante la adición, supresión o sustitución de uno o más aminoácidos).

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación se diferencian de una insulina de tipo salvaje por 10- 10 (por ejemplo, 1- 9, 1- 8, 1- 7, 1- 6, 1- 5, 1- 4, 1- 3, 1- 2, 2- 9, 2- 8, 2- 7, 2- 6, 2- 5, 2- 4, 2- 3, 3- 9, 3- 8, 3- 7, 3 - 6, 3- 5, 3- 4, 4- 9, 4- 8, 4- 7, 4- 6, 4- 5, 5- 9, 5- 8, 5- 7, 5- 6, 6- 9, 6- 8, 6- 7, 7- 9, 7- 8, 8- 9, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1) sustituciones, adiciones y/o supresiones de aminoácidos,. En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación se diferenciará de una insulina tipo silvestre por sustituciones aminoácidas solamente. En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente invención se diferenciará de una insulina de tipo silvestre por adiciones aminoácidas solamente. En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente invención se diferenciará de una insulina de tipo silvestre por las dos sustituciones y adiciones aminoácidas. En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación se diferenciará de una insulina de tipo silvestre por las dos sustituciones y eliminaciones aminoácidas.

En ciertas realizaciones, las sustituciones aminoácidas pueden realizarse sobre la base de la similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilicidad, y/o la naturaleza anfipática de los residuos involucrados. En ciertas realizaciones, una sustitución puede ser conservadora, es decir, un aminoácido es sustituido por uno de forma y carga similares. Sustituciones conservadoras son bien conocidas en el estado de la técnica y por lo general incluyen sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina, valina, isoleucina, leucina, ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina, serina, treonina, lisina, arginina y tirosina, fenilalanina. En ciertas realizaciones, el índice hidrofóbico de los aminoácidos puede ser considerado en la elección de las mutaciones adecuadas. La importancia del índice aminoácido hidrofóbico de conferir función biológica interactiva sobre un polipéptido se entiende generalmente en el estado de la técnica. Por otra parte, la sustitución de aminoácidas

similares puede realizarse de manera efectiva sobre la base de hidrofilicidad. La importancia de la hidrofilicidad de conferir función biológica interactiva de un polipéptido se entiende generalmente en el estado de la técnica. El uso del índice hidrofóbico o hidrofilicidad en el diseño de polipéptidos se tratará adicionalmente en la Patente estadounidense. No. 5.691.198.

La secuencia tipo silvestre de insulina humana (cadena- A y cadena- B) se muestra a continuación y en la Figura 63.

Cadena- A (SEQ ID NOT): GIVEQCCTSICSLYQLENYCN

Cadena- B (SEQ ID NO:2): FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFFYTPKT

La insulina humana difiere de la insulina de conejo, porcina, bovina, y de oveja solamente en los aminoácidos A8, A9, A10, y B30 (ver tabla abajo).

Insulina	**La posición del aminoácido**			
	A8	**A9**	**A10**	**B30**
humano	Thr	Ser	Él	Thr
conejo	Thr	Ser	Mentira	Ser
porcino	Thr	Ser	Él	Ala
bovino	Ala	Ser	Val	Ala
Oveja	Ala	Gly	Val	Ala

En varias realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación es mutada en las posiciones B28 y/o B29 de the B- peptide sequence. Por ejemplo, la insulina lispro (HUMALOG®) es un mutante de insulina de acción rápida en el cual los penúltimos residuos de lisina y prolina sobre el extremo C- terminal del péptido- B han sido invertidos (lisina humana $Lys^{B28}Pro^{B29}$). Esta modificación bloquea la formación de multímeros de insulina. La insulina aspart (NovoLog ®) es otro mutante de insulina de acción rápida en el que la prolina en la posición B28 se ha sustituido por ácido aspártico (insulina humana- Asp^{B28}). Este mutante también previene la formación de multímeros. En algunas realizaciones, la mutación en las posiciones B28 y / o B29 se acompaña de una o más mutaciones en otras partes en el polipéptido de insulina. Por ejemplo, la insulina glulisina (Apidra ®) es otro mutante de insulina de acción rápida en la que el ácido aspártico en la posición B3 ha sido sustituido por un residuo de lisina y

la lisina en la posición B29 ha sido sustituida por un residuo de ácido glutámico ($Lys^{B3}Glu^{B29}$- insulina humana).

En diversas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación tiene un punto isoeléctrico que se desplaza en relación con la insulina humana. En algunas realizaciones, el cambio en el punto isoeléctrico se logra mediante la adición de uno o más residuos de arginina al extreme- N del peptido A de insulina y/o el extreme C del péptido B de insulina. Ejemplos de estos polipéptidos de insulina incluyen, insulina humana Arg^{A0}, insulina humana $Arg^{B31}Arg^{B32}$, insulina humana $Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$, insulina humana $Arg^{A0}Arg^{B31}Arg^{B32}$- , y la insulina humana $Arg^{A0}Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$. A modo de ejemplo adicional, la insulina glargina (Lantus ®) es un mutante insulina de acción prolongada de ejemplo en el que AspA21 ha sido sustituido por glicina, y dos residuos de arginina se han añadido al extremo- C del péptido B. El efecto de estos cambios es cambiar el punto isoeléctrico, la producción de una solución que es completamente soluble a pH 4. Por lo tanto, en algunas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende una secuencia de péptidos- A en donde A21 es Gly y secuencia de péptidos- B en la que B31 es Arg- Arg. Es de entenderse que la presente divulgación abarca todas las combinaciones únicas y múltiples de estas mutaciones y las otras mutaciones que se describen en este documento (por ejemplo, insulina humana- Gly^{A21}, insulina humana $Gly^{A21}Arg^{B31}$, insulina humana $Arg^{B31}Arg^{B32}$, insulina humana Arg^{B31}).

En diversas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación se trunca. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, una secuencia de péptidos- B de un polipéptido de insulina de la presente invención está omitiendo Bl, B2, B3, B26, B27, B28, B29 y/o B30. En ciertas realizaciones, las combinaciones de los residuos no se encuentran en la secuencia de péptidos B del polipéptido de insulina de la presente divulgación. Por ejemplo, la secuencia de péptidos B pueden ser residuos que faltan B (l- 2), B (l- 3), B (29- 30), B (28- 30), B (27- 30) y/o B (26- 30). En algunas realizaciones, las supresiones y/o truncamientos se aplican a cualquiera de las moléculas de insulina antes mencionadas (por ejemplo, pero sin limitarse a producir des (B30)- insulina lispro, des (B30) de la insulina aspart, des (B30) de la insulina glulisina, des (B30)- insulina glargina, etc.)

En algunas realizaciones, una molécula de insulina contiene otros residuos aminoácidos en el extremo- N- o - C de las secuencias de péptidos A o B. En algunas realizaciones, uno o más residuos de aminoácidos se encuentran en las posiciones A0, A21, B0 y/o B31. En algunas

realizaciones, uno o más residuos aminoácidos se encuentran en la posición A0. En algunas realizaciones, uno o más residuos aminoácidos se encuentran en la posición A21. En algunas realizaciones, uno o más residuos aminoácidos se encuentran en la posición de BO. En algunas realizaciones, uno o más residuos aminoácidos se encuentran en la posición B31. En ciertas realizaciones, una molécula de insulina no incluye los residuos de otros aminoácidos en las posiciones A0, A21, B31 o B0.

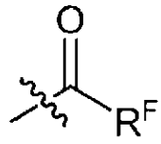
En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación es mutada de tal manera que uno o más aminoácidos amidados se sustituyen por formas ácidas. Por ejemplo, la asparagina puede ser reemplazada por ácido aspártico o ácido glutámico. Del mismo modo, la glutamina puede ser reemplazada por ácido aspártico o ácido glutámico. En particular, Asn^{A18}, Asn^{A21}, o Asn^{B3}, o cualquier combinación de estos residuos, puede ser reemplazado por ácido aspártico o ácido glutámico. Gln^{A15} o Gln^{B4}, o ambos, podrán ser sustituidos por ácido aspártico o ácido glutámico. En algunas realizaciones, una molécula de insulina tiene ácido aspártico en la posición A21 o el ácido aspártico en la posición B3, o ambos.

Un experto en el estado de la técnica reconocerá que es posible mutar sin embargo, otros aminoácidos en la molécula de insulina, manteniendo la actividad biológica. Por ejemplo, sin limitación, las siguientes modificaciones también son ampliamente aceptadas en el estado de la técnica: la sustitución del residuo de histidina de la posición B10 con ácido aspártico (His^{B10}- - > Asp^{B10}), la sustitución del residuo de fenilalanina en la posición B1 con ácido aspártico (Phe^{B1}- - > Asp^{B1}), la sustitución del residuo de treonina en la posición B30 por alanina (Thr^{B30}- > Ala^{B30}), la sustitución de los residuos de tirosina en la posición B26 por alanina (Tyr^{B26}- > Ala^{B26}), y la sustitución del residuo de serina en la posición B9 por ácido aspártico (Ser^{B9} - > Asp^{B9}).

En varias realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación tiene un perfil de acción prolongada. Así, en ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación puede ser acilada con un ácido graso. Es decir, un enlace amida se forma entre un grupo amina en la molécula de insulina y el grupo de ácido carboxílico del ácido graso. El grupo amino puede ser el grupo alfa- amino de un aminoácido N- terminal de la molécula de insulina, o puede ser el grupo épsilon- amino de un residuo de lisina de la molécula de insulina. Una molécula de insulina de la presente divulgación puede ser acilada en uno o más de los tres grupos amino que están presentes en la insulina tipo silvestre o pueden ser acilados sobre el residuo de lisina que se ha introducido en la secuencia de tipo silvestre. En ciertas realizaciones, una

molécula de insulina puede ser acilada en la posición Bl. En ciertas realizaciones, una molécula de insulina puede ser acilada en la posición B29. En ciertas realizaciones, el ácido graso se selecciona a partir del ácido mirístico (C14), ácido pentadecílico (C15), el ácido palmítico (C16), ácido heptadecílico (C17) y el ácido esteárico (C18). Por ejemplo, la insulina detemir (Levemir ®) es un mutante de insulina de acción prolongada en el que Thr^{B30} se ha eliminado, y una cadena de ácidos grasos C14 (ácido mirístico) se ha unido a LysB29.

En algunas realizaciones, el extremo- N del péptido- A, el extremo- N del péptido- B, el grupo épsilon- amino de Lys en la posición B29 o cualquier otro grupo amino disponible en una molécula de insulina de la presente divulgación está covalentamente unido a una fracción de ácido graso de la fórmula general:



en donde R^F es hidrógeno o un grupo C_{1-30} alquilo. En algunas realizaciones, R^F es un grupo C_{1-20} alquilo, un grupo C_{3-19} alquilo, un grupo C_{5-18} alquilo, un grupo C_{6-17} alquilo, un grupo C_{5-16} alquilo, un grupo C_{10-15} alquilo, o un grupo C_{12-14} alquilo. En ciertas realizaciones, el polipéptido de insulina se conjuga a la fracción en la posición Al. En ciertas realizaciones, el polipéptido de insulina se conjuga a la fracción en la posición Bl. En ciertas realizaciones, el polipéptido de insulina se conjuga a la fracción en el grupo épsilon- amino de Lys en la posición B29. En ciertas realizaciones, la posición B28 de la molécula de insulina es Lys y el grupo épsilon- amino de Lys^{B28} se conjuga a la fracción de ácido graso. En ciertas realizaciones, la posición B3 de la molécula de insulina es Lys y el grupo épsilon- amino de Lys^{B3} se conjuga a la fracción de ácido graso. En algunas realizaciones, la cadena de ácidos grasos tiene 80- 20 carbonos de longitud. En algunas realizaciones, el ácido graso es ácido octanoico (C8), ácido nonanoico (C9), ácido decanoico (C1O), ácido undecanoico (C11), ácido dodecanoico (C12), o ácido tridecanoico (C13). En ciertas realizaciones, el ácido graso es el ácido mirístico (C14), ácido pentadecanoico (C15), ácido palmítico (C16), ácido heptadecanoico (C17), ácido esteárico (C18), ácido nonadecanoico (C19), o ácido araquídico (C20).

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina:

$Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana (insulina lispro), Asp^{B28}- insulina humana (insulina aspart), $Lys^{B3}Glu^{B29}$- insulina humana (insulina glulisina), $Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana (insulina glargina), $N^{\varepsilon B29}$- miristoil- des(B30)- insulina humana (insulina detemir), Ala^{B26}- insulina humana, Asp^{B1}- insulina humana, Arg^{A0}- insulina humana, $Asp^{B1}Glu^{B13}$- insulina humana, Gly^{A21}- insulina humana, $Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana, $Arg^{A0}Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana, $Arg^{A0}Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana, des(B30)- insulina humana, des(B27)- insulina humana, des(B28- B30)- insulina humana, des(Bl)- insulina humana, des(Bl- B3)- insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$- palmitoil- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- mirisotil- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- palmitoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- miristoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$- palmitoil- des(B30)- insulina humana, $N^{\varepsilon B30}$- miristoil- $Thr^{B29}Lys^{B30}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B30}$- palmitoil- $Thr^{B29}Lys^{B30}$- insulina humana, N^{sB29}- (N- palmitoil- y- glutamil)- des(B30)- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- (N- litocolil- y- glutamil)- des(B30)- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- (co-carboxiheptadecanoil)- des(B30)- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- (ω- carboxiheptadecanoil)- insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$- octanoil- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- miristoil- $Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B31}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- miristoil- $Gly^{A21}Gln^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- miristoil- $Arg^{A0}Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- $Arg^{A0}Gly^{A21}Gln^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- miristoil- $Arg^{A0}Gly^{A21}Asp^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- miristoil- $Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- miristoil- $Arg^{A0}Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- octanoil- $Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- octanoil- $Gly^{A21}Gln^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- octanoil- $Arg^{A0}Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- octanoil- $Arg^{A0}Gly^{A21}Gln^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- octanoil-

$Arg^{B0}Gly^{A21}Asp^{B3}Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- octanoil- $Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- octanoil- $Arg^{A0}Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de uno de los siguientes polipéptidos de insulina: N^{B28}- miristoil- $Gly^{A21}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- miristoil- $Gly^{A21}Gln^{B3}Lys^{B28}Pro^{B30}Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- miristoil- $Arg^{A0}Gly^{A21}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- miristoil- $Arg^{A0}Gly^{A21}Gln^{B3}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- miristoil- $Arg^{A0}Gly^{A21}Asp^{B3}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- miristoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- miristoil- $arg^{A0}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- octanoil- $Gly^{A21}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B28}$- octanoil- $Gly^{A21}Gln^{B3}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- octanoil- $Arg^{A0}Gly^{A21}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- octanoil- $Arg^{A0}Gly^{A21}Gln^{B3}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- octanoil- $Arg^{A0}Gly^{A21}Asp^{B3}Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- octanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- octanoil- $arg^{A0}Lys^{B29}Pro^{B29}Arg^{B31}Arg^{B32}$ - insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$- tridecanoil- des(B30)- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- tetradecanoil- des(B30)- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- decanoil- des(B30)- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- dodecanoil- des(B30)- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- tridecanoil- Gly^{A21}- des(B30)- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- tetradecanoil- Gly^{A21}- des(B30)- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- decanoil- Gly^{A21}- des(B30)- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- dodecanoil- Gly^{A21}- des(B30)- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- tridecanoil- $Gly^{A21}Gln^{B3}$- des(B30)- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- tetradecanoil- $Gly^{A21}Gln^{B3}$- des(B30)- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- decanoil- Gly^{A21}- Gln^{B3}- des(B30)- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- dodecanoil- Gly^{A21}- Gln^{B3}- des(B30)- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- tridecanoil- Ala^{A21}- des(B30)- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- tetradecanoil- Ala^{A21}- des(B30)- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- decanoil- Ala^{A21}- des(B30)- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- dodecanoil- Ala^{A21}-

des(B30)- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- tridecanoil- Ala^{A21}- Gln^{B3}- des(B30)- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- tetradecanoil- $Ala^{A21}Gln^{B3}$- des(B30)- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- decanoil- $Ala^{A21}Gln^{B3}$- des(B30)- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- dodecanoil- $Ala^{A21}Gln^{B3}$- des(B30)- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- tridecanoil- Gln^{B3}- des(B30)- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- tetradecanoil- Gln^{B3}- des(B30)- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- decanoil- Gln^{B3}- des(B30)- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- dodecanoil- Gln^{B3}- des(B30)- insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$- tridecanoil- Gly^{A21}- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- tetradecanoil- Gly^{A21}- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- decanoil- Gly^{A21}- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- dodecanoil- Gly^{A21}- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- tridecanoil- Ala^{A21}- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- tetradecanoil- Ala^{A21}- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- decanoil- Ala^{A21}- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- dodecanoil- Ala^{A21} - insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$- tridecanoil- $Gly^{A21}Gln^{B3}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- tetradecanoil- $Gly^{A21}Gln^{B3}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$ decanoil- $Gly^{A21}Gln^{B3}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- dodecanoil- $Gly^{A21}Gln^{B3}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- tridecanoil- $Ala^{A21}Gln^{B3}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- tetradecanoil- $Ala^{A21}Gln^{B3}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- decanoil- $Ala^{A21}Gln^{B3}$ - insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- dodecanoil- $Ala^{A21}Gln^{B3}$- insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$- tridecanoil- Gln^{B3}- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- tetradecanoil- Gln^{B3}- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- decanoil- Gln^{B3}- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- dodecanoil- Gln^{B3}- insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$- tridecanoil- Glu^{B30}- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- tetradecanoil- Glu^{B30}- insulina humana, $N^{\pounds B29}$- decanoil- Glu^{B30}- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- dodecanoil- Glu^{B30}- insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$- tridecanoil- $Gly^{A21}Glu^{B30}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- tetradecanoil- $Gly^{A21}Glu^{B30}$- insulina

humana, $N^{\varepsilon B29}$- decanoil- $Gly^{A21}Glu^{B30}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- dodecanoil- $Gly^{A21}Glu^{B30}$- insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$- tridecanoil- $Gly^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- tetradecanoil- $Gly^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- decanoil- $Gly^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- dodecanoil- $Gly^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- tridecanoil- $Ala^{A21}Glu^{B30}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- tetradecanoil- $Ala^{A21}Glu^{B30}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- decanoil- $Ala^{A21}Glu^{B30}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- dodecanoil- $Ala^{A21}Glu^{B30}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- tridecanoil- $Ala^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- tetradecanoil- $Ala^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- decanoil- $Ala^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- dodecanoil- $Ala^{A21}Gln^{B3}Glu^{B30}$- insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$- tridecanoil- $Gln^{B3}Glu^{B30}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- tetradecanoil- $Gln^{B3}Glu^{B30}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- decanoil- $Gln^{B3}Glu^{B30}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- dodecanoil- $Gln^{B3}Glu^{B30}$- insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$- formil- insulina humana, $N^{\alpha B1}$- formil- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- formil- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- formil- $N^{\alpha B1}$- formil- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- formil- $N^{\alpha A1}$- formil- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- formil- $N^{\alpha B1}$- formil- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- formil- $N^{\alpha A1}$- formil- $N^{\alpha B1}$- formil- insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$ acetil- insulina humana, $N^{\alpha B1}$- acetil- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- acetil- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- acetil- $N^{\alpha B1}$- acetil- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- acetil- $N^{\alpha A1}$- acetil- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- acetil- $N^{\alpha B1}$- acetil- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- acetil- $N^{\alpha A1}$- acetil- $N^{\alpha B1}$- acetil- insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina:

$N^{\varepsilon B29}$- propionil- insulina humana, $N^{\alpha B1}$- propionil- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- propionil- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- acetil- $N^{\alpha B1}$- propionil- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- propionil- $N^{\alpha A1}$- propionil- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- propionil- $N^{\alpha B1}$- propionil- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- propionil- $N^{\alpha A1}$- propionil- $N^{\alpha B1}$- propionil- insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$- butiril- insulina humana, $N^{\alpha B1}$- butiril- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- butiril- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- butiril- $N^{\alpha B1}$- butiril- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- butiril- $N^{\alpha A1}$- butiril- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- butiril- $N^{\alpha B1}$- butiril- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- butiril- $N^{\alpha A1}$- butiril- $N^{\alpha B1}$- butiril- insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$- pentanoil- insulina humana, $N^{\alpha B1}$- pentanoil- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- pentanoil- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- pentanoil- $N^{\alpha B1}$- pentanoil- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- pentanoil- $N^{\alpha A1}$- pentanoil- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- pentanoil- $N^{\alpha B1}$- pentanoil- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- pentanoil- $N^{\alpha A1}$- pentanoil- $N^{\alpha B1}$- pentanoil- insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$- hexanoil- insulina humana, $N^{\alpha B1}$- hexanoil- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- hexanoil- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- hexanoil- $N^{\alpha B1}$- hexanoil- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- hexanoil- $N^{\alpha A1}$- hexanoil- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- hexanoil- $N^{\alpha B1}$- hexanoil- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- hexanoil- $N^{\alpha A1}$- hexanoil- $N^{\alpha B1}$- hexanoil- insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$- heptanoil- insulina humana, $N^{\alpha B1}$- heptanoil- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- heptanoil- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- heptanoil- $N^{\alpha B1}$- heptanoil- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- heptanoil- $N^{\alpha A1}$- heptanoil- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- heptanoil- $N^{\alpha B1}$- heptanoil- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- heptanoil- $N^{\alpha A1}$- heptanoil- $N^{\alpha B1}$- heptanoil- insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\alpha B1}$- octanoil- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- octanoil- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- octanoil- $N^{\alpha B1}$- octanoil-

insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- octanoil- $N^{\alpha A1}$- octanoil- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- octanoil- $N^{\alpha B1}$- octanoil- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- octanoil- $N^{\alpha A1}$- octanoil- $N^{\alpha B1}$- octanoil- insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$- nonanoil- insulina humana, $N^{\alpha B1}$- nonanoil- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- nonanoil- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- nonanoil- $N^{\alpha B1}$- nonanoil- insulia humana, $N^{\varepsilon B29}$- nonanoil- $N^{\alpha A1}$- nonanoil- insulina humana, $N^{\alpha A1}$ - nonanoil- $N^{\alpha B1}$ - nonanoil- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- nonanoil- $N^{\alpha A1}$- nonanoil- $N^{\alpha B1}$ - nonanoil- insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$- decanoil- insulina humana, $N^{\alpha B1}$- decanoil- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- decanoil- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- decanoil- $N^{\alpha B1}$- decanoil- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- decanoil- $N^{\alpha A1}$- decanoil- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- decanoil- $N^{\alpha B1}$ - decanoil- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- decanoil- $N^{\alpha A1}$- decanoil- $N^{\alpha B1}$ - decanoil- insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: N^{sB28}- formil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\alpha B1}$- formil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- formil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- formil- $N^{\alpha A1B1}$- formil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- formil- $N^{\alpha A1}$- formil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- formil- $N^{\alpha B1}$- formil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- humai insulina, $N^{\varepsilon B28}$- formil- $N^{\alpha A1}$- formil- $N^{\alpha B1}$- formil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- acetil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\alpha B1}$- acetil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- acetil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- acetil- $N^{\alpha B1}$- acetil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B28}$- acetil- $N^{\alpha A1}$- acetil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- acetil- $N^{\alpha B1}$- acetil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- acetil- $N^{\alpha A1}$- acetil- $N^{\alpha B1}$- acetil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina:

$N^{\varepsilon B28}$- propionil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\alpha B1}$- propionil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- propionil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- propionil- $N^{\alpha B1}$- propionil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- propionil- $N^{\alpha A1}$- propionil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- propionil- $N^{\alpha B1}$- propionil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- propionil- $N^{\alpha A1}$- propionil- $N^{\alpha B1}$- propionil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B28}$ butiril- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\alpha B1}$- butiril- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- butiril- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- butiril- $N^{\alpha B1}$- butiril- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- butiril- $N^{\alpha A1}$- butiril- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- butiril- $N^{\alpha B1}$- butiril- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- butiril- $N^{\alpha A1}$- butiril- $N^{\alpha B1}$- butiril- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B28}$- pentanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\alpha B1}$- pentanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- pentanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- pentanoil- $N^{\alpha B1}$- pentanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- pentanoil- $N^{\alpha A1}$- pentanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- pentanoil- $N^{\alpha A1}$- pentanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- pentanoil- $N^{\alpha A1}$- pentanoil- $N^{\alpha B1}$- pentanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B28}$- hexanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\alpha B1}$- hexanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- hexanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- hexanoil- $N^{\alpha B1}$ - hexanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- hexanoil- $N^{\alpha A1}$- hexanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- hexanoil- $N^{\alpha A1}$- hexanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- hexanoil- $N^{\alpha A1}$- hexanoil- $N^{\alpha B1}$- hexanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B28}$- heptanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\alpha B1}$- heptanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\wedge 1}$- heptanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- heptanoil- $N^{\alpha B1}$- heptanoil-

$Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- heptanoil- $N^{\alpha A1}$- heptanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- heptanoil- $NO^{\alpha B1}$- heptanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- heptanoil- $N^{\alpha A1}$- heptanoil- $N^{\alpha B1}$- heptanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B28}$- octanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\alpha B1}$- octanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- octanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- octanoil- $N^{\alpha B1}$- octanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- octanoil- $N^{\alpha A1}$- octanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- octanoil- $N^{\alpha A1}$- octanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- octanoil- $N^{\alpha A1}$- octanoil- $N^{\alpha B1}$- octanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B28}$- nonanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\alpha B1}$- nonanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\alpha A1}$ nonanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- nonanoil- $N^{\alpha B1}$- nonanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- nonanoil- $N^{\alpha A1}$- nonanoil- $Lys^{B28}Pro^{829}$- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- nonanoil- $N^{\alpha B1}$- nonanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- nonanoil- $N^{\alpha A1}$- nonanoil- $N^{\alpha B1}$- nonanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B28}$- decanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\alpha B1}$- decanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- decanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- decanoil- $N^{\alpha B1}$- decanoil- $Lys^{828}Pro^{829}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- decanoil- $N^{\alpha A1}$- decanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- decanoil- $N^{\alpha B1}$- decanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B28}$- decanoil- $N^{\alpha A1}$- decanoil- $N^{\alpha B1}$- decanoil- $Lys^{B28}Pro^{B29}$- insulina humana.

En ciertas realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación comprende las mutaciones y/o modificaciones químicas de una de las siguientes moléculas de insulina: $N^{\varepsilon B29}$- pentanoil- Gly^{A21} Arg^{831} Arg^{B32}- insulina humana, $N^{\alpha B1}$- hexanoil- Gly^{A21} $Arg^{\alpha B1}$ Arg^{B32}- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- heptanoil- $Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- octanoil- $N^{\alpha B1}$- octanoil- $Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- propionil- $N^{\alpha A1}$- propionil- $Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana, $N^{\alpha B1}$- acetil- $N^{\alpha B1}$- acetil- $Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$-

insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- formil- $N^{\alpha A1}$- formil- $N^{\alpha B1}$- formil- $Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- formil- des(B26)- insulina humana, $N^{\alpha B1}$- acetil- Asp^{B28}- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- propionil- $N^{\alpha A1}$- propionil- $N^{\alpha B1}$- propionil- $Asp^{81}Asp^{83}AspB^{21}$- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- pentanoil- Gly^{A21}- insulina humana, $N^{\alpha B1}$- hexanoil- Gly^{A21}- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- heptanoil- Gly^{A21}- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- octanoil- $N^{\alpha B1}$- octanoil- Gly^{A21}- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- propionil- $N^{\alpha A1}$- propionil- Gly^{A21}- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- acetil- $N^{\alpha B1}$- acetil- Gly^{A21}- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- formil- $N^{\alpha A1}$- formil- $N^{\alpha B1}$- formil- Gly^{A21}- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- butiril- des(B30)- insulina humana, $N^{\alpha B1}$- butiril- des(B30)- insulina humana, $N^{\alpha A1}$- butiril- des(B30)- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- butiril- $N^{\alpha B1}$- butiril- des(B30)- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- butiril- $N^{\alpha A1}$- butiril- des(B30)- insulina humana, N- butiril- $N^{\alpha B1}$- butiril- des(B30)- insulina humana, $N^{\varepsilon B29}$- butiril- $N^{\alpha A1}$- butiril- $N^{\alpha B1}$- butiril- des(B30)- insulina humana.

La presente divulgación también comprende formas modificadas de insulinas no humanas (por ejemplo, insulina porcina, insulina bovina, insulina de conejo, insulina ovina, etc) que comprenden cualquiera de las mutaciones y/o modificaciones químicas mencionadas. Estas y otras moléculas de insulina modificadas se describen en detalle en la patente estadounidense. N ° 6.906.028, 6.551.992, 6.465.426, 6.444.641, 6.335.316, 6.268.335, 6.051.551, 6.034.054, 5.952.297, 5.922.675, 5.747.642, 5.693.609, 5.650.486, 5.547.929, 5.504.188, 5.474.978, 5.461.031, y 4.421.685, y en la Patente estadounidense N ° 7.387.996; 6.869.930; 6.174.856; 6.011.007; 5.866.538 y 5.750.497, las descripciones completas de las cuales se incorporan por referencia.

En varias realizaciones, una molécula de insulina de la presente divulgación incluye los tres puentes de disulfuro tipo silvestre (es decir, uno entre la posición 7 de la A- cadena y la posición 7 de la cadena B, un segundo entre la posición 20 de la cadena A- y la posición 19 de la cadena B, y el tercero entre las posiciones 6 y 11 de la cadena A-).

En algunas realizaciones, una molécula de insulina se ha modificado y/o mutado para reducir su afinidad por el receptor de la insulina. Sin querer estar vinculado a una teoría particular, se cree que la atenuación de la afinidad del receptor de una molécula de insulina a través de la modificación (por ejemplo, acilación) o mutación puede disminuir la velocidad a la que se elimina la molécula de insulina a partir de suero. En algunas realizaciones, una afinidad disminuida del receptor de insulina in vitro se traduce en actividad in vivo superior para un conjugado de insulina. En ciertas realizaciones, una molécula de insulina es mutada de tal

manera que el sitio de la mutación se utiliza como punto de conjugación, y la conjugación en el sitio de mutación reduce la unión al receptor de insulina (por ejemplo, LysA3). En ciertas otras realizaciones, la conjugación de un aminoácido tipo silvestre existente o extremo reduce la unión al receptor de insulina (por ejemplo, GlyA1). En algunas realizaciones, una molécula de insulina se conjuga en la posición A4, A5, A8, A9, o B30. En ciertas realizaciones, la conjugación en la posición A4, A5, A8, A9, B30 o se lleva a cabo a través de una cadena secundaria de aminoácidos tipo silvestre (por ejemplo, GluA4). En ciertas otras realizaciones, una molécula de insulina se encuentra mutada en la posición A4, A5, A8, A9, B30 o para proporcionar un sitio para la conjugación (por ejemplo, Lys^{A4}, Lys^{A5}, Lys^{A8}, Lys^{A9} o Lys^{B30}).

Métodos para conjugar fármacos incluyendo moléculas de insulina se describen a continuación. En ciertas realizaciones, una molécula de insulina se conjuga con un ligando o estructura conjugada a través del residuo ácido amino A1. En ciertas realizaciones el residuo aminoácido A1 es glicina. Se ha de entenderse sin embargo, que la presente exposición no se limita a la conjugación N- terminal y que en ciertas realizaciones una molécula de insulina puede conjugarse a través de un residuo aminoácido de cadena- A no terminal. En particular, la presente divulgación comprende la conjugación a través del grupo épsilon- amino de un residuo de lisina presente en cualquier posición en la cadena A- (tipo salvaje o introducida por mutagénesis dirigida a sitio). Se apreciará que las posiciones diferentes de conjugación en la cadena A puede dar lugar a diferentes reducciones en la actividad de la insulina. En particular, la presente divulgación comprende la conjugación a través del grupo épsilon- amina de un residuo de lisina presente en cualquier posición en la cadena B (tipo silvestre o introducida por mutagénesis dirigida). Por ejemplo, en ciertas realizaciones, una molécula de insulina se puede conjugar a través del residuo de lisina B29.En el caso de insulina glulisina, puede emplearse conjugación con el al menos un ligando vía el residuo de lisina B3. Se puede apreciar que las diferentes posiciones de conjugación sobre la cadena B pueden conducir a diferentes reducciones en la actividad de la insulina.

En ciertas realizaciones, los ligandos se conjugan a más de un punto de conjugación sobre un fármaco tal como una molécula de insulina. Por ejemplo, una molécula de insulina puede conjugarse en ambos el extremo N A1 y la lisina B29. En algunas realizaciones, la conjugación de amida se lleva a cabo en buffer carbonato para conjugar en las posiciones B29 y A1, pero no en la posición B1. En otras realizaciones, una molécula de insulina se puede conjugar

en el extremo N A1 y la lisina B29. En aún otras realizaciones, los grupos protectores se utilizan de tal manera que la conjugación se lleva a cabo en las posiciones Bl y B29 o Bl y A1. Se puede apreciar que cualquier combinación de los puntos de conjugación de una molécula de insulina puede emplearse. En algunas realizaciones, al menos uno de los puntos de la conjugación es un residuo de lisina mutado, por ejemplo, Lys ^{A3}.

En diversas realizaciones, un conjugado puede incluir un sensibilizador de insulina (es decir, un fármaco que potencia la acción de la insulina). Los fármacos que potencian los efectos de la insulina incluyen biguanidas (por ejemplo, metformina) y las glitazonas. El primer fármaco de glitazona fue troglitazona, que resultó tener efectos secundarios severos. Las glitazonas de segunda generación incluyen pioglitazona y rosiglitazona que son mejor toleradas, aunque la rosiglitazona se ha asociado con eventos cardiovasculares adversos en ciertas pruebas.

En varias realizaciones, un conjugado pueden incluir un secretagogo de insulina (es decir, un fármaco que estimula la secreción de insulina por las células beta del páncreas). Por ejemplo, en varias realizaciones, un conjugado puede incluir una sulfonilurea. Las sulfonilureas estimulan la secreción de insulina por las células beta del páncreas mediante la sensibilización de éstas a la acción de la glucosa. Las sulfonilureas pueden, además inhibir la secreción de glucagón y sensibilizar los tejidos diana a la acción de la insulina. Las sulfonilureas de primera generación incluyen tolbutamida, clorpropamida y carbutamida. Las sulfonilureas de segunda generación que son activas en dosis más bajas incluyen glipizida, glibenclamida, gliclazida, glimepirida y glibornurida. En varias realizaciones, un conjugado puede incluir una meglitinida. Meglitinidas adecuadas incluyen mitiglinida, nateglinida y repaglinida. Su acción hipoglucémica es más rápida y más corta que la de las sulfonilureas. Otros secretagogos de insulina incluyen péptido tipo glucagón 1 (GLP- 1) y los análogos de GLP- 1 (es decir, un péptido con bioctividad tipo GLP- 1 que se diferencia de GLP- 1 por 1- 10 sustituciones, adiciones o supresiones aminoácidas y/o por una modificación química). GLP- 1 reduce la ingesta de alimentos mediante la inhibición del vaciado gástrico, lo que aumenta la saciedad a través de acciones centrales y mediante la supresión de la entrega de glucagón. GLP- 1 reduce los niveles de glucosa en plasma mediante el aumento de la proliferación de isletas pancreáticas y aumenta la producción de insulina después del consumo de alimentos. GLP- 1 puede modificarse químicamente, por ejemplo, mediante la conjugación de lípidos como en liraglutida para extender su vida media in vivo. Sin embargo, otros secretagogos de insulina incluyen exendina- 4 y análogos de la exendina- 4 (es decir, un

péptido con bioactividad tipo exendina- 4 que se diferencia de la exendina- 4 por 1- 10 sustituciones, adiciones o supresiones aminoácidas y/o por una modificación química). La exendina- 4, que se encuentra en el veneno del monstruo de Gila, presenta bioactividad tipo GLP- 1. Tiene una vida media mucho más larga que GLP- 1 y, a diferencia de GLP- 1, puede ser truncada por ocho residuos aminoácidos en su extremo N sin perder la bioactividad. La región N-terminal de GLP- 1 y exendina- 4 son casi idénticas, una diferencia significativa es el segundo residuo aminoácido, la alanina en el GLP- 1 y la glicina en la exendina- 4, que da a la exendina-4 su resistencia a la digestión in vivo . La exendina- 4 también tiene un extra de 9 residuos aminoácidos en su extreme- C en comparación con GLP- 1. Mann *Biochem. Soc. Trans.* 35:713-716, 2007 y Runge, *Biochemistry* 46:5830- 5840, 2007 describen una variedad de análogos de GLP- 1 y exendina- 4 que se pueden utilizar en un conjugado de la presente divulgación. La corta vida media de GLP- 1 resulta a partir de la digestión enzimática de la dipeptidil peptidasa IV (DPP- IV). En ciertas realizaciones, los efectos de la GLP- 1 endógena pueden ser potenciados por la administración de un inhibidor de la DPP- IV (por ejemplo, vildagliptina, sitagliptina, saxagliptina, linagliptina o alogliptina).

En varias realizaciones, un conjugado puede incluir amilina o un análogo de la amilina (es decir, un péptido con bioactividad tipo amilina que difiere de la amilina por 1- 10 sustituciones, adiciones o supresiones aminoácidas y/o por una modificación química). La amilina juega un papel importante en la regulación de glucosa (por ejemplo, ver Edelman y Weyer, *Diabetes Technol.* No. 4:175- 189, 2002). La amilina es una hormona neuroendocrina que es co- secretada con insulina por las células beta del páncreas en respuesta a la ingesta de alimentos. Mientras que la insulina trabaja para regular la desaparición de la glucosa de la sangre, la amilina trabaja para ayudar a regular la aparición de glucosa en el torrente sanguíneo desde el estómago y el hígado. El acetato de pramlintida (Symlin ®) es un análogo de amilina de ejemplo. Puesto que la amilina humana nativa es amiloidogénica, la estrategia para el diseño de pramlintida involucró sustitución de determinados residuos con los de amilina de rata, que no es amiloidogénica. En particular, los residuos de prolina se conocen como residuos que rompen estructuras, por lo que estos fueron injertados directamente de la secuencia de rata a la secuencia humana. Glu- 10 fue sustituido también con una asparagina.

En varias realizaciones, un fármaco pre- conjugado puede contener una o más fracciones reactivas (por ejemplo, carboxílo o éster reactivo, amina, hidroxilo, aldehído, sulfhidrilo,

maleimidilo, alquinilo, azido, etc fracciones). Como se discute más adelante, estas fracciones reactivas pueden, en ciertas realizaciones, facilitar el proceso de conjugación. Ejemplos específicos incluyen fármacos peptídicos que tienen grupos amina alfa- terminal y/o épsilon-amina lisina. Se puede apreciar que cualquiera de estas fracciones reactivas puede agregarse artificialmente a un fármaco conocido si aún no está presente. Por ejemplo, en el caso de fármacos peptídicos un aminoácido adecuado (por ejemplo, una lisina) puede agregarse o sustituirse en la secuencia aminoácida. Además, como se discute en detalle más adelante, se apreciará que el proceso de conjugación puede ser controlado por el bloqueo selectivo de ciertas fracciones reactivas antes de la conjugación.

En varias realizaciones, un conjugado de la presente invención puede ser explotado para manipular un mecanismo de retroalimentación natural entre la glucosa y la insulina (donde el nivel de insulina aumenta a medida que el nivel de glucosa aumenta y el nivel de glucosa disminuye a medida que el nivel de insulin aumenta). Por otra parte, en varias realizaciones, el fármaco puede ser una molécula que (a) tiene la misma función que la insulina (por ejemplo, reduce los niveles de glucosa), (b) estimula la producción de insulina y/o (c) potencia el efecto (s) de la insulina. Por ejemplo, como se mencionó anteriormente se podría usar un secretagogo de insulina o un sensibilizador de insulina en lugar de la insulina como el fármaco.

En varias realizaciones, se puede utilizar un conjugado, el cual incluye un fármaco con una función que no está directamente relacionada con la glucosa. Sin limitación, un conjugado que responde a la glucosa puede utilizarse para proporcionar administración a largo plazo a hora de la comida de un fármaco. Cualquier fármaco que debe ser dosificado periódicamente y/o con los alimentos se beneficiaría de tal sistema de entrega. Como se conoce bien en el estado de la técnica, muchos de los fármacos tradicionales deben ser administrados con las comidas o durante las comidas. Por ejemplo, los fármacos que inhiben la absorción de grasas (por ejemplo, orlistat) se presentan de manera ventajosa durante las comidas. Del mismo modo, fármacos que disminuyen los niveles de lípidos, por ejemplo, lovastatina, atorvastatina o simvastatina, o los niveles de triglicéridos, por ejemplo, gemfibrozil, también pueden ser liberados de manera ventajosa a la hora de las comidas.

Conjugados de Insulina de Ejemplo

En varias realizaciones, un conjugado de insulina de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada a uno o más ligandos que se seleccionan

independientemente del grupo que consta de aminoetilglucosa (AEG), aminoetilmanosa (AEM), aminoetilbimanosa (AEBM), aminoetiltrimanosa (AETM), P- aminoetil- N- acetilglucosamina (AEGA), y aminoetilfucosa (AFI). En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se conjuga a través del grupo épsilon- amino de Lys^{B29}.

En ciertas realizaciones, un conjugado de insulina de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada a uno o más ligandos de aminoetilglucosa (AEG). En ciertas realizaciones, un conjugado de insulina de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada a uno o más ligandos de aminoetilmanosa (AEM). En ciertas realizaciones, un conjugado de insulina de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada a uno o más ligandos de aminoetilbimanosa (AEBM). En ciertas realizaciones, un conjugado de insulina de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada a uno o más ligandos de aminoetiltrimanosa (AETM). En ciertas realizaciones, un conjugado de insulina de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada a uno o más ligandos de P- aminoetil- N- acetilglucosamina (AEGA) ligandos. En ciertas realizaciones, un conjugado de insulina de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada a uno o más ligandos de aminoetilfucosa (AEF).

En varias realizaciones, un conjugado de insulina de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con dos o más ligandos diferentes. En algunas realizaciones, un conjugado de insulina de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con dos ligandos por separado. En otras realizaciones, un conjugado de insulina de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con tres ligandos por separado. En ciertas realizaciones, los dos o más ligandos por separado de un conjugado de insulina son aminoetilglucosa (AEG). En ciertas realizaciones, los dos o más ligandos por separado de un conjugado de insulina son aminoetilmanosa (AEM). En ciertas realizaciones, los dos o más ligandos por separado de un conjugado de insulina son aminoetilbimanosa (AEBM). En ciertas realizaciones, los dos o más ligandos por separado de un conjugado de insulina son aminoetiltrimanosa (AETM). En ciertas realizaciones, los dos o más ligandos por separado de un conjugado de insulina son β- aminoetil- N- acetilglucosamina (AEGA). En ciertas realizaciones, los dos o más ligandos por separado de un conjugado de insulina son aminoetilfucosa (AEF).

En varias realizaciones, un conjugado de la presente divulgación comprende dos o más ligandos separados conjugados con una única estructura conjugada que se conjuga también con

una molécula de insulina. En algunas realizaciones, los dos o más ligandos separados y la molécula de la insulina de tal conjugado están ubicados cada uno en una ramificación separada de una única estructura conjugada ramificadas. En algunas realizaciones, los dos o más ligandos separados y la molécula de la insulina de tal conjugado se encuentran sobre los extremos de ramificaciones distintas de una única estructura conjugada ramificadas. En algunas realizaciones, los dos o más ligandos separados de tal conjugado se conjugan con la molécula de insulina a través de dos o más puntos de conjugación diferentes. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se conjuga a través del residuo aminoácido A1 y el grupo épsilon- amino de LysB29. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se conjuga con dos estructuras independientes de conjugados que se conjugan cada uno con un ligando diferente. En aún otras realizaciones, la molécula de insulina se conjuga con dos estructuras independientes que se conjugan cada una con un ligando. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se conjuga con dos estructuras separadas de conjugados ramificados que se conjugan cada una con dos ligandos. En ciertas realizaciones, los ligandos se encuentran en los extremos de ramificaciones distintas de las estructuras de conjugados ramificados. En otras realizaciones, los ligandos se encuentran en los extremos de ramificaciones distintas de las estructuras de conjugados ramificados.

En varias realizaciones, un conjugado de la presente invención comprende una molécula de insulina conjugada con aminoetilglucosa (AEG). En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se conjuga a través del residuo aminoácido A1. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se conjuga a través del residuo aminoácido Bl. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se conjuga a través del grupo épsilon- amino de Lys^{B29}. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina es insulina glulisina conjugada a través del grupo épsilon- amino de Lys^{B3}. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se conjuga a través del residuo aminoácido A1 y el grupo épsilon- amino de Lys^{B29}.

En varias realizaciones, un conjugado de la presente invención comprende una molécula de insulina conjugada con aminoetilmanosa (AEM). En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se conjuga a través del residuo aminoácido A1. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se conjuga a través del residuo aminoácido Bl. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se conjuga a través del grupo épsilon- amino de Lys^{B29}. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina es insulina glulisina conjugada a través del grupo épsilon- amino de Lys^{B3}.

En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se conjuga a través del residuo aminoácido A1 y el grupo épsilon- amino de Lys^{B29}.

En varias realizaciones, un conjugado de la presente invención comprende una molécula de insulina conjugada con aminoetilbimanosa (AEBM). En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se conjuga a través del residuo aminoácido A1. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se conjuga a través del residuo aminoácido B1. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se conjuga a través del grupo épsilon- amino de Lys^{B29}. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina es insulina glulisina conjugada a través del grupo épsilon- amino de Lys^{B3}. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se conjuga a través del residuo aminoácido A1 y el grupo épsilon- amino de Lys^{B29}.

En varias realizaciones, un conjugado de la presente invención comprende una molécula de insulina conjugada con aminoetiltrimanosa (AETM). En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se conjuga a través del residuo aminoácido A1. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se conjuga a través del residuo aminoácido B1. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se conjuga a través del grupo épsilon- amino de Lys^{B29}. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina es insulina glulisina conjugada a través del grupo épsilon- amino de Lys^{B3}. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se conjuga a través del residuo aminoácido A1 y el grupo épsilon- amino de Lys^{B29}.

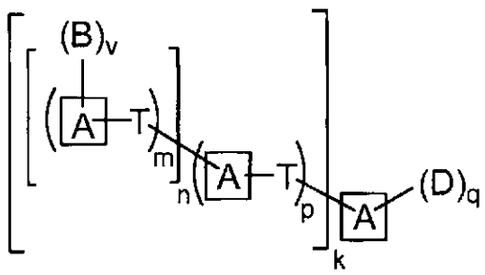
En varias realizaciones, un conjugado de la presente invención comprende una molécula de insulina conjugada con β- aminoetil- N- acetilglucosamina (AEGA). En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se conjuga a través del residuo aminoácido A1. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se conjuga a través del residuo aminoácido B1. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se conjuga a través del grupo épsilon- amino de Lys^{B29}. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina es insulina glulisina conjugada a través del grupo épsilon- amino de Lys^{B3}. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se conjuga a través del residuo aminoácido A1 y el grupo épsilon- amino de Lys^{B29}.

En varias realizaciones, un conjugado de la presente invención comprende una molécula de insulina conjugada con aminoetilfucosa (AFI). En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se conjuga a través del residuo aminoácido A1. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se conjuga a través del residuo aminoácido B1. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se conjuga a través del grupo épsilon- amino de Lys^{B29}. En ciertas realizaciones, la

molécula de insulina es insulina glulisina conjugada a través del grupo épsilon- amino de Lys^{B3}. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se conjuga a través del residuo aminoácido A1 y el grupo épsilon- amino de Lys^{B29}.

Estructuras de Conjugados

Esta sección describe algunas estructuras de conjugados de ejemplo. En varias realizaciones, un conjugado de la presente invención puede tener la fórmula general (I):



I

en donde:

cada ocurrencia de $\left[\left(\boxed{A}-T\right)\right]$ representa una ramificación potencial dentro del conjugado;

cada ocurrencia de $\left(\boxed{A}-T\right)$ representa una repetición potencial dentro una ramificación del conjugado;

cada ocurrencia de $\boxed{A}$ es independientemente un enlace covalente, un átomo de carbono, un heteroátomo, o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado a partir del grupo que consta de acilo, alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo, y heterocíclico;

cada ocurrencia de T es independientemente un enlace covalente o una cadena de hidrocarburos C_{1-30} bivalente, lineal o ramificada, saturada o no saturada, opcionalmente sustituida en donde una o más unidades de metileno de T son opcionalmente e independientemente reemplazadas por - O- , - S- , - N(R)- , - C(O)- , - C(O)O- , - OC(O)- , - N(R)C(O)- , - C(O)N(R)- , - S(O)- , - $S(O)_2$- , - $N(R)SO_2$- , - $SO_2N(R)$- , un grupo heterocíclico, un grupo arilo, o un grupo heteroarilo;

cada ocurrencia de R es independientemente hidrógeno, un grupo protector apropiado, o una fracción de acilo, fracción de arilalquilo, fracción alifática, fracción de arilo, fracción de heteroarilo, o fracción heteroalifática;

- B es - T- L^B- X;

cada ocurrencia de X es independientemente un ligando;

cada ocurrencia de L^B es independientemente un enlace covalente o un grupo derivado a partir de la conjugación covalente de un T con una X;

- D es - T- L^D- W;

cada ocurrencia de W es independientemente unfármaco;

cada ocurrencia de L^D es independientemente un enlace covalente o un grupo derivado a partir de la conjugación covalente de un T con un W;

k es un entero entre 1 y 12, inclusive;

q es un entero entre 1 y 4, inclusive;

cada ocurrencia de p es independientemente un entero entre 1 y 5, inclusive; y

cada ocurrencia de n es independientemente un entero de 0 a 5, inclusive; y

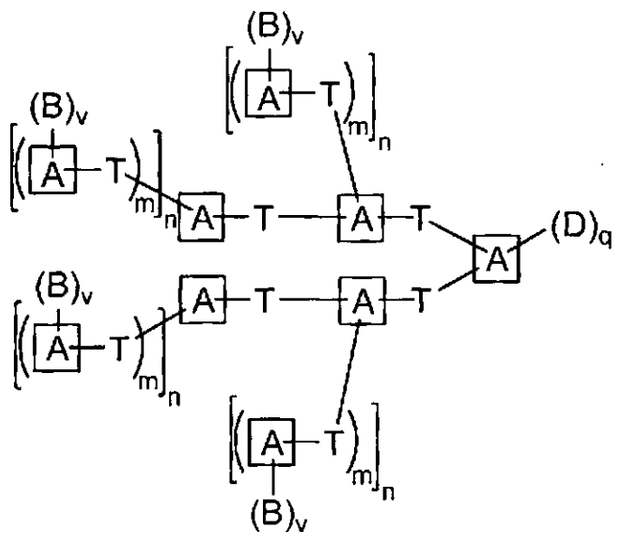
cada ocurrencia de m es independientemente un entero entre 1 y 5, inclusive; y

cada ocurrencia de v es independientemente un entero de 0 a 5, inclusive, con la salvedad de que dentro de cada ramificación- k al menos una ocurrencia de n es ≥ 1 y al menos one ocurrencia de v es ≥ 1.

Se debe entender que fórmula general (I) (y las otras fórmulas en la presente) no listan expresamente cada hidrógeno. Por ejemplo, si la [A] central es un grupo arilo C_6 y $k + q < 6$ se puede apreciar que las posiciones abiertas el anillo arilo C_6 incluyen un hidrógeno.

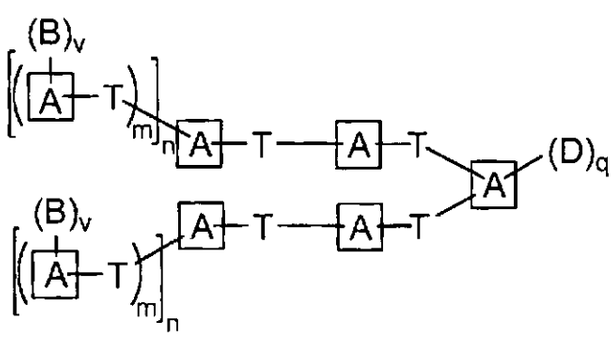
En general, se puede apreciar que cada ocurrencia de [A] representa un nodo ramificador potencial y que el número de ramificaciones en cada nodo se determina por los valores de k para [A] central y n para ocurrencias no centrales de [A]. Un experto podrá apreciar que debido a que cada aparición de n puede ser un número entero de 0 a 5, la presente divulgación contempla realizaciones lineales, ramificadas, y hiperramificadas (por ejemplo, tipo dendrímero) de estos conjugados. La condición que requiere que dentro de cada ramificación- k por lo menos una ocurrencia de n sea ≥ 1 y por lo menos una ocurrencia de v sea ≥ 1 asegura que cada conjugado incluya al menos una ocurrencia de B (es decir, un ligando).

En ciertas realizaciones, cada ocurrencia de [A] en una fracción p- entre paréntesis se sustituye por un número de fracciones n- entre corchetes que corresponden a un valor de $n \geq 1$. Por ejemplo, cuando k = 2 y p = 2, en ambas ramificaciones- k, el conjugado puede ser de la fórmula (Ia):



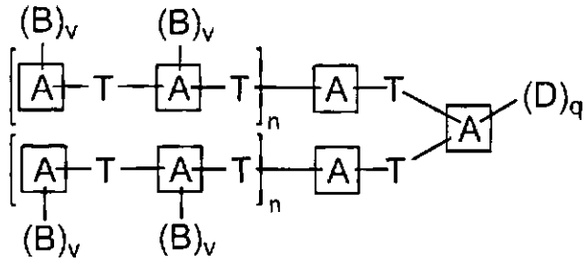
Ia

En otras realizaciones, sólo las ocurrencias terminales de [A] en una fracción p- entre corchetes son sustituidas por un número de n fracciones entre corchetes que corresponden a un valor de $n \geq 1$. Por ejemplo, cuando k = 2 y p = 2, en ambas ramificaciones k (y n = 0 para la primera fracción p entre corchetes en ambas ramificaciones k), el conjugado puede ser de la fórmula (Ib):



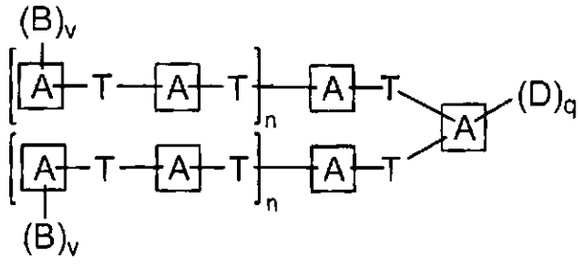
Ib

En ciertas realizaciones, cada ocurrencia de [A] en una fracción m entre corchetes es sustituida por un número de fracciones B que corresponden al valor de v ≥ 1. Por ejemplo, cuando k = 2, cada ocurrencia de p = 1, y cada ocurrencia de m = 2, el conjugado puede ser de la fórmula (Ic):



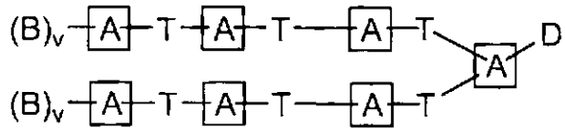
Ic

En otras realizaciones, solamente las ocurrencias terminales de [A] en una fracción m entre corchetes son sustituidas por un número de fracciones B que corresponden a un valor de v ≥ 1. Por ejemplo, cuando k = 2, cada ocurrencia de p = 1, y cada ocurrencia de m = 2 (y v = 0 para la primera fracción m entre corchetes en cada ramificación n), el conjugado puede ser de la fórmula (Id):



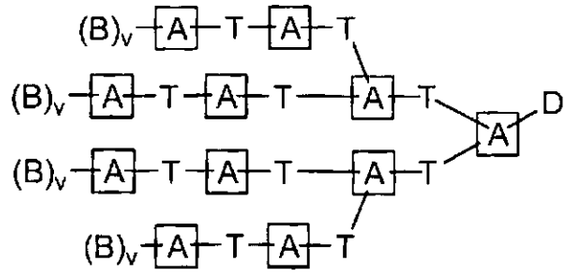
Id

A manera de ejemplo adicional, cuando n = 1 en ambas ramificaciones k de la fórmula anterior, el conjugado puede ser de la fórmula (Ie):



Ie

Por otra parte, cuando q = 1 y n = 2 en ambas ramificaciones k de la fórmula anterior, el conjugado puede ser de la fórmula (If):



If

En varias realizaciones, la presente divulgación también proporciona conjugados que incluyen ligandos y/o un fármaco que no está covalentemente unido a una estructura conjugada.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de cualquiera de las fórmulas anteriores, en donde:

cada [A], T, D, k, q, p, n, m, v se define como se describió anteriormente y en la presente;

- B es- T- LRP^B- X;

cada ocurrencia de X es independientemente un ligandos; y

cada ocurrencia de LRP^B es independientemente un par ligando- receptor que forma un enlace no covalente entre T y X, con una constante de disociación en el suero humano de menos de 1 pmol/L.

En aún otras realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de cualquiera de las fórmulas anteriores, en donde:

cada [A], T, B, k, q, p, n, m, y v se definen como se describió anteriormente y en la presnete;-

D es- T- LRP^D- W;

cada ocurrencia de W es independiente un fármaco, y

cada ocurrencia de LRP^D es independientemente un par ligando- receptor que forma un enlace no covalente entre T y W, con una constante de disociación en el suero humano de menos de 1 pmol/L.

En otras realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de cualquiera de las fórmulas anteriores en donde:

cada [A], T, k, q, p, n, m y v se definen como se describió anteriormente y en la presente; - B es - T- LRP^B- X;

cada ocurrencia de X es independientemente un ligando;

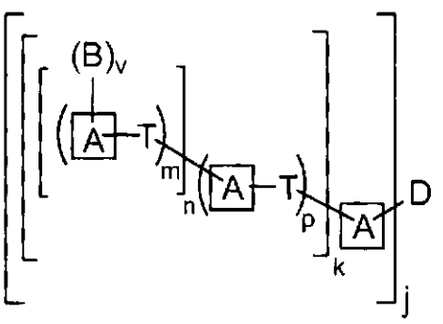
cada ocurrencia de LRP^B es independientemente un par ligando- receptor que forma un enlace no covalente entre T y X con una constante de disociación en el suero humano de menos de 1 pmol/L;

- D es - T- LRP^D- W;

cada ocurrencia de W es independiente un fármaco, y

cada ocurrencia de LRP^D es independientemente un par ligando- receptor que forma un enlace no covalente entre T y W, con una constante de disociación en el suero humano de menos de 1 pmol/L.

En otro aspecto, un conjugado de la presente divulgación puede tener la fórmula general (II):



II

en donde [A], B, T, D, v, m, n, p, y k son como se definen y describen en este documento, y j es un entero de 1 a 4 inclusive. Los conjugados de la fórmula (II) puede tener varios sitios de la conjugación del ligando con el fármaco (es decir, donde dos o más ligandos se conjugan con una única molécula de fármaco a través de diferentes sitios sobre el fármaco, por ejemplo, aminoácidos diferentes en un fármaco biomolecular). Se puede apreciar que, cuando q es 1, los subgéneros descritos anteriormente (es decir, las fórmulas (Ia)- (If)) se aplican a los

conjugados de la fórmula (II) cuando j es 1. Del mismo modo, subgéneros similares se pueden contemplar por un experto en estado de la técnica para conjugados en donde j es de 2, 3, o 4.

Para fines de ejemplo y para evitar confusión se debe entender que una ocurrencia de: $-[A]-D-[A]-$ en un conjugado de la formula (II) (es decir, cuando j es 2) puede representarse como: $-[A]-T-L^{D}-W-L^{D}-T-[A]-$ (cuando el fármaco se une covalentemente a la estructura conjugada) o $-[A]-T-LRP^{D}-W-LRP^{D}-T-[A]-$ (cuando el fármaco no se une covalentemente con la estructura conjugada).

Descripción de Grupos de ejemplo

(nodo) [A]

En ciertas realizaciones, cada ocurrencia de [A] es independientemente un grupo opcionalmente sustituido seleccionado a partir del grupo que consta de acilo, alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo, y heterocíclico. En algunas realizaciones, cada ocurrencia de [A] es igual. En algunas realizaciones, la [A] central es es diferente de todas las demás ocurrencias de [A]. En ciertas realizaciones, todas ocurrencias de [A] son iguales excepto para la [A] central.

En algunas realizaciones, [A] es un grupo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, [A] es un arilo de 6 miembros. En ciertas realizaciones, [A] es fenilo.

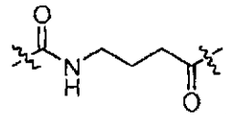
En ciertas realizaciones, [A] es un heteroátomo seleccionado a partir N, O, o S. En algunas realizaciones, [A] es un átomo de nitrógeno. En algunas realizaciones, [A] es un átomo de oxigeno. En some realizaciones, [A] es un átomo de azufre. En algunas realizaciones, [A] es un átomo de carbono.

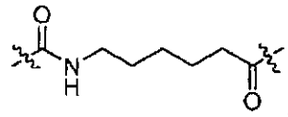
T (espaciador)

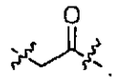
En ciertas realizaciones, cada ocurrencia de T es independientemente una cadena de hidrocarburos C1- 20 bivalente, lineal o ramificada, saturada o no saturada, opcionalmente

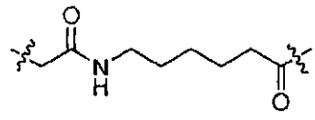
sustituida en donde una o más unidades de metileno de T son opcionalmente e independientemente reemplazadas por - O- , - S- , - N(R)- , - C(O)- , - C(O)O- , - OC(O)- , - N(R)C(O)- , - C(O)N(R)- , - S(O)- , - $S(O)_2$- , - $N(R)SO_2$- , - $SO_2N(R)$- , un grupo heterocíclico, un grupo arilo, o un grupo heteroarilo. En ciertas realizaciones, una, dos, tres, cuatro, o cinco unidades de metileno de T son opcionalmente e independientemente reemplazadas. En ciertas realizaciones, T se construye a partir de una cadena de hidrocarburos C_{1-10}, C_{1-8}, C_{1-6}, C_{1-4}, C_{2-12}, C_{4-12}, C_{6-12}, C_{8-12}, o C_{10-12} en donde una o más unidades de metileno de T son opcionalmente e independientemente reemplazadas por - O- , - S- , - N(R)- , - C(O)- , - C(O)O- , - OC(O)- , - N(R)C(O)- , - C(O)N(R)- , - S(O)- , - $S(O)_2$- , - $N(R)SO_2$- , - $SO_2N(R)$- , un grupo heterocíclico, un grupo arilo, o un grupo heteroarilo. En ciertas realizaciones, una o más unidades de metileno de T son reemplazadas por un grupo heterocíclico. En algunas realizaciones, una o más unidades de metileno de T son reemplazadas por una fracción de triazol. En ciertas realizaciones, una o más unidades de metileno de T son reemplazadas por - C(O)- . En ciertas realizaciones, una o más unidades de metileno de T son reemplazadas por - C(O)N(R)- . En ciertas realizaciones, una o más unidades de metileno de T son reemplazadas - O- .

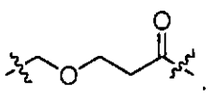
En algunas realizaciones, T es  .

En algunas realizaciones, T es  .

En algunas realizaciones, T es  .

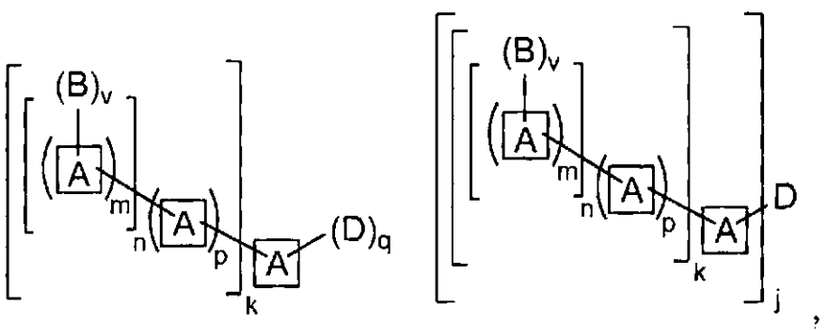
En algunas realizaciones, T es  .

En algunas realizaciones, T es  .

En algunas realizaciones, T es  .

En ciertas realizaciones, cada ocurrencia de T es la misma.

En ciertas realizaciones, cada ocurrencia de T (fuera de los grupos B y D) es un enlace covalente y el conjugado es de la fórmula general (IV) o (V):

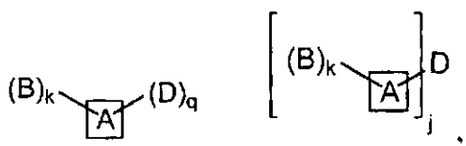


IV **V**

o

en donde  , B, D, v, m, n, p, k, y j son como se definen y describen en la presente.

En ciertas realizaciones de las fórmulas generales (IV) y (V), cada ocurrencia de , excepto para la central es un enlace covalente, cada ocurrencia de v = 1, y el conjugado es de la fórmula (VI) o (VII):



o

en donde , B, D, q, k, y j son como se definen y describen en la presente.

En ciertas realizaciones para la fórmula (VI), k = 1 y q = 1.

En otras realizaciones, k = 2 y q = 1.

En otras realizaciones, k = 3 y q = 1.

En otras realizaciones, k = 1 y q = 2.

En otras realizaciones, k = 2 y q = 2.

En ciertas realizaciones para la fórmula (VII), k = 1 y j = 2.

En otras realizaciones, k = 2 y j = 2.

En otras realizaciones, k = 3 y j = 2.

En otras realizaciones, k = 1 j = 1.

En otras realizaciones, k = 2 y j = 1.

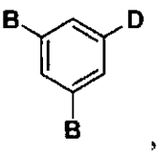
En otras realizaciones, k = 3 y j = 1.

En otras realizaciones, k = 1 y j = 3.

En otras realizaciones, k = 2 y j = 3.

En otras realizaciones, k = 3 y j = 3.

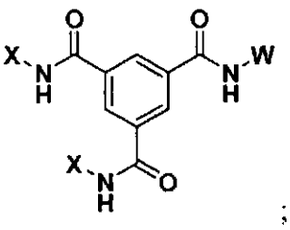
En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de fórmula general (VIa):



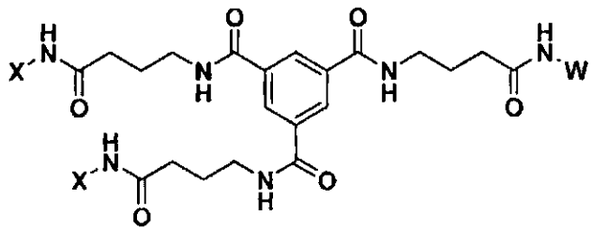
VIa

donde B y D son como se definen y describen en la presente.

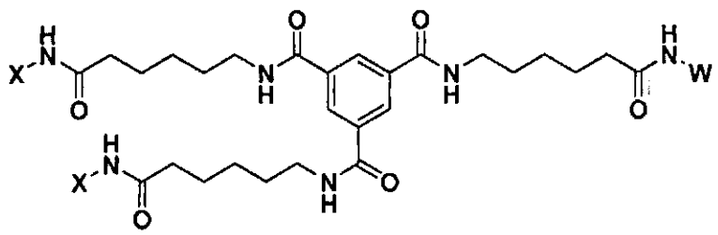
Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de fórmula:



;



, o



en donde W y X son como se definen y describen en la presente.

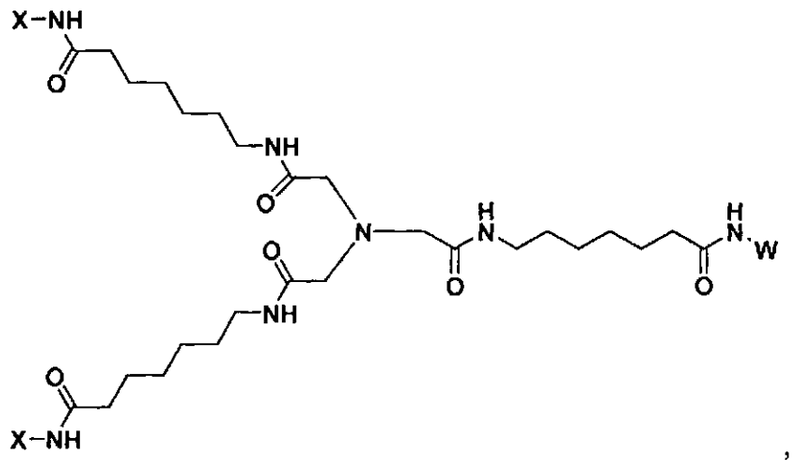
En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de fórmula general (VIb):



VIb

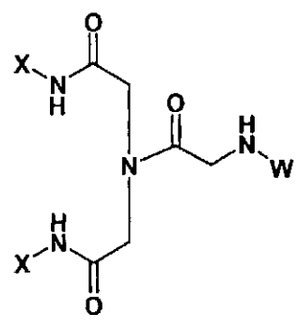
donde B y D son como se definen y describen en la presente.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de fórmula:

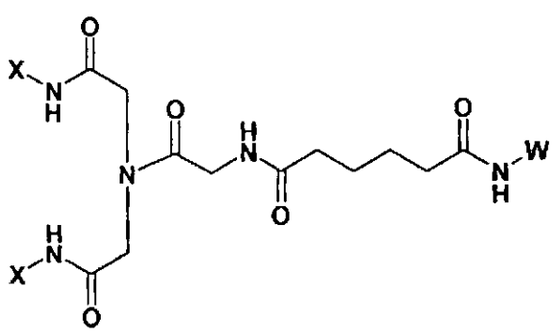


donde W y X son como se definen y describen en la presente.

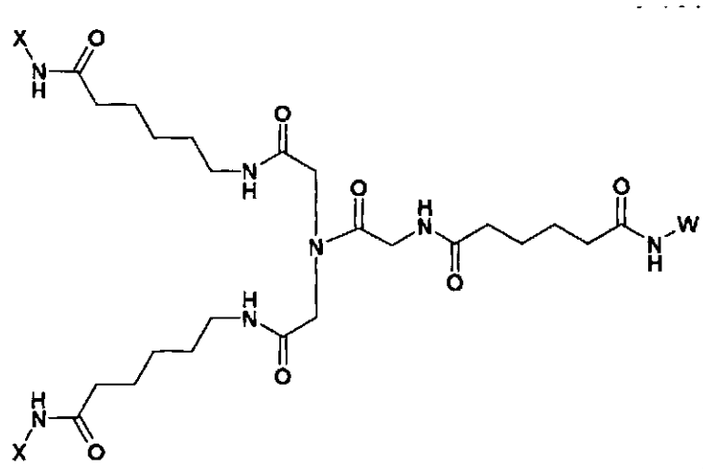
Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de fórmula:



;

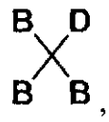


, o



donde W y X son como se definen y describen en la presente.

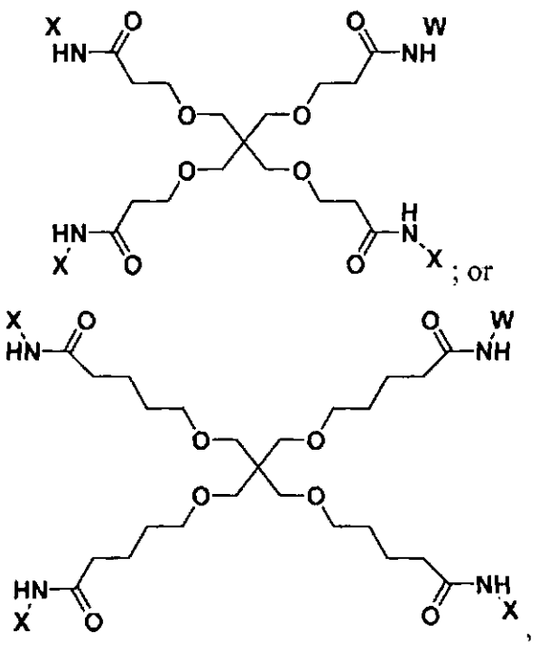
En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de fórmula general (VIc):



VIc

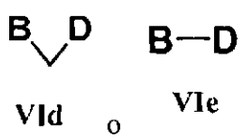
en donde B y D son como se definen y describen en la presente.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de fórmula:



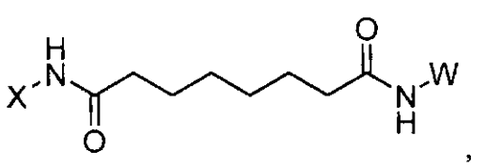
donde W y X son como se definen y describen en la presente.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de fórmula general (VId) o (VIe):



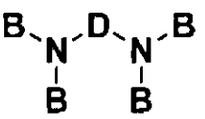
en donde B y D son como se definen y describen en la presente.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de fórmula:

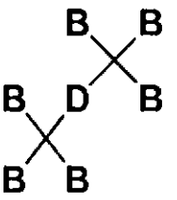


en donde W y X son como se definen y describen en la presente.

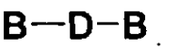
Se puede apreciar que los subgéneros de las fórmulas (VIa), (VIb), (VIc), (VId), y (VIe) y especies de los mismos, se aplican a los conjugados de la fórmula (VII) donde j es 1. Del mismo modo, subgéneros y especies similares se pueden contemplar por un experto en el estado de la técnica para conjugados de fórmula (VII) donde j es de 2, 3, o 4. Por ejemplo, cuando j es 2, la presente divulgación proporciona conjugados de fórmula:



VIIb-*i*



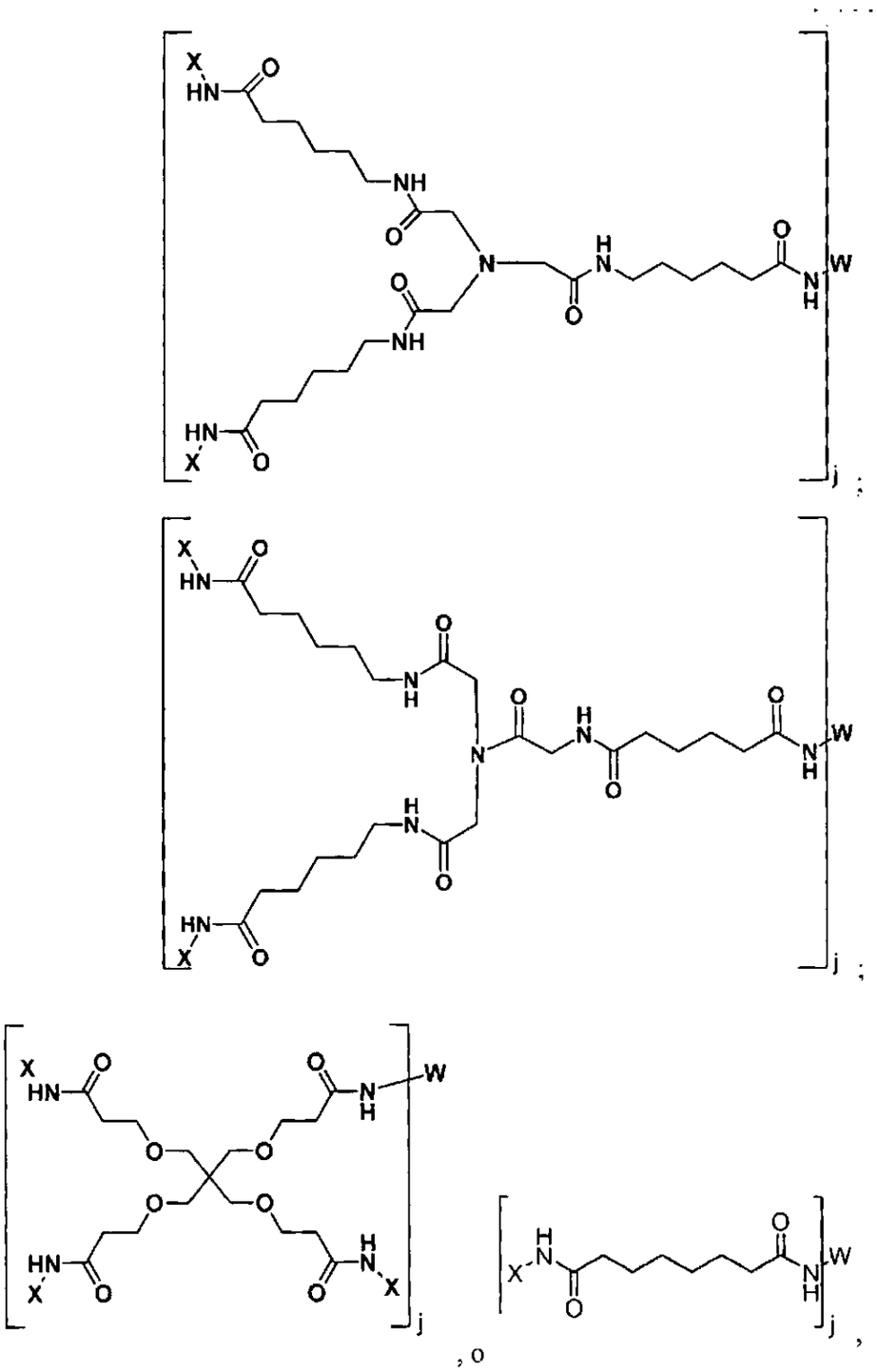
VIIc-*i*



VIIe-*i*

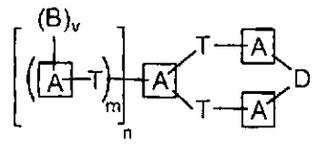
en donde B y D son como se definen y describen en la presente.

En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de fórmula:



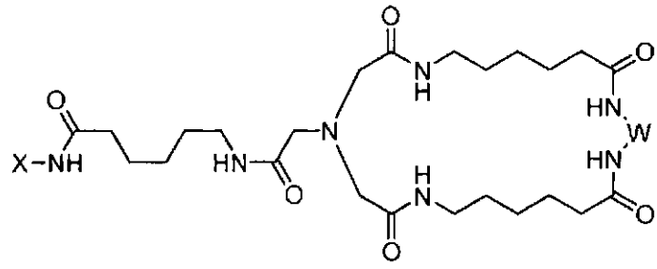
en donde W, X, J y son como se definen y describen en la presente.

En otro aspecto, un conjugado de la presente divulgación puede tener la fórmula general (VIII):

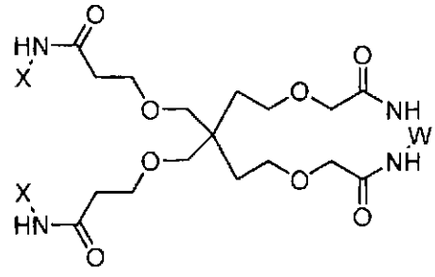


en donde [A], T, D, v, m, yn son como se definen y describen para los conjugados de fórmula (I), y B es- T- L^B- X, en donde cada ocurrencia de X es independientemente un ligandos que incluye un sacárido.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de fórmula:

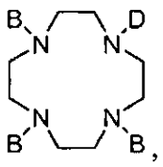


o



donde W y X son como se definen y describen para los conjugados de fórmula (I).

En otro aspecto, el andamio conjugado no es de la fórmula (I) o (II), sino que es un macrociclo. En algunas realizaciones, el macrociclo es un macrociclo de poliamina. Por ejemplo, en varias realizaciones, un conjugado de la presente divulgación puede tener la fórmula general (IX):



IX

en donde D es como se define y describe para los conjugados de la fórmula (I), y B es- T- L^B- X, en donde cada ocurrencia de X es independientemente un ligando, que incluye un sacárido.

B (ligando)

En ciertas realizaciones,- B- T- L^B- X, donde X es un ligando y L^B es un enlace covalente o un grupo derivado de la conjugación covalente de un X con un T. Ligandos de ejemplo y sus componentes sacáridos se describieron anteriormente.

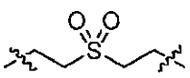
D (fármaco)

En ciertas realizaciones,- D- T- L^D- W, donde W es una fármaco y L^D es un enlace covalente o un grupo derivado de la conjugación covalente de un W con T. Fármacos de ejemplo se han descrito anteriormente.

L^B y L^D (conjugación covalente)

Un experto apreciará que una variedad de químicas de conjugación pueden utilizarse para conjugar covalentemente una X con una T y/o una W con una T (generalmente "componentes"). Estas técnicas son ampliamente conocidas en el estado de la técnica y las técnicas de ejemplo se discuten a continuación. Los componentes pueden ser unidos directamente (es decir, sin grupos químicos intermedios) o indirectamente unidos a través de un separador (por ejemplo, un agente de acoplamiento o cadena covalente que proporciona alguna separación física entre el elemento conjugado y el resto de la estructura conjugada). Es de entenderse que los componentes pueden unirse covalentemente a una estructura conjugada a través de cualquier número de enlaces químicos, incluyendo pero no limitado a, amida, amina, éstere, étere, tioéter, isourea, imina, enlaces, etc. En ciertas realizaciones, L^B y / o L^D (por lo general "L" a los efectos de esta sección) es un enlace covalente. En algunas realizaciones, L es una fracción opcionalmente

sustituida derivada de la conjugación de una fracción opcionalmente sustituida reactiva de carbonilo, reactiva de tiol, reactiva de amina, o reactiva de hidroxilo de T con un grupo carboxilo, tiol, amina, o hidroxilo de X o W . En algunas realizaciones, L es una fracción opcionalmente sustituida derivada de la conjugación de una fracción opcionalmente sustituida reactiva de carboxilo, reactiva de tiol, reactiva de amina, o reactiva de hidroxilo de X o W con un grupo carboxilo, amino tiol o hidroxilo de T . En algunas realizaciones, L es



. En algunas realizaciones, L es una fracción de succinimida.

En varias realizaciones, los componentes pueden unirse covalentemente a una estructura conjugada utilizando reacciones de "química *click*" como se conoce en el estado de la técnica. Estas incluyen, por ejemplo, las reacciones de cicloadición, reacciones de apertura de anillos nucleofílicos, y las adiciones a enlaces carbono- carbono múltiples (por ejemplo, ver Kolb y Sharpless, Drug Discovery Today 8:1128- 1137, 2003 y referencias allí citadas, así como también Dondoni, Chem. *Asian J.* 2:700- 708, 2007 y referencias allí citadas). Como se mencionó anteriormente, en varias realizaciones, los componentes pueden ser unidos a una estructura conjugada a través de grupos pendientes naturales o añadidos de manera química. En general, se apreciará que el primero y segundo miembros de un par de grupos reactivos (por ejemplo, un grupo carboxilo y un grupo amina que reaccionan para producir un enlace amida) pueden estar presentes en cada uno del componente y la estructura (es decir, , la ubicación relativa de los dos miembros es irrelevante, siempre y cuando reaccionen para producir un conjugado). Enlaces de ejemplo se describen con más detalle a continuación.

En varias realizaciones, los componentes portadores de carboxilo (o éster reactivo) pueden conjugarse con estructuras portadoras de - OH (OBFs) mediante el procedimiento descrito por Kim, *Biomaterials* 24:4843- 4851 (2003). En pocas palabras, el OBF se disuelve en DMSO junto con el componente portador de carboxilo y reacciona a través de N',N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y 4- dimetilaminopiridina (DMAP) como catalizadores en una atmósfera seca. Los componentes portadores de carboxilo pueden conjugarse con estructuras portadores de - NH2 (MBFs), utilizando un procedimiento de acoplamiento de carbodiimida (EDAC). Utilizando este procedimiento, el componente portador de carboxilo es funcionalizado mediante reacción con EDAC en un buffer de pH 5 seguido por la adición del NBF. En cualquiera de estos casos (y en cualquiera de los siguientes casos), los productos resultantes

pueden ser purificados por cualquier número de medios disponibles para los expertos en la materia, incluyendo, pero no limitados a, cromatografía de exclusión por tamaños, cromatografía de fase inversa, cromatografía de gel de sílice, cromatografía de intercambio iónico, ultrafiltración y precipitación selectiva.

En varias realizaciones, los componentes portadores de aminas pueden acoplarse a estructuras portadoras de - COOH (CBFS). Los CBFs utilizando fracciones de éster activado (por ejemplo, ver Hermanson en *Bioconjugate Tecniques*, 2 ª edición, Academic Press, 2008 y referencias allí citadas). En resumen, un CBF con ésteres de ácidos carboxílicos activados terminales, tales como- NHS, SSC, NPC, etc se disuelve en un disolvente orgánico anhidro como DMSO o DMF. El número deseado de equivalentes de componentes teniendo aminas se añaden y se mezclan durante varias horas a temperatura ambiente. Los componentes portadores de amina también pueden acoplarse a CBFs para producir un enlace de amida estable según lo descrito por Baudys, *Bioconj. Chem.* 9:176- 183, 1998. Esta reacción se puede lograr mediante la adición de tributilamina (TBA) y cloroformiato de isobutilo a una solución del CBF y un componente portador de aminas en dimetilsulfóxido (DMSO) en condiciones anhidras. Componentes portadores de aminas pueden alternativamente acoplarse a OBFs a través de cianalación utilizando reactivos, incluyendo pero no limitado a, bromuro de cianógeno (CNBr), tetrafluoroborato de N- cianotrietilamonio (CTEA), tetrafluoroborato de 1- ciano- 4- (dimetilamino)- piridinio (CDAP), y p- nitrofenilcianato (pNPC). Las reacciones CNBr pueden llevarse a cabo a un pH ligeramente básico en solución acuosa. Las reacciones CDAP se llevan a cabo en una mezcla de DMSO y agua a pH ligeramente básico con trietilamina (TEA) como catalizador. En ciertas realizaciones, los Componentes portadores de aminas pueden conjugarse a BBFs, por ejemplo, a través de acoplamiento de glutaraldehído en soluciones acuosas amortiguadas que contienen piridina seguido de un apagado con glicina. En ciertas realizaciones, los Componentes portadores de aminas pueden conjugarse con estructuras teniendo aldehídos mediante un procedimiento de acoplamiento de Base Schiff seguido por reducción (por ejemplo, ver Hermanson en *Bioconjugate Tecniques*, 2 ª edición, Academic Press, 2008 y referencias allí citadas, así como Mei.. en Pharm Res 16:. 1680- 1686, 1999 y referencias allí citadas). En pocas palabras, una estructura con aldehídos terminales activados (por ejemplo, acetaldehído, propionaldehído, butiraldehído, etc) se disuelve en un buffer acuoso con un pH igual o inferior a neutral para evitar la hidrólisis de aldehído indeseada. El número deseado de equivalentes de un

componente portador de aminas se agregan y se mezclan a temperatura ambiente, seguido por la adición de un exceso de agente reductor adecuado (por ejemplo, borohidruro de sodio, cianobrohidruro de sodio, triacetoxiborohidruro borano piridina, trietilamina borano, etc.)

En varias realizaciones, los componentes con hidroxilo pueden conjugarse a OBFs de acuerdo con el procedimiento de divinilsulfona (DVS). Utilizando este procedimiento, el OBF se agrega a un buffer de de bicarbonato de pH 11,4 y se activa con DVS seguido por la adición de un componente con hidroxilo después de que la glicina es añadida para neutralizar y detener la reacción. Los componentes con hidroxilo también pueden acoplarse a OBFs utilizando fracciones de éster activado como se describe anteriormente para producir enlaces de éster.

En varias realizaciones, los componentes con sulfhidrilo pueden acoplarse a estructuras con maleimida (MBFs), utilizando un procedimiento relativamente suave para producir enlaces de tioéter (por ejemplo, ver Hermanson en *Bioconjugate Tecniques*, 2 ª edición, Academic Press, 2008 y referencias allí citadas). Debido a que el grupo maleimida es mucho menos susceptible a la hidrólisis que los ésteres activados, la reacción puede llevarse a cabo en condiciones acuosas. En pocas palabras, un MBF, se disuelve en una solución acuosa a un pH de 6.5 a 7.5 seguido del número deseado de equivalentes de componente teniendo sulfhidrilo. Después de mezclar a temperatura ambiente durante varias horas, el conjugado acoplado con tioéter puede purificarse. Los componentes con sulfhidrilo también pueden conjugase a NBFs de acuerdo con un método descrito por Thoma, *J. Am. Chem. Soc.* 121:5919- 5929, 1999. Esta reacción implica la suspensión del NBF en dimetilformamida anhidra (DMF), seguido por la adición de 2,6- lutidina y anhídrido ácido y la posterior purificación del intermedio reactivo. Luego se agrega un componente con sulfhidrilo a una solución del intermedio en DMF con trietilamina.

En varias realizaciones, los componentes con azida pueden acoplarse a una estructura teniendo alquino (ABF) utilizando una versión moderna catalizada por cobre (I) por la de la Huisgen de tipo azida- alquino cicloadición para proporcionar 1,2 ,3- triazol 1,4- di- sustituido (por ejemplo, ver Dondoni, *Chem Asian J.* 2:700 - 708, 2007 y referencias allí citadas, así como también Dedola, *Org. Biomol Chem* 5. 1006- 1017, 2007). Esta reacción, comúnmente conocida como reacción "clic", puede ser llevada a cabo por ejemplo en THF puro utilizando N,N-diisopropiletilamina y $Cu(PPh_3)_3Br$ como el sistema catalizador (por ejemplo, ver Wu, *Chem. Commun* . 5775- 5777, 2005). La reacción también puede llevarse a cabo en una mezcla 3:1 (THF: agua) utilizando ascorbato de sodio y $CuSO_4$ $5H_2O$- como el sistema catalizador (por

ejemplo, ver Wu, arriba.). En cualquier caso, el componente que tiene azida se añade al ABF en el número deseado de equivalentes seguido de la mezcla durante 12- 48 horas a temperatura ambiente. Por otra parte, los componentes con alquino se puede conjugar con una estructura que tiene azida utilizando exactamente las mismas condiciones descritas anteriormente.

Ciertos componentes pueden poseer naturalmente más de una misma fracción químicamente reactiva. En algunos ejemplos, es posible elegir el tipo de reacción química y las condiciones de reaccionar de forma selectiva el componente en sólo uno de esos sitios. Por ejemplo, en el caso donde la insulina se conjuga a través de aminas reactivas, en ciertas realizaciones, el α- Phe- Bl N- terminal es un sitio preferido de fijación sobre α- Gly- Al y ε- Lys- B29 N- terminal para preservar la bioactividad de la insulina (por ejemplo, ver Mei, Pharm Res 16: 1680- 1686, 1999 y referencias allí citadas, así como Tsai, J. Pharm Sci. 86. 1264 a 1268, 1997). En una reacción de ejemplo entre la insulina con hexadecenal (una molécula terminada por aldehído), los investigadores descubrieron que la mezcla de los dos componentes durante la noche en una solución acuosa de salicilato de sodio 1.5 M pH 6,8 que contiene 54% de isopropanol en una proporción de 1:6 (insulina: aldehído mol/mol) en presencia de cianoborohidruro de sodio resultó en la conversión de más del 80% a la de un solo sustituido Phe- Bl amina secundaria conjugado producto (Mei., Pharm. Res.. 16:1680- 1686, 1999). Sus estudios mostraron que la elección del solvent, pH, y la relación insulina:aldehído todos afectaron la selectividad y el rendimiento de la reacción. En la mayoría de los casos, sin embargo, el logro de la selectividad a través de la elección de las condiciones de reacción química es difícil. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, puede ser ventajoso proteger selectivamente el componente (por ejemplo, insulina) en todos los sitios que no sea el deseado para la reacción seguido por un paso de desprotección después de que el material se ha reaccionado y purificado. Por ejemplo, hay numerosos ejemplos de la protección selectiva de los grupos amina de insulina disponibles en la literatura, incluyendo aquellos que se pueden desproteger en condiciones ácidas (BOC), ligeramente ácidas (anhídrido citracónico), y alcalinas (MSC) (por ejemplo, ver Tsai, *J. Pharm Sci.* 86: 1264- 1268, 1997, Dixon, *Biochem J.* 109: 312- 314, 1968, y Schuettler, *D. Brandenburgo Hoppe Seyler Physiol Chem.* 360: 1721, 1979). En un ejemplo, las aminas Gly- Al y Lys- B29 pueden ser selectivamente protegidas con grupos tert- butoxicarbonilo (BOC) que luego se eliminan después de la conjugación mediante incubación de una hora a 4 ° C en ácido trifluoroacético al 90% (TFA)/solución de anisol al 10%. En una

realización, un polvo seco de insulina se disuelve en DMSO anhidro seguido por un exceso de trietilamina. A esta solución, aproximadamente dos equivalentes de solución de dicarbonato de di- tert- butilo en THF se adicionan lentamente y la solución se deja mezclar durante 30- 60 minutos. Después de la reacción, la solución cruda se vierte en un exceso de acetona seguido por la adición gota a gota de HCl diluido para precipitar la insulina reaccionada. El material precipitado se centrifuga, se lavó con acetona y se secó por completo al vacío. El producto protegido di- BOC puede ser separado de la insulina que no ha reaccionado, isómeros di- BOC indeseados, y subproductos de mono- BOC y tri- BOC utilizando HPLC de fase reversa preparativa o cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, ver Tsai, *J. Pharm. Sci.* 86:. 1264- 1268, 1997). En el caso de HPLC de fase reversa, una solución del producto crudo en 70% agua/30% acetonitrilo que contiene TFA al 0.1% se carga en una columna C8 y se eluye con un gradiente de acetonitrilo en aumento. El pico de di- BOC se recolecta, se rotoevaporó para eliminar el acetonitrilo, y se liofiliza para obtener el producto puro.

LRP^B y PRL^D (conjugación no covalente)

Un experto apreciará que una variedad químicas de conjugación puede utilizarse para conjugar no covalentemente un X con un T y/o W con un T (generalmente "componentes"). Tales técnicas son ampliamente conocidas en el estado de la técnica y técnicas de ejemplo se discuten a continuación. En ciertas realizaciones, la constante de disociación (Ka) del enlace no covalente en suero humano es inferior a 1 pmol/L. Por ejemplo, un componente puede ser unido no- covalentemente a una estructura conjugada a través de un par ligando- receptor no covalente como se conoce bien en el estado de la técnica (por ejemplo, sin limitación un par con base en biotina- avidina). En tal realización, uno miembro del par ligandos- receptor se une covalentemente al componente, mientras que el otro miembro del par se une covalentemente a la estructura conjugada. Cuando el componente y la estructura conjugada se combinan, la fuerte interacción no covalente entre el ligando y su receptor hace que el componente se una de manera no covalente a la estructura conjugada. Pares ligando/receptor típicos incluyen pares proteína/co-factor y enzima/sustrato. Además del par biotina/avidina comúnmente utilizado, estos incluyen, sin limitación, los pares biotina/estreptavidina, digoxigenina/anti- digoxigenina, FK506/proteina fijadora de FK506 (FKBP), rapamicina/FKBP, ciclofilina/ciclosporina y glutationa/transferasa de glutaniona. Otros pares ligando/receptor apropiados serán reconocidos por los expertos en estado

de la técnica, por ejemplo, anticuerpos monoclonales pareados con un rótulo de epítopo tales como, sin limitación, glutationa- S- transferasa (GST), c- myc, FLAG ® y adicionalmente aquellos descritos en Kessler *Advances in Mutagenesis* " Ed. by Kessler, Springer- Verlag, 1990; *"Affinity Chromatography: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)"* Ed. by Pascal Baillon, Humana Press, 2000; and *"Immobilized Affinity Ligand Techniques"* by Hermanson, Academic Press, 1992.

k y q

k es un entero de 1 a 12, inclusive. En ciertas realizaciones, k = 1 a 6, por ejemplo, 1, 2, o 3. q es un entero de 1 a 4, inclusive, y define el número de grupos D que están unidos al grupo [A] central. En ciertas realizaciones, q = 1. En algunas realizaciones, q = 2. En ciertas realizaciones, k + q es un número entero de 2 a 6 inclusive. En ciertas realizaciones, k + q = 2, 3 o 4.

p y m

Cada ocurrencia de p es independientemente un entero de 1 a 5, inclusive. En ciertas realizaciones, cada ocurrencia de p es igual. En ciertas realizaciones, p = 1, 2 o 3. En ciertas realizaciones, p = 1.

Cada ocurrencia de m es independientemente un entero de 1 a 5, inclusive. En ciertas realizaciones, cada ocurrencia de m es igual. En ciertas realizaciones, m = 1, 2 o 3. En ciertas realizaciones, m = 1.

n y v

Cada ocurrencia de n es independientemente un entero de 0 a 5, inclusive, con la salvedad de que dentro de cada ramificación k por lo menos una ocurrencia de n es $\geq$ 1. Las ramificaciones dentro de una determinada ramificación k son conocidas como ramificaciones n.

En ciertas realizaciones, cada aparición de [A] en una fracción p- entre paréntesis se sustituye por un número de fracciones n entre corchetes que corresponden a un valor de n $\geq$ 1, por ejemplo, ver la fórmula (la) más arriba. En algunas realizaciones, cada aparición de n en el conjugado es igual. En algunas de estas realizaciones, n = 1 o 2.

En otras realizaciones, solamente las ocurrencias terminales de [A] en una fracción p- entre corchetes son sustituidas por un número de n fracciones entre corchetes que corresponden a un valor de $n \geq 1$, por ejemplo, ver la fórmula (Ib) anterior. En ciertas realizaciones, cada ramificación k incluye sólo una ocurrencia de $n \geq 1$ (es decir, todos las otras ocurrencias de n = 0). En algunas de estas realizaciones, cada aparición de n en el conjugado es igual. En algunas de estas realizaciones, n = 1 o 2.

Cada ocurrencia de v es independientemente un entero entre 0 y 5, inclusive, con la salvedad de que dentro cada ramificación- k al menos ona ocurrencia de v es ≥ 1.

En ciertas realizaciones, cada aparición de [A] en una fracción m- entre paréntesis se sustituye por un número de fracciones B correspondiente al valor de $v \geq 1$, por ejemplo, ver la fórmula (Ic) anterior. En algunas realizaciones, cada ocurrencia de v en el conjugado es la misma. En algunas de estas realizaciones, v = 1 o 2.

En otras realizaciones, solamente las ocurrencias terminales de [A] en una fracción m- entre corchetes son sustituidas por una serie de fracciones B correspondientes a un valor de $v \geq 1$, por ejemplo, ver la fórmula (Id) anterior. En ciertas realizaciones, cada ramificación- k incluye sólo una ocurrencia de $v \geq 1$ (es decir, todos los otros casos de v = 0). En algunas realizaciones, cada ocurrencia de v en el conjugado es la misma. En algunas de estas realizaciones, v = 1 o 2. En ciertas realizaciones, cada ramificación n incluye al menos una ocurrencia de $v \geq 1$. En ciertas realizaciones cada ramificación n incluye sólo una ocurrencia de $v \geq 1$ (es decir, todas las ocurrencias de v = 0). En algunas realizaciones, cada ocurrencia de v en el conjugado es igual. En algunas de estas realizaciones, v = 1 o 2.

j

j de la fórmula (II) es un entero de 1 a 4, inclusive, y define el número de conjugaciones en el grupo D. En ciertas realizaciones, j = 1. En ciertas realizaciones, j = 2. En algunas realizaciones, j = 3. En otras realizaciones, j = 4.

Carga farmacológica

En general, la cantidad de fármaco que se carga en un conjugado puede controlarse mediante el ajuste del peso molecular de la estructura conjugada y/o el nivel de activación

química (es decir, cuando los grupos pendientes se añaden a la estructura). En varias realizaciones, el nivel de carga farmacológica puede estar en el rango de 5 a 99% por peso de fármaco a conjugado. En varias realizaciones, niveles de carga dentro del rango más reducido de 50 a 99% pueden utilizarse, por ejemplo, en el rango de 80 a 99%.

Otros

Se debe entender que mientras que las secciones anteriores describen los componentes de los conjugados (por ejemplo, ligando, fármaco, estructura) en diferentes puntos, la presente divulgación comprende conjugados que se componen de todos y cada uno de los ligandos, fármacos y estructuras divulgados.

Intermedios para la preparación de los conjugados

En un aspecto, la presente divulgación proporciona reactivos para la preparación de conjugados. Así, en varias realizaciones, se proporciona un compuesto de fórmula general (I) en donde:

cada $\boxed{A}$, T, D, k, q, q + q, p, n, m, v se definen como se describió anteriormente;

- B es T- L^B, y

cada ocurrencia de L^B es independientemente hidrógeno, una fracción que contiene alquino, una fracción que contiene azida, o una fracción opcionalmente sustituida reactiva de carbonilo, reactiva de tiol, reactiva de amina, o reactiva de hidroxilo.

En otras realizaciones, se proporciona un compuesto de fórmula general (I) en donde:

cada $\boxed{A}$, T, B, k, q, k + q, p, n, m, y v se definen como se describió anteriormente;

- D es- T- L^D, y

cada ocurrencia de L^D es independientemente hidrógeno, una fracción que contiene alquilo, una fracción que contiene azida, o una fracción opcionalmente sustituida reactiva de carbonilo, reactiva de tiol, reactiva de amina, o reactiva de hidroxilo.

Métodos para la preparación de conjugados

Como se describe en los ejemplos, hemos ejemplificado métodos para la preparación de los conjugados antes mencionados utilizando insulina como un fármaco de ejemplo y

aminoetilglucosa (AEG), aminoetilmanosa (AEM), aminoetilbimanosa (AEBM), aminoetiltrimanosa (AETM), aminoetilfucosa (AEF), β- aminoetil- N- acetilglucosamina (AEGA) como ligandos de ejemplo. Sin limitación, los conjugados con dos ligandos por sitio de conjugación y con distancias cortas entre todos los componentes de la estructura se puede preparar con tris(hidroximetil)aminometano(Tris), aminotriacetato de tris- succinimidilo (TSAT), tris- succinimidil- 1,3.5- bencenotricarboxilato (TSB), y el benceno- 1, 3, 5- tricarboxi- (N- 4- butírico- NHS- éster)amida (TSB- C4) como estructuras de conjugados. Si se desea más espacio entre los componentes de la estructura, entonces puede utilizarse (6- aminocaproil) aminotriacetato de succinimidilo (TSAT- C6), (6- amino (PEO- 6)) aminotriacetato de succinimidilo (TSAT- PEO- 6), benceno- 1,3.5- tricarboxi- (éster NHS N- 6- aminocaproico)amida (TSB- C6), y el benceno- 1,3.5- tricarboxi- (éster aminodecanoico- N- 10 NHS) amida (TSB- C10). La química de brazo separador TSAT- C6 imparte carácter más hidrofóbico que el conjugado, en comparación con TSAT- PEO- 6.

Por ejemplo, para fines de ilustración, en una realización, tanto el ligando (por ejemplo, AEG, AEM, AEMB y AETM) como la insulina se pueden hacer reaccionar con una estructura TSAT- C6 a través de ésteres terminales activados para producir conjugados de insulina TSAT- C6- AEG- 2, TSAT- C6- AEM- 2- insulina, insulina TSAT- C6- AEMB- 2, e insulina TSAT- C6- AETM- 2. Los diferentes ligandos se sintetizan de antemano como se indica en los ejemplos. En algunas realizaciones, los grupos amino A1 y B29 de la insulina son BOC- protegidos como se describe en los ejemplos de manera que cada insulina sólo puede reaccionar en el grupo α- amino Phe- Bl. En algunas realizaciones, los grupos amino Bl y B29 de insulina son BOC- protegidos como se describe en los ejemplos de manera que cada insulina sólo puede reaccionar en el grupo α- amino Gly- Al. Aproximadamente un equivalente de BOC- insulina como una solución de 40- 50 mg/ml en DMSO se añade a la temperatura ambiente a una solución de 50 mg/ml de TSAT- C6 en DMSO que contiene exceso de trietilamina y se deja reaccionar durante una hora aproximadamente. A continuación, un exceso de AEG, AEM, AEBM, y/o AETM (2- 10 equivalentes) como 100 mg/ml de solución en DMSO se añade y se deja reaccionar durante 2 horas más. Después de la reacción, la solución de DMSO es superdiluida por l0x en un buffer salino a pH de 5 después de lo cual se ajusta el pH a 8.0 y la solución se pasa por una columna P2 Biogel para eliminar los reactivos de bajo molecular y sales. El material eluyendo en la fracción vacía se concentra utilizando un aparato de ultrafiltración 3K después de lo cual se

inyecta sobre una columna HPLC de fase inversa a escala preparativa (C8, acetonitrilo/agua de la fase móvil que contiene 0.1% de TFA) para purificar el producto deseado a partir de insulina BOC2 sin reaccionar. El pico de elución deseado se recoge y se rotoevaporó para eliminar acetonitrilo seguido de liofilización para obtener un polvo seco. Finalmente, los grupos protectores BOC se eliminan mediante la disolución del polvo liofilizado en un TFA al 90%/ anisol al 10% durante una hora a 4 ° C seguido por superdilución 10x en buffer HEPES pH 8.2 que contiene NaCl 0.150 M. Se ajusta el pH entre 7.0 y 8.0 utilizando una solución de NaOH después de lo cual el material se pasa a través de una columna Biogel P2 para eliminar anisol, BOC, y cualquier otras sales contaminantes. La solución conjugada acuosa purificada desprotegida luego se concentra al nivel deseado y se almacena a 4 ° C hasta que se necesite.

En otro aspecto, la reacción puede tener lugar en el grupo B29 épsilon- amino utilizando insulina no protegida en buffer de carbonato, ya que en esas condiciones, el grupo amino B29 es el más reactivo de los tres grupos amino presentes en la insulina tipo silvestre. En una síntesis de ejemplo, la estructura que contiene ésteres activados N- terminales se disuelve en 60 mM en DMSO anhidro seguido por la adición de trietilamina (TEA). La solución se agita rápidamente durante 10 minutos a temperatura ambiente. Al mismo tiempo, una solución 448 mM de ligando se prepara en un volumen apropiado de DMSO anhidro. Una vez disuelta, suficiente solución de ligando se agrega gota a gota en el transcurso de diez minutos para proporcionar una serie de equivalentes reactivos igual a 1.5 veces el número de grupos éster activado en la estructura, N, menos uno. Por ejemplo, si hay N = 3 grupos éster activados iníciales por estructura, entonces se agrega (3x (4- l) x60mM/370 mm) = 0,973 ml de solución de ligando. Si hay N = 4 grupos éster activado iníciales por estructura, entonces (3x (4- l) x60mM/370 mM) = 1,46 ml de solución de ligando se añaden, y así sucesivamente. Después de agregar la solución de ligandos, la solución se agita durante una hora a temperatura ambiente.

Luego el fármaco portador de amina se disuelve por separado en 17.2 mM en buffer de carbonato de sodio (0.1 M, pH 11) y el pH se ajustó posteriormente a 10.8 con hidróxido de sodio 1.0 N. Una vez disuelta, toda la solución de estructura/DMSO/ligando/TEA se agrega gota a gota a lo largo de 75 minutos a la solución de fármaco/buffer de carbonato. Durante la adición, el pH de la mezcla resultante se ajusta cada 5 minutos a 10.8 si es necesario utilizando HCl diluido o NaOH. La solución se dejó en agitación durante 15 minutos después de la adición gota a gota para asegurar la reacción completa.

Luego la solución resultante se superdiluyó por 10x en una solución salina amortiguada HEPES 20 mM pH 5.0 conteniendo NaCl 0.150 M seguido por el ajuste del pH con HCl diluido a un pH final de 8.0. La solución acuosa es purificada primero mediante exclusión por tamaños con una fase sólida adecuada para la separación deseada de materiales conjugados y no conjugados. La solución que pasa por el volumen vacío de la columna se concentra utilizando una membrana de ultrafiltración de tamaño adecuado a aproximadamente 40 ml. Esta solución se purifica para obtener el producto deseado utilizando HPLC preparativa de fase inversa. Una vez recolectada, la solución se rotoevaporó para eliminar acetonitrilo y se liofiliza para obtener conjugado puro.

Además, bajo condiciones de buffer de carbonato, el grupo amino A1 es el segundo grupo amino más reactivo de insulina tipo silvestre. Así, en ciertas realizaciones, los conjugados de insulina A1, B- 29- disustituidos son sintetizados usando las condiciones descritas anteriormente con aproximadamente diez veces la cantidad de estructura de éster activo multivalente y ligando por molécula de insulina en comparación con la síntesis de conjugado de insulina B29- monosustituido.

En otro aspecto, los conjugados de insulina B- 29- monosustituidos son sintetizados usando secuencias aminoácidas protectoras N- terminales utilizando métodos similares a los reportados en la Patente estadounidense. No. 7.402.565. Especificamente, las secuencias peptídicas N- terminales se modifican sobre la cadena A y la cadena B de insulina de tal manera que las secuencias aminoácidas protectoras contienen Arg^{A0} y Arg^{B0} para proporcionar un intermedio de insulina. La conjugación tiene lugar en Lys^{B29} sobre el intermedio de insulina, mientras los extremos N están protegidos contra sub- productos de conjugación. El intermedio de insulina conjugado se trata con tripsina para escindir las secuencias aminoácidas protectoras N-terminales para proporcionar un conjugado de insulina en el que únicamente Lys^{B29} se conjuga. En algunas realizaciones, el intermedio de insulina se deriva de un precursor de la insulina de cadena sencilla como se describe en la patente estadounidense. No. 7.402.565. En algunas realizaciones, el intermedio de insulina es un mutante que contiene un sitio de conjugación diferente de Lys^{B29} y se realiza una síntesis análoga a la descrita para Lys^{B29}.

Se puede apreciar que estos procedimientos de ejemplo pueden ser utilizados para producir otros conjugados con diferentes ligandos y moléculas de la insulina, químicas de conjugación diferentes, diferentes separaciones entre los componentes de la estructura, y/o

diferentes valencias sustituyendo la estructura TSAT- C6, con una estructura diferente según se describe a continuación.

Por ejemplo, si aún se requiere más distancia entre los componentes de la estructura y/o una se require una carga preservada en el sitio de conjugación, entonces un acetal de dietilo portador de aminas de tamaño adecuado (por ejemplo, aminopropionaldehido dietil acetal (APDA) o aminobutiraldehido dietil acetal (ABDA)) se puede conjugar con uno de los grupos reactivos sobre las estructuras en el listado en la presente seguido por reacción completa de los restantes grupos reactivos con el ligando de interés (por ejemplo, AEM, AEBM, o AETM). Un grupo aldehído reactivo puede ser revelado desde el dietil acetal bajo condiciones ácidas seguido de una aminación reductora con la insulina para completar el paso de la conjugación de insulina después ABDA- TSAT, ABDA- LCTSAT, etc pueden ser empleados.

En otro ejemplo, tetrakis- (N- succinimidil- carboxipropil)pentaeritritol (TSPE), puede ser utilizado para fijar tres ligandos por sitio de conjugación para multivalencia aumentada. También será apreciado por los expertos en el estado de la técnica que cualquiera de las enseñanzas anteriores se pueden utilizar para producir conjugados hiperramificados (por ejemplo, tipo dendrímeros) con valencias de orden aún mayores. Por ejemplo, Rockendorf y Lindhorst proporcionan una revisión exhaustiva de los enfoques actuales para la producción de estructuras hiperramificadas en *Topics in Current Chemistry.* 217: 202- 238, 2001.

Por otra parte, los ligandos que contienen ya un grado predeterminado de multivalencia de nuevo se pueden hacer reaccionar de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente para producir órdenes aún mayores de la multiplicidad de ligandos. Por ejemplo, una molécula divalente AEM- 2, AEBM- 2, o AETM- 2 que contiene una amina reactiva terminal puede ser preparada por la conjugación de dos de cada ligando con una estructura adecuada con la cual una amina reactiva también se conjuga. Una molécula trivalente AEM- 3, AEBM- 3, o AETM- 3 que contiene una amina reactiva terminal puede ser preparada por la conjugación de tres de cada ligando con una estructura adecuada con la cual una amina reactiva también se conjuga. Los sacáridos NH2- divalentes pueden reaccionar con las mismas estructuras descritas anteriormente para producir conjugados de insulina con 4 y 6 ligandos por molécula de insulina. Los sacáridos NFL- trivalentes se pueden hacer reaccionar con las mismas estructuras descritas anteriormente para producir conjugados farmacológicos con 6 y 9 ligandos por molécula de insulina.

En todos los casos, se debe reconocer que una mezcla de diferentes ligandos se puede conjugar con la misma molécula de insulina a través de una estructura multivalente mediante el ajuste de la química de la estructura, valencia, y la estoiquiometría de ligando: estructura. Por ejemplo, la AEM- 1- AEBM- 1- insulina, la AEBM- 1- AETM- 1- insulina, la AEM- 2- AETM- 2- insulina, y la AEM- 1- 2- AETM- insulina todas se pueden sintetizar según este método de ligandos mixtos.

En algunos casos, puede ser deseable conjugar el ligando con la estructura a través de un medio diferente de la molécula de insulina. Por ejemplo, una maleimida divalente/estructura funcionalizada por éster activado monovalente (por ejemplo, succinimidil- 3, 5- dimaleimidofenil benzoato (SDMB)) pueden utilizarse para conjugar dos ligandos funcionalizados de sulfhidrilo y una molécula de insulina en pasos separados. Por ejemplo, una molécula de insulina se puede conjugar con la porción de éster activado de la estructura mediante los métodos descritos en este documento. En un paso separado, el sacárido aminoetilo (AEM, AEBM, AETM) se puede convertir en un ligandos con sulfhidrilo terminal mediante reacción con 4- iminotiolano. Finalmente, el conjugado de la estructura- di- maleimida- insulina puede mezclarse con un exceso de sacárido funcionalizado por sulfhidrilo para producir el conjugado de insulina de ligando divalente resultante.

Formulaciones de entrega sostenida

Como se discutió en los ejemplos, en ciertas realizaciones, puede ser ventajoso administrar un conjugado de manera sostenida (es decir, en una forma que presenta un perfil de absorción que es más sostenido que la insulina humana recombinante soluble). Esto proporcionará un nivel sostenido de conjugado que puede responder a las fluctuaciones en glucosa sobre una escala de tiempo que más estrechamente relacionado con la escala de tiempo de fluctuaciones de glucosa típicas (es decir, las horas en cambio de minutos). En ciertas realizaciones, la formulación de entrega sostenida pueden exhibir una entrega de orden cero del conjugado cuando se administra a un mamífero, en ausencia de condiciones de hiperglicemia (es decir, en ayunas).

Se puede apreciar que cualquier formulación que ofrece un perfil de absorción sostenida puede ser utilizada. En ciertas realizaciones, la absorción sostenida se puede lograr mediante la combinación del conjugado con otros ingredientes que disminuyen sus propiedades de entrega a

la circulación sistémica. Por ejemplo, las formulaciones PZI (insulina protamina zinc) pueden utilizarse para este propósito. Como se describe en los ejemplos, hemos encontrado que en ciertas realizaciones el perfil de absorción y la estabilidad de las formulaciones PZI preparadas con conjugados de insulina amorfos son sensibles a las cantidades absolutas y relativas de protamina y zinc incluidas en la formulación. Por ejemplo, mientras las formulaciones de insulina comerciales PZI y NPH (protamina neutral Hagedorn) sólo requieren de 0,05 a 0,2 mg de protamina/mg de insulina, algunas preparaciones de conjugados PZI requieren de 1 a 5 mg de protamina/mg de conjugado con el fin de mantener la eficacia del perfil de absorción. Por otra parte, mientras que las preparaciones de insulina de protamina comerciales contienen alrededor de 0.006 mg de zinc/mgde insulina, hemos encontrado que el aumento de la concentración de zinc junto con la concentración de protamina puede, en ciertas realizaciones, conducir a formulaciones más estables de fácil dispersión. En algunos casos, el contenido de zinc se encuentra en el rango de 0,05 a alrededor de 0,5 mg de zinc/mg de conjugado. Además, también hemos encontrado, inesperadamente, que en ciertas realizaciones, los conjugados de insulina sustituidos en el grupo Bl- amina requieren más protamina y zinc para mantener con eficacia del perfil de entrega frente a un conjugado de insulina sustituido en el grupo B29- amina. La presente divulgación abarca formas amorfas y cristalinas de estas formulaciones PZI.

Así, en ciertas realizaciones, una formulación de la presente divulgación incluye entre 0.05 y 10 mg de protamina/mg de conjugado. Por ejemplo, desde 0.2 a 10 mg de protamina/mg de conjugado, por ejemplo, de 1 a 5 mg de protamina/mg de conjugado.

En ciertas realizaciones, una formulación de la presente invención incluye de aproximadamente 0,006 a alrededor de 0,5 mg de zinc/mg de conjugado. Por ejemplo, de 0,05 a 0,5 mg de zinc/mg de conjugado, por ejemplo, entre 0.1 y 0,25 mg de zinc/mg de conjugado.

En ciertas realizaciones, una formulación de la presente divulgación incluye protamina y zinc en una relación (peso/peso) en el rango de alrededor de 100:1 a 5:1, por ejemplo, de 50:1 a 5:1 aproximadamente, por ejemplo, de 40:1 a 10:1 aproximadamente. En ciertas realizaciones, una formulación PZI de la presente invención incluye protamina y zinc en una relación (peso/peso) en el rango de 20:1 a 5:1 aproximadamente, por ejemplo, 20:1 a 10:1 aproximadamente, 20:1 a 15:1 aproximadamente, 15:1 a 5:1 aproximadamente, 10:1 a 5:1 aproximadamente, 10:1 a 15:1 aproximadamente.

Los Ejemplos también describen los beneficios de incluir uno o más de los siguientes componentes de una formulación PZI: un conservante antimicrobiano, un agente isotónico, y/o una molécula de insulina sin conjugar.

En ciertas realizaciones, una formulación de la presente invención incluye un conservante antimicrobiano (por ejemplo, m- cresol, fenol, metilparabeno o propilparabeno). En ciertas realizaciones, el conservante antimicrobiano es m- cresol. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, una formulación puede incluir del 0.1 al 1.0% por volumen de m- cresol. Por ejemplo, de 0.1 a 0,5% por volumen de m- cresol, por ejemplo, alrededor de 0.15 a 0,35% por volumen de m-cresol.

En ciertas realizaciones, una formulación de la presente invención incluye un poliol como agente isotónico (por ejemplo, manitol, glicol de propileno o glicerol). En ciertas realizaciones, el agente isotónico es el glicerol. En ciertas realizaciones, el agente isotónico es una sal, por ejemplo, NaCl. Por ejemplo, una formulación puede comprender de 0,05 a 0,5 M NaCl, por ejemplo, entre 0,05 y 0,25 M de NaCl o entre 0.1 y 0,2 M de NaCl.

En ciertas realizaciones, una formulación de la presente divulgación incluye una cantidad de la molécula de la insulina no conjugada. En ciertas realizaciones, una formulación incluye una relación molar de la molécula de insulina conjugada a la molécula de insulina no conjugada en el rango de 100:1 a 1:1 aproximadamente, por ejemplo, 50:1 a 2:1 aproximadamente o 25:1 y 2:1 aproximadamente.

La presente divulgación también incluye el uso de formulaciones de entrega sostenida estándares (también conocidas como formulaciones extendidas) son bien conocidas en el estado de la técnica de formulación moléculas pequeñas (por ejemplo, ver *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19 ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995). La presente divulgación también abarca el uso de dispositivos que se basan en bombas o difusión obstruida para liberar un conjugado de forma gradual. En ciertas realizaciones, una formulación de acción prolongada puede (adicionalmente o alternativamente) proporcionarse mediante el uso de una molécula de insulina modificada. Por ejemplo, se podría utilizar insulina glargina (Lantus ®) o insulina detemir (Levemir ®) en lugar de insulina humana tipo silvestre en la preparación del conjugado. La insulina glargina es un análogo de insulina de acción prolongada de ejemplo en el que Asp-A21 ha sido sustituido por glicina, y dos argininas se han añadido al extremo C de la cadena B. El efecto de estos cambios es cambiar el punto isoeléctrico, produciendo una solución que es

completamente soluble a pH 4. La insulina detemir es otro análogo de insulina de acción prolongada en el que Thr- B30 se ha eliminado, y una cadena de ácido graso C14 se ha fijado a Lys- B29.

Usos de los conjugados

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para utilizar los conjugados. En general, los conjugados se pueden utilizar para proporcionar de forma controlada un fármaco bioactivo en respuesta a un sacárido (por ejemplo, glucosa o un sacárido exógeno tal como manosa, alfa- metil- manosa, L- fucosa, etc como se describe en este documento). La divulgación abarca el tratamiento de una enfermedad o condición mediante la administración de un conjugado de la presente divulgación. Aunque los conjugados pueden utilizarse para tratar cualquier paciente (por ejemplo, perros, gatos, vacas, caballos, ovejas, cerdos, ratones, etc), preferiblemente son los más utilizados en el tratamiento de humanos. Un conjugado puede administrarse a un paciente mediante cualquier ruta. En general la vía de administración más adecuada dependerá de una variedad de factores incluyendo la naturaleza de la enfermedad o la afección a tratar, la naturaleza del fármaco, la condición del paciente, etc. En general, la presente divulgación incluye la administración por vía oral , intravenosa, intramuscular, intraarterial, subcutánea, intraventricular, transdérmica, rectal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (como por polvos, pomadas o gotas), bucal, o como un spray nasal u oral o en aerosol. Consideraciones generales en la formulación y fabricación de composiciones farmacéuticas para estas diferentes vías se pueden encontrar, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19a ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. En varias realizaciones, el conjugado puede administrarse por vía subcutánea, por ejemplo, por inyección. El conjugado puede disolverse en un vehículo para facilitar la entrega. Por ejemplo, el vehículo puede ser una solución acuosa, que incluye pero no se limita a, agua estéril, solución salina o solución salina amortiguada.

En general, una cantidad terapéuticamente efectiva de un fármaco en forma de un conjugado será administrada. Por una "cantidad terapéuticamente efectiva" de una fármaco se entiende una cantidad suficiente del fármaco para tratar la enfermedad o condición en una relación razonable beneficio/riesgo, lo que implica un equilibrio entre la eficacia y toxicidad del fármaco. En general, la eficacia terapéutica y la toxicidad pueden determinarse mediante procedimientos farmacológicos estándares en cultivos celulares o con animales experimentales,

por ejemplo, mediante el cálculo de la ED_{50} (la dosis que es terapéuticamente efectiva en el 50% de los sujetos tratados) y la DL_{50} (la dosis que es letal para el 50% de los sujetos tratados). La ED_{50}/LD_{50} representa el índice terapéutico del fármaco. Aunque en general los fármacos que tienen un índice terapéutico grande son los preferidos, como se conoce bien en el estado de la técnica, un menor índice terapéutico puede ser aceptable en el caso de una enfermedad o condición seria, especialmente en la ausencia de opciones terapéuticas alternativas. La selección final de un rango apropiado de dosis para la administración a los seres humanos está determinada en el curso de los ensayos clínicos.

En varias realizaciones, el fármaco es insulina y la dosis media diaria de insulina está en el rango de 10 a 200 U, por ejemplo, de 25 a 100 U (donde 1 unidad de insulina es de ~ 0,04 mg). En ciertas realizaciones, una cantidad de conjugado con estas dosis de insulina se administra sobre una base diaria. En ciertas realizaciones, una cantidad de conjugado con 5 a 10 veces las dosis de insulina se administra una vez por semana. En ciertas realizaciones, una cantidad de conjugado con 10 a 20 veces las dosis de insulina se administra sobre una base bisemanal. En ciertas realizaciones, una cantidad de conjugado con 20 a 40 veces las dosis de insulina se administra una vez al mes. Los expertos en estado de la técnica reconocen que este mismo método se puede extrapolar a otros fármacos aprobados con rangos de dosis conocidas, por ejemplo, cualquiera de los sensibilizadores de insulina aprobado y secretagogos de insulina descritos en este documento. Típicamente, la dosis del fármaco conjugado será mayor que la dosis normal del fármaco no conjugado.

En ciertas realizaciones, un conjugado de la presente divulgación puede ser utilizado para tratar la hiperglicemia en un paciente (por ejemplo, un paciente mamífero). En ciertas realizaciones, el paciente es diabético. Sin embargo, los métodos actuales no se limitan al tratamiento de pacientes diabéticos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un conjugado puede ser utilizado para el tratamiento de la hiperglicemia en un paciente con una infección asociada con el control glucémico deteriorado. En ciertas realizaciones, un conjugado puede utilizarse para tratar la diabetes.

En ciertas realizaciones, cuando un conjugado o la formulación de la presente divulgación (con una molécula de insulina como el fármaco) se administra a un paciente (por ejemplo, un paciente mamífero) éste induce menos hipoglicemia que una versión conjugada de la molécula de insulina. En ciertas realizaciones, una formulación de la presente divulgación (con

un conjugado que comprende una molécula de insulina como el fármaco) induce a un valor de HbAlc inferior en un paciente (por ejemplo, un paciente mamífero) que una formulación que comprende una versión no conjugada de la molécula de insulina. En ciertas realizaciones, la formulación conduce a un valor de HbAlc que es por lo menos un 10% inferior (por ejemplo, por lo menos un 20% menor, por lo menos un 30% menor, por lo menos un 40% menor, por lo menos un 50% menos) que una formulación que comprende una versión no conjugada de la molécula de insulina. En ciertas realizaciones, la formulación conduce a un valor de HbAlc de menos de 7%, por ejemplo, en el rango de 4 a 6%. En ciertas realizaciones, una formulación que comprende una versión no conjugada de la molécula de insulina conduce a un valor de HbAlc por encima del 7%, por ejemplo, de 8 a 12%.

Se entenderá que el uso diario total de un fármaco para un paciente determinado se decidirá por el médico tratante en el ámbito del criterio médico. La cantidad terapéuticamente efectiva específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores incluyendo la enfermedad o afección que se trata, la actividad del fármaco específico empleado, la composición específica empleada, la edad, peso corporal, salud general, el sexo y la dieta del paciente, el tiempo de administración, vía de administración y la tasa de excreción del fármaco específico empleado, la duración del tratamiento, los fármacos utilizados en combinación o coincidentes con el fármaco específico empleado, y factores similares bien conocidos en las artes médicas. En varias realizaciones, un conjugado de la presente divulgación puede administrarse en más de una ocasión. Por ejemplo, la presente divulgación abarca específicamente los métodos en que se administra un conjugado con una inyección subcutánea a un paciente de forma continua (por ejemplo, una vez al día, una vez cada dos días, una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, etc.)

En varias realizaciones, un conjugado de la presente divulgación puede administrarse a un paciente que está recibiendo al menos una terapia adicional. En varias realizaciones, la al menos una terapia adicional tiene el propósito de tratar la misma enfermedad o trastorno que el conjugado administrado. En varias realizaciones, la al menos una terapia adicional tiene el propósito de tratar un efecto secundario del fármaco principal. Las dos o más terapias pueden administrarse dentro de las estructuras de tiempo iguales, superpuestos o no superpuestos, siempre y cuando no haya un período en que el paciente esté recibiendo un beneficio de ambas terapias. Las dos o más terapias pueden administrarse dentro de las mismas o diferentes

formulaciones siempre y cuando no haya un período en que el paciente esté recibiendo un beneficio de ambas terapias. Las dos o más terapias pueden administrarse dentro de las formulaciones iguales o diferentes, siempre y cuando no haya un período en que el paciente esté recibiendo un beneficio de ambas terapias. En ciertas realizaciones, un único conjugado de la presente divulgación puede incluir más de un fármaco para tratar la misma enfermedad o trastorno. En ciertas realizaciones, dos o más conjugados separados de la presente divulgación pueden administrarse (como una mezcla o de manera separada) incluyendo diferentes fármacos para el tratamiento de la misma enfermedad o trastorno. En ciertas realizaciones, un fármaco secundario no conjugado se puede mezclar con un conjugado de la presente divulgación (es decir, un fármaco que se mezcla simplemente con la formulación de conjugado y no covalentemente unido al conjugado). Por ejemplo, en ciertas realizaciones, cualquiera de estos enfoques puede utilizarse para administrar más de un fármaco antidiabético a un sujeto. Ciertas realizaciones de ejemplo de este enfoque se describen con más detalle más adelante en el contexto de terapias relacionadas con insulina, sin embargo, se podrá apreciar de lo anterior que otras terapias se beneficiarán de tales enfoques de combinación.

Los sensibilizadores de insulina (por ejemplo, biguanidas como la metformina, glitazonas) actúan aumentando la respuesta del paciente a una cantidad determinada de insulina. Por lo tanto un paciente que recibe un sensibilizador de insulina, requiere una dosis más baja de conjugado de insulina de la presente divulgación que un paciente de otra manera idéntico. Así, en ciertas realizaciones, un conjugado de insulina puede administrarse a un paciente que también está siendo tratado con un sensibilizador de insulina. En varias realizaciones, el conjugado de insulina de la presente divulgación puede administrarse hasta el 75% de la dosis normal requerida en ausencia del sensibilizador de insulina. En varias realizaciones, hasta un 50%, 40, 30 o 20 de la dosis normal puede administrarse.

La resistencia a la insulina es un trastorno en el cual las cantidades normales de insulina no son suficientes para producir una respuesta normal a la insulina. Por ejemplo, los pacientes resistentes a la insulina pueden requerir altas dosis de insulina con el fin de superar su resistencia y proporcionar un efecto reductor de glucosa suficiente. En estos casos, las dosis de insulina que normalmente inducen hipoglicemia en pacientes de menos resistentes fallan para ejercer incluso un efecto reductor de glucosa en los pacientes altamente resistentes. Del mismo modo, los conjugados cristalinos de insulina de la presente divulgación sólo son eficaces para esta subclase

de pacientes cuando proporcionan altos niveles de insulina bioactiva en una estructura de tiempo adecuado. En ciertas realizaciones, el tratamiento de esta subclase de los pacientes puede ser facilitado mediante la combinación de los dos enfoques. Así, en ciertas realizaciones, una terapia tradicional basada en insulina se utiliza para proporcionar un nivel básico de insulina y el conjugado de insulina de la presente divulgación se administra para proporcionar un suplemento controlado de insulina bioactiva cuando sea necesario por parte del paciente. Así, en ciertas realizaciones, los conjugados cristalino de insulinas pueden administrarse a un paciente que también está siendo tratado con insulina. En varias realizaciones, la insulina puede administrarse hasta el 75% de la dosis normal requerida en ausencia de un conjugado de la presente divulgación. En varias realizaciones, hasta un 50%, 40, 30 o 20 de la dosis normal puede administrarse. Se puede apreciar que este enfoque de combinación también se puede utilizar con pacientes resistentes a la insulina que están recibiendo un secretagogo de insulina (por ejemplo, una sulfonilurea, GLP- 1, exendina- 4, etc) y/o un sensibilizador de insulina (por ejemplo, una biguanida como la metformina, una glitazona).

Activador exógeno

Como se mencionó anteriormente, los métodos, conjugados y composiciones que se describen en este documento no se limitan a conjugados sensible a la glucosa. Como se demuestra en los ejemplos, varios conjugados sensibles a la glucosa de ejemplo también fueron sensibles a sacáridos exógenos, tales como alfa- metil manosa y L- fucosa. Por lo tanto, se apreciará que en ciertas realizaciones, un conjugado puede ser activado por la administración exógena de un sacárido que no sea la glucosa, tales como alfa- metil manosa y L- fucosa o cualquier otro sacárido que pueda alterar las propiedades PK o PD del conjugado.

Una vez que el conjugado se ha administrado como se describió anteriormente (por ejemplo, como una formulación de entrega sostenida) éste puede ser activado por la administración de un sacárido exógeno adecuado. En una realización determinada, una cantidad activadora del sacárido exógeno se administra. Como se utiliza en la presente, una "cantidad activadora" de sacárido exógeno es una cantidad suficiente para causar un cambio en al menos una propiedad PK y/o PD del conjugado (por ejemplo, Cmax, AUC, la vida media, etc como se indicó anteriormente) . Se debe entender que cualquiera de los métodos antes mencionados de administración para el conjugado se aplican por igual al sacárido exógeno. También se debe

entender que los métodos de administración para el conjugado y sacarido exógeno pueden ser iguales o diferentes. En varias realizaciones, los métodos de administración son diferentes (por ejemplo, para fines de ilustración un conjugado de insulina puede administrarse por inyección subcutánea una vez por semana, mientras que el sacárido exógeno se administra oralmente a diario). La administración oral de un sacárido exógeno es de especial valor, ya que facilita el cumplimiento del paciente. En general, se apreciará que las PK y PD del conjugado de insulina estarán relacionadas con el perfil PK del sacárido exógeno. Por lo tanto, las propiedades PK y PD pueden ser adaptadas mediante el control del perfil farmacocinético del sacárido exógeno. Como es bien sabido en el estado de la técnica, el perfil farmacocinético del sacárido exógena se puede adaptar según la dosis, vía, frecuencia y la formulación utilizada. Por ejemplo, si se desea una activación corta e intensa del conjugado entonces puede utilizarse una formulación oral de entrega inmediata. Por el contrario, si se desea una activación más prologada menos intensa del conjugado entonces una formulación oral de entrega prolongada puede utilizarse en su lugar. Consideraciones generales en la formulación y fabricación de formulación de entrega inmediata y extendida se pueden encontrar, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19 ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995.

También se apreciará que la frecuencia relativa de la administración de un conjugado de la presente divulgación y un sacárido exógeno puede ser igual o diferente. En ciertas realizaciones, el sacárido exógeno se administra con más frecuencia que el conjugado. Por ejemplo, en cierta realización, el conjugado puede administrarse diariamente, mientras que el sacárido exógeno se administra más de una vez al día. En cierta realización, el conjugado puede administrarse dos veces por semana, semanal, quincenal o mensual, mientras que el sacárido exógeno se administra a diario. En ciertas realizaciones, el conjugado se administra mensualmente y el sacárido exógeno se administra dos veces por semana, semanal o quincenal. Otras variaciones sobre estos esquemas serán reconocidas por los expertos en el estado de la técnica y pueden variar dependiendo de la naturaleza del conjugado y la formulación utilizada.

EJEMPLOS

Las estructuras de los conjugados de ejemplo I- 1 a I- 17 y II- 1 a II- 7 que se describen y se utilizan en los ejemplos se muestran en la Figura 45.

I. Métodos de fabricación de conjugados de ejemplo

Este primer conjunto de ejemplos describe varios métodos para la fabricación de conjugados de ejemplo. Los ejemplos incluyen también ensayos para la purificación y ensayo de los ingredientes de partida y los productos finales. Se debe entender que estos métodos pueden modificarse para producir otros conjugados que caen dentro del alcance del invento.

Ejemplo 1 - Síntesis de Azidoetilglucosa (AzEG)

a. Síntesis de bromoetilglucosa

Resina DOWEX 50Wx4 (Alfa Aesar, Ward Hill, MA) se lavó con agua desionizada para eliminar el color. Una mezcla de 225 g de D- glucosa (1,25 mol;. 1 equiv, Alfa Aesar) y 140 g DOWEX 50Wx4 fue tratada con 2.2 L de 2- bromoetanol (30,5 mol, 25 equiv;. 124,97 gm/mol; 1,762 g/ml; BP = 150 C, Alfa Aesar) y la mezcla agitada se calienta a 80 ° C durante 4 horas. La reacción se monitoreó mediante TLC (metanol al 20%/diclorometano (DCM)). La reacción se completó después de unas cuatro horas, y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La solución se filtra para eliminar la resina y la resina se lavó con acetato de etilo y DCM. El filtrado resultante fue sometido a un proceso de evaporación hasta quedar un aceite de color ámbar en un evaporador rotatorio. Un total de 400 g después de la extracción.

El aceite ámbar fue purificado en gel de sílice (4 kg de sílice empaquetado en DCM) de la siguiente manera. El crudo se disolvió en DCM y se cargó en la columna, y luego se eluyó con 2 x 4L metanol al 10%/ DCM; 2 x 4L metanol al 15% /DCM, y 3 x 4L metanol al 20% /DCM. Los productos con fracciones (sobre la base de TLC) se reunieron y se evaporaron a sequedad para proporcionar 152 gramos de 1- α- bromoetil- glucosa (42%).

b. Conversión de bromoetilglucosa a azidoetilglucosa (Azem)

Un matraz de fondo redondo de tres cuellos de 5L, equipado con una manta calefactora, un agitador y un termómetro, se cargó con 150 g de bromoetilglucosa (525 mmol). El aceite se disolvió en 2 L de agua y se trató con 68.3 g de azida de sodio (1.05 mol, 2 equiv;. 65 g/mol; Alfa- Aesar), seguido de 7.9 g de yoduro de sodio (52.5 mmol, 0,08 equiv;. 149,89 g mol ; Alfa-Aesar) y la solución se calienta a 50 ° C y se agita durante la noche. La solución se enfría a temperatura ambiente y se concentra a sequedad en el rotovapor. El residuo sólido se digiere con

3 x 500 ml de 5:1 vol. $CHCl_3$: MeOH a 40 °C. Las porciones orgánicas combinadas se filtraron y se evaporaron a sequedad para producir azidoetilglucosa (86 g) como un sólido blancuzco. TLC (20% MeOH/DCM; residuo de carbonización con H2S04): muestra única, indistinguible del material de inicio.

c. Repurificación de azidoetilglucosa

Se tomaron 32g de azidoetilglucosa en 100 ml de agua. La solución turbia se filtra a través de un filtro de microfibras de vidrio (Whatman GF / B). El filtrado dorado se evapora a un sólido por rotovapor. El sólido fue colocado en metanol (100 ml) y la solución turbia se filtra nuevamente a través de un filtro de microfibras de vidrio. El filtrado amarillo claro resultante fue sometido a un proceso de evaporación hasta quedar unsólido al vacío.

El sólido fue colocado en un mínimo de metanol (50 ml) y acetato de etilo (150 ml) se añadió lentamente con agitación. La pasta aguada se enfría y se filtra. El sólido se secó al aire (higroscópico) y se coloca en un horno a 60°C durante la noche. TLC tiene muy poco material de inicio. Rendimiento de 15.4 gr. El licor madre se evapora al vacío hasta una goma amarilla. No se trató de purificar aún más este material en este momento.

Ejemplo 2 - Síntesis de Azidoetilmanosa (AzEM)

a. Síntesis de bromoetilmanosa

Resina DOWEX 50Wx4 (Alfa Aesar, Ward Hill, MA) se lavó con agua desionizada para eliminar el color. Una mezcla de 225 g de D- manosa (1,25 mol;. 1 equiv, Alfa Aesar) y 140 g de DOWEX 50Wx4 se trató con 2.2 L de 2- bromoetanol (30,5 mol, 25 equiv;. 124.97 g/mol; 1,762 g/ml; BP = 150 C, Alfa Aesar) y la mezcla agitada se calienta a 80 °C durante 4 horas. La reacción se monitorea mediante TLC (metanol al 20%/diclorometano (DCM)). La reacción se completa después de cuatro horas, y luego se deja enfriar a temperatura ambiente. La solución se filtra para eliminar la resina y la resina se lavó con acetato de etilo y DCM. El filtrado resultante se extrae a un aceite de color ámbar en un evaporador rotatorio.

El aceite de color ámbar se purifica en gel de sílice (4 kg de sílice empacado en DCM) de la siguiente manera. El crudo se disuelve en DCM y se carga en la columna, y luego se eluye con 2 x 4L de metanol al 10%/DCM; 2 x 4L de metanol al 15% / DCM, y 3 x 4L de metanol al 20% /

DCM. Los productos que contienen fracciones (sobre la base de TLC) se agrupan y se evaporan a sequedad para producir 152 gramos de 1- α- bromoetil- manosa (42%).

b. Conversión de bromoetilmanosa a azidoetilmanosa (AzEM)

Un matraz de fondo redondo de tres cuellos de 5L, equipado con una manta calefactora calentamiento, un agitador de varilla y un termómetro, se carga con 150 gm de bromoetilmanosa (525 mmol). El aceite se disuelve en 2 L de agua y se trata con 68.3 g de azida de sodio (1.05 mol, 2 equiv;. 65 g / mol; Alfa- Aesar), seguido de 7.9 g de yoduro de sodio (52.5 mmol, 0,08 equiv;. 149,89 g/mol ; Alfa- Aesar) y la solución se calienta a 50 ° C y se agita durante la noche. La solución se enfría a temperatura ambiente y se concentra a sequedad por rotavapor. El residuo sólido se digiere con 3 x 500 ml de 5:1 vol. $CHCl_3$: MeOH a 40 C. Las porciones orgánicas combinadas se filtran y se evaporan a sequedad para producir azidoetilmanosa como un sólido blancuzco.

c. Repurificación de azidoetilmanosa

Treinta y dos gramos (23g) de azidoetilmanosa se colocan en 100 ml de agua. La solución turbia se filtra a través de un filtro de microfibras de vidrio (Whatman GF / B). El filtrado se evapora a un sólido con un rotovapor. El sólido se coloca en metanol (100 ml) y la solución turbia se filtra nuevamente mediante un filtro de microfibras de vidrio. El filtrado resultante amarillo claro se extrae a un sólido al vacío.

El sólido se coloca en un mínimo de metanol (50 ml) y se agrega lentamente acetato de etilo (150 ml) con agitación. La pasta aguada se enfría y se filtra. El sólido se secó al aire (higroscópico) y se coloca en un horno a 60 °C durante la noche. El licor madre se evapora al vacío a una goma amarilla.

Ejemplo 3 - Síntesis de Azidoetilmanobiosa (AzEBM)

El compuesto Azem del ejemplo 2 es selectivamente protegido con dimetil éter benceno, se purifica mediante cromatografía en columna y posteriormente se hace reaccionar con bromuro de bencilo para proporcionar diacetal- 3- bencil- manopiranosida de l- α- (2- azidoetil)- 4,6- benzaldehído. El producto es posteriormente glucosilado con l- α- bromo- 2 ,3,4,6- tetrabenzoilmanopiranosida utilizando química de triflato de plata bajo condiciones

rigorosamente anhidras para proporcionar el producto de azidoetilmanobiosa protegida. Luego producto intermedio se desprotege para retirar los grupos benzoilo para proporcionar AzEBM.

Ejemplo 4 - Síntesis de Azidoetilmanotriosa (AzETM)

a. l- α- bromo- 2,3,4,6- tetrabenzoil- manosa

A un matraz de tres cuellos de 500 ml que contiene una barra de agitación y entrada de nitrógeno se añadieron 40 g (60,9 mmol) de pentabenzoilmanosa y 80 mL de cloruro de metileno. La solución resultante se enfrió en un baño de hielo a <5 ° C, y 80 ml de solución de HBr 33%- ácido acético se agregó a través de un embudo de adición a una tasa tal para mantener la temperatura de reacción <10 ° C. Tras la adición completa (~30 min .) el baño de hielo se retiró y se continuó la agitación durante 3 horas.

La solución de reacción se diluyó con un volumen igual (160 ml) de DCM y se extrajo sucesivamente con agua (2 x 500 ml), bicarbonato saturado (2x 50 ml) y salmuera (1x50 ml), se secó sobre sulfato de magnesio y el solvente se evaporó para proporcionar 41 g de espuma sólida. (Rendimiento teórico 40.1 g) y se almacenó en N_2 en un congelador. Este material se utilizó sin purificación adicional. La reacción se monitoreó mediante TLC: gel de sílice (hexano/ acetato de etilo, 7/3) de material inicial Rf 0.65, producto Rf 0.8 visualización UV. ^{1}H RMN (CDC13) δ 8.11 (d, 2H), 8.01 (m, 4H), 7,84 (d, 2H), 7.58 (m, 4H), 7,41 (m, 6H), 7,28 (t, 2H), 6.58 (s, 1H), 6,28 (m, 2H), 5,8 (m, 1H), 4,75 (dd, 1H) 4,68 (dd, 1H) 4.5 (dd, 1H).

b. 1- Azidoetil- 2,4- dibenzoilmanosa

A un matraz de 3 cuellos de 1.0L que contiene una barra agitadora, entrada de nitrógeno y 300 ml de acetonitrilo anhidro se agregó 25 g de 1- azidoetilmanosa (100,4 mmol), y 50 ml de ortobenzoato de trietilo (220 mmol, 2.2 equiv.). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente y se agregó 0.8mL (10 mmol) de ácido trifluoroacético (TFA) puro. La solución se clarificó dentro de 10 minutos y se continuó la agitación durante dos horas, luego se agregó 25 ml de TFA al 10% acuoso y se continuó agitando durante 2 horas para hidrolizar el intermedio a los isómeros de éster. El solvente se evaporó al vacío a un aceite viscoso, que se trituró con 50 ml de DCM y se evaporó de nuevo a un aceite viscoso. Se agregó (70 ml) al residuo y la solución viscosa se sembró con 2,4- dibenzoilazidoetilmanosa. Un precipitado fino se formó dentro de 15 minutos y se continuó la agitación durante la noche a temperatura ambiente. La suspensión

resultante pesada se colocó en el congelador durante 2- 4 horas, después se filtró y el sólido se lavó con tolueno helado (2x10 ml). El sólido se secó al aire hasta un peso constante para proporcionar 21 g (22,85 g @ TY 50% de pureza isomérica) de ~95% de pureza isomérica. El producto se colocó en 40 ml de tolueno, se agitó durante 1 hora y luego se colocó en el congelador durante 2 horas. El sólido se filtró y se lavó (2x10 ml) con tolueno helado y se secó al aire a un peso constante para proporcionar 18.5 g del producto de isómero único 2,4-dibenzoilazidoetilmanosa en 83% de rendimiento. Las aguas madre contenían el isómero no deseado y una pequeña cantidad del isómero deseado. La reacción se monitoreó mediante TLC: SG (hexano/acetato de etilo 7/3) de material inicial R_f 0.0, intermedio de ortoéster R_f 0.9. (Hexano/acetato de etilo: 8/2) SM R_f 0,8, isómero deseado Rf 0,4, isómero deseado un R_f 0,2 ^{1}H RMN 300 MHz (CDC13) δ 8.12 (t, 4H), 7,66 (t, 2H), 7.5 (m , 4H), 5,56 (t, 1H), 5,48 (m, 1H), 5,14 (m, 1H), 4,5 (dd, 1H), 4,0 (m, 2H), 3,8 (m, 3H), 3.56 (m, 1H), 3,44 (m, 1H).

c. man(α- 1,3)- man(α- 1.6)- α- 1- azidoetilmannopiranosida perbenzoilada

A un matraz de tres cuellos de 1.0 L con varilla agitadora, entrada de nitrógeno, se agregó 41 g de crudo 1- bromo- tetrabenzoimanosa (60,9 mmol, ~2.5 equiv.) en 185 ml de DCM. A esto se agregó 11,2 g de 2,4- dibenzoilazidoetilmanosa (24,5 mmol), seguido por 11,2 g de tamices 4A. La pasta aguada se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se enfrió a - 15 ° C en un baño de metanol/hielo.

En un recipiente oscuro por separado se agregó 190 ml de tolueno seguido por 15,1 g de triflluorometanosulfonato de plata (AgOTf) (58.8 mmol, 2.4 equiv.) y se agitó en solución en la oscuridad. Esta solución se transfirió a un embudo de adición grande, y agregó gota a gota a la suspensión en agitación mientras se protegió la reacción de la luz. La temperatura de reacción se mantuvo <- 10 ° C mediante el ajuste de la tasa de adición AgOTf. Tras completar la adición (~30 minutos), el baño frío se retiró y la reacción se agitó durante 2 horas hasta que un solo producto se mantuvo mediante TLC (SG, hexano/acetato de etilo: 7/3, Bromo R_f 0.9, azido R_f 0.4, trios producto R_f 0.5, visualización UV).

Se agregó trietilamina (7 ml, 5,0 equiv.) seguido por 200 ml de DCM. La pasta aguada resultante se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice y de celite y se lavó con 2 x 75 ml de DCM. El solvente se evaporó al vacío y el residuo se colocó en acetato de etilo y se lavó sucesivamente con agua (2x100 ml), bicarbonato (2x50 ml) y salmuera (1x75 ml) y se secó sobre

sulfato de magnesio. El solvente se evaporó al vacío para proporcionar 39 g de espuma sólida (TY 39,5 g). ^{1}H RMN 300 MHz (CDC13) δ 8.3 (d, 2H), 8.2 (m, 8H), 7,85 (d, 4H), 7,75 (dd, 4H), 7,3 a 7,65 (m, 30H), 7,2 (t, 2H) , 6.05 (m, 4H), 5,9 (t, 2H), 5,63 (m, 2H), 5,38 (s, 2H), 5,18 (d, 1H), 4,65 (m, 4H), 4,5 (m, 2H), 4,35 (m, 4H), 3,8 (m, 2H), 3.54 (m, 2H).

d. Man(α1,3)- man(α- 1.6)- al- azidoetilmanopiranosida

A una suspensión agitada de 3,0 g de perbenzoilado- man(α- 1,3)- man(α- 1.6)- α- l- azidoetilmanopiranosida (1,86 mmol) en 40 ml de metanol se agregó 0.2 mL 4.28M metóxido sódico en metanol. La suspensión resultante se agitó durante 20 horas a temperatura ambiente dando una solución clara. La finalización de la reacción se monitoreó mediante TLC, (SG, hexano/acetato de etilo: 8.2 SM R_f 0,4, producto R_f 0,0).

El metanol se evaporó al vacío dando un semi- sólido aceitoso. El residuo se llevó a acetato de etilo (50 ml) y se agitó durante 3 horas. El sólido se filtró, se lavó con acetato de etilo fresco (2x20 ml) y se secó al aire hasta peso constante para proporcionar 1.09 g (1.07 g TY) del producto. Las aguas madre contuvieron benzoato de metilo residual, el sub- producto de la desprotección.

Ejemplo 5 - Síntesis de aminoetil- sacáridos (AEG, AEM, AEBM, AETM) a partir de azidoetil- sacáridos (AzEG, AzEM, AzEBM, AzETM)

Los compuestos azido terminados de los ejemplos 1- 4 son fácilmente hidrogenados a temperatura ambiente mediante el uso de catalizador de paladio/carbono, una pequeña cantidad de ácido acético, y etanol como solvente para proporcionar los correspondientes compuestos terminados por amina. La figura 1 muestra las estructuras químicas de AEG, AEM, AEBM, AETM. El proceso es idéntico al descrito para AETM a continuación, salvo que los expertos en el estado de la técnica entenderán que las cantidades de reactivos, solventes, etc debe ser escaladas a la cantidad de moles de ligandos sacáridos a ser hidrogenados.

a. Man(α- l 3)- Man (α- 1.6)- α- 1- aminoetilmanopiranosida ("aminoetiltrimanosa", AETM)

A una solución de 5.3 g (9.25 mmol) del man(α- 1,3)- man(α- 1,6)- α- 1- azidoetilmanopiranosida en 100 ml de agua y 50 ml de etanol se agregó 0.8 g Pd al 5%/C. La suspensión vigorosamente agitada se hidrogenó a 30- 40 psi durante 48 horas o hasta que el

material de partida no era evidente mediante TLC (SG, metanol, SM R_f 0,75, Pdt R_f 0,0, PMA vis.). La suspensión se filtró sobre celite, el cual se enjuagó con etanol (2x50 ml) y el filtrado se concentró al vacío.

HPLC de este material (C18, 3% Acetonitrilo/97% 0.1% H_3PO_4, 220 nm, 2 ml/min) proporcionó adsorción uv del material en vacío de la columna de inyección, a Rt de 2.5 minutos, indicativo de éster de benzoato.

El filtrado se diluyó con 70 ml de agua y 12 ml de NaOH 1N y la solución se agitó durante la noche a temperatura ambiente (HPLC: sin material uv en el vacio de columna a Rt de 2.5 min, material uv a Rt de 10.5 minutos co- eluyendo con ácido benzoico.). Se agregó 2 g de carbón decolorante y la suspensión agitada se calentó a 80 ° C, se enfrió a temperatura ambiente y se filtró sobre celite. El pH del filtrado se ajustó a 8.0 con HCl 2N y la solución incolora se concentró al vacío al volumen del 50% aproximadamente.

La solución se cargó en una columna de resina (Dowex 50W, 50 g) y se lavó con agua hasta que las fracciones eluyentes fueron neutrales al pH (6x75 ml) retirando cualquier sub-producto de ácido residual. El producto de amina se lavó fuera de la columna con hidróxido de amonio 0.25N (6x75 ml) y las fracciones conteniendo el producto de amina- detección de ninhidrina se combinaron y se concentraron a 25- 30 ml al vacío. Esta solución concentrada se agregó gota a gota a 300 ml de etanol en agitación y se continuó la agitación durante 2 horas. El producto se filtró, se lavó con etanol fresco (2x50 ml) y se secó al aire hasta peso constante. El sólido amorfo blanco resultante se secó aún más en un horno al vacío a 80 ° C durante 5 horas para proporcionar 4.1 g de un sólido granular blanco (TY 5,1 g). La RMN estuvo libre de cualquier protones aromáticos. ^{1}H RMN 300 MHz (D20) δ 5,08 (s, 1H), 4,87 (s, 1H), 4,81 (s, 1H), 04.08- 03.06 (m, 18H), 2,9 (m, 2H).

Ejemplo 6 - Síntesis de sacáridos de dipropargilo y producción de ligandos AE

a. Síntesis de dietil diproparglimalonato

Se agregó dietilmalonato (122.5g, 0,7648 mol) a etanol absoluto (800 ml) conteniendo etóxido de sodio (preparado a partir de metal de sodio, 38.5 g, 1.67mol). Después de 30 minutos, se agregó lentamente bromuro de propargilo (200 g, 1.68 mol) a la suspensión agitada, manteniendo la temperatura por debajo de 60 ° C. La mezcla se sometió a reflujo durante la noche (15 horas). Las sales precipitadas se eliminaron por filtración y se lavaron con etanol. El

disolvente se retiró al vacío y el residuo se diluyó con agua y se extrajo con etanol (2x 200 ml). Los extractos combinados se secaron sobre MgSO4, se filtraron, se lavaron con Et_2O y el solvente se retiró al vacío para proporcionar un aceite de color dorado. El aceite se colocó en alto vacío (40 C) durante 3 horas y se dejó reposar. Los sólidos comenzaron a cristalizarse formando un sólido aceitoso. Se dejó reposar durante la noche (16 horas). Se cargó ciclohexano en un matraz, los sólidos se trituraron, filtraron y lavaron con ciclohexano para proporcionar el producto cristalino de color blanco (81 g, rendimiento 44,8%). La reacción fue seguida por GC.

b. Síntesis de ácido dipropargilmalónico

Dietil- dipropargil malonato (80 g, 0,339 mol) se calentó a reflujo en 600 ml de hidróxido de potasio alcohólico al 10% durante la noche (15 horas). El solvente se retiró al vacío y el residuo se acidificó con HCl 3N. El residuo se extrajo con Et2O (2x 300 ml). Los extractos combinados se secaron sobre MgSO4, se filtraron, se lavaron con Et2O y se concentraron *al vacío* hasta obtener un aceite. Se colocaron en alto vacío (40 C) durante 2 horas y se dejaron reposar para proporcionar ácido dipropargilmalonico como un aceite (46 g, rendimiento 75,4%). La reacción fue seguida por GC.

c. Síntesis del ácido dipropargilacético

El ácido dipropargilmalónico (26 g, 0.443 mol) se calentó a 135 °C hasta que CO2 detuvo la evolución. Luego se dejó enfriar hasta obtener un aceite. El aceite se destiló a 0.5 psi. El residuo aceitoso sobrante en el matraz de destilación y el sólido se combinaron (15.7 gm, rendimiento 79,9%) y se utilizó como tal en el siguiente paso.

d. Síntesis de éster tert- butílico del ácido [2- (3- prop- 2- inil- hex- 5- inoilamino)- etil]- carbámico

Se agregó lentamente N- Boc- etilendiamina (18.3 g, 0.1143 mol) en 50 ml de CH_3CN a través de un embudo de adición a una solución agitada conteniendo ácido dipropargilacético (15,56 g, 0.1143 mol), TBTU (36,74 g, 0.114 mol) y DIPEA (29,6 g, 0,229 mol) en 300 ml de CH_3CN a 0° C. Se produjo precipitación. El baño de hielo se retiró y el producto se agitó a temperatura ambiente durante la noche (16 horas). La reacción fue ahora totalmente homogénea. La solución se concentró a vacío y el residuo se diluyó con 800 ml de agua. Los sólidos resultantes se filtraron, se lavaron con abundante agua, y secaron al vacío para proporcionar 14,3

g de producto bruto. La recristalización (2x) a partir de DCM, la filtración y lavado con hexanos proporciona el producto (9,85 g, 31% de rendimiento, el 98% de pureza por HPLC (214nm)).

e. Reacción click de azidosacarido a éster t- butílico de ácido [2- (3- prop- 2- inilo- hex- 5- inoilamino)- carbámico

A 1,1- dipropargil- acetil- (- 1N, 2 N- BOC- 1 ,2- diaminoetil)amida (DP, 418 mg, 1.5 mmol) en DCM (20 mL) se agregó por goteo TFA (4 ml) durante 5 minutos a 0 ° C. La solución oscura se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Los volátiles se evaporan bajo presión reducida. Se agregó tolueno (20 ml) al residuo y se evaporó bajo presión reducida dos veces. El aceite resultante oscuro se utilizó sin purificación adicional.

A este residuo se agregó THF (20 mL) y agua (20 ml) con agitación durante 15 minutos. Se agregó sulfato de cobre (225 mg, 0,9 mmol) seguido por ascorbato de sodio (180 mg, 0,9 mmol). La mezcla resultante se calentó a 55- 60 ° C durante 6 horas y luego se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La solución se evaporó a presión reducida a la mitad del volumen aproximadamente y se filtró a través de un filtro de microfibras de vidrio. La solución transparente resultante se colocó en una columna de resina (Dowex 50X- 2) que se lavó con agua (6 x 75 ml) hasta pH neutro, y luego se lavó con NH_4OH al 10% (8 x 75 ml). Las fracciones de tinción positiva con ninhidrina se combinaron y se evaporaron a presión reducida a un sólido cristalino. El residuo de vidrio se colocó en agua (250 ml) y se trató con 0.5 g de carbón y se calentó a reflujo. La pasta aguada fria se filtró sobre celite y un filtro de microfibra. La solución resultante de color amarillo claro se evaporó a un sólido cristalino bajo presión reducida y se agregó metanol y se evaporó (2x) para proporcionar una espuma blanca (0.9 g, TY 1.0 g).

Ejemplo 7 - Síntesis de sacáridos de tripropargilo y la producción de ligandos AE

a. 2- (2- BOC- aminoetil)- tioacetamida- tris(propargiloxi)metil]aminometano

A una solución de N- (2- mercaptoetil)carbamato de t- butilo (Frontrun Organix, Ipswich, MA; 111,26 mg, 1 mmol) en etanol (5 mL) se agregó NaOH (1,1 mmol) con agitación a temperatura ambiente. A esta solución se agregó 2- bromoacetamida- tris[(propargiloxi)metil]aminometano (356 mg, 1.0 mmol, ver *J. Org. Chem.* 73, 5602, 2008) y se continuó agitando durante 20 horas (TLC SG 08/02 hexano/acetato de etilo, pdt R_f 0.4) . El solvente se evaporó al vacío y el residuo se colocó en acetato de etilo (40 ml) y se lavó

sucesivamente con agua (25 ml), NaOH 0.5 N (25 ml) y salmuera (25 mL), se secó sobre $Na2SO_4$, se filtró y se concentró en un aceite (360 mg, TY 452,3 mg). RMN CDC13, (ppm): 7.05 (s, 1H, NH), 5.25 ((s, 1H, NH), 4,85 (s, 6H); 3,85 (s, 6H); 3,3 (m, 2H), 3,15 (s , 2H), 2.7 (m, 2H), 2,42 (s, 3H), 1,22 (s, 9H).

b. 2- (2- aminoetil)tioacetamida- tris[(triazol- l- (2- etilmanosa)4- metoxi)metil] aminometano

A una solución agitada de 2- (2- BOC- aminoetil)tioacetamida- tris[(propargiloxi)metil] aminometano (1 g, 2,21 mmol)en DCM (40 mL) a temperatura ambiente se agregó TFA (4 ml) por goteo. La solución resultante se agitó durante la noche. Los solventes se retiraron al vacío y el residuo se colocó en tolueno (15 ml) y se evaporó hasta sequedad.

El residuo se recolectó en THF (40 ml), agua (40 ml) y se agitó en la solución. Se agregó azidoetilmanosa (3,75 eq., 2,0 g, 8.3 mmol) seguido por el sulfato de cobre (500 mg, 2,0 mmol) y ascorbato de sodio (400 mg, 2,0 mmol) y la mezcla resultante se agitó a 55- 60° C (baño de aceite) durante 6 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La mezcla resultante se concentró al vacío hasta un volumen medio y se filtró a través de un filtro de microfibra de vidrio. El filtrado se cargó en una columna de resina (Dowex 50w 50x4- 100) y se eluyó con agua (6x75 ml) hasta hacerlo neutral. La columna se eluyó con hidróxido de amonio al 15% (10x75 ml) y las fracciones positivas a ninhidrina se combinaron y se concentróron hasta una espuma vítrea (1,29 g, TY (MW 1099 g/mol), 53% en dos pasos).

Ejemplo 8- Síntesis de NH2- Bl- BOC2- insulina (Al, B29)

En una síntesis típica, se disuelve 4 g de insulina en polvo (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) en 100 ml de DMSO anhidro a temperatura ambiente, seguido por la adición de 4 ml de trietilamina (TEA). La solución se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se agrega lentamente 1.79 ml (2,6 equivalentes) de solución de di- tert- butil-dicarbonato/THF (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) a la solución de insulina- TEA y se mezcla durante aproximadamente una hora. La reacción se apaga a través de la adición de 4 ml de una solución concentrada conteniendo 250 ul de etanolamina en 5 ml de DMSO seguido por mezclado durante cinco minutos. Después de apagar, toda la solución se vierte en 1600 ml de acetona y se mezcla brevemente con una espátula. A continuación, se agregá por goteo alícuotas

8 x 400 ul de una solución HCl al 18.9%: agua sobre la superficie de la mezcla para precipitar la insulina reaccionada. Luego el material precipitado se centrifuga y el sobrenadante se decanta en un segundo vaso, mientras que la torta de precipitado es obtenida. A la solución de sobrenadante, se agrega por goteo otras alícuotas 8 x 400 ul de una solución de HCl al 18.9% : agua sobre la superficie de la mezcla para obtener un segundo precipitado de insulina reaccionada. Este segundo precipitado se centrifuga y el sobrenadante se descarta. Las tortas de centrífuga combinadas de las dos etapas de precipitación se lavan una vez con acetona seguido de secado al vacío a temperatura ambiente para proporcionar el polvo crudo que normalmente contiene 60% del producto BOC2 deseado y 40% del material BOC3.

Un método de HPLC de fase inversa preparativa se utiliza para aislar la insulina BOC2 pura a partir del polvo crudo. El buffer A es agua desionizada conteniendo TFA al 0.1% y el Buffer B es acetonitrilo conteniendo TFA al 0.1%. El polvo crudo se disuelve en 25 mg/ml en una mezcla de 70% A/30%B y se filtra por jeringa antes de la inyección en la columna. Antes de la purificación, la columna (Waters C18 SymmetryPrep, 7 um, 19 x 150 mm) se equilibra a 15 ml/minuto con una fase movil B del 70% A/30%B utilizando un sistema Waters DeltraPrep 600. Aproximadamente 5 ml de la solución de polvo crudo se inyecta en la columna a una tasa de 15 ml/minuto en el transcurso de 5 minutos después de que se emplea un gradiente lineal entre 70%A /30%B al 62%A/38% B en el transcurso de los próximos 3.5 minutos y se mantiene allí durante 2.5 minutos más. Utilizando este método, el pico BOC2 deseado eluye a aproximadamente 10.6 minutos, seguido de cerca por el pico BOC3. Una vez recolectada, la solución se sometió a rotoevaporación para elimitar acetonitrilo y se liofilizó para obtener polvo de insulina BOC2 pura. La identidad es verificada por LC- MS (HT Laboratories, San Diego, CA) y el sitio de conjugación se determina por secuenciación N- terminal (Western Analytical, St. Louis, MO).

Ejemplo 9- Síntesis de estructuras de benceno- 1 ,3.5- tricarboxi- (N- ω- aminoácido- NHS éster)amida

Una solución de cloruro de 1,3.5- bencenotricarbonilo (1g, 3,8 mmol) en diclorometano (DCM)(5 ml) se agregó por goteo a una solución en agitación vigorosa de un ω- aminoácido (3,1 equivalentes) en NaOH 1N (25 ml) en un baño de hielo. El baño de hielo se retira y se continúa la agitación durante 4 horas a temperatura ambiente. Se agregá 2N HCl (~15 ml) se agregó por

goteo a un pH de aproximadamente 2 y la mezcla resultante se agita durante 2 horas. El precipitado se filtra, se lava con agua fría (2x20 ml) y se seca en aire al vacío y luego en un horno a 60 ° C durante la noche. El sólido blanco resultante se utiliza sin purificación adicional. Rendimiento para cada ω- aminoácido(ácido 4- aminobutírico: rendimiento 1,6 g, 91%; ácido 6- aminocaproico: rendimiento 1,9 g, 92%).

El material anterior es colocado en DMSO (5 ml) conteniendo N- hidroxisuccinimida (3.1 mmol, 3.1 equiv.) y se agrega N- (3- dimetilaminopropil)- N'- etilcarbodiimida (EDCI, 3,6 mmol, 3.6 equiv.) a temperature ambiente. La solución resultante se agita durante 24 horas, se diluye con agua (125 ml) y se extrae con acetato de etilo (3x50 ml). La fase orgánica combinada se lava con agua (2x50 ml) y salmuera (1x50 ml) y se seca sobre $MgSO_4$. El solvente se evapora y el residuo semisólido se tritura con acetonitrilo (10 ml). El sólido se filtra y se lava con solvente frío, se seca en aire al vacío y luego en un horno durante la noche a 60 °C. El producto está libre de sub- producto de urea. Benceno- 1 ,3.5- tricarboxi- (N- 6- aminocaproico- NHS éster)amida (TSB- C6): 304 mg, 36%, pf 140- 142 C. Benceno- 1, 3, 5- tricarboxi(N- 4- butírico- NHS- éster)amida (TSB- C4): 245 mg, 45%, pf 182- 184 C.

Ejemplo 10- síntesis de estructuras dendríticas

a. Hidrogenación de dendritas funcionalizadas con extremos alquino que contienen grupos nitro

Dendritas que contienenn = 2, 4, o 8 alquinos terminales y un núcleo de ácido nitropropiónico se obtienen (por ejemplo, en Polymer Factory, Suecia) y se utilizan sin purificación adicional. La dendrita se disuelve en 100 ml de una mezcla 50:50 vol de DCM y etanol, y se agrega 0.8 g de 5% Pd/C. La suspensión en agitación vigorosa se hidrogena a 30- 40 psi durante 48 horas o hasta que el material de partida no es evidente por TLC. La suspensión se filtra sobre Celite, que se lava con etanol (2x50 ml) y el filtrado se concentra al vacío.

El filtrado se diluye con 70 ml de agua y 12 ml de NaOH IN y la solución se agita durante la noche a temperatura ambiente. Se agrega 2g de carbón decolorante y la suspensión agitada se calienta a 80 ° C, se enfria a temperatura ambiente y se filtra sobre celite. El pH del filtrado se ajusta a 8.0 con HCl 2N y la solución incolora se concentra al vacío a volumen del 50%.

La solución se carga sobre una columna de resina (Dowex 50W, 50 g) y se lava con agua hasta que las fracciones eluyentes son neutrals a pH (6x75 ml) retirando cualquier subproducto ácido residual. El producto amina se lava fuera de la columna con hidróxido de amonio 0.25N (6x75 ml) y las fracciones conteniendo el producto de amina (detección de ninhidrina) se combinan y se evaporan al vacío utilizando un evaporador rotatorio.

b. Reacción de dendritas (amina, alquino- 4)con azidoetil manosa

El producto de dendritas que contienen el núcleo amino y cuatro grupos alquino terminales obtenidos después de hidrogenación (8.3 mmol) se colocan en THF (40 ml), agua (40 ml) y se agitan en la solución. Se agrega azidoetilmanosa (4,75 eq., 2.53 g, 10,51 mmol) seguido de sulfato de cobre (500 mg, 2,0 mmol) y ascorbato de sodio (400 mg, 2,0 mmol) y la mezcla resultante se agita a 55- 60 C (baño de aceite) durante 6 horas, se enfria a temperatura ambiente y se agita durante la noche. La mezcla resultante se concentra al vacío a un volumen medio y se filtra a través de un filtro de microfibra de vidrio. El filtrado se carga en una columna de resina (Dowex 50w 50x4- 100) y se eluye con agua (6 x 75 ml) hasta hacerlo neutra. Luego la columna se eluye con hidróxido de amonio al 15% (10x75 ml) y las fracciones positivas a la ninhidrina se agrupan y se concentran a una espuma de vidrio.

Ejemplo 11- Conjugación de fármacos funcionalizados por amina con ésteres activados multivalentes en solvente orgánico (fármaco agregado primero)

Una estructura que contieneésteres activados N- terminales se disuelve en 60 mM de 1.0 ml de DMSO anhidro seguido por la adición de 400 ul (exceso) de trietilamina (TEA). La solución se agita rápidamente durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego el fármaco portador de amina se disuelve de manera separada en 7.9 ml de DMSO a una concentración de 7.4 mM. Una vez disuelta, toda la solución de fármaco se agrega por goteo a lo largo de 10 minutos a la solución de estructura/DMSO/TEA seguido por mezclado a temperatura ambiente durante dos horas. Luego los ésteres restantes activados se hacen reaccionar con ligandos funcionalizados por aminas de la siguiente manera. Una solución 370 mM de ligando se prepara en un volumen apropiado de DMSO seco. Una vez disuelto, se agrega suficiente solución para proporcionar un número de equivalentes reactivos igual a tres veces el número inicial de grupos éster activados, N, menos uno. Por ejemplo, si hay N = 3 grupos éster activados iniciales por estructura, entonces (3x (3- l)x60mM/370 mm)= 0.973 ml de solución de ligando se agrega. Si

hay N = 4 grupos éster activados iniciales por estructura, entonces (3x (4- 1)x60mM/370 mM)= 1.46 ml de solución de ligando se agrega, y así sucesivamente. Después de agregar la solución de ligando, la solución se agita durante una hora más a temperatura ambiente para asegurar la reacción completa.

Luego la solución resultante se superdiluye 10x en una solución salina amortiguada por HEPES 20 mM pH 5.0 con 0.150 M NaCl seguido por el ajuste del pH con HC1 diluido a un pH final de 8.0. La solución acuosa es purificada primero mediante exclusión por tamaños con una fase sólida adecuada para la separación deseada de materiales conjugados y no conjugados. La solución que pasa por el volumen vacío de la columna luego se concentra utilizando una membrana de ultrafiltración de tamaño adecuado a aproximadamente 10 ml. Esta solución se purifica adicionalmente para obtener el producto deseado con HPLC de fase inversa preparativa en una Columna Waters C8, 7 um, 19 x 150 mm . El buffer A es agua desionizada conteniendo TFA al 0.1% y el buffer B es acetonitrilo conteniendo TFA al 0.1%. Antes de la purificación, la columna se equilibró a 15 ml/minuto con una fase móvil 80%A/20%B utilizando un Sistema Waters DeltraPrep 600. Aproximadamente 5 ml de la solución cruda se inyecta en la columna a lo largo de 2 minutos con una tasa de 15 ml/minuto después de lo cual se emplea un gradiente lineal entre 80%A/20%B y 75%A/25%B durante los siguientes 5 minutos, seguido por un gradiente lineal más lento entre 75% A/25% B y 62%A/38%B durante los próximos 22 minutos. El tiempo de retención del pico deseado variará dependiendo del fármaco, la estructura, y ligando utilizados. Una vez recolectada, la solución se sometió a rotoevaporación para elimitar acetonitrilo y se liofiliza para obtener conjugado puro cuya identidad puede verificarse por LC- MS (HT Laboratories, San Diego, CA).

Ejemplo 12- Conjugados de insulina B1 con sacáridos multivalentes - ligando homogéneo

Utilizando el método descrito en el Ejemplo 11 y el fármaco portador de amina, NH_2-B1- BOC2 (Al, B29)- insulina (PM = 6.008 g/mol) del Ejemplo 8, se prepararon conjugados de la insulina con las siguientes estructuras y ligandos. Estructuras de éster activado de Tris-succinimidil- 1,3.5- bencenotricarboxilato (TSB), tris- succinimidil aminotriacetato (TSAT), tris-succinimidil (6- aminocaproil)aminotriacetato (TSAT- C6), y tetrakis- (N-succinimidilcarboxipropil)pentaeritritol TSPE fueron adquiridos en Molecular Biosciences

(Boulder, CO) y se utilizaron sin purificación adicional. Las estructuras TSB- C4 y C6- TSB fueron sintetizados según el Ejemplo 9. Los ligandos AEM, AEBM y AETM fueron sintetizados según los ejemplos 1- 5. El medio de exclusión por tamaño de tamaño apropiado es Biogel P2 (Bio- Rad Laboratories, Hercules, CA), y el corte de peso molecular de membrana de ultrafiltración adecuadamente dimensionada es de 3 kD.

En todos los casos, los grupos de protectores BOC fueron retirados por la disolución del polvo liofilizado obtenido según el ejemplo 11 en 90% TFA/10% anisol durante una hora a 4 °C seguido por superdilución 10x en buffer HEPES 25 mM pH 8.2 conteniendo NaCl 0.150M. El pH se ajustó entre 7.0 y 8.0 utilizando una solución de NaOH después de lo cual el material se pasa a través de una columna P2 Biogel para eliminar anisol, BOC y otros subproductos de desprotección de bajo peso molecular , así como también cualquier otra sal contaminante. Luego la solución de conjugado desprotegida, purificada, acuosa se concentra, utilizando membranas Amicon 3K (Millipore, Billerica, MA) a aproximadamente 58 U de insulina/ml (con base en mediciones A280) y se almacenada a 4 ° C hasta que se necesite. Debido a que el material NH2- B1- BOC2 (A1, B29)- insulina de inicio sólo posee un grupo amina libre en el extremo Phe- B1, el Phe- Bl es el único sitio de conjugación de insulina con la estructura como se verifica en cada producto final desprotegido por la secuenciación N- terminal.

En la siguiente tabla (y otras similares en los ejemplos), los valores de peso molecular de estructura son para los ésteres activados de las estructuras. De manera que se puede calcular inmediatamente la masa de la estructura de éster activado para agregar a la mezcla de reacción. Una vez reaccionado, la estructura pierde los ésteres activados y por lo tanto la contribución de peso molecular en el producto final es mucho menor.

Conjugado	**Estructura**	**Peso Mol estructura**	**Ligando**	**Peso Molecular AE-azúcar**	**Pureza (HPLC)**	**Peso molecular (LC-MS)**	**azúcar/insulina**
TSB- AEM- 2 (Bl)	TSB	501	AEM	223	97%	6410	2.0
TSB- AEBM- 2 (Bl)	TSB	501	AEBM	385	94%	6734	2.0

TSB- AETM- 2 (Bl)	TSB	501	AETM	547	96%	7057	2.0
TSB- C4- AEM- 2 (Bl)	TSB- C4	755	AEM	223	95%	6665	2.0
TSB- C4- AEBM- 2 (B1)	TSB- C4	755	AEBM	385	97%	6989	2.0
TSB- C4- AETM- 2 (B1)	TSB- C4	755	AETM	547	95%	7313	2.0
TSB- C6- AEM- 2 (Bl)	TSB- C6	882	AEM	223	99%	6791	2.0
TSB- C6- AEBM- 2 (B1)	TSB- C6	882	AEBM	385	99%	7114	2.0
TSB- C6- AETM- 2 (B1)	TSB- C6	882	AETM	547	95%	7438	2.0
TSAT- AEM- 2 (Bl)	TSAT	482	AEM	223	98%	6390	2.0
TSAT- AEBM- 2 (Bl)	TSAT	482	AEBM	385	95%	6714	2.0
TSAT- AETM- 2 (Bl)	TSAT	482	AETM	547	94%	7038	2.0
M: TSAT- C6- AEM- 2 (Bl)	TSAT- C6	822	AEM	223	97%	6730	2.0
L3: TSAT- C6- AEBM- 2 (Bl)	TSAT- C6	822	AEBM	385	99%	7054	2.0
L2: TSAT- C6- AETM- 2 (Bl)	TSAT- C6	822	AETM	547	97%	7378	2.0
01.16: TSPE- AEM- 3 (Bl)	TSPE	813	AEM	223	98%	6829	3.0
TSPE- AEBM- 3 (Bl)	TSPE	813	AEBM	385	97%	7314	3.0

TSPE- AETM- 3 (Bl)	TSPE	813	AETM	547	94%	7802	3.0

Ejemplo 13- Conjugados de insulina B1 con sacáridos multivalentes - ligandos mixtos

Utilizando el método descrito en el Ejemplo 11 y el fármaco portador de amina, NH2- BI- BOC2 (A1, B29)- insulina (PM = 6.008 g/mol) del Ejemplo 8, se prepararon conjugados de insulina que poseían una mezcla de ligandos sacáridos conectados con la estructura.

Las estructuras de éster activado TSAT- C6 y TSPE fueron adquiridos en Molecular Biosciences (Boulder, CO) y se utilizaron sin purificación adicional. AEM, AEBM y AETM fueron sintetizados según los ejemplos 1- 5. El medio de exclusión por tamaño de tamaño apropiado es Biogel P2 (Bio- Rad Laboratories, Hercules, CA), y el corte de peso molecular de membrana de ultrafiltración adecuadamente dimensionada es de 3 kD.

En todos los casos, los grupos protectores BOC fueron retirados por la disolución del polvo liofilizado obtenido según el ejemplo 11 en 90% TFA/10% anisol durante una hora a 4 ° C seguido por superdilución 10x en buffer HEPES 25 mM pH 8.2 conteniendo NaCl 0.150M. El pH se ajustó entre 7.0 y 8.0 utilizando una solución de NaOH después de que el material fue pasado a través de una columna Biogel P2 para eliminar anisol, BOC y otros subproductos de desprotección de bajo peso molecular , así como también cualquier otra sal contaminante. Luego la solución de conjugado desprotegida, purificada, acuosa se concentró, utilizando membranas Amicon 3K (Millipore, Billerica, MA) hasta el nivel deseado y se almacenó a 4 ° C hasta necesitarse. Debido a que el material NH2- B1- BOC2 (A1, B29)- insulina de inicio posee un grupo amina libre en el extremo Phe- B1, el Phe- B1 es el único sitio de conjugación de insulina con la estructura como se verificó en cada producto final desprotegido mediante secuenciación N- terminal.

Identidad del conjugado	**Estructura**	**Peso Mol estructura**	**Ligando mixto**	**Peso molecular AE-azúcar**	**Pureza (HPLC)**	**Peso molecular (LC-MS)**	**Azúcar/insulina**

TSPE- AEM- 1- AETM- 2 (Bl)	TSPE	813	AEM/AETM (33/67 mol/mol)	223/547	94%	7478	1.0 AEM, 2.0 AETM
TSPE- AEM- 2- AETM- 1 (Bl)	TSPE	813	AEM/AETM (67/33 mol/mol)	223/547	94%	7152	2.0 AEM, 1.0 AETM
TSAT- C6- AEM- 1- AEBM- 1 (B1)	TSAT- C6	822	AEM/AEBM (50/50 mol/mol)	223/385	96%	6892	1.0 AEM, 1.0 AEBM
L4: TSAT- C6- AEBM- 1- AETM- 1 (IB)	TSAT- C6	822	AEBM/AETM (50/50 mol/mol)	385/547	95%	7216	1.0 AEBM, 1.0 AETM

Ejemplo 14 - Conjugados de insulina B1 con sacáridos multivalentes utilizando sacáridos multivalentes pre- fabricados

Utilizando el método descrito en el Ejemplo 11 y el fármaco portador de amina, NH_2- B1- BOC2 (Al, B29)- insulina (PM = 6.008 g/mol) del Ejemplo 8, los siguientes conjugados de insulina se preparan a partir de ligandos que contienen aminas multivalentes pre- sintetizados. Las estructuras de éster activado de disuccinimidil suberato (DSS) y TSAT- C6 se compran en Molecular Biosciences (Boulder, CO) y se utilizan sin purificación adicional. Moléculas divalentes de AEM- 2, AEBM- 2, y AETM- 2 conteniendo una amina reactiva terminal se preparan mediante la conjugación de dos de cada ligando con una estructura adecuada con la cual una amina reactiva también se conjuga. Moléculas trivalentes de AEM- 3, AEBM- 3, y AETM- 3 conteniendo una amina reactiva terminal son preparadas por la conjugación de tres de cada ligando con una estructura adecuada con la cual una amina reactiva también se conjuga. El

medio de exclusión por tamaño de tamaño apropiado es Biogel P2 (Bio- Rad Laboratories, Hercules, CA), y el corte de peso molecular de membrana de ultrafiltración adecuadamente dimensionada es de 3 kD.

En todos los casos, los grupos BOC protectores se retiran mediante la disolución del polvo liofilizado obtenido según el ejemplo 11 en 90% TFA/10% anisol durante una hora a 4 ° C seguido por superdilución 10x en buffer HEPES 25 mM pH 8.2 conteniendo NaCl 0.150 M. El pH se ajusta entre 7.0 y 8.0 utilizando una solución de NaOH después de lo cual el material se pasa a través de una columna P2 Biogel para eliminar anisol, BOC y otros subproductos de desprotección de bajo peso molecular , así como también cualquier otra sal contaminante. Luego la solución de conjugado desprotegida, purificada, acuosa se concentra utilizando membranas Amicon 3K (Millipore, Billerica, MA) hasta el nivel deseado y se almacena a 4 ° C hasta que se necesite. Debido a que el material NH2- B1- BOC2 (A1, B29)- insulina inicial solamente posee un grupo amina libre en el extremo Phe- B1, Phe- B 1 es el único sitio de conjugación de insulina con la estructura como se verificó en cada producto final desprotegido mediante secuenciación N- terminal.

Conjugado	**Condiciones de síntesis**				**Caracterización de Conjugado esperada**	
Identidad	**Estructura**	**Peso Mol Estructura**	**Ligando**	**PM AE-azúcar**	**Peso molecular (LC-MS)**	**Azúcar/insulina**
DSS- (AEM- 2)- 1 (B1)	DSS	368	AEM- 2	676	6621	2.0 AEM
DSS- (AEM- 2)- 1 (B1)	DSS	368	AEBM- 2	1000	6945	2.0 AEBM
DSS- (AEM- 2)- 1 (B1)	DSS	368	AETM- 2	1324	7269	2.0 AETM
DSS- (AEM- 3)- 1 (B1)	DSS	368	AEM- 3	1085	7031	3.0 AEM

DSS- (AEM- 3)- 1 (Bl)	DSS	368	AEBM- 3	1571	7517	3.0 AEBM
DSS- (AEM- 3)- 1 (Bl)	DSS	368	AETM- 3	2057	8003	3.0 AETM
TSAT- C6- (AEM- 2)- 2 (Bl)	TSAT- C6	822	AEM- 2	676	7637	4.0 AEM
TSAT- C6- (AEBM- 2)- 2 (Bl)	TSAT- C6	822	AEBM- 2	1000	8285	4.0 AEBM
TSAT- C6- (AEM- 2)- 2 (Bl)	TSAT- C6	822	AETM- 2	1324	8933	4.0 AETM
TSAT- C6- (AEM- 3)- 2 (Bl)	TSAT- C6	822	AEM- 3	1085	8046	6.0 AEM
TSAT- C6- (AEBM- 3)- 2 (Bl)	TSAT- C6	822	AEBM- 3	1571	9018	6.0 AEBM
TSAT- C6- (AEM- 3)- 2 (Bl)	TSAT- C6	822	AETM- 3	2057	9990	6.0 AETM

Ejemplo 15 - Conjugados de insulina B1 con sacáridos multivalentes utilizando la estructura dendrítica - ligando homogéneo

0.1 g (0,098 mmol) dendrita que contiene un núcleo amino y cuatro grupos alquino terminales preparados en el Ejemplo 10b se disuelve en 100 mg/ml en DMSO anhidro. La solución se agrega por goteo a una solución conteniendo disuccinimidil suberato (DSS, Molecular Biosciences, 0,098 mmol) y trietilamina (400 uL) y se deja reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego esta mezcla se agrega por goteo a una solución de 50 mg/ml conteniendo la NH2- B1- B0C2- insulina (A1, B29) (PM = 6.008 g/mol) del ejemplo 8 (0.588g, 0,098 mmol) y se dejó reaccionar durante 2 horas.

El conjugado resultante es superdiluido en el agua, y el pH se ajusta a 8.0. La solución es desalinizada con P2 BioGel, seguido por concentración utilizando dispositivos de ultrafiltración Amicon 3k. La solución resultante se purifica mediante cromatografía en fase reversa, se coloca

en rotavapor para eliminar el acetonitrilo, y se liofiliza. Los grupos BOC protectores se retiran mediante la disolución del polvo liofilizado en un 90% TFA/10% anisol durante una hora a 4 ° C seguido por superdilución 10x en buffer HEPES 25 mM pH 8.2 conteniendo NaCl 0.150 M. El pH se ajusta entre 7.0 y 8.0 utilizando una solución de NaOH después de lo cual el material se pasa a través de una columna P2 Biogel para eliminar anisol, BOC y otros subproductos de desprotección de bajo peso molecular , así como también cualquier otra sal contaminante. Luego la solución de conjugado desprotegida, purificada, acuosa se concentra utilizando membranas Amicon 3K (Millipore, Billerica, MA) hasta el nivel deseado y se almacena a 4 ° C hasta que se necesite. Debido a que el material NH2- B1- BOC2 (A1, B29)- insulina de inicio sólo posee un grupo amina libre en el extremo Phe- B1, el Phe- Bl es el único sitio de conjugación de insulina para la estructura y se verifica en cada producto final desprotegido mediante secuenciación N-terminal.

Ejemplo 16 Síntesis de NH2- B29- BOC2 (Al, Bl)- insulina

a. Fmoc- L- (B29)- insulina

En una síntesis típica, 4 g de insulina en polvo (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) se disuelven en 100 ml de DMSO anhidro a temperatura ambiente, seguido por la adición de 4 ml de trietilamina (TEA). La solución se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, 1,2 equivalentes de 9- fluorenilmetil- succinimidil carbonato (Fmoc- NHS)(Sigma Aldrich, St. Louis, MO) se agregan lentamente a la solución de insulina- TEA como una solución 1.0 M de Fmoc- NHS en THF. La reacción se mezcla durante aproximadamente una hora. La reacción se apaga a través de la adición de 4 ml de una solución concentrada conteniendo 250 ul de etanolamina en 5 ml de DMSO seguido por mezclado durante cinco minutos. Después de apagar, toda la solución se vierte en 1600 ml de acetona y se mezca brevemente con una espátula. A continuación, 8 x 400 ul alícuotas de una solución HCl al 18.9% : agua se agregan por goteo sobre la superficie de la mezcla para precipitar la insulina reaccionada. El material precipitado se centrifuga y el sobrenadante se decanta en un segundo vaso, mientras que la torta de precipitado se guardó y se mantuvo al margen. A la solución de sobrenadante, se agregan por goteo otras 8 x 400 ul alícuotas de una solución HCl al 18.9% : agua sobre la superficie de la mezcla para obtener un segundo precipitado de insulina reaccionada. Este segundo precipitado se centrifuga y el sobrenadante se descarta. Las tortas de centrífuga combinadas de los dos pasos de

precipitación se lavan una vez con acetona seguido de secado al vacío a temperatura ambiente para proporcionar el polvo crudo, que normalmente contiene un 20% del producto Fmoc1, 65% del producto Fmoc2, y 15% de insulina sin reaccionar.

Un método de HPLC de fase inversa preparativa se utiliza para aislar la fmoc- insulina pura deseada a partir del polvo crudo. El Buffer A es agua desionizada conteniendo TFA al 0.1% y el buffer B es acetonitrilo conteniendo TFA al 0.1%. El polvo crudo se disuelve en 25 mg/ml en una mezcla de 70%A/30%B y se filtra por jeringa antes de la inyección en la columna. Antes de la purificación, la columna (Waters C18 SymmetryPrep, 7 um, 19 x 150 mm) se equilibra a 15 ml/minuto con una fase móvil 70%A/30%B utilizando un sistema de Waters DeltraPrep 600. Aproximadamente 5 ml de la solución en polvo crudo se inyecta en la columna a una tasa de flujo de 15 ml/minuto en el transcurso de 5 minutos después de lo cual se emplea un gradiente lineal entre 70%A/30%B y 62% A/38% B en el transcurso de los próximos 3.5 minutos y se mantiene allí por un adicional de 2.5 minutos. Utilizando este método, el pico Fmoc1 deseado eluye en aproximadamente 3 minutos después del pico RHI sin reaccionar, seguido de cerca por el pico de Fmoc2- insulina. Una vez recolectada, la solución se sometió a rotoevaporación para elimitar acetonitrilo y se liofiliza para obtener polvo puro de Fmoc- insulina. La identidad es verificada por LC- MS (HT Laboratories, San Diego, CA) y el sitio de conjugación se determina mediante secuenciación N- terminal (Western Analytical, St. Louis, MO).

b. BOC2 (A1, B1)- Fmoc- (B29)- insulina

En una síntesis típica, 1 g de Fmoc1- (B29)- insulina se disuelve en 25 ml de DMSO anhidro a temperatura ambiente, seguido por la adición de 1 ml de trietilamina (TEA). La solución se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, 0.379 ml (2,2 equivalentes) de solución de di- tert- butil- dicarbonato/THF (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) se agrega lentamente a la solución de insulina- TEA y se mezcla durante aproximadamente una hora. La reacción se apaga a través de la adición de 1 ml de una solución concentrada conteniendo 250 ul de etanolamina en 5 ml de DMSO seguido por mezclado durante cinco minutos. Después de apagar, toda la solución se vierte en 400 ml de acetona y se mezcla brevemente con una espátula. A continuación, 8 x 100 ul alícuotas de una solución 18,9% HC1: agua se agrega por goteo sobre la superficie de la mezcla para precipitar la insulina reaccionada. El material precipitado se centrifuga y el sobrenadante se decanta en un segundo vaso, mientras

que la torta de precipitado se guardó y se mantuvo al margen. A la solución de sobrenadante, se agregán por goteo otras 8 x 100 ul alícuotas de una solución HCl al 18.9% : agua sobre la superficie de la mezcla para obtener un segundo precipitado de insulina reaccionada. Este segundo precipitado se centrifuga y el sobrenadante se descarta. Las tortas de centrífuga combinadas de los dos pasos de precipitación se lavan una vez con acetona seguido de secado al vacío a temperatura ambiente para proporcionar el polvo crudo, que generalmente contiene más del 90% del producto BOC2- Fmoc- 1 deseado.

Se utiliza un método de HPLC de fase inversa preparativa para aislar BOC2- Fmoc- 1- insulina pura desde el polvo crudo. El Buffer A es agua desionizada conteniendo TFA al 0.1% y el buffer B es acetonitrilo conteniendo TFA al 0.1%. El polvo crudo se disuelve en 25 mg/ml en una mezcla 70%A/30%B y se filtra por jeringa antes de la inyección en la columna. Antes de la purificación, la columna (Waters C18 SymmetryPrep, 7 um, 19 x 150 mm) se equilibra a 15 ml/minuto con una fase móvil 70% A/30%B utilizando un sistema Waters DeltraPrep 600. Aproximadamente 5 ml de la solución en polvo crudo se inyecta en la columna a una tasa de 15 ml/minuto en el transcurso de 5 minutos después de lo cual se emplea un gradiente lineal entre el 70%A/30%B y 62% A/38% B en el transcurso de los próximos 3.5 minutos y se mantiene allí por 2.5 minutos más. Utilizando este método, el el pico BOC2- Fmoc- 1 deseado eluye en aproximadamente 5 minutos después del material inicial de Fmoc1- insulina. Una vez recolectada, la solución se sometió a rotoevaporación para elimitar el acetonitrilo y se liofiliza para obtener polvo de BOC2 (A1, B1)- Fmoc (B29)- insulina pura. La identidad es verificada por LC- MS (HT Laboratories, San Diego, CA) y el sitio de conjugación se determina mediante secuenciación N- terminal (Western Analytical, St. Louis, MO).

c. NH2- (B29)- BOC2 (Al, Bl)- insulina

El grupo protector Fmoc de la BOC2 (Al, Bl)- Fmoc (B29) se elimina por la disolución del polvo liofilizado obtenido según el paso anterior en piridina al 20% en dimetilformamida (DMF) durante 30 minutos a 4 ° C seguido por superdilución 10x en buffer HEPES 25 mM pH 8.2 conteniendo NaCl 0.150 M. El pH se ajusta entre 7.0 y 8.0 utilizando una solución de NaOH después de lo cual el material se pasa a través de una columna P2 Biogel para eliminar Fmoc, DMF, y cualquier otra sal contaminante. La NH2- (B29)- BOC2 (Al, Bl)- insulina es liofilizada en polvo, si es necesario o se utiliza directamente en una solución acuosa si se desea.

Ejemplo 17- Síntesis de conjugados de NH2- B29- BOC2 (A1, B1)- insulina

Todos los conjugados multivalentes, de ligandos, de fármacos descritos en los ejemplos anteriores que utilizan la NH2- Bl- BOC2- insulina (Al, B29) del Ejemplo 8 se pueden preparar utilizando la NH2- B29- BOC2 (Al, Bl)- insulina del ejemplo 16. Todos los conjugados resultantes poseerán el mismo peso molecular y características de grado de sustitución, pero el sitio de conjugación con la molécula de insulina será en el grupo amino épsilon B29 y no el Phe-B1 N- terminal. Esto puede confirmarse mediante secuenciación N- terminal.

Ejemplo 18- Conjugación de fármacos funcionalizados por amina con ésteres activados multivalentes en solvente orgánico (fármaco agregado al final)

Este ejemplo describe una alternativa al método descrito en el ejemplo 11 en el que se agrega el fármaco a la estructura antes que el ligando. En este ejemplo, el ligando (s) se agrega a la estructura antes del fármaco.

Una estructura conteniendo ésteres activados N- terminales se disuelve a 60 mM en 1 ml de DMSO anhidro seguido por la adición de 400 ul (exceso) de trietilamina (TEA). La solución se agita rápidamente durante 10 minutos a temperatura ambiente. Al mismo tiempo, una solución 122 mM de ligando se prepara en un volumen apropiado de DMSO anhidro. Una vez disuelta, se agrega por goteo suficiente solución de ligando en el transcurso de diez minutos para proporcionar una serie de equivalentes reactivos exactamente igual a la cantidad de grupos éster activados en la estructura, N, menos uno. Por ejemplo, si hay N = 3 grupos éster activados en la estructura, entonces se agrega (lx (3- l)x60mM/122 mM)= 0.98 ml de solución de ligando. Si hay N = 4 grupos éster activados en la estructura, entonces se agrega (lx (4- l)x60mM/122 mM)= 1.5 ml de solución de ligando, y así sucesivamente. Después de agregar la solución de ligando, la solución se agita durante dos horas a temperatura ambiente.

Luego el fármaco portador de amina se disuelve de manera separada en 7.5 ml de DMSO anhidro con una concentración de 8.1 mM. Una vez disuelta, toda la solución de fármaco se agrega en el transcurso de un minuto a la solución de estructura/DMSO/ligando/TEA seguido por mezclado a temperatura ambiente durante dos horas para asegurar la reacción completa.

Luego la solución resultante se superdiluye 10x en una solución salina amortiguada por HEPES 20 mM pH 5.0 con NaCl 0.150 M seguido por el ajuste del pH con HCl diluido a un pH final de 8.0. La solución acuosa es purificada primero por exclusión por tamaños con una fase

sólida adecuada para la separación deseada de materiales conjugados y no conjugados. La solución que pasa por el volumen vacío de la columna se concentra utilizando una membrana de ultrafiltración de tamaño adecuado a aproximadamente 10 ml. Esta solución se purifica adicionalmente para obtener el producto deseado con HPLC de fase inversa preparativa en una columna Waters SymmetryPrep C18, 7 um, 19 x 150 mm. El Buffer A es agua desionizada conteniendo TFA al 0.1% y el buffer B es acetonitrilo conteniendo TFA al 0.1%. Antes de la purificación, la columna se equilibra a 15 ml/minuto con una fase móvil 80%A/20%B utilizando un sistema Waters DeltraPrep 600. Aproximadamente 5 ml de la solución cruda se inyectan en la columna a lo largo de 2 minutos con una tasa de 15 ml/minuto después de lo cual se emplea un gradiente lineal entre el 80% A/20 B% y 75% A/25% B durante los siguientes 5 minutos, seguido por un gradiente lineal más lento de 75% A/25 B% a 62% A/38% B durante los próximos 22 minutos. El tiempo de retención del pico deseado variará dependiendo del fármaco, estructura, y ligando utilizados. Una vez recolectada, la solución se sometió a rotoevaporación para elimitar el acetonitrilo y se liofiliza para obtener conjugado puro cuya identidad puede ser verificada por LC- MS (HT Laboratories, San Diego, CA).

Ejemplo 19- Conjugados de B29- insulina con sacáridos multivalentes producidos en solvente orgánico a partir de insulina no protegida

En este ejemplo se hace uso del hecho de que en la insulina no protegida, la fracción épsilon- amino Lys B29 es la amina más reactiva, seguida por A1 y B1. Por lo tanto, cuando la insulina no protegida se utiliza como el fármaco que contiene amina, el conjugado resultante debe ser predominantemente sustituido en la posición Lys- B29. Utilizando el método descrito en el Ejemplo 18 e insulina humana recombinante (PM = 5808 Da, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) como el fármaco que contiene amina, los siguientes conjugados de insulina se prepararon utilizando la estructura de éster activado TSAT- C6 comprada en Molecular Biosciences (Boulder, CO). La AEM y AETM se sintetizaron como se describió anteriormente. El medio de exclusión por tamaño de tamaño apropiado fue Biogel P2 (Bio- Rad Laboratories, Hercules, CA), y el corte de peso molecular de membrana de sultrafiltración adecuadamente dimensionadafue 3kDa.

Conjugado	Estructura	PM Estructura	Ligando	PM AE-azúcar	Pureza (HPLC)	Peso molecular (LC-MS)	Zzúcar/insulina
I £ 7: TSAT-C6- AEM- 2 (B29)	TSAT- C6	**822**	AEM	**223**	**93%**	**6729**	**2.0**
L6: TSAT-C6- AETM- 2 (B29)	TSAT- C6	**822**	AETM	**547**	**95%**	**7378**	**2.0**

Según la secuenciación N- terminal, aproximadamente 85% de la estructura que contiene AEM se conjugó con insulina a través de Lys- B29 y aproximadamente el 87% de la estructura conteniendo AETM se conjugó con insulina a través de Lys- B29.

Ejemplo 20 - Conjugación de fármacos funcionalizados por amina con ésteres activados multivalentes en solvente acuoso (fármaco agregado al final)

Este ejemplo describe una alternativa al método descrito en el ejemplo 18 en el cual la reacción se realiza en un solvente acuoso en lugar de solvente orgánico.

La estructura conteniendo ésteres activados N- terminales se disuelve en 60 mm de 6.25 ml de DMSO anhidro seguido por la adición de 2 ml (exceso) de trietilamina (TEA). La solución se agita rápidamente durante 10 minutos a temperatura ambiente. Al mismo tiempo, una solución 448 mM de ligando se prepara en un volumen apropiado de DMSO anhidro. Una vez disuelta, se agrega por goteo suficiente solución de ligando en el transcurso de diez minutos para proporcionar una serie de equivalentes reactivos igual a 1.5 veces el número de grupos éster activados en la estructura, N, menos uno. Por ejemplo, si hay N = 3 grupos éster activados en la estructura, entonces se agrega (1.5 x (3- l)x60mM/448 mM)x6.25ml = 2.5 ml de solución de ligando. Si hay N = 4 grupos éster activados en la estructura, entonces se agrega (1.5 x (4-l)x60mM/448 mM)x6.25ml = 3.8 ml de solución de ligando, y así sucesivamente. Después de agregar la solución de ligando, la solución se agita durante una hora a temperatura ambiente.

Luego el fármaco portador de amina se disuelve de manera separada a 17.2 mm en 2,67 ml de 0.1 M, pH 11 buffer de carbonato de sodio y el pH se ajusta posteriormente a 10.8 con hidróxido de sodio 1.0 N. Una vez disuelta, toda la solución de estructura/DMSO/ligando/TEA se agrega por goteo durante 75 minutos a la solución de fármaco/ buffer de carbonato. Durante la adición, el pH de la mezcla resultante se ajusta cada 5 minutos a 10.8 si es necesario utilizando HCl diluido o NaOH. La solución se dejó en agitación durante 15 minutos después de la adición por goteo para asegurar la reacción completa.

Luego la solución resultante se superdiluye 10x en una solución salina amortiguada por HEPES 20 mM pH 5.0 con NaCl 0.150 M seguido por el ajuste del pH con HC1 diluido a un pH final de 8.0. La solución acuosa es purificada primero por exclusión por tamaños con una fase sólida adecuada para la separación deseada de materiales conjugados y no conjugados. La solución que pasa por el volumen vacío de la columna se concentra utilizando una membrana de ultrafiltración de tamaño adecuado a aproximadamente 40 ml. Esta solución se purifica para obtener el producto deseado con HPLC de fase inversa preparativa en una columna SymmetryPrep Waters C18, um 7, 19 x 150 mm de columna. El Buffer A es agua desionizada conteniendo TFA al 0.1% y el buffer B es acetonitrilo conteniendo TFA al 0.1%. Antes de la purificación, la columna se equilibra a 15 ml/minuto con una fase móvil 80%A/20%B utilizando un sistema Waters DeltraPrep 600. Aproximadamente 5 ml de la solución cruda se inyecta en la columna durante 2 minutos con una tasa de 15 ml/minuto después de lo cual se emplea un gradiente lineal entre el 80% A/20 B% y 75% A/25% B durante los siguientes 5 minutos, seguido por un gradiente lineal más lento de 75% A/25 B% a 62% A/38% B durante los próximos 22 minutos. El tiempo de retención del pico deseado variará dependiendo del fármaco, la estructura, y ligando utilizados. Una vez recolectada, la solución se sometió a rotoevaporación para elimitar acetonitrilo y se liofiliza para obtener conjugado puro cuya identidad puede verificarse por LC- MS (HT Laboratories, San Diego, CA).

Ejemplo 21- Conjugado de B29- AEM- 2- insulina sintetizada en solvente acuoso a partir de insulina no protegida

Este ejemplo se hace uso del hecho de que en la insulina no protegida, la fracción épsilon- amino Lys B29 es la amina más reactiva, seguida por Al y Bl. Por lo tanto, cuando la

insulina no protegida se utiliza como fármaco que contiene amina el conjugado resultante debe ser

predominantemente sustituido en la posición Lys- B29. Utilizando el método descrito en el Ejemplo 20 y la insulina humana recombinante (PM = 5808, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) como el fármaco que contiene amina, un conjugado de AEM- 2- insulina se preparó utilizando la estructura de éster activado TSAT- C6 comprada en Molecular Biosciences (Boulder, CO). La AEM utilizada como análogo de insulina se sintetiza como se describió anteriormente. El medio de exclusión por tamaño de tamaño apropiado es Biogel P2 (Bio- Rad Laboratories, Hercules, CA), y el corte de peso molecular de membrana de ultrafiltración de tamaño adecuado fue 3 kD. El producto final (95% de pureza por HPLC) tuvo un peso molecular deseado de 6729 g/mol (LC- MS), lo que representa un total de 2.0 moléculas de AEM conjugadas por insulina, con más del 85% de las moléculas de conjugado conjugadas en el sitio Lys- B29 (Secuenciación N-terminal).

Ejemplo 22- Conjugación generalizada de fármacos funcionalizados por aminas con estructura que contiene aldehído

a. Estructura funcionalizada con más de un ligando y un aldehído terminal

En primer lugar, una estructura conteniendo ésteres activados N- terminales se disuelve a 60 mM en 27.0 ml de DMSO anhidro seguido por la adición de 800 ul (exceso) de trietilamina (TEA). La solución se agita rápidamente durante 10 minutos a temperatura ambiente. Una solución concentrada de dietilacetal portador de amina se prepara a 580 mm en 5 ml de DMSO anhidro. Una vez disuelta, se agrega 2.9 ml de la solución de dietil acetal por goteo durante 5 minutos a la solución de estructura/DMSO/TEA seguido por mezclado a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego los ésteres restantes activados se hacen reaccionar con ligandos funcionalizados por aminas de la siguiente manera. Una solución 370 mM de ligando se prepara en un volumen apropiado de DMSO seco. Una vez disuelta, se agrega suficiente solución para proporcionar un número de equivalentes reactivos igual a 1.5 veces el número inicial de grupos éster activados, N, menos uno. Por ejemplo, si hay N = 3 grupos éster activados iniciales por estructura, entonces se agrega (1.5 x (3- l)x60mMx27/370 mM)= 13 ml de solución de ligando. Si hay N = 4 grupos éster activados iniciales por estructura, entonces se agrega (1.5 x (4- l)x60mMx27/370 mM)= 20 ml de solución de ligando, y así sucesivamente. Después de agregar

la solución de ligando, la solución se agita durante 1 hora y 45 minutos más a temperatura ambiente para asegurar reacción completa. Después de la reacción, la solución completa se diluye 10x con éter dietílico, se mezcla vigorosamente y se centrifuga para separar desde el sobrenadante la fase inferior densa conteniendo el material deseado. Después de descartar el sobrenadante, se agrega el mismo volumen de etanol para generar una masa sólida precipitada. Después de centrifugar y desechar el sobrenadante, el material se lava exhaustivamente con etanol y éter y se seca al vacío para proporcionar la estructura de crudo conteniendo múltiples ligandos y un grupo dietil acetal.

b. Conjugación de fármaco funcionalizado por aminas con aldehído terminal

Una vez seco, el grupo aldehído se genera a partir del dietil acetal disolviendo el material recogido en 60 ml de agua desionizada con el pH de la solución ajustado a 1.0. La solución se mezcla durante 30 minutos después de lo cual se agrega 6 ml de buffer 200 mM HEPES pH 8.2 conteniendo 1.5 M de NaCl y el pH de la solución se ajusta a 6.5 con solución de NaOH diluido. 48 mmol del fármaco que contiene aminas se agrega a la solución y el pH se ajusta nuevamente a 6.5 si es necesario. Por otra parte, una solución concentrada del agente reductor se prepara disolviendo 1.5 g de cianoborohidruro de sodio (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) en 15 ml de un buufer HEPES 20 mM pH 7.0 con NaCl 0.150 M y el pH se ajusta cuidadosamente a 6.5 con Solución de HCl diluido. Trece mililitros de la solución concentrada de cianoborohidruro se agregan a la solución de fármaco/estructura/aldehído y se deja reaccionar durante la noche a temperatura ambiente.

La solución acuosa resultante se purifica primero por exclusión por tamaños con una fase sólida adecuada para la separación deseada de materiales conjugados y no conjugados. La solución que pasa por el volumen vacío de la columna se concentra utilizando una membrana de ultrafiltración de tamaño adecuado a aproximadamente 10 ml. Esta solución se purifica para obtener el producto deseado con HPLC de fase inversa preparativa en una columna Waters SymmetryPrep C18, 7 um, 19 x 150 mm. El Buffer A es agua desionizada conteniendo TFA al 0.1% y el buffer B es acetonitrilo conteniendo TFA al 0.1%. Antes de la purificación, la columna se equilibró a 15 ml/minuto con una fase móvil 80%A/20%B utilizando un sistema Waters DeltraPrep 600. Aproximadamente 5 ml de la solución cruda se inyecta en la columna durante 2 minutos con una tasa de 15 ml/minuto después de lo cual se emplea un gradiente lineal entre el

80% A/20 B% y 75% A/25% B durante los siguientes 5 minutos, seguido por un gradiente lineal más lento de 75% A/25 B% a 62%A/38%B durante los próximos 22 minutos. El tiempo de retención del pico deseado variará dependiendo del fármaco, la estructura, y ligando utilizados. Una vez recolectada, la solución se sometió a rotoevaporación para elimitar el acetonitrilo y se liofiliza para obtener conjugado puro cuya identidad puede verificarse por LC- MS (HT Laboratories, San Diego, CA).

Ejemplo 23- Estructura AEM- 2 conteniendo un grupo aldehído reactivo terminal y conjugación posterior de insulina en Bl

a. TSAT funcionalizado con 2 AEM y 1 aminobutilaldehído dietil acetal (ABDA)

Este material se sintetizó según el método descrito en el Ejemplo 22a utilizando TSAT (Molecular Biosciences, Boulder, CO) como la estructura multivalente de ésteres activados y 4 aminobutiraldehido dietil acetal (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) como el dietilacetal portador de amina. AEM (PM = 223 g/mol), sintetizado como se describió anteriormente se utilizó como ligando.

b. Conjugación de TSAT- AEM- 2- ABDA con NH_2B1- BOC2 (A1, B29)- insulina

Este material se sintetizó utilizando el método descrito en el Ejemplo 22b y el TSAT- AEM- 2- ABDA producido en (a) anterior, junto con el fármaco portador de amina, NH_2- B1- BOC2 (Al, B29)- insulina (PM = 6.008 g/mol), sintetizada según el Ejemplo 8. El medio de exclusión por tamaño de tamaño apropiado es Biogel P2 (Bio- Rad Laboratories, Hercules, CA), y el corte de peso molecular de membrana de ultrafiltración de tamaño adecuado fue de 3 kD. Debido a que el material de NH_2- B1- BOC2 (A1, B29)- insulina de inicio sólo posee un grupo amina libre en el extremo Phe- B1, Phe- Bl es el único sitio de conjugación de insulina con la estructura. Los grupos protectores BOC fueron retirados por la disolución del polvo liofilizado en un 90% TFA/10% anisol durante una hora a 4 ° C seguido por superdilución 10x en buffer HEPES 25 mM pH 8.2 conteniendo NaCl 0.150 M. El pH se ajustó entre 7.0 y 8.0 utilizando una solución de NaOH después de lo cual el material fue pasado a través de una columna Biogel P2 para eliminar anisol, BOC y otros subproductos de desprotección de bajo peso molecular , así como también cualquier otra sal contaminante. Luego la solución de conjugado desprotegida, purificada, acuosa se concentró utilizando membranas Amicon 3K (Millipore, Billerica, MA) hasta el nivel deseado y se almacenó a 4 ° C hasta necesitarse.

El producto final (95% puro por HPLC) tuvo el peso molecular deseado de 6462 g/mol (LC- MS), lo que representa un total de 2,0 moléculas de AEM conjugadas por insulina, 99% de las cuales se conjugaron en el sitio Phe - Bl (secuenciación N- terminal).

Ejemplo 24- Estructura AEM- 3- que contiene un grupo aldehído reactivo terminal y la conjugación posterior de insulina en B1

a. TSPE funcionalizado con 3 AEM y 1 aminobutilaldehído dietil acetal (ABDA)

Este material se sintetizó según el método descrito en el Ejemplo 22a utilizando TSPE (Molecular Biosciences, Boulder, CO) como la estructura multivalente éster activado y 4 aminobutiraldehido dietilacetal (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) como el dietilacetal portador de amina. AEM (PM = 223 g/mol), sintetizado como se describe anteriormente, se utilizó como ligando.

b. Conjugación de TSPE- AEM- 3- ABDA con NH2- Bl- B0C2 (A1, B29)- insulina

Este material se sintetizó utilizando el método descrito en el Ejemplo 22b y el TSPE- AEM- 3- ABDA producido en (a) anterior, junto con el fármaco portador de amina, NH2- B1- BOC2 (Al, B29)- insulina (PM = 6.008 g/mol), sintetizado según el Ejemplo 8. El medio de exclusión por tamaño de tamaño apropiado es Biogel P2 (Bio- Rad Laboratories, Hercules, CA), y el corte de peso molecular de membrana de ultrafiltración de tamaño adecuado fue 3 kD. Debido a que el material de NH2- B1- BOC2 (A1, B29)- insulina de inicio sólo posee un grupo amina libre en el extremo Phe- Bl, Phe- Bl es el único sitio de conjugación de insulina con la estructura. Los grupos BOC protectores se retiran mediante la disolución del polvo liofilizado en 90% TFA/10% anisol durante una hora a 4 ° C seguido por superdilución 10x en buffer HEPES 25 mM pH 8.2 conteniendo NaCl 0.150 M. El pH se ajustó entre 7.0 y 8.0 utilizando una solución de NaOH después de lo cual el material fue pasado a través de una columna Biogel P2 para eliminar anisol, BOC y otros subproductos de desprotección de bajo peso molecular , así como también cualquier otra sal contaminante. La solución de conjugado desprotegida, purificada, acuosa se concentró a continuación, utilizando membranas Amicon 3K (Millipore, Billerica, MA) hasta el nivel deseado y se almacenó a 4 °C hasta ser necesitada.

El producto final (95% puro por HPLC) tuvo el peso molecular deseado de 6897 g/mol (LC- MS), lo que representa un total de 3,0 moléculas AEM conjugadas por insulina, el 99% de las cuales se conjugaron en el sitio Phe- Bl (secuenciación N- terminal).

Ejemplo 25- Andamio AEM- 3 conteniendo un grupo aldehído reactivo terminal y la posterior conjugación de insulina en B1 utilizando insulina no protegida

a. TSPE funcionalizado con 3 AEM y 1 aminobutiraldehido dietil acetal (ABDA)

Este material se sintetiza según el método descrito en el Ejemplo 22a utilizando TSPE (Molecular Biosciences, Boulder, CO) como el andamio multivalente de éster activado y 4-aminobutiraldehido dietil acetal (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) como el dietilacetal portador de amina. AEM (PM = 223 g/mol) sintetizado como se describe anteriormente, se utiliza como ligando.

b. Conjugación de TSPE- AEM- 3- ABDA con NH2- Bl- BOC2 (A1, B29)- insulina

Este material se sintetizó utilizando el método descrito en el Ejemplo 22b y el TSPE-AEM- 3- ABDA producido en (a) anterior, junto con el fármaco portador de amina, la insulina no modificada (PM = 5.808 g/mol, Sigma- Aldrich, St. Louis, MO). El medio de exclusión por tamaño de tamaño apropiado fue Biogel P2 (Bio- Rad Laboratories, Hercules, CA), y el corte de peso molecular de membrana de ultrafiltración de tamaño adecuado fue 3 kD. Aunque el material de partida de insulina no protegida tiene tres grupos amino libres, Phe- B1 es el sitio predominante de conjugación de la insulina con el andamio debido al hecho de que Phe- Bl (pKa ~ 6,8) es la amina más reactiva a pH 6,5. El polvo liofilizado se disolvió en buffer HEPES 25 mM pH 8.2 conteniendo NaCl 0.150 M. El pH se ajustó entre 7.0 y 8.0 utilizando una solución de NaOH después de lo cual el material se concentró utilizando membranas Amicon 3K (Millipore, Billerica, MA) hasta el nivel deseado y se almacenó a 4 ° C hasta ser necesitado.

El producto final (95% puro por HPLC) tuvo el peso molecular deseado de 6897 g/mol (LC- MS), lo que representa un total de 3.0 moléculas AEM conjugadas por insulina, > 85% de las cuales se conjugaron en el sitio Phe- Bl (secuenciación N- terminal).

Ejemplo 26- Química de estructuras mixtas y la conjugación correspondiente separada de fármaco y los ligandos

Succinimidil- 3.5- dimaleimidofenil benzoato (SDMB) se puede adquirir en Molecular Biosciences (Boulder, CO) y utilizarse en el siguiente ejemplo sin purificación adicional. SDMB se disuelve en 60 mM de 1.0 ml de DMSO anhidro seguido por la adición de 400 ul (exceso) de trietilamina (TEA). La solución se agita rápidamente durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego el fármaco portador de amina se disuelve de manera separada en 7.5 ml de DMSO anhidro con una concentración de 8.1 mM. Una vez disuelta, toda la solución SDMB se agrega por goteo durante diez minutos a la solución DMSO- fármaco seguida por mezclado a temperatura ambiente durante dos horas para asegurar la reacción completa.

Luego la solución resultante se superdiluye 10x en una solución salina amortiguada por HEPES 20 mM pH 5.0 con NaCl 0.150 M seguido por el ajuste del pH con HC1 diluido a un pH final de 8.0. La solución acuosa se purifica primero por exclusión por tamaños con una fase sólida adecuada para la separación deseada de materiales conjugados y no conjugados. La solución que pasa por el volumen vacío de la columna se concentra utilizando una membrana de ultrafiltración de tamaño adecuado a aproximadamente 10 ml.

Por otra parte, 6.0 mmol de un ligando que contiene amina se disuelve en una solución salina amortiguada por HEPES 20 mM pH 8.2 con NaCl 0.150 M a una concentración de 450 mM. A esta solución, se agrega 6.6 mmol de iminotiolano (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO) y se deja reaccionar a pH 8.2 durante 30 minutos a temperatura ambiente para convertir los grupos amino- terminales en grupos sulfhidrilo terminales. El material resultante se mezcla con los 10 ml de solución de conjugado de estructura- di- - maleimida producido en el paso anterior. Los grupos maleimida se dejan reaccionar con los grupos sulfhidrilo análogos indicadores a pH 8.2 durante 2 horas para asegurar la reacción completa. La solución resultante se purifica por exclusión por tamaños con una fase sólida adecuada para la separación deseada de materiales conjugados y no conjugados. La solución que pasa por el volumen vacío de la columna se concentra utilizando una membrana de ultrafiltración de tamaño adecuado a aproximadamente 10 ml.

Por último, esta solución se purifica para obtener el producto deseado utilizando HPLC de fase inversa preparativa en una Columna Waters SymmetryPrep C18, 7 um, 19 x 150 mm. El Buffer A es agua desionizada conteniendo TFA al 0.1% y el buffer B es acetonitrilo conteniendo TFA al 0.1%. Antes de la purificación, la columna se equilibra a 15 ml/minuto con una fase móvil 80%A/20%B utilizando el sistema Waters DeltraPrep 600. Aproximadamente 5 ml de la

solución cruda se inyecta en la columna durante 2 minutos con una tasa de 15 ml/minuto después de lo cual se emplea un gradiente lineal de 80%A/20%B a 75%A/25%B durante los siguientes 5 minutos, seguido por un gradiente lineal más lento de 75% A/25% B a 62%A/38%B durante los próximos 22 minutos. El tiempo de retención del pico deseado variará dependiendo del fármaco, la estructura, y ligando utilizados. Una vez recolectada, la solución se sometió a rotoevaporación para elimitar acetonitrilo y se liofiliza para obtener conjugado puro cuya identidad puede verificarse por LC- MS (HT Laboratories, San Diego, CA).

Ejemplo 27- Insulina conjugada con sacáridos de aminoetilo utilizando la química estructuras mixtos

Utilizando el método descrito en el Ejemplo 26 y el fármaco portador de amina, NH_2- B1- BOC2 (Al, B29)- insulina (PM = 6.008 g/mol), sintetizada según el ejemplo 8, se obtienen los siguientes conjugados fármaco- específicos. AEM (PM = 223 g/mol), AEBM (PM = 385 g/mol), y AETM (PM = 547 g/mol) se sintetizan como se describió anteriormente y se utilizan como ligandos en la síntesis. El medio de exclusión por tamaño de tamaño apropiado es Biogel P2 (Bio- Rad Laboratories, Hercules, CA), y el corte de peso molecular de membrana de ultrafiltración adecuadamente dimensionada es 3 kD.

En todos los casos, los grupos BOC protectores se retiran mediante la disolución del polvo liofilizado obtenido según el ejemplo 26 en 90% TFA/10% anisol durante una hora a 4 ° C seguido por superdilución 10x en buffer HEPES 25 mM pH 8.2 conteniendo NaCl 0.150 M. El pH se ajusta entre 7.0 y 8.0 utilizando una solución de NaOH después de lo cual el material se pasa a través de una columna P2 Biogel para eliminar anisol, BOC y otros subproductos de desprotección de bajo peso molecular , así como también cualquier otra sal contaminante. Luego la solución de conjugado desprotegida, purificada, acuosa se concentra utilizando membranas Amicon 3K (Millipore, Billerica, MA) a aproximadamente 58 U de insulina/ml (con base en mediciones A280) y se almacenada a 4 ° C hasta ser necesitada. Debido a que el material de NH_2- B1- BOC2 (A1, B29)- insulina de inicio sólo posee un grupo amina libre en el extremo Phe- B1, Phe- B1 será el único sitio de conjugación de insulina con la estructura. Esto se puede comprobar en cada producto final desprotegido mediante secuenciación N- terminal.

Condiciones de síntesis			Caracterización esperada de conjugado	
Ligando	**Peso molecular AE-azúcar**	**PM de AE-intermedio de iminotiolano**	**Peso molecular (LC- MS)**	**Azúcar/insulina**
AEM	223	360	6822	2.0 AEM
AEBM	385	522	7146	2.0 AEBM
AETM	547	684	7470	2.0 AETM

Ejemplo 28- Química *clic* generalizada para conjugación de fármacos con estructuras complementarias

Una estructura (8.3 mmol) conteniendo al menos una funcionalidad amino y uno o más grupos alquino terminales es llevado a THF (40 ml), agua (40 ml) y se agita en la solución. Un fármaco portador del grupo azidoetilo (10,51 mmol) se agrega seguido por sulfato de cobre (500 mg, 2,0 mmol) y ascorbato de sodio (400 mg, 2,0 mmol). La mezcla resultante se agita a 55- 60° C (baño de aceite) durante 6 horas, se enfria a temperatura ambiente, se agita durante la noche y se concentra al vacío a un volumen medio y se filtra a través de un filtro de microfibra de vidrio. El filtrado se carga en una columna de resina (Dowex 50w 50x4- 100) y se eluye con agua (6 x 75 ml) hasta ser neutral. La columna se eluye con hidróxido de amonio al 15% (10x75 ml) y las fracciones positivas a la ninhidrina se agrupan y se concentran a una espuma de vidrio.

Ejemplo 29- Conjugados preparados con insulinas naturales de otras especies, como bovinas y porcinas

Las insulinas de otras especies conteniendo al menos una funcionalidad amina reactiva (por ejemplo, la insulina bovina y porcina) pueden acoplarse utilizando cualquiera de los métodos utilizados para conjugar la insulina humana. Los expertos en estado de la técnica apreciarán que los pesos moleculares de los conjugados resultantes a partir de la insulina bovina o porcina, serán diferentes dc aquellos hechos a partir de la insulina humana por las cantidades que figuran en la siguiente tabla.

Tipo de insulina	Peso molecular (g/mol)	Diferencia en PM insulina humana PM (g/mol)
Insulina humana	5808	-
Insulina porcina	5778	- 30
Insulina bovina	5733	- 75

Los expertos en estado de la técnica también apreciarán que los conjugados resultantes hechos a partir de insulina bovina o porcina, pueden tener tiempos de retención cromatográfica pico que difieren ligeramente de los conjugados hechos a partir de insulina humana, debido a las pequeñas diferencias en las estructuras entre insulinas.

Ejemplo 30- Conjugados preparados con análogos de insulina tales como lispro, aspart, glulisina, glargina y detemir

Todos los análogos de la insulina que contienen al menos una funcionalidad de amina reactiva (por ejemplo, lispro, aspart, glulisina, glargina y detemir) pueden acoplarse con cualquiera de los métodos utilizados para conjugar insulina humana. Los expertos en estado de la técnica apreciarán que los pesos moleculares de los conjugados resultantes a partir de los análogos de insulina se diferencian de los hechos a partir de insulina humana por las cantidades que figuran en la siguiente tabla.

Tipo de insulina	Peso molecular (G/mol)	Diferencia de PM insulina humana (g/mol)
Insulina humana	5808	-
Insulina lispro	5808	-
Insulina aspart	5832	24
Insulina glulisina	5823	15
Insulina glargina	6063	255
Insulina detemir	5913	105

Los expertos en estado de la técnica también apreciarán que los conjugados resultantes a partir de los análogos de la insulina puede tener tiempos de retención cromatográfica pico que

difieren ligeramente de los conjugados hechos a partir de la insulina humana, debido a las pequeñas diferencias en las estructuras entre insulinas.

El uso de la insulina glulisina (que no contiene una lisina B29, sino más bien una lisina B3) dará principalmente conjugados B3 cuando se utiliza la insulina glulisina no protegida. Sin embargo, si se desean conjugados de la insulina glulisina Bl, entonces insulina glulisina BOC- (Al, B3) primero se sintetiza utilizando el mismo protocolo que BOC- (Al, B29)- insulina humana tal como se describe en el Ejemplo 8.

Ejemplo 31- Conjugados preparados con conjugados secretagogos de insulina peptídica

Los secretagogos de insulina péptida (por ejemplo, sin limitación GLP- 1 o el análogo de exanitida de GLP- 1), los cuales contienen una funcionalidad amina N- terminal pueden acoplarse utilizando cualquiera de los métodos utilizados para conjugar la insulina.

II. En ensayos in vitro de conjugados de ejemplo

Este segundo conjunto de ejemplos describen varios experimentos que investigan las propiedades *in vitro* de algunos conjugados de ejemplo.

Ejemplo 32- Síntesis de conjugados de glicógeno e insulina

Este ejemplo comparativo describe la síntesis de un conjugado de glicógeno e insulina según la publicación de solicitud de patente estadounidense No. 20070099820. En pocas palabras, 1 g de glicógeno purificado derivado de ostras comercialmente disponible (Tipo II, Sigma- Aldrich, St. Louis, MO) se disuelve en agua desionizada a una concentración de 10 mg/ml. CNBr sólido se agrega a la solución resultante en una relación de masa de CNBr a glicógeno de 0.68 y el pH se mantiene constante en 10.7 +/- 0.2 utilizando solución de hidróxido de sodio 3N (NaOH). Después de agitar durante 15 minutos, otra masa igual de CNBr sólido se agrega y el pH se mantiene constante en 10.7 +/- 0.2 con agitación durante 45 minutos. La insulina se agrega a la solución a una relación de masa de insulina a glicógeno de 0.60 y el pH se ajusta a 9.15 con bicarbonato de sodio sólido. La solución se agita durante la noche, se ultrafiltra exhaustivamente contra agua desionizada utilizando un filtro de membrana de disco de polietersulfona MWCO 50 kDA (Millipore, Bedford, MA), y se liofiliza. El polvo resultante se purifica a partir de insulina no conjugada mediante HPLC de filtración de gel (Waters, Milford, MA) con una fase móvil de ácido acético 1M sobre una columna empacada Superdex ™ 30

HiLoad 16/60 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). La fracción de glicógeno insulina se liofiliza para obtener el conjugado como un polvo puro de color blanco. El material purificado resultante contenía 1.0% por peso de insulina por conjugado de insulina- glicógeno como se midió utilizando el análisis de aminoácidos (Biopolímeros UCLA Laboratory, Los Angeles, CA).

Ejemplo 33- Análisis por cromatografía líquida

Este ejemplo describe las diferencias entre los perfiles de RP- HPLC de la insulina-glicógeno sintetizada según el Ejemplo 32 y un conjugado de ejemplo sintetizado según la presente divulgación. 100 ul de 5 mg/ml de solución de insulina- glicógeno sintetizada de acuerdo al ejemplo 32 y 100 ul de una solución 1 mg/ml de conjugado de ejemplo se inyectaron de manera separada en una columna Waters Symmetry C8 5 um (4,6 mm x 250 mm), equilibrada con una fase móvil 80% agua/20% acetonitrilo (cada uno con TFA al 0.1%). El conjugado de ejemplo utilizados en este estudio fue sintetizado utilizando TSAT- C6 como la estructura, AEM como el ligando, e NH2- Bl- BOC2- insulina (Al, B29) como el fármaco.

Las muestras se eluyeron a 1.0 ml/minuto utilizando el siguiente método de gradiente: 0-5 minutos- 80% Agua/20% CH_3CN constante, 5- 35 minutos - gradiente lineal a 50% Agua/50% CH_3CN. Los perfiles de elución en la Figura 1 muestran un solo punto para el conjugado de ejemplo que indica una sola especie químicamente distinta en comparación con un perfil de elución amplio y heterogéneo para el conjugado de insulina- glicógeno, lo que indica una amplia distribución de diferentes entidades químicas y/o pesos moleculares.

Ejemplo 34- Análisis de distribución de peso molecular

En este ejemplo se describe la diferencia en peso molecular y distribución de peso molecular entre la insulina- glicógeno sintetizada según el Ejemplo 32 y el mismo conjugado de ejemplo. El peso molecular y la distribución de peso molecular del conjugado de insulina-glicógeno se determinaron mediante la inyección de 1 ml de solución de 25 mg/ml de solución salina amortiguada por HEPES pH 7 en una columna por exclusión de tamaños Ultrahidrogel ™(Waters Corporation, Millford, MA) equilibrada con solución salina amortiguada con HEPES. La columna se eluyó durante 30 minutos a 0.5 ml por minuto, y el perfil de elución fue medido como absorbancia a 280 nm. En experimentos separados utilizando el mismo protocolo, estándares de peso molecular de dextrano de 1000, 5000, 12000, 25000, 50000, 80000, 150000,

270000, 410000 y g/mol (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO) fueron inyectados para establecer una curva de calibración de peso molecular versus el tiempo de retención. Con base en la curva de calibración y el perfil de elución del conjugado de insulina- glicógeno, el peso molecular promedio se determinó en 500.000 g/mol con 67% de la distribución eluyendo sobre un rango amplio de 250.000 a 1.000.000 g/mol (datos no mostrados). Por el contrario, el conjugado de ejemplo se determinó con sólo un único peso molecular de exactamente 6730 g/mol según lo determinado mediante LC/MS (HT Laboratories, San Diego, CA) (datos no mostrados).

Ejemplo 35- Estabilidad física y química de conjugados

En este ejemplo se compara la estabilidad de un conjugado de ejemplo con aquella de la insulina no conjugada en condiciones aceleradas según el método descrito en Hinds. (*Bioconj. Chem.* 11:195- 201, 2000) a 37 ° C y una tasa de agitación mecánica de 150 golpes/min. La insulina humana recombinante de grado farmacéutico (RHI) fue seleccionada como el control para el estudio de estabilidad acelerada. Holcombe (*Diabetes Care* 27:1241- 1242, 2004) describe que bajo condiciones no aceleradas, la estabilidad RHI se mantiene durante al menos 30 días a temperatura ambiente (TA) y mucho más tiempo en el refrigerador. La figura 2 muestra los resultados del ensayo de estabilidad de agregación para RHI y dos conjugados de ejemplo en solución salina amortiguada por fosfato a pH 7.4 (PBS) a 50 U/ml. En todos los casos, el porcentaje restante en la solución se determinó mediante la centrifugación (4500xg, 5 minutos) de la solución en un momento dado, midiendo el A280 del sobrenadante, y dividiendo el A280 sobrenadante por aquel de la solución de inicio original. El conjugado I- 1 (ver Figura 45) fue sintetizado utilizando TSAT- C6 como la estructura, AEM como el ligando, y NH_2- Bl BOC2 (Al, B29)- insulina como el fármaco. El conjugado I- 16 (ver Figura 45) fue sintetizado utilizando TSPE como estructura, AEM como el ligando, y NH2- B1- BOC2 (A1, B29)- insulina como el fármaco.

Después de 48 horas de agitación continua a 37 °C, menos del 6% de RHI se mantuvo estable en la solución, mientras que la mayoría del RHI se precipitó fuera como agregados insolubles. Después de la misma cantidad de tiempo, ambos conjugados se mantuvieron mucho más estables, el 96%- 99% de los conjugados se mantuvieron intactos y solubles en la solución de PBS. Los datos muestran de manera concluyente que los conjugados son significativamente más estable que RHI en estas condiciones.

RP- HPLC se utilizó para evaluar la estabilidad química de los conjugados (ver la Figura 3 a). Después de 48 horas de estabilidad acelerada, las soluciones de conjugados fueron analizadas utilizando una columna de fase reversa C8- utilizando un gradiente de elución de agua- acetonitrilo. Los tiempos de retención de las muestras de conjugados antes y después de estabilidad se muestran junto con el porcentaje de insulina no conjugada (libre) y desamino insulina encontradas en los trazos de la LC resultantes. No se observaron cantidades detectables de insulina libre o desamido, lo que indica que (i) el enlace covalente entre los sacáridos y la molécula de insulina es estable, y (ii) no ocurre degradación química significativa del conjugado durante la prueba de estabilidad acelerada (AST). Antes y en paralelo con la AST, el conjugado también fue sometido a una prueba de estabilidad no acelerada de 90 días que incluyó termo ciclado diario entre 4 ° C y temperatura ambiente. A la conclusión del estudio paralelo, RP-HPLC demostró que el conjugado fue química y físicamente estable (datos no mostrados).

Una confirmación adicional de la estabilidad química del conjugado en buffer HEPES se proporciona a partir de los datos de LC- MS obtenidos antes y después de someter el conjugado a la AST. Curiosamente, las muestras de conjugado de AST de 48 horas en PBS mostraron que ocurrió degradación sustancial, mientras que las muestras de conjugado de AST de 48 horas en buffer HEPES fueron completamente intactas y estables (ver Figura 3b). El conjugado 1- 7 almacenado en HEPES tiene un peso molecular de 6730 Da antes y después de la AST, lo que demuestra que tanto los residuos de manosa, la estructura de conjugado, y la insulina son químicamente muy estables y sin cambios. Para asegurar la estabilidad del conjugado, todos los buffers utilizados para el almacenamiento, las pruebas in vitro y pruebas in vivo contienen HEPES como agente amortiguante. En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona una composición que comprende un conjugado novedoso en un buffer HEPES.

Los datos LC- MS mejoran enormemente el cumplimiento regulatorio de fabricación de la FDA, puesto que prueba LC- MS fácilmente puede actuar como el ensayo de la identidad química del conjugado. Ya que el fármaco (por ejemplo, insulina), la estructura de conjugado, y el conjugado todos tienen pesos moleculares discretos, la relación de ligando resultante puede ser fácilmente calculada restando el peso molecular de la estructura de conjugado del peso molecular del conjugado para proporcionar la masa restante debido a los grupos sacáridos. En el caso de conjugado 1- 7, la relación molar manosa: insulina se calcula como exactamente 2.0.

Ejemplo 36- Estabilidad funcional de los conjugados

Después de demostrar que el conjugado fue química y físicamente estable, un conjugado AST de 72 horas se evaluó por su bioactividad subcutánea *in vivo* frente a conjugado fresco utilizando ratas Sprague- Dawley a 5 U/kg (ver Figura 4).

El análisis de los datos de conjugado AST HEPES de 72 horas demostró que el tiempo para alcanzar la glucosa nadir (T_{nadir}) fue de 60 minutos, y el tiempo para retornar a 70% de los valores de glucosa en sangre en ayunas ($T70\%_{BG}$) fue menor de 128 + 15 min. Una comparación de curvas de bioactividad de conjugado fresco vs conjugado AST de 72 horas en cada punto de tiempo utilizando la prueba t de Student (n = 4 para cada grupo) no mostró diferencias significativas (todos los valores de $p > 0.21$). Estos resultados estuvieron dentro de los objetivos especificados para la formulación, lo que indica que la estabilidad química preservada del conjugado se traduce en desempeño funcional preservado *in vivo*.

III. Ensayos in vivo de conjugados de ejemplo

Este tercer grupo de ejemplos describe varios experimentos que investigan las propiedades *in vivo* de algunos conjugados de ejemplo.

Ejemplo 37- Bioactividad de conjugado vs conjugados de RHI y dextrano o glicógeno

(a) Bioactividad de insulina- dextrano

Este ejemplo comparativo evalúa el perfil farmacodinámico vivo de insulina- dextrano administrada por vía subcutánea (Sigma- Aldrich, PM ~ 70K). Como se muestra a continuación, los conjugados de insulina- dextrano sintetizados según la publicación de patente estadounidense. N ° 20040202719 actúan relativamente de manera lenta después de la inyección subcutánea, ya que el alto PM del polímero del conjugado dificulta significativamente la tasa de absorción a la circulación sistémica. La insulina- dextrano fue sintetizada utilizando una reacción de acoplamiento modificada de bromuro de cianógeno (CNBr). En pocas palabras, 500 mg de dextrano (PM = 70K, Sigma- Aldrich) se disolvió en 50 ml de agua desionizada. 56 mg de CNBr sólido se agregó a la solución resultante y el pH se mantuvo en 10.7 ± 0.2 con 5 N NaOH. Después de agitar durante 15 minutos, otros 56 mg de CNBr sólida se agregaron y el pH se mantuvo en 10.7 ± 0.2 mientras se agitó durante 45 minutos. Se agregaron 300 mg de insulina humana recombinante (RHI) a la solución y el pH se ajustó a 9.15 con bicarbonato de sodio

sólido. La solución se agitó durante la noche, se ultrafiltró exhaustivamente contra agua desionizada utilizando un filtro de membrana de disco de polietersulfona 10K MWCO (Millipore, Bedford, MA), y se liofilizó. Luego el polvo resultante fue purificado a partir de la insulina no conjugada por cromatografía líquida de alto desempeño (Waters, Milford, MA) con una fase móvil de ácido acético 1M sobre una columna empacada Superdex ™ 75 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Luego la fracción de insulina- dextrano se liofilizó para obtener el conjugado en forma de polvo puro. El grado de conjugación de insulina fue del 10% (peso/peso) según lo determinado mediante análisis de aminoácidos (UCLA Laboratorio de Biopolímeros, Los Angeles, CA).

Inyecciones subcutáneas de insulina- dextrano se administraron utilizando 0.25 ml de una solución esterilizada lx PBS (20 U de insulina equivalente/ml) por detrás del cuello de ratas normales no diabéticas en ayuno (Sprague- Dawley, 200- 250 g, n = 4). Se tomaron muestras de sangre a través de sangrado por la vena de la cola a - 15 y 0 minutos, y a 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 300, y 360 minutos después de la inyección. Los valores de glucosa en sangre se midieron utilizando tiras de prueba disponibles en el mercado (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Como se muestra en la Figura 5, el tiempo para alcanzar la concentración de glucosa nadir (T_{nadir}) fue aproximadamente 3 horas después de la inyección, y los niveles de glucosa en suero se mantienen bajos durante al menos cinco horas de la inyección.

(b) Bioactividad de insulina- glicógeno

Este ejemplo evalúa el perfil farmacodinámico vivo de insulina- glicógeno administrada por vía subcutánea. El conjugado de insulina- glicógeno se sintetizó según el Ejemplo 32. La bioactividad del conjugado de insulina- glicógeno se evaluó mediante la inyección de un equivalente de 2.5 U de dosis de insulina/kg por detrás del cuello de ratas macho normales no diabéticas en ayuno (Sprague- Dawley, 200- 250 g, n = 4). Se tomaron muestras de sangre a través de sangrado por la vena de la cola a - 15 y 0 minutos, y a 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 300, y 360 minutos después de la inyección. Los valores de glucosa en sangre se midieron utilizando tiras de prueba disponibles en el mercado (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). En comparación con los conjugados de insulina- dextrano anteriores, el peso molecular de conjugados de insulina- glicógeno reduce los niveles de glucosa con mucha más rapidez y en mayor medida (ver Figura 6). Este perfil de acción y eliminación rápida se debe a la rápida

digestión enzimática de la cadena polimérica de glicógeno de alto peso molecular después de la inyección subcutánea.

(C) Un conjugado de ejemplo y Bioactividad de RHI

En este ejemplo se evalúa y compara el perfil farmacodinámico in vivo de un conjugado de ejemplo administrado por vía subcutánca y la insulina humana recombinante (RHI). El conjugado de ejemplo, I- 1 en la Figura 45, se sintetizó utilizando TSAT- C6 como el andamiaje, AEM como el análogo indicador, e insulina NH_2- Bl BOC2 (Al, B29) como el fármaco. En cada caso, el conjugado o RHI se inyectó a 3.5 U/kg por detrás del cuello de ratas macho normales no diabéticas en ayuno (Sprague- Dawley, 400- 500 g, n = 6). Se tomaron muestras de sangre a través de sangrado por la vena de la cola a los 0 minutos y 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, y 300 minutos después de la inyección. Los valores de glucosa en sangre se midieron utilizando tiras de prueba disponibles en el mercado (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Como se muestra en la Figura 7, los perfiles de la depresión de glucosa para RHI y el conjugado de ejemplo son casi idénticos a pesar de la incapacidad del conjugado de ejemplo de ser enzimáticamente digerido in vivo. Los perfiles de rápida acción y eliminación del conjugado son más probables debido al hecho de que el conjugado es sólo el 14% más grande que RHI haciendo cualquier efecto de PM aumentado casi insignificante en términos de propiedades farmacodinámicas.

Ejemplo 38- Comparación farmacocínetica con RHI

En este ejemplo se describe y compara los perfiles de insulina en esuero obtenidos para un conjugado de ejemplo administrado por vía subcutánea e insulina humana recombinante (RHI). El conjugado de ejemplo I- 1 en la Figura 45, se sintetizó utilizando TSAT- C6 como la estructura, AEM como el ligando, e NH2- Bl- BOC2- insulina (Al, B29) como el fármaco. En cada caso, el conjugado o RHI se inyectó a 3.5 U/kg por detrás del cuello de ratas macho normales no diabéticas en ayuno (Sprague- Dawley, 400- 500 g, n = 6). Se tomaron muestras de sangre a través de sangrado por la vena de la cola a los 0 minutos y 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, y 300 minutos después de la inyección. Sangre de cada punto de tiempo se centrifugó a 4 ° C para recolectar el suero. Las concentraciones de insulina en suero se midieron posteriormente con un kit ELISA disponible comercialmente (insulina humana ELISA,

Mercodia, Uppsala, Suecia). Como se puede observar en la Figura 8, el perfil farmacocinético del conjugado es estadísticamente indistinguible de aquel de RHI, lo que demuestra que este conjugado se absorbe rápidamente en suero y se elmina desde el mismo de una inyección subcutánea.

Ejemplo 39- Farmacocinética y bioactividad de un versión sustituida por B29 del conjugado de AEM- 2- TSAT- C6- insulina

Este ejemplo describe los perfiles de depresión de insulina en suero y glucosa en sangre obtenidos para un conjugado de ejemplo administrado por vía subcutánea . El conjugado de ejemplo, I- 7 en la Figura 45, se sintetizó utilizando TSAT- C6 como la estructura, AEM como el ligando, e insulina humana recombinante como el fármaco (para proporcionar un conjugado B29- sustituido en lugar de un conjugado Bl- sustituido como en los Ejemplos 37 y 38). En este caso, el conjugado se inyectó a 5 U/kg por detrás del cuello de ratas macho normales no diabéticas en ayuno (Sprague- Dawley, 400- 500 g, n = 3). Se tomaron muestras de sangre a través de sangrado por la vena de la cola a los 0 minutos y 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, y 300 minutos después de la inyección. Los valores de glucosa en sangre se midieron utilizando tiras de prueba disponibles en el mercado (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Además, la sangre de cada punto de tiempo se centrifugó a 4 ° C para recolectar el suero. Las concentraciones de insulina en suero se midieron posteriormente con un kit ELISA disponible comercialmente (insulina humana ELISA, Mercodia, Uppsala, Suecia). Como se puede observar en la Figura 9, el perfil farmacocinético del conjugado B29- sustituido es estadísticamente indistinguible de aquel de RHI, así como también el conjugado Bl- sustituido del ejemplo 38, lo que demuestra que este conjugado es también absorbe y elimina en el suero después de una inyección subcutánea.

Ejemplo 40- Comparación de farmacocinética y bioactividad con Lispro

En este ejemplo se comparan los perfiles de insulina en suero y glucosa en sangre obtenidos para un conjugado de ejemplo administrado por vía subcutánea e insulina lispro. La insulina lispro (Humalog ®) es un análogo de insulina de acción rápida en la que los penúltimos residuos de lisina y prolina en el extremo C- terminal de la cadena B se han invertido. Esta modificación bloquea la formación de multímeros de insulina. Los datos de la insulina humana

recombinante soluble (RHI) también se proporcionan para comparación (ver el ejemplo 38 y Figura 8).

El conjugado de ejemplo, I- 1 en la Figura 45, se sintetizó utilizando TSAT- C6 como la estructura, AEM como el ligando, y NH2- Bl- BOC2- insulina (Al, B29) como el fármaco. En cada caso, el conjugado o insulina lispro se inyecta a 3.5 U/kg por detrás del cuello de ratas macho normales no diabéticas en ayuno (Sprague- Dawley, 400- 500 g, n = 6). Se tomaron muestras de sangre a través de sangrado por la vena de la cola a los 0 minutos y 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, y 300 minutos después de la inyección. Los valores de glucosa en sangre se midieron utilizando tiras de prueba disponibles en el mercado (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Además, la sangre de cada punto de tiempo se centrifugó a 4 ° C para recolectar el suero. Las concentraciones de insulina en suero se midieron posteriormente con un kit ELISA disponible comercialmente (insulina humana ELISA, Mercodia, Uppsala, Suecia). Como se puede observar en la Figura 12, el perfil farmacocinético del conjugado es estadísticamente indistinguible de aquel de insulina lispro.

Ejemplo 41- Efecto de ligando en la bioactividad

Este ejemplo compara los perfiles de glucosa en la sangre obtenidos para una serie de conjugados de ejemplo administrado por vía subcutánea. Los conjugados de ejemplo se sintetizaron utilizando TSAT- C6 como la estructura, e NH2- Bl- BOC2- insulina (Al, B29) como el fármaco. La composición de ligando se varió entre los conjugados para cubrir un rango de afinidades: AEM- 2, AEBM- 2, AETM- 1- AEBM- 1 y AETM 2 (de menor a mayor afinidad). Los conjugados de insulina se muestran como I- 2,I- 3 I- 1, y I- 4 en la Figura 45. En cada caso, los conjugados se inyectaron a 5 U/kg (3.5 U/kg para AEM- 2) por detrás del cuello de ratas macho normales no diabéticas en ayuno (Sprague- Dawley, 400- 500 g, n = 6). Se tomaron muestras de sangre a través de sangrado por la vena de la cola a los 0 minutos y 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, y 300 minutos después de la inyección. Los valores de glucosa en sangre se midieron utilizando tiras de prueba disponibles en el mercado (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Además, la sangre de cada punto de tiempo se centrifugó a 4 ° C para recolectar el suero. Las concentraciones de insulina en suero se midieron posteriormente con un kit ELISA disponible comercialmente (insulina humana ELISA, Mercodia, Uppsala, Suecia).

Como se puede observar en la Figura 13, la respuesta reductora de glucosa disminuyó a medida que la afinidad del ligando aumentó. Estos datos proporcionan la primera indicación de que la naturaleza del ligando puede afectar la bioactividad del conjugado. Las figuras 14- 16 muestran los niveles de glucosa en la sangre junto con los niveles séricos de insulina de cada uno de los cuatro conjugados probados. Estos resultados muestran claramente que la respuesta de glucosa reducida para conjugados con ligandos de mayor afinidad resulta del perfil PK reducido del conjugado (compar Figura 14 para AEM- 2 con figura 17 para AETM- 2).

Ejemplo 42- Efecto de inhibidores exógenos sobre farmacocinética (PK) y bioactividad

En vista de los datos descritos en el ejemplo 41, se tiene la hipótesis de que el perfil farmacocinético reducido y bioactividad observados con conjugados que tienen ligandos mayores pueden resultar de fuerte unión a las moléculas endógenas fijadoras de sacáridos. Por ejemplo, sin querer limitarse a ninguna teoría en particular, la hipótesis de que la unión a proteínas endógenas "tipo lectina " tales como proteínas surfactantes A y D o los miembros de la familia de las selectinas podría ser la causa de que estos conjugados se eliminen más rápidamente que los conjugados con ligandos de afinidad más baja.

Con el fin de probar esta hipótesis se corrieron una serie de experimentos para determinar si ligandos exógenos podrían competir por la unión a estas moléculas endógenas fijadoras de sacáridos propuestas y por lo tanto aumentar el perfil PK de los conjugados después de la administración. El conjugado I- 2 AETM- 2 de alta afinidad se utilizó para todos los experimentos. En cada caso, la misma dosis de conjugado se inyectó en la nuca de ratas macho normales no diabéticas en ayuno (Sprague- Dawley, 400- 500 g, n = 6). Después de un retraso de 15 minutos una dosis del ligando exógeno se inyectó IP. Se tomaron muestras de sangre a través de sangrado por la vena de la cola a los 0 minutos y 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, y 300 minutos después de la inyección inicial de conjugado. Los valores de glucosa en sangre se midieron utilizando tiras de prueba disponibles en el mercado (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Además, la sangre de cada punto de tiempo se centrifugó a 4 °C para recolectar el suero. Las concentraciones de insulina en suero se midieron posteriormente con un kit ELISA disponible comercialmente (insulina humana ELISA, Mercodia, Uppsala, Suecia). Un control se realizó mediante la inyección de solución salina en lugar del ligando exógeno después de 15 minutos.

La figura 18 muestra los resultados obtenidos cuando se administró alfa- metil- manosa. Alfa- metil- manosa es un sacárido de afinidad muy elevada, que es capaz de competir con AETM por la unión a lectinas tal como Con A. Como se observa, el cambio en el perfil PK/PD que resultó de la inyección de alfa- metil- manosa fue muy significativo ($p < 0,05$).

La Figura 19 es un experimento de control en el que se utiliza insulina humana recombinante soluble (RHI) para la inyección inicial en lugar del conjugado AETM- 2. Como se muestra, no hubo ningún cambio en el perfil PK/PD cuando se inyectó alfa- metil- manosa ($p >> 0.05$).

La lectina endógena fijadora de manano (MBL) se conoce por fijar sacáridos con las siguientes afinidades relativas: D- manosa, L- fucosa > D- glucosa, N- acetil- D- glucosamina >> D- galactosa. Por lo tanto, se decidió ejecutar dos experimentos que comparan los efectos de la L- fucosa (ligando de alta afinidad), D- glucosa (ligando de afinidad intermedia) y D- galactosa (ligando de baja afinidad) sobre el perfil PK/PD para el conjugado AETM- 2. Los resultados con la L- fucosa se comparan con los resultados obtenidos con alfa- metil- manosa en la Figura 20. Como se muestra, la alfa- metil- manosa y L- fucosa parecen mostrar el mismo tipo de efecto. Los resultados de D- glucosa y D- galactosa se comparan en la Figura 21. La galactosa no presenta ningún efecto en comparación con solución salina. La glucosa parece mostrar un efecto pequeño, sin embargo, esto se complica por el hecho de que la insulina exógena desde el conjugado rápidamente baja la glucosa, por lo que el efecto sostenido observado con alfa- metil- manosa L- fucosa no se produce.

Ejemplo 43- Efecto de inhibidores exógenos en el sitio de la inyección local

En vista de los datos descritos en el Ejemplo 42, se propusó determinar si alfa- metil- manosa (a- MM) indujo aumento en la concentración de conjugado en suero y la bioactividad fue un resultado de una tasa aumentada de absorción desde el sitio de la inyección subcutánea. El conjugado TSAT- C6- AETM- 2 **I- 2** de alta afinidad se utilizó para este experimento. En primer lugar, el conjugado se diluyó a una concentración de 5 U/ml (0.2 mg/ml equivalente de insulina) utilizando una solución salina amortiguada o una solución salina amortiguada conteniendo 1M a- MM. Cada solución se inyectó por vía subcutánea a una dosis de 5 U/kg en la parte posterior del cuello de cada una de tres ratas SD macho no diabéticas en el tiempo 0 y tomaron muestras de sangre a través de sangrado por la vena de la cola a los 0 minutos y 15 , 30, 45, 60, 90, 120, 150,

180, 240, y 300 minutos después de la inyección. Los valores de glucosa en sangre se midieron utilizando tiras de prueba disponibles en el mercado (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Además, la sangre de cada punto de tiempo se centrifugó a 4 ° C para recolectar el suero. Las concentraciones de insulina en suero se midieron posteriormente con un kit ELISA disponible en el mercado (ISO insulina ELISA, Mercodia, Uppsala, Suecia). En este experimento, las ratas que recibieron la solución de conjugado a- MM también recibieron una inyección de solución salina amortiguada subcutánca en un sitio de inyección sobre el muslo a los 15 minutos. Las ratas que recibieron la solución salina de conjugado también recibieron una inyección de una solución a- MM por vía subcutánea en un sitio de inyección sobre el muslo separado a los 15 minutos. Estas inyecciones con retraso de 15 minutos se utilizaron para asegurarse de que la cantidad de a- MM inyectada por vía subcutánea con la solución de conjugado no aumentaría la concentración sistémica de a- MM lo suficientemente como para invocar la clase de los efectos inducidos a- MM exhibidos en la Figura 18.

Los resultados mostrados en la Figura 22 indican que dentro del error experimental, los perfiles PK y de bioactividad del conjugado no se han aumentado en absoluto a propósito de co-inyección de una alta concentración de un inhibidor a- MM con el conjugado. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que los sacáridos exógenos no actúan sobre los conjugados cambiando el perfil de absorción a la circulación sistémica desde el sitio de la inyección.

Ejemplo 44- Efecto del retraso de la inyección de inhibidores exógenos después de inyección inicial de conjugado

Con base en los resultados en la Figura 22, los resultados de PK y bioactividad aumentados por a- MM no pueden ser explicados por una mayor absorción del sitio de la inyección, sino que debe ser el resultado de un efecto sistémico que se produce después de que el conjugado ha sido absorbido. Las siguientes dos hipótesis podrían explicar este comportamiento: (a) el conjugado se elimina del cuerpo a través de un mecanismo dependiente de la lectina que puede ser interrumpido por el sacárido competitivo o (b) el conjugado se une a lectinas en el cuerpo y se libera sólo a la circulación en la presencia del sacárido competitivo. En el caso de (b) uno podría esperar que la introducción de a- MM en el animal después del conjugado ha sido completamente absorbida desde el depósito subcutáneo produciría la entrega de conjado absorbido desde los sitios de lectina en el cuerpo aumentando así su concentración sérica y la

bioactividad. Sin embargo, si un mecanismo d eliminación está en funcionamiento como se describe en (a), entonces la inyección de a- MM después de que el conjugado ha sido completamente absorbido desde el depósito subcutáneo no producirá ningún incremento en la concentración sérica o bioactividad porque el conjugado ya habrá sido completamente eliminado del cuerpo.

Para determinar el mecanismo más probable, el conjugado TSAT- C6- AETM- 2 I- 2 de alta afinidad se inyectó a 5 U/kg por detrás del cuello de ratas macho normales no diabéticas en ayuno (Sprague- Dawley, 400- 500 g, n = 3 por grupo). Después de cuatro intervalos de tiempo diferentes (15 minutos, 60 minutos, 120 minutos y 240 minutos) se inyectó IP una dosis de 4 g/kg de una solución a- MM. Se tomaron muestras de sangre a través de sangrado por la vena de la cola a los 0 minutos y en los siguientes intervalos para cada experimento:

Intervalo de tiempo de inyección IP a- MM (min)	puntos de tiempo de muestra (minutos después de inyección)
15	15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 360
60	5, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 360
120	15, 30, 45, 60, 90, 120, 135, 150, 180, 240, 300, 360
240	15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 255, 270, 300, 360

Los valores de glucosa en sangre se midieron utilizando tiras de prueba disponibles en el mercado (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Además, la sangre de cada punto de tiempo se centrifugó a 4 °C para recolectar el suero. Las concentraciones de insulina en suero se midieron posteriormente con un kit ELISA disponible en el mercado (ISO insulina ELISA, Mercodia, Uppsala, Suecia).

Como se muestra en la Figura 23, el aumento en la concentración de conjugado en suero y bioactividad debida a inyección IP de a- MM es menor y menos frecuente cuanto mayor sea el tiempo de retardo entre la inyección de conjugado y la inyección IP de a- MM. Por ejemplo, después de 240 minutos no se observó aumento en la concentración de conjugado en suero lo que indica que no hay depósito de conjugado ligado a lectina presente en el cuerpo después de la absorción completa de conjugado. Estos resultados son consistentes con el mecanismo propuesto (a) e inconsistentes con el mecanismo propuesto (b). Se debe entender que mientras que la hipótesis de que el mecanismo (a) puede ser responsable de las propiedades PK observadas con

los conjugados de la presente divulgación, las reivindicaciones presentadas en la presente no están limitadas de ninguna manera a un mecanismo específico de acción.

Ejemplo 45- Efecto de a- MM sobre farmacocinética y bioactividad como una función de la afinidad de ligandos

En vista de los datos descritos en el Ejemplo 42, nos propusimos determinar el comportamiento farmacocinético y farmacodinámico de los conjugados sintetizados utilizando ligandos sacáridos diferentes al ligando AETM utilizado en el ejemplo 42. En este ejemplo, la estructura TSAT- C6 se utilizó y los siguientes conjugados se sintetizaron según los métodos descritos en el Ejemplo 20 (nota la glucosamina- HCl o GA- HCl fue comprada en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) y se utilizó sin purificación adicional):

Conjugado	**Estructura**	**Peso Mol estructura**	**Ligando**	**Peso molecular AE-azúcar**	**Pureza (HPLC)**	**Peso molecular (LC-MS)**	**Azúcar/insulina**
L7: TSAT- C6-AEM- 2 (B29)	**TSAT- C6**	822	**AEM**	223	95%	6729	2.0
L5: TSAT- C6-GA- 2 (B29)	**TSAT- C6**	822	GA-HCl	216	95%	6641	2.0

Según secuenciación N- terminal, aproximadamente el 90% de cada estructura conteniendo sacáridos se conjugó con la insulina a través de Lys- B29. Los conjugados TSAT- C6- AEM- 2 (B29) y TSAT- C6- GA- 2 (B29) se muestran en la Figura 45 como **1- 7 y 1- 5,** respectivamente.

El mismo tipo de experimentos descritos en el Ejemplo 42 se repitieron para los conjugados descritos en la tabla anterior. En cada caso, la misma dosis de conjugado (5 U/kg) se inyectó por detrás del cuello de ratas macho normales no diabéticas en ayuno (Sprague- Dawley, 400- 500 g, n = 3). Después de un retraso de 15 minutos una dosis 4g/kg de a- MM se inyectó IP. Se tomaron muestras de sangre a través de sangrado por la vena de la cola a los 0 minutos y 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, y 300 minutos después de la inyección inicial de conjugado. Los valores de glucosa en sangre se midieron utilizando tiras de prueba disponibles en el mercado (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Además, la sangre de cada punto de

tiempo se centrifugó a 4 ° C para recolectar el suero. Las concentraciones de insulina en suero se midieron posteriormente con un kit ELISA disponible en el mercado (ISO insulina ELISA, Mercodia, Uppsala, Suecia). Un control se realizó mediante la inyección de solución salina en lugar de a- MM después de 15 minutos.

Las Figuras 24 y 25 muestran los resultados obtenidos cuando a- MM se administró mediante inyección IP 15 minutos después de la inyección subcutánea de **I- 7 y 1- 5,** respectivamente. Como se observa, el aumento de perfil PK/PD que resultó de la inyección de a- MM fue muy significativa ($p < 0,05$) para el conjugado I- 7 en comparación con el grupo de control de inyección de solución salina. Sin embargo, la magnitud del aumento inducido por a- MM en la concentración de conjugado sérico fue inferior a la obtenida para los conjugados AETM- 2 del Ejemplo 42. El perfil del conjugado I- 5 no se vio afectado por la inyección de a- MM, al igual que los resultados obtenidos para RHI en la Figura 19. En conjunto, estos datos ponen de manifiesto que ambos conjugados derivados de manosa ((AEM- 2 y AETM- 2) muestran el perfil PK/PD aumentado por a- MM, mientras los conjugados derivados de glucosamina de afinidad menor no lo hacen. Además, el cambio relativo en el perfil farmacocinético para conjugados AEM- 2 de menor afinidad es menor que el cambio observado en conjugados AETM- 2 de mayor afinidad.

Ejemplo 46- Efecto de a- MM sobre farmacocinética y bioactividad como una función de la valencia de ligando

En este ejemplo, nos propusimos determinar el comportamiento farmacocinético y farmacodinámico de conjugados a los cuales se ha unido de manera covalente un creciente número de ligandos sacáridos de ejemplo. Todos los conjugados se sintetizaron según los métodos descritos en el ejemplo 20 utilizando las estructuras y los ligandos sacáridos especificados a continuación:

Conjugado	**Estructura**	**Peso Mol estructura**	**Ligando**	**Peso molecular AE-azúcar**	**Pureza (HPLC)**	**Peso molecular (LC-MS)**	**Azúcar/insulina**
1- 8: DSS- AEM- 1 (B29)	DSS	368	AEM	223	> 95%	6168	1.0

L9: TSPE- AEM- 3 (B29)	TSPE	813	AEM	223	> 95%	6829	3.0
01.10: DSS- AETM- 1 (B29)	DSS	368	AETM	547	> 95%	6491	1.0
MI: TSPE- AETM- 3 (B29)	TSPE	813	AETM	547	> 95%	7800	3.0

Según secuenciación N- terminal, aproximadamente el 90% de cada estructura conteniendo sacáridos se conjugó con insulina a través de Lys- B29. Los conjugados se muestran en la Figura 45 como I- 8, I- 9, I- 10, y I- 11.

El mismo tipo de experimento que se describe en el Ejemplo 45 se repitió para los conjugados descritos en la tabla anterior. En cada caso, la misma dosis de conjugado (5 U/kg) se inyectó por detrás del cuello de ratas macho normales no diabéticas en ayuno (Sprague- Dawley, 400- 500 g, n = 3). Después de un retraso de 15 minutos una dosis 4g/kg de a- MM se inyectó IP. Se tomaron muestras de sangre a través de sangrado por la vena de la cola a los 0 minutos y 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, y 300 minutos después de la inyección inicial de conjugado. Los valores de glucosa en sangre se midieron utilizando tiras de prueba disponibles en el mercado (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Además, la sangre de cada punto de tiempo se centrifugó a 4 ° C para recolectar el suero. Las concentraciones de insulina en suero se midieron posteriormente con un kit ELISA disponible en el mercado (ISO insulina ELISA, Mercodia, Uppsala, Suecia). Un control se realizó mediante la inyección de solución salina en lugar de a- MM después de 15 minutos.

Las Figuras 26 y 27 muestran los resultados obtenidos cuando se administra a- MM mediante una inyección IP 15 minutos después de la inyección subcutánea de I- 8 y I- 9, respectivamente. Como se observa, el aumento de perfil PK/PD que resultó de la inyección de a- MM fue muy significativo ($p < 0,05$) para I- 9 y en menor medida para I- 8 en comparación con el grupo de control de inyección de solución salina. Además, el conjugado I- 9 exhibió aproximadamente el mismo perfil PK inducido por a- MM que el conjugado I- 2 del Ejemplo 42, ambos los cuales fueron mucho más pronunciados que aquel obtenido desde I- 8.

Figuras 28 y 29 muestran los resultados obtenidos cuando a- MM se administra mediante una inyección IP 15 minutos después de la inyección subcutánea de I- 10 y I- 11,

respectivamente. Como se observa, el aumento en perfil PK/PD que resultó de la inyección de a-MM fue muy significativo ($p < 0,05$) para I- 11 y un poco menos para I- 10 en comparación con el grupo de control de inyección de solución salina. Además, el conjugado I- 11 exhibió aproximadamente el mismo perfil PK inducido por a- MM como el conjugado I- 2 del Ejemplo 42, ambos los cuales fueron un poco más pronunciados que los obtenidos de I- 10.

Ejemplo 47- Comparación in vivo de vida media/tasa de eliminación

Los resultados obtenidos en el Ejemplo 44 son consistentes con los conjugados de ejemplo que se eliminan del cuerpo a través de un mecanismo dependiente de la lectina que puede ser interrumpido por la presencia de un sacárido competitivo. Con el fin de explorar este mecanismo con más detalle, se realizaron los siguientes experimentos sobre conjugados de ejemplo para determinar la tasa a la que se eliminaron desde el suero en vs. insulina no conjugada. Todos los conjugados utilizados en este estudio se sintetizaron según los métodos generales descritos en el Ejemplo 20.

En cada caso el conjugado soluble se administró a 0.4 mg de conjugado/kg de peso corporal en la vena yugular de ratas Sprague- Dawley (Taconic, JV/JV, 350- 400g, n = 3) mediante cánula dual. Una solución de conjugado estéril o insulina de control se inyectó por vía intravenosa a través de una cánula JV, seguida inmediatamente por una solución permeabilizadora de heparina- solución salina para asegurarse de que toda la dosis de conjugado se administró al animal. La segunda cánula se utilizó para recolectar muestras de sangre a t = 0 (pre- dosis), y 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos después de la dosis.

Los valores de glucosa en sangre se midieron utilizando tiras de prueba disponibles en el mercado (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Además, la sangre de cada punto de tiempo se centrifugó a 4 ° C para recolectar el suero. Las concentraciones de insulina en suero o conjugado en suero se midieron posteriormente con un kit ELISA disponible comercialmente (Iso- insulina ELISA, Mercodia, Uppsala, Suecia).

La figura 30 muestra la concentración sérica de RHI o conjugado TSAT- C6- AETM- 2, mostrado como I- 6 en la Figura 45, como una función de tiempo después de la inyección intravenosa. Claramente, I- 6 se elimina mucho más rápido desde el suero que RHI. Los datos se ajustan mejor con un modelo bi- exponencial de dos compartimientos con la siguiente fórmula general: $C(t) = A_0 \text{ EXP } (-at) + B_0 \text{ EXP } (-bt)$, donde t es el tiempo, C (t) es la concentración en

suero como una función del tiempo, A_0 es la constante de concentración del primer compartimiento, a es la constante de tiempo exponencial del primer compartimiento, B_0 es la constante de concentración del segundo compartimiento, y b es la constante de tiempo exponencial del segundo compartimiento. Las vidas medias de eliminación (en minutos) asociadas con cada compartimiento, son tl/2 (a)= 0,693/a y tl/2 (b)= 0,693/b. En la Figura 30, para RHI tl/2 (a)= 0.76 y tl/2 (b)= 11.46 y para I- 6 tl/2 (a)= 0.47 y tl/2 (b)= 2.87. En otras palabras, tl/2 (b) para I- 6 es aproximadamente cuatro veces más corto que tl/2 (b) para RHI.

La siguiente tabla resume los parámetros tl/2 para un número de conjugados probados utilizando el mismo procedimiento descrito anteriormente (las estructuras se muestran en la Figura 45):

Formulación	**tl/2 (a)**	**tl/2 (b)**	**Relación a RHI tl/2 (a)**	**Relación a RHI tl/2 (b)**
RHI	0.76	11.46	1.00	1.00
1- 5: TSAT- C6- GA- 2	0.81	12.02	1.07	1.05
1- 8: DSS- AEM- 1	0.90	9.61	1.18	0.84
1- 7: TSAT- C6- AEM- 2	0.45	2.77	0.60	0.24
1- 9: TSPE- AEM- 3	0.66	2.62	0.87	0.23
01.10: DSS- AETM- 1	0.82	4.48	1.08	0.39
1- 6: TSAT- C6- AETM- 2	0.47	2.87	0.62	0.25
01.11: TSPE- AETM- 3	0.22	1.33	0.29	0.12

Estos datos son consistentes con la hipótesis de que los conjugados de ejemplo se eliminan a partir del suero más rápido que la insulina no conjugada, la medida de lo cual que se rige por la afinidad del conjugado particular para la lectina endógena y el número de ligandos sustituidos por conjugado. Además, el aumento inducido por a- MM en perfiles PK/PD demostrado en los ejemplos 42, y 44- 46 se correlaciona bien con la reducción en la vida media de fase b para cada uno de los conjugados probados.

Ejemplo 48- Tasa de vida media in vivo/eliminación bajo infusión de glucosa

En este ejemplo, se planteó la hipótesis adicional que la tasa de eliminación de los conjugados de ejemplo puede ser inhibida por la presencia de concentraciones fisiológicas de glucosa. Con el fin de determinar la tasa a la que los conjugados se eliminaron desde el suero *in vivo* en condiciones de hiperglicemia, se realizó el siguiente experimento. En cada caso, se administró l- 7 a 0.4 mg de conjugado/kg de peso corporal en la vena yugular ratas macho Sprague- Dawley (Taconic, JV/JV, 350- 400g, n = 3) mediante cánula dual.

Una hora antes de comenzar el experimento la cánula se conectó a una bomba de infusión de jeringa conteniendo una solución de glucosa estéril al 50% peso/volumen. La tasa de infusión de bomba se ajustó por el investigador para asegurar que los niveles de glucosa en sangre en el animal se mantuvieran por encima de 300 mg/dL en todo momento durante el experimento. La glucosa en sangre se midió utilizando tiras de prueba disponibles en el mercado (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). En un experimento típico, se encontró que la tasa de bomba de infusión necesaria para mantener a los animales por encima de 300 mg/dl típicamente fue mayor de 85 uL/min. Una muestra de sangre fue tomada en t = 0 min, después de lo cual una solución de conjugado estéril o insulina de control se inyectó por vía intravenosa a través de la segunda cánula, seguido inmediatamente por una solución permeabilizadora de la heparina- solución salina para asegurarse de que toda la dosis de conjugado se administró al animal. Después de una descarga adicional de la línea de cánula con heparina- solución salina, la segunda cánula se utilizó para recolectar muestras de sangre en t = 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos después de la dosis.

Sangre de cada punto de tiempo se centrifugó a 4 ° C para recolectar el suero, y las concentracione de insulina en suero o conjugado en suero se midieron posteriormente con un kit ELISA disponible comercialmente (Iso- insulina ELISA, Mercodia, Uppsala, Suecia). Los datos de concentración sérica de insulina o conjugado vs tiempo se ajustan mejor a la suma de dos exponenciales de descomposición independientes ($C(t) = a \exp(-k_a t) + b \exp(-k_b t)$) según el modelo de dos compartimentos, donde $tl/2\ (a) = (\ln 2)/k_a$ y $tl/2\ (b) = (\ln 2)/k_b$. La siguiente tabla resume los parámetros t1/2 para 1- 7 con y sin infusión de glucosa junto con los obtenidos para RHI a partir del ejemplo 47:

Infusión	**Formulación**	**tl/2 (a)**	**tl/2 (b)**	**Relación a RHI tl/2 (a)**	**Relación a RHI tl/2 (b)**
Ninguno	RHI	0.76	11.46	1.00	1.00

Salina	TSAT- C6- AEM- 2 (1- 7)	0.45	2.77	0.60	0.24
Glucosa (400 mg/dl)	TSAT- C6- AEM- 2 (1- 7)	0.64	5.11	0.84	0.45

Podemos concluir a partir de estos datos que la glucosa es capaz de inhibir la eliminación acelerada de suero para este conjugado duplicando así la vida media de la eliminación de la fase b desde 2.77 a 5.11 minutos.

Ejemplo 49- Tasa de vida media in vivo/eliminación bajo infusión de a- MM

En este ejemplo, se planteó la hipótesis adicional que la tasa de eliminación de los conjugados de insulina- sacáridos puede ser inhibida por la presencia de concentraciones arbitrariamente altas de sacáridos inhibidores diferentes de la glucosa, tal como α- metil- manosa (a- MM). Con el fin de determinar la tasa a la que los conjugados de ejemplo fueron eliminados desde suero *in vivo* en presencia de a- MM, se realizó el siguiente experimento. En cada caso el conjugado soluble se administró a 0.4 mg de conjugado/kg de peso corporal en la vena yugular ratas macho Sprague- Dawley (Taconic, JV/JV, 350- 400g, n = 3).

Una hora antes del inicio del experimento una cánula se conectó a una bomba de infusión de jeringa conteniendo una solución estéril de a- MM al 25% peso/volumen. La tasa de infusión de bomba se ajustó por el experimentador, pero por lo general se fijó en 85 uL/min. Una muestra de sangre fue tomada en t = 0 min, después de lo cual una solución de conjugado estéril o insulina de control se inyectó por vía intravenosa a través de la segunda cánula, seguido inmediatamente por una solución permeabilizadora de heparina- solución salina para asegurarse de que toda la dosis de conjugado se administró el animal. Después de una descarga adicional de la línea de la cánula con la heparina- solución salina, la segunda cánula se utilizó para recolectar muestras de sangre en t = 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos después de la dosis.

Además, la glucosa en sangre se midió utilizando tiras de prueba disponibles en el mercado (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Sangre de cada punto de tiempo se centrifugó a 4 ° C para recolectar el suero, y las concentraciones séricas de insulina o conjugado se midieron posteriormente con un kit ELISA disponible comercialmente (Iso-insulina ELISA, Mercodia, Uppsala, Suecia). Los datos de concentración sérica de insulina o conjugado vs. Tiempo se ajustaron mejor con la suma de dos exponenciales de descomposición

independientes (C (t)= exp (- k_at)+ b exp (- k_bt)) según el modelo de dos compartimentos, donde tl/2 (a)= (ln 2)/k_a y tl/2 (b)= (ln 2)/k_b. La siguiente tabla resume las parámetros t1/2 para el conjugado TSAT- C6- AEM- 2 con y sin la infusión de a- MM, junto con los obtenidos con la infusión de glucosa a partir del ejemplo 48 y los obtenidos para RHI sin infusión de sacárido del ejemplo 47:

Infusión	**Formulación**	**tl/2 (a)**	**tl/2 (b)**	**Relación a RHI tl/2 (a)**	**Relación a RHI tl/2 (b)**
Ninguno	RHI	0.76	11.46	1.00	1.00
Solución Salina	TSAT- C6- AEM- 2 (1- 7)	0.45	2.77	0.60	0.24
a- MM	TSAT- C6- AEM- 2 (1- 7)	0.92	10.09	1.21	0.88
Glucosa (400 mg/dl)	TSAT- C6- AEM- 2 (1- 7)	0.64	5.11	0.84	0.45

Podemos concluir a partir de estos datos que no sólo a- MM inhibe la eliminación acelerada de suero para este conjugado, lo hace en un grado aún mayor que la glucosa. En este caso, la vida media de la eliminación de la fase b casi se cuadruplica de 2.77 a 10.09 minutos.

IV. Otros ejemplos

Este cuarto grupo de ejemplos describe varios experimentos que investigan la síntesis, formulación y propiedades de algunos conjugados de ejemplo.

Ejemplo 50- conjugados de insulina de acción prolongada utilizando protamina, zinc, y otros excipientes

Teniendo en cuenta que los datos de ejemplos anteriores son consistentes con un mecanismo de eliminación de suero dependiente de sacáridos, que se propuso desarrollar formulaciones de conjugados que proporcionen una tasa de absorción estable, sostenida desde un sitio de la inyección subcutánea. A una tasa de absorción constante, la concentración sérica de conjugado en cualquier momento se regirá fundamentalmente por la tasa de eliminación dependiente de sacáridos. De esta manera, podemos formular una insulina de entrega sostenida de acción prolongada que exhiba un perfil PK sensible a sacáridos.

Con el fin de generar conjugados de acción prolongada, hemos preparado formulaciones PZI (insulina protamina zinc) a partir de soluciones de conjugados. Los conjugados sustituidos con insulina en el extremo Bl no forman formulaciones PZI amorfas o cristalinas tan fácilmente, así que utilizamos conjugados sustitudios por B29 preparados con base en los métodos del Ejemplo 20. Los excipientes utilizados en estas formulaciones comprenden zinc, protamina, m-cresol, y sal, todos obtenidos comercialmente en Sigma- Aldrich (St. Louis, MO). Las concentraciones de estos componentes pueden variar con el fin de obtener una tasa de absorción sostenida, óptimamente plana. Además, en algunos casos se encontró que la adición de una pequeña cantidad de insulina sin modificar ayudó a estabilizar la formulación. En estos casos, la concentración de insulina sin modificar contenida en la muestra se varió para obtener la tasa de absorción sostenida, optimamente uniforme. En todas las formulaciones probadas, se utilizó la siguiente receta:

Componente	**Variable**	**Volumen (ml)**
Solución de Conjugado 2.7 mg/ml	% El contenido de insulina sin modificar (M/M)	1.000
solución salina amortiguada por HEPES 250 mM	NaCl de concentración (M)	0.111
Solución de acetato de zinc	Concentración de zinc (mg/ml)	0.124
Solución de cresol en agua	v/v%	0.159
solución de protamina pH 7.2 en solución salina amortiguada por HEPES 25 mM	Concentración de protamina (mg/ml)	alícuotas 4x0.194

A menos que se especifique lo contrario, una vez que las formulaciones se prepararon después de la adición de los componentes en el orden descrito en la tabla anterior, se mezclaron suavemente durante 30 minutos antes de las pruebas *in vivo*.

Para probar el perfil de entrega sostenida para una formulación dada, así como también el perfil PK sensible a glucosa, se realizó el siguiente experimento. La formulación se inyectó a una

dosis determinada (~15 U/kg en la mayoría de los casos a menos que se especifique lo contrario) por detrás del cuello de ratas macho normales no diabéticas en ayuno (Sprague- Dawley, 400-500 g, n = 3). Después de un retraso de 240 minutos, se inyectó IP una dosis de glucosa (4 g/kg). Se tomaron muestras de sangre a través de sangrado por la vena de la cola a los 0 minutos y 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, y 300 minutos después de la inyección inicial de conjugado. Los valores de glucosa en sangre se midieron utilizando tiras de prueba disponibles en el mercado (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Además, la sangre de cada punto de tiempo se centrifugó a 4 ° C para recolectar el suero. Las concentraciones de insulina en suero se midieron posteriormente con un kit ELISA disponible comercialmente (Iso- insulina ELISA, Mercodia, Uppsala, Suecia). De acuerdo a las especificaciones de ensayo del fabricante, la prueba de Iso- insulina ELISA reacciona cruzadamente en un 71% con la insulina de rata. Las muestras de suero se diluyeron 10x con el fin de minimizar la cantidad de insulina endógena de rata detectada en cada muestra, pero la posibilidad de detección de la insulina de rata no puede ser completamente descartada. Por lo tanto, los resultados generalmente se reportan como la "insulina medida", que puede consistir en una cierta cantidad de insulina endógena de rata además del conjugado o RHI, dependiendo del experimento. Sin embargo, todas las muestras recolectadas en cada uno de los siguientes ejemplos fueron tratadas de forma idéntica y se pueden comparar directamente para diferencias en rendimiento.

Ejemplo 51- Efecto de la concentración de protamina sobre desempeño de conjugado de insulina de acción prolongada

El propósito de este ejemplo fue demostrar el efecto de la concentración de protamina en la acción del tiempo y perfil PK sensible a glucosa de un conjugado de ejemplo. En este ejemplo, I- 6 sintetizado según los métodos descritos en el ejemplo 20, se probó utilizando la formulación generalizada y el protocolo in vivo descrito en el ejemplo 50:

Componente	**Variable**	**Volumen (ml)**
Solución de TSAT- C6-AETM- 2 (I- 6) a 2.7 mg/ml	insulina sin modificar = 16,7%	1.000
solución salina amortiguada por HEPES	La concentración de NaCl = 1.5 M	0.111

250 mM		
Solución de acetato de zinc	Concentración de zinc (mg/ml)= ver a continuación	0.124
Solución de cresol en agua	3% v/v	0.159
solución de protamina pH 7.2 en solución salina amortiguada por HEPES 25 mM	Concentración de protamina (mg/ml)= ver a continuación	alícuotas 4x0.194

Formulación	Concentración de zinc (mg/ml)	Concentración de protamina (mg/ml)
LXP- LXZ	1.15	1.25
4XP- 4xZ	4.60	5.00
10XP- 4xZ	4.60	12.50

Se realizaron ejemplos de inyección IP de glucosa (4 g/kg) de cuatro horas mediante la administración 15 U/kg (peso corporal en gramos/1.87 = microlitros de volumen de inyección) de cada una de las tres formulaciones anteriormente descritas. Los resultados mostrados en la Figura 3 la- c demuestran que a medida que aumenta la concentración de protamina en la formulación, más prolongada la formulación resultante y más pronunciado el incremento medido en el perfil de insulina en suero después de la inyección de glucosa de cuatro horas. La formulación LxP- 1xZ liberó una porción significativa de la carga de conjugado de insulina durante un corto período de tiempo inmediatamente después de la inyección de tal manera que se detectada una señal muy débil después de la exposición intraperitoneal de glucosa. Por otro lado, la formulación 10xP- 4xZ liberó una cantidad basal baja de insulina en las primeros cuatro horas, sin hipoglicemia y posteriormente alcanzó aumento> 4 veces en la concentración de insulina medida inmediatamente después de la inyección de glucosa IP.

Ejemplo 52- Efecto de la concentración de zinc sobre el desempeño de conjugado de insulina de acción prolongada

El propósito de este ejemplo fue demostrar el efecto de la concentración de zinc sobre la estabilidad de la formulación, acción del tiempo y perfil PK sensible a glucosa de un conjugado de ejemplo. En este ejemplo, l- 6 sintetizado según los métodos descritos en el ejemplo 20, se probó mediante la formulación generalizada y el protocolo in vivo descrito en el ejemplo 50:

Componente	Variable	Volumen (ml)
Solución de TSAT- C6- AETM- 2 (I- 6) a 2.7 mg/ml	insulina sin modificar = 0%	1.000

solución salina amortiguada por HEPES 250 mM	Concentración de NaCl = 1.5 M	0.111
Solución de acetato de zinc	Concentración de zinc (mg/ml)= ver a continuación	0.124
Solución de cresol en agua	3% v/v	0.159
solución de protamina pH 7.2 en solución salina amortiguada por HEPES 25 mM	Concentración de protamina (mg/ml)= ver a continuación	alícuotas 4x0.194

Formulación	Concentración de zinc (mg/ml)	Concentración de protamina (mg/ml)
4XP- LXZ	1.15	5.00
4XP- 2xz	2.30	5.00
loxP LXZ	1.15	12.5
10XP- 2xz	2.30	12.5

Los experimentos de inyección de glucosa (4 g/kg) de 4 horas se realizaron mediante la administración 15 U/kg (peso corporal en gramos/1.87 = microlitros de volumen de inyección) de cada una de las formulaciones descritas anteriormente. Los resultados mostrados en la Figura 32a- b y 33a- b demuestran que dentro del error experimental, la concentración de zinc no tuvo un efecto significativo sobre la naturaleza global de entrega sostenida de la formulación o el perfil sensible a glucosa. En todos los casos, se observó un aumento estadísticamente significativo en concentración de insulina medida después de la inyección de glucosa IP. Como se demostró en el ejemplo 51, las mayores formulaciones de protamina (l0xP) liberaron menos conjugado en el tiempo que las menores formulaciones de protamina (4 XP), independientemente de la concentración de zinc. Sin embargo, cuando las formulaciones se dejaron a temperatura ambiente durante más de 24 horas, ambas formulaciones l0xP se

transformaron de una solución particulada de fácil dispersión a una solución de dos fases, pegajosa, aglomerada. Esto no sucedió con la correspondiente formulación 10XP- 4xZ. Del mismo modo, se encontró que formulación 4xP- 1xZ se transformó de la misma manera que la formulación l0xP 1xZ mientras la formulación 4xP- 2xZ se mantuvo relativamente estable a temperatura ambiente durante semanas. Por lo tanto, la concentración de zinc para una determinada concentración de protamina se puede ajustar para preparar formulaciones de fácil dispersión que se mantengan estables durante largos períodos de tiempo.

Ejemplo 53- Efecto de la concentración de m- cresol sobre el rendimiento de conjugado de insulina de acción prolongada.

El propósito de este ejemplo fue demostrar el efecto de la concentración de m- cresol sobre la acción del tiempo y el perfil PK sensible a glucosa de un conjugado de ejemplo. En este ejemplo, I- 6 sintetizado según los métodos descritos en el ejemplo 20, se probó mediante la formulación generalizada y el protocolo in vivo descrito en el ejemplo 50:

Componente	**Variable**	**Volumen (ml)**
Solución de TSAT- C6-AETM- 2 (I- 6) a 2.7 mg/ml	insulina sin modificar = 0%	1.000
solución salina amortiguada por HEPES 250 mM	Concentración de NaCl = 1.5 M	0.111
Solución de acetato de zinc	Concentración de zinc = 4,6 mg/ml	0.124
Solución de cresol en agua	v/v% = ver a continuación	0.159
solución de protamina pH 7.2 en solución salina amortiguada por HEPES 25 mM	Concentración de protamina = 12.5 mg/ml	alícuotas 4x0.194

Formulación	Concentración de cresol
No cresol	0
4x cresol	12% v/v

Se realizaron experimentos de inyección de glucosa (4 g/kg) de 4 horas mediante la administración 15 U/kg (peso corporal en gramos/1.87 = microlitros de volumen de inyección) de las dos formulaciones descritas anteriormente. Los resultados mostrados en la Figura 34a- b demuestran que la presencia de m- cresol mantiene una formulación durante más tiempo. La formulación sin cresol libera una parte significativa de la carga de conjugado de la insulina durante un corto período de tiempo inmediatamente después de la inyección tal que muy poco incremento en la concentración de insulina medida se observó cuando se expuso a glucosa IP. Por otro lado, la formulación de cresol 4x libera una cantidad basal baja de insulina en las primeros cuatro horas, sin hipoglicemia y posteriormente logra un aumento de 3 a 4 veces en la concentración de insulina medida inmediatamente después de la inyección de glucosa IP.

Ejemplo 54- Efecto de la concentración de sal/agente isotónico sobre el desempeño de conjugado de insulina de acción prolongada

El propósito de este ejemplo fue demostrar el efecto de la concentración de sal y la elección de agente isotónico sobre la acción del tiempo y el perfil PK sensible a glucosa de un conjugado de ejemplo. En este ejemplo, I- 6 sintetizado según los métodos descritos en el ejemplo 20, se probó mediante la formulación generalizada y el protocolo in vivo descrito en el ejemplo 50:

Componente	Variable	Volumen (ml)
Solución de TSAT- C6- AETM- 2 (I- 6) a 2.7 mg/ml	insulina sin modificar = 16,7%	1.000
solución salina amortiguada por HEPES 250 mM	La concentración de NaCl o glicerol (M)= ver a continuación	0.111

Solución de acetato de zinc	Concentración de zinc = 4,6 mg/ml	0.124
Solución de cresol en agua	3% v/v	0.159
solución de protamina pH 7.2 en solución salina amortiguada por HEPES 25 mM	Concentración de protamina = 12.5 mg/ml	alícuotas 4x0.194

Formulación	**Concentración de NaCl**
Sin sal	0,0 M
3.3x sal	5,0 M
Glicerol	Solución de glicerol puro en lugar de solución salina amortiguada

Se realizaron los experimentos de inyección de glucosa (4 g/kg) de 4 horas mediante la administración 15 U/kg (peso corporal en gramos/1.87 = microlitros de volumen de inyección) de cada una de las tres formulaciones anteriormente descritas. Los resultados mostrados en la Figura 35a- c demuestran que la presencia de sal en la formulación mantiene una formulación durante más tiempo. La formulación sin sal liberó una parte significativa de la carga de conjugado de insulina durante las primeras cuatro horas del experimento de manera que muy poco incremento en la concentración de insulina medida se observó después de exposición intraperitoneal de glucosa. Por otro lado, la formulación de sal 3.3 x liberó una cantidad basal baja de conjugado durante las primeros cuatro horas sin hipoglicemia y posteriormente alcanzó un incremento de ~ 4 veces en la concentración de insulina medida inmediatamente después de la inyección de glucosa IP. Este desempeño fue similar al obtenido con la formulación 10xP- 4xZ del Ejemplo 51, el cual fue exactamente el mismo que la formulación de sal de 3.3 x, pero contenía aproximadamente 1/3 de la concentración de sal (1.5 M en comparación con 5.0 M). Por último, la sustitución de glicerol por NaCl como el agente isotónico no parece afectar adversamente el carácter prolongado de la formulación.

Ejemplo 55- Efecto de la concentración de insulina sin modificar sobre el desempeño del conjugado de insulina de acción prolongada

El propósito de este ejemplo fue demostrar el efecto de incluir diferentes concentraciones de insulina sin modificar en la acción del tiempo y perfil PK sensible a glucosa de un conjugado de ejemplo. En este ejemplo, 1- 6 sintetizado según los métodos descritos en el Ejemplo 20, se probó mediante la formulación generalizada y protocolo in vivo descrito en el ejemplo 50:

Componente	**Variable**	**Volumen (ml)**
Solución de TSAT- C6-AETM- 2 (I- 6) a 2.7 mg/ml	% de insulina sin modificar = ver a continuación	1.000
solución salina amortiguada por HEPES 250 mM	La concentración de NaCl = 1.5 M	0.111
Solución de acetato de zinc	Concentración de zinc = 4,6 mg/ml	0.124
Solución de cresol en agua	3% v/v	0.159
solución de protamina pH 7.2 en solución salina amortiguada por HEPES 25 mM	Concentración de protamina = 12.5 mg/ml	alícuotas 4x0.194

Formulación	**% de insulina sin modificar**
01.24	4.17
12.01	8.33
6.1	16.7

Los experimentos de inyección de glucosa (4 g/kg) de 4 horas se realizaron mediante la administración 15 U/kg (peso corporal en gramos/1.87 = microlitros de volumen de inyección) de cada una de las tres formulaciones anteriormente descritas. Los resultados mostrados en la Figura 36a- c demuestran que la presencia de insulina sin modificar en la formulación produce de manera benéfica una formulación más prolongada con un aumento sustancial en la concentración de insulina medida después de una inyección de glucosa en IP. Además, la presencia de la insulina no modificada ayuda a preservar el desempeño de la formulación, incluso después de varias semanas de incubación a temperatura ambiente (ver el Ejemplo 57 más adelante).

Ejemplo 56 – Conjugados de insulina de acción prolongada – Efecto de respuesta a dosis

En este ejemplo, se evaluó el efecto dosis- respuesta de una formulación particular de un conjugado de ejemplo de acción prolongada. El Conjugado I- 6, sintetizado según los métodos descritos en el ejemplo 20, se probó mediante la formulación generalizada y el protocolo *in vivo* descrito en el ejemplo 50:

Componente	**Variable**	**Volumen (ml)**
Solución de TSAT- C6-AETM- 2 (I- 6) a 2.7 mg/ml	insulina sin modificar = 16,7%	1.000
solución salina amortiguada por HEPES 250 mM	La concentración de NaCl = 1.5 M	0.111
Solución de acetato de zinc	Concentración de zinc = 4,6 mg/ml	0.124
Solución de cresol en agua	3% v/v	0.159
solución de protamina pH 7.2 en solución salina amortiguada por HEPES 25 mM	Concentración de protamina = 12.5 mg/ml	alícuotas 4x0.194

El experimento de inyección de glucosa (4 g/kg) IP de 4 horas se realizo mediante la administración de 5 o 15 U/kg (peso corporal en gramos/1.87 = microlitros de volumen de inyección) de la formulación descrita anteriormente.

Como se muestra en la Figura 37, el conjugado mostró un perfil PK plano hasta que la glucosa se inyectó. El aumento en la concentración de insulina medida después de exposición a glucosa IP fue dramática y dependiente de dosis (comparar datos obtenidos con un 5 U/kg (izquierda) y 15 U/kg (derecha) la dosis de conjugado). No se observó hipoglicemia en los puntos de tiempo tempranos o tardíos.

Ejemplo 57- Estabilidad de conjugados sensibles a glucosa de acción prolongada de ejemplo

En este ejemplo, hemos sintetizado la misma formulación de acción prolongada del ejemplo 56 en una escala de 2x. La mitad del material se almacenó a 2- 8 ° C y la otra mitad se almacenó a temperatura ambiente durante una semana o dos semanas. Después del tiempo de almacenamiento especificado, el material se dispersó nuevamente y se probó utilizando el mismo protocolo de inyección IP de glucosa de 4 horas descrito en el Ejemplo 56 a 15 U/kg (peso corporal en gramos/1.87 = microlitros de volumen de inyección). Como se muestra en las figuras 38- 39, esta formulación demuestra un rendimiento similar, incluso después de ser almacenada en refrigerador (Figura 38) o a temperatura ambiente (Figura 39) durante por lo menos dos semanas.

Ejemplo 58- Desempeño de conjugados de acción prolongada preparados a partir de conjugados con multivalencia y afinidad de ligando variables

En este ejemplo, nos dispusimos a determinar la acción del tiempo y perfil farmacocinético sensible a glucosa de formulaciones de acción prolongada de conjugados construidos a partir de diferentes tipos y números de los ligandos. Todos los conjugados de este ejemplo se sintetizaron según los métodos descritos en el ejemplo 20 utilizando las estructuras y los ligandos sacáridos especificados a continuación:

Conjugado	Estructura	Peso Molestructura	Ligando	Peso molecular AE-	Pureza (HPLC)	Peso molecular (LC-	Azúcar/insulina

				azúcar		MS)	
I- 8: DSS- AEM- 1 (B29)	DSS	368	AEM	223	> 95%	6168	1.0
I- 7: TSAT- C6- AEM- 2 (B29)	TSAT- C6	822	AEM	223	95%	6729	2.0
I- 9: TSPE- AEM- 3 (B29)	TSPE	813	AEM	223	> 95%	6829	3.0
I- 10: DSS- AETM- 1 (B29)	DSS	368	AETM	547	> 95%	6491	1.0
I- 11: TSPE- AETM- 3 (B29)	TSPE	813	AETM	547	> 95%	7800	3.0
I- 17: C6- amida- AEM- 2 (B29)	C6- amida	838	AEM	223	95%	6745	2.0

La siguiente formulación de acción prolongada se utilizó para cada conjugado:

Componente	**Variable**	**Volumen (ml)**
Solución de conjugado a 2.7 mg/ml	Insulina sin modificar = 16,7%	1.000
solución salina amortiguada por HEPES 250 mM	Concentración de NaCl = 1.5 M	0.111
Solución de acetato de zinc	Concentración de zinc = 4,6 mg/ml	0.124
Solución de cresol en agua	3% v/v	0.159
solución de protamina pH 7.2 en solución salina amortiguada por HEPES	Concentración de protamina = 12.5 mg/ml	alícuotas 4x0.194

25 mM		

Se realizaron experimentos de inyección de glucosa (4 g/kg) de 4 horas mediante la administración 15 U/kg (peso corporal en gramos/1.87 = microlitros de volumen de inyección) de cada uno de los conjugados descritos anteriormente. Como se muestra en la Figura 40a- e, todos los conjugados mostraron un perfil de absorción prolongado con algún elemento de aumento en la concentración insulina medida en suero después de la inyección de glucosa de 4 horas. Parece que hubo cierta absorción de conjugado importante en las primeras cuatro horas después de la inyección de conjugado TSPE- AETM- 3 I- 11 de acción prolongada. Sin embargo, todos los otros conjugados exhibieron perfiles de absorción planos, como los observados para conjugados TSAT- C6- AETM- 2. Estos resultados se correlacionan bien con el hecho de que las vidas medias de estos conjugados son todas menores se que la insulina no modificada como se describe en los Ejemplos 47 a 48 y que cada una de ellas demuestra un aumento inducido por a-MM en perfil PK/PD como se describe en los ejemplos 45- 46.

Ejemplo 59- Desempeño de conjugados de acción prolongada bajo condiciones de prueba de a- MM IP

En este ejemplo, hemos probado el perfil sensible a a- MM de formulaciones de acción prolongada de conjugados construidos a partir de conjugados TSAT- C6- AETM- 2 (I- 6) y TSAT- C6- GA- 2 (I- 5). Ambos conjugados fueron preparados según los métodos generales descritos en el Ejemplo 20. Además, la siguiente formulación de acción prolongada se utilizó para cada conjugado:

Componente	**Variable**	**Volumen (ml)**
Solución de conjugado a 2.7 mg/ml	insulina sin modificar = 16,7%	1.000
solución salina amortiguada por HEPES 250 mM	Concentración de NaCl = 1.5 M	0.111
Solución de acetato de	Concentración de zinc = 4,6 mg/ml	0.124

zinc		
Solución de cresol en agua	3% v/v	0.159
solución de protamina pH 7.2 en solución salina amortiguada por HEPES 25 mM	Concentración de protamina = 12.5 mg/ml	alícuotas 4x0.194

Para probar la naturaleza de entrega sostenida de las formulaciones, así como también el perfil PK sensible a a- MM, se realizó el siguiente experimento. Las formulaciones fueron inyectadas a 15 U/kg (peso corporal en gramos/1.87 = microlitros de volumen de inyección) por detrás del cuello de ratas macho normales no diabéticas en ayuno (Sprague- Dawley, 400- 500 g, n = 3). Después de un retraso de 240 minutos, una dosis de a- MM (4 g/kg) se inyectó IP. Se tomaron muestras de sangre a través de sangrado por la vena de la cola a los 0 minutos y 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, y 300 minutos después de la inyección inicial de conjugado. Los valores de glucosa en sangre se midieron utilizando tiras de prueba disponibles en el mercado (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Además, la sangre de cada punto de tiempo se centrifugó a 4 ° C para recolectar el suero. Las concentraciones de insulina en suero se midieron posteriormente con un kit ELISA disponible comercialmente (Iso- insulina ELISA, Mercodia, Uppsala, Suecia).

Como se muestra en la figura 41a, la relación concentración sérica máxima:concentración sérica de base después de la inyección IP de a- MM para la formulación TSAT- C6- AETM- 2 (I- 6) de acción prolongada fue aún mayor que la observada para la misma formulación cuando la glucosa se sustituye por a- MM. Además, la formulación TSAT- C6- GA- 2 (I- 5) (Figura 41b) no mostró ningún aumento en la concentración de conjugado en suero después de exposición a a- MM. Estos resultados se correlacionan bien con el hecho de que la vida media de eliminación del conjugado TSAT- C6- GA- 2 (I- 5) fue casi idéntica a la insulina sin modificar (Ejemplo 47), y que no mostró cambios inducidos por a- MM en PK (Ejemplo 45).

Ejemplo 60- Conjugados de acción prolongada en diabéticos y no diabéticos

Con el fin de confirmar la utilidad *in vivo* de la formulación TSAT- C6- AETM- 2 (I- 6), se administró (5, 10 y 20 U/kg) a ratas macho normales y diabéticas inducidas por STZ (Spragu - Dawley, 400- 500 g, n = 6). La formulación se preparó mediante el siguiente procedimiento:

Componente	**Variable**	**Volumen (ml)**
Solución de TSAT- C6- AETM- 2 (I- 6) a 2.7 mg/ml	insulina sin modificar = 0%	1.000
solución salina amortiguada por HEPES 250 mM	Concentración de NaCl = 1.5 M	0.111
Solución de acetato de zinc	Concentración de zinc = 4,6 mg/ml	0.124
Solución de cresol en agua	3% v/v	0.159
solución de protamina pH 7.2 en solución salina amortiguada por HEPES 25 mM	Concentración de protamina = 12.5 mg/ml	alícuotas 4x0.194

No se utilizaron inyecciones IP externas de glucosa para desencadenar la bioactividad de los conjugados. En su lugar, se basó en los niveles endógenos de glucosa en las ratas para controlar el perfil PK y PD de la formulación de conjugado. Se tomaron muestras de sangre a través de sangrado por la vena de la cola en varios puntos de tiempo después de la inyección inicial de conjugado. Los valores de glucosa en sangre se midieron utilizando tiras de prueba disponibles en el mercado (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Como se muestra en la Figura 42, no se observó hipoglicemia en los puntos de tiempo tempranos o tardíos para ratas normales o diabéticas. Los perfiles de glucosa observados con las ratas diabéticas son dramáticos y demuestran que los conjugados fueron activados por las altas concentraciones de glucosa y ejercieron su efecto reductor de glucosa de una manera proporcional a la dosis durante un largo período de tiempo (más de 8 horas a la dosis más alta).

El experimento se repitió utilizando diferentes dosis (7, 14 y 28 kg U /) y un período de tiempo más largo (24 horas). Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 43.

Ejemplo 61- Conjugación con ésteres de ácidos grasos para generar formulaciones de acción prolongada

Se puede apreciar que se podría haber utilizado un enfoque alternativo a la insulina zinc protamina para hacer una forma de acción prolongada de un conjugado de ejemplo. En este ejemplo, se muestra cómo convertir un conjugado de insulina Bl- sustituido en una formulación de acción prolongada mediante la modificación covalente del grupo B29- épsilon- amina con un ácido graso de cadena larga. Como se describe en la patente estadounidense. N ° 6.869.930, acilación de insulina con ácido mirístico C14- , por ejemplo, conduce a un material soluble con un perfil plano de acción prolongada. TSAT- C6- AETM- 2 (I- 2) Bl- sustituido se sintetiza según los métodos en el Ejemplo 12. Luego el material puede liofilizarse en un polvo seco y utilizarse como material de partida en el siguiente procedimiento.

Acido Mirístico- éster NHS se disuelve a 60 mM en 1 ml de DMSO anhidro seguido por la adición de 400 ul (exceso) de trietilamina (TEA). La solución se agita rápidamente durante 10 minutos a temperatura ambiente. El conjugado I- 2 se disuelve de manera separada en 7.5 ml de DMSO anhidro a una concentración de 8.1 mM. Una vez disuelto, la solución completa se agrega durante un minuto a la solución de ácido mirístico- éster NHS seguido por mezclado a temperatura ambiente durante dos horas para asegurar la reacción completa.

Luego la solución resultante se superdiluye 10x en una solución salina amortiguada por HEPES 20 mM pH 5.0 con NaCl 0.150 M seguido por el ajuste del pH con HC1 diluido a un pH final de 8.0. La solución acuosa se purifica primero por exclusión por tamaños con una fase sólida adecuada para la separación deseada de materiales conjugados y no conjugados. La solución que pasa por el volumen vacío de la columna se concentra utilizando una membrana de ultrafiltración de tamaño adecuado a aproximadamente 10 ml. Esta solución se purifica para obtener el producto deseado con HPLC de fase inversa preparativa en una Columna Waters SymmetryPrep C18, 7 um, 19 x 150 mm. El Buffer A es agua desionizada conteniendo TFA al 0.1% y el buffer B es acetonitrilo conteniendo TFA al 0.1%. Antes de la purificación, la columna se equilibró a 15 ml/minuto con una fase móvil 80%A/20%B utilizando un sistema Waters DeltraPrep 600. Aproximadamente 5 ml de la solución cruda se inyectó en la columna durante 2

minutos con una tasa de 15 ml/minuto después de lo cual se emplea un gradiente lineal entre 80% A/20 B% y 75% A/25% B durante los siguientes 5 minutos, seguido por un gradiente lineal más lento de 75% A/25 B% a 62%A/38%B durante los próximos 22 minutos. El tiempo de retención pico deseado variará dependiendo del fármaco, la estructura, y ligando utilizados. Una vez recolectada, la solución se sometió a rotoevaporación para elimitar acetonitrilo y se liofiliza para obtener conjugado puro cuya identidad puede verificarse por LC- MS (HT Laboratories, San Diego, CA). El perfil PK/PD prolongado y sensible a sacáridos del conjugado resultante puede evaluarse utilizando condiciones de glucosa o a- MM IP de 4 horas descritas en los Ejemplos 50 y 59.

Ejemplo 62- Conjugados de acción prolongada con insulina que posee un punto isoeléctrico neutral

Se puede apreciar que se podrían haber utilizado enfoques alternativos insulina zinc protamina para fabricar una forma de acción prolongada del conjugado. En este ejemplo, se demuestra cómo sintetizar conjugados de acción prolongada mediante la sustitución de la insulina glargina (Lantus ®), por ejemplo, en lugar de insulina humana tipo silvestre en la preparación del conjugado. Cualquiera y todos los métodos de síntesis descritos en los ejemplos anteriores pueden utilizarse para formar conjugados de insulina- glargina. La insulina glargina es un análogo de insulina de acción prolongada de ejemplo en el cual Asp- A21 ha sido sustituido por glicina, y dos argininas se han agregado al extremo C de la cadena B. El efecto de estos cambios es cambiar el punto isoeléctrico, produciendo una solución que es completamente soluble a pH 4, pero insoluble a pH fisiológico. Una vez sintetizado y purificado, el perfil PK/PD prolongado y sensible a sacáridos del conjugado resultante puede evaluarse utilizando condiciones de glucosa o a- MM IP de 4 horas descritas en los Ejemplos 50 y 59.

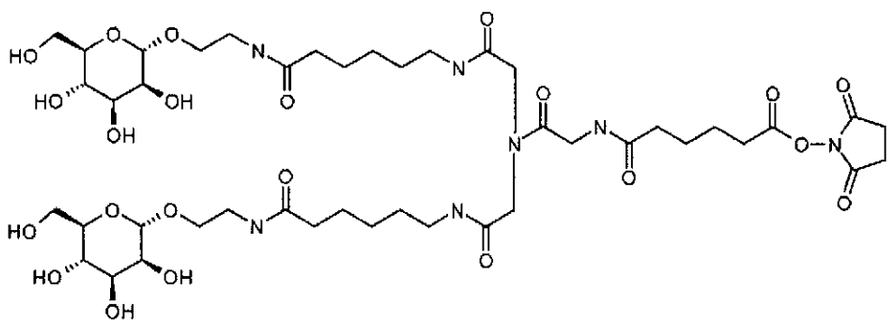
Ejemplo 63- Uso de conjugados solubles en un sistema de entrega de bomba

En lugar de formular los conjugados sensibles a sacáridos en formulaciones de acción prolongada, cada uno puede ser infundido continuamente por vía intravenosa, subcutánea, o intraperioneal utilizando un sistema de entrega de bomba. La solución estéril de conjugado a una concentración conocida (típicamente 25 - 100 U/ml) se carga en el depósito de la bomba y continuamente se libera al compartimiento de elección a una tasa constante. Esta tasa se ajusta al

nivel máximo al cual no se observa hipoglicemia en el sujeto. Luego, utilizando condiciones de glucosa o a- MM IP de 4 horas descritas en los Ejemplos 50 y 59 años, el perfil PK/PD sensible a glucosa puede ser evaluado. El método de la bomba es vla ventaetajoso puesto que no se requieren excipientes para proporcionar una entrada constante y tasa de absorción para los conjugados. Una variedad de bombas de insulina han sido descritas en la técnica y pueden utilizarse para este propósito. Por ejemplo, ver cualquiera de las bombas descritas en las patentes estadounidenses. N ° 4.435.173, 4.498.843, 4.923.375, 5.062.841, 6.650.951, 6.744.350, 6.852.104, 7.377.907, 7.515.060 y, y las Publicaciones de Patentes estadounidenses. N ° 20080172028, 20090005726, 20090112165, 20090137957, 20090177142, 20090177154, 20100004598, cada una de los cuales se incorpora en la presente como referencia.

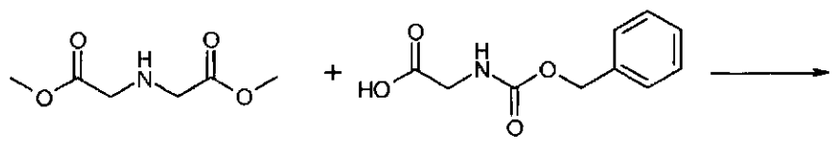
Ejemplo 64- Síntesis del intermdio de C6- Amida- AEM- 2

En este ejemplo se describe un proceso sintético para la fabricación de un intermedio ZC- AEM- 2 que tiene la siguiente estructura química:

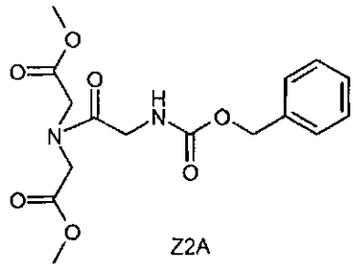


a. Intermedio Z2A

La primera fase del proceso implicó la combinación de reactivos y Z1A Z1B para proporcionar el intermedio Z2A como se muestra en el siguiente esquema de reacción:



Z1A Z1B



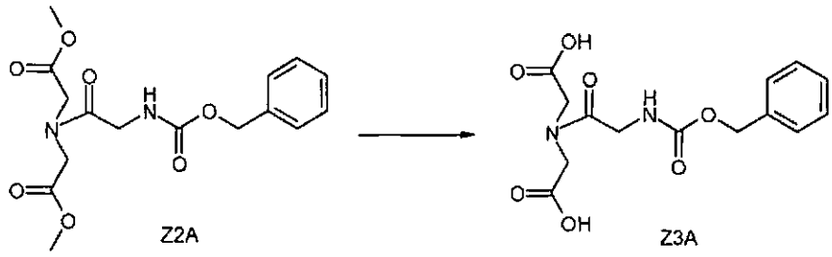
Z2A

Esto se logró de la siguiente manera. A un matraz de 250 ml de dos cuellos se agregó compuesto Z1B (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, 13,9 g), hidrato de 1- hidroxibenzotriazol (HOBT, Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, 11.0 g) y dimetilformamida (DMF , Sigma- Aldrich, St. Louis, MO) a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno. La mezcla se enfrió a 0 ° C, después de lo cual se agregó Compuesto Z1A (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, 9,5 ml) y di-isopropilcarbodiimida (DIC, Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, 9,8 ml) a la mezcla en atmósfera de nitrógeno. La solución de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Después de 36 horas de reacción, se agregó (dimetilamino)piridina (DMAP, Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, 7,71 g), y después de 48 horas, la mezcla de reacción se filtró con un embudo Buchner. El filtrado se mantuvo a 4 ° C durante la noche y trabajó hasta el día siguiente.

El filtrado se evaporó y el residuo resultante se recolectó en 120 ml de acetato de etilo y se lavó sucesivamente con una solución acuosa de HCl al 10% (3 x 30 ml), solución acuosa saturada $NaHCO_3$ (3 x 30 ml) y salmuera (3 x 20 mL) y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. La solución se concentró a sequedad al vacío para proporcionar el producto que podría ser utilizado sin purificación adicional.

b. Intermedio Z3A

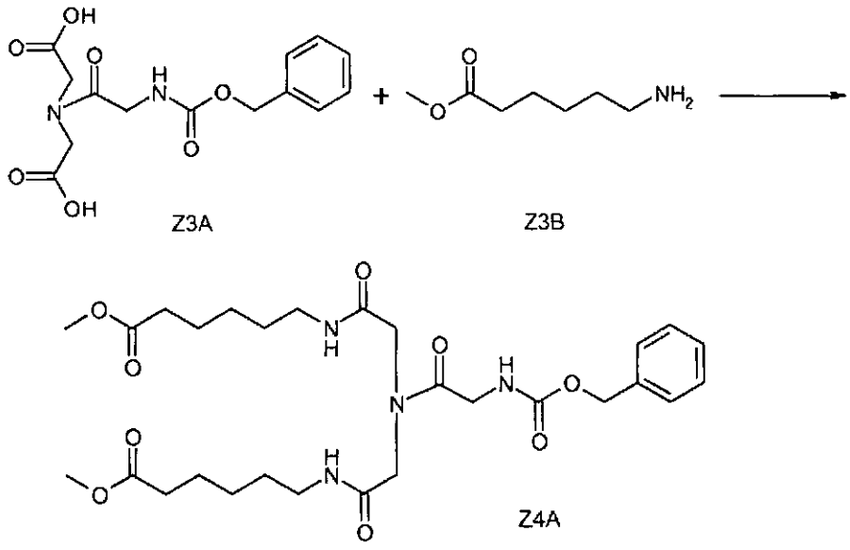
La segunda fase del proceso implicó la conversión del intermedio Z2A al intermedio Z3A como se muestra en el siguiente esquema de reacción:



El compuesto Z2A (16.0 g) se disolvió en metanol (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, 85 ml), y la solución se enfrió a 0 ° C. Una solución acuosa al 10% de hidróxido de sodio (19 ml) se agregó por goteo y la reacción se agitó a 0 ° C durante 3 horas. Posteriormente, la suspensión se disolvió con una cantidad mínima de agua (15 ml). A esta solución se agregó Amberlita IR- 120 (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, forma H +), en alícuotas 15 x de 2 g a 0 ° C. La suspensión de esferas se agitó durante 0.5 horas, lo que resulta en una solución con pH ~ 5. La mezcla resultante se filtró para eliminar las esferas Amberlite™, y el filtrado se concentró y se secó al vacío para proporcionar un sólido blanco- rojo, 13.0 g de rendimiento.

c. Intermedio Z4A

La tercera fase del proceso implicó la combinación del intermedio Z3A con el reactivo Z3B para proporcionar el intermedio Z4A, como se muestra en el siguiente esquema de reacción:



El compuesto Z3B (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, 19,0 g) se disolvió en DMF (50 mL). La suspensión se enfrió a 0 ° C, después de lo cual se agregó trietilamina (15.0 ml) a la solución.

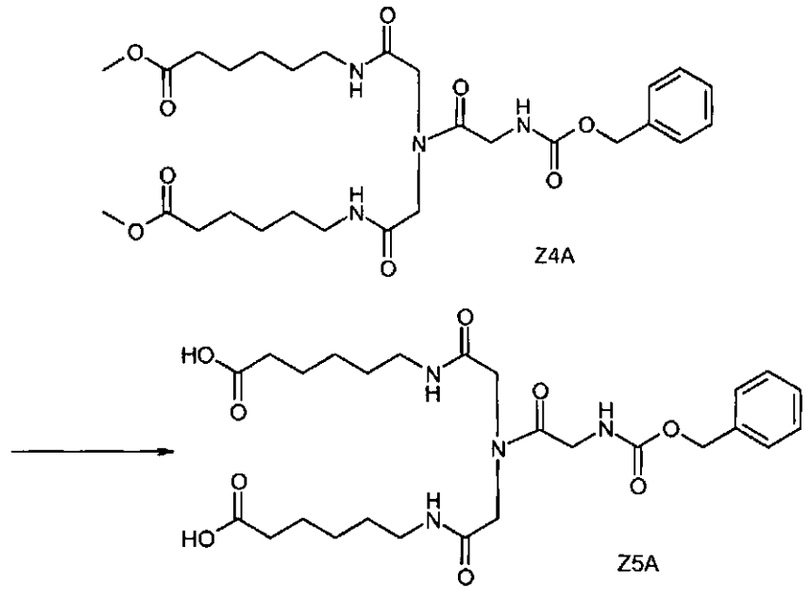
La temperatura de la solución se mantuvo a 0 ° C durante 0.75 horas. A continuación, la solución fue cargada con una solución del compuesto Z3A (13.0 g) en DMF (24 mL) a 0 °C, seguido por HOBT (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, 15.9 g), DMF (50 mL) y DIC (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, 15,0 ml). La solución resultante se agitó durante una hora adicional a 0 °C y luego se dejó calentar a temperatura ambiente y reaccionar durante la noche durante 18 horas más.

A continuación, la reacción se volvió a enfriar a 0 ° C y se agregó N, N-diisopropiletilamina (DIPEA, Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, 15 ml) y la solución resultante se agitó durante 0.5 horas hasta que el pH de la solución fue de aproximadamente 9.0 . Se agregó cloruro de metileno anhidro (25 ml) y DIC (3.5 ml) y se continuó la agitación durante otras 10 horas. Se agregó más compuesto Z3B (base libre, 2.5 g) y la reacción se dejó proceder durante 50 horas más a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno.

Finalmente, la mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró por evaporación rotatoria. El residuo se disolvió en cloruro de metileno (CH_2Cl_2, 400 ml), y la fase orgánica se lavó con una solución de HCl al 5% (3 x 200 ml). La capa orgánica se enfrió a 0 ° C y se neutralizó con una solución saturada de bicarbonato sódico (3 x 100 ml) y salmuera (2 x 200 ml). La solución orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, que luego se separó por filtración y se concentró utilizando evaporación giratoria. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (fase eluyente: cloruro de metileno/metanol 50:1 a 5:1). Las fracciones de columna se concentraron y se secaron al vacío durante la noche. Un sólido blanco se obtuvo como Z4A (18.9g, rendimiento 81%).

d. Intermedio Z5A

La cuarta fase del proceso implicó la conversión del intermedio Z4A a intermedio Z5A como se muestra en el siguiente esquema de reacción:

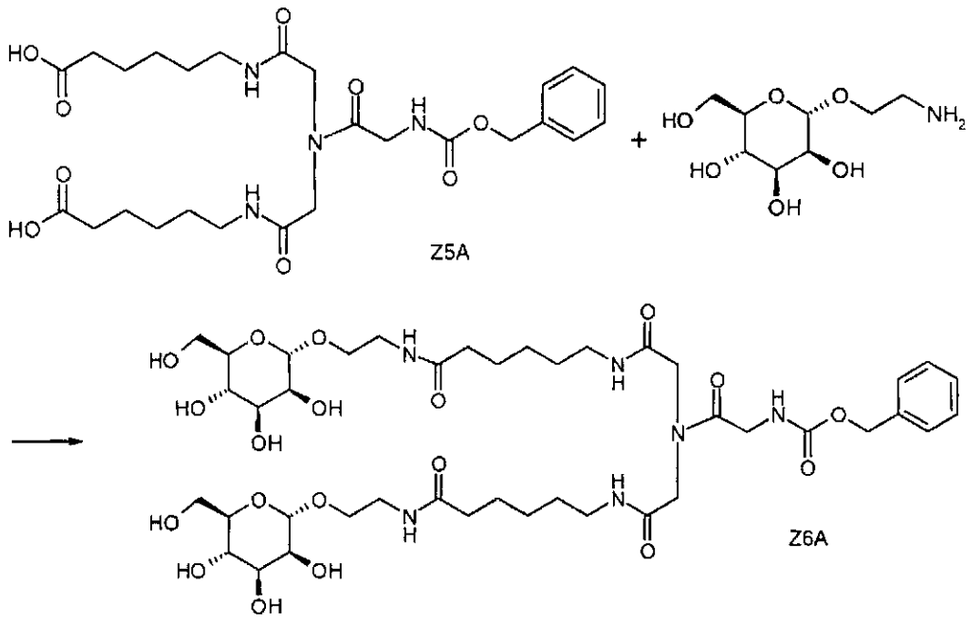


Ester Z4A (2,27 g) se disolvió en metanol (10 ml), y a esta solución se agregó 5.0 ml de solución 1.0 M de hidróxido de sodio a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 38 horas. Transcurrido este tiempo se agregó 1.5 ml de solución acuosa 2.0 M de hidróxido de sodio, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante otras 14 horas.

A continuación, la mezcla de reacción se acidificó con una solución acuosa al 10% de HCl a 0 ° C. El producto se extrajo con acetato de etilo (3 x 25 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio, y después se concentraron a sequedad al vacío durante la noche para proporcionar Z5 A como un sólido blanco (2.2 g).

e. Intermedio Z6A

La quinta fase del proceso implicó la combinación del intermedio Z5A con aminoetilmanosa (AEM) para proporcionar el intermedio Z6A, como se muestra en el siguiente esquema de reacción:

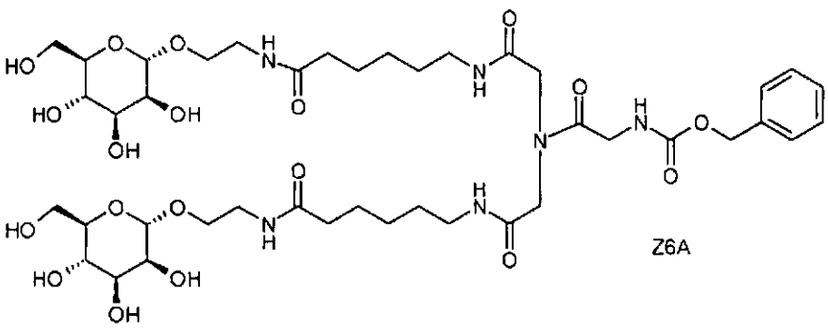


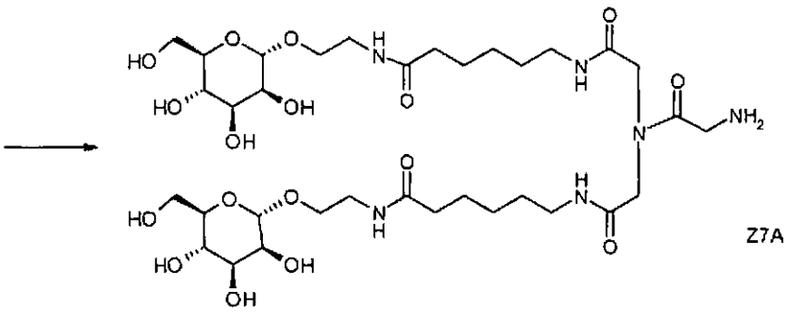
El compuesto diácido Z5A (2.0 g), aminoetilmanosa (1.46 g), 0- (7- azabenzotriazol- 1- il)- N, N, N ', N'- tetrametil- uronio hexafluorofosfato (HATU, Sigma- Aldrich, St. Louis , MO, 2.7 g) se disolvieron en DMF seco (80 ml) en atmósfera de nitrógeno a 0 ° C. Se agregó DIPEA (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, 3.0 ml) por goteo a la mezcla a 0 ° C bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó durante 1 hora a 0 ° C y luego 4 horas más a temperatura ambiente. En este punto, se agregó otra alícuota de aminoetilmanosa (0.5 g) y HATU (0.52 g) a la solución de reacción a temperatura ambiente, y la solución se agitó durante 3 horas. La mezcla se concentró por evaporación rotatoria y el residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (cloruro de metileno/metanol 20:1, luego 6:1 eluyendo a 1:1). Las fracciones se recolectaron y evaporaron al vacío para proporcionar el producto purificado (TLC: mancha superior, Rf 0.6, cloruro de metileno: metanol 1:3).

Se puede apreciar que todo este proceso se puede repetir para obtener conjugados con diferentes ligandos mediante la sustitución de AEM con otro reactivo que contiene amina (por ejemplo, sin limitación AEG, AEBM, AETM, etc) al convertir el intermedio Z5A al intermedio Z6A.

f. Intermedio Z7A

La sexta fase del proceso implicó la conversión del intermedio Z6A al intermedio Z7A como se muestra en el siguiente esquema de reacción:



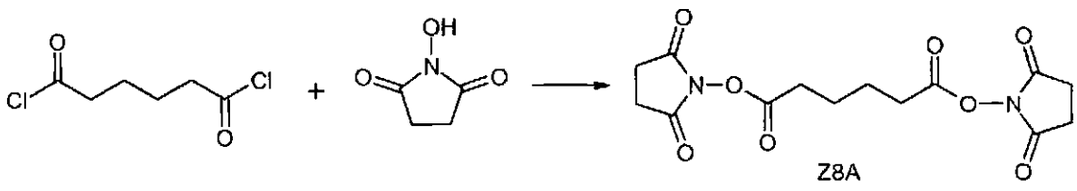


El compuesto Z6A (1.43 g) se disolvió en metanol anhidro (100 ml). A esta solución se agregó (1.00g paladio sobre carbono (Pd/C)), y se burbujeó gas de hidrógeno en la solución para reducir el grupo protector para proporcionar la amina correspondiente. Se encontró que la reacción había llegado a una conversión completa después de aproximadamente 9 horas de reacción.

La mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de Celite y el filtrado se concentró y se secó al vacío. El compuesto Z7A se obtuvo como un sólido marrón (1.16g, rendimiento 94%).

g. Intermedio Z8A

El siguiente esquema muestra cómo el agente de acoplamiento Z8A fue preparado:

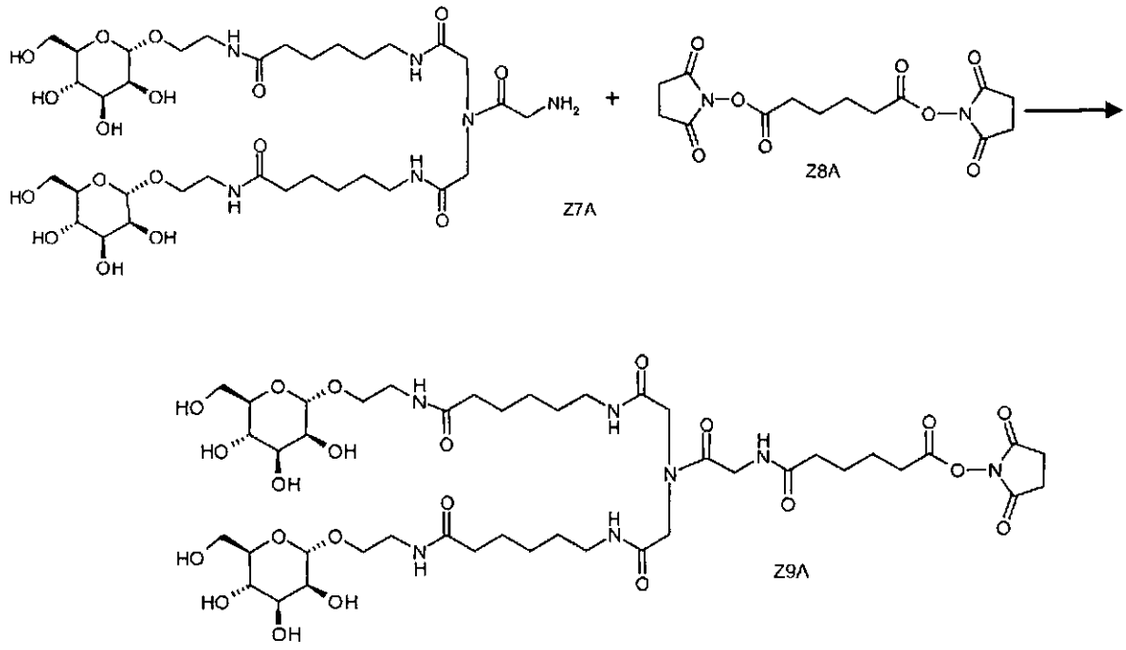


A una solución enfriada de N- hidroxisuccinimida (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, NHS, 7.0 g) en CH_2Cl_2 (65 mL) a 0 ° C se agregó trietilamina (9,5 ml) y cloruro de adipoilo (3,97 ml,

5.0 g). La mezcla resultante se agitó durante 2 horas a 0° C. La mezcla se lavó con una solución acuosa saturada de NaCl (3 x 30 ml) y se secó sobre sulfato de magnesio. La solución se filtró y se concentró al vacío, a continuación, el residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice para obtener un sólido blanco (6,6 g) como el producto Z8A.

h. Intermedio Z9A

El siguiente esquema muestra cómo el agente de acoplamiento Z8A se combinó con el intermedio Z7A para proporcionar el intermedio Z9A:



El compuesto Z7A (0,256 g) se disolvió en DMF seco, y la solución se enfrió a 0 ° C. A esta solución se agregó una solución de Z8A (0,710 g) en DMF anhidro (15 ml) bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó a 0 ° C durante 2 horas.

El volumen de la solución se concentró a un tercio y se filtró el exceso de DSS no reaccionado. El filtrado se concentró adicionalmente a aproximadamente 3 ml de la columna y se purificó mediante cromatografía de gel de sílice (eluyente: cloruro de metileno/metanol 20:01-04:01, luego 3:1 a 1:1). Fracciones recolectadas se concentraron y se secaron al vacío para proporcionar 151 mg de producto purificado. ^{1}H RMN (300 MHz, DMSO) δ 1,28 a 1,63 (banda, 20H), 2.07 a 2.22 (banda, 6H), 2,85 (s, 4H), 3.08 a 3,64 (banda, 22H), 3,91 (s, 4H), 4,08 (s, 2H), 4,49 (s, 2H), 4,57 (d, 2H, J = 5,70 Hz), 4,64 (s, 2H), 4,73 (t, 4H, J = 5,10 Hz), 7,85 (s, 2H , amida

NH), 8,68, 8.19, 7,98 (s, 3H, amida NH). LC- MS (encontrado 1.074,67[M + Na +], M = 1051.57 Calculado 1052.08 Da).

Ejemplo 65- Síntesis de conjugado C6- Amida- AEM- 2 (B1)

En este ejemplo se describe un método para la preparación de una insulina conjugada por B1 a partir del intermedio Z9A del Ejemplo 64. El compuesto Z9A se conjugó con insulina de la siguiente manera. Insulina- NH2- Bl- BOC2 (Al, B29) sintetizada según el ejemplo 8 (0.167 g) se disolvió en DMSO seco (3 ml) a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno y se agitó durante 0.5 horas a temperatura ambiente. A esta solución se agregó trietilamina anhidro (0,013 mL) a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno. Se agregó el compuesto Z9A (0.177 g) en DMSO seco (1.5 ml) a través de la bomba de jeringa a una tasa de (4,2 uL/min) a la mezcla de insulina- trietilamina a temperatura ambiente a una tasa de agitación de 80 rpm. La conversión de la reacción se monitoreó por HPLC analítica. Después de 4 horas, otros 3 equivalentes de TEA (0,010 mL) se agregaron a la mezcla de reacción. Después de un total de 10.5 horas a temperatura ambiente, la reacción se detuvo y se colocó en un refrigerador a - 20 C durante la noche.

Al día siguiente, la mezcla de reacción se descongeló y se colocó en una pequeña columna empaquetada de esferas de intercambio iónico (esferas SP Sephadex, Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, condiciones isocráticas). La columna se centrifugó brevemente durante 4 minutos a 1000 xg para purificar el conjugado la insulina (evaluado por HPLC analítica). Las fracciones recolectadas de la columna de intercambio iónico (6 mL) se agregaron por goteo a acetona seca (30 mL) con agitación a 140 rpm durante 10 minutos. La suspensión resultante se vertió en un tubo de centrífuga de 50 ml el cual se centrifugó durante 10 minutos a 3500 x g. El sobrenadante fue retirado de los tubos, y la torta se guardó y se mantuvo al margen. El sobrenadante se agregó a otros 30 mL de acetona para obtener una segunda cosecha de precipitado (después de añadir unas gotas de HCl 5N), el cual luego se centrifugó durante 10 minutos a 3500 x g para obtener una segunda torta de centrifugación.

Las tortas combinadas se secaron al vacío durante una hora, para obtener un sólido blanco (197 mg, 92% de rendimiento) a pureza de > 98% mediante HPLC analítica. Los grupos BOC conjugados de insulina se retiraron mediante el procedimiento divulgado en el Ejemplo 12 para obtener el conjugado de insulina biológicamente activo.

El proceso descrito en este ejemplo tiene la ventaja de proporcionar un conjugado de insulina de alto rendimiento, alta pureza sin necesidad de HPLC de fase reversa.

Ejemplo 66- Síntesis de I- 17: conjugado de C6- Amida- AEM- 2 (B29)

En este ejemplo se describe un método para la preparación de insulina conjugada por B29 a partir del intermedio Z9A del Ejemplo 64. El compuesto Z9A se conjuga con la insulina de la siguiente manera. NH2- B29- BOC2 (A1, B1)- insulina sintetizada según el ejemplo 16 (0.167 g) se disuelve en DMSO seco (3 ml) a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno y se agita durante 0.5 horas a temperatura ambiente. A esta solución se agrega trietilamina anhidro (0.013 mL) a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno. El compuesto Z9A (0.177 g) en DMSO seco (1.5 ml) se agrega a través de la bomba de jeringa a una tasa de (4.2 uL/min) a la mezcla de insulina trietilamina a temperatura ambiente a una tasa de agitación de 80 rpm.
La conversión de la reacción es monitoreada mediante HPLC analítica. Después de 4 horas, otros 3 equivalentes de TEA (0.010 mL) se agregan a la mezcla de reacción. Después de un total de 10.5 horas a temperatura ambiente, la reacción se detiene y se coloca en un congelador a - 20 C durante la noche.

Al día siguiente, la mezcla de reacción se descongela y se coloca en una pequeña columna empaquetada de esferas de intercambio iónico (esferas SP Sephadex, Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, condiciones isocrática). La columna se centrifuga brevemente durante 4 minutos a 1000 xg para purificar el conjugado de insulina (evaluada por HPLC analítica). Las fracciones recolectadas de la columna de intercambio iónico (6 mL) se agregan por goteo a acetona seca (30 mL) con agitación a 140 rpm durante 10 minutos. La suspensión resultante se vierte en un tubo de centrífuga de 50 ml que se centrifuga durante 10 minutos a 3500 x g. El sobrenadante claro se elimina de los tubos, y la torta se guardó y se mantuvo al margen. El sobrenadante se agrega a otros 30 mL de acetona para obtener una segunda cosecha de precipitado (después de añadir unas gotas de HCl 5N), el cual luego se centrifuga durante 10 minutos a 3500 xg para obtener una segunda torta de centrifugación.

Las tortas combinadas se secan al vacío durante una hora, para obtener un sólido blanco. Los grupos BOC de conjugado de insulina se retiran mediante el procedimiento establecido en el Ejemplo 12 para obtener el conjugado de insulina biológicamente activo.

Ejemplo 67- Síntesis alternativa de I- 17: Conjugado C6- Amida- AEM- 2 (B29)

En este ejemplo se describe otro método para la preparación de una insulina conjugada por B29 a partir del intermedio Z9A del Ejemplo 64. Especificamente, este método alternativo implica directamente acoplar el compuesto Z9A a la insulina no protegida en el grupo épsilon amino B29. El compuesto Z9A se disolvió a 53 mm en 1.0 ml de DMSO anhidro seguido por la adición de 0.4 ml (exceso) de trietilamina (TEA). La solución se agitó rápidamente durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego el polvo de insulina humana recombinante (RHI) se disolvió de manera separada a 17.2 mM en 1 ml de 0.1 M buffer de carbonato de sodio y el pH se ajustó posteriormente a 10.8 por 1.0N hidróxido de sodio. Una vez disuelta, la solución entera del compuesto Z9A se agregó por goteo durante el transcurso de 10 minutos a la solución de insulina/ buffer de carbonato. La solución se dejó en agitación durante 15 minutos más después de la adición por goteo para asegurar la reacción completa.

Luego la solución resultante se superdiluyó l0x en una solución salina amortiguada por HEPES 20 mM pH 5.0 con NaCl 0.150 M seguido por el ajuste del pH con HC1 diluido a un pH final de 8.0. Luego la solución acuosa fue purificada primero por exclusión por tamaños con Biogel P2 (Bio- Rad Laboratories, Hercules, CA) para la separación deseada de materiales conjugados y no conjugados. La solución que pasa por el volumen vacío de la columna se concentró utilizando una membrana de ultrafiltración de 3 kDa a aproximadamente 15 ml. Esta solución se purificó aún más para obtener el producto deseado con HPLC de fase inversa preparativa en una columna SymmetryPrep Waters C18, 7 um, 19 x 150 mm. El búfer A fue agua desionizada conteniendo TFA al 0.1% y el buffer B fue acetonitrilo conteniendo TFA al 0.1%. Antes de la purificación, la columna se equilibró a 15 ml/minuto con una fase móvil 80%A/20%B utilizando un sistema Waters DeltraPrep 600. Aproximadamente 5 ml de la solución cruda se inyectó en la columna durante transcurso de 2 minutos con una tasa de 15 ml/minuto después de lo cual se empleó un gradiente lineal entre el 80% A/20 B% y 75% A/25% B durante los siguientes 5 minutos, seguido por un gradiente lineal más lento de 75%A/25%B a 62%A/38%B) durante los próximos 22 minutos. Una vez que la fracción deseada se recolectó, la solución llevada a rotavapor para eliminar acetonitrilo y se liofilizó para obtener conjugado puro cuya identidad fue verificada por LC- MS (HT Laboratories, San Diego, CA). El producto final (95% puro por HPLC) tuvo el peso molecular deseado de 6744 g/mol (LC- MS), lo que representa un total de 2.0 moléculas de AEM conjugadas por insulina, con más del 85% de las

moléculas de conjugado conjugadas en el sitio Lys- B29 (según lo determinado mediante secuenciación N- terminal).

Ejemplo 68- Conjugados I- 17 de acción prolongada

En este ejemplo, nos dispusimos a determinar la acción del tiempo y el perfil PK sensible a glucosa de formulaciones de acción prolongada de conjugados construidos a partir del compuesto Z9A del Ejemplo 64. El conjugado de este ejemplo se sintetizó según los métodos descritos en el Ejemplo 67. La siguiente formulación de acción prolongada se utilizó para este conjugado:

Componente	**Variable**	**Volumen (ml)**
Solución de conjugado I-7 a 2.7 mg/ml	Insulina sin modificar = 16,7%	1.000
solución salina amortiguada por HEPES 250 mM	Concentración de NaCl = 1.5 M	0.111
Solución de acetato de zinc	Concentración de zinc = 4,6 mg/ml	0.124
Solución de cresol en agua	3% v/v	0.159
solución de protamina pH 7.2 en solución salina amortiguada por HEPES 25 mM	Concentración de protamina = 12.5 mg/ml	alícuotas 4x0.194

Los experimentos de inyección de glucosa IP (4 g/kg) de 4 horas se realizaron mediante la administración 15 U/kg (peso corporal en gramos/1.87 = microlitros de volumen de inyección) de la formulación descrita anteriormente. Como se muestra en la Figura 44, el conjugado presenta un perfil de absorción prolongado con un aumento significativo en la concentración de insulina en suero medido después de la inyección de glucosa de 4 horas.

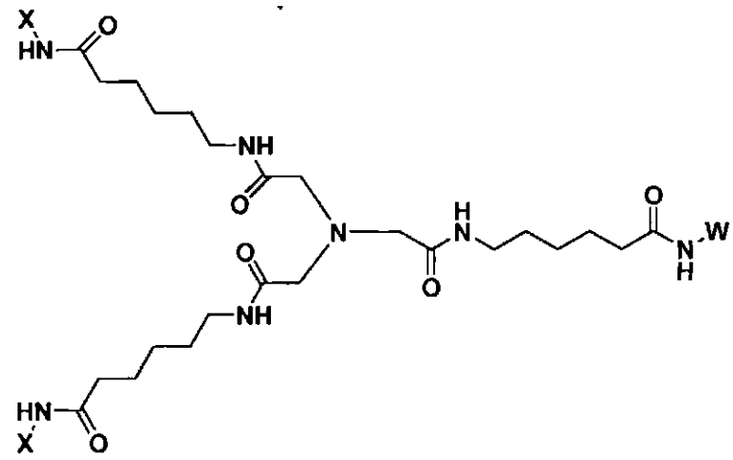
Ejemplo 69- Conjugados preparados a partir de 2- aminoetil alfa- L- fucofucopiranosida y 2 aminoetil- N- acetil- beta- D- glucosamina y la evaluación

Los datos del ejemplo 42 demuestran la capacidad de L- fucosa para inhibir la presunta ruta de lectina que conduce al perfil PK aumentado de los conjugados de ejemplo. También se sabe que la N- acetil glucosamina beta- enlazada también puede inhibir las rutas para las cuales manosa y fucosa son inhibidores (por ejemplo, ver Haurum en *Biochem. J.* 293:873- 878, 1993). En este ejemplo se describe cómo los conjugados de insulinas, como los descritos anteriormente pueden ser sintetizados utilizando los ligandos de 2- aminoetil alfa- L- fucopiranosida o 2 aminoetil- N- acetil- beta- D- glucosamina. 2- aminoetil alfa- L- fucofucopiranosida (PM = 207 g/mol) se prepara según el método de Ni en *Bioconjugate Chem.* 14:232- 238, 2003. 2- aminoetil N- acetil- beta- D- glucosamina (PM = 264 g/mol) se sintetiza según el método de Cai en *Organic Letters* 7:4021- 4024, 2005. Cualquiera de estos ligandos puede ser fácilmente sustituido por los ligandos de azúcar amino- funcionalizados en cualquiera de los métodos de síntesis de conjugados descritos anteriormente en los Ejemplos 11 a 13, 15, 17- 27, y 29- 31.

El PK de los conjugados resultantes se prueba *in vivo* para aumentos inducidos por a-MM, L- fucosa, o glucosa en perfiles PK/PD después de la inyección subcutánea en ratas según los métodos descritos en el Ejemplo 42. Los conjugados pueden formularse también como formulaciones de entrega sostenida según los métodos en los ejemplos 50- 55 y posteriormente evaluados por su farmacocinética prolongada y sensible a glucosa según el protocolo de inyección de glucosa IP de 4 horas descrito en estos ejemplos de muestra. Métodos alternativos de sostener la entrega de estos conjugados también pueden emplearse tales como los descritos en los Ejemplos 61 a 63.

Ejemplo 70- Conjugado de ejemplo de la fórmula (VIb- 3)

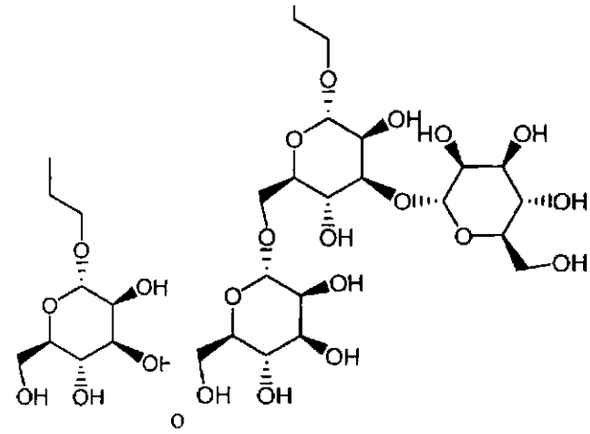
En ciertas realizaciones la presente divulgación proporciona un conjugado de la fórmula (VIb- 3):



en donde:

W es una molécula de insulina, y

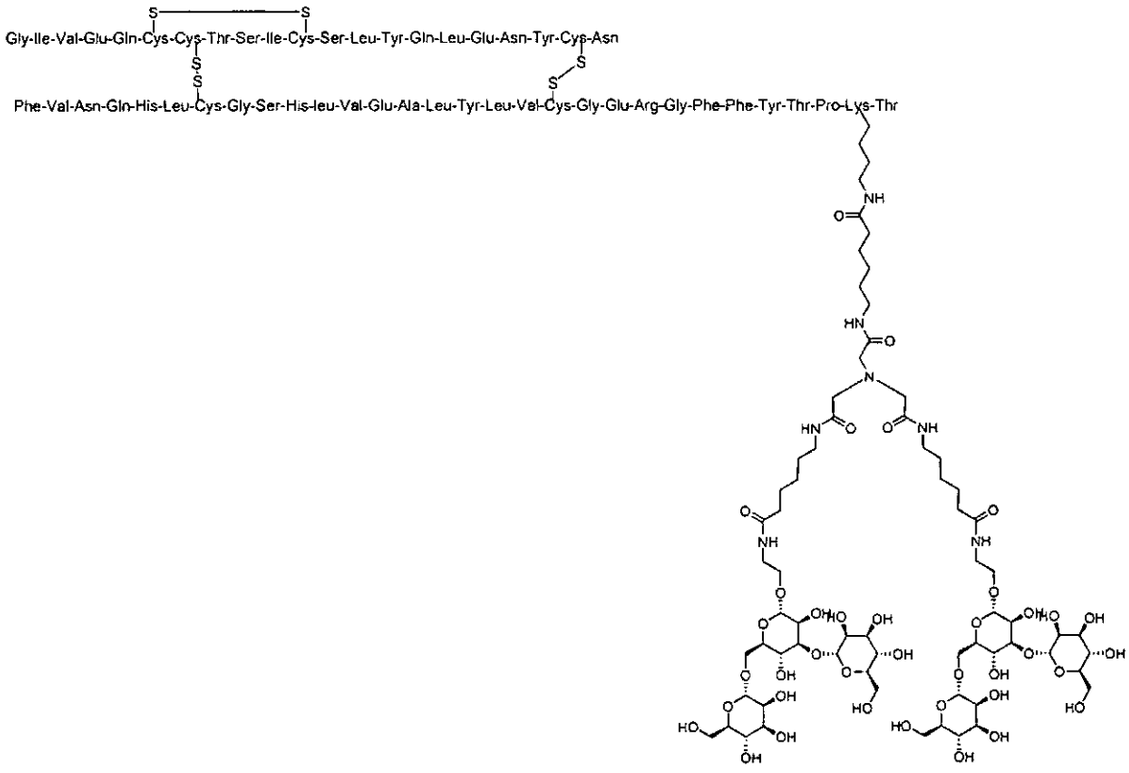
cada ocurrencia de X es



En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se selecciona del grupo que consta de insulina humana, insulina porcina e insulina bovina. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina es insulina glargina o insulina detemir. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina incluye tres puentes disulfuro.

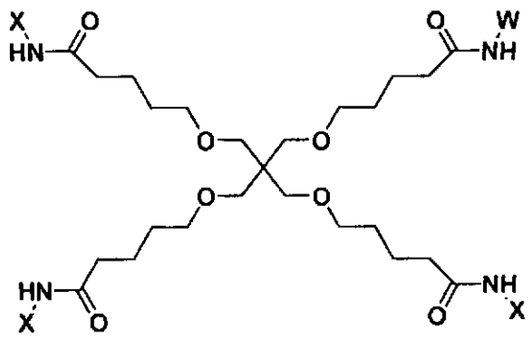
Ejemplo 71 – Conjugado I- 6 de ejemplo

En ciertas realizaciones la presente divulgación proporciona el conjugado I- 6



Ejemplo 72- Conjugado de ejemplo de la fórmula (IVc- 2)

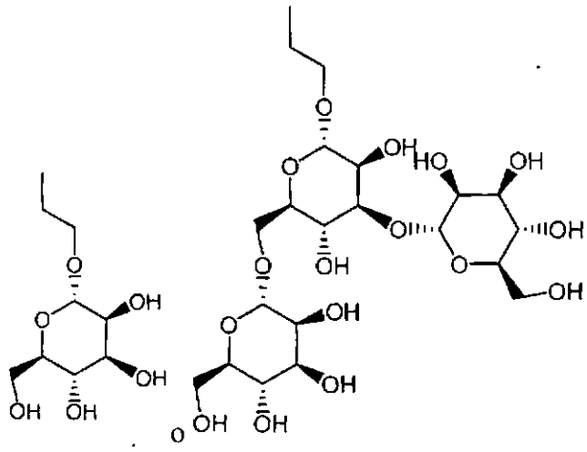
En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona un conjugado de la fórmula (IVc- 2):



en donde:

W es una molécula de insulina;

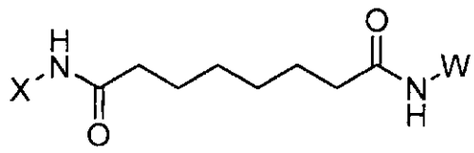
y cada ocurrencia de X es



En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se selecciona del grupo que consta de insulina humana, insulina porcina e insulina bovina. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina es insulina glargina o insulina detemir. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina incluye tres puentes de disulfuro.

Ejemplo 73- Conjugado de ejemplo de la fórmula (VId- 1)

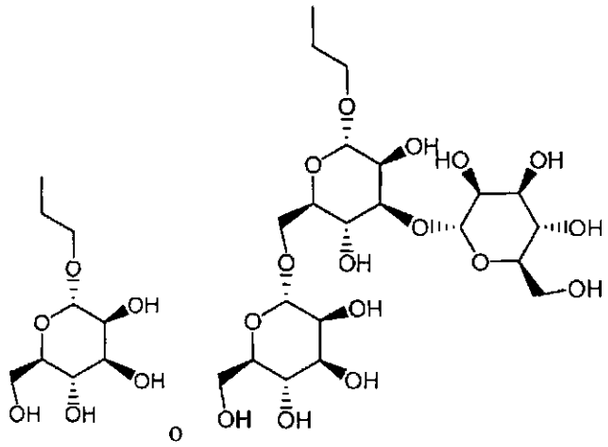
En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona un conjugado de la fórmula (VId- 1):



en donde:

W es una molécula de insulina, y

- X es



o

En ciertas realizaciones, la molécula de insulina se selecciona del grupo que consta de insulina humana, insulina porcina e insulina bovina. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina es insulina glargina o insulina detemir. En ciertas realizaciones, la molécula de insulina incluye tres puentes de disulfuro.

Ejemplo 74- formulaciones de ejemplo

En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona formulaciones de entrega sostenida que comprenden un conjugado, en donde la formulación comprende protamina y zinc. Se debe entender que la presente divulgación abarca formulaciones de entrega sostenida con cualquiera de los conjugados descritos en este documento (por ejemplo, sin limitación, cualquiera de los conjugados de las figuras 45, 49, 55, 60, 61 o 62).

En ciertas realizaciones, la formulación incluye de 1 a 5 mg de protamina/mg de conjugado, y entre 0.1 y 0,25 mg aproximadamente de zinc/mg de conjugado.

En ciertas realizaciones, la formulación incluye protamina y zinc en una relación (peso/peso) en el rango de 40:1 a 10:1 aproximadamente.

En ciertas realizaciones, la formulación comprende además una cantidad de la molécula de la insulina no conjugada. En ciertas realizaciones, la formulación comprende una proporción molar de la molécula de insulina conjugada a la molécula de insulina no conjugada en el rango de 25:1 a 2:1 aproximadamente.

En ciertas realizaciones, la formulación comprende además un conservante antimicrobiano. En ciertas realizaciones, el conservante antimicrobiano es m- cresol. En ciertas realizaciones, la formulación comprende entre 0.15 y 0.35% v/v de m- cresol.

En ciertas realizaciones, la formulación comprende además un agente isotónico. En ciertas realizaciones, el agente isotónico es glicerol. En ciertas realizaciones, el agente isotónico es NaCl. En ciertas realizaciones, la formulación comprende entre 0.1 y 0.2 M NaCl.

En ciertas realizaciones, la formulación comprende:

protamina y zinc en una relación (peso/peso) en el rango entre 40:1 y 10:1 aproximadamente;

una proporción molar de la molécula de insulina conjugada a la molécula de insulina no conjugada en el rango entre 25:1 y 2:1 aproximadamente;

entre 0.15 y 0,35% v/v aproximadamente de m- cresol, y

glicerol o entre 0.1 y 0,2 M de NaCl.

En ciertas realizaciones, la formulación comprende: aproximadamente 3.6 mg de protamina/mg de conjugado;

y aproximadamente 0.2 mg de zinc/mg de conjugado.

En ciertas realizaciones, la formulación comprende: aproximadamente 3.6 mg de protamina/mg de conjugado, aproximadamente 0.2 mg de zinc/mg de conjugado, y una relación molar de la molécula de insulina conjugada a la molécula de insulina no conjugada de aproximadamente 5:1.

En ciertas realizaciones, la formulación comprende:

aproximadamente 3.6 mg de protamina/mg de conjugado;

aproximadamente 0.2 mg de zinc/mg de conjugado;

una relación molar de la molécula de insulina conjugada a una molécula de insulina no conjugada de aproximadamente 5:1, y

0.2% v/v de m- cresol.

En ciertas realizaciones, la formulación comprende:

aproximadamente 3.6 mg de protamina/mg conjugado;

0.2 mg de zinc/mg de conjugado;

una relación molar de la molécula de insulina conjugada a una molécula de insulina no conjugada de aproximadamente 5:1;

aproximadamente 0.2%v/v de m- cresol, y

el glicerol o aproximadamente 0.15 M de NaCl.

Ejemplo 75- Conjugación de insulina con ésteres activados multivalentes en solvente orgánico (fármaco agregado primero) para proporcionar conjugados de insulina A1-sustituidos - procedimiento general

Paso 1

La insulina se disuelve en una mezcla 66:37 vol:vol de buffer de carbonato de sodio 100 mM (pH 11) y acetonitrilo a una concentración de 14.7 mm. Por otra parte, un éster activado por un grupo protector monofuncional (por ejemplo, BOC- NHS) se disuelve a 467 mM en acetonitrilo. Una vez que la insulina se disuelve, pequeñas alícuotas del éster activado por un grupo protector monofuncional (por ejemplo, BOC- NHS) se agregan a la solución de insulina. El pH se monitorea durante todo el proceso y se mantiene entre 10.2 a 11.0 a través de la adición de hidróxido de sodio 0.1 M. La reacción es monitoreada por HPLC de fase inversa. Alícuotas del éster activado por el grupo protector monofuncional se agregan hasta que el cromatograma de HPLC muestra que toda la insulina no modificada ha reaccionado y que una parte sustancial de la mezcla de reacción se ha convertido en insulina protegida por B29. Típicamente el grupo protector será de naturaleza más hidrofóbica y, una vez que reacciona sobre insulina, eluirá a un tiempo de retención HPLC que es mayor que la insulina no modificada.

Paso 2

Por otra parte, una estructura que contiene ésteres activados N- terminales se disuelve a 174 mM en 1.267 ml de DMSO anhidro seguido por la adición de 100 ul (exceso) de trietilamina (TEA). La solución se agita rápidamente durante 10 minutos a temperatura ambiente. En otro frasco, una solución 370 mM de ligando se prepara en un volumen apropiado de DMSO seco. Una vez disuelta, se agrega suficiente solución para proporcionar un número de equivalentes reactivos igual a tres veces el número grupos éster activados iniciales, N, menos uno. Por ejemplo, si hay N = 3 grupos éster activados iniciales por estructura, entonces se agrega (3x (3-1)x60mM/370 mm)= 0.973 ml de solución de ligando. Si hay N = 4 grupos éster activados iniciales por estructura, entonces se agrega (3x (4- 1)x60mM/370 mM)= 10.46 ml de solución de ligando, y así sucesivamente. Después de agregar la solución de ligando, la solución se agita durante una hora más a temperatura ambiente para asegurar la reacción completa.

Paso 3

Una vez que la insulina reaccionó suficientemente con el grupo protector como se describe en el paso 1, y después de que ocurrió suficiente reacción entre la estructura y el ligando

en el paso 2, la solución estructura- ligando del paso 2 se agrega por goteo a la solución de insulina en alícuotas. La reacción resultante es monitoreada por HPLC. Se agregan alícuotas hasta que la insulina B29- protegida reacciona completamente para proporcionar el conjugado de insulina deseado de estructura- A1/ligando, B- 29 protegido. Dado que el ligando- estructura a menudo es más hidrofílico que la insulina, la apariencia del producto deseado se indica mediante un cambio distinto a tiempos de retención HPLC menores en comparación con insulina B29 (desde el paso 1). Una vez que el nivel deseado de la reacción se ha logrado, la solución de reacción se superdiluye 10x en una solución salina amortiguada por HEPES 20 mM pH 5.0 con NaCl 0.150 M seguido por el ajuste del pH con HCl diluido a un pH final de 8.0. La solución acuosa es purificada primero por exclusión por tamaños utilizando una fase sólida adecuada para la separación deseada de materiales conjugados y no conjugados. La solución que pasa por el volumen vacío de la columna se concentra utilizando una membrana de ultrafiltración de tamaño adecuado a aproximadamente 10 ml. Esta solución se purifica para obtener el producto deseado con HPLC de fase inversa preparativa en un Columna Waters C8, 7 um, 19 x 150 mm . El Buffer A es agua desionizada conteniendo TFA al 0.1% y el buffer B es acetonitrilo conteniendo TFA al 0.1%. Antes de la purificación, la columna se equilibra a 15 ml/minuto con una fase móvil 80%A/20%B utilizando un sistema Waters DeltraPrep 600. Aproximadamente 5 ml de la solución cruda se inyectaron en la columna durante el transcurso
2 minutos a una tasa de 15 ml/minuto después de lo cual se emplea un gradiente lineal entre el 80% A/20 B% y 75% A/25% B durante los siguientes 5 minutos, seguido por un gradiente lineal más lento de 75% A/25% B a 62%A/38%B durante los próximos 22 minutos. El tiempo de retención del pico deseado variará en función de la insulina, la estructura, y ligando utilizados. Una vez recolectada, la solución se sometió a rotoevaporación para elimitar acetonitrilo y se liofiliza para obtener conjugado de insulina mono- protegido puro.

Paso 4

En todos los casos el grupo protector se retira del conjugado de insulina. En los casos en que se utilizó un grupo protector BOC en el paso 1, los grupos BOC se retiran mediante la disolución del polvo liofilizado obtenido según el Paso 3 en el 90% TFA/10% anisol durante una hora a 4 ° C seguido por superdilución 10x en buffer HEPES 25 mM pH 8.2 conteniendo NaCl 0.150M. (Si un grupo protector diferente de BOC está presente en el fármaco portador de amina,

entonces las condiciones de desprotección adecuadas se emplean en lugar de TFA/anisol. Una lista de agentes de protección y condiciones de desprotección se puede encontrar en *Protecting Groups in Organic Synthesis,* T.W. Greene y Wuts PGM, 3 [a] edición, John Wiley & Sons, 1999, tal como se describe en la sección Definiciones.) El pH se ajustó entre 7.0 y 8.0 utilizando una solución de NaOH después de lo cual el material se pasa a través de una columna P2 Biogel para eliminar anisol, BOC y otros subproductos de desprotección de bajo peso molecular , así como también cualquier otra sal contaminante. La solución de conjugado desprotegida, purificada, acuosa luego se concentró utilizando membranas Amicon 3K (Millipore, Billerica, MA) a aproximadamente 66 U de insulina/ml (con base en mediciones A280) y se almacenó a 4 ° C hasta ser necesitada. La identidad del conjugado final es verificada por LC- MS (HT Laboratories, San Diego, CA). El sitio de conjugación A1 es confirmado por la secuenciación N-terminal (Western Analytical, St. Louis, MO), que revela > 95% del extremo de cadena Phe- Bl presente y <5% del extremo de cadena Gly^{A1} presente debido a la sustitución de Gly^{A1} con la estructura que contiene ligandos.

Un experto en estado de la técnica apreciará que otros fármacos funcionalizados por aminas pueden ser conjugados con estructuras que contienen ligandos utilizando procedimientos análogos a los que se describen en el Ejemplo 75. Un experto en el estado de la técnica también apreciará que el Ejemplo 75 es relevante no sólo a la insulina tipo silvestre, sino también a los mutantes de insulina tal como se describe en la presente.

Los siguientes conjugados de insulina se prepararon según el procedimiento en el ejemplo 75 utilizando BOC- NHS como el reactivo protector.

Conjugado	Estructura	Peso Mol estructura	Ligando	Peso molecular AE-azúcar	Pureza (HPLC)	Peso molecular (LC-MS)	Azúcar/insulina
I- 13: TSAT- C6- AEM- 2 (A1)	TSAT-C6	822	AEM	223	97%	6730	2.0
I- 12: TSAT- C6- AETM- 2 (A1)	TSAT-C6	822	AETM	547	97%	7378	2.0
I- 15: TSPE- AEM- 3 (A1)	TSPE	813	AEM	223	98%	6829	3.0
I- 14: TSPE- AETM- 3 (A1)	TSPE	813	AETM	547	94%	7802	3.0

Los siguientes conjugados de insulina pueden prepararse según el procedimiento del ejemplo 75. En algunas realizaciones, los conjugados de insulina se preparan utilizando BOC-NHS como el reactivo protector.

Conjugado	Estructura	Peso Mol estructura	Ligando	Peso molecular AE-azúcar	Peso molecular (LC- MS)(esperado)	Azúcar/insulina (esperado)
DSS- AEM- 1 (Al)	DSS	368	AEM	223	6169	1.0
DSS- AEBM- 1 (Al)	DSS	368	AEBM	385	6331	1.0
DSS- AETM- 1 (Al)	DSS	368	AETM	547	6493	1.0
TSAT- C6- AEBM- 2 (Al)	TSAT-C6	822	AEBM	385	7054	2.0
TSPE- AEBM- 3 (Al)	TSPE	813	AEBM	385	7314	3.0

Ejemplo 76- Conjugación de insulina con ésteres activados multivalentes en solvente orgánico (fármaco agregado primero) para proporcionar conjugados de insulina A1,B29 sustituidos

Procedimiento general

Paso 1

Una estructura que contiene ésteres activados N- terminales se disuelve en 147 mM de 2.5 ml de DMSO anhidro seguido por la adición de 1.0 mL (exceso) de trietilamina (TEA). La solución se agitó rápidamente durante 10 minutos a temperatura ambiente. En otro frasco, una solución 272 mM de ligando se prepara en un volumen apropiado de DMSO seco. Una vez disuelto, se agrega suficiente solución para proporcionar un número de equivalentes reactivos igual a tres veces el número inicial de grupos éster activados, N, menos uno. Por ejemplo, si hay N = 3 grupos éster activados iniciales por estructura, entonces se agregan (3x (3- l)x60mM/370 mm)= 0.973 ml de solución de ligando. Si hay N = 4 grupos éster activados iniciales por estructura, entonces se agrega (3x (4- l)x60mM/370 mM)= 1.46 ml de solución de ligando, y así sucesivamente. Después de agregar la solución de ligando, la solución se agita durante una hora más a temperatura ambiente para asegurar la reacción completa.

Paso 2

La insulina se disuelve en 1.5 ml de buffer de carbonato de sodio 100 mM (pH 11) a una concentración de 17.2 mm. El pH de la solución se mantiene a ~ 11 mediante la adición de NaOH 0.1 M, según sea necesario. Una vez que la insulina se disuelve, se agregan pequeñas alícuotas de la solución de estructura- ligando a la solución de insulina. El pH se monitorea a través de todo el proceso y se mantiene entre 10.2- 11.0 a través de la adición de hidróxido de sodio 0.1 M. La reacción es monitoreada mediante HPLC de fase inversa. Alícuotas de la solución de estructura- ligando se agregan hasta que el cromatograma de HPLC muestra que sustancialmente toda la insulina no modificada ha reaccionado y que una parte sustancial de la mezcla de reacción se ha convertido en una pequeña porción de conjugado mono- reaccionado de insulina/estructura/ligando y el producto mayoritario es conjugado di- reaccionado de insulina/estructura/ligando. Típicamente, el constructo estructura- ligando será más hidrofílico que la insulina no modificada, haciendo que los productos farmacológicos portadores de aminas mono y di- reaccionados eluyan a tiempos de retención HPLC más cortos que el de la insulina sin modificar. Del mismo modo, el pico HPLC del producto deseado, el conjugado de insulina di- sustituido, aparecerá a un tiempo de retención más corto que aquel del conjugado de insulina mono- sustituido.

Paso 3

Una vez que la insulina ha reaccionado suficientemente con el ligando de estructura como se describe en el paso 2, la solución se seuperdiluye 10x en una solución salina amortiguada por HEPES 20 mM pH 5.0 con NaCl 0.150 M seguido por el ajuste del pH con HCl diluido a un pH final de 8.0 . La solución acuosa se purifica primero por exclusión por tamaños con una fase sólida adecuada para la separación deseada de materiales conjugados y no conjugados. La solución que pasa por el volumen vacío de la columna se concentra utilizando una membrana de ultrafiltración de tamaño adecuado a aproximadamente 10 ml. Esta solución se purifica para obtener el producto deseado con HPLC de fase inversa preparativa en un Columna Waters C8, 7 um, 19 x 150 mm . El Buffer A es agua desionizada conteniendo TFA al 0.1% y el buffer B es acetonitrilo conteniendo TFA al 0.1%. Antes de la purificación, la columna se equilibró a 15 ml/minuto con una fase móvil 80%A/20%B utilizando un Sistema Waters DeltraPrep 600. Aproximadamente 5 ml de la solución cruda se inyectan en la columna durante 2 minutos a una tasa de 15 ml/minuto después de lo cual se emplea un gradiente lineal de 80%A/20%B a 75%A/25%B durante los siguientes 5 minutos, seguido por un gradiente lineal más lento de 75% A/25% B a 62%A/38%B durante los próximos 22 minutos. El tiempo de retención del pico deseado variará en función de la insulina, la estructura, y ligando utilizados. Una vez recolectada, la solución se sometió a rotoevaporación para elimitar acetonitrilo y se liofiliza para obtener conjugado puro. La identidad del conjugado final se verifica mediante LC-MS (HT Laboratories, San Diego, CA). Los sitios de conjugación A1, B29 se confirman por secuenciación N- terminal (Western Analytical, St. Louis, MO), lo cual revela > 95% del extremo de cadena Phe- B1 presente y <5% del extremo de cadena Gly^{A1} presente debido a la sustitución de Gly^{A1} con la estructura que contiene ligandos.

Un experto en estado de la técnica apreciará que otros fármacos funcionalizados por aminas pueden ser conjugados con estructuras que contienen ligandos utilizando procedimientos análogos a los que se describen en el Ejemplo 76. Un experto en la técnica también apreciará que el Ejemplo 76 es relevante no sólo a la insulina tipo silvestre, sino también a los mutantes de insulina como se describe en la presente.

Los siguientes conjugados de insulina se prepararon según el procedimiento en el ejemplo 76.

Conjugado	Estructura	Peso Mol estructura	Ligando	Peso molecular AE-azúcar	Pureza (HPLC)	PM (LC-MS)	Azúcar/insulina
II- 4: DSS- Di- sub- AEM- 1 (Al, B29)	DSS	368	AEM	223	92%	6531	2.0
II- 3: DSS- Di- sub- AETM- 1 (Al, B29)	DSS	368	AETM	547	94%	7179	2.0
II- l: TSAT- C6- Di- sub- AEM- 2 (Al, B29)	TSAT- C6	822	AEM	223	97%	7653	4.0
II- 2: TSAT- C6- Di- sub- AETM- 2 (Al, B29)	TSAT- C6	822	AETM	547	97%	8949	4.0

Los siguientes conjugados de insulina pueden prepararse según el procedimiento del ejemplo 76.

Conjugado	Estructura	Peso Mol estructura	Ligando	Peso molecular AE- azúcar	Peso molecular (LC- MS)	Azúcar/insulina
DSS- Di- sub- AEBM- 1 (Al, B29)	DSS	368	AEBM	385	6855	2.0
TSAT- C6- Di- sub- AEBM- 2 (Al, B29)	TSAT- C6	822	AEBM	385	8301	4.0
TSPE- Di- sub- AEM- 3 (Al, B29)	TSPE	813	AEM	223	7852	6.0
TSPE- Di- sub- AEBM- 3 (Al, B29)	TSPE	813	AEBM	385	8824	6.0
TSPE- Di- sub- AETM- 3 (Al, B29)	TSPE	813	AETM	547	9796	6.0

Ejemplo 77- Conjugación de insulina con ésteres activados multivalentes en solvente orgánico (fármaco agregado primero) para proporcionar conjugados de insulina A1, B1-sustituidos

Paso 1

Una estructura conteniendo ésteres activados N- terminales se disuelve a 147 mM en 2.5 ml de DMSO anhidro seguido por la adición de 1.0 mL (exceso) de trietilamina (TEA). La solución se agita rápidamente durante 10 minutos a temperatura ambiente. En otro frasco, una solución 272 mM de ligando se prepara en un volumen apropiado de DMSO seco. Una vez disuelta, se agrega suficiente solución para proporcionar un número de equivalentes reactivos igual a tres veces el número inicial de grupos éster activados, N, menos uno. Por ejemplo, si hay N = 3 grupos éster activados iniciales por estructura, entonces se agrega (3x (3- 1)x60mM/370 mm)= 0,973 ml de solución de ligando. Si hay N = 4 grupos éster activados iniciales por la estructura, entonces se agrega (3x (4- 1)x60mM/370 mM)= 1.46 ml de solución de ligando, y así sucesivamente. Después de agregar la solución de ligando, la solución se agita durante una hora más a temperatura ambiente para asegurar la reacción completa.

Paso 2

Una insulina que contiene tres grupos amina reactivos cada uno con un pKa distinguible (por ejemplo, en el caso de insulina tipo silvestre, pKa Gly^{A1} = 8.0, Phe^{B1} = 6.7, $Lyss^{B29}$ = 11,2;.. Ver Mei, Pharm Res 16:1680- 1686, 1999) que ha sido previamente mono- protegida en el grupo amina pKa mayor (ej.,, LysB29) con un éster activado por el grupo protector monofuncional (ej., BOC- NHS) se disuelve en 1.5 ml de DMSO a una concentración de 17.2 mM . Una vez que la B29- BOC- insulinase disuelve, se agregan pequeñas alícuotas de la solución estructura- ligando a la solución de B29- BOC- insulina. La reacción es monitoreada por HPLC de fase inversa. Se agregan alícuotas de la solución estructura- ligando hasta que el cromatograma de HPLC muestra que prácticamente toda la B29- BOC- insulina ha reaccionado y que una parte sustancial de la mezcla de reacción se ha convertido en una pequeña porción de conjugado mono- reaccionado de B29- BOC- insulina/estructura/ligando y el producto mayoritario es conjugado di- reaccionado de B29- BOC- insulina/estructura/ligando. Típicamente, el constructo estructura - ligando será más hidrofílico que la B29- BOC- insulina, haciendo que los conjugados mono- conjugados y di-

conjugados de B29- BOC- insulina eluyan a tiempos de retención HPLC menores que el de la B29- BOC- insulina sin modificaar. Del mismo modo, el pico HPLC para el producto deseado, el conjugado disustituido de B29- BOC- insulina, aparecerá a un tiempo de retención más corto que aquel del conjugado mono- sustituido de B29- BOC- insulina.

Paso 3

Una vez que la B29- BOC- insulina ha reaccionado suficientemente con la estructura que contiene ligandos como se describe en el paso 2, la solución se se superdiluye 10x en una solución salina amortiguada con HEPES 20 mM pH 5.0 con NaCl 0.150 M seguido por el ajuste del pH con HCl diluido a un pH final de 8.0. La solución acuosa se purifica primero por exclusión por tamaños con una fase sólida adecuada para la separación deseada de materiales conjugados y no conjugados. La solución que pasa por el volumen vacío de la columna se concentró utilizando una membrana de ultrafiltración de tamaño adecuado a aproximadamente 10 ml. Esta solución se purifica para obtener el producto deseado con HPLC de fase inversa preparativa en un Columna Waters C8, 7 um, 19 x 150 mm . El Buffer A es agua desionizada conteniendo TFA al 0.1% y el buffer B es acetonitrilo conteniendo TFA al 0.1%. Antes de la purificación, la columna se equilibró a 15 ml/minuto con una fase móvil 80%A/20%B utilizando un sistema Waters DeltraPrep 600. Aproximadamente 5 ml de la solución cruda se inyectaron en la columna durante 2 minutos a una tasa de 15 ml/minuto después de lo cual se emplea un gradiente lineal entre el 80% A/20 B% y 75% A/25% B durante los siguientes 5 minutos, seguido por un gradiente lineal más lento de 75% A/25 B% a 62%A/38%B durante los próximos 22 minutos. El tiempo de retención del pico deseado variará en función de la insulina, la estructura, y ligando utilizados. Una vez recolectada, la solución se sometió a rotoevaporación para elimitar acetonitrilo y se liofiliza para obtener el conjugado puro.

Paso 4

En todos los casos el grupo protector se retira del conjugado. En los casos en que se utilizó un grupo protector BOC en el paso 1, los grupos BOC se retiran mediante la disolución del polvo liofilizado obtenido según el Paso 3 en el 90%TFA/10%anisol durante una hora a 4 ° C seguido por superdilución 10x en buffer HEPES 25 mM pH 8.2 conteniendo NaCl 0.150M. (Si un grupo protector diferente de BOC está presente en el fármaco portador de amina, entonces las condiciones de desprotección adecuadas se emplean en lugar de TFA/anisol. Una lista de agentes

de protección y condiciones de desprotección se puede encontrar en *Protecting Groups in Organic Synthesis*, TW Greene y Wuts PGM, 3 ª edición, John Wiley & Sons, 1999, tal como se describe en la sección Definiciones.) El pH se ajustó entre 7.0 y 8.0 utilizando una solución de NaOH después de lo cual el material se pasa a través de una columna P2 Biogel para eliminar anisol, BOC y otros subproductos de desprotección de bajo peso molecular , así como también cualquier otra sal contaminante. La solución de conjugado desprotegida, purificada, acuosa se concentró a continuación, utilizando membranas Amicon 3K (Millipore, Billerica, MA) a aproximadamente 66 U de insulina/ml (con base en mediciones A280) y almacenados a 4 ° C hasta ser necesitada. La identidad del conjugado final se verifica por LC- MS (HT Laboratories, San Diego, CA). Los sitios de conjugación A1, B1 se confirman por secuenciación N- terminal (Western Analytical, St. Louis, MO), que revela esencialmente no extremo de cadena Phe-B1presente y no extremo de cadena Gly- Al presente debido a la sustitución en ambos extremos con la estructura conteniendo ligandos.

Un experto en estado de la técnica apreciará que otros fármacos funcionalizados por aminas pueden ser conjugados con estructuras que contienen ligandos utilizando procedimientos análogos a los que se describen en el Ejemplo 77. Un experto en la técnica también apreciará que el Ejemplo 77 es relevante no sólo a la insulina tipo silvestre, sino también a los mutantes de insulina tal como se describen en este documento.

El conjugado II- 5 se preparó según el procedimiento en el ejemplo 77 utilizando BOC-NHS como el reactivo protector.

Conjugado	**Estructura**	**Peso Mol estructura**	**Ligando**	**Peso molecular AE-azúcar**	**Pureza (HPLC)**	**Peso molecular (LC-MS)**	**Azúcar/insulina**
II- 5: TSAT- C6- Di- sub-AETM- 2 (Al, Bl)	TSAT-C6	822	AETM	547	97%	8949	4.0

Los siguientes conjugados de insulina pueden prepararse según el procedimiento del ejemplo 77.

Identidad	Estructura	Peso Mol Estructura	Ligando	Peso molecular AE- azúcar	Peso molecular (LC- MS) (Esperado)	Azúcar/insulina (esperado)
DSS- Di- sub- AEM- 1 (Al, Bl)	DSS	368	AEM	223	6531	2.0
DSS- Di- sub- AEBM- 1 (Al, Bl)	DSS	368	AEBM	385	6855	2.0
DSS- Di- sub- AETM- 1 (Al, Bl)	DSS	368	AETM	547	7179	2.0
TSAT- C6- Di- sub- AEM- 2 (Al, Bl)	TSAT- C6	822	AEM	223	7653	4.0
TSAT- C6- Di- sub- AEBM- 2 (Al, Bl)	TSAT- C6	822	AEBM	385	8301	4.0
TSAT- C6- Di- sub- AETM- 2 (Al, Bl)	TSAT- C6	822	AETM	547	8949	4.0
TSPE- Di- sub- AEM- 3 (Al, Bl)	TSPE	813	AEM	223	7852	6.0
TSPE- Di- sub- AEBM- 3 (Al, Bl)	TSPE	813	AEBM	385	8824	6.0
TSPE- Di- sub- AETM- 3 (Al, Bl)	TSPE	813	AETM	547	9796	6.0

Ejemplo 78- Conjugación de insulina con ésteres activados multivalentes en solvente orgánico (fármaco agregado primero) para proporcionar conjugados de insulina Bl, B29- sustituidos

Paso 1

Una estructura conteniendo ésteres activados N- terminales se disuelve a 147 mM de 2.5 ml de DMSO anhidro. No se agrega la base, en contraste con los ejemplos anteriores. La solución se agita rápidamente durante 10 minutos a temperatura ambiente. En otro frasco, una

solución 272 mM de ligando es preparada en un volumen apropiado de DMSO seco. Una vez disuelta, se agrega suficiente solución para proporcionar un número de equivalentes reactivos igual a tres veces el número inicial de grupos éster activados, N, menos uno. Por ejemplo, si hay N = 3 grupos éster activados iniciales por estructura, entonces se agrega (3x (3- 1)x60mM/370 mm)= 0.973 ml de solución de ligando. Si hay N = 4 grupos éster activados iniciales por estructura, entonces se agrega (3x (4- 1)x60mM/370 mM)= 1.46 ml de solución de ligando, y así sucesivamente. Después de agregar la solución de ligando, la solución se agita durante una hora más a temperatura ambiente para asegurar la reacción completa.

Paso 2

Una insulina conteniendo tres grupos amina reactivos cada uno con un pKa distinguibles (por ejemplo, en el caso de la insulina tipo silvestre, pKa Gly^{A1} = 8.0, Phe^{B1} = 6.7, $Lys^{\varepsilon B29}$ = 11.2;.. Ver Mei, Pharm Res 16:1680- 1686, 1999) que ha sido previamente mono- protegida en el grupo amina con el intermedio pKa (por ejemplo, Gly^{A1} de la insulina tipo silvestre) con éster activado por el grupo protector monofuncional (por ejemplo, BOC- NHS) se disuelve en 1.5 ml de DMSO a una concentración de 17.2 mm. (Al- BOC- insulina puede prepararse utilizando el procedimiento del Ejemplo 8, pero reaccionando con menos equivalentes del reactivo BOC con el fin de obtener una distribución de productos A1, B29- diBOC- insulina, A1- BOC- insulina, y B29,- BOC- insulina. A1- BOC- insulina puede aislarse por RP- HPLC y confirmarse por secuenciación N- terminal.) Una vez que A1- BOC- insulina se disuelve, se agregan pequeñas alícuotas de la solución de estructura- ligando a la solución A1- BOC- insulina. La reacción es monitoreada por HPLC de fase inversa. Se agregan alícuotas de la solución estructura- ligando hasta que el cromatograma de HPLC muestra que prácticamente toda la Al- BOC- insulina no modifica ha reaccionado y que una parte sustancial de la mezcla de reacción se ha convertido en una pequeña porción del conjugado mono- conjugado de Al- BOC - insulina/estructura/ligando y el producto mayoritario es conjugado di- conjugado de A1- BOC- insulina/estructura/ligando. Típicamente, el constructo estructura- ligando será más hidrofílico que la A1- BOC- insulina, haciendo que los conjugados mono y di- sustituidos de A1- BOC- insulina eluyan a tiempos de retención HPLC menores que el de la A1- BOC- insulina no modificada. Igualmente, el pico HPLC del producto deseado, el A1- BOC- insulina- conjugado di- sustituido, aparecerá en un tiempo de retención más corto que el de A1- BOC- insulina- conjugado monosustituido.

Paso 3

Una vez que la A1- BOC- insulina ha reaccionado suficientemente con ligando de estructura como se describió en el paso 2, la solución se superdiluye 10x en una solución salina amortiguada por HEPES 20 mM pH 5.0 con NaCl 0.150 M seguido por el ajuste del pH con HCl diluido a un pH final de 8.0. La solución acuosa se purifica primero por exclusión por tamaños con una fase sólida adecuada para la separación deseada de materiales conjugados y no conjugados. La solución que pasa por el volumen vacío de la columna se concentra utilizando una membrana de ultrafiltración de tamaño adecuado a aproximadamente 10 ml. Esta solución se purifica para obtener el producto deseado con HPLC de fase inversa preparativa en una columna Waters C8, 7 um, 19 x 150 mm . El Buffer A es agua desionizada conteniendo TFA al 0.1% y el buffer B es acetonitrilo conteniendo TFA al 0.1%. Antes de la purificación, la columna se equilibra a 15 ml/minuto con una fase móvil 80%A/20%B Sistema Waters DeltraPrep 600. Aproximadamente 5 ml de la solución cruda se inyectan en la columna durante 2 minutos a una tasa de 15 ml/minuto después de lo cual se emplea un gradiente lineal entre el 80% A/20 B% y 75% A/25% B durante los siguientes 5 minutos, seguido por un gradiente lineal más lento de 75% A/25 B% a 62%A/38%B durante los próximos 22 minutos. El tiempo de retención del pico deseado variará dependiendo del fármaco, la estructura, y el ligando utilizado. Una vez recolectada, la solución se sometió a rotoevaporación para elimitar acetonitrilo y se liofiliza para obtener conjugado puro.

Paso 4

En todos los casos el grupo protector se retira del conjugado. En los casos en que se utilizó un grupo protector BOC en el paso 1, los grupos BOC se retiran mediante la disolución del polvo liofilizado obtenido según el Paso 3 en el 90%TFA/10%anisol durante una hora a 4 ° C. Si un grupo protector diferente de BOC está presente en el fármaco portador de amina, entonces se emplean condiciones de desprotección adecuadas en lugar de TFA/anisol. Una lista de agentes de protección y condiciones de desprotección se puede encontrar en *Protecting Groups in Organic Synthesis*, TW Greene y PGM Wuts, 3 ª edición, John Wiley & Sons, 1999, tal como se describe en la sección Definiciones. El paso de desprotección es seguido por superdilución 10x en buffer HEPES 25 mM pH 8.2 conteniendo NaCl 0.150M. El pH se ajusta entre 7.0 y 8.0 utilizando una solución de NaOH después de lo cual el material se pasa a través de una columna P2 Biogel para eliminar anisol, BOC y otros subproductos de desprotección de

bajo peso molecular , así como también cualquier otra sal contaminante. Luego la solución de conjugado desprotegida, purificada, acuosa se concentra utilizando membranas Amicon 3K (Millipore, Billerica, MA) a aproximadamente 66 U de insulina/ml (con base en mediciones A280) y se almacena a 4 ° C hasta ser necesitada. La identidad del conjugado final se verifica por LC- MS (HT Laboratories, San Diego, CA). El sitio de conjugación B1 se confirma por secuenciación N- terminal (Western Analytical, St. Louis, MO), que revela > 95% del extremo de cadena Gly- A1 presente y <5% del extremo de cadena Phe- B1 presente debido a la sustitución de Phe- Bl con la estructura que contiene ligandos.

Un experto en estado de la técnica apreciará que otros fármacos funcionalizados por aminas pueden ser conjugados con estructuras que contienen ligandos utilizando procedimientos análogos a los que se describen en el Ejemplo 78. Un experto en la técnica también apreciará que el Ejemplo 78 es relevante no sólo a la insulina tipo silvestre, sino también a los mutantes de insulina tal como se describe en la presente.

Los siguientes conjugados de insulina pueden prepararse según el procedimiento del ejemplo 78.

Conjugado	Estructura	Peso Mol Estructura	Ligando	PM de A1 - azúcar	Peso molecular (LC-MS)(esperado)	Azúcar/insulina (esperado)
II- 7: DSS- Di- sub- AETM- 1 (Bl, B29)	DSS	368	AETM	547	7179	2.0
II- 6: TSAT- C6- Di- sub- AETM- 2 (Bl, B29)	TSAT-C6	822	AETM	547	8949	4.0
DSS- Di- sub- AEM- 1 (Bl, B29)	DSS	368	AEM	223	6531	2.0
DSS- Di- sub- AEBM- 1 (Bl, B29)	DSS	368	AEBM	385	6855	2.0
TSAT- C6- Di- sub- AEM- 2 (Bl, B29)	TSAT-C6	822	AEM	223	7653	4.0
TSAT- C6- Di- sub- AEBM- 2 (Bl, B29)	TSAT-C6	822	AEBM	385	8301	4.0

TSPE- Di- sub- AEM- 3 (Bl, B29)	TSPE	813	AEM	223	7852	6.0
TSPE- Di- sub- AEBM- 3 (Bl, B29)	TSPE	813	AEBM	385	8824	6.0
TSPE- Di- sub- AETM- 3 (Bl, B29)	TSPE	813	AETM	547	9796	6.0

Ejemplo 79- Comparación in vivo de vida media/tasa de eliminación

Con el fin de determinar la tasa a la que se eliminó el conjugado I- 6 desde el suero in vivo en la presencia o ausencia de azúcares inhibidores como la glucosa o a- MM, se realizó el siguiente experimento. En cada caso el conjugado soluble (o RHI como control) se administró a 0.4 mg de conjugado/kg de peso corporal en la vena yugular ratas macho Sprague- Dawley (Taconic, JV/JV, 350- 400g, n = 3) mediante cánula.

Para determinar la tasa de eliminación en presencia de niveles elevados de glucosa, una hora antes del inicio del experimento se conecta una cánula a una bomba de infusión de jeringa conteniendo una solución estéril de glucosa al 50% peso/volumen. La tasa de infusión de la bomba se ajustó por el investigador para asegurar que los niveles de glucosa en la sangre en el animal se mantuvieran por encima de 300 mg/dL en todo momento durante el experimento. La glucosa en sangre se midió utilizando tiras de prueba disponibles en el mercado (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). En un experimento típico, se encontró que la tasa de bomba de infusión necesaria para mantener a los animales por encima de 300 mg/dl por lo general fue mayor de 85 uL/min. Una muestra de sangre fue tomada en t = 0 min, después de lo cual una solución de conjugado estéril o insulina de control se inyectó por vía intravenosa a través de la segunda cánula, seguido inmediatamente por una solución permeabilizadora de heparina- solución salina para asegurarse de que toda la dosis de conjugado se administró al animal. Después de una descarga adicional de la línea de la cánula con la heparina- solución salina, la segunda cánula se utilizó para recolectar muestras de sangre en t = 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos después de la dosis.

Para determinar la tasa de eliminación en presencia de a- MM, una hora antes del inicio del experimento una cánula se conectó a una bomba de infusión de jeringa conteniendo una solución estéril de a- MM al 25% peso/volumen. La tasa de infusión de la bomba se ajustó por el

experimentador, pero por lo general se fijó en 85 uL/min. Una muestra de sangre fue tomada en t = 0 min, después de lo cual una solución de conjugado estéril o insulina de control se inyectó por vía intravenosa a través de la segunda cánula, seguido inmediatamente por una solución permeabilizadora de la heparina- solución salina para asegurarse de que toda la dosis de conjugado se administró al animal. Después de una descarga adicional de la línea de la cánula con la heparina- solución salina, la segunda cánula se utilizó para recolectar muestras de sangre en t = 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos después de la dosis.

Durante el experimento, la glucosa en sangre se midió utilizando tiras de prueba disponibles en el mercado (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). La sangre de cada punto de tiempo se centrifugó a 4 ° C para recolectar el suero, y las concentraciones de insulina en suero o conjugado en suero se midieron posteriormente con un kit ELISA disponible comercialmente (Iso- insulina ELISA, Mercodia, Uppsala, Suecia). Los datos de concentración sérica de insulina o conjugado vs tiempo se ajustan mejor con la suma de dos exponenciales de descomposición independientes (C (t)= exp (- k_at)+ b exp (- k_bt)) según el modelo de dos compartimentos, donde tl/2 (a)= (ln 2)/k_a y tl/2 (b)= (ln 2)/k_b. Los resultados se muestran en la Figura 46. El panel izquierdo muestra la tasa de eliminación significativamente mayor (> 5x) para el conjugado I- 6 vs RHI en ausencia de a- MM o glucosa. El panel de la derecha muestra que la tasa de eliminación disminuye algo (~ 50%), en presencia de glucosa (infusión G400) y de forma sustancial (~ 400%), en presencia de a- MM(infusión a- MM).

Ejemplo 80- Farmacocinética sensible a glucosa para infusión intravenosa de I- 6

En este ejemplo, el experimento de tasa de eliminación intravenosa descrito en el Ejemplo 79 fue modificado a partir de un solo bolo intravenoso de 0.4 mg de conjugado/kg de peso corporal a una infusión intravenosa continua. El objetivo del experimento fue mantener una tasa constante de entrada de conjugado (o RHI como control) durante seis horas con una inyección intraperitoneal de glucosa administrada en el punto de tiempo de cuatro horas para determinar el efecto resultante sobre concentración de conjugado en suero (o RHI). Se utilizaron ratas macho Sprague- Dawley (Taconic, JV/JV, 350- 400g, n = 3) con cánula dual en la vena yugular en cada experimento de manera que una línea de la vena yugular se utilizó para la infusión de conjugado o RHI y la otra para recolectar sangre.

Para RHI, una solución de 50 mU/ml de solución se filtraron de manera estéril a través de una membrana de filtración 0.2 um y se infundió a 0.07 ml/min para proporcionar una tasa de entrada constante de 3.5 mU/min para el experimento completo de seis horas. Se tomó una muestra de sangre en t = 0 min, después de lo cual se inició la infusión intravenosa constante. La segunda cánula se utilizó para recolectar muestras de sangre en t = 30, 60, 120, 180 y 240 min. En t = 240 min, se administró una dosis 4 g/kg de glucosa a través de inyección intraperitoneal, seguida por la extracción de sangre en t = 255, 270, 300, 330 y 360 min.

Para el conjugado I- 6, una solución 150 mU/ml se filtró estéril a través de una membrana de se filtración 0.2 um y se infundió a 0.10 ml/min para proporcionar una tasa de entrada constante de 15 mU/min para el experimento completo de seis horas . Una muestra de sangre fue tomada en t = 0 min, después de lo cual se inició la infusión intravenosa constante. La segunda cánula se utilizó para recolectar muestras de sangre en t = 30, 60, 120, 180 y 240 min. En t = 240 minutos, una dosis de 1, 2, o 4 g/kg de glucosa se administró a través de inyección intraperitoneal, seguida por la extracción de sangre en t = 255, 270, 300, 330 y 360 min.

Durante los experimentos, la glucosa en sangre se midió utilizando tiras de prueba disponibles en el mercado (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). La sangre de cada punto de tiempo se centrifugó a 4 ° C para recolectar el suero, y las concentracione de insulina en suero o conjugado en suero se midieron posteriormente con un kit ELISA disponible comercialmente (Iso- insulina ELISA, Mercodia, Uppsala, Suecia).

Los dos primeros paneles de la Figura 47 comparan los perfiles de concentración de glucosa en sangre y de insulina/conjugado en suero de una infusión de 3.5 mU/min de RHI y 15 mU/min de infusión de I- 6 antes y después de la inyección intraperitoneal de 4 g/kg de glucosa. La infusión de RHI provoca hipoglicemia significativa antes de la inyección de glucosa en comparación con la infusión de I- 6. Después de la inyección intraperitoneal de glucosa, la concentración insulina medida en suero de I- 6 inmediatamente se incrementa en más del 300% a medida que la concentración de glucosa en la sangre aumenta seguido por un rápido retorno a los niveles iniciales a medida que disminuye la concentración de glucosa. Por otro lado, no hay ningún cambio significativo en la concentración de insulina en suero medida para RHI después de la inyección intraperitoneal de glucosa bajo las mismas condiciones experimentales. Los siguientes tres pancles de la Figura 47 muestran que el grado en que la concentración de insulina medida aumenta durante la inyección intraperitoneal de glucosa está directamente relacionada

con la dosis de glucosa administrada y los niveles de glucosa en la sangre resultantes. Por ejemplo, sólo un cambio de pico a base del 50% en concentración de insulina en suero se observa para la inyección de glucosa de 1 g/kg en comparación con el cambio de pico a base del 300% observado para la dosis de 4 g/kg.

Ejemplo 81- Tasa de eliminación in vivo para conjugados de insulina con y sin azúcar

Con el fin de determinar la tasa a la que el conjugado I- 9 fue eliminado desde suero in vivo en presencia o ausencia de azúcares inhibidores como la glucosa o a- MM, se realizó el siguiente experimento. En cada caso el conjugado soluble (o RHI como control) se administró a 0.4 mg de conjugado/kg de peso corporal en la vena yugular de ratas macho Sprague- Dawley (Taconic, JV/JV, 350- 400g, n = 3).

Para determinar la tasa de eliminación de la presencia de niveles elevados de glucosa, una hora antes del inicio del experimento se conectó una cánula a una bomba de infusión de jeringa conteniendo una solución estéril de glucosa al 50% peso/volumen. La tasa de infusión de bomba se ajustó por el investigador para asegurar que los niveles de glucosa en la sangre en el animal se mantuvieran por encima de 300 mg/dL en todo momento durante el experimento. La glucosa en sangre se midió utilizando tiras de prueba disponibles en el mercado (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). En un experimento típico, se encontró que la tasa de infusión de bomba necesaria para mantener los animales por encima de 300 mg/dl por lo general fue mayor de 85 uL/min. Una muestra de sangre fue tomada en t = 0 min, después de lo cual una solución de conjugado estéril o insulina de control se inyectó por vía intravenosa a través de la segunda cánula, seguido inmediatamente por una solución permeabilizadora de la heparina- solución salina para asegurarse de que toda la dosis de conjugado se administró al animal. Después de una descarga adicional de la línea de la cánula con la heparina- solución salina, la segunda cánula se utilizó para recolectar muestras de sangre en t = 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos después de la dosis.

Para determinar la tasa de eliminación de la presencia de a- MM, una hora antes del inicio del experimento una cánula se conectó a una bomba de infusión de jeringa conteniendo una solución estéril de a- MM al 25% peso/volumen una solución. La tasa de infusión de la bomba se ajustó por el experimentador, pero por lo general se fijó en 85 uL/min. Una muestra de sangre fue tomada en t = 0 min, después de lo cual una solución de conjugado estéril o insulina de control se inyectó por vía intravenosa a través de la segunda cánula, seguido inmediatamente por

una solución permeabilizadora de la heparina- solución salina para asegurarse de que toda la dosis de conjugado se administró el animal. Después de una descarga adicional de la línea de la cánula con la heparina- solución salina, la segunda cánula se utilizó para recolectar muestras de sangre en t = 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos después de la dosis.

Durante el experimento, la glucosa en sangre se midió utilizando tiras de prueba disponibles en el mercado (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Sangre de cada punto de tiempo se centrifugó a 4 ° C para recolectar el suero, y las concentraciones de insulina en suero o conjugado en suero se midieron posteriormente con un kit ELISA disponible comercialmente (Iso- insulina ELISA, Mercodia, Uppsala, Suecia). Los datos de concentración sérica de insulina o conjugado se ajustan mejor con la suma de dos exponenciales de descomposición independientes (C (t)= exp (- k_at)+ b exp (- k_bt)) según el modelo de dos compartimentos, donde tl/2 (a)= (ln 2)/k_a y tl/2 (b)= (ln 2)/k_b. El primer panel de la figura 48 muestra que la tasa de eliminación de la insulina sin modificar no se ve afectada en presencia de azúcares (glucosa G400 o a- MM). Para efectos de comparación, el último panel de la figura 48 que muestra el conjugado I- 6 con infusión de azúcar se grafica a partir de los resultados del Ejemplo 79. El panel central de la figura 48 que muestra el conjugado I- 9 con infusión de azúcar muestra una disminución mucho más pronunciada en la tasa de eliminación (~ 350% vs. ~ 50%>) en presencia de glucosa (infusión G400) versus el conjugado I- 6. El conjugado I- 9 también muestra una disminución más significativa en la tasa de eliminación (~ 700 % vs. ~400%), en presencia de a- MM (infusión de a- MM) en comparación con el conjugado I- 6.

Ejemplo 82- Verificación de mecanismo y desempeño sensible a glucosa en cerdos miniatura

Con el fin de determinar si los resultados de conjugado de insulina sensible a glucosa que se describen anteriormente podrían extenderse a otras especies más allá de las ratas, nos enfocamos en explorar la tasa de eliminación in vivo dependiente de azúcar en cerdos miniatura macho no diabéticos representativos de humanos (cepa Yucatán), también conocidos como "minicerdos" en este documento. Un subconjunto de conjugados de insulina resumidos en la figura 49 fueron probados para determinar inicialmente los efectos de afinidad de azúcar y multivalencia sobre tasas de eliminación dependientes de azúcar. Los conjugados se muestran en la Figura 45 como I- 7 ,I- 6 ,I- 11 y II- 2. Todos los conjugados utilizados en este estudio se

sintetizaron según los métodos generales descritos en el Ejemplo 20. Para producir el conjugado de insulina AETM- 2 A1, B29- disustituido II- 2, se utilizó aproximadamente diez veces la cantidad de estructura de éster activo multivalente y ligando AETM por molécula de insulina en comparación con la síntesis de conjugado de insulina AETM- 2 B29- monosustituido (I- 6).

En cada experimento, el conjugado de insulina se administró por vía intravenosa a 0.1 U/kg en minicerdos no diabéticos con puerto de acceso vascular dual y la sangre se recolectó a intervalos de tiempo frecuentes después de la inyección. Para determinar la tasa de eliminación del suero en presencia de glucosa, se infundió por vía intravenosa una solución estéril de glucosa al 50% peso/volumen en un puerto con una bomba de jeringa una hora antes de la administración del conjugado de insulina, y la tasa se ajustó durante todo el experimento para asegurarse de que los niveles de glucosa en la sangre en el animal se mantuvieran en o cerca de 400 mg/dl (típicamente 80- 150 ml/h). Para determinar la tasa de eliminación del suero en la presencia de a- MM, la solución de glucosa fue sustituida por una solución estéril de a- MM al 25% peso/volumen y la tasa de infusión de la bomba se mantuvo constante durante todo el experimento a 80 ml/h. En cada caso, los datos resultantes de concentración de conjugado de insulina vs. tiempo se ajustaron con la suma de dos exponenciales de descomposición independientes ($C(t) = \exp(-k_a t) + P \exp(-k_b t)$) según el modelo de dos compartimientos.

A 400 mg/dl los altos niveles de insulina porcina inducida por glucosa endógena reaccionaron de manera cruzada con nuestro inmunoensayo de conjugado de insulina. Como tal, los resultados PK a partir de experimentos de infusión de glucosa requirieron la sustracción de los valores obtenidos de un ensayo de insulina porcina solamente, llevando a conjunto de datos particularmente "ruidoso". Puesto que a- MM no induce secreción de insulina porcina endógena, los datos a partir de estudios de infusión de a- MM fueron utilizados como nuestro principal indicador de cambios sensibles a azúcar en la vida media del conjugado de insulina. Curiosamente, en los cerdos, el conjugado de insulina AETM- 2 (I- 6) mostró sólo un modesto aumento de 1.7 x en t1/2 en presencia de a- MM en comparación con un aumento 4.0x en las ratas (Figura 56). Sin embargo, en los cerdos, el conjugado de AETM- 2 A1, B29- insulina di-sustituido (**II- 2**) demostró un aumento de casi 10 veces en t1/2 en presencia de a- MM (Figuras 50 y 51). Los resultados tabulares para otros conjugados se muestran en la Figura 57.

El área sobre la curva de disminución de glucosa para la dosis intravenosa de conjugado de insulina AETM- 2 di- sustituido **(II- 2)** en presencia de a- MM fue aproximadamente 2.6

veces mayor que en la ausencia de azúcar (Figura 52). La Figura 59 compara las diferencias en bioactividad entre RHI, I- 6 y II- 2 (conjugado de AETM - 2- insulina di- sustituido), y II- 3. Todos los tres conjugados de insulina contienen los ligandos de azúcar AETM de alta afinidad. En este conjunto seleccionado de conjugados de insulina, no existe una correlación entre vida media dependiente de azúcar y bioactividad.

El conjugado II- 2 se inyectó por vía subcutánea como una solución soluble a dosis de 0.25, 0.50, y 1.00 U/kg en minicerdos no diabéticos, y normoglucémicos y aloxano- diabéticos, hiperglucémicos para determinar su capacidad para reducir glucosa en diabéticos sin causar hipoglicemia en animales no diabéticos. El conjugado de insulina demostró una reducción significativa dependiente de dosis en los niveles de glucosa en sangre en los diabéticos sin ningún tipo de hipoglicemia o signos de disminución de la glucosa en los no diabéticos (Figura 53). En comparación, RHI inyectado a 0.063 y 0.125 U/kg causó disminución significativa de glucosa en los animales diabéticos con hipoglicemia notable y disminución significativa de glucosa e hipoglicemia en los animales no diabéticos (Figura 54). Con base en estos resultados preliminares, una sola inyección de aproximadamente 0.5 U/kg de conjugado de insulina soluble II- 2 proporcionó control de glucosa libre de hipoglicemia durante 6- 8 horas en minicerdos diabéticos. Las tasas de eliminación sérica de II- 2 inyectado por vía subcutánease determinaron en minicerdos diabéticos y normales (Figura 58). Se observaron perfiles PK similares entre diabéticos y normales para todas las dosis.

En conjunto, estos resultados iniciales demuestran que existe un mecanismo basado en lectina endógena en los minicerdos que puede ser explotado a través de la selección de afinidad de azúcar y multivalencia. Parece que los conjugados de insulina con mayores afinidadades y multivalencias proporcionan control glucémico mejorado libre de hipoglicemia en minicerdos en comparación con ratas.

Ejemplo 83- Estudios de optimización en cerdos miniatura

Sobre la base de la gran diferencia en el desempeño de **II- 2 vs. los otros conjugados en la** figura 49, es conveniente separar y cuantificar el efecto de sitio de conjugación de insulina (A1 vs. B29) de los efectos de la afinidad de azúcar y valencia. Utilizando técnicas similares de conjugación a las utilizadas para producir los conjugados de insulina en la Figura 49, por lo tanto, ha sintetizado el conjunto de la conjugados de insulina listados en la Figura 55 (mostrados

en la Figura 45 como I- 12,I- 13,I- 14,I - 15, II- 1, II- 3 y II- 4), así como los compuestos de control que se muestran en la Figura 60. Todos los conjugados di- sustituidos para ser utilizados en este estudio se sintetizaron según los métodos generales descritos en el Ejemplo 20.

Para producir los conjugados de insulina A1, B29- disustituidos, se utilizó aproximadamente diez veces la cantidad de estructura de éster activo multivalente y ligando afinidad de azúcar por molécula de insulina en comparación con la síntesis de conjugado de insulina B29- monosustituido. Los materiales sustituidos solamente por A1 también se prepararon según los métodos generales descritos Ejemplo 20. Sin embargo, en este caso se utilizó la insulina B29- mono- BOC protegida aislada a partir de una síntesis de protección BOC descrita en el Ejemplo 8 utilizando la mitad del número de equivalentes de di- tert- butil-dicarbonato. Una vez purificados, los grupos BOC fueron retirados del conjugado utilizando un método TFA/anisol descrito en el Ejemplo 12.

En general, las vidas medias sensibles a azúcar y los efectos reductores de glucosa de cada uno de estos conjugados de insulina se determinaron de la siguiente manera. Como se describió anteriormente, cada conjugado de insulina se administró por vía intravenosa a 0.1 U/kg en minicerdos no diabéticos con puerto de acceso vascular doble y la sangre se recolectó a intervalos de tiempo frecuentes después de la inyección. Para determinar la tasa de eliminación del suero en la presencia de a- MM, se infundió por vía intravenosa una solución estéril de a-MM al 25% peso/volumen hacia un puerto utilizando una bomba de jeringa (80 ml/h), una hora antes de administrar el conjugado de insulina, y la tasa se mantuvo constante durante todo el experimento. En cada caso, los datos resultantes de concentración de conjugado de insulina vs. tiempo se ajustan con la suma de dos exponenciales de descomposición independientes ($C(t) = \exp(-k_a t) + P \exp(-k_b t)$) según el modelo de dos compartimientos. La comparación de las tasas de eliminación de β- fase con y sin infusión de a- MM se utilizó para identificar conjugados adecuados.

La figura 61 muestra una comparación de los niveles de glucosa cuando varios conjugados de insulina se inyectaron por vía intravenosa en minicerdos. El conjugado I- 12 (sustitución de A1 con AETM- 2) fue ligeramente más efectivo en la reducción de glucosa que el conjugado I- 6 (sustitución de B29 con AETM- 2). La sustitución del conjugado I- 6 en la posición A1 por óxido de polietileno para proporcionar el conjugado C3 redujo la bioactividad general pero no aumentó la bioactividad inducida por a- MM. La sustitución de conjugado I- 6

en la posición A1 por otro andamio TSAT- C6- AETM- 2 para proporcionar el conjugado II- 2 redujo la bioactividad general, pero aumentó la bioactividad inducida por a- MM.

La figura 62 muestra una comparación de los niveles de glucosa cuando varios conjugados de insulina A1, B29 di- sustituidos fueron inyectados por vía intravenosa en minicerdos. La di- sustitución A1,B29 de insulina con grupos acetil (conjugado C7) o PEO (conjugado C4) no redujo sustancialmente la bioactividad general. Además, los conjugados C7 y C4 no presentaron efectos de bioactividad inducidos por a- MM distinguibles. El conjugado II- 3 tuvo bioactividad considerablemente reducida en comparación con conjugados C7 y C4, pero su bioactividad fue virtualmente restaurada en presencia de a- MM.

OTRAS REALIZACIONES

Otras realizaciones de l invento serán evidentes para los expertos en el estado de la técnica a partir de una consideración de la especificación o la práctica del invento divulgado en la presente . Se pretende que la especificación y los ejemplos se consideren como de ejemplo solamente, con el verdadero alcance y espíritu de la divulgación que se indican en las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado que comprende un fármaco y un ligando el cual incluye un primer sacárido, en donde el conjugado se caracteriza porque, cuando el conjugado se administra a un mamífero, por lo menos una propiedad farmacocinética o farmacodinámica del conjugado es sensible a la concentración sérica de un segundo sacárido.

2. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el segundo sacárido es glucosa.

3. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el segundo sacárido es manosa.

4. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el segundo sacárido es L- fucosa.

5. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el segundo sacárido es N- acetil glucosamina.

6. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el segundo sacárido es alfa- metil-manosa.

7. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el peso molecular del conjugado en ausencia del fármaco es menor que 10.000 Da aproximadamente.

8. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el peso molecular del conjugado en ausencia del fármaco está en el rango de 250 a 5.000 Da aproximadamente.

9. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el peso molecular del conjugado en ausencia del fármaco está en el rango de 900 a 2.000 Da aproximadamente.

10. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el peso molecular del conjugado que incluye el fármaco es menor que 20.000 Da aproximadamente.

11. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el peso molecular del conjugado incluyendo el fármaco está en el rango de 2.000 a 18.000 Da aproximadamente.

12. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el peso molecular del conjugado incluyendo el fármaco está en el rango entre 6.500 y 8.000 Da aproximadamente.

13. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el conjugado tiene un peso molecular único.

14. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el conjugado tiene una curva de concentración sérica sustancialmente diferente bajo condiciones de ayuno y de hiperglicemia.

15. El conjugado de la reivindicación 14, en donde las condiciones de hiperglicemia son inducidas por la administración simultánea de conjugado y glucosa al mamífero.

16. El conjugado de la reivindicación 14, en donde el conjugado tiene una C_{max} sérica que es mayor bajo condiciones de hiperglicemia en comparación a condiciones de ayuno.

17. El conjugado de la reivindicación 14, en donde el conjugado tiene un AUC (área bajo la curva) sérica que es mayor bajo condiciones de hiperglicemia en comparación a condiciones de ayuno.

18. El conjugado de la reivindicación 14, en donde el conjugado tiene una tasa de climinación sérica que es más lenta bajo condiciones de hiperglicemia en comparación a condiciones de ayuno.

19. El conjugado de la reivindicación 14, en donde el conjugado tiene una curva de concentración sérica que puede ser ajustada utilizando un modelo bi- exponencial de dos compartimientos con una corta y una larga vida media y la larga vida media es más larga en condiciones de hiperglicemia en comparación a condiciones de ayuno.

20. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 14- 19, en donde las condiciones de ayuno implican una C_{max} de glucosa sérica de menos de 100 mg/dL.

21. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 14- 19, en donde las condiciones de hiperglicemia implican una C_{max} de glucosa sérica por encima de 200 mg/dL.

22. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el conjugado tiene una curva de concentración sérica que es sustancialmente diferente a 100 y 300 mg/dl de glucosa.

23. El conjugado de la reivindicación 22, en donde el conjugado tiene una C_{max} que es mayor a 300 mg/dl de glucosa que a 100 mg/dl de glucosa.

24. El conjugado de la reivindicación 23, en donde la C_{max} del conjugado es por lo menos un 50% mayor a 300 mg/dl de glucosa.

25. El conjugado de la reivindicación 22, en donde el conjugado tiene una AUC que es superior a 300 mg/dl de glucosa que a 100 mg/dl de glucosa.

26. El conjugado de la reivindicación 25, en donde la AUC del conjugado es por lo menos un 50% mayor a 300 mg/dl de glucosa.

27. El conjugado de la reivindicación 22, en donde el conjugado tiene una tasa de eliminación sérica que es más rápida a 100 mg/dl de glucosa que a 300 mg/dl de glucosa.

28. El conjugado de la reivindicación 27, en donde la tasa de eliminación sérica del conjugado es al menos el 25% más rápida a 100 mg/dl de glucosa.

29. El conjugado de la reivindicación 22, en donde la curva de concentración sérica del conjugado puede ser ajustada con un modelo bi- exponencial de dos compartimientos con una corta y una larga vida media y la larga vida media es más larga a 300 mg/dL.

30. El conjugado de la reivindicación 29, en donde la larga vida media es de al menos un 50% más larga a 300 mg/dl de glucosa.

31. El conjugado de la reivindicación 1, en donde una versión del conjugado y no conjugado del fármaco tienen curvas de concentración sérica que son esencialmente las mismas bajo condiciones de hiperglicemia.

32. El conjugado de la reivindicación 1, en donde una versión del conjugado y no conjugado del fármaco tienen curvas de concentración sérica que son sustancialmente diferentes bajo condiciones de ayuno.

33. El conjugado de la reivindicación 1, en donde una versión del conjugado y no conjugado del fármaco tienen curvas de concentración sérica que son esencialmente las mismas bajo condiciones de hiperglicemia y sustancialmente diferentes bajo condiciones de ayuno.

34. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 31- 33, en donde las condiciones de ayuno implican una C_{max} de glucosa sérica de menos de 100 mg/dL.

35. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 31- 33, en donde las condiciones de hiperglicemia implica una C_{max} de glucosa sérica por encima de 200 mg/dL.

36. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el conjugado tiene una menor bioactividad bajo condiciones de ayuno en comparación con las condiciones de hiperglicemia.

37. El conjugado de la reivindicación 36, en donde las condiciones de ayuno implican una C_{max} de glucosa sérica de menos de 100 mg/dL.

38. El conjugado de la reivindicación 36, en donde las condiciones de hiperglicemia implican una C_{max} de glucosa sérica por encima de 200 mg/dL.

39. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el conjugado tiene una menor bioactividad a 100 mg/dl de glucosa que a 300 mg/dl de glucosa.

40. El conjugado de la reivindicación 39, en donde la bioactividad del conjugado es por lo menos un 25% mayor a 300 mg/dl de glucosa.

41. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1- 40, en donde el mamífero es un ser humano, perro, gato, rata, o cerdo minipig.

42. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1- 40, en donde el mamífero es un ser humano.

43. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el fármaco es un fármaco anti-diabético.

44. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el fármaco es un sensibilizador de insulina.

45. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el fármaco es un secretatogogo de insulina.

46. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el fármaco es un factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF- 1).

47. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el fármaco es una molécula de insulina.

48. El conjugado de la reivindicación 47, en donde la molécula de insulina es seleccionada del grupo que consta de insulina humana, insulina porcina e insulina bovina.

49. El conjugado de la reivindicación 47, en donde la molécula de insulina es seleccionada del grupo que consta de insulina lispro, insulina aspart e insulina glulisina.

50. El conjugado de la reivindicación 47, en donde la molécula de insulina es insulina glargina o insulina detemir.

51. El conjugado de la reivindicación 47, en donde la molécula de insulina incluye tres puentes de disulfuro.

52. El conjugado de la reivindicación 47, en donde la molécula de insulina se conjuga a través del residuo aminoácido A1.

53. El conjugado de la reivindicación 47, en donde la molécula de insulina se conjuga a través del residuo aminoácido B1.

54. El conjugado de la reivindicación 47, en donde la molécula de insulina se conjuga a través del grupo épsilon- amino de Lys^{B29}.

55. El conjugado de la reivindicación 47, en donde la molécula de insulina es insulina glulisina conjugada a través del grupo épsilon- amino de Lys^{B3}.

56. El conjugado de la reivindicación 47, en donde la molécula de insulina se trunca.

57. El conjugado de la reivindicación 56, en donde la molécula de insulina es des(B30)- insulina, des(B28- B30)- insulina, des(B27)- insulina, des(B1)- insulina, o des(B1-B3)insulina.

58. El conjugado de la reivindicación 47, en donde la conjugación resulta en una afinidad disminuida de receptor de insulina *in vitro* en comparación con insulina humana tipo silvestre.

59. El conjugado de la reivindicación 47, en donde la molécula de insulina se conjuga a través del residuo aminoácido A3, A4, A5, A8, A9, o B30.

60. El conjugado de la reivindicación 47, en donde la molécula de insulina se conjuga a través del residuo aminoácido A1 y el grupo épsilon- amino de Lys^{B29}.

61. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el conjugado incluye un único ligando.

62. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el conjugado incluye al menos dos ligandos separados cada uno de los cuales incluye un sacárido.

63. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el conjugado incluye dos ligandos separados cada uno de los cuales incluye un sacárido.

64. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el conjugado incluye tres ligandos separados cada uno de los cuales incluye un sacárido.

65. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el conjugado incluye cuatro ligandos separados cada uno de los cuales incluye un sacárido.

66. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el conjugado incluye cinco ligandos separados cada uno de los cuales incluye un sacárido.

67. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 62- 66, en donde los ligandos separados son los mismos.

68. El conjugado de la reivindicación 62, en donde los al menos dos ligandos separados se conjugan con el fármaco a través de diferentes puntos de conjugación.

69. El conjugado de la reivindicación 62, en donde los al menos dos ligandos separados se conjugan con una estructura única de conjugados que también es conjugada con el fármaco.

70. El conjugado de la reivindicación 62, en donde los al menos dos ligandos separados y el fármaco están ubicados cada uno sobre una ramificación separada de una estructura ramificada conjugada.

71. El conjugado de la reivindicación 70, en donde los al menos dos ligandos separados y el fármaco están ubicados cada uno en los extremos de ramificaciones distintas de una estructura ramificada conjugada.

72. El conjugado de la reivindicación 70, en donde la estructura conjugada es hiper-ramificada.

73. El conjugado de la reivindicación 62, en donde la estructura conjugada no es polimérica.

74. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el ligando incluye un primer sacárido seleccionado del grupo que consta de glucosa, manosa y L- fucosa.

75. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el ligando incluye un primer sacárido seleccionado del grupo que consta de manosamina y N- acetil manosamina beta-enlazada.

76. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el ligando incluye un primer sacárido seleccionado del grupo que consta de metilglucosa, metilmanosa, etilglucosa, etilmanosa, propilglucosa y propilmanosa.

77. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el ligando incluye alfa- L-fucopiranosida.

78. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el ligando incluye una bimanosa.

79. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el ligando incluye una trimanosa.

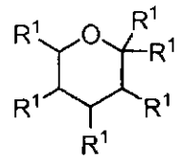
80. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el ligando incluye una trimanosa lineal.

81. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el ligando incluye una trimanosa ramificada.

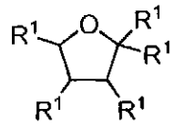
82. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el ligando incluye un primer sacárido y un grupo amina.

83. El conjugado de la reivindicación 82, en donde el primer sacárido y un grupo amina están separados por un grupo alquilo C1- C6.

84. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el ligando es de la fórmula (IIIa) o (IIIb):



IIIa



IIIb

en donde:

cada R^1 es independientemente hidrógeno,- OR^y,- $N(R^y)_2$,- SR^y, O- Y, G- Z, o - CH_2R^X;

cada R^x es independientemente hidrógeno,- OR^y,- $N(R^y)_2$,- SR^Y, o - O- Y;

cada R^y es independientemente - R^2,- $S0_2R^2$, - $S(O)R^2$,- $P(O)(OR^2)_2$,- $C(O)R^2$,- CO_2R^2, o - $C(O)N(R^2)_2$;

cada Y es independientemente un monosacárido, disacárido o trisacárido;

cada G es independientemente un enlace covalente o un alquileno C_{1-9} sustituido opcionalmente, en donde una o más unidades de metileno de G es opcionalmente reemplazada por - O- , - S- , - $N(R^2)$ - , - C(O) - , - OC(O) - , - C(O)O- - $C(O)N(R^2)$ - , - $N(R^2)C(O)$ - , - $N(R^2)C(O)N(R^2)$ - , - SO_2- - $SO_2N(R^2)$- , - $N(R^2)SO_2$- , o - $N(R^2)SO_2N(R^2)$- ;

cada Z es independientemente halógeno, - $N(R^2)_2$, - OR^2, - SR^2, - N_3, - OCR^2, - $C0_2R^2$, - $C(O)R^2$, o - OSO_2R^2; y

cada R^2 es independientemente hidrógeno o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado a partir de C_{1-6} alifático, fenilo, un anillo heterocíclico de 4- 7 miembros que tiene 1- 2 heteroátomos seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre, o un anillo heteroarilo monocíclico de 5- 6 miembros con 1- 4 heterátomos seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre,

con la salvedad de que el ligando comprende no más de un total de cuatro fracciones de monosacáridos.

85. El conjugado de la reivindicación 84, en donde R^1 es hidrógeno,- OH,- NHC $(O)CH_3$, - O- Y,- G- Z,- CH_2OH,- CH2- O- Y, o - NH_2.

86. El conjugado de la reivindicación 84, en donde R^x es hidrógeno,- OH, u –O- Y.

87. El conjugado de la reivindicación 84, en donde R^y es hidrógeno, R^2, - $C(O)R^2$, o acetilo.

88. El conjugado de la reivindicación 84, en donde Y es un monosacárido.

89. El conjugado de la reivindicación 88, en donde Y es manosa, glucosa, fructosa, galactosa, ramnosa, o xilopiranosa.

90. El conjugado de la reivindicación 88, en donde Y es manosa.

91. El conjugado de la reivindicación 88, en donde Y es D- manosa.

92. El conjugado de la reivindicación 84, en donde Y es un disacárido.

93. El conjugado de la reivindicación 92, en donde Y es sacarosa, maltosa, turanosa, trehalosa, celobiosa o lactosa.

94. El conjugado de la reivindicación 84, en donde G es un enlace covalente.

95. El conjugado de la reivindicación 84, en donde G es - O- C_{1-8} alquileno.

96. El conjugado de la reivindicación 95, en donde G es- OCH_2CH_2- .

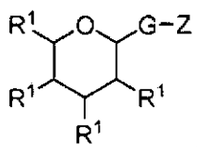
97. El conjugado de la reivindicación 84, en donde Z es- N $(R^2)_2$,- OR^2, o - SR^2.

98. El conjugado de la reivindicación 97, en donde Z es - SH.

99. El conjugado de la reivindicación 97, en donde Z es - NH_2.

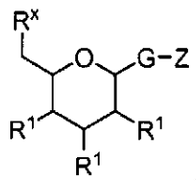
100. El conjugado de la reivindicación 84, en donde –G- Z es $OCH_2CH_2NH_2$.

101. El conjugado de la reivindicación 84, en donde el ligando es de la fórmula (IIIa-*i*):



IIIa-*i*

102. El conjugado de la reivindicación 84, en donde el ligando es de la fórmula (IIIa-*ii*):



IIIa-*ii*

103. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el ligando incluye aminoetilglucosa (AEG), aminoetilmanosa (AEM), aminoetilbimanosa (AEBM) o aminoetiltrimanosa (AETM).

104. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el ligando incluye aminoetiltrimanosa (AETM).

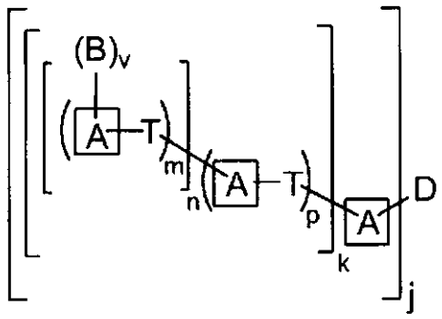
105. El conjugado de la reivindicación 1, en donde el conjugado incluye dos o tres ligandos separados cada uno de los cuales incluye aminoetiltrimanosa (AETM).

106. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ligando incluye un primer sacárido que se conjuga a través de un carbono anomérico.

107. El conjugado de la reivindicación 106, en donde el carbono anomérico es un alfa anómero .

108. El conjugado de la reivindicación 106, en donde el sacárido es conjugado indirectamente con el fármaco a través de una estructura conjugada.

109. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el conjugado tiene la fórmula general (II):



II

en donde:

cada ocurrencia de $\left[\left(\boxed{A}-T\right)\right]$ representa una ramificación potencial dentro del conjugado;

cada ocurrencia de $\left(\boxed{A}-T\right)$ representa una repetición potencial dentro de una ramificación de la conjugación;

cada ocurrencia de $\boxed{A}$ es independientemente un enlace covalente, un átomo de carbono, un heteroátomo o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado del grupo formado por acilo, alifáticos, heteroalifático, arilo, heteroarilo y heterocíclico;

cada ocurrencia de T es independientemente un enlace covalente o una cadena de hidrocarburos C_{1-30} bivalente, lineal o ramificada, saturada o insaturada, opcionalmente sustituida en donde una o más unidades de metileno de T es opcional e independientemente sustituida por - O- , - S- , - N(R)- , - C(O)- , - C(O)O- , - OC(O)- , - N(R)C(O)- , - C(O)N(R)- , - S(O)- , - $S(O)_2$- , - $N(R)SO_2$- , - SO_2N (R)- , un grupo heterocíclico, un grupo arilo o un grupo heteroarilo;

cada ocurrencia de R es independientemente hidrógeno, un grupo protector adecuado, o una fracción acilo, fracción arilalquilo, fracción alifática, fracción arilo, fracción heteroarilo, o fracción heteroalifática;

- B es –T- L^B- X;

cada ocurrencia de X es independientemente un ligando;

cada ocurrencia de L^B es independientemente un enlace covalente o un grupo

derivado de la conjugación covalente de una T con una X;

- D es - T- L^D- W;

cada ocurrencia de W es independiente un fármaco;

cada ocurrencia de L^D es independientemente un enlace covalente o un grupo derivado de la conjugación covalente de una T con una W,

k es un entero de 1 a 12, inclusive;

j es un entero de 1 a 4, inclusive;

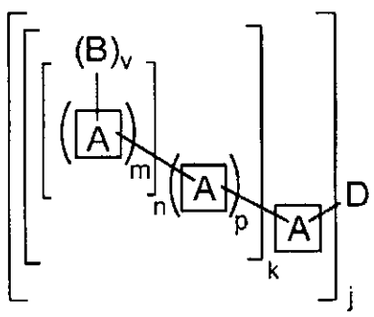
cada ocurrencia de p es independientemente un entero de 1 a 5, inclusive, y

cada ocurrencia de n es independientemente un entero de 0 a 5, inclusive, y

cada ocurrencia de m es independientemente un entero de 1 a 5, inclusive, y

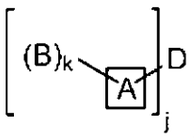
cada ocurrencia de v es independientemente un entero de 0 a 5, inclusive, con la salvedad de que dentro de cada ramificación de k por lo menos una ocurrencia de n es ≥ 1 y por lo menos una ocurrencia de v ≥ 1.

110. El conjugado de la reivindicación 109, en donde cada ocurrencia de T fuera de los grupos B y D es un enlace covalente y el conjugado es de la fórmula (V):



V

111. El conjugado de la reivindicación 109, en donde cada ocurrencia de [A] excepto de la [A] central es un enlace covalente, cada ocurrencia de v = 1, y el conjugado es de la fórmula (VII):



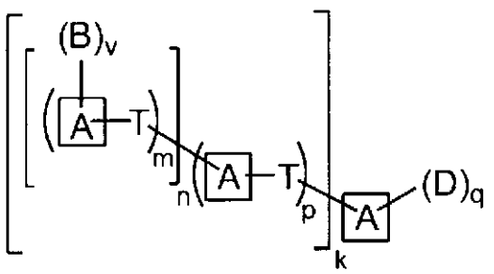
VII

112. El conjugado de la reivindicación 109, en donde k = 1 y j = 2.

113. El conjugado de la reivindicación 109, en donde k = 2 y j = 2.

114. El conjugado de la reivindicación 109, en donde k = 3 y j = 2.

115. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el conjugado tiene la fórmula general (I):



I

en donde:

cada ocurrencia de $\left[\left(\boxed{A}-T\right)\right]$ representa una ramificación potencial dentro del conjugado;

cada ocurrencia de $\left(\boxed{A}-T\right)$ representa una repetición potencial dentro de una ramificación del conjugado;

cada ocurrencia de $\boxed{A}$ es independientemente un enlace covalente, un átomo de

carbono, un heteroátomo o un grupo sustituido opcionalmente seleccionado del grupo formado por acilo, alifáticos, heteroalifático, arilo, heteroarilo y heterocíclico;

cada ocurrencia de T es independientemente un enlace covalente o una cadena de hidrocarburos C_{1-30} bivalente, lineal o ramificada, saturada o insaturada, opcionalmente sustituida en donde una o más unidades de metileno de T son opcional e independientemente sustituidas por - O- , - S- , - N(R)- , - C(O)- , - C(O)O- , - OC(O)- , - N(R)C(O)- , - C(O)N(R)- , - S(O)- , - $S(O)_2$- , - N(R)SO_2- , - SO_2N(R)- , un grupo heterocíclico, un grupo arilo o un grupo heteroarilo;

cada ocurrencia de R es independientemente hidrógeno, un grupo protector adecuado, o una fracción de acilo, fracción de arilalquilo, fracción alifática, fracción de arilo, fracción de heteroarilo, o fracción heteroalifática;

- B es - T- L^B- X;

cada ocurrencia de X es independientemente un ligando;

cada ocurrencia de L^B es independientemente un enlace covalente o un grupo derivado de la conjugación covalente de una T con una X;

- D es - T- L^D- W;

cada ocurrencia de W es independiente un fármaco;

cada ocurrencia de L^D es independientemente un enlace covalente o un grupo derivado de la conjugación covalente de una T con una W,

k es un entero de 1 a 12, inclusive;

q es un entero de 1 a 4, inclusive;

cada ocurrencia de p es independientemente un entero de 1 a 5, inclusive, y

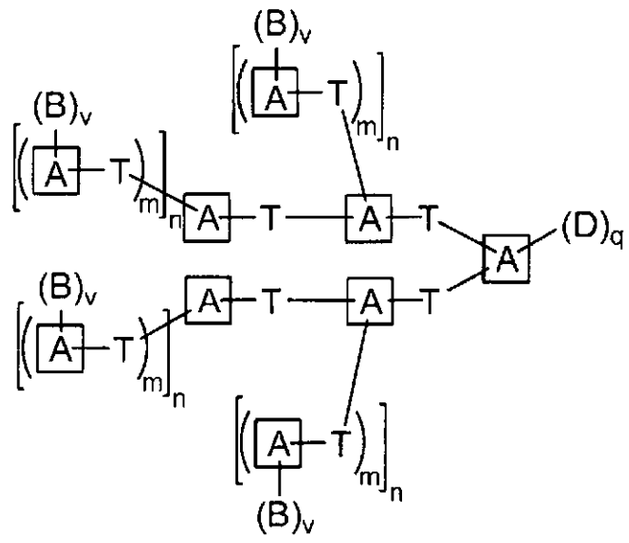
cada ocurrencia de n es independientemente un entero de 0 a 5, inclusive, y

cada ocurrencia de m es independientemente un entero de 1 a 5, inclusive, y

cada ocurrencia de v es independientemente un entero de 0 a 5, inclusive, con la salvedad de que dentro de cada ramificación de k- por lo menos una ocurrencia de $n \geq 1$ y por lo menos una ocurrencia de $v \geq 1$.

116. El conjugado de la reivindicación 115, en donde cada ocurrencia de [A] en una fracción p- entre corchetes se sustituye por un número de fracciones n- entre corchetes que corresponden a un valor de $n \geq 1$.

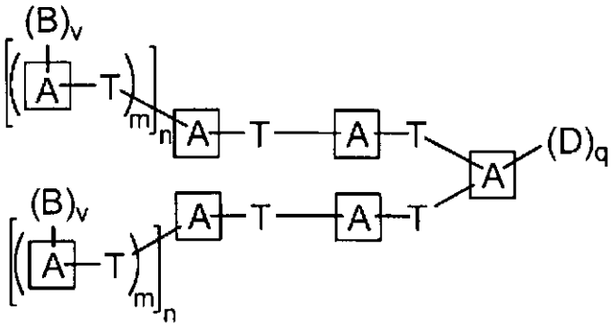
117. El conjugado de la reivindicación 116, en donde k = 2 y p = 2 en ambas ramificaciones k y el conjugado es de la fórmula (Ia):



Ia

118. El conjugado de la reivindicación 115, en donde solamente las ocurrencias terminales de [A] en una fracción p- entre corchetes son sustituidas por un número de fracciones n- entre corchetes que corresponden a un valor de $n \geq 1$.

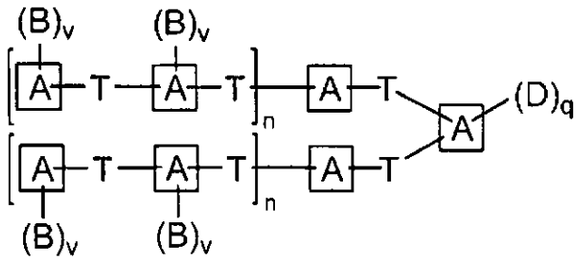
119. El conjugado de la reivindicación 118, en donde k = 2 y p = 2 en ambas ramificaciones k, n = 0 para la primera fracción de p- entre corchetes en ambas ramificaciones k y el conjugado es de la fórmula (Ib):



Ib

120. El conjugado de la reivindicación 115, en donde cada ocurrencia de [A] en una fracción de m- entre corchetes se sustituye por un número de fracciones B correspondiente al valor de $v \geq 1$.

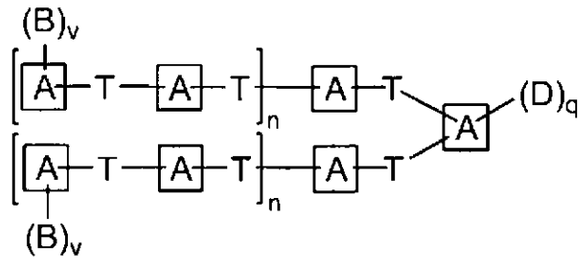
121. El conjugado de la reivindicación 120, en donde k = 2, cada ocurrencia de p = 1, y cada ocurrencia de m = 2 y el conjugado es de la fórmula (Ic):



Ic

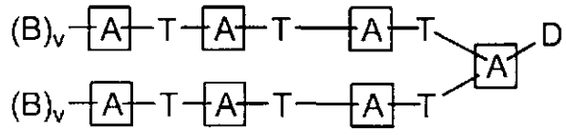
122. El conjugado de la reivindicación 115, en donde solamente las ocurrencias terminales de [A] en una fracción de m- entre corchetes son sustituidas por un numero de fracciones de B correspondiente a un valor de $v \geq 1$.

123. El conjugado de la reivindicación 122, en donde k = 2, cada ocurrencia de p = 1, cada ocurrencia de m = 2, v = 0 para la primera fracción de m- entre corchetes en cada ramificación n y el conjugado es de la fórmula (Id):



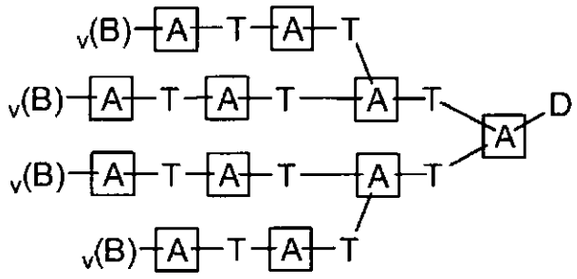
Id

124. El conjugado de la reivindicación 123, en donde q = 1 y n = 1 en ambas ramificaciones k y el conjugado es de la fórmula (Ie):



Ie

125. El conjugado de la reivindicación 123, en donde q = 1 y n = 2 en ambas ramificaciones k y el conjugado es de la fórmula (If):



If

126. El conjugado de la reivindicación 115, en donde cada ocurrencia de A es un grupo seleccionado opcionalmente sustituido del grupo que consta de acilo, alifáticos, heteroalifático, arilo, heteroarilo y heterocíclicos.

127. El conjugado de la reivindicación 115, en donde cada ocurrencia de [A] es la misma.

128. El conjugado de la reivindicación 115, en donde la [A] central es diferente a todas las otras ocurrencias de [A].

129. El conjugado de la reivindicación 128, en donde todas las ocurrencias de [A] son las mismas a excepción de la [A] central.

130. El conjugado de la reivindicación 115, en donde [A] es un grupo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido.

131. El conjugado de la reivindicación 130, en donde [A] es un arilo de 6 miembros.

132. El conjugado de la reivindicación 131, en donde [A] es fenilo.

133. El conjugado de la reivindicación 115, en donde [A] es un heteroátomo seleccionado entre N, O o S.

134. El conjugado de la reivindicación 115, en donde [A] es un átomo de nitrógeno.

242. El conjugado de la reivindicación 115, en donde [A] es un átomo de carbono.

136. El conjugado de la reivindicación 115, en donde cada ocurrencia de T es independiente una cadena de hidrocarburos C_{1-20} bivalente, lineal o ramificada, saturada o insaturada, opcionalmente sustituida en donde una o más unidades de metileno de T son opcional e independientemente sustituidas por - O- , - S- , - N(R)- , - C(O)- , - C(O)O- , -

OC (O)- , - N(R)C(O)- , - C(O)N(R)- , - S(O)- , - $S(O)_2$- , - $N(R)SO_2$- , - $SO_2N(R)$- , un grupo heterocíclico, un grupo arilo o un grupo heteroarilo.

137. El conjugado de la reivindicación 136, en donde uno, dos, tres, cuatro o cinco unidades de metileno de T son opcional e independientemente sustituidas.

138. El conjugado de la reivindicación 136, en donde T es construido a partir de una cadena de hidrocarburos C_{1-10} en donde una o más unidades de metileno de T son opcional e independientemente sustituidas por - O- , - S- , - N(R)- , - C(O)- , - C(O)O- , - OC (O)- , - N(R)C(O)- , - C(O)N(R)- , - S(O)- , - $S(O)_2$- , - $N(R)SO_2$- , - $SO_2N(R)$- , un grupo heterocíclico, un grupo arilo o un grupo heteroarilo.

139. El conjugado de la reivindicación 136, en donde una o más unidades de metileno de T se sustituyen por un grupo heterocíclico.

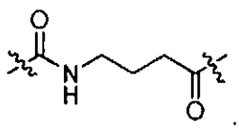
140. El conjugado de la reivindicación 136, en donde una o más unidades de metileno de T se sustituyen por una fracción de triazol.

141. El conjugado de la reivindicación 136, en donde una o más unidades de metileno de T se sustituyen por - C(O)- .

142. El conjugado de la reivindicación 136, en donde una o más unidades de metileno de T se sustituyen por - C(O)N(R)- .

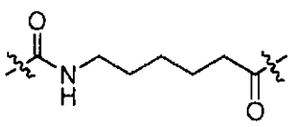
143. El conjugado de la reivindicación 136, en donde una o más unidades de metileno de T se sustituyen por - O- .

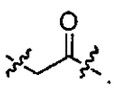
144. El conjugado de la reivindicación 136, en donde T es  .



145. El conjugado de la reivindicación 136, en donde T es

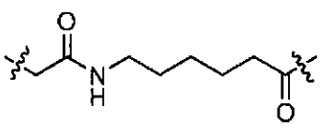
146. El conjugado de la reivindicación 244, en donde T es

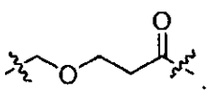




147. El conjugado de la reivindicación 136, en donde T es

148. El conjugado de la reivindicación 136, en donde T es

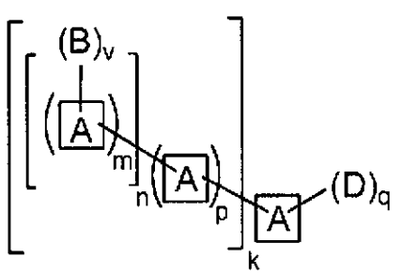




149. El conjugado de reivindicación 136 en donde T es

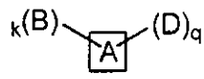
150. El conjugado de la reivindicación 136, en donde cada ocurrencia de T es la misma.

151. El conjugado de la reivindicación 136, en donde cada ocurrencia de T fuera de los grupos B y D es un enlace covalente y el conjugado es de la fórmula (IV):



IV

152. El conjugado de la reivindicación 151, en donde cada ocurrencia de [A] a excepción de la [A] central es un enlace covalente, cada ocurrencia de v = 1, y el conjugado es de la fórmula (VI):



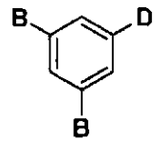
VI

153. El conjugado de la reivindicación 152, en donde k = 1 y q = 1.

154. El conjugado de la reivindicación 152, en donde k = 2 y q = 1.

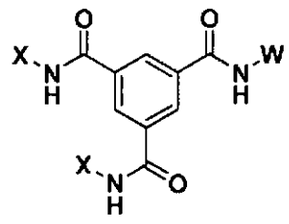
245. El conjugado de la reivindicación 152, en donde k = 3 y q = 1.

156. El conjugado de la reivindicación 154, en donde el conjugado es de la fórmula (VIa):



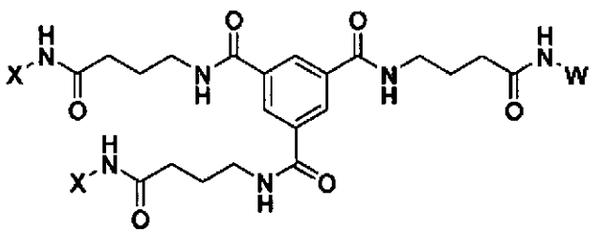
VIa

157. El conjugado de la reivindicación 156, en donde el conjugado es de la fórmula (VIa- 1):



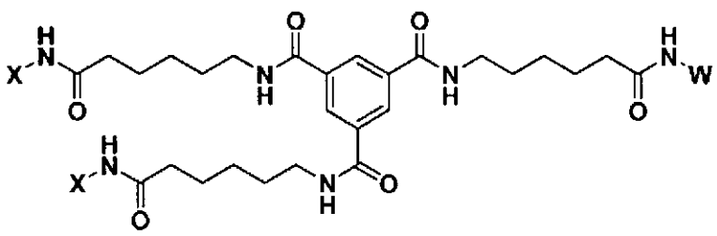
VIa-1

158. El conjugado de la reivindicación 156, en donde el conjugado es de la fórmula (VIa- 2):



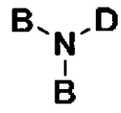
VIa-2

159. El conjugado de la reivindicación 156, en donde el conjugado es de la fórmula (VIa- 3):



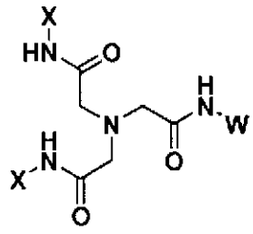
VIa-3

160. El conjugado de la reivindicación 154, en donde el conjugado es de la fórmula (VIb):



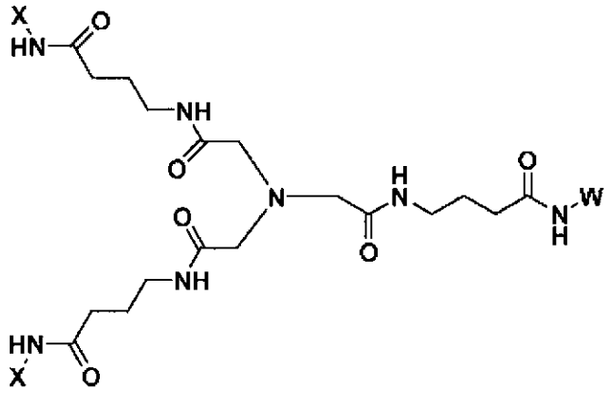
VIb

161. El conjugado de la reivindicación 160, en donde el conjugado es de la fórmula (VIb- 1):



VIb-1

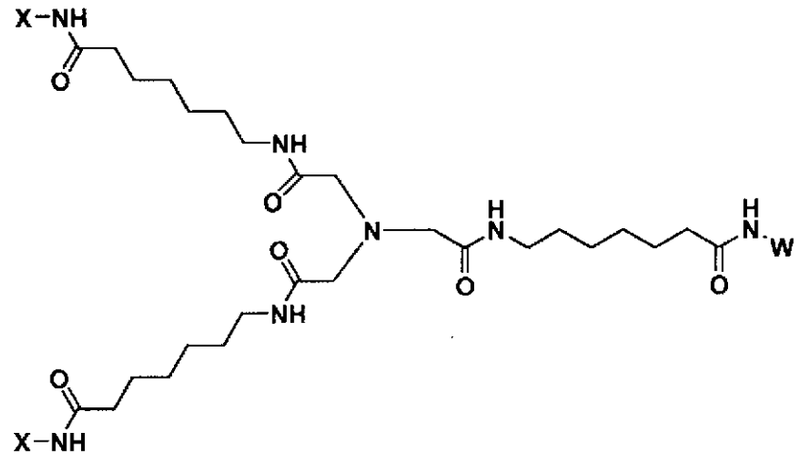
162. El conjugado de la reivindicación 160, en donde el conjugado es de la fórmula (VIb- 2):



VIb-2

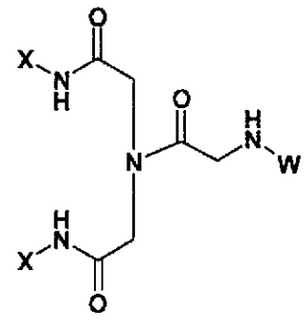
163. El conjugado de la reivindicación 160, en donde el conjugado es de la fórmula (VIb- 3):

249. El conjugado de la reivindicación 160, en donde el conjugado es de la fórmula (VIb- 4):



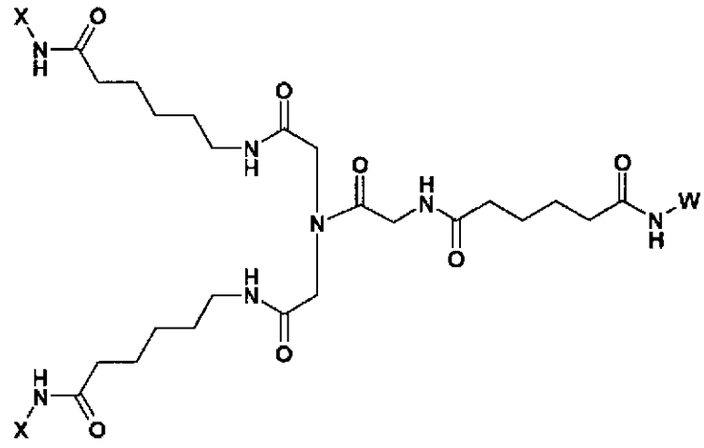
VIb-4

165. El conjugado de la reivindicación 160, en donde el conjugado es de la fórmula (VIb- 5):



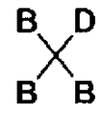
VIb-5

166. El conjugado de la reivindicación 160, en donde el conjugado es de la fórmula (VIb- 6):



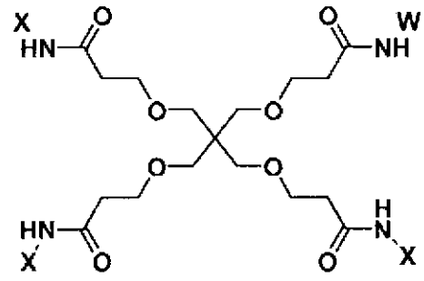
VIb-7

168. El conjugado de la reivindicación 155, en donde el conjugado es de la fórmula (VIc):



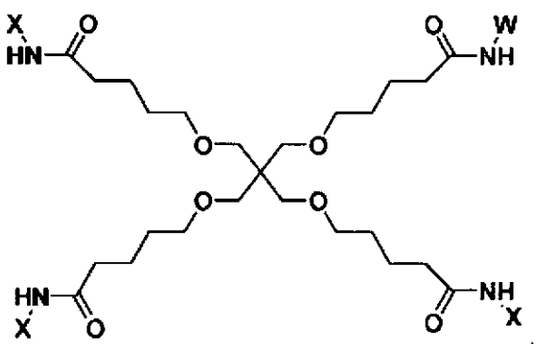
VIc

169. El conjugado de la reivindicación 168, en donde el conjugado es de la fórmula (VIc- 1):



VIc-1

170. El conjugado de la reivindicación 168, en donde el conjugado es de la fórmula (VIc- 2):



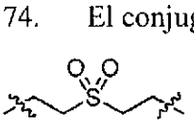
VIc-2

252. El conjugado de la reivindicación 115, en donde al menos uno entre L^B y L^D es un enlace covalente.

172. El conjugado de la reivindicación 115, en donde al menos uno entre L^B y L^D es una fracción opcionalmente sustituida derivada de la conjugación de una fracción opcionalmente sustituida reactiva de carbonilo, reactiva de tiol, reactiva de amina, o reactiva de hidroxilo de T con un grupo carboxilo, tiol, amina, o hidroxilo de X o W.

173. El conjugado de la reivindicación 115, en donde al menos uno entre L^B y L^D es una fracción opcionalmente sustituida derivada de la conjugación de una fracción opcionalmente sustituida reactiva de carboxilo, reactiva de tiol, reactiva de amina, o reactiva de hidroxilo de X o W con un grupo carboxilo, tiol, amina, o hidroxilo de T.

174. El conjugado de la reivindicación 172, en donde al menos uno entre L^B y L^D es



175. El conjugado de la reivindicación 172, en donde al menos uno entre L^B y L^D es un grupo succinimida.

176. El conjugado de la reivindicación 115, en donde k + q es un entero de 2 a 6 inclusive.

177. El conjugado de la reivindicación 176, en donde k + q es 2, 3 o 4.

178. El conjugado de la reivindicación 115, en donde cada ocurrencia de p es 1, 2 o 3.

179. El conjugado de la reivindicación 115, en donde cada ocurrencia de p es 1.

180. El conjugado de la reivindicación 115, en donde cada ocurrencia de p es la misma.

181. El conjugado de la reivindicación 115, en donde cada ocurrencia de m es 1, 2 o 3.

182. El conjugado de la reivindicación 115, en donde cada ocurrencia de m es 1.

183. El conjugado de la reivindicación 115, en donde cada ocurrencia de m es la misma.

184. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 109- 183, en donde cada ocurrencia de X es un ligando que incluye aminoetilglucosa (AEG), aminoetilmanosa (AEM), aminoetilbimanosa (AEBM) o aminoetiltrimanosa (AETM).

185. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 109- 183, en donde cada ocurrencia de X es un ligando que incluye aminoetiltrimanosa (AETM).

186. El conjugado de la reivindicación 185, en donde W es una molécula de insulina.

187. El conjugado de la reivindicación 186, en donde la molécula de insulina se conjuga a través del residuo aminoácido A1.

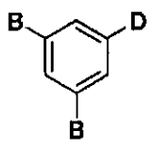
188. El conjugado de la reivindicación 186, en donde la molécula de insulina se conjuga a través del residuo aminoácido Bl.

189. El conjugado de la reivindicación 186, en donde la molécula de insulina se conjuga a través del grupo épsilon- amino de Lys ^{B29}.

190. El conjugado de la reivindicación 186, en donde la molécula de insulina es insulina glulisina conjugada a través del grupo épsilon- amino de Lys^{B3}.

191. El conjugado de la reivindicación 115, en donde cada ocurrencia de X es aminoetiltrimanosa (AETM) conjugada con la estructura de conjugado a través de un carbono alfa anomérico, y W es una molécula de insulina conjugada con la estructura de conjugado a través del grupo épsilon- amino de Lys^{B29}.

192. Un conjugado de la fórmula (VIa):



VIa

en donde:

- B es - T- L^B- X;

cada ocurrencia de X es independientemente un ligando, que incluye un sacárido;

cada ocurrencia de L^B es independientemente un enlace covalente o un grupo derivado de la conjugación covalente de una T con una X;

- D es - T- L^D- W,

W es un fármaco;

cada ocurrencia de L^D es independientemente un enlace covalente o un grupo derivado de la conjugación covalente de un T con una W;

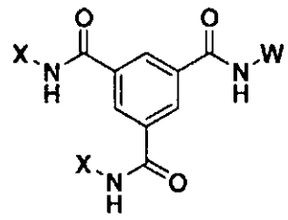
cada ocurrencia de T es independientemente un enlace covalente o una cadena de

hidrocarburos C_{1-30} bivalente, lineal o ramificada, saturada o no saturada, opcionalmente sustituida en donde una o más unidades de metileno de T son opcionalmente e independientemente reemplazadas por - O- , - S- , - N(R)- , - C(O)- , - C(O)O- , - OC(O)- , - N(R)C(O)- , - C(O)N(R)- , - S(O)- , - $S(O)_2$- , - $N(R)SO_2$- , - $SO_2N(R)$- , un grupo heterocíclico, un grupo arilo, o un grupo heteroarilo;

cada ocurrencia de R es independientemente hidrógeno, un grupo protector apropiado, o una fracción de acilo, fracción de arilalquilo, fracción alifática, fracción de arilo, fracción de heteroarilo, o fracción heteroalifática; y

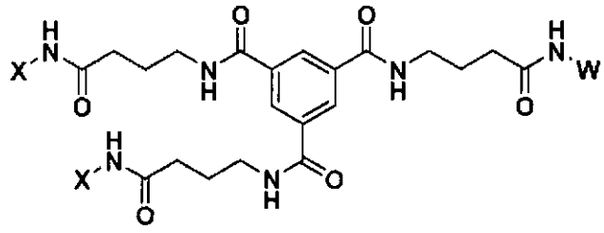
cada ocurrencia de R es independientemente hidrógeno, un grupo protector adecuado, o una fracción acilo, fracción arilalquilo, fracción alifática, fracción alifática, fracción heteroarilo, o fracción heteroalifático.

193. El conjugado de la reivindicación 192, en donde el conjugado es de la fórmula (VIa- 1):



VIa-1

194. El conjugado de la reivindicación 192, en donde el conjugado es de la fórmula (VIa- 2):



VIa-2



VIb

en donde:

- B es - T- L^B- X;

cada ocurrencia de X es independientemente un ligando, que incluye un sacárido;

cada ocurrencia de L^B es independientemente un enlace covalente o un grupo derivado de la conjugación covalente de una T con una X;

- D es - T- L^D- W,

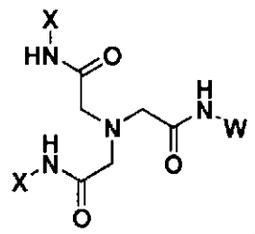
W es un fármaco;

cada ocurrencia de L^D es independientemente un enlace covalente o un grupo derivado de la conjugación covalente de una T con una W;

cada ocurrencia de T es independientemente un enlace covalente o una cadena de hidrocarburos C_{1-30} bivalente, lineal o ramificada, saturada o no saturada, opcionalmente sustituida en donde una o más unidades de metileno de T son opcionalmente e independientemente reemplazadas por - O- , - S- , - N(R)- , - C(O)- , - C(O)O- , - OC(O)- , - N(R)C(O)- , - C(O)N(R)- , - S(O)- , - $S(O)_2$- , - $N(R)SO_2$- , - $SO_2N(R)$- , un grupo heterocíclico, un grupo arilo, o un grupo heteroarilo; y

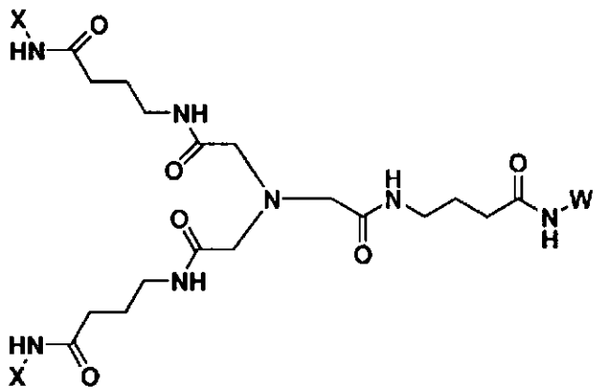
cada ocurrencia de R es independientemente hidrógeno, un grupo protector apropiado, o una fracción de acilo, fracción de arilalquilo, fracción alifática, fracción de arilo, fracción de heteroarilo, o fracción heteroalifática.

197. El conjugado de la reivindicación 196, en donde el conjugado es de la fórmula (VIb- 1):



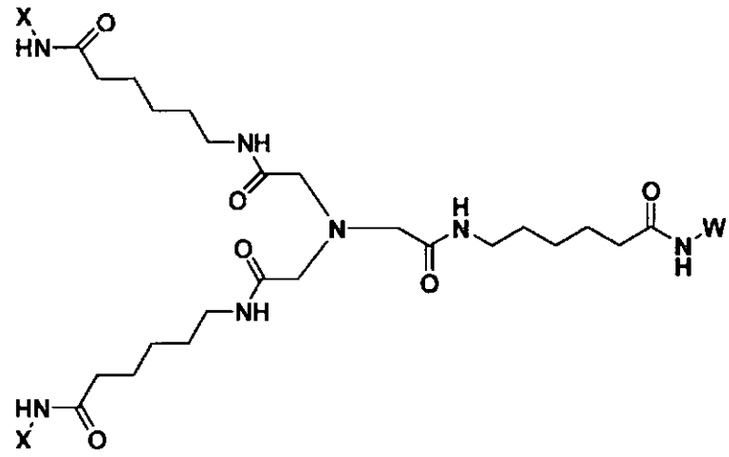
VIb-1

198. El conjugado de la reivindicación 196, en donde el conjugado es de la fórmula (VIb- 2):



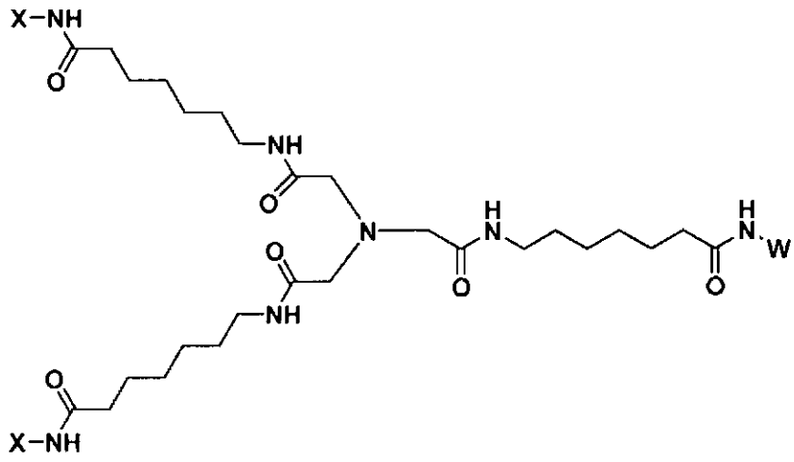
VIb-2

199. El conjugado de la reivindicación 196, en donde el conjugado es de la fórmula (VIb- 3):



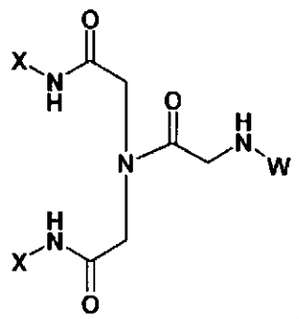
VIb-3

200. El conjugado de la reivindicación 196, en donde el conjugado es de la fórmula (VIb- 4):



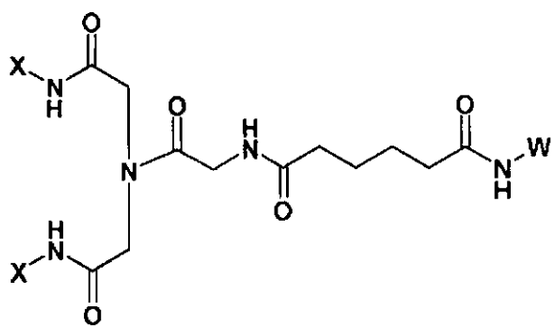
VIb-4

201. El conjugado de la reivindicación 196, en donde el conjugado es de la fórmula (VIb- 5):



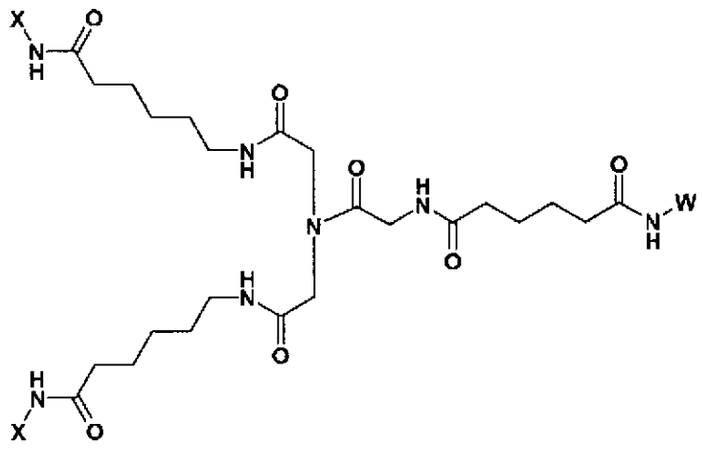
VIb-5

202. El conjugado de la reivindicación 196, en donde el conjugado es de la fórmula (VIb- 6):



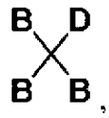
VIb-6

203. El conjugado de la reivindicación 196, en donde el conjugado es de la fórmula (VIb- 7):



VIb-7

204. Un conjugado de la fórmula (VIc):



VIc

en donde:

- B es - T- L^B- X;

cada ocurrencia de X es independientemente un ligando, que incluye un sacárido;

cada ocurrencia de L^B es independientemente un enlace covalente o un grupo derivado de la conjugación covalente de una T con una X;

- D es - T- L^D- W,

W es un fármaco;

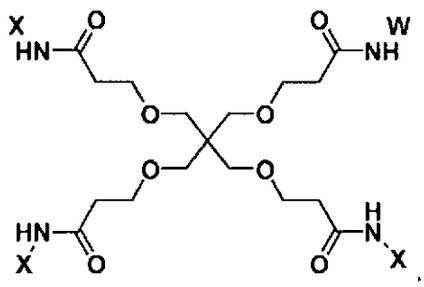
cada ocurrencia de L^D es independientemente un enlace covalente o un grupo derivado de la conjugación covalente de un T con una W;

cada ocurrencia de T es independientemente un enlace covalente o una cadena de hidrocarburos C_{1-30} bivalente, lineal o ramificada, saturada o no saturada, opcionalmente sustituida en donde una o más unidades de metileno de T son opcionalmente e independientemente reemplazadas por - O- , - S- , - N(R)- , - C(O)- , - C(O)O- , - OC(O)- , - N(R)C(O)- , - C(O)N(R)- , - S(O)- , - $S(O)_2$- , -

$N(R)SO_2-$, $-SO_2N(R)-$, un grupo heterocíclico, un grupo arilo, o un grupo heteroarilo; y

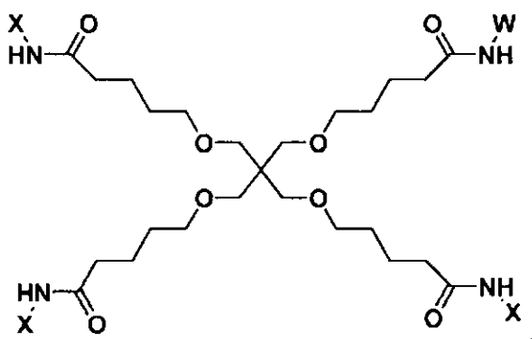
cada ocurrencia de R es independientemente hidrógeno, un grupo protector apropiado, o una fracción de acilo, fracción de arilalquilo, fracción alifática, fracción de arilo, fracción de heteroarilo, o fracción heteroalifática;

205. El conjugado de la reivindicación 204, en donde el conjugado es de la fórmula (VIc- 1):



VIc-1

206. El conjugado de la reivindicación 204, en donde el conjugado es de la fórmula (VIc- 2):



VIc-2

207. El conjugado de la reivindicación 192, 196 o 204, en donde cada ocurrencia de T es independientemente una cadena de hidrocarburos C_{1-20} bivalente, lineal o ramificada, saturada o no saturada, opcionalmente sustituida en donde una o más unidades de metileno de T son

opcionalmente e independientemente reemplazadas por - O- , - S- , - N(R)- , - C(O)- , - C(O)O- , - OC(O)- , - N(R)C(O)- , - C(O)N(R)- , - S(O)- , - $S(O)_2$- , - N(R)SO_2- , - SO_2N(R)- , un grupo heterocíclico, un grupo arilo, o un grupo heteroarilo.

208. El conjugado de la reivindicación 207, en donde uno, dos, tres, cuatro o cinco unidades de metileno de T son opcional e independientemente sustituidas.

209. El conjugado de la reivindicación 207, en donde T es construido a partir de una cadena de hidrocarburos C_{1-10} donde una o más unidades de metileno de T son opcional e independientemente sustituidas por - O- , - S- , - N(R)- , - C(O)- , - C(O)O- , - OC(O)- , - N(R)C(O)- , - C(O)N(R)- , - S(O)- , - $S(O)_2$- , - N(R)SO_2- , - SO_2N(R)- ,un grupo heterocíclico, un grupo arilo o un grupo heteroarilo.

210. El conjugado de la reivindicación 207, en donde una o más unidades de metileno de T se sustituyen por un grupo heterocíclico.

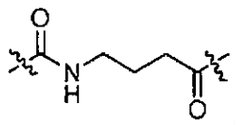
211. El conjugado de la reivindicación 207, en donde una o más unidades de metileno de T se sustituyen por una fracción triazol.

212. El conjugado de la reivindicación 207, en donde una o más unidades de metileno de T se sustituyen por - C(O)- .

213. El conjugado de la reivindicación 207, en donde una o más unidades de metileno de T se sustituyen por - C(O)N(R)- .

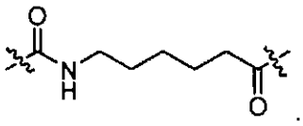
214. El conjugado de la reivindicación 207, en donde una o más unidades de metileno de T se sustituyen por - O- .

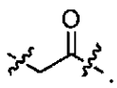
215. El conjugado de la reivindicación 207, en donde T es  .



216. El conjugado de la reivindicación 207, en donde T es

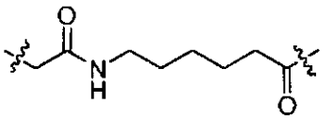
217. El conjugado de la reivindicación 207, en donde T es

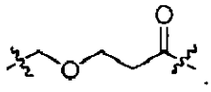




218. El conjugado de la reivindicación 207, en donde T es

219. El conjugado de la reivindicación 207, en donde T es





220. El conjugado de la reivindicación 207, en donde T es

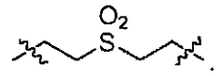
221. El conjugado de la reivindicación 207, en donde cada ocurrencia de T es la misma.

222. El conjugado de la reivindicación 192, 196 o 204, en donde al menos uno entre L^B y L^D es un enlace covalente.

223. El conjugado de la reivindicación 192, 196 o 204, en donde al menos uno entre L^B y L^D es una fracción opcionalmente sustituida derivada de la conjugación de una fracción opcionalmente sustituida reactiva de carbonilo, reactiva de tiol, reactiva de amina, o reactiva de hidroxilo de T con un grupo carboxilo, tiol, amina, o hidroxilo de X o W.

224. El conjugado de la reivindicación 192, 196 o 204, en donde al menos uno entre L^B y L^D es una fracción opcionalmente sustituida derivada de la conjugación de una fracción opcionalmente sustituida reactiva de carbonilo, reactiva de tiol, reactiva de amina, o reactiva de hidroxilo de X o W con un grupo carboxilo, tiol, amino, o hidroxilo de T.

225. El conjugado de la reivindicación 192, 196 o 204, en donde al menos uno entre L^B y L^D es



226. El conjugado de la reivindicación 192, 196 o 204, en donde al menos uno entre L^B y L^D es un grupo succinimida.

227. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 192- 226, en donde el fármaco es un fármaco anti- diabético.

228. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 192- 226, en donde el fármaco es un sensibilizador de insulina.

229. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 192- 226, en donde el fármaco es un secretagogo de insulina.

230. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 192- 226, en donde el fármaco es una molécula de insulina.

231. El conjugado de la reivindicación 230, en donde la molécula de insulina se selecciona del grupo que consta de insulina humana, insulina porcina e insulina bovina.

232. El conjugado de la reivindicación 230, en donde la molécula de insulina se selecciona del grupo formado por insulina lispro, insulina aspart y la insulina glulisina.

233. El conjugado de la reivindicación 230, en donde la molécula de insulina es insulina glargina o insulina detemir.

234. El conjugado de la reivindicación 230, en donde la molécula de insulina incluye tres puentes de disulfuro.

235. El conjugado de la reivindicación 230, en donde la molécula de insulina se conjuga a través del residuo aminoácido A1.

236. El conjugado de la reivindicación 230, en donde la molécula de insulina se conjuga a través del residuo aminoácido B1.

237. El conjugado de la reivindicación 230, en donde la molécula de insulina se conjuga a través del grupo épsilon- amino de Lys^{B29}.

238. El conjugado de la reivindicación 230, en donde la molécula de insulina es insulina glulisina conjugada a través del grupo épsilon- amino de Lys^{B3}.

239. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 192- 226, en donde cada ocurrencia de X es independientemente un ligando, que incluye un sacárido seleccionado entre el grupo formado por glucosa, manosa y L- fucosa.

240. El conjugado de la reivindicación 239, en donde cada ocurrencia de X es independientemente un ligando, que incluye un sacárido seleccionado entre el grupo formado por manosamina y N- acetil manosamina beta- enlazada.

241. El conjugado de la reivindicación 239, en donde cada ocurrencia de X es independientemente un ligando, que incluye un sacárido seleccionado del grupo que consta de metilglucosa, metilmanosa, etilglucosa, etilmanosa, propilglucosa y propilmanosa.

242. El conjugado de la reivindicación 239, en donde cada ocurrencia de X es un ligando que incluye alfa- L- fucopiranosida.

243. El conjugado de la reivindicación 239, en donde cada ocurrencia de X es un ligando que incluye una bimanosa.

244. El conjugado de la reivindicación 239, en donde cada ocurrencia de X es un ligando que incluye una trimanosa.

245. El conjugado de la reivindicación 239, en donde cada ocurrencia de X es un ligando que incluye una trimanosa lineal.

246. El conjugado de la reivindicación 239, en donde cada ocurrencia de X es un ligando que incluye una trimanosa ramificada.

247. El conjugado de la reivindicación 239, en donde cada ocurrencia de X es un ligando que incluye un sacárido y un grupo amina.

248. El conjugado de la reivindicación 247, en donde el sacárido y el grupo amina están separados por un grupo alquilo C_1- C_6.

249. El conjugado de la reivindicación 248, en donde cada ocurrencia de X es independientemente un ligando, que incluye aminoetilglucosa (AEG), aminoetilmanosa (AEM), aminoetilbimanosa (AEBM) o aminoetiltrimanosa (AETM).

250. El conjugado de la reivindicación 249, en donde cada ocurrencia de X es un ligando que incluye aminoetiltrimanosa (AETM).

251. El conjugado de la reivindicación 250, en donde el conjugado incluye dos o tres ocurrencias, en donde X es un ligando que incluye aminoetiltrimanosa (AETM).

252. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 192- 226, en donde cada ocurrencia de X es un ligando que incluye un sacárido que se conjuga a través de un carbono anomérico.

253. El conjugado de la reivindicación 252, en donde el carbono anomérico es un alfa anómero.

254. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 192- 226, en donde cada ocurrencia de X es aminoetiltrimanosa (AETM) conjugada con la estructura conjugada a través de un carbono alfa anomérico, y W es una molécula de insulina conjugada con la estructura de conjugado a través del grupo épsilon- amino de Lys^{B29}

255. Una formulación de liberación sostenida que comprende un conjugado de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

256. La formulación de la reivindicación 255, en donde la formulación exhibe una liberación de orden cero del conjugado cuando se administra a un mamífero bajo condiciones de ayuno.

257. La formulación de la reivindicación 255, en donde la formulación presenta una liberación de orden cero del conjugado cuando se administra por vía subcutánea a un mamífero bajo condiciones de ayuno.

258. La formulación de la reivindicación 255, en donde el fármaco es una molécula de insulina y la formulación comprende protamina y zinc.

259. La formulación de la reivindicación 258, en donde la molécula de insulina se selecciona del grupo que consta de insulina humana, insulina porcina e insulina bovina.

260. La formulación de la reivindicación 258, en donde la molécula de insulina es insulina glargina o insulina detemir.

261. La formulación de la reivindicación 258, en donde la molécula de insulina incluye tres puentes de disulfuro.

262. La formulación de la reivindicación 258, en donde la formulación incluye desde 0,05 a 10 mg aproximadamente de protamina/mg de conjugado.

263. La formulación de la reivindicación 258, en donde la formulación incluye de 1 a 5 mg aproximadamente de protamina/mg de conjugado.

264. La formulación de la reivindicación 258, en donde la formulación incluye de 0,006 a 0.5 mg aproximadamente de zinc/mg de conjugado.

265. La formulación de la reivindicación 258, en donde la formulación incluye de 0.1 a 0,25 aproximadamente mg de zinc/mg de conjugado.

266. La formulación de la reivindicación 258, en donde la formulación incluye protamina y zinc en una relación (peso/peso) en el rango entre 100:1 y 5:01 aproximadamente.

267. La formulación de la reivindicación 258, en donde la formulación incluye protamina y zinc en una relación (peso/peso) en el rango entre 40:1 y 10:1 aproximadamente.

268. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones 258- 267, en donde la formulación comprende además un conservante antimicrobiano.

269. La formulación de la reivindicación 268, en donde el conservante antimicrobiano se selecciona del grupo que consta de m- cresol, fenol, metilparabeno y propilparabeno.

270. La formulación de la reivindicación 268, en donde el conservante antimicrobiano es m- cresol.

271. La formulación de la reivindicación 270, en donde la formulación comprende entre 0.1 y 1.0% v/v aproximadamente de m- cresol.

272. La formulación de la reivindicación 270, en donde la formulación comprende entre 0.15 y 0,35% v/v aproximadamente de m- cresol.

273. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones 258- 267, en donde la formulación comprende además un agente isotónico.

274. La formulación de la reivindicación 273, en donde el agente isotónico es un poliol.

275. La formulación de la reivindicación 274, en donde el agente isotónico se selecciona del grupo formado por manitol, glicol de propileno y glicerol.

276. La formulación de la reivindicación 275, en donde el agente isotónico es el glicerol.

277. La formulación de la reivindicación 273, en donde el agente isotónico es una sal.

278. La formulación de la reivindicación 277, en donde la sal es NaCl.

279. La formulación de la reivindicación 278, en donde la formulación comprende entre 0,05 y 0.5 M aproximadamente de NaCl.

280. La formulación de la reivindicación 278, en donde la formulación comprende entre 0.1 y 0,2 M aproximadamente de NaCl.

281. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones 258- 267, en donde la formulación comprende además una cantidad de la molécula de insulina sin conjugar.

282. La formulación de la reivindicación 281, en donde la formulación comprende una proporción molar de la molécula de insulina conjugada a una molécula de insulina sin conjugar en el rango entre 100:1 y 01:01 aproximadamente.

283. La formulación de la reivindicación 281, en donde la formulación comprende una proporción molar de la molécula de insulina conjugada a una molécula de insulina sin conjugar en el rango entre 25:1 y 2:1 aproximadamente.

284. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones 255- 283, en donde el conjugado es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 327- 350.

285. Un sistema de entrega de bomba que comprende un conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1- 254, en donde el sistema de entrega de bomba opera mediante infusión del conjugado en un mamífero.

286. La bomba de la reivindicación 285, en donde la bomba opera mediante infusión del conjugado por vía intravenosa, subcutánea o intraperitoneal.

287. La bomba de la reivindicación 285, en donde el conjugado es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 327- 350.

288. Un método de tratamiento de hiperglicemia el cual comprende administrar una formulación de cualquiera de las reivindicaciones 255- 284 a un paciente mamífero en necesidad del mismo.

289. El método de la reivindicación 288, en donde el paciente es diabético.

290. El método de la reivindicación 288, en donde el paciente tiene una infección asociada con control glicémico deteriorado.

291. El método de la reivindicación 288, en donde la formulación no incluye una lectina.

292. El método de la reivindicación 288, en donde la formulación se administra mediante inyección subcutánea.

293. El método de la reivindicación 288, en donde el paciente es un ser humano.

294. El método de la reivindicación 288, en donde el fármaco es un fármaco anti-diabético.

295. El método de la reivindicación 288, en donde el fármaco es un sensibilizador de insulina.

296. El método de la reivindicación 288, en donde el fármaco es un secretagogo de insulina.

297. El método de la reivindicación 288, en donde el fármaco es una molécula de insulina.

298. El método de la reivindicación 297, en donde el conjugado se administra de manera tal que la dosis diaria promedio de la molécula de insulina está en el rango entre 10 y 200 U.

299. El método de la reivindicación 298, en donde el conjugado se administra diariamente.

300. El método de la reivindicación 298, en donde el conjugado se administra semanalmente.

301. El método de la reivindicación 298, en donde el conjugado se administra mensualmente.

302. El método de la reivindicación 298, en donde el paciente también está recibiendo un sensibilizador de insulina.

303. El método de la reivindicación 298, en donde el paciente también está recibiendo un secretagogo de insulina.

304. El método de cualquiera de las reivindicaciones 288- 303, en donde la formulación no incluye una lectina.

305. El método de cualquiera de las reivindicaciones 288- 304, en donde el conjugado es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 327- 350.

306. Un método que comprende la administración de un conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1- 254 a un paciente mamífero que lo necesite.

307. El método de la reivindicación 306, en donde el fármaco es una molécula de insulina.

308. El método de la reivindicación 307, en donde el conjugado induce menos hipoglicemia que una versión sin conjugar de la molécula de insulina.

309. El método de la reivindicación 307 o 308, en donde el conjugado es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 327- 350.

310. Un método que comprende la administración de una formulación de cualquiera de las reivindicaciones 255- 283 a un paciente mamífero que lo necesite.

311. El método de la reivindicación 310, en donde el fármaco es una molécula de insulina.

312. El método de la reivindicación 311, en donde la formulación induce menos hipoglicemia que una formulación que comprende una versión sin conjugar de la molécula de insulina.

313. El método de la reivindicación 311, en donde la formulación induce un HbALc menor que una formulación que comprende una versión sin conjugar de la molécula de insulina.

314. El método de cualquiera de las reivindicaciones 311- 313, en donde el conjugado es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 327- 350.

315. El método de cualquiera de las reivindicaciones 306- 314, que comprende además administrar una cantidad activadora de un sacárido exógeno al paciente.

316. El método de la reivindicación 315, en donde el sacárido exógeno es manosa.

317. El método de la reivindicación 315, en donde el sacárido exógeno es L- fucosa.

318. El método de la reivindicación 315, en donde el sacárido exógeno es N- acetil glucosamina.

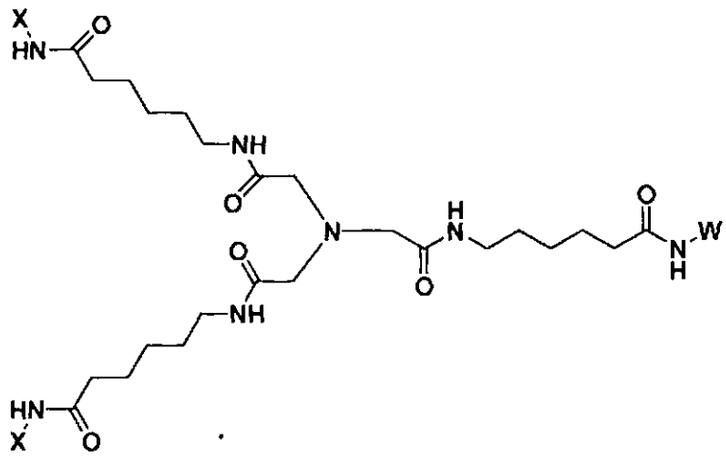
319. El método de la reivindicación 315, en donde el sacárido exógeno es alfa- metil manosa.

320. El método de la reivindicación 315, en donde el conjugado o la formulación y el sacárido exógeno son administrados al mamífero a través de diferentes rutas.

321. El método de la reivindicación 320, en donde el conjugado o la formulación se administra por vía subcutánea y el sacárido exógeno se administra por vía oral.

322. El método de la reivindicación 320, en donde el conjugado o la formulación se administra por vía subcutánea y el sacárido exógeno se administra por vía intravenosa.

323. Un conjugado de la fórmula (VIb- 3):

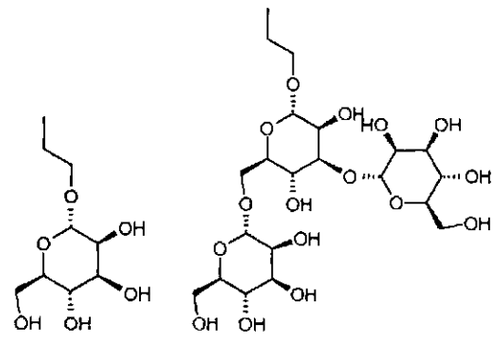


VIb-3

en donde:

W es una molécula de insulina,

y cada ocurrencia de - X es



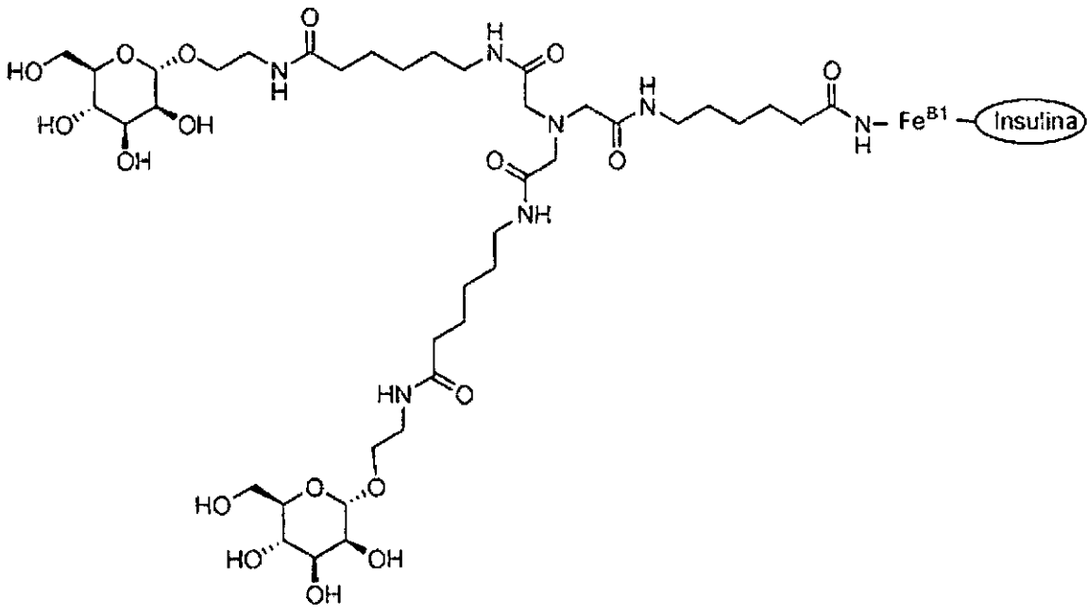
o

324. El conjugado de la reivindicación 323, en donde la molécula de insulina se selecciona del grupo que consta de insulina humana, insulina porcina e insulina bovina.

325. El conjugado de la reivindicación 323, en donde la molécula de insulina es insulina glargina o insulina detemir.

326. El conjugado de la reivindicación 323, en donde la molécula de insulina incluye tres puentes de disulfuro.

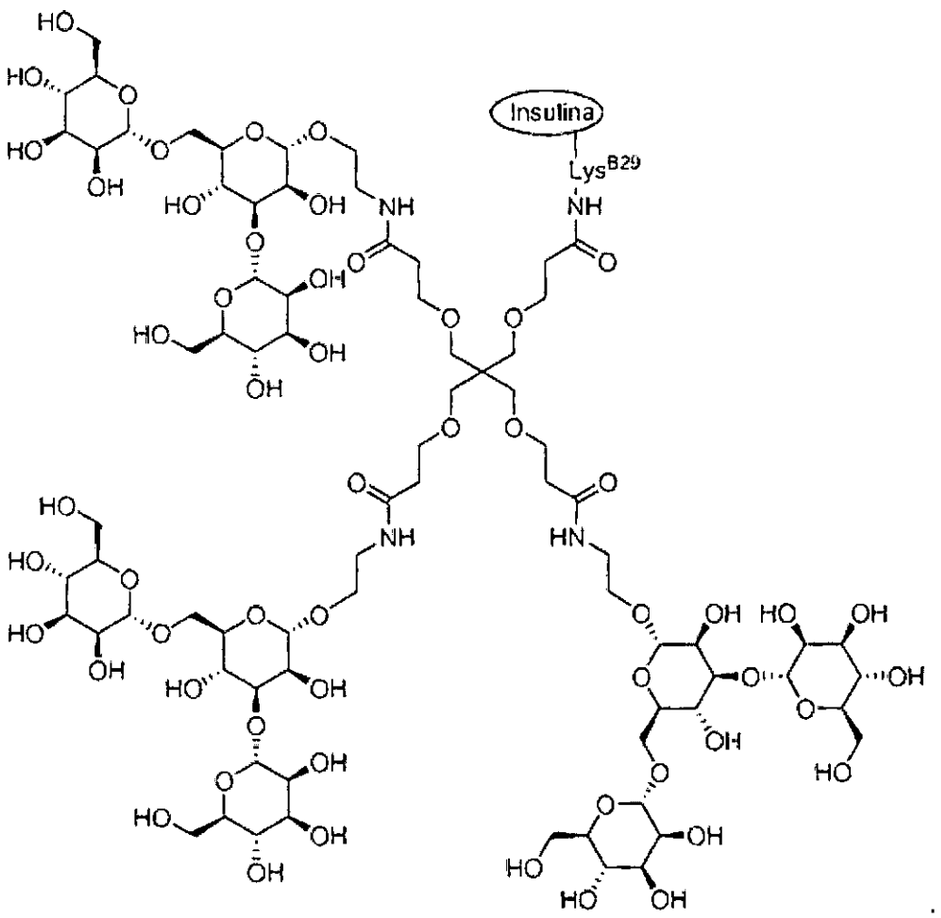
327. Un conjugado de la fórmula:



I-1

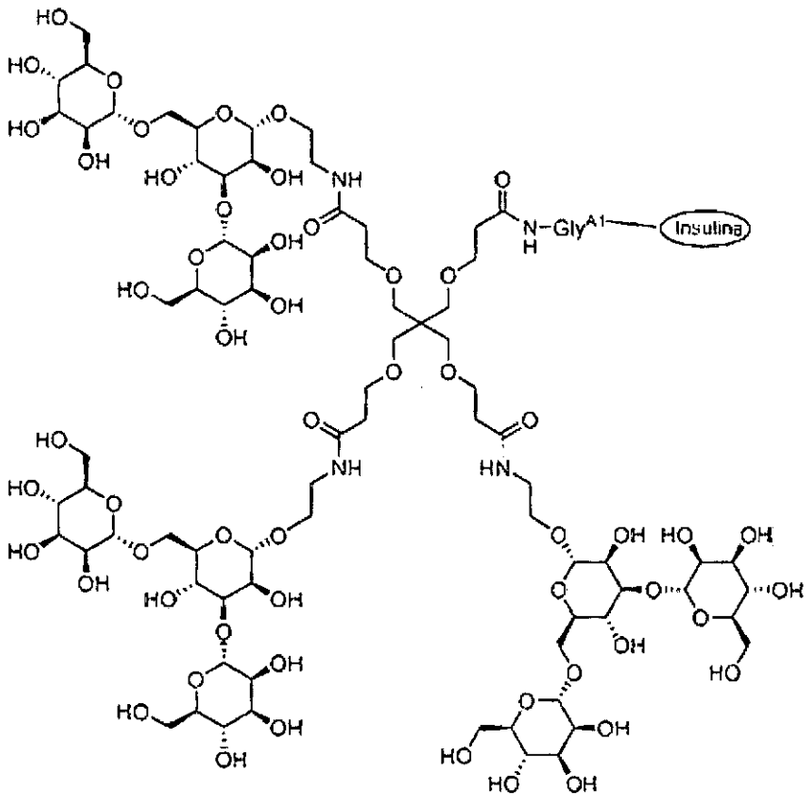
328. Un conjugado de la fórmula:

337. Un conjugado de la fórmula:



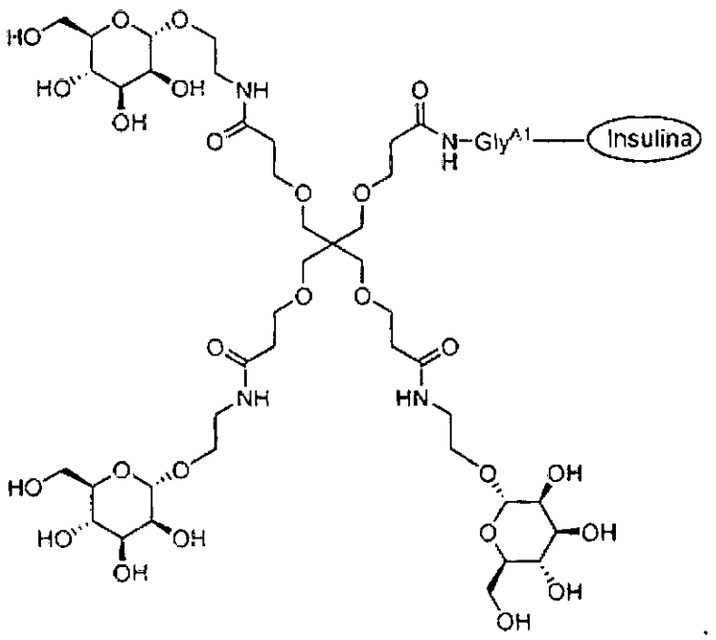
I-11

338. Un conjugado de la fórmula:



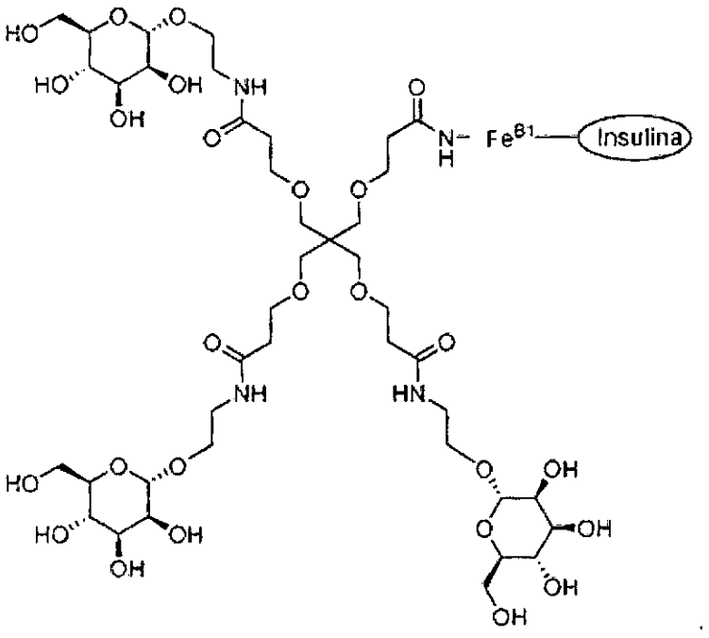
I-14

341. Un conjugado de la fórmula:



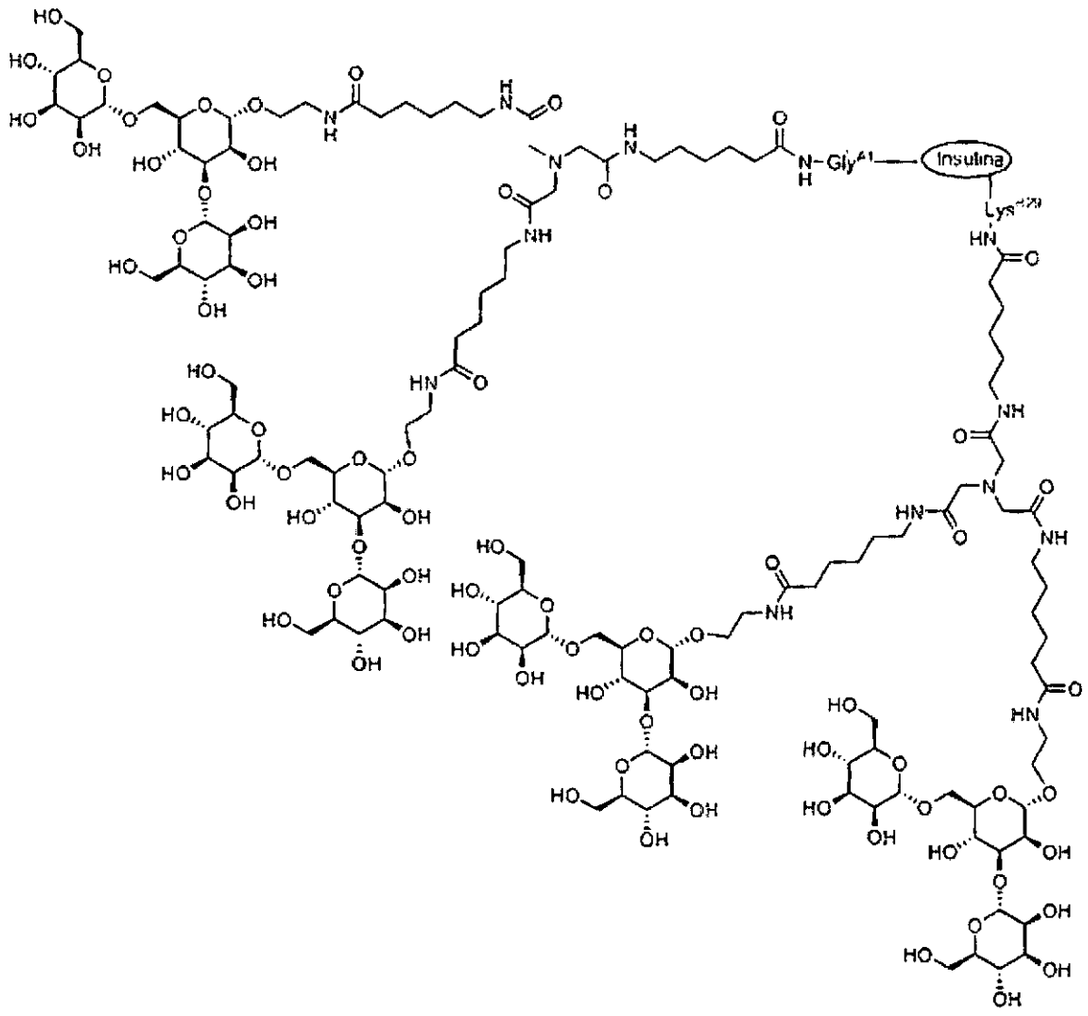
I-15

342. Un conjugado de la fórmula:



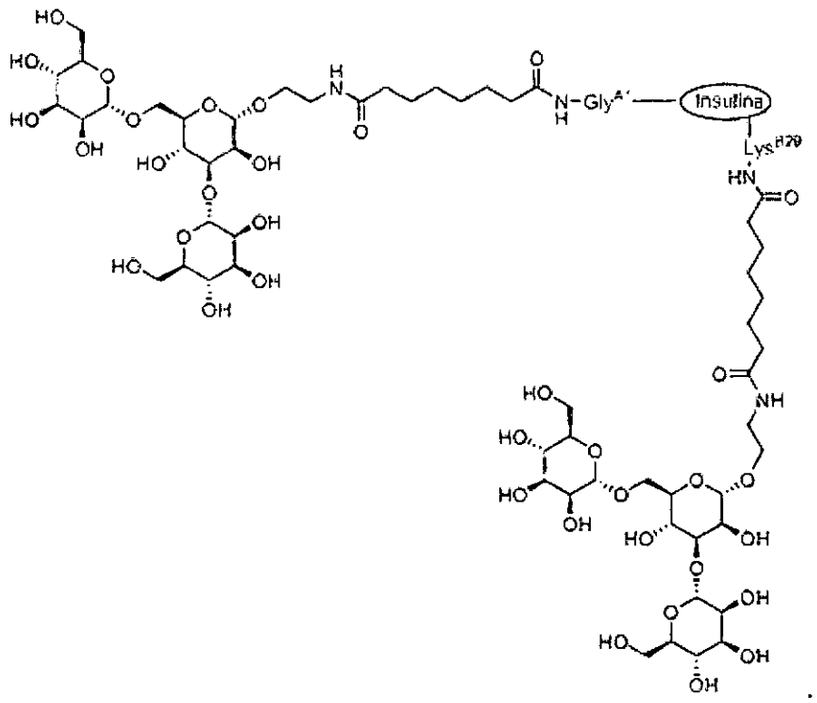
I-16

345. Un conjugado de la fórmula:



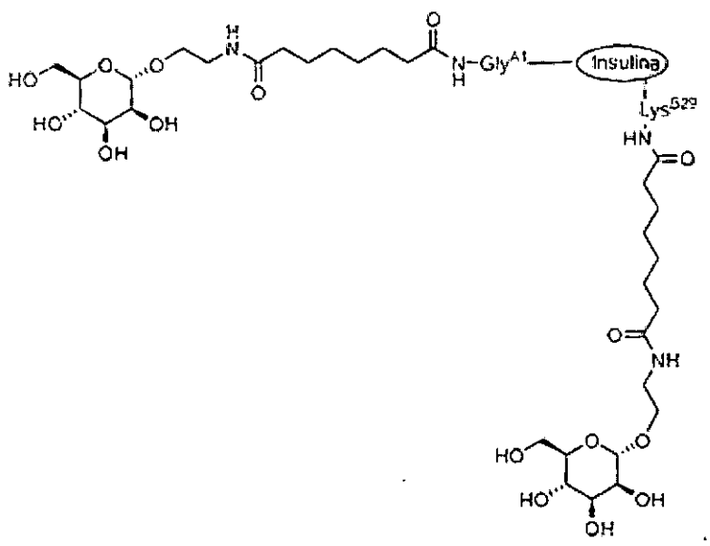
II-2

346. Un conjugado de la fórmula:



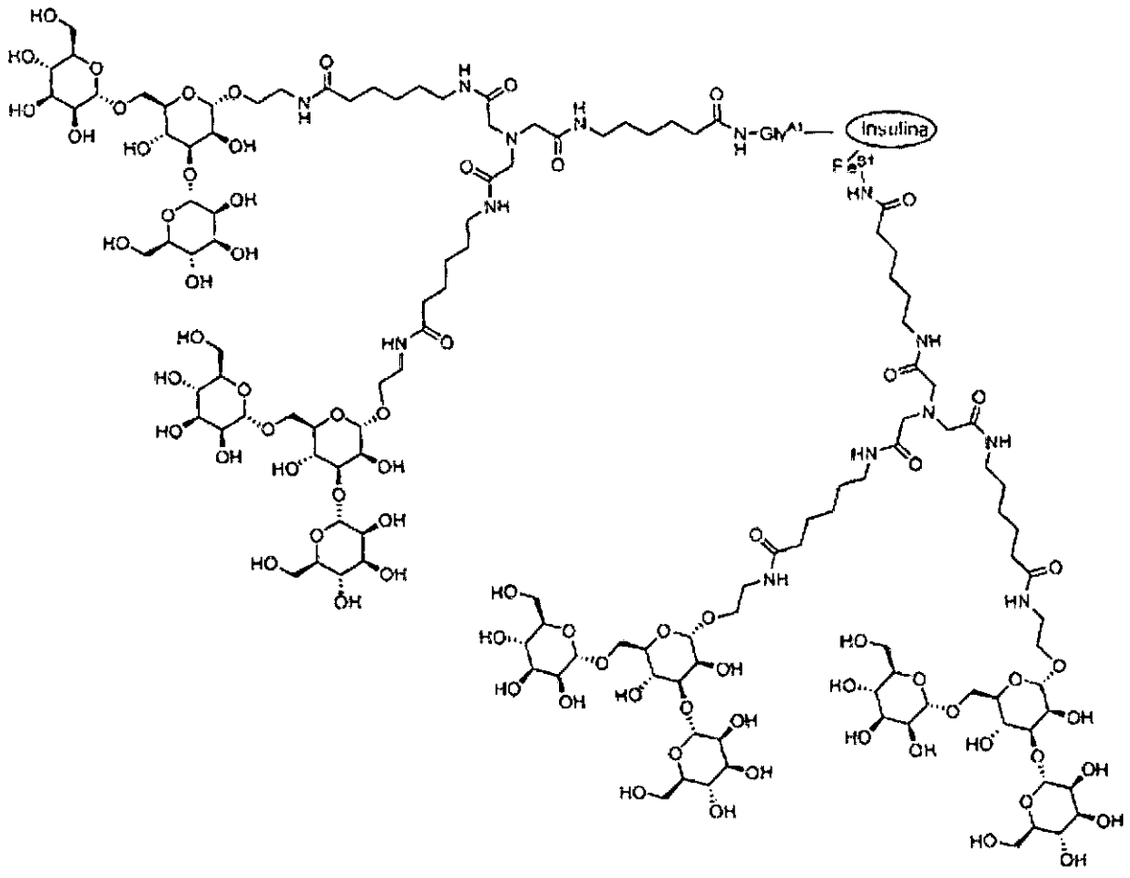
II-3

347. Un conjugado de la fórmula:



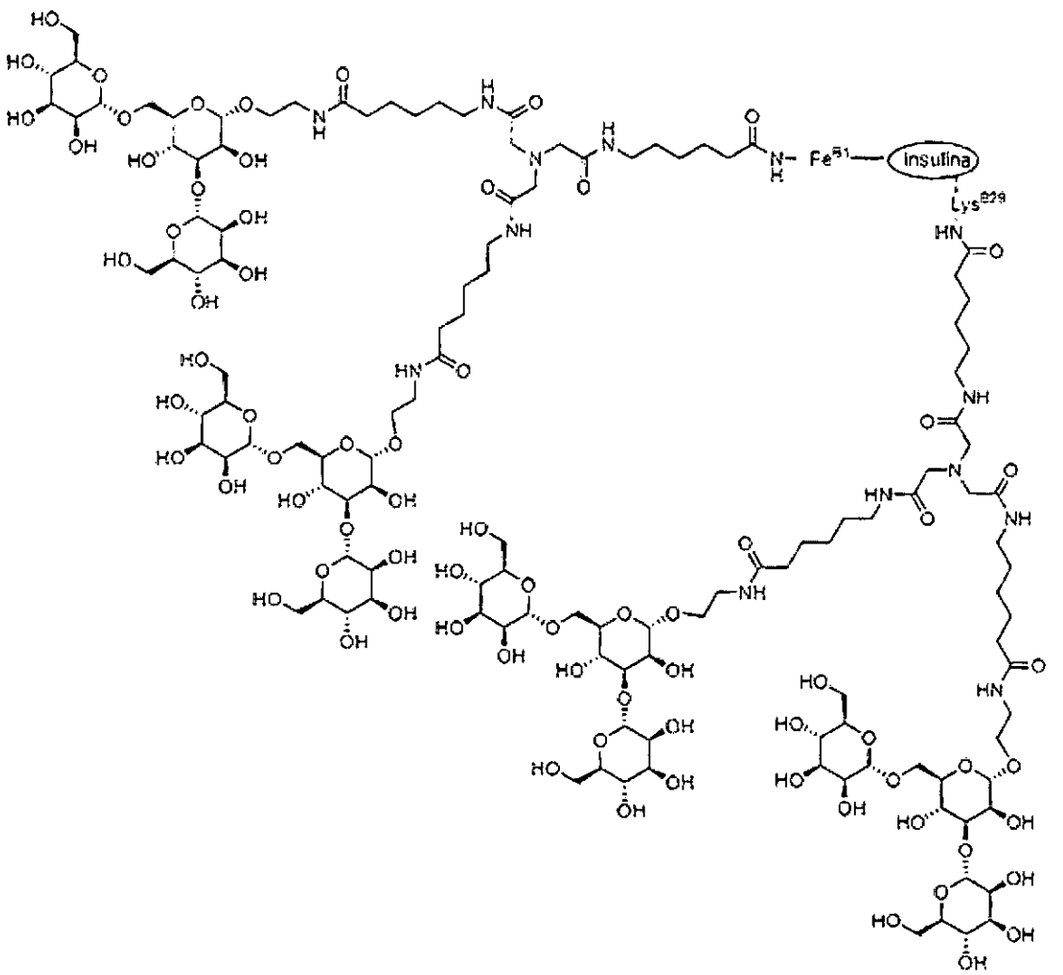
II-4

348. Un conjugado de la fórmula:



II-5

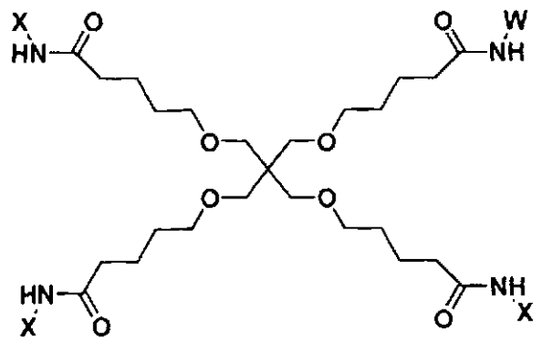
349. Un conjugado de la fórmula:



II-6

350. Un conjugado de la fórmula:

351. Un conjugado de la fórmula (VIc- 2):

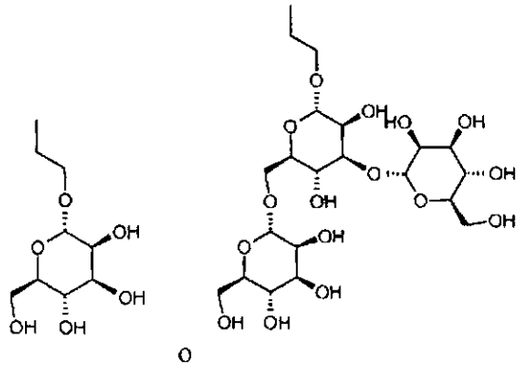


VIc-2

en donde:

W es una molécula de insulina, y

cada ocurrencia de - X es

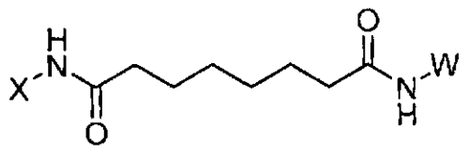


352. El conjugado de la reivindicación 351, en donde la molécula de insulina se selecciona del grupo que consta de insulina humana, insulina porcina e insulina bovina.

353. El conjugado de la reivindicación 351, en donde la molécula de insulina es insulina glargina o insulina detemir.

354. El conjugado de la reivindicación 351, en donde la molécula de insulina incluye tres puentes de disulfuro.

355. Un conjugado de la fórmula (VId- 1):

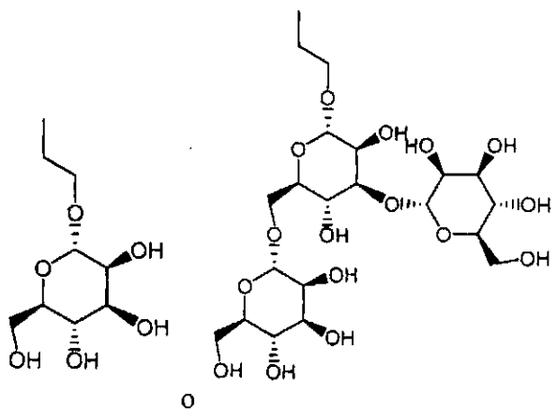


VId-1

en donde:

W es una molécula de insulina, y

- X es



o

356. El conjugado de la reivindicación 355, en donde la molécula de insulina se selecciona del grupo que consta de insulina humana, insulina porcina e insulina bovina.

357. El conjugado de la reivindicación 355, en donde la molécula de insulina es insulina glargina o insulina detemir.

358. El conjugado de la reivindicación 355, en donde la molécula de insulina incluye tres puentes de disulfuro.

359. Una formulación de liberación sostenida que comprende el conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 327- 350, en donde la formulación comprende protamina y zinc.

360. La formulación de la reivindicación 359, en donde la formulación incluye:
entre 1 y 5 mg aproximadamente de protamina/mg de conjugado, y
entre 0.1 y 0,25 mg aproximadamente de zinc/mg de conjugado.

361. La formulación de la reivindicación 359, en donde la formulación incluye protamina y zinc en una relación (peso/peso) en el rango entre 40:1 y 10:1 aproximadamente.

362. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones 359- 361, en donde la formulación comprende además una cantidad de la molécula de insulina sin conjugar.

363. La formulación de la reivindicación 362, en donde la formulación comprende una proporción molar de la molécula de insulina conjugada a una molécula de insulina sin conjugar en el rango entre 25:1 y 2:1 aproximadamente.

364. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones 359- 363, en donde la formulación comprende además un conservante antimicrobiano.

365. La formulación de la reivindicación 364, en donde el conservante antimicrobiano es m- cresol.

366. La formulación de la reivindicación 365, en donde la formulación comprende de 0.15 a 0,35% v/v aproximadamente de m- cresol.

367. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones 359- 366, en donde la formulación comprende además un agente isotónico.

368. La formulación de la reivindicación 367, en donde el agente isotónico es glicerol.

369. La formulación de la reivindicación 367, en donde el agente isotónico es NaCl.

370. La formulación de la reivindicación 369, en donde la formulación comprende de 0.1 a 0,2 M aproximadamente de NaCl.

371. La formulación de la reivindicación 359, en donde la formulación comprende además una cantidad de la molécula de insulina sin conjugar.

372. La formulación de la reivindicación 371, en donde la formulación comprende una proporción molar de la molécula de insulina conjugada a una molécula de insulina sin conjugar en el rango entre 25:1 y 2:1 aproximadamente.

373. La formulación de la reivindicación 372, en donde la formulación comprende además un conservante antimicrobiano.

374. La formulación de la reivindicación 373, en donde el conservante antimicrobiano es m- cresol.

375. La formulación de la reivindicación 374, en donde la formulación comprende de 0.15 a 0,35% v/v aproximadamente de m- cresol.

376. La formulación de la reivindicación 375, en donde la formulación comprende además un agente isotónico.

377. La formulación de la reivindicación 376, en donde el agente isotónico es glicerol.

378. La formulación de la reivindicación 376, en donde el agente isotónico es NaCl.

379. La formulación de la reivindicación 378, en donde la formulación comprende de 0.1 a 0,2 M aproximadamente de NaCl.

380. Una formulación de liberación sostenida que comprende el conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 327- 350, en donde la formulación comprende:

3,6 mg de protamina /mg de conjugado aproximadamente, y

0,2 mg de zinc /mg de conjugado aproximadamente.

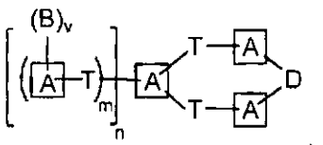
381. La formulación de la reivindicación 380, en donde la formulación comprende además una cantidad de la molécula de insulina sin conjugar, y la relación molar de la molécula de insulina conjugada a una molécula de insulina sin conjugar es de 5:1 aproximadamente.

382. La formulación de la reivindicación 381, en donde la formulación comprende además un 0,2% v/v aproximadamente de m- cresol.

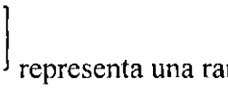
383. La formulación de la reivindicación 382, en donde la formulación comprende además glicerol.

384. La formulación de la reivindicación 382, en donde la formulación comprende además 0.15 M aproximadamente de NaCl.

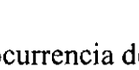
385. Un conjugado de la fórmula (VIII):



VIII

cada ocurrencia de  representa una ramificación potencial dentro de la

conjugación;

cada ocurrencia de  representa una repetición potencial dentro de una ramificación de la conjugación;

cada ocurrencia de  es independientemente un enlace covalente, un átomo de carbono, un heteroátomo o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado del grupo formado por acilo, alifáticos, heteroalifático, arilo, heteroarilo y heterocíclico;

cada ocurrencia de T es independientemente un enlace covalente o una cadena de hidrocarburos C_{1-30} bivalente, lineal o ramificada, saturada o no saturada, opcionalmente sustituida en donde una o más unidades de metileno de T son opcionalmente e independientemente reemplazadas por - O- , - S- , - N(R)- , - C(O)- , - C(O)O- , - OC(O)- , - N(R)C(O)- , - C(O)N(R)- , - S(O)- , - $S(O)_2$- , - $N(R)SO_2$- , - $SO_2N(R)$- , un grupo heterocíclico, un grupo arilo, o un grupo heteroarilo;

cada ocurrencia de R es independientemente hidrógeno, un grupo protector apropiado, o una fracción de acilo, fracción de arilalquilo, fracción alifática, fracción de arilo, fracción de heteroarilo, o fracción heteroalifática;

- B es - T- L^B- X;

cada ocurrencia de X es independientemente un ligando, que incluye un sacárido;

cada ocurrencia de L^B es independientemente un enlace covalente o un grupo derivado de la conjugación covalente de una T con una X;

- D es - T- L^D- W;

cada ocurrencia de W es independientemente un fármaco;

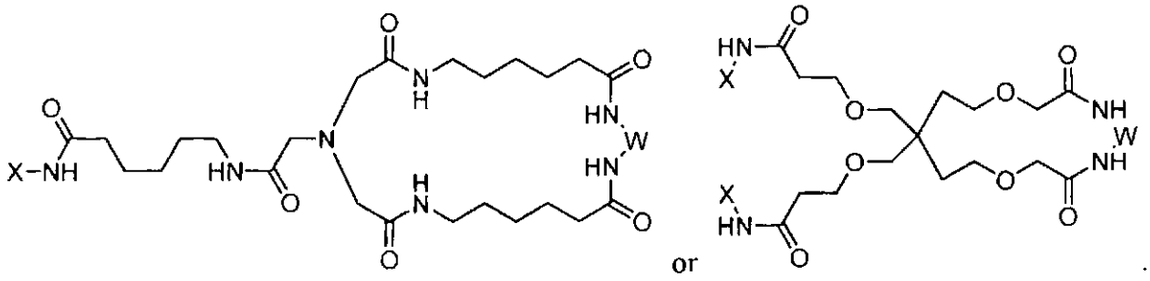
cada ocurrencia de L^D es independientemente un enlace covalente o un grupo derivado de la conjugación covalente de una T con una W,

cada ocurrencia de n es independientemente un entero de 0 a 5, inclusive,

cada ocurrencia de m es independientemente un entero de 1 a 5, inclusive, y

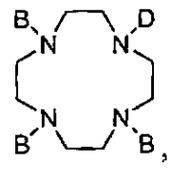
cada ocurrencia de v es independientemente un entero de 0 a 5, inclusive, con la salvedad de que al menos una ocurrencia de n es ≥ 1 y por lo menos una ocurrencia de v es ≥ 1.

386. El conjugado de la reivindicación 385, en donde el conjugado es de la fórmula:



or

387. Un conjugado de la fórmula (IX):



IX

en donde:

- B es - T- L^B- X;

cada ocurrencia de T es independientemente un enlace covalente o una cadena de hidrocarburos C_{1-30} bivalente, lineal o ramificada, saturada o no saturada, opcionalmente sustituida en donde una o más unidades de metileno de T son opcionalmente e independientemente reemplazadas por - O- , - S- , - N(R)- , - C(O)- , - C(O)O- , - OC(O)- , - N(R)C(O)- , - C(O)N(R)- , - S(O)- , - $S(O)_2$- , - $N(R)SO_2$- , - $SO_2N(R)$- , un grupo heterocíclico, un grupo arilo, o un grupo heteroarilo;

cada ocurrencia de R es independientemente hidrógeno, un grupo protector apropiado, o una fracción de acilo, fracción de arilalquilo, fracción alifática, fracción de arilo, fracción de heteroarilo, o fracción heteroalifática;

cada ocurrencia de X es independientemente un ligando, que incluye un sacárido;

cada ocurrencia de L^B es independientemente un enlace covalente o un grupo derivado de la conjugación covalente de una T con una X;

- D es - T- L^D- W;

cada ocurrencia de W es independientemente un fármaco, y

cada ocurrencia de L^D es independientemente un enlace covalente o un grupo derivado de la conjugación covalente de una T con una W.

388. Un conjugado que comprende una molécula de insulina conjugada con uno o más ligandos que se seleccionan independientemente del grupo que consta de aminoetilglucosa (AEG), aminoetilmanosa (AEM), aminoetilbimanosa (AEBM), aminoetiltrimanosa (AETM), ß- aminoetil- N- acetilglucosamina (AEGA), y aminoetilfucosa (AFI).

389. El conjugado de la reivindicación 388, en donde la molécula de insulina se conjuga a través del residuo aminoácido A1.

390. El conjugado de la reivindicación 388, en donde la molécula de insulina se conjuga a través del residuo aminoácido Bl.

391. El conjugado de la reivindicación 388, en donde la molécula de insulina se conjuga a través del grupo épsilon- amino de Lys^{B29}

392. El conjugado de la reivindicación 388, en donde la molécula de insulina es insulina glulisina conjugada a través del grupo épsilon- amino de Lys^{B3}.

393. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 389- 392, en donde uno o más ligandos son aminoetilglucosa (AEG).

394. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 389- 392, en donde uno o más ligandos son aminoetilmanosa (AEM).

395. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 389- 392, en donde uno o más ligandos son aminoetilbimanosa (AEBM).

396. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 389- 392, en donde uno o más ligandos son aminoetiltrimanosa (AETM).

397. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 389- 392, en donde uno o más ligandos son β- aminoetil- N- acetilglucosamina (AEGA).

398. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 389- 392, en donde uno o más ligandos son aminoetilfucosa (AFI).

399. El conjugado de la reivindicación 388, en donde la molécula de insulina se conjuga con dos o más ligandos diferentes.

400. El conjugado de la reivindicación 399, en donde la molécula de insulina se conjuga con dos ligandos separados.

401. El conjugado de la reivindicación 399, en donde la molécula de insulina se conjuga con tres ligandos separados.

402. El conjugado de la reivindicación 399, en donde la molécula de insulina se conjuga con cuatro ligandos separados.

403. El conjugado de la reivindicación 399, en donde dos o más ligandos separados son conjugados con una única estructura conjugada que también se conjugan con la molécula de insulina.

404. El conjugado de la reivindicación 399, en donde los dos o más ligandos separados y la molécula de insulina están cada uno localizados sobre una ramificación separada de una única estructura ramificada de conjugado.

405. El conjugado de la reivindicación 404, en donde los dos o más ligandos separados y la molécula de insulina se localizan sobre los extremos de las distintas ramificaciones de una única estructura ramificada de conjugado.

406. El conjugado de la reivindicación 399, en donde los dos o más ligandos separados se conjugan con la molécula de insulina a través de dos o más puntos de conjugación diferentes.

407. El conjugado de la reivindicación 406, en donde la molécula de insulina se conjuga a través del residuo aminoácido A1 y el grupo épsilon- amino de Lys^{B29}.

408. El conjugado de la reivindicación 407, en donde la molécula de insulina se conjuga con dos estructuras conjugadas diferentes que son conjugadas cada una con dos o más ligandos diferentes.

409. El conjugado de la reivindicación 407, en donde la molécula de insulina se conjuga con dos estructuras de conjugado separadas las cuales son conjugadas cada una con un ligando.

410. El conjugado de la reivindicación 407, en donde la molécula de insulina se conjuga con dos estructuras de conjugado ramificadas separadas las cuales son conjugadas cada una con dos ligandos.

411. El conjugado de la reivindicación 410, en donde los ligandos se encuentran en ramificaciones diferentes de las estructuras ramificadas de conjugado.

412. El conjugado de la reivindicación 411, en donde los ligandos se encuentran en extremos de ramificaciones diferentes de las estructuras ramificadas de conjugado.

413. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 399- 412, en donde los dos o más ligandos diferentes son aminoetilglucosa (AEG).

414. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 399- 412, en donde los dos o más ligandos diferentes son aminoetilmanosa (AEM).

415. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 399- 412, en donde los dos o más ligandos diferentes son aminoetilbimanosa (AEBM).

416. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 399- 412, en donde los dos o más ligandos diferentes son aminoetiltrimanosa (AETM).

417. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 399- 412, en donde los dos o más ligandos diferentes son β- aminoetil- N- acetilglucosamina (AEGA).

418. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 399- 412, en donde los dos o más ligandos diferentes son aminoetilfucosa (AFI).

419. Un conjugado que comprende una molécula de insulina conjugada con aminoetilglucosa (AEG).

420. Un conjugado que comprende una molécula de insulina conjugada con aminoetilmanosa (AEM).

421. Un conjugado que comprende una molécula de insulina conjugada con aminoetilbimanosa (AEBM).

422. Un conjugado que comprende una molécula de insulina conjugada con aminoetiltrimanosa (AETM).

423. Un conjugado que comprende una molécula de insulina conjugada con β- aminoetil- N- acetilglucosamina (AEGA).

424. Un conjugado que comprende una molécula de insulina conjugada con aminoetilfucosa (AFI).

425. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 419- 424, en donde la molécula de insulina se conjuga a través del residuo aminoácido A1.

426. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 419- 424, en donde la molécula de insulina se conjuga a través del residuo aminoácido B1.

427. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 419- 424, en donde la molécula de insulina se conjuga a través del grupo épsilon- amino de Lys^{B29}.

428. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 419- 424, en donde la molécula de insulina es insulina glulisina conjugada a través del grupo épsilon- amino de Lys^{B3}.

429. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 419- 424, en donde la molécula de insulina se conjuga a través del residuo aminoácido A1 y el grupo épsilon-amino de Lys^{B29}.

FIGURA 1

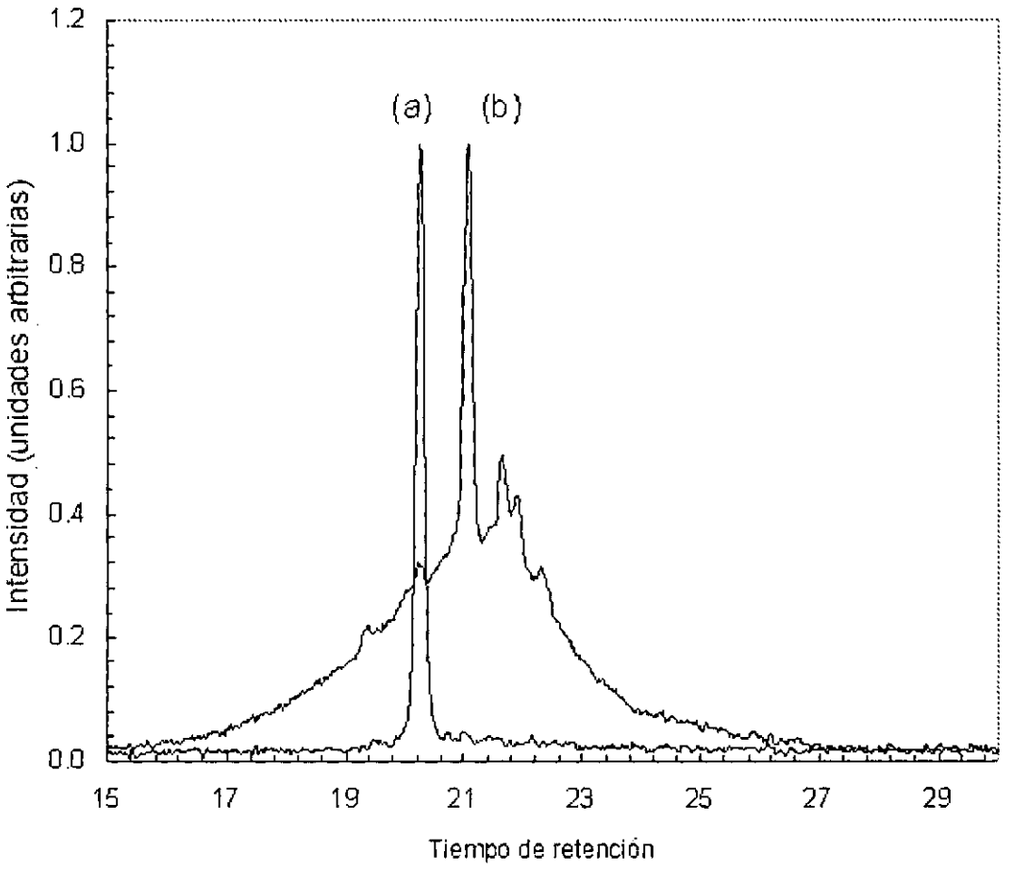

1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Intensidad (unidades arbitrarias)
(a)
(b)
15
17
19
21
23
25
27
29
Tiempo de retención

FIGURA 2

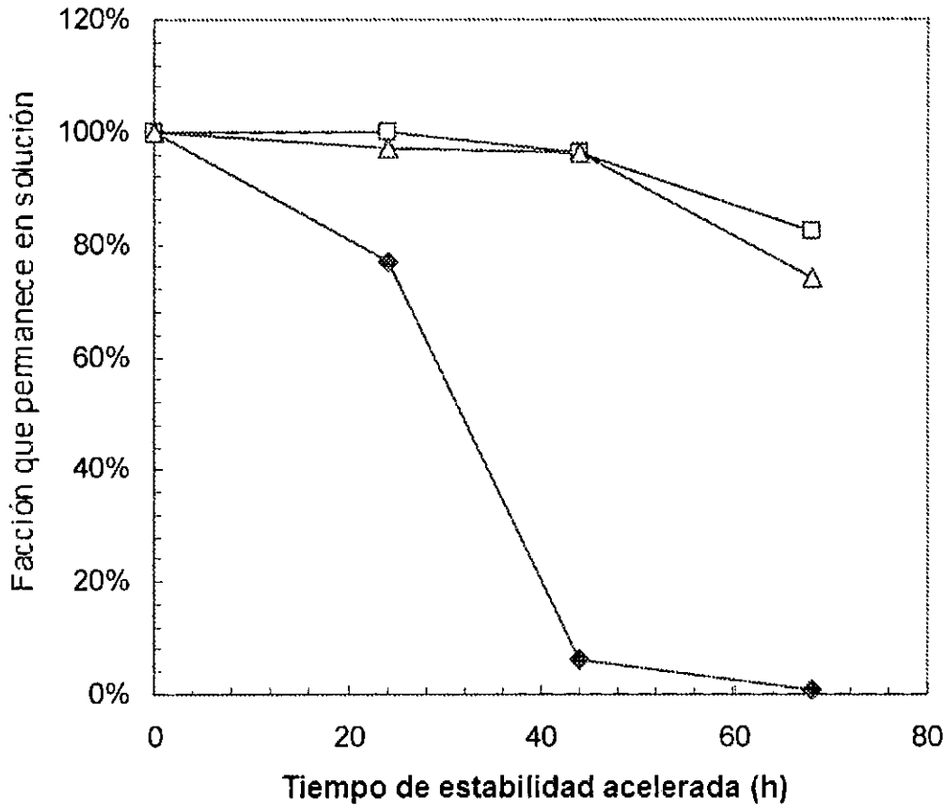

120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
Fracción que permanece en solución
0
20
40
60
80
Tiempo de estabilidad acelerada (h)

FIGURA 3

(a) ICP Tiempo pico de retención, %Insulina libre, y %Desamido insulina

Ejemplo	Pico 1 RT[1] (min)	Pico 2 RT (min)	Pico 3 RT (min)	% Pureza IPC	% Libre insulina	% Desamido insulina
HS-1-60-1 (Puro)	20.62	-	-	>99	<0.1	<0.1
HS-1-60-1 (AST, PBS)	20.61	19.19	-	85	<0.1	<0.1
HS-1-60-1 (AST, HEPES)	20.65	-	-	>99	<0.1	<0.1
TL-13-85 (Puro)	20.46	-	-	>99	<0.1	<0.1
TL-13-85 (AST, PBS)	20.40	19.84	18.91	30	<0.1	<0.1
TL-13-85 (AST, HEPES)	20.46	-	-	>99	<0.1	<0.1

[1]C8 columna de fase inversa, agua: acetonitrilo (0.1% TFA) gradiente de elución. RT= tiempo de retención

(b) Datos de espectrometría de masas sobre IPC's y los productos de descomposición del IPC

Ejemplo	Pico 1 MW (Da)	Pico 2 MW (Da)	Pico 3 MW (Da)
HS-1-60-1 (Puro)	6730 [2]	-	-
HS-1-60-1 (AST, PBS)	6730	5947	-
HS-1-60-1 (AST, HEPES)	6730	-	-
TL-13-85 (Puro)	6829 [2]	-	-
TL-13-85 (AST, PBS)	6829	5944	7928
TL-13-85 (AST, HEPES)	6829	-	-

[2]Los dos IPCs que se muestran tienen estructuras diferentes y, por tanto, diferentes pesos moleculares

FIGURA 4

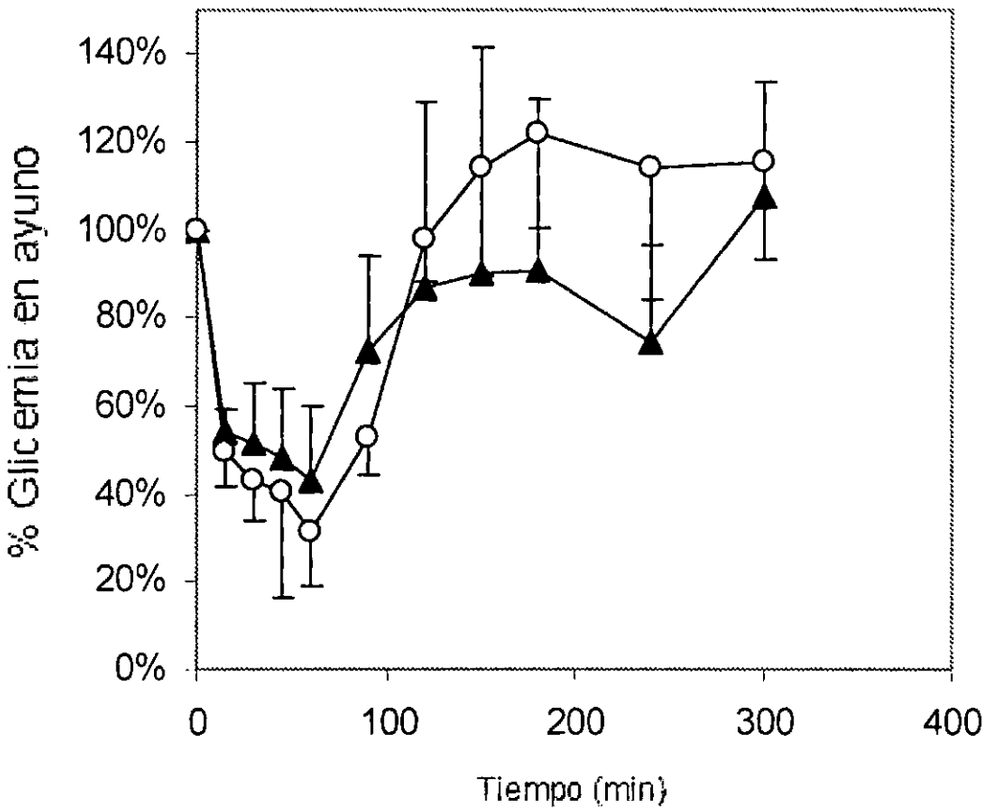

140%
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
% Glicemia en ayuno
0
100
200
300
400
Tiempo (min)

FIGURA 5

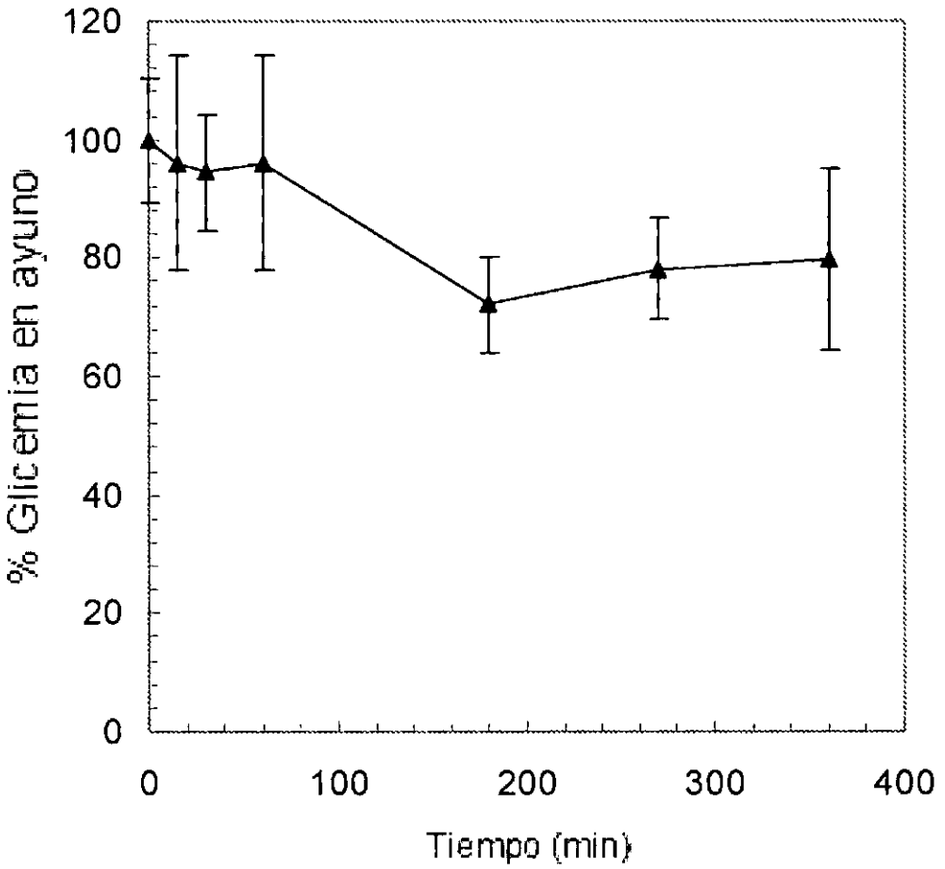

120
100
80
60
40
20
0
% Glicemia en ayuno
0
100
200
300
400
Tiempo (min)

FIGURA 6

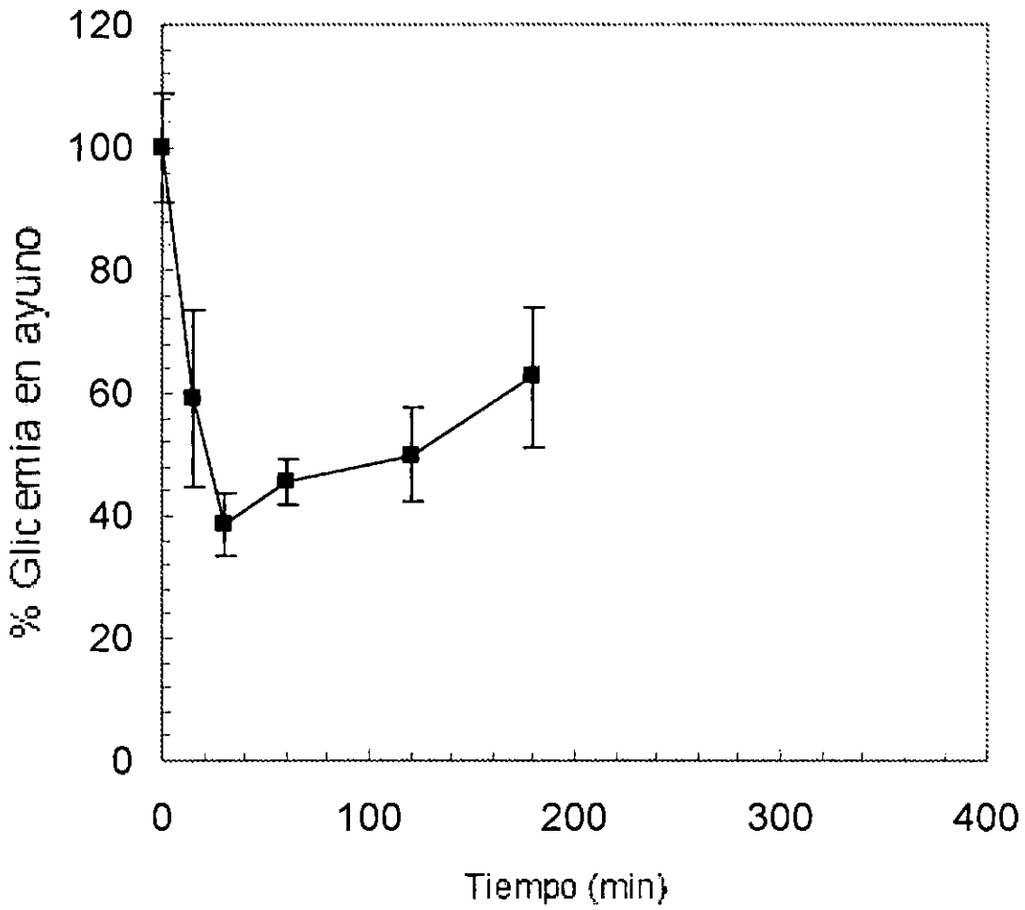

120
100
80
60
40
20
0
% Glicemia en ayuno
0
100
200
300
400
Tiempo (min)

FIGURA 7

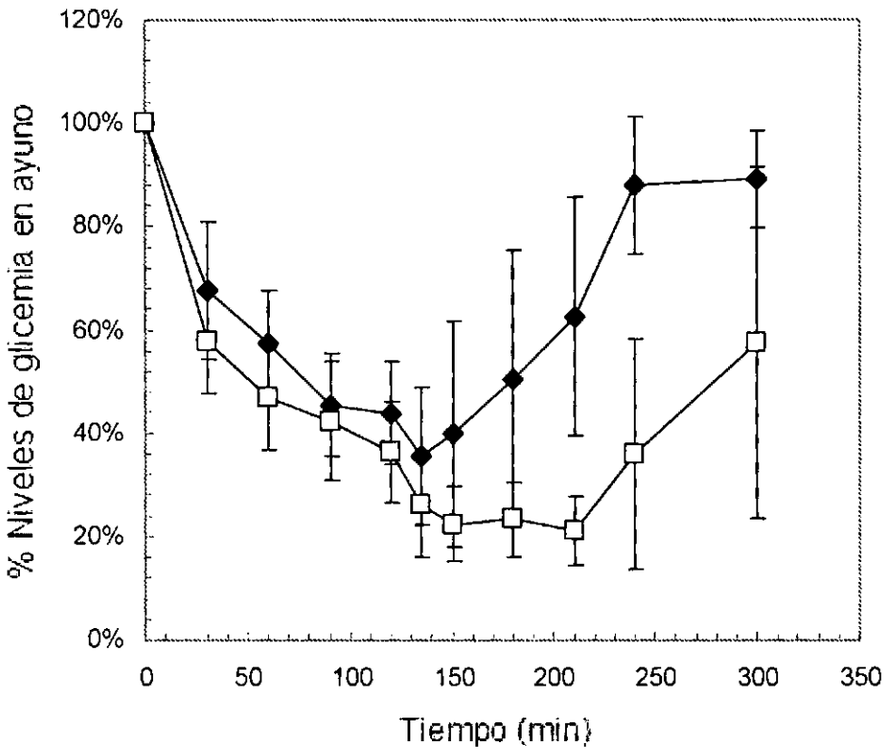

120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
% Niveles de glicemia en ayuno
0
50
100
150
200
250
300
350
Tiempo (min)

FIGURA 8

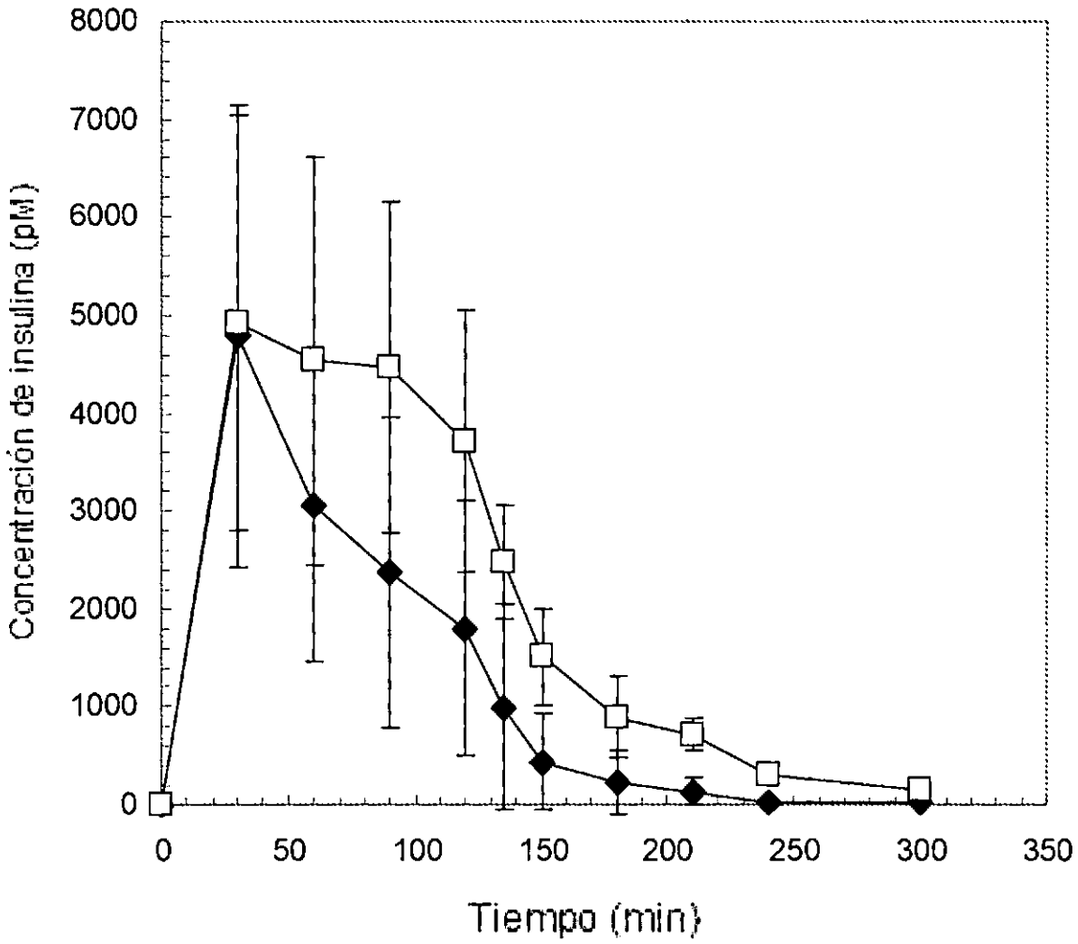

8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Concentración de insulina (pM)
0
50
100
150
200
250
300
350
Tiempo (min)

FIGURA 9

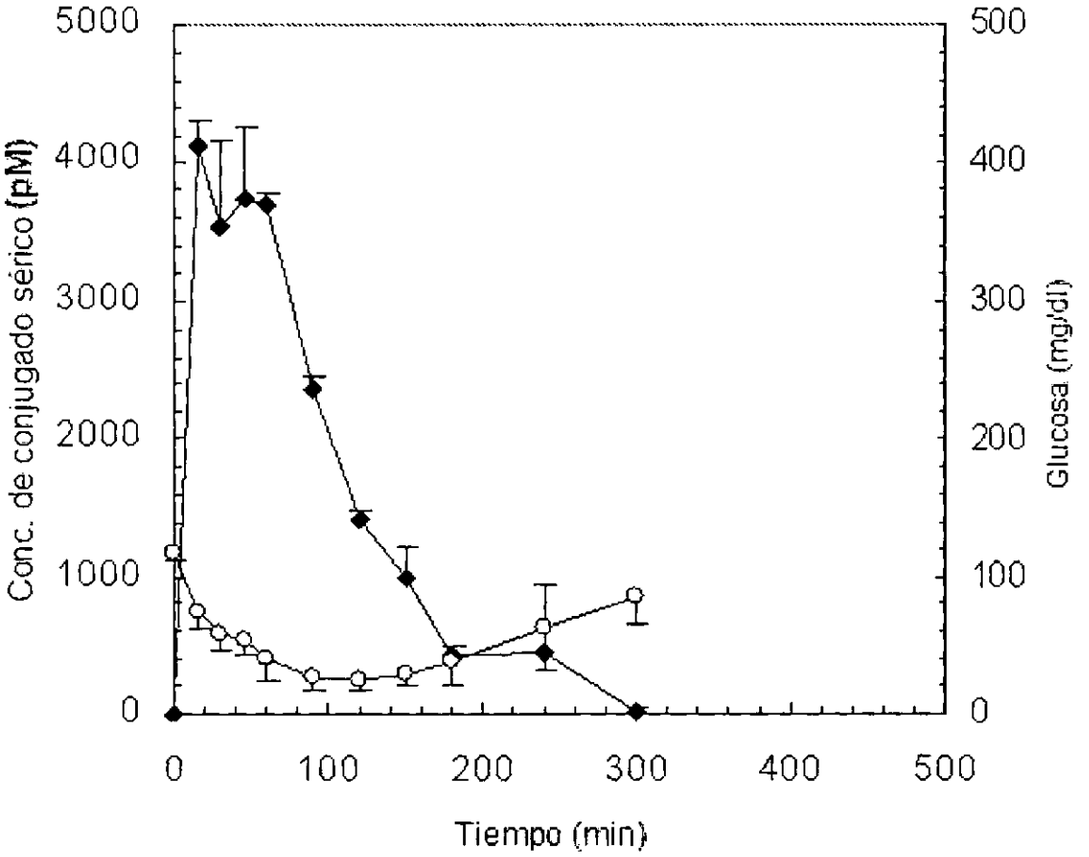

5000
4000
3000
2000
1000
0
Conc. de conjugado sérico (pM)
500
400
300
200
100
0
Glucosa (mg/dl)
0
100
200
300
400
500
Tiempo (min)

FIGURA 10

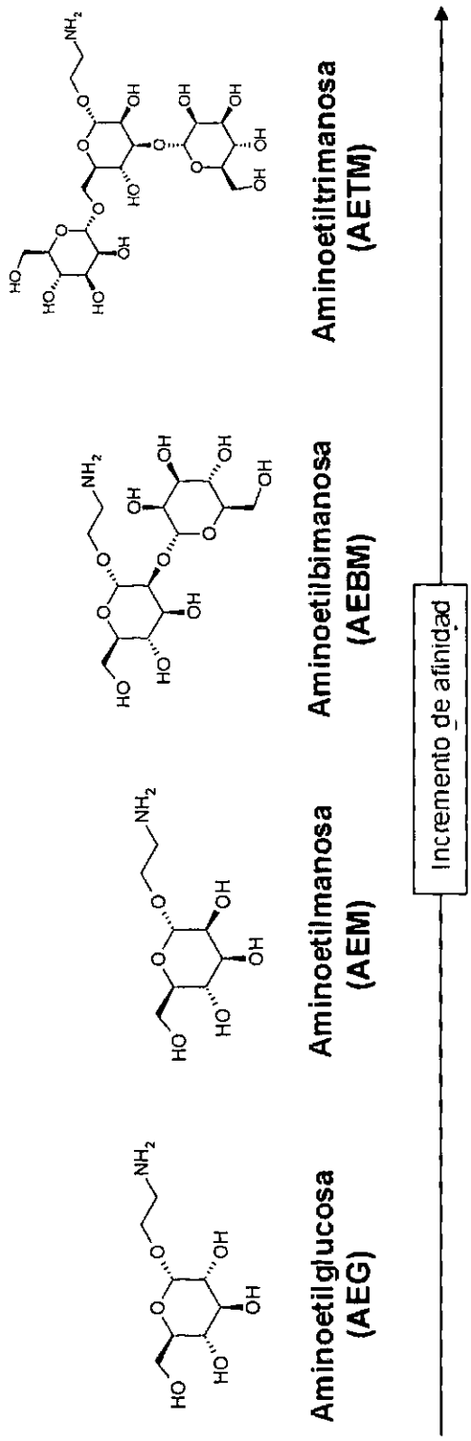

Aminoetiltrimanosa (AETM)
Aminoetilbimanosa (AEBM)
Aminoetilmanosa (AEM)
Aminoetilglucosa (AEG)
Incremento de afinidad

FIGURA 11

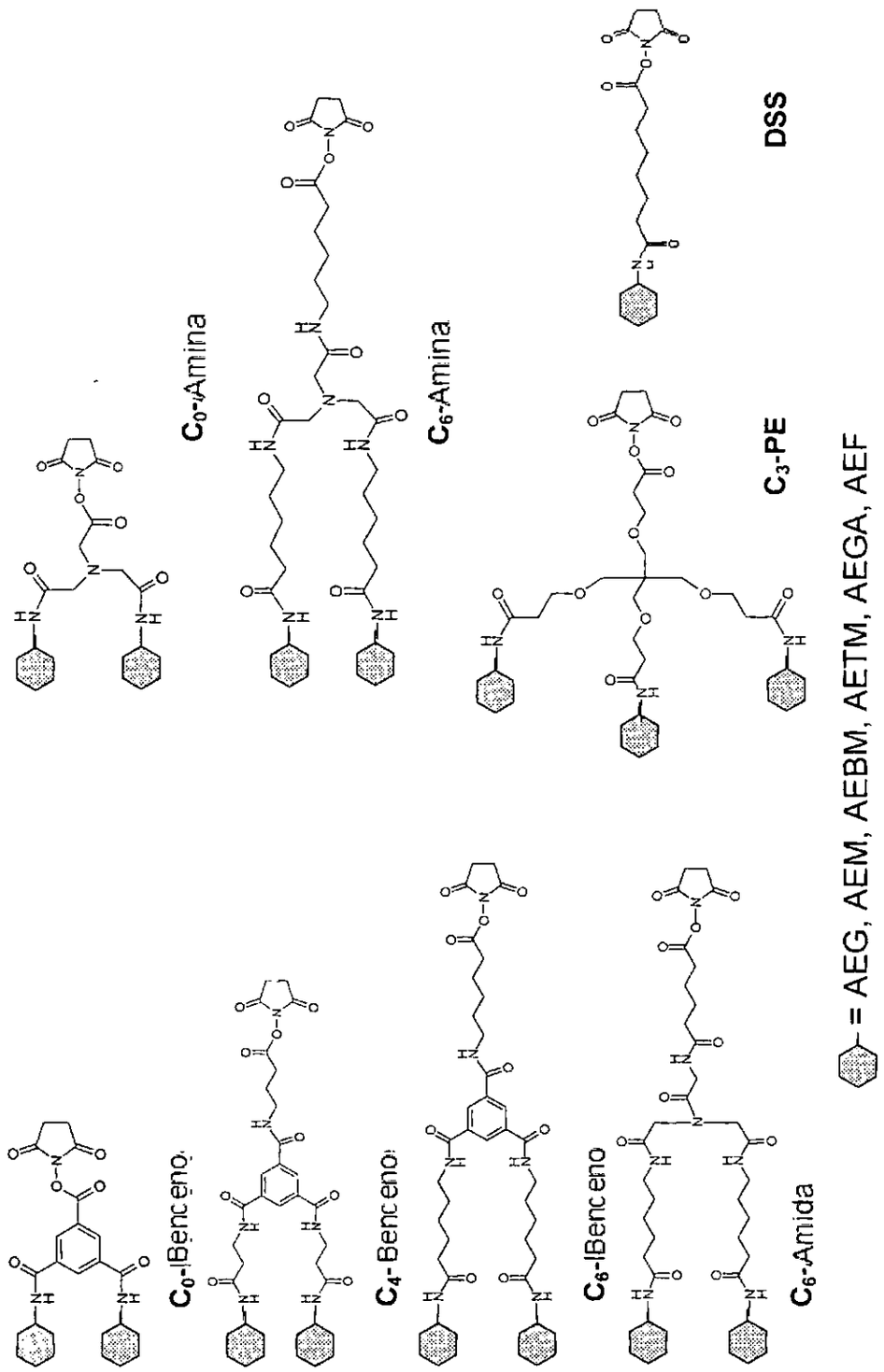

C0-Amina
C6-Amina
DSS
C3-PE
C0-Benceno
C4-Benceno
C6-Benceno
C6-Amida
= AEG, AEM, AEBM, AETM, AEGA, AEF

FIGURA 12

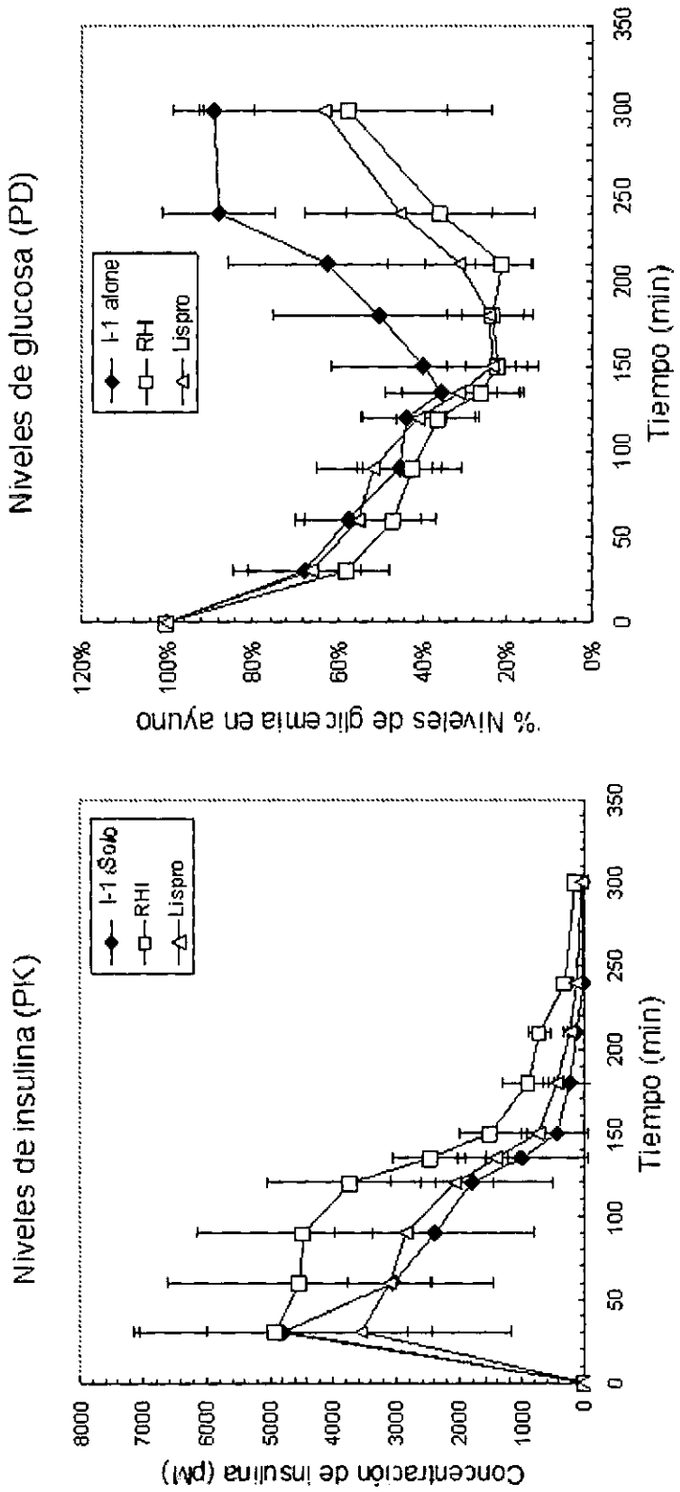

Niveles de glucosa (PD)
% Niveles de glicemia en ayuno
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0
50
100
150
200
250
300
350
Tiempo (min)
I-1 alone
RH
Lispro
Niveles de insulina (PK)
Concentración de insulina (pM)
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Tiempo (min)
I-1 &Solo
RHI
Lispro

FIGURA 13

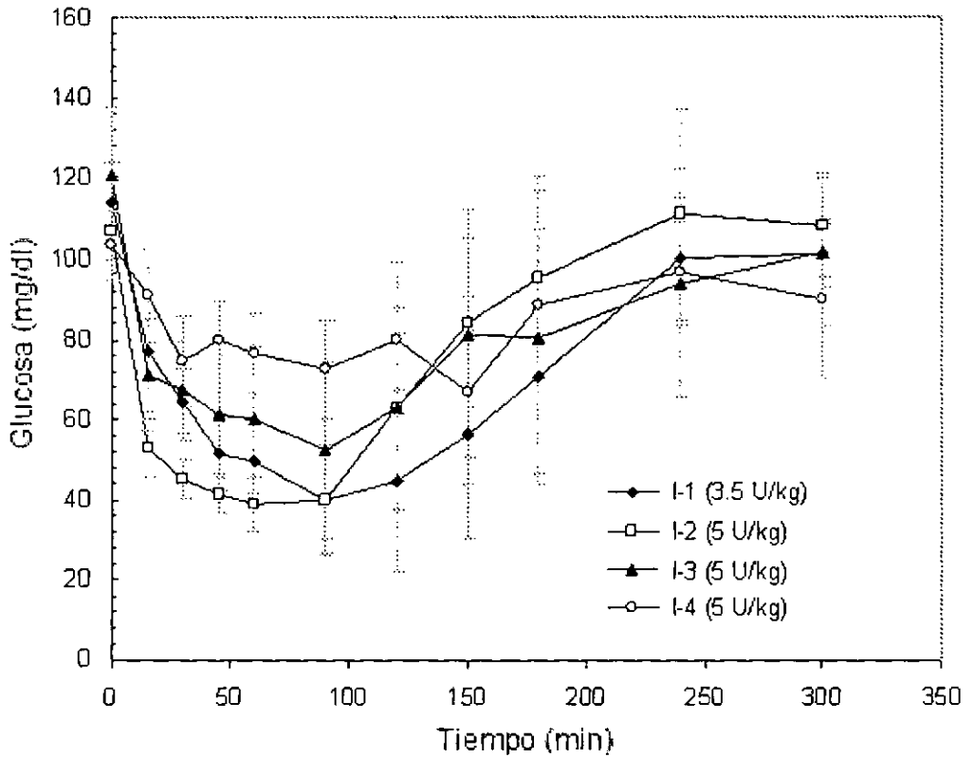

160
140
120
100
80
60
40
20
0
Glucosa (mg/dl)
0
50
100
150
200
250
300
350
Tiempo (min)
I-1 (3.5 U/kg)
I-2 (5 U/kg)
I-3 (5 U/kg)
I-4 (5 U/kg)

FIGURA 14

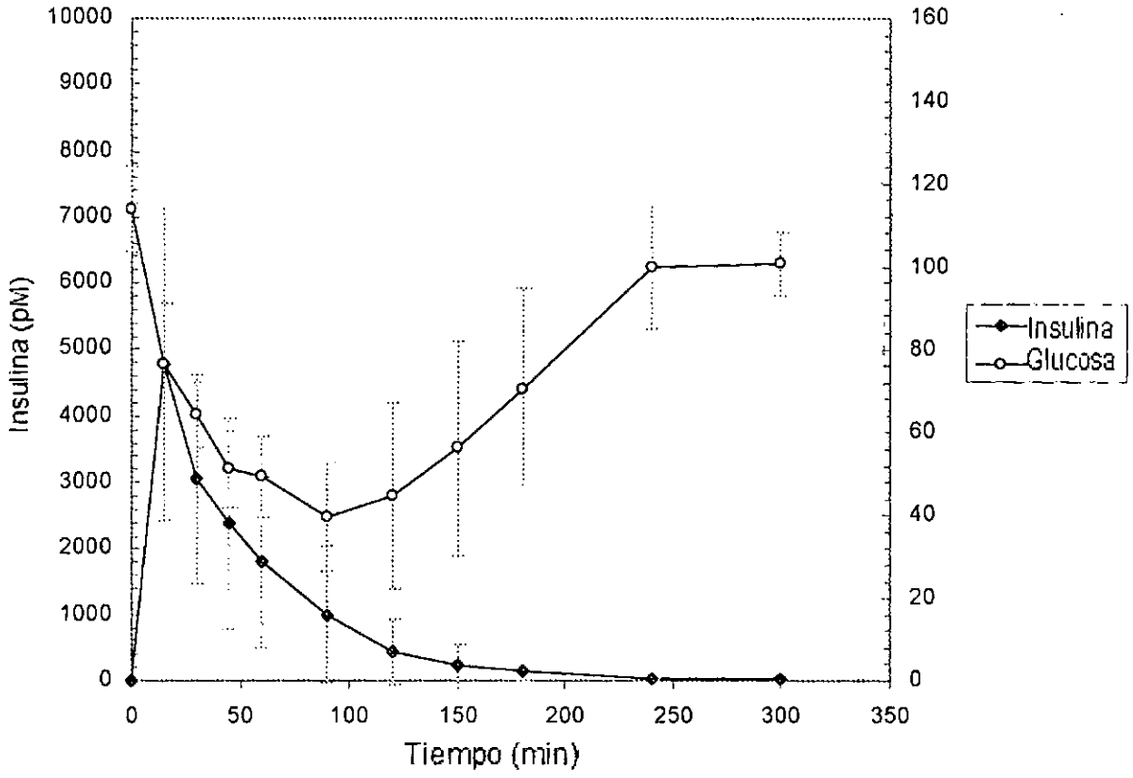

10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Insulina (pM)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
50
100
150
200
250
300
350
Tiempo (min)
Insulina
Glucosa

FIGURA 15

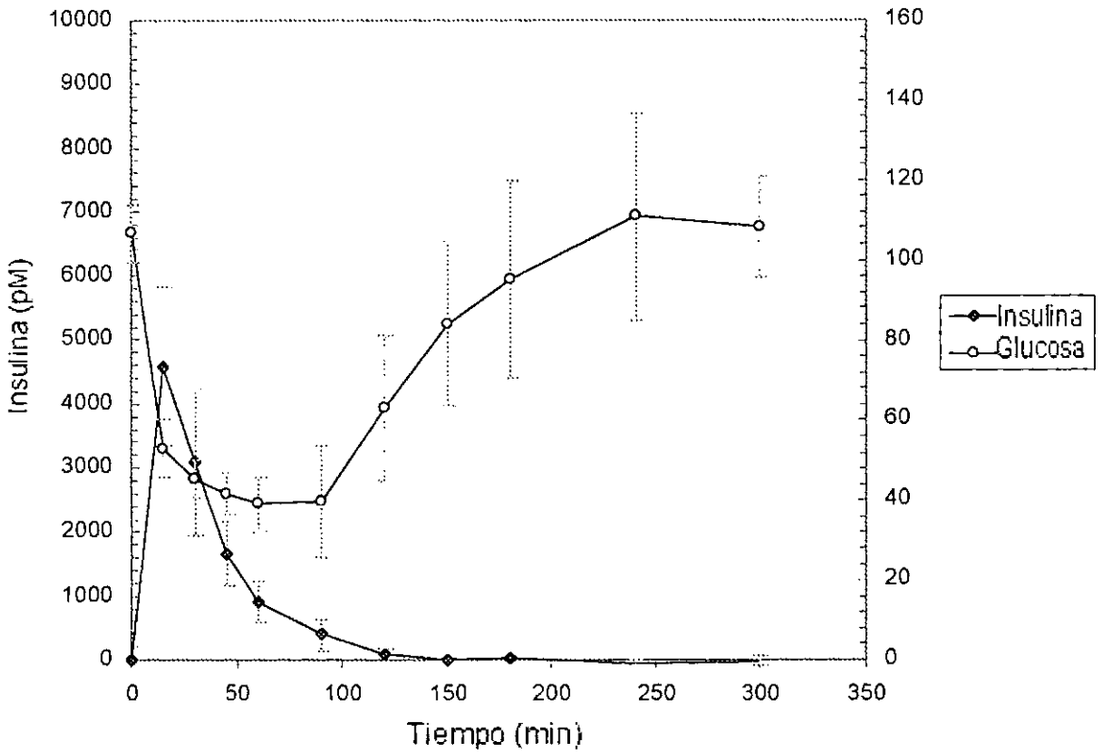

10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Insulina (pM)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
50
100
150
200
250
300
350
Tiempo (min)
Insulina
Glucosa

FIGURA 16

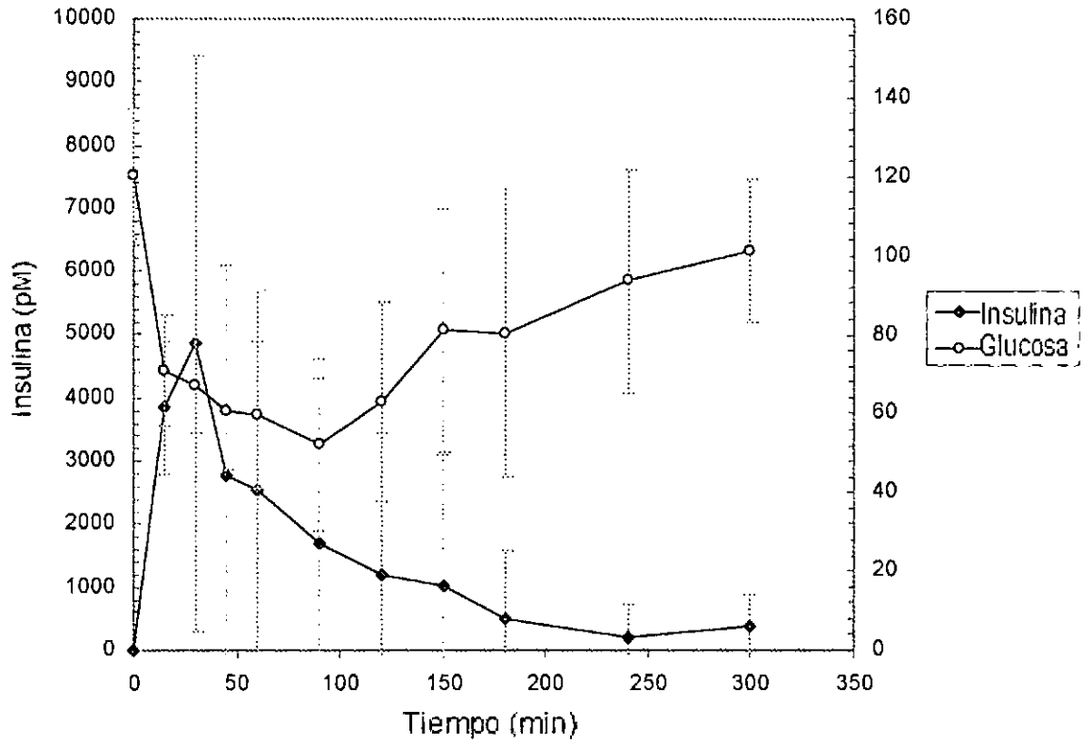

10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Insulina (pM)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
50
100
150
200
250
300
350
Tiempo (min)
Insulina
Glucosa

FIGURA 17

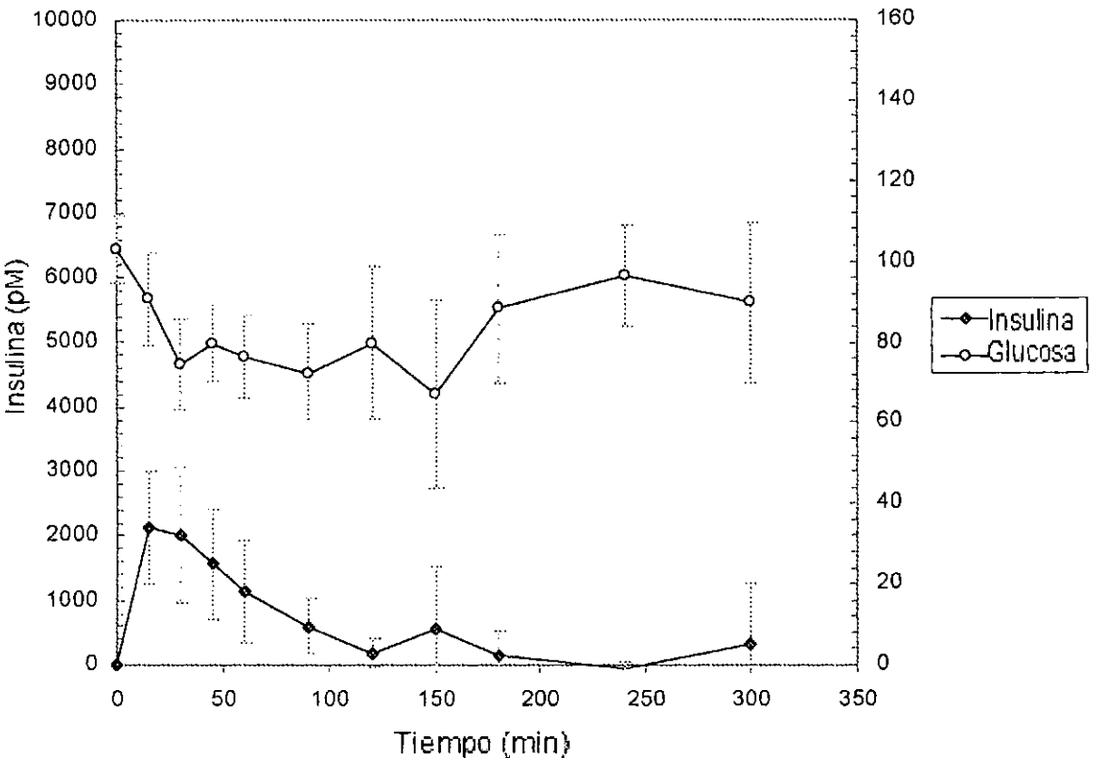

10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Insulina (pM)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
50
100
150
200
250
300
350
Tiempo (min)
Insulina
Glucosa

FIGURA 18

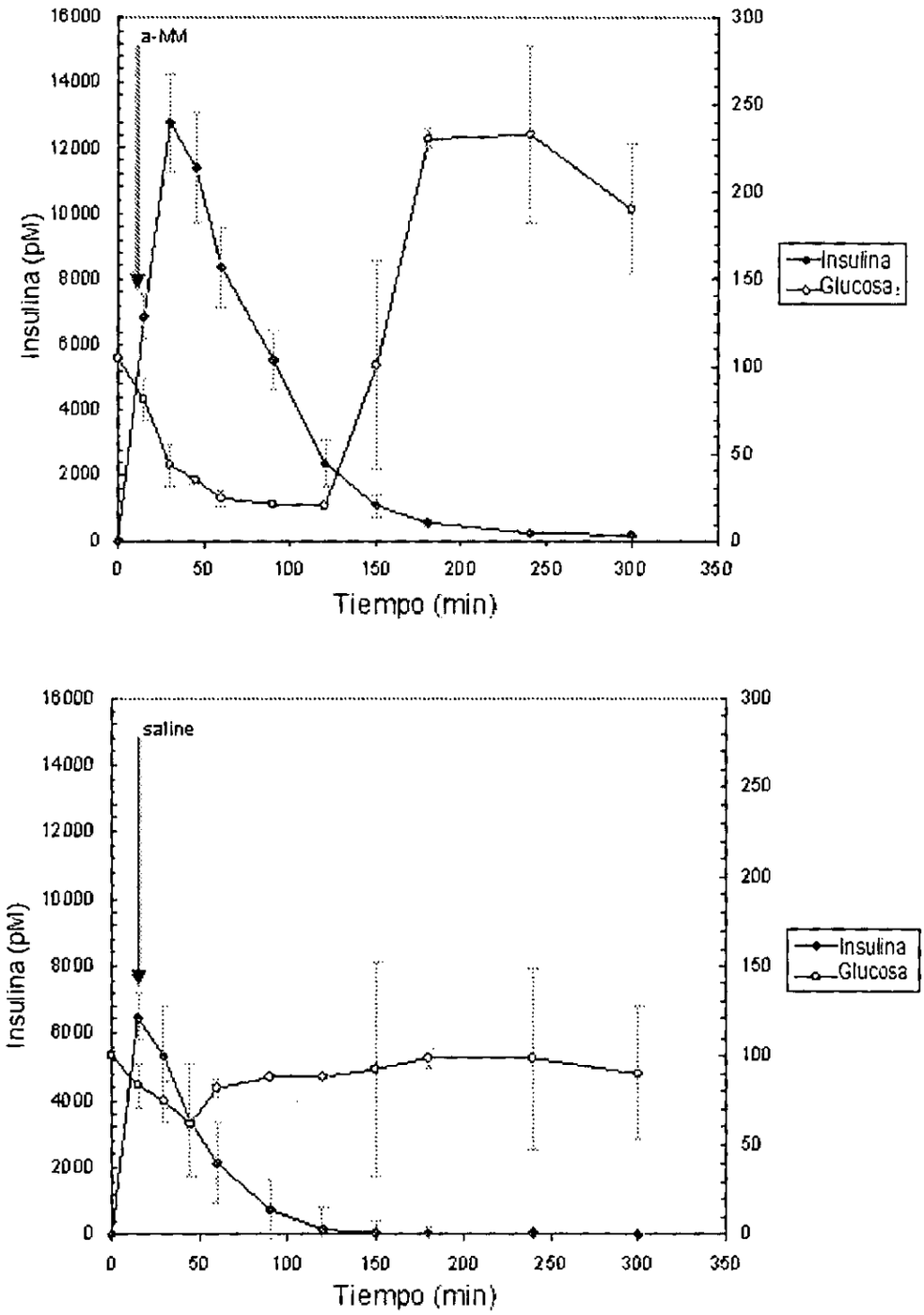
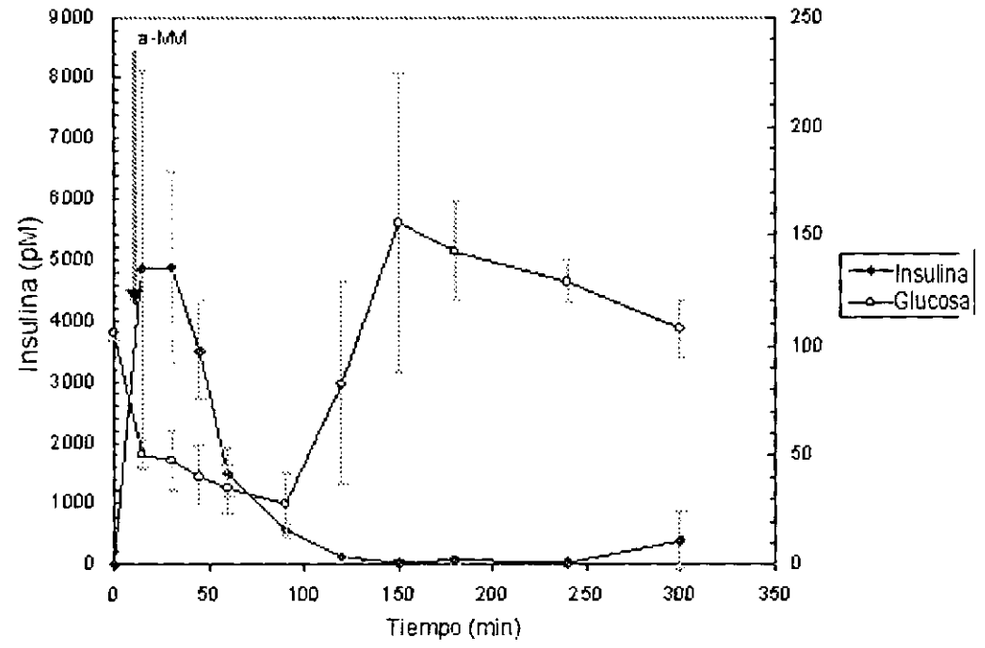

a-MM
Insulina (pM)
Tiempo (min)
Insulina
Glucosa
saline
Insulina (pM)
Tiempo (min)
Insulina
Glucosa

FIGURA 19


a-MM
Insulina (pM)
Tiempo (min)
Insulina
Glucosa

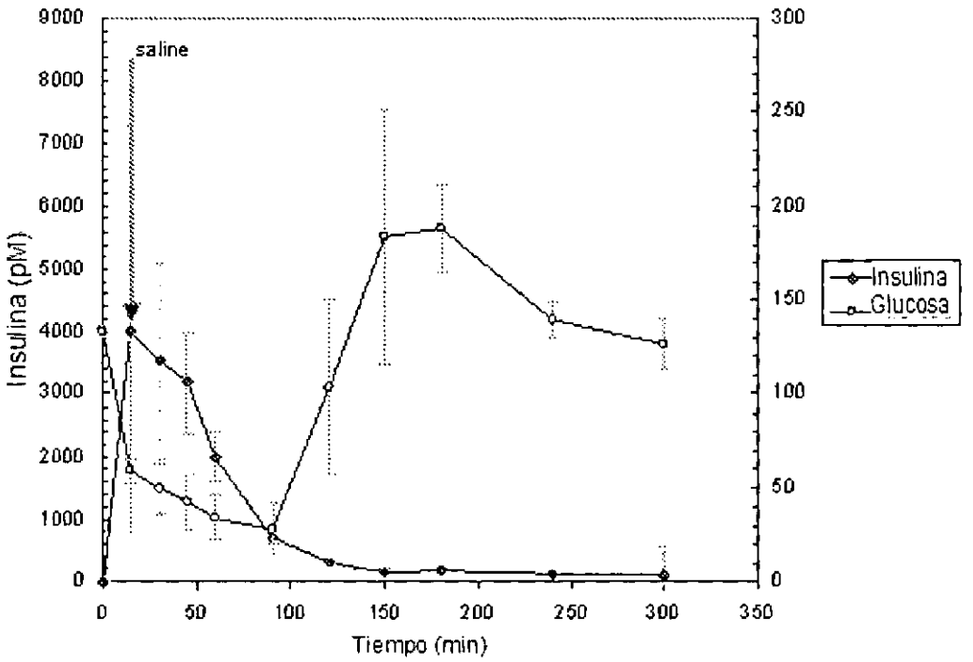

saline
Insulina (pM)
Tiempo (min)
Insulina
Glucosa

FIGURA 20

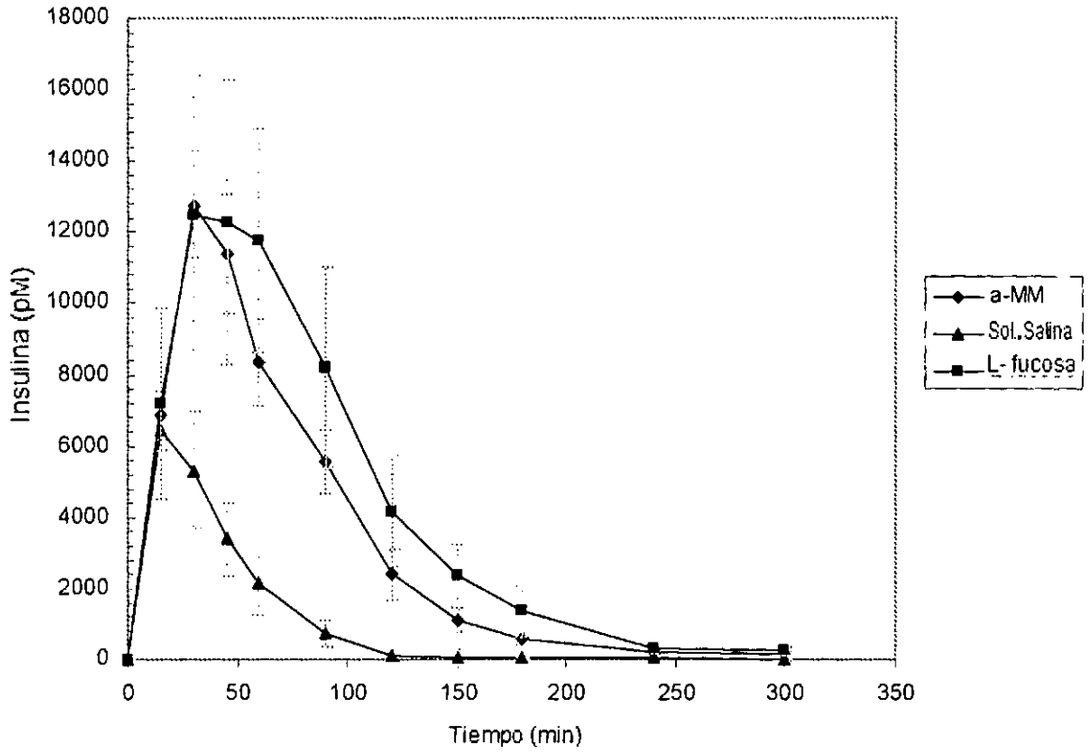

18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
Insulina (pM)
0
50
100
150
200
250
300
350
Tiempo (min)
a-MM
Sol.Salina
L- fucosa

FIGURA 21

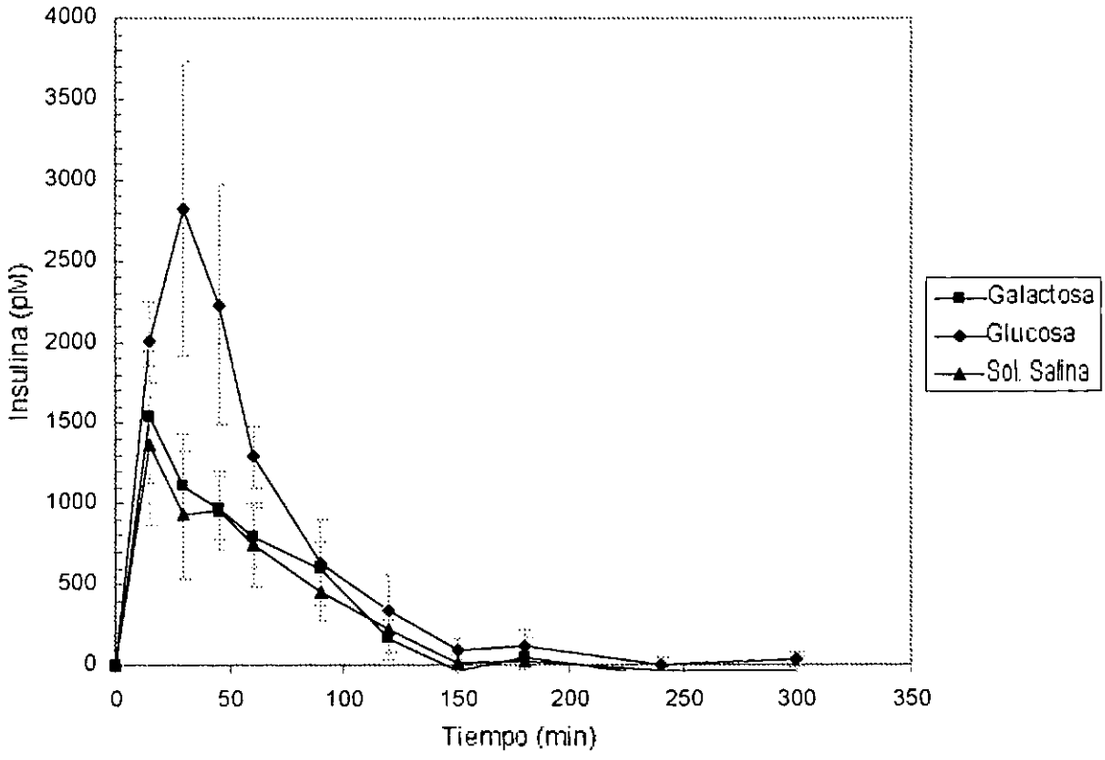

4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Insulina (pM)
0
50
100
150
200
250
300
350
Tiempo (min)
Galactosa
Glucosa
Sol. Salina

FIGURA 22

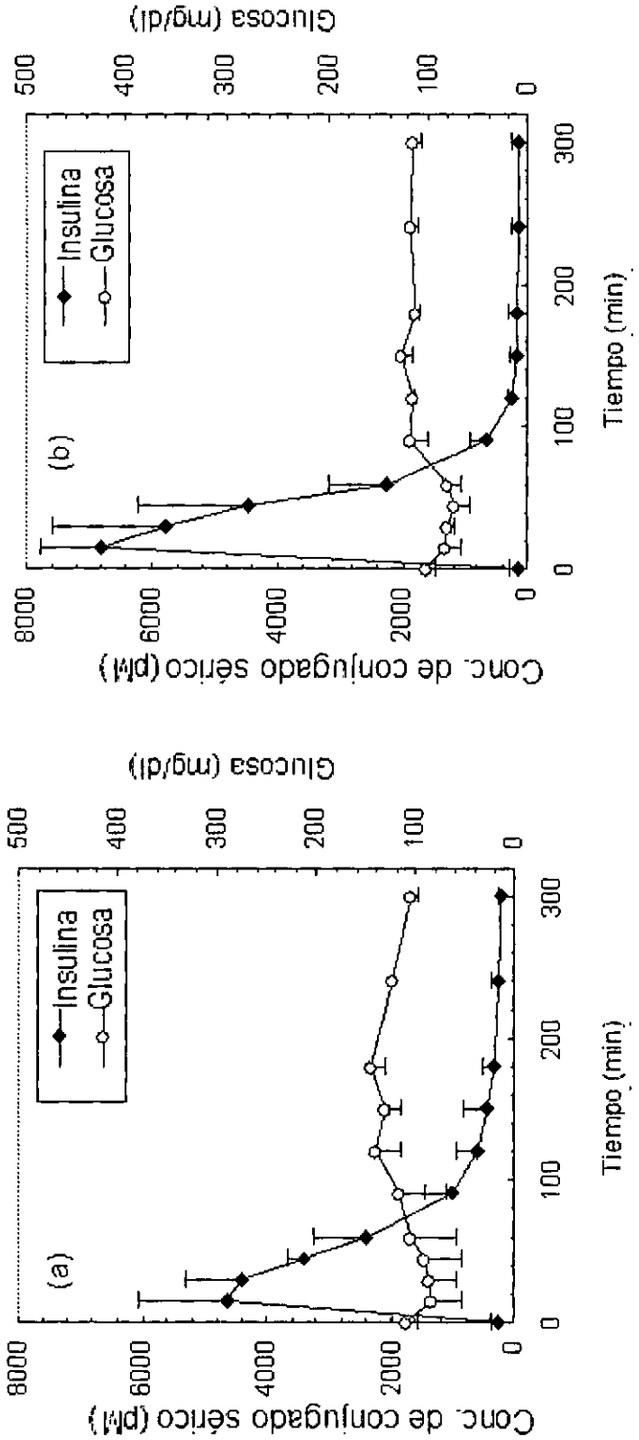

(a)
(b)
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
2000
4000
6000
8000
100
200
300
400
500

FIGURA 23

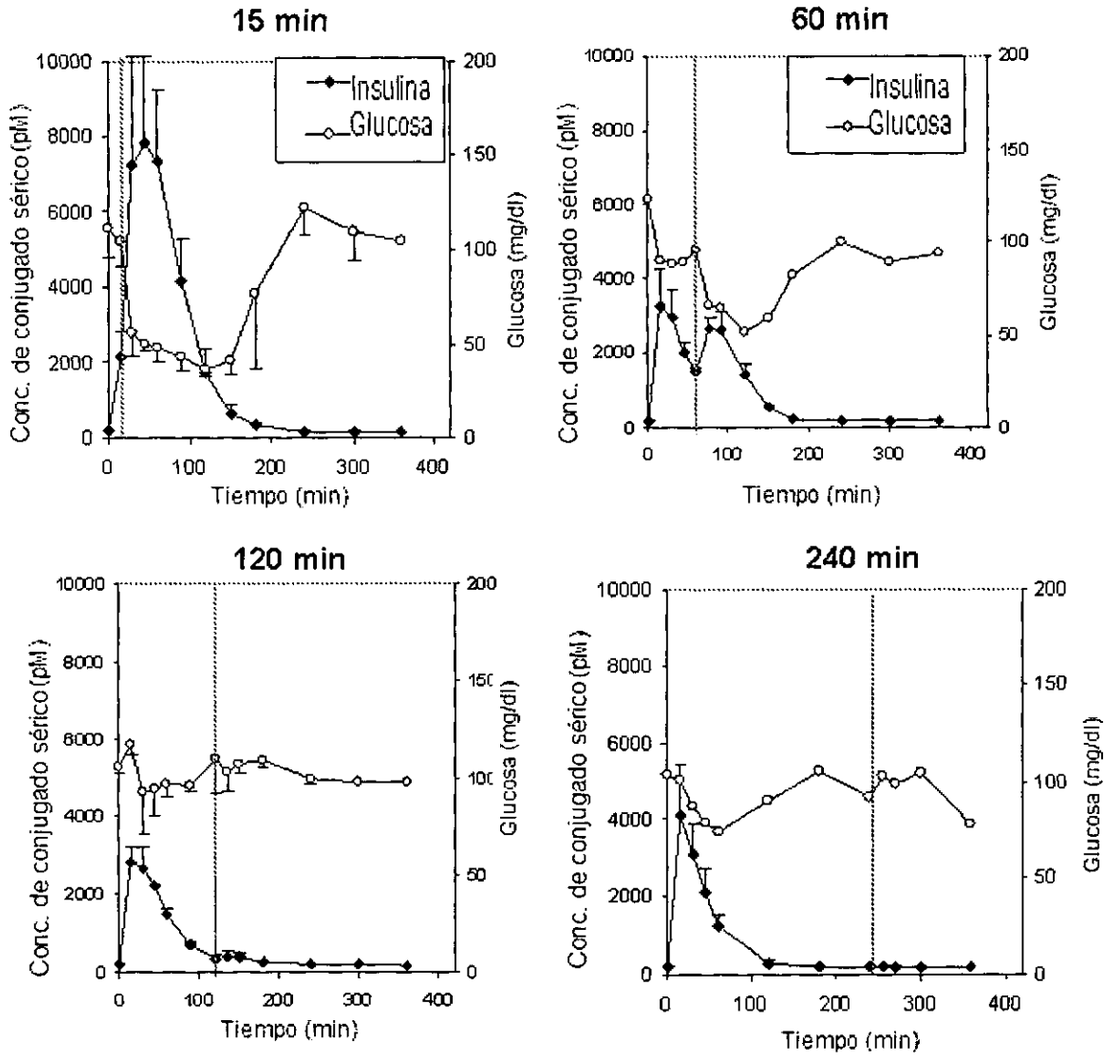

15 min
60 min
120 min
240 min
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
2000
4000
6000
8000
10000
50
100
150
200
300
400

FIGURA 24

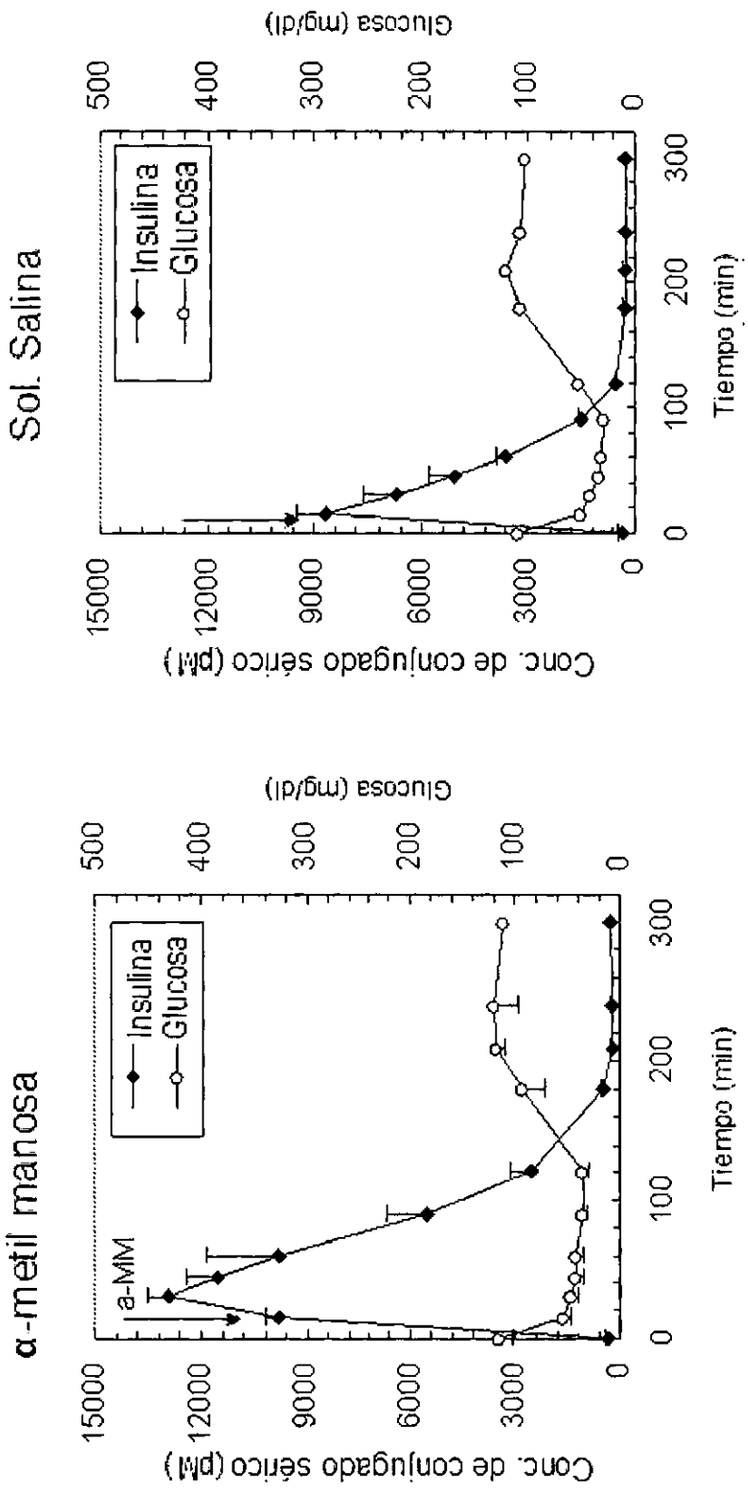

Sol. Salina
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
α-metil manosa
a-MM
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)

FIGURA 25

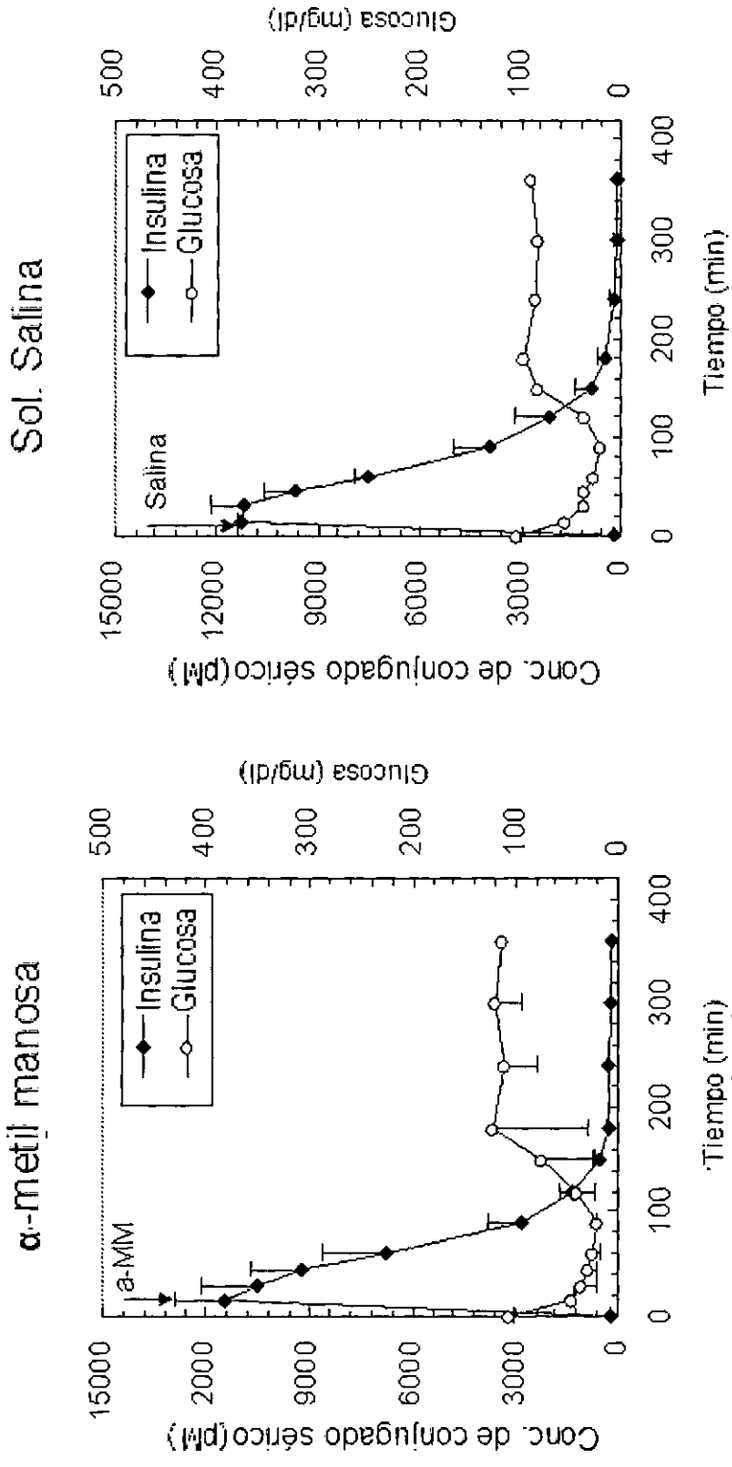

Sol. Salina
Salina
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
α-metil manosa
α-MM
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)

FIGURA 26

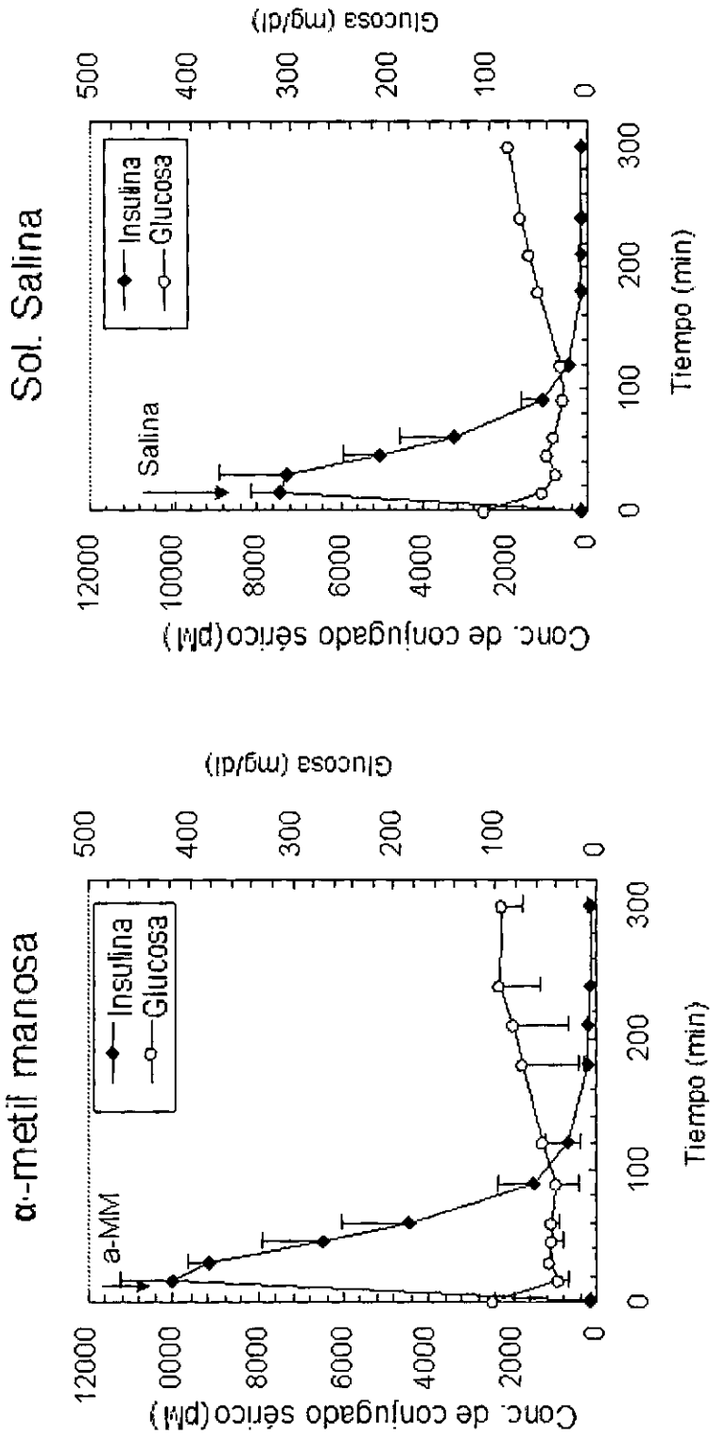
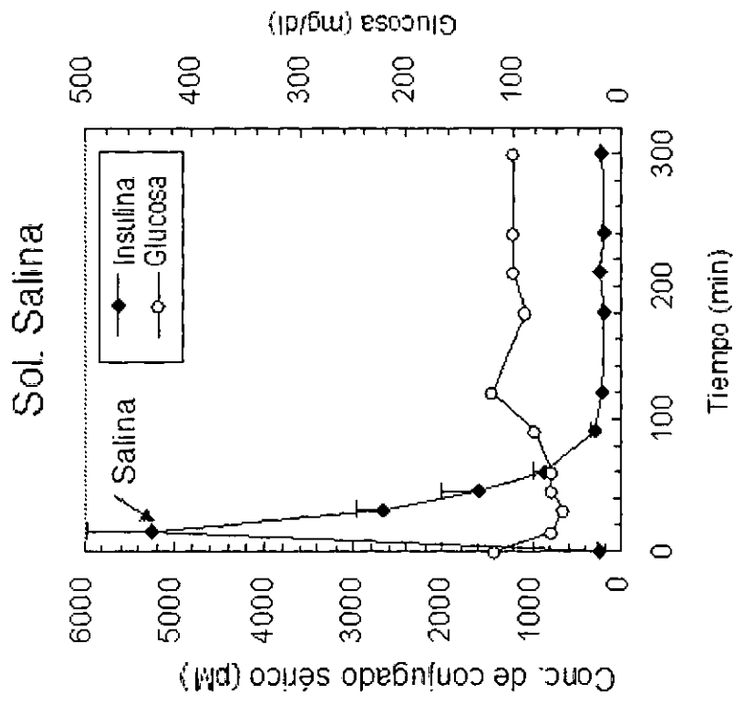

Sol. Salina
Salina
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
α-metil manosa
a-MM
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)

FIGURA 27


Sol. Salina
Salina
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
100
200
300
400
500

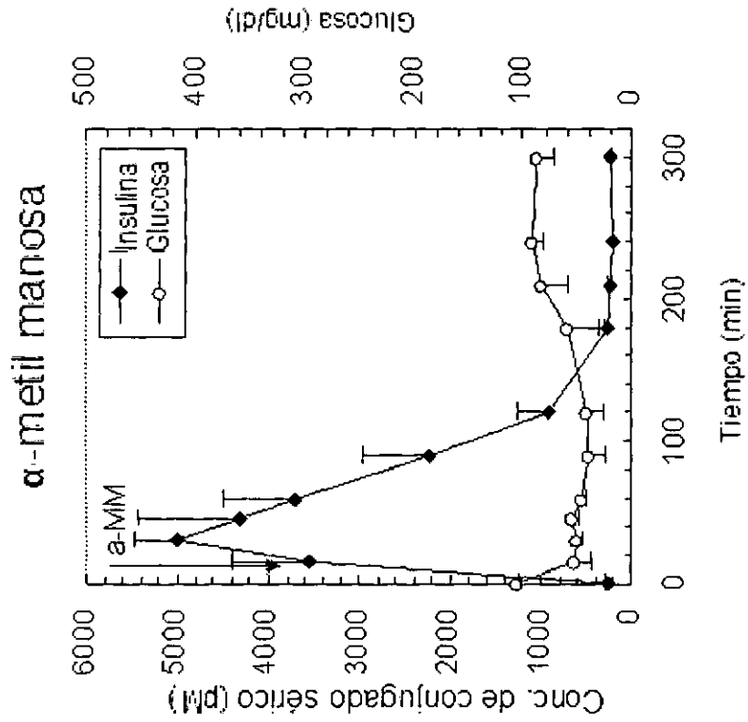

α-metil manosa
a-MM
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
100
200
300
400
500

FIGURA 28

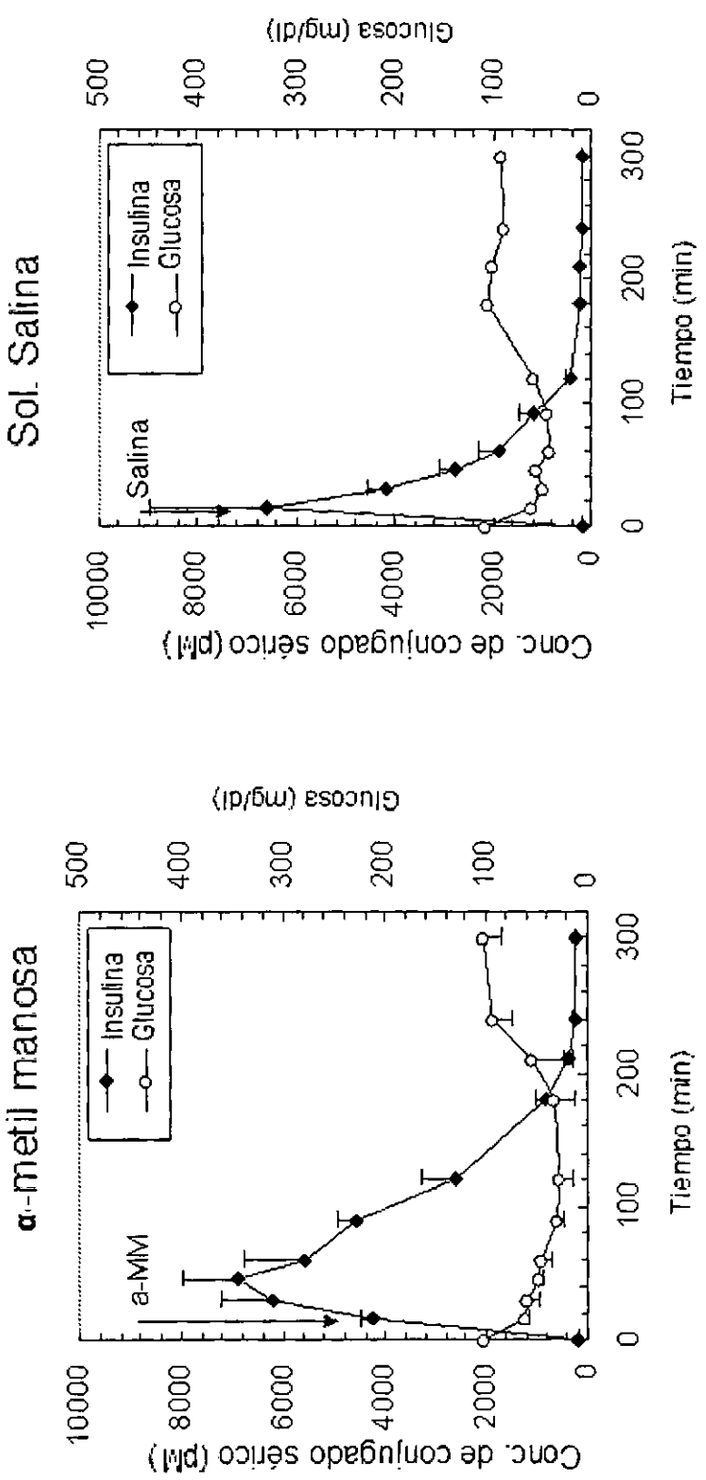

Sol. Salina
Salina
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
α-metil manosa
a-MM
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)

FIGURA 29

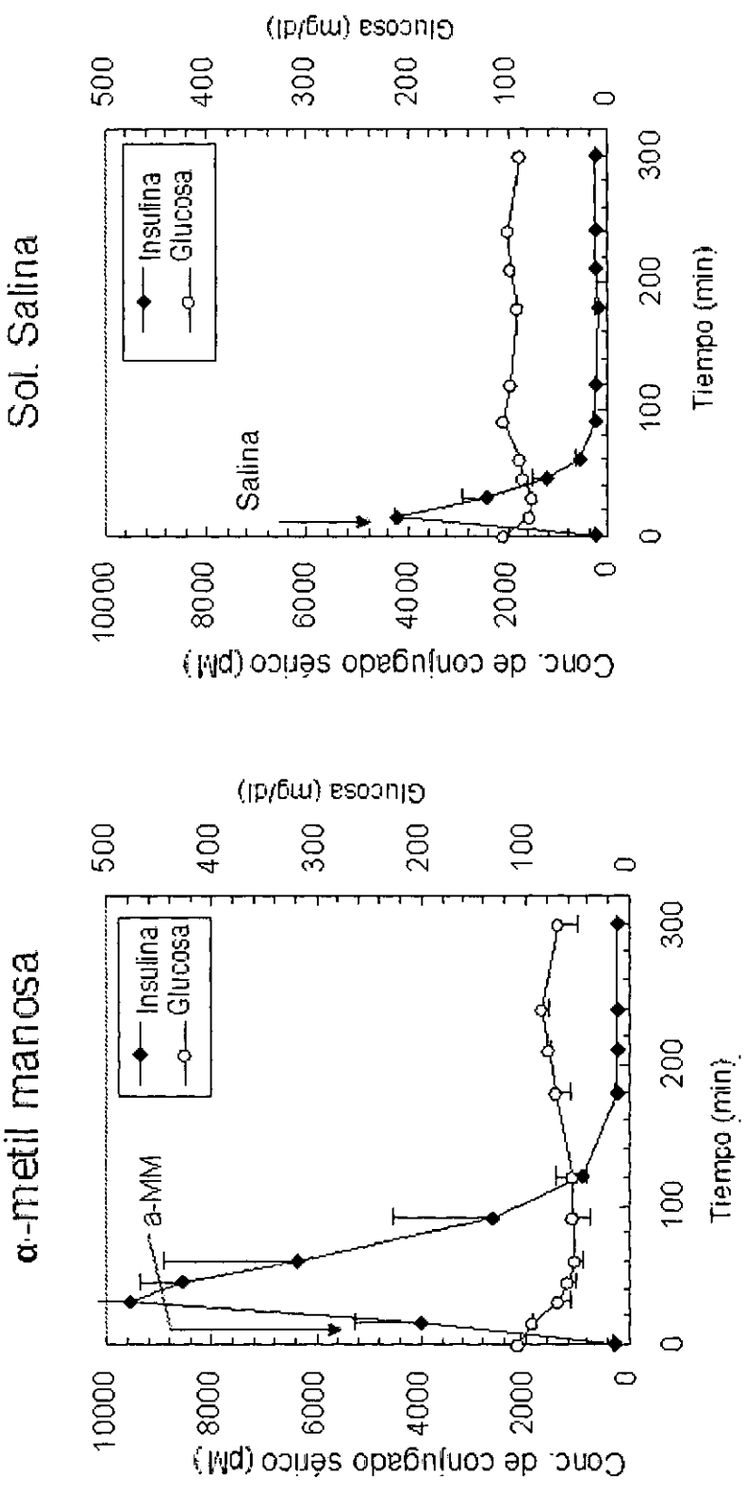

Sol. Salina
Salina
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
α-metil manosa
α-MM
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)

FIGURA 30

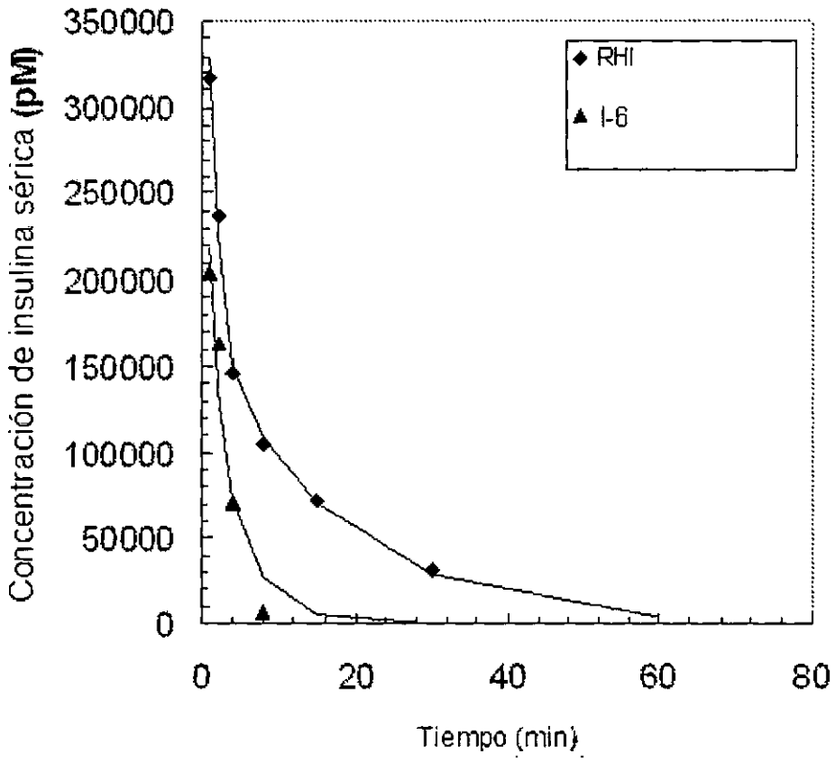
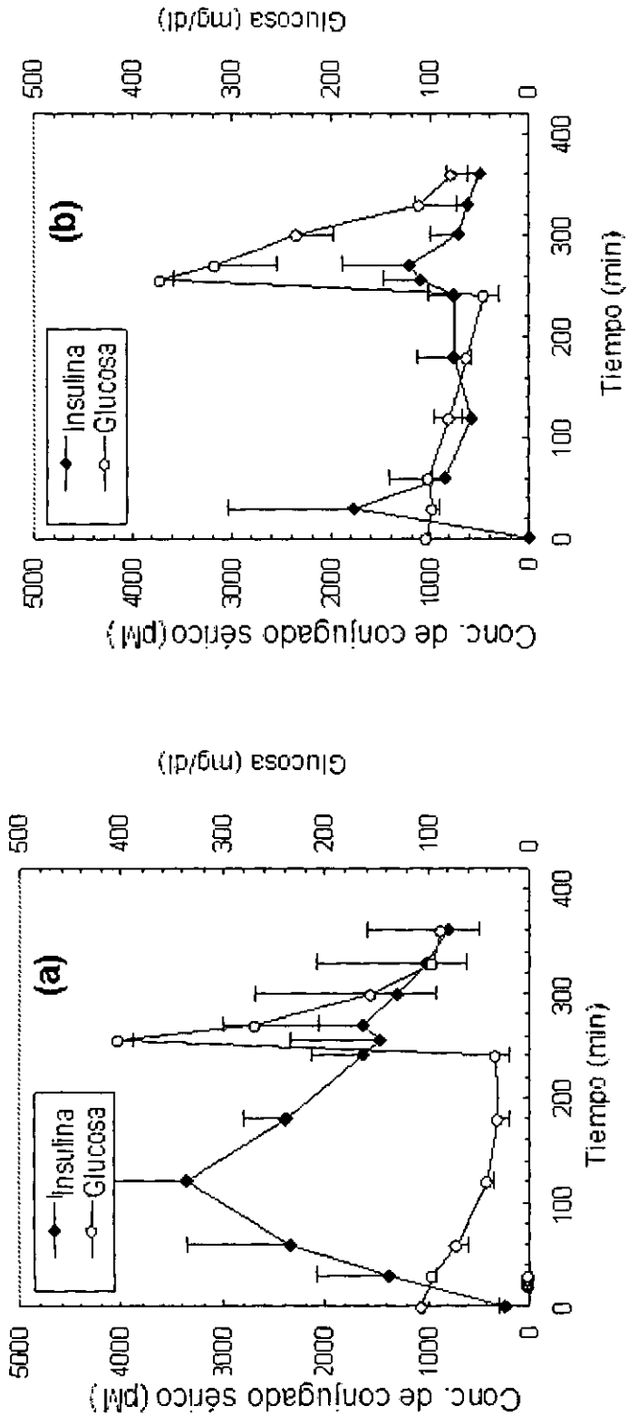

Concentración de insulina sérica (pM)
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
0
20
40
60
80
Tiempo (min)
RHI
I-6

FIGURA 31


(a)
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
100
200
300
400
500

(b)
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
100
200
300
400
500

FIGURA 31 (CONTINUACION)

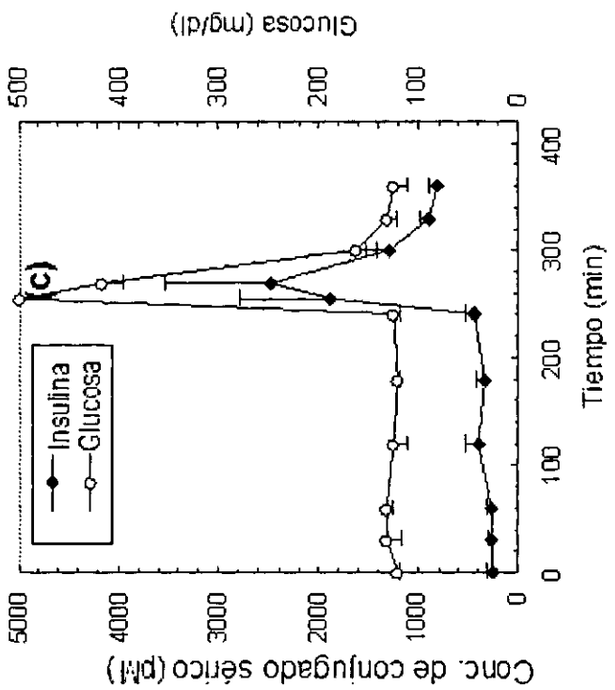


FIGURA 32

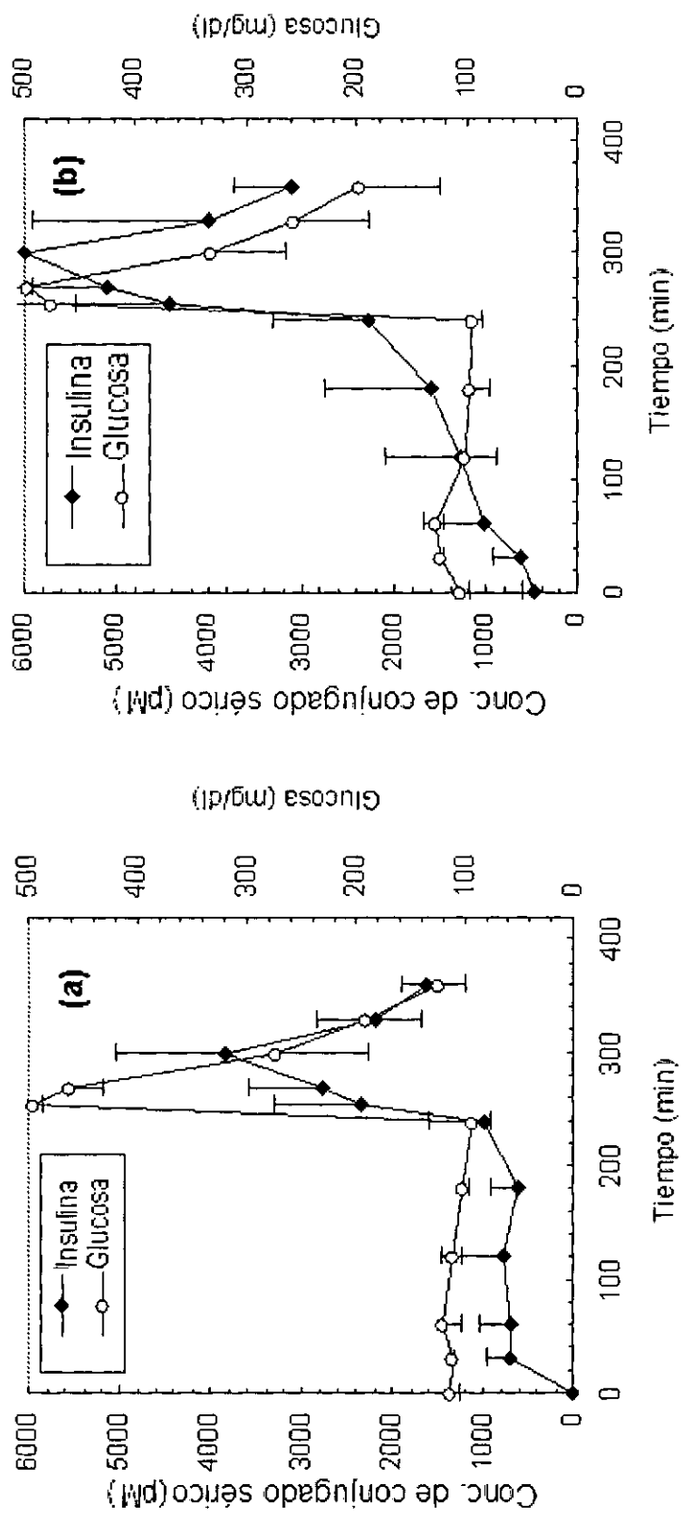
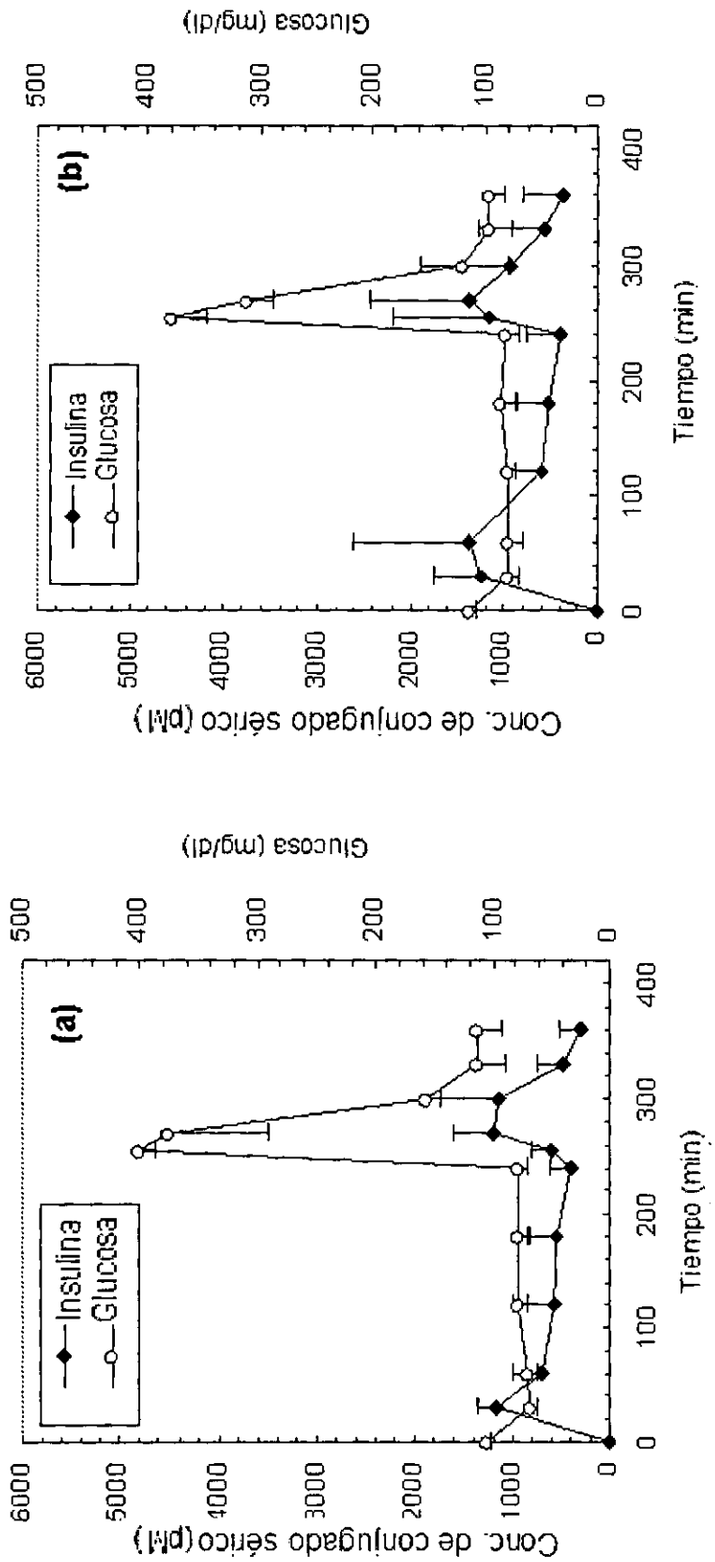

(a)
(b)
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
100
200
300
400
500

FIGURA 33


(a)
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
100
200
300
400
500

(b)
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
100
200
300
400
500

FIGURA 34

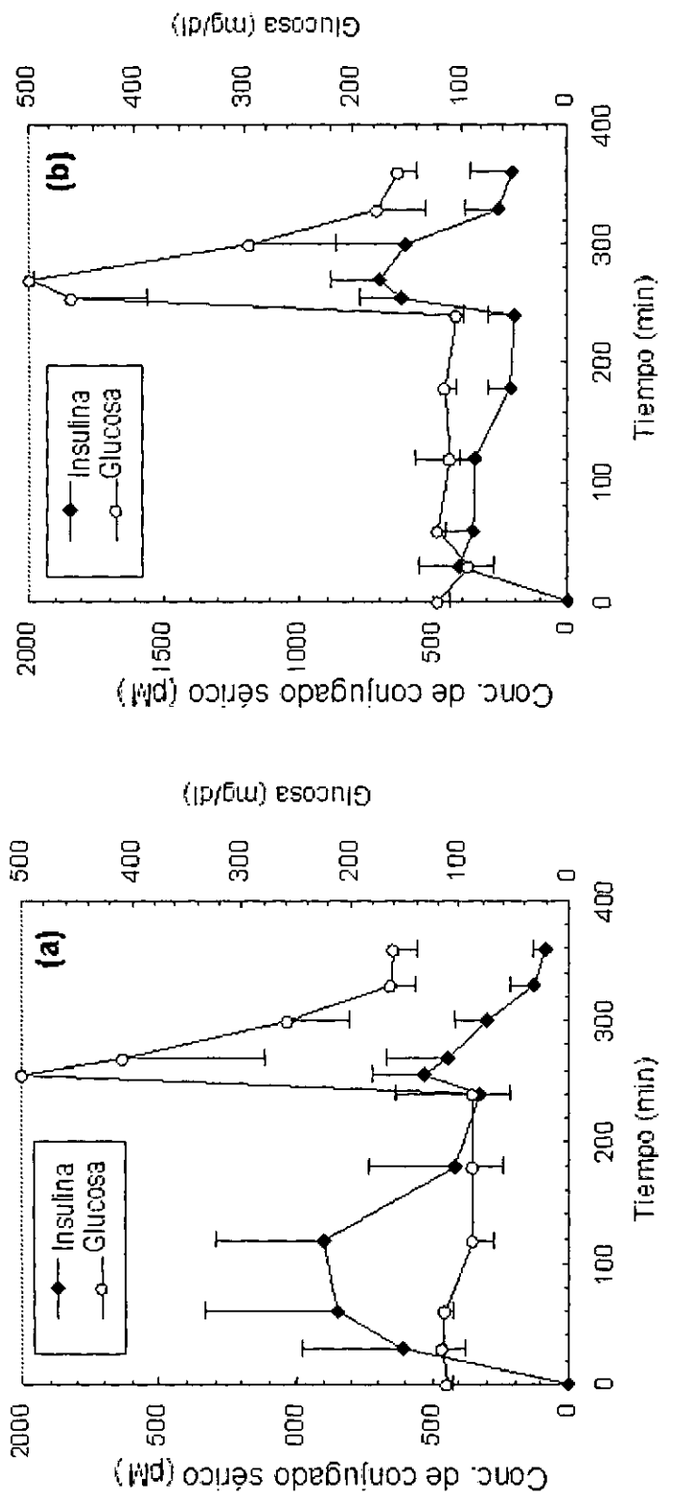

(a)
(b)
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
100
200
300
400
500
1000
1500
2000

FIGURA 35

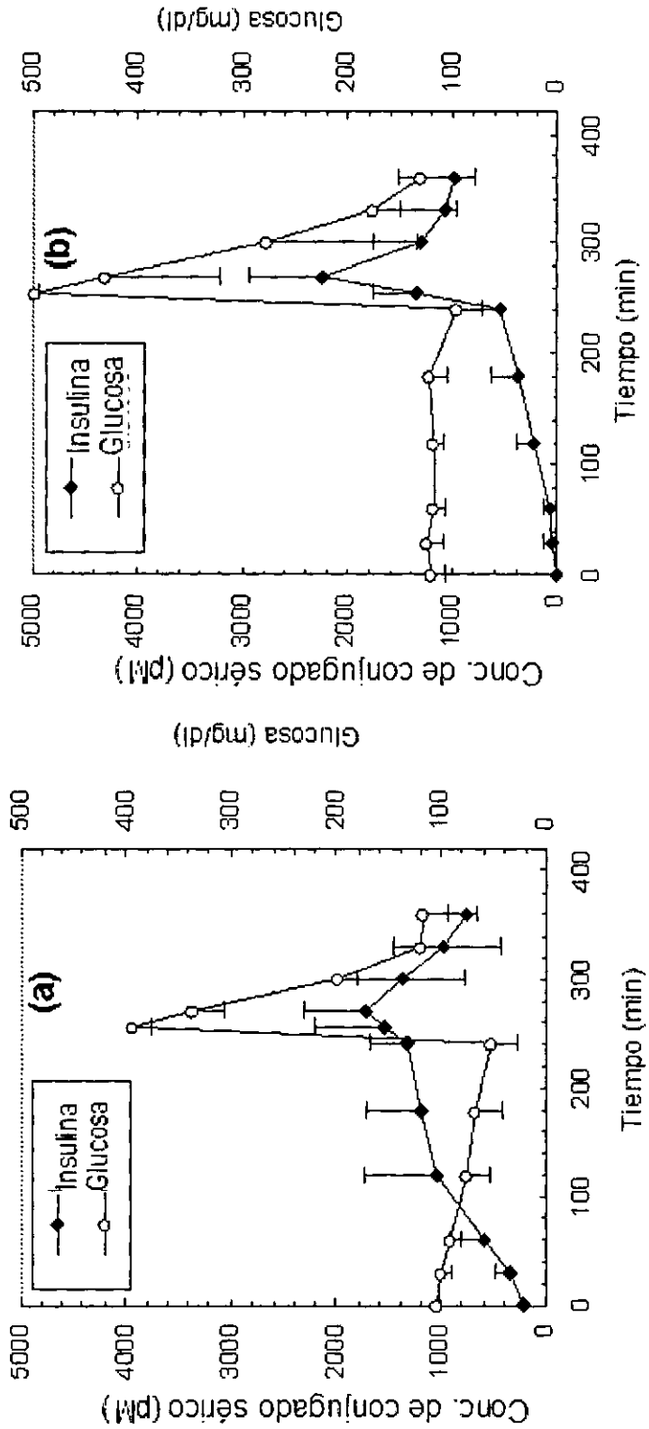

(a)
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
0
100
200
300
400
500
0
100
200
300
400
(b)
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)

FIGURA 35 (CONTINUACION)

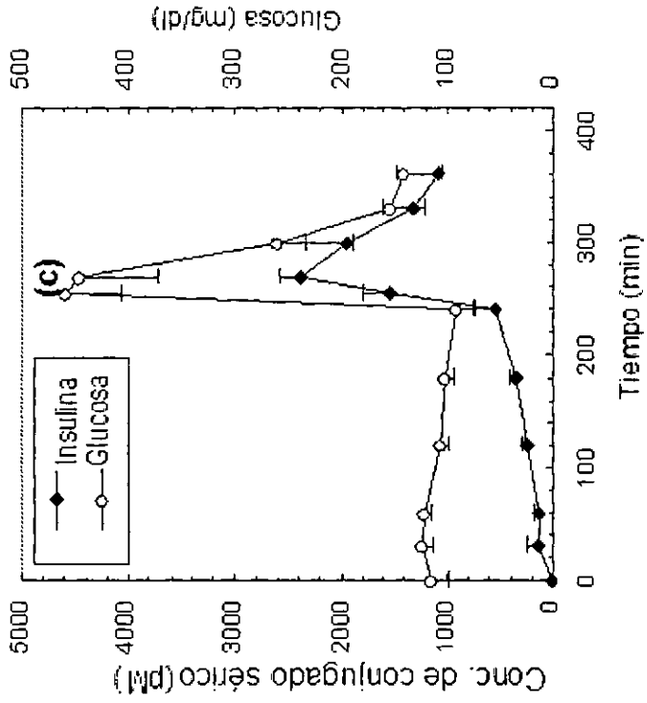


FIGURA 36

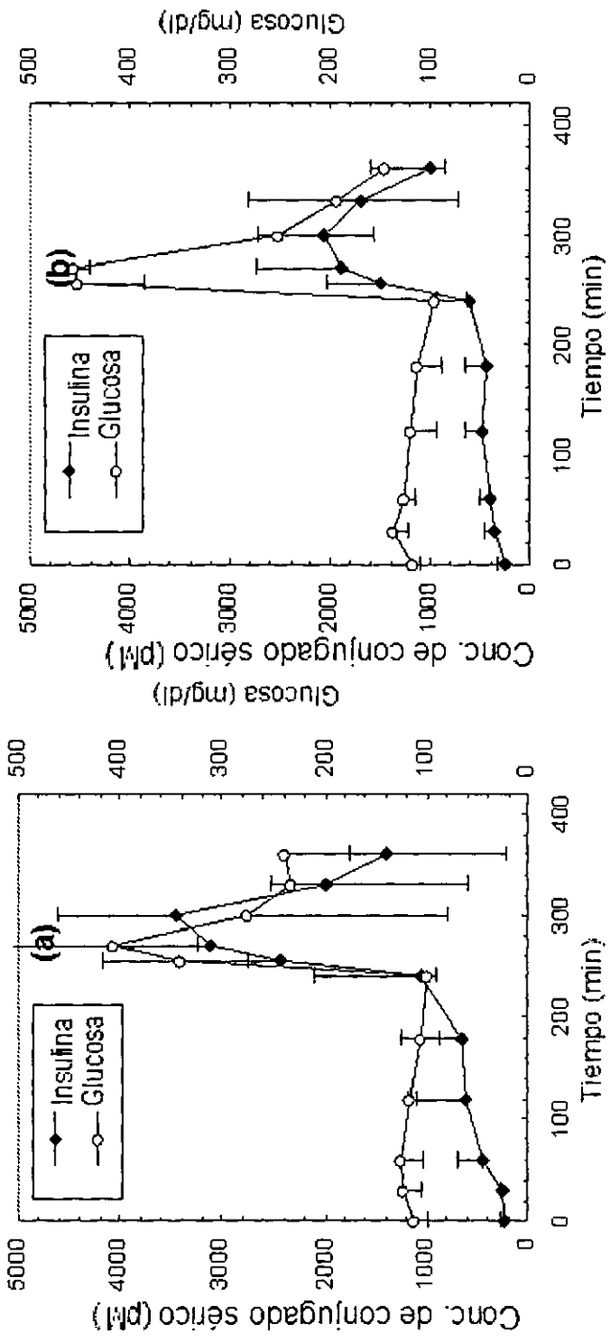

(a)
(b)
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
100
200
300
400
500

FIGURA 36 (CONTINUACION)

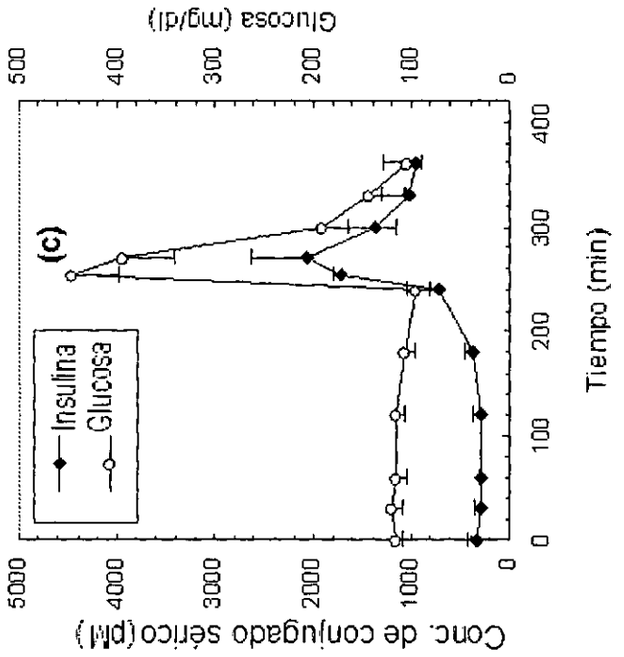


FIGURA 37

15 U/kg
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
Insulina
Glucosa
5 U/kg
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
Insulina
Glucosa

FIGURA 38

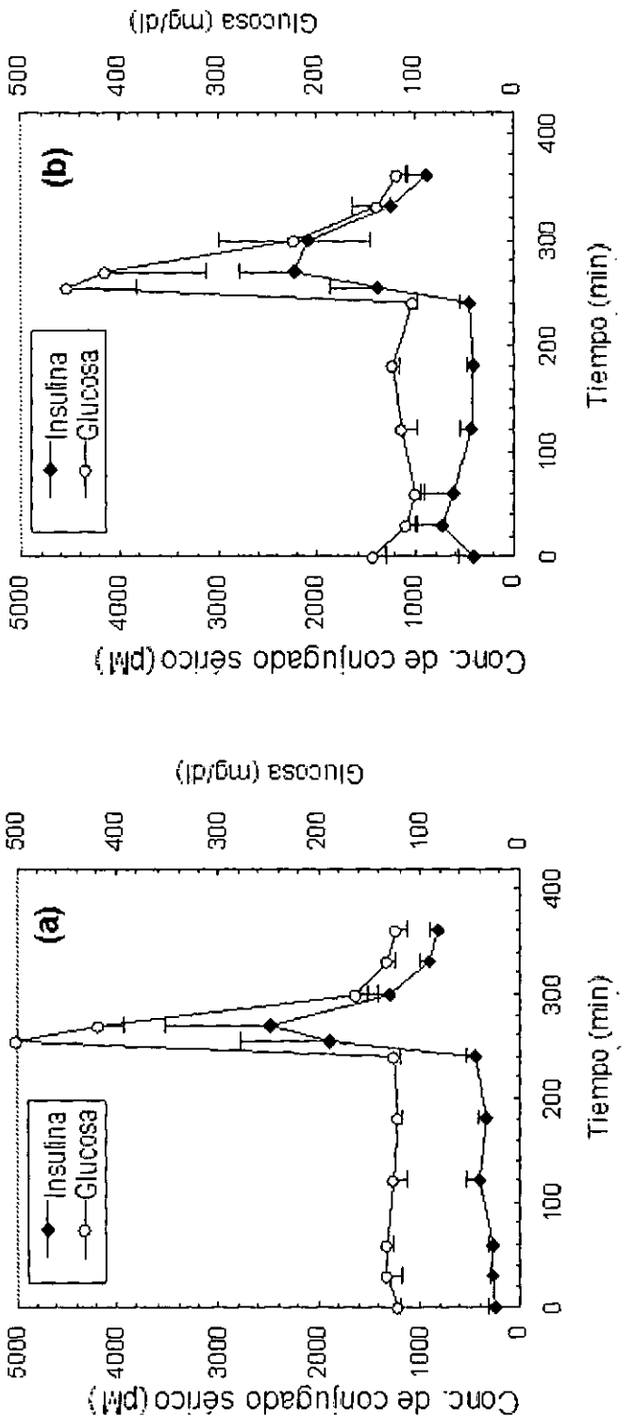

(a)
(b)
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
100
200
300
400
500

FIGURA 39

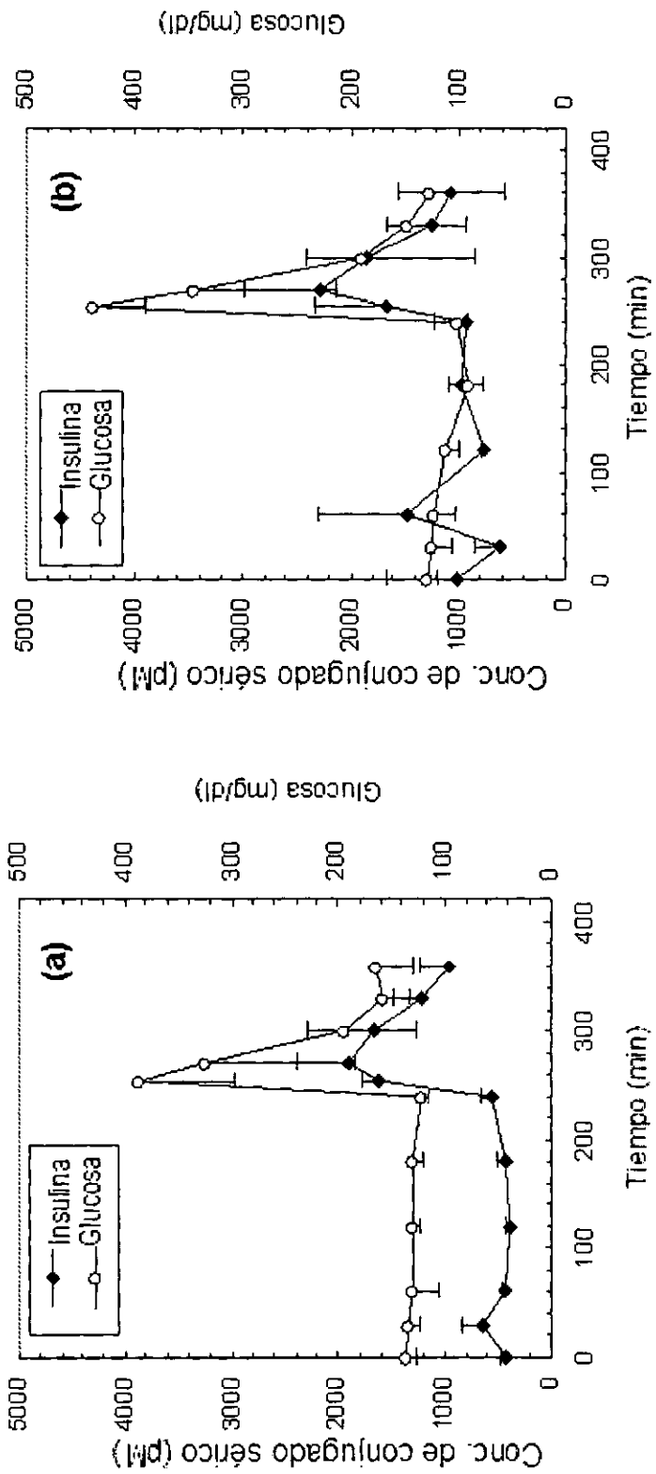
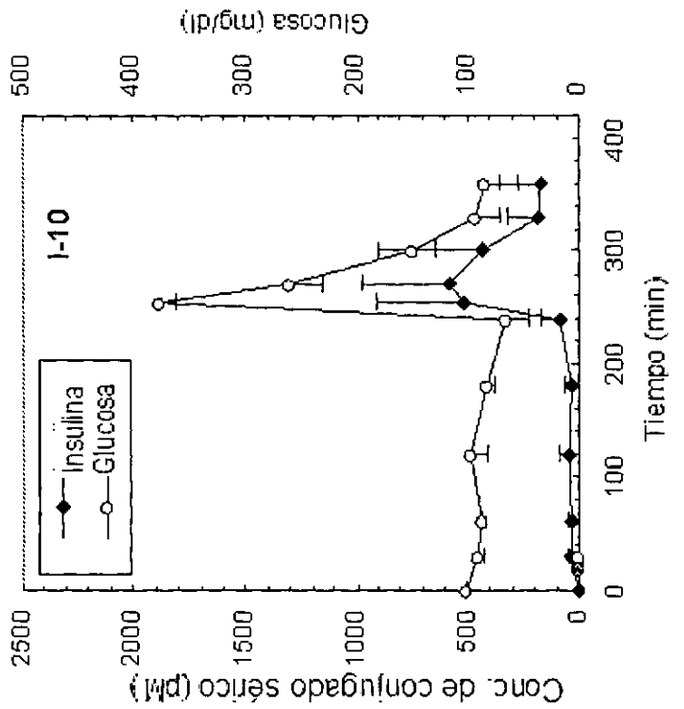

(a)
(b)
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
100
200
300
400
500

FIGURA 40


I-10
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
500
1000
1500
2000
2500
100
200
300
400

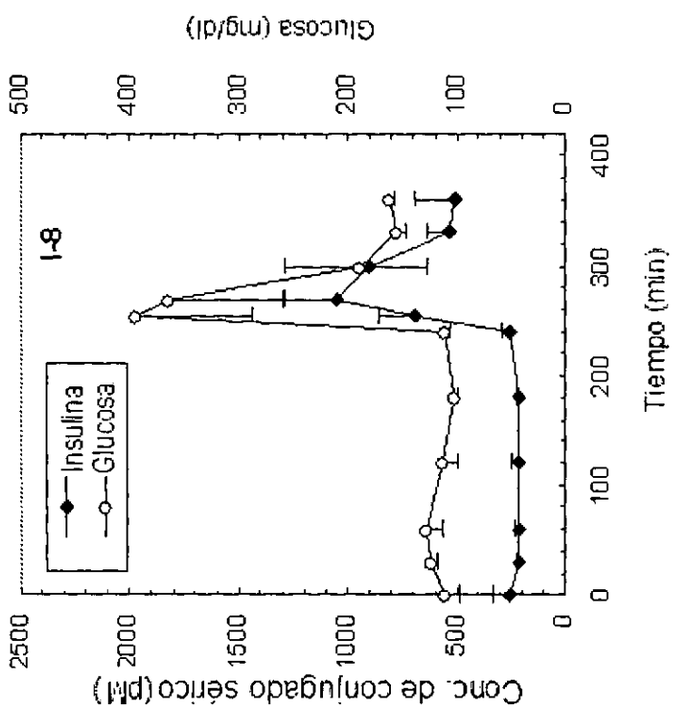

I-8
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
500
1000
1500
2000
2500
100
200
300
400

FIGURA 40 (CONTINUACION)

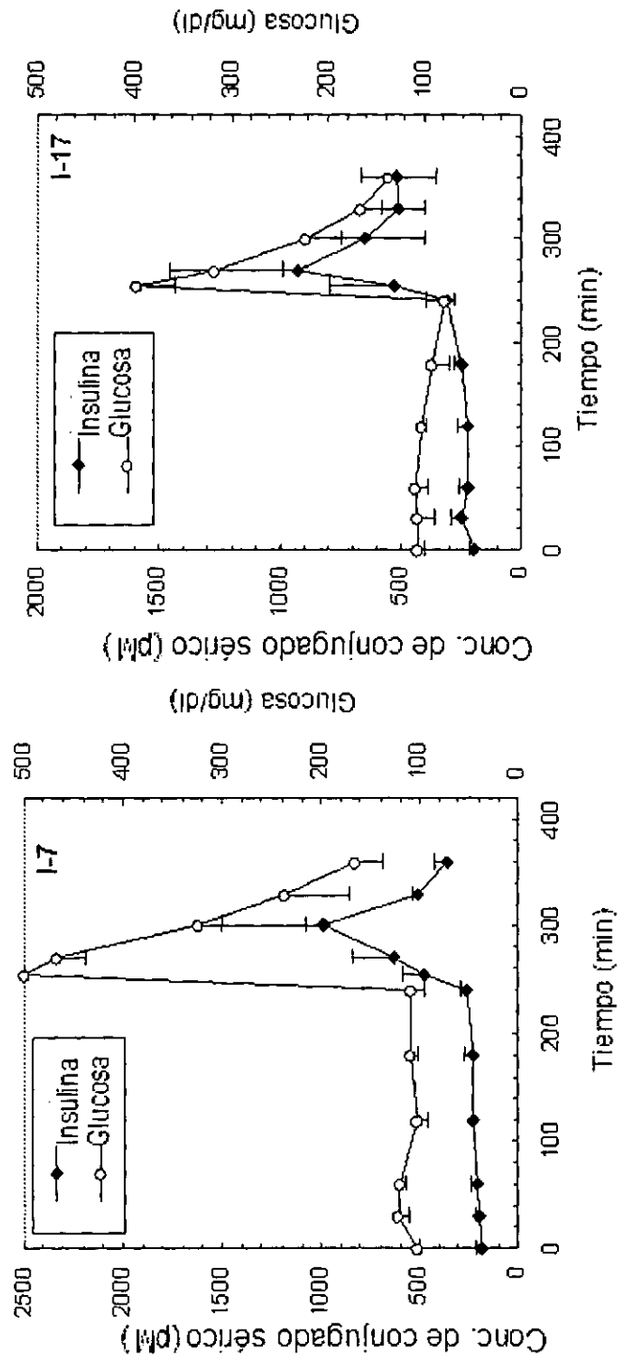


FIGURA 40 (CONTINUACION)

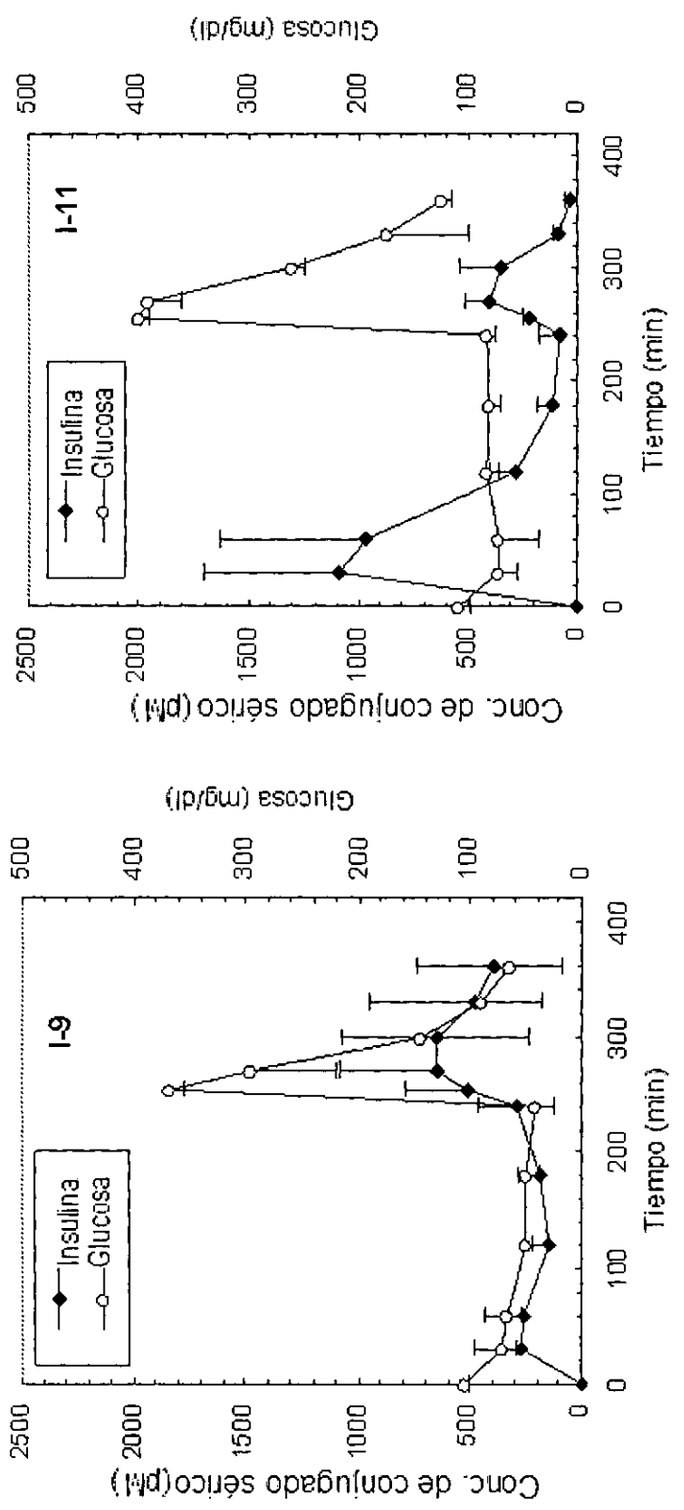
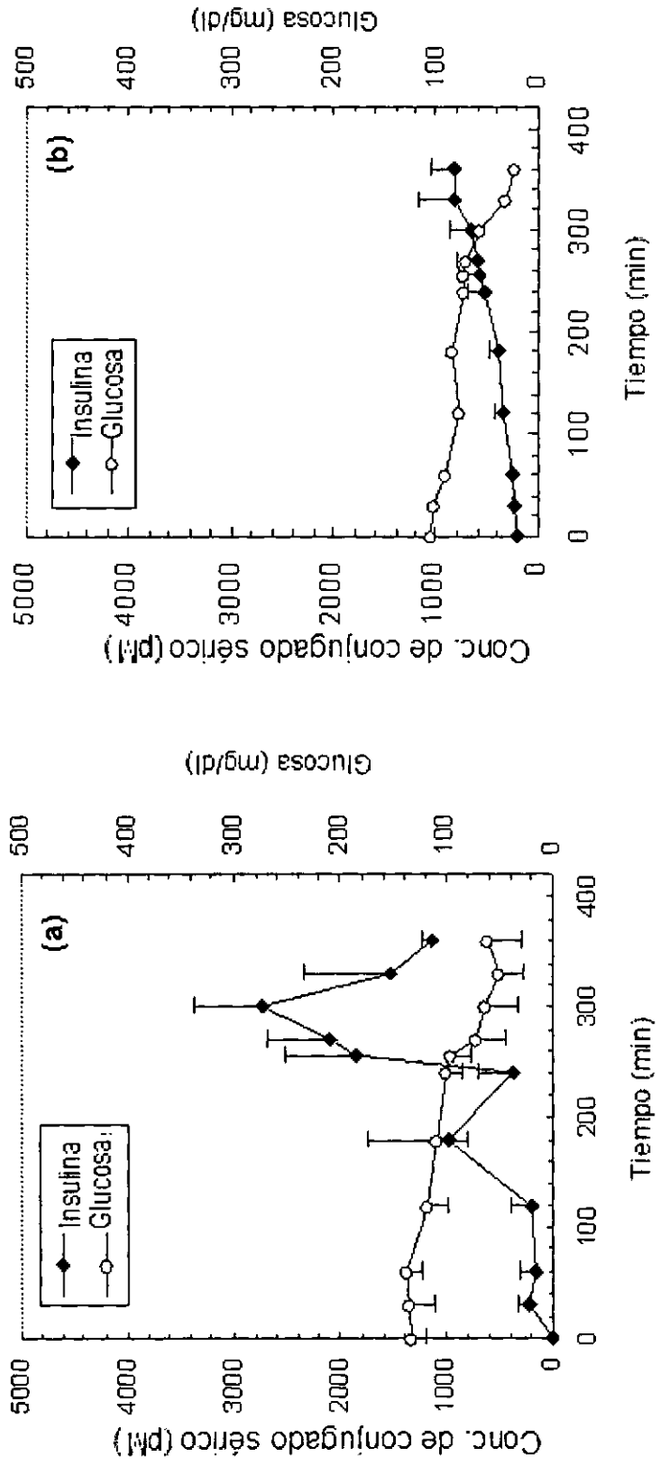


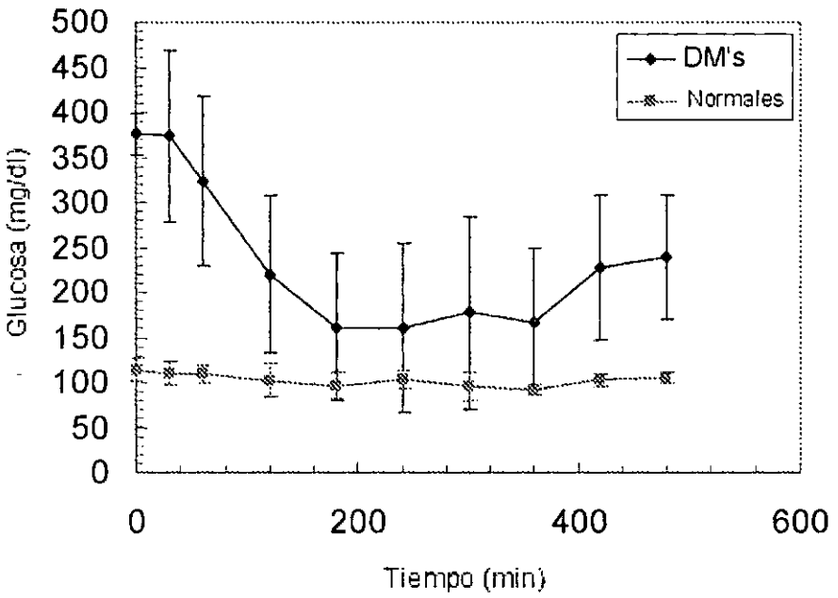
FIGURA 41


(a)
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
0
100
200
300
400
500
0
100
200
300
400

(b)
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
0
100
200
300
400
500
0
100
200
300
400

FIGURA 42

5 U/kg



10 U/kg

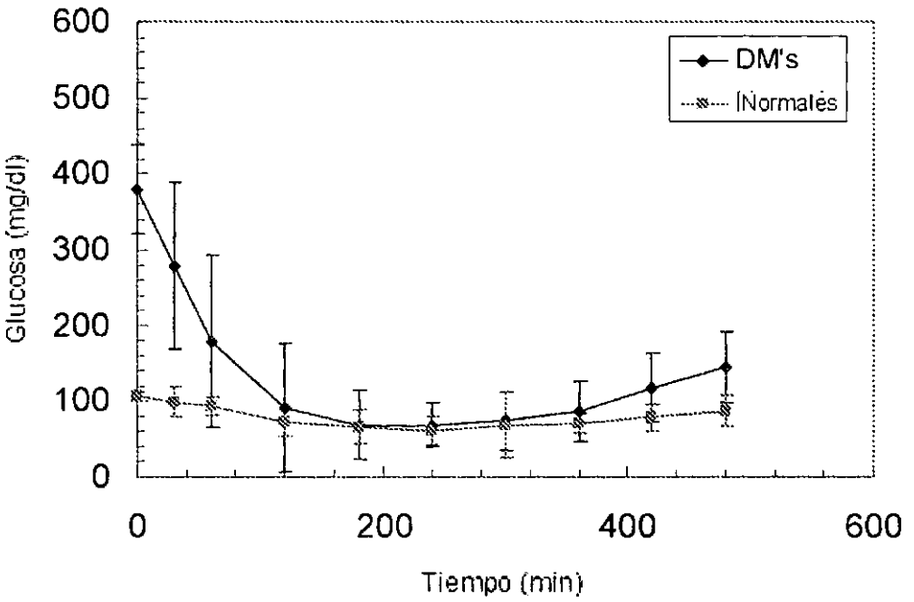


FIGURA 42 (CONTINUACION)

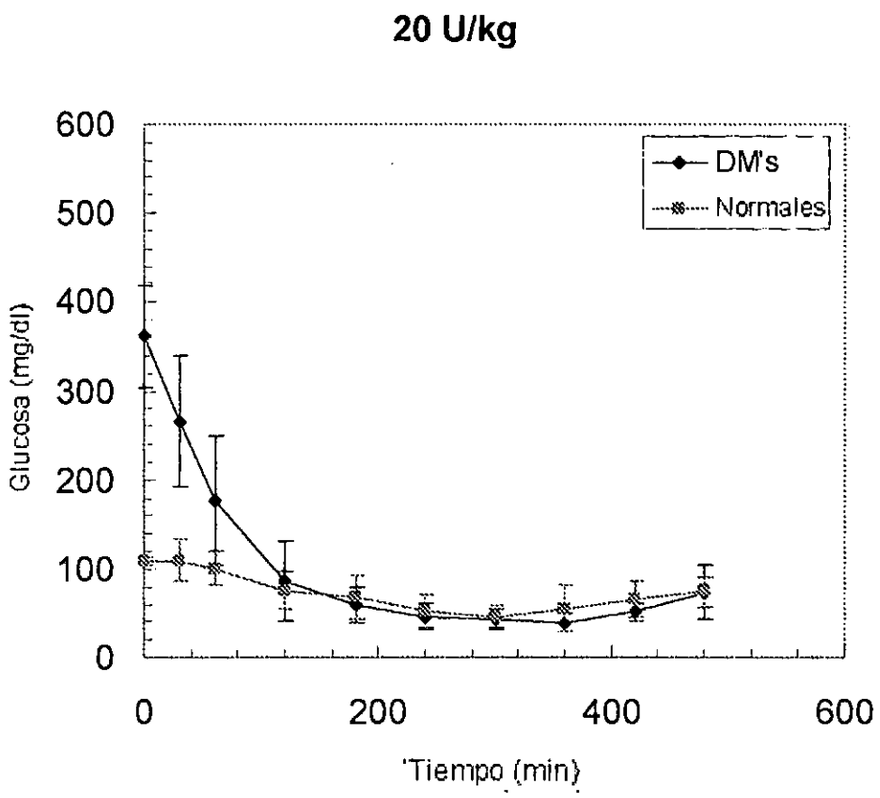


FIGURA 43

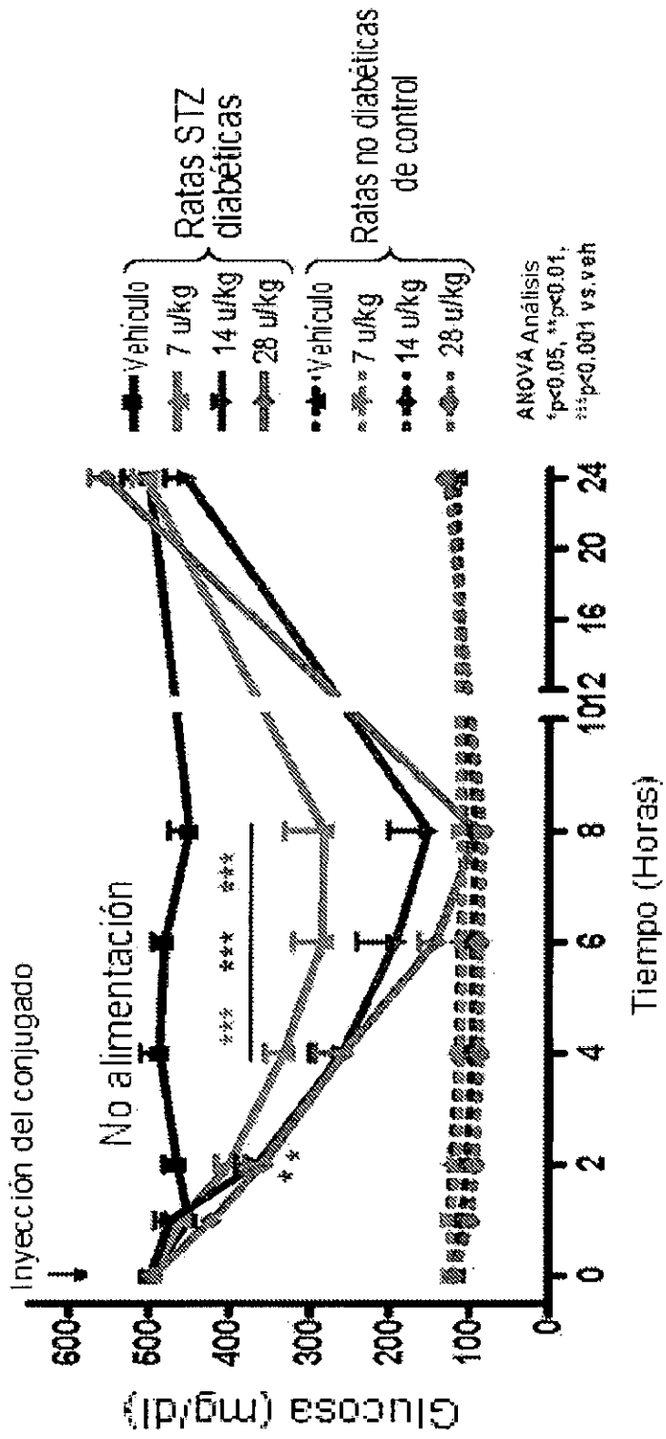

Inyección del conjugado
No alimentación
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (Horas)
Vehículo
7 u/kg
14 u/kg
28 u/kg
Ratas STZ diabéticas
Vehículo
7 u/kg
14 u/kg
28 u/kg
Ratas no diabéticas de control
ANOVA Análisis
*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs.veh

FIGURA 44

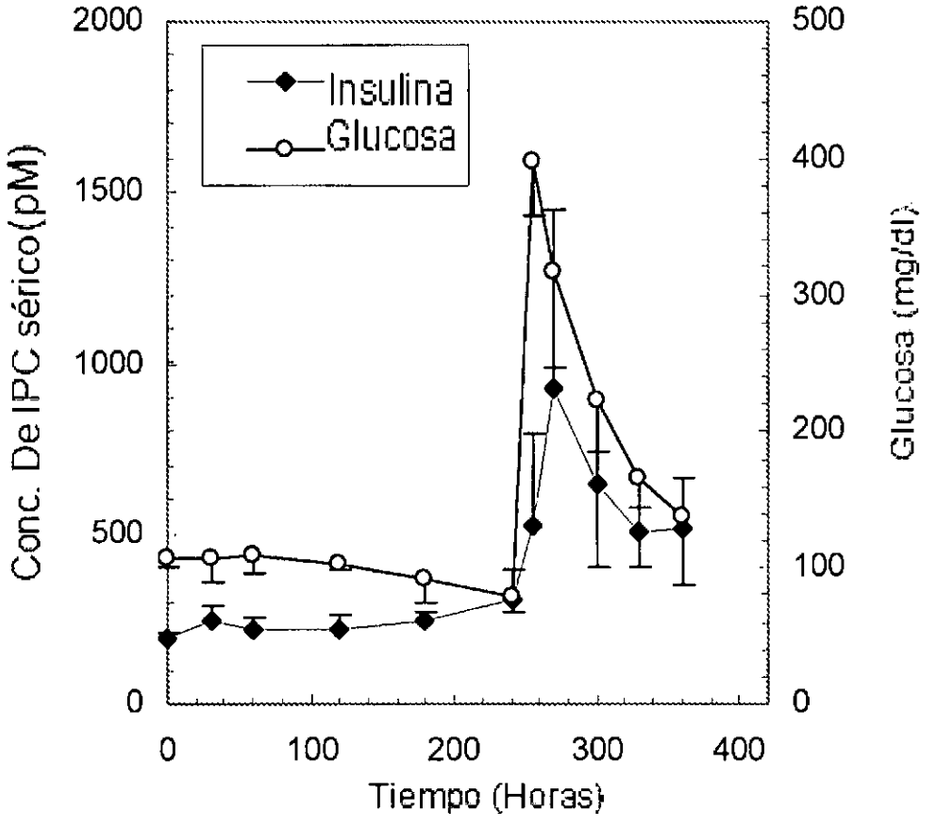
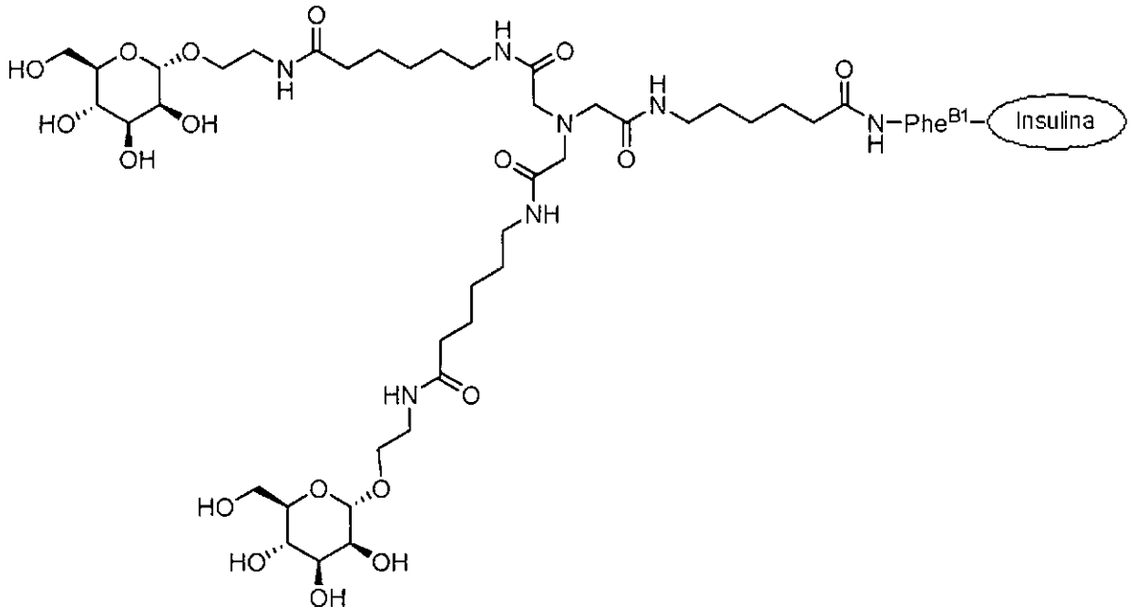
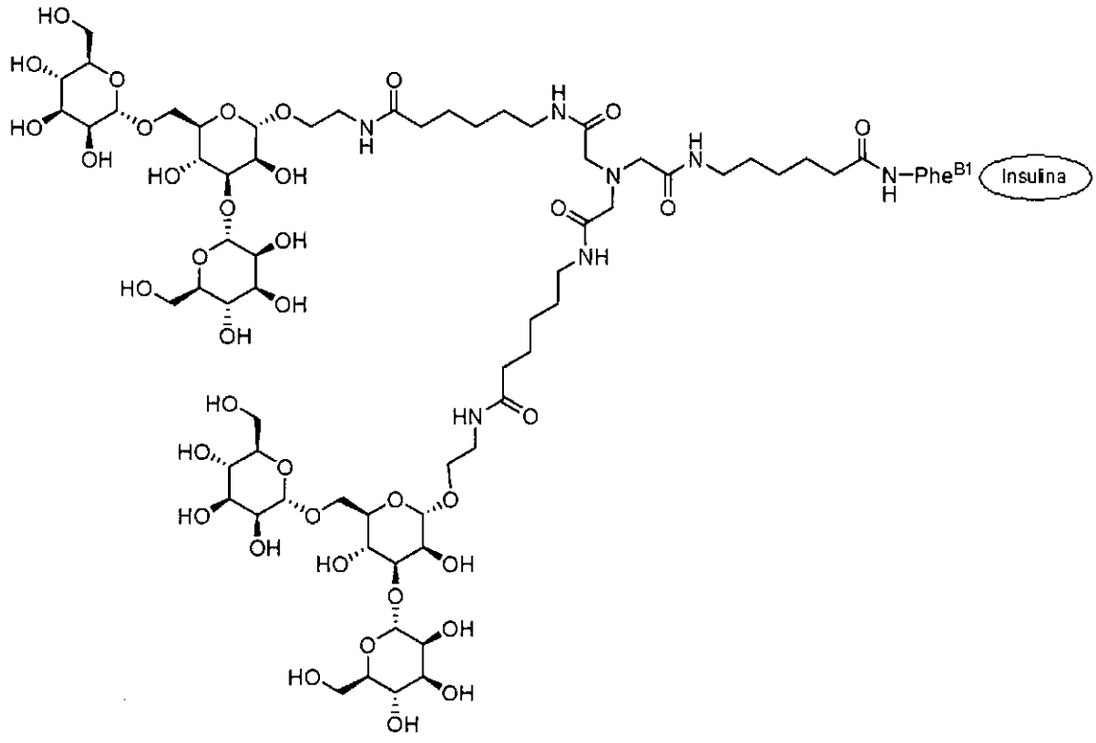

Insulina
Glucosa
Conc. De IPC sérico(pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (Horas)
2000
1500
1000
500
0
500
400
300
200
100
0
0
100
200
300
400

FIGURA 45

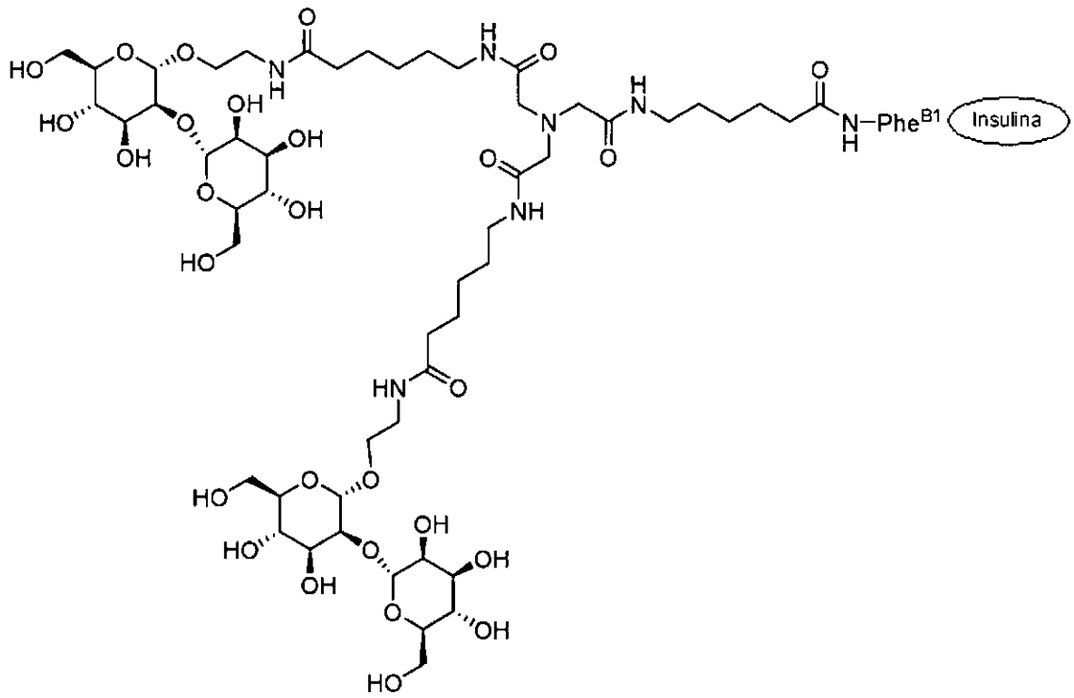


Conjugado **I-1**
TSAT-C6-AEM-2 (B1)

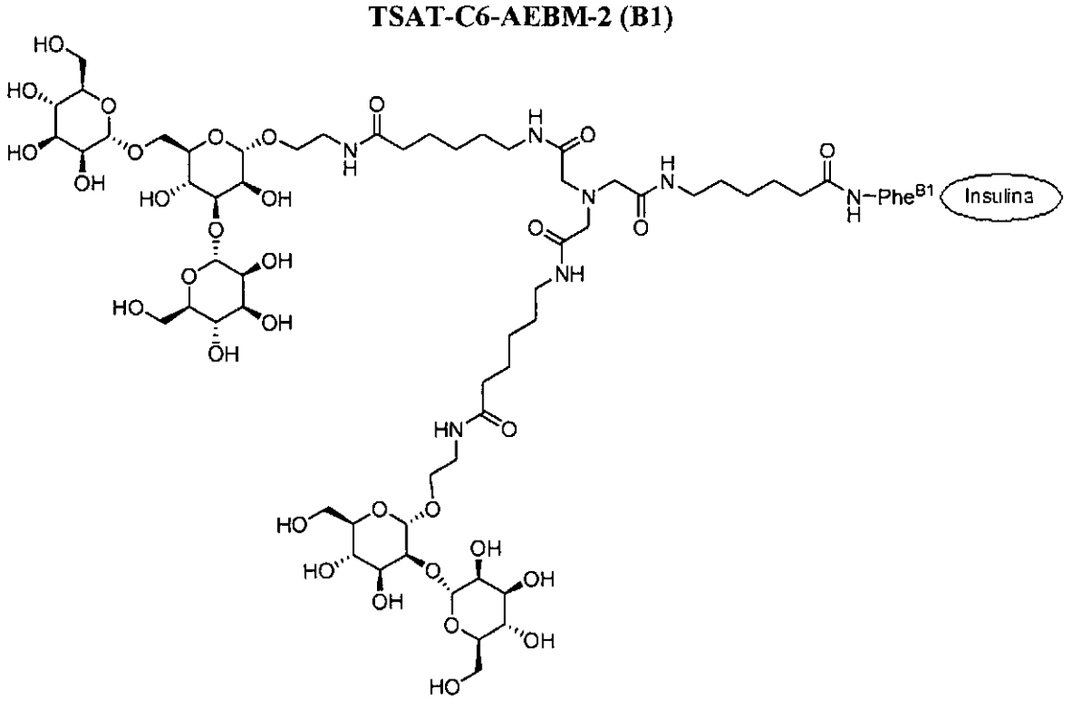


Conjugado **I-2**
TSAT-C6-AETM-2 (B1)

FIGURA 45 (CONTINUACION)

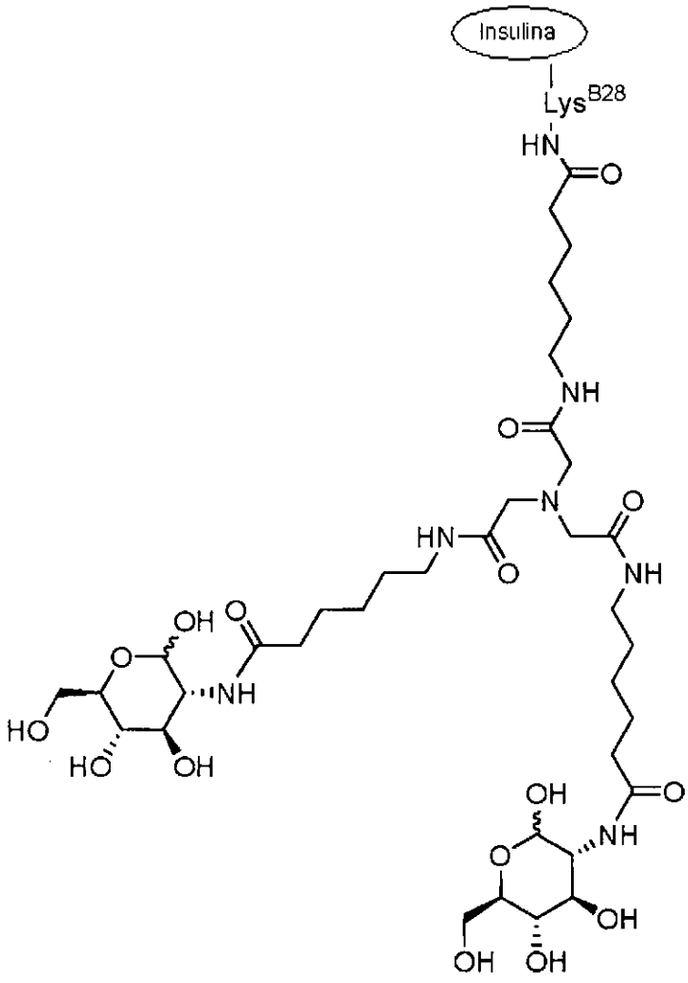


Conjugado **I-3**
TSAT-C6-AEBM-2 (B1)



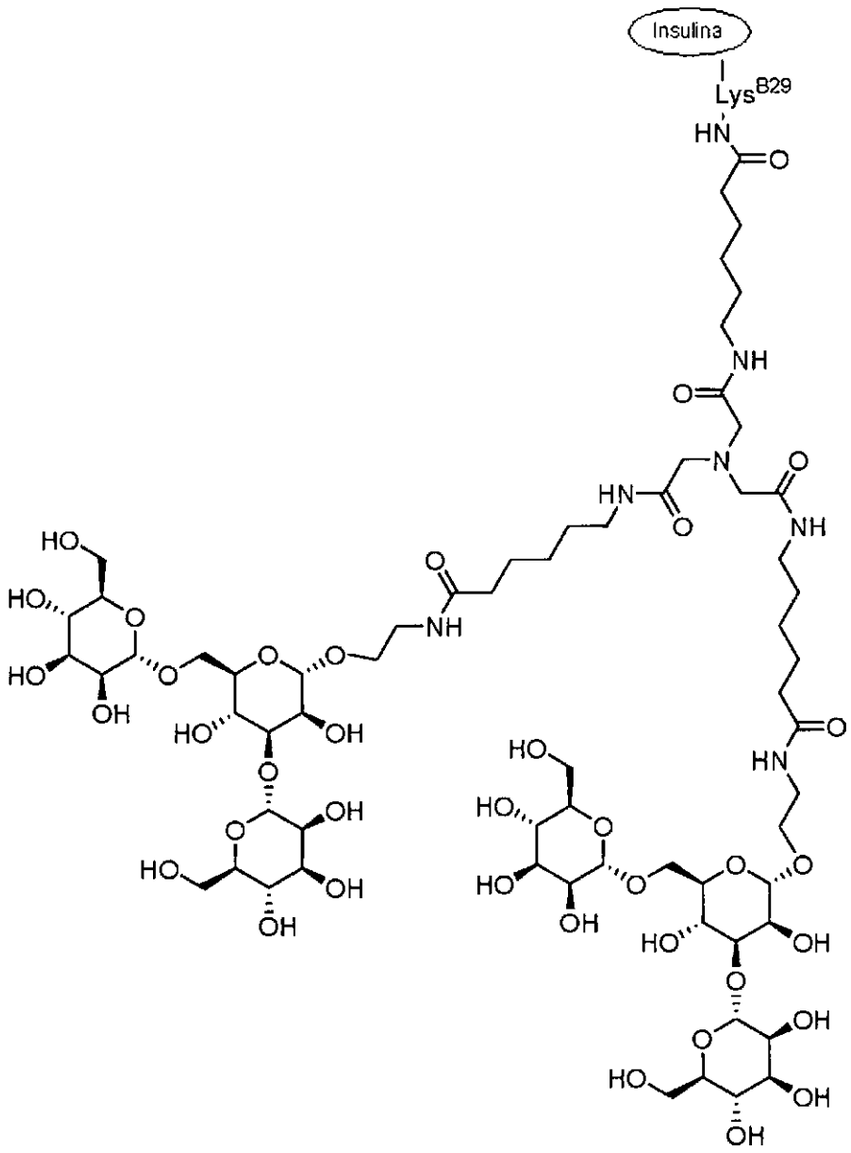
Conjugado **I-4**
TSAT-C6-AEBM-1-AETM-1 (B1)

FIGURA 45 (CONTINUACION)



Conjugado **I-5**
TSAT-C6-GA-2 (B29)

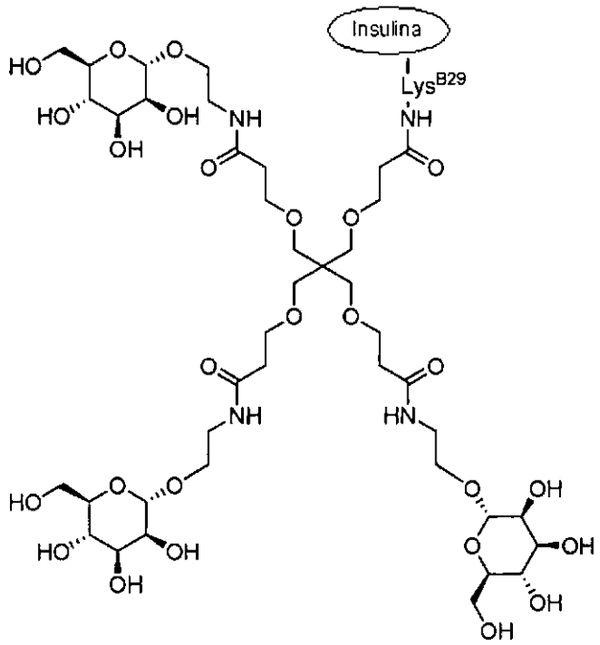
FIGURA 45 (CONTINUACION)



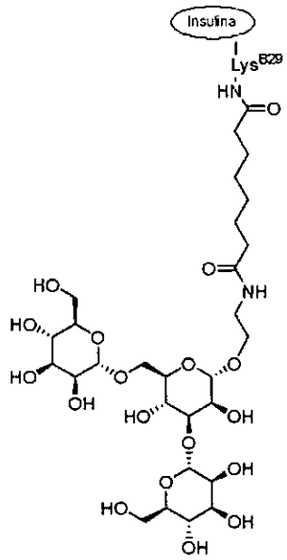
Conjugado **I-6**

TSAT-C6-AETM-2 (B29)

FIGURA 45 (CONTINUACION)

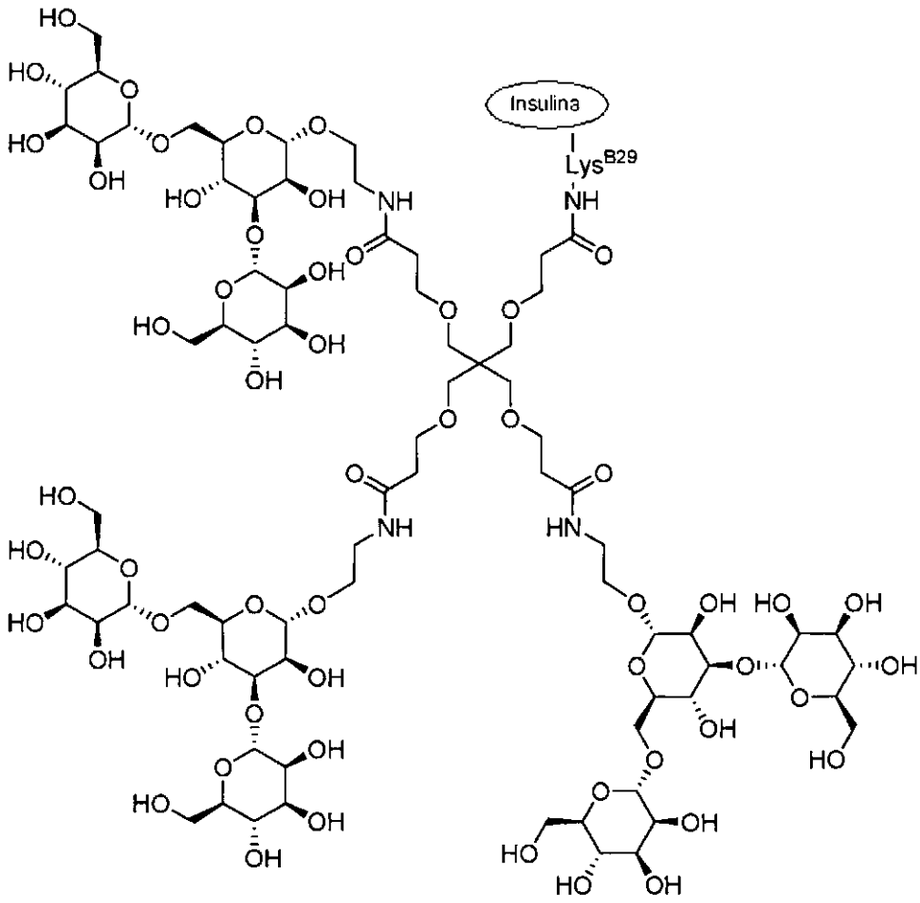


Conjugado **I-9**
TSPE-AEM-3 (B29)



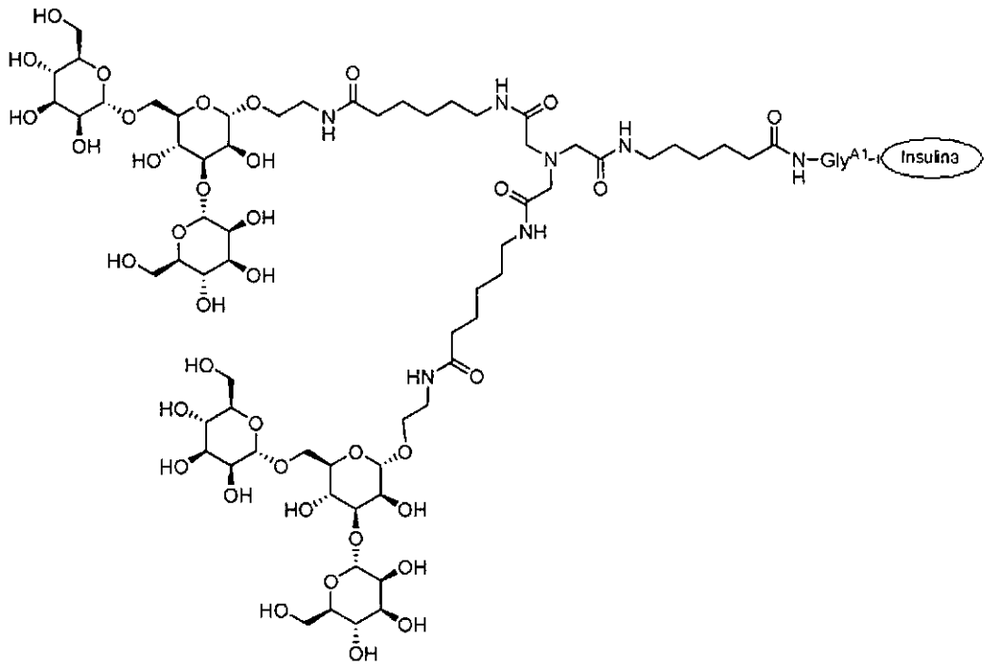
Conjugado **I-10**
DSS-AETM-1 (B29)

FIGURA 45 (CONTINUACION)

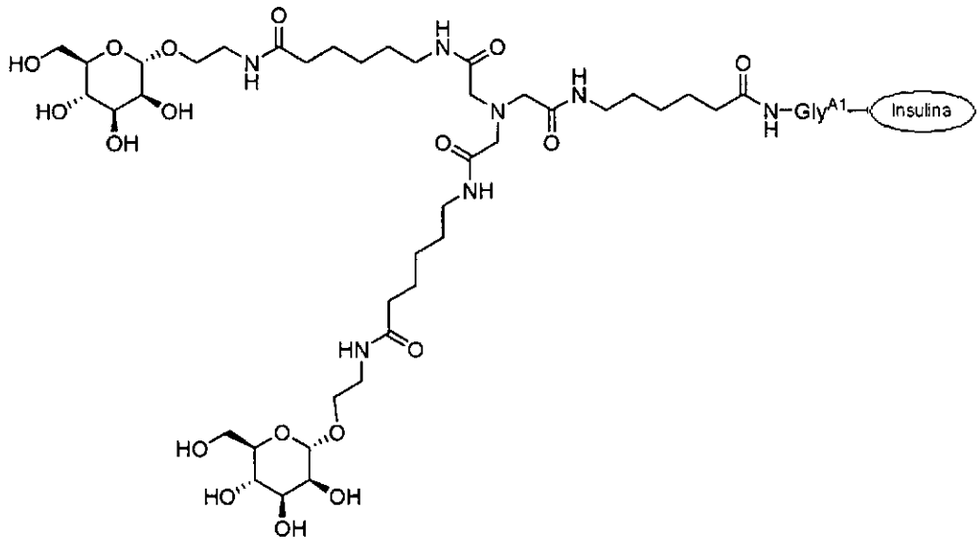


Conjugado **I-11**
TSPE-AETM-3 (B29)

FIGURA 45 (CONTINUACION)

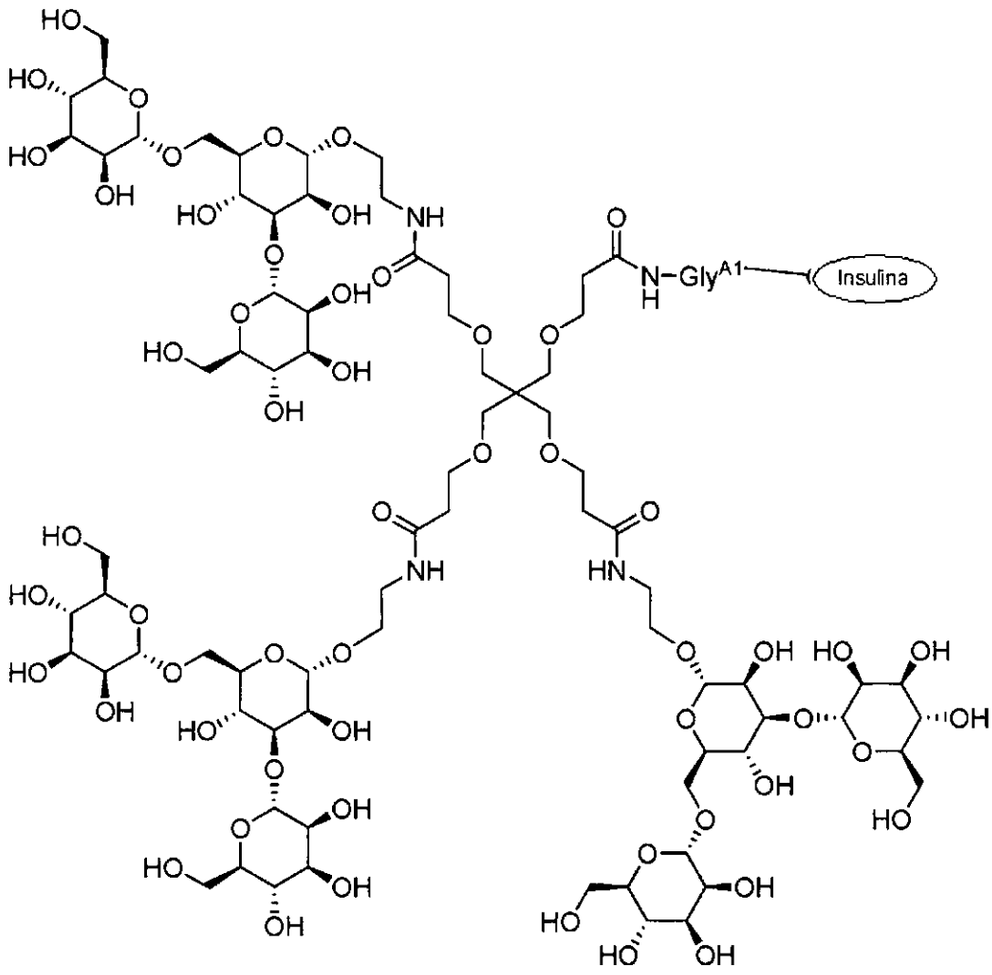


Conjugado **I-12**
TSAT-C6-AETM-2 (A1)



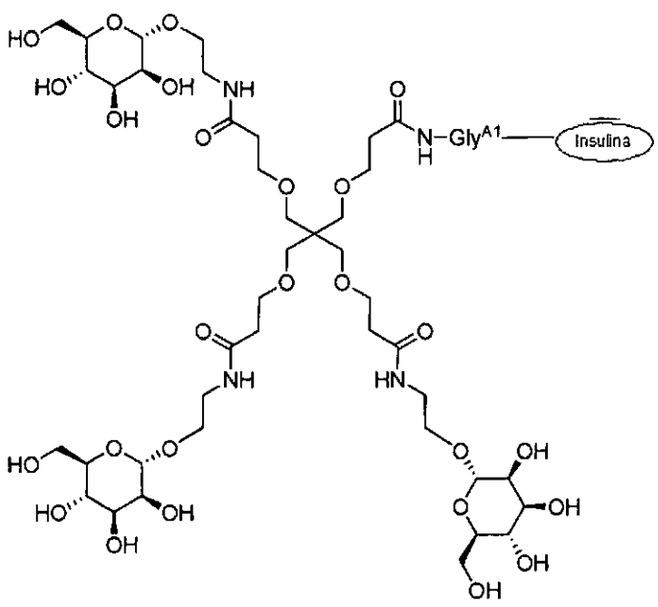
Conjugado **I-13**
TSAT-C6-AEM-2 (A1)

FIGURA 45 (CONTINUACION)

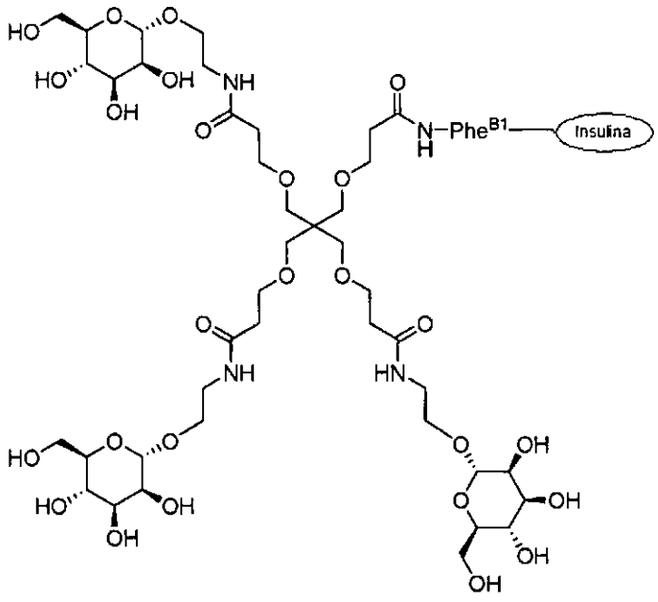


Conjugado **I-14**
TSPE-AETM-3 (A1)

FIGURA 45 (CONTINUACION)

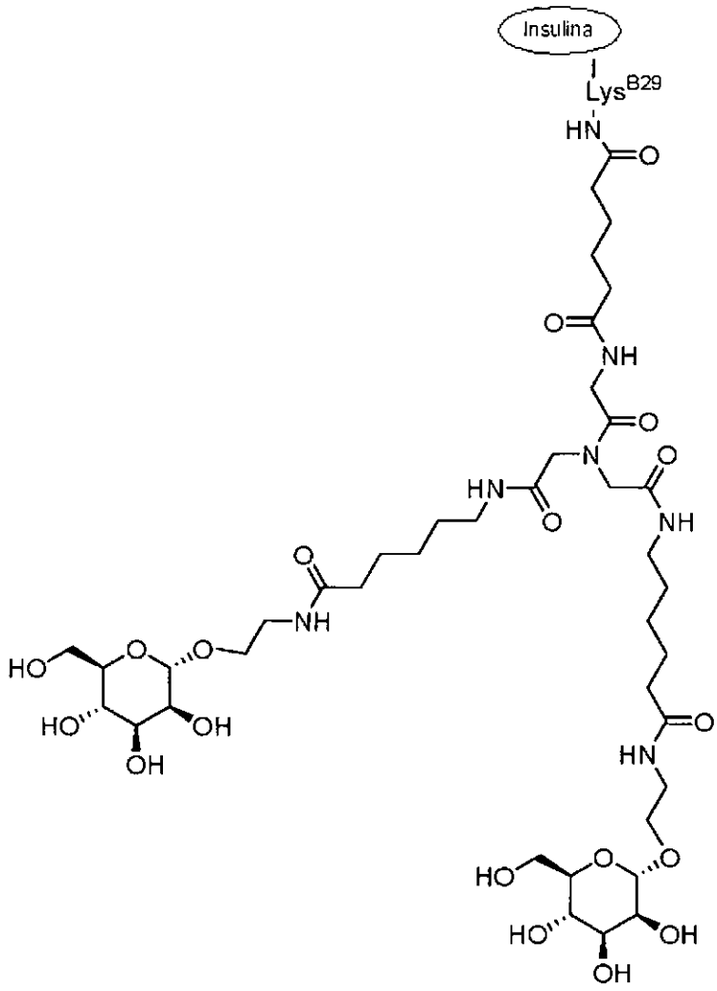


Conjugado **I-15**
TSPE-AEM-3 (A1)



Conjugado **I-16**
TSPE-AEM-3 (B1)

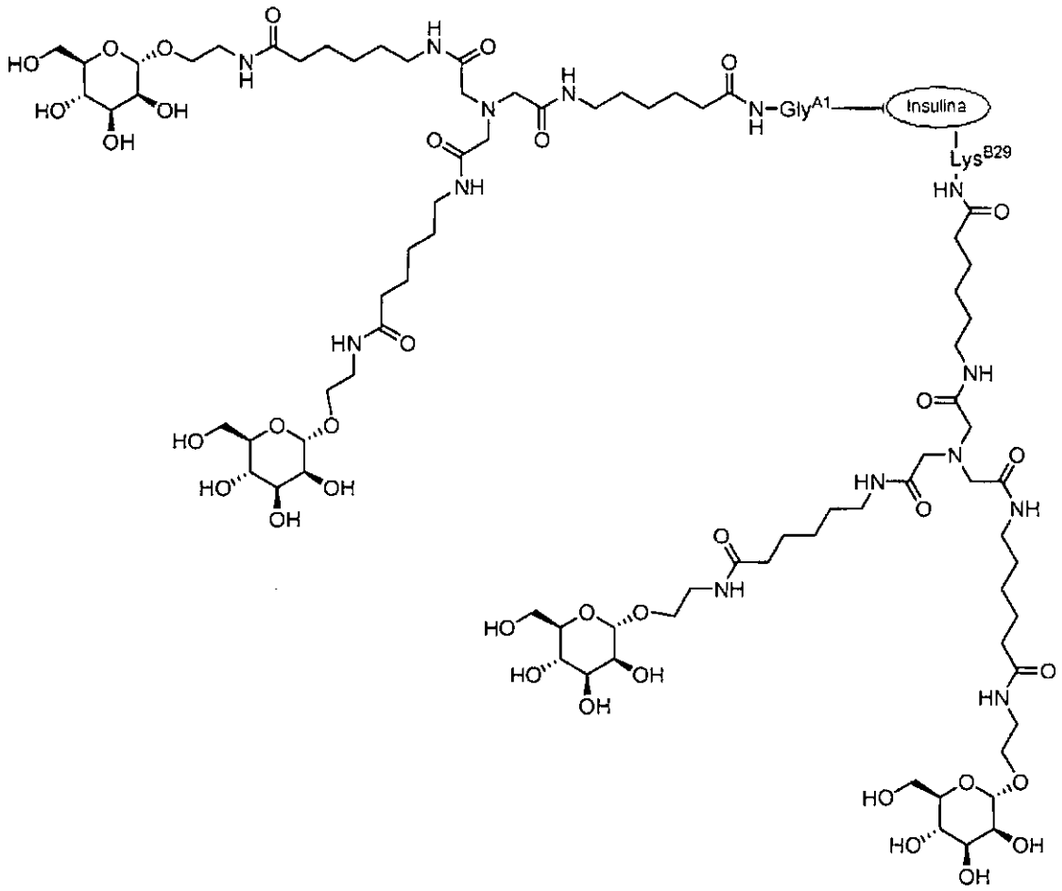
FIGURA 45 (CONTINUACION)



Conjugado **I-17**

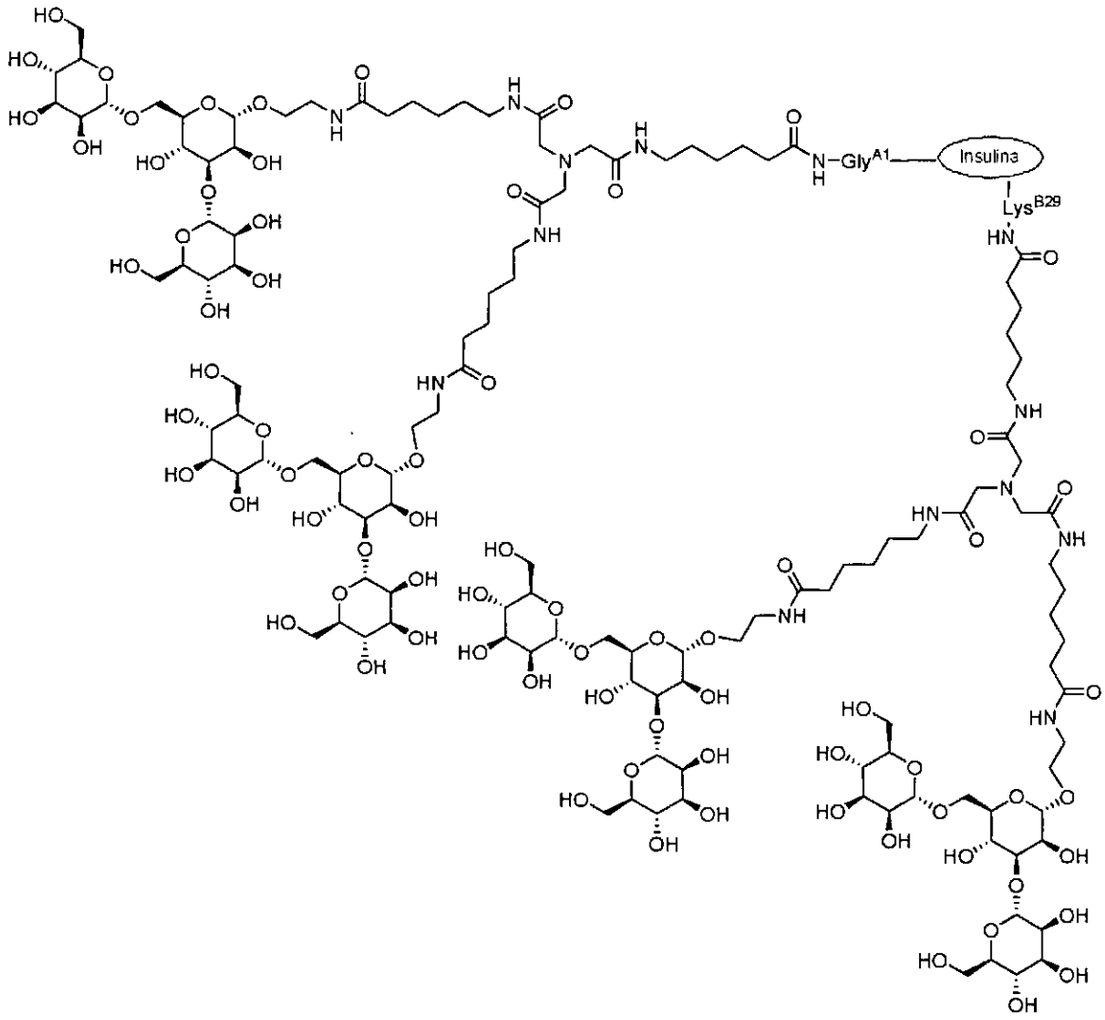
C6-Amida-AEM-2 (B29)

FIGURA 45 (CONTINUACION)



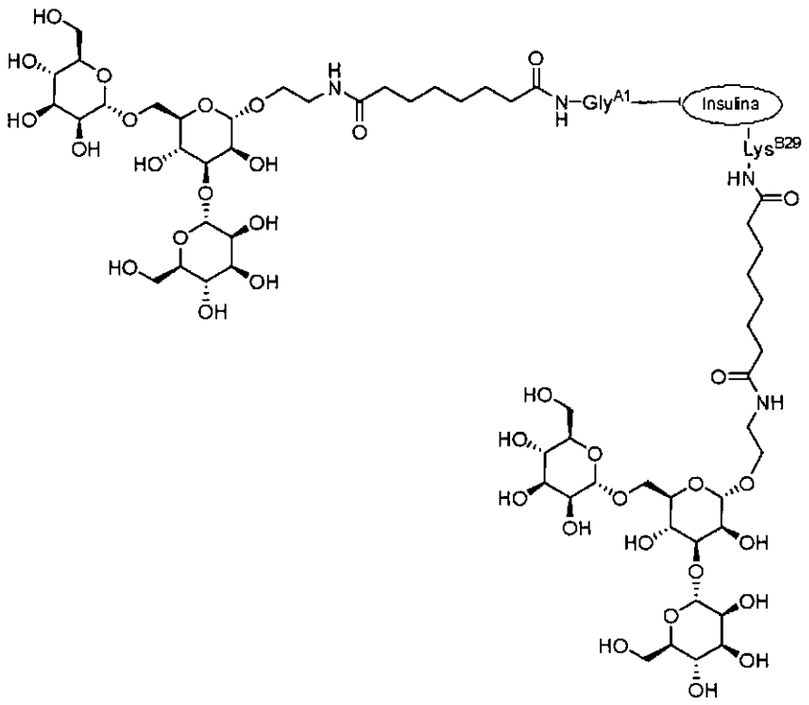
Conjugado **II-1**
TSAT-C6-Di-sub-AEM-2 (A1,B29)

FIGURA 45 (CONTINUACION)

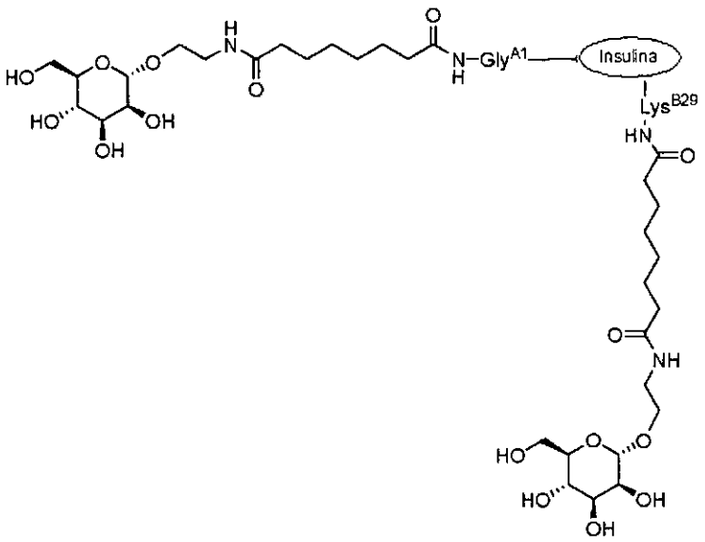


Conjugado **II-2**
TSAT-C6-Di-sub-AETM-2 (A1,B29)

FIGURA 45 (CONTINUACION)

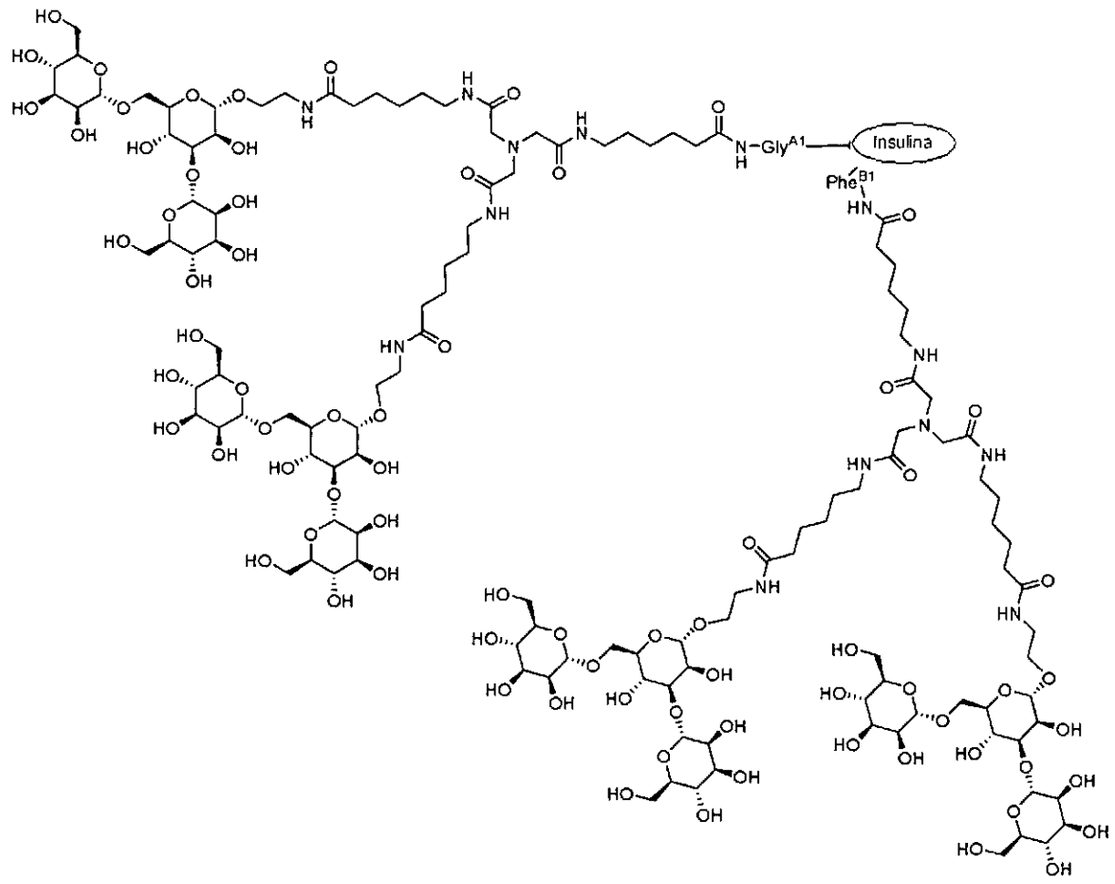


Conjugado **II-3**
DSS-Di-sub-AETM-1 (A1,B29)



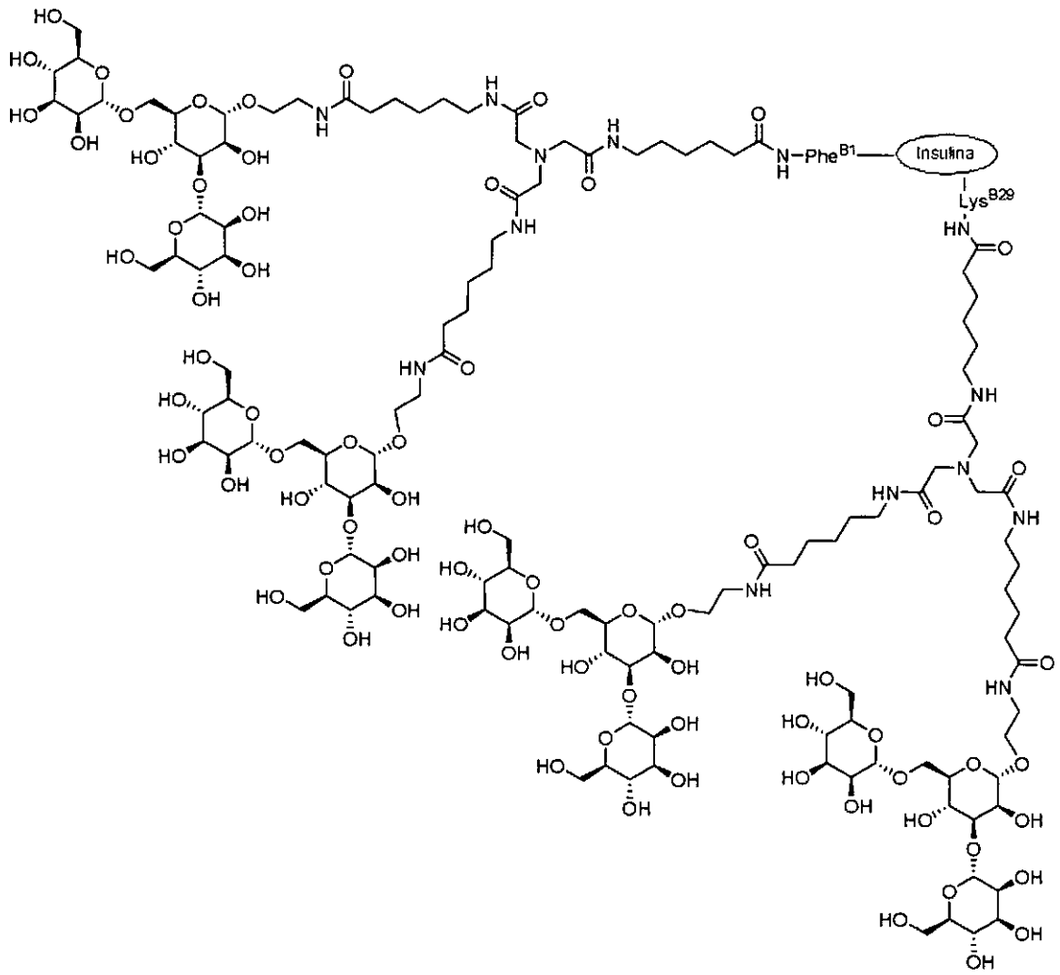
Conjugado **II-4**
DSS-Di-sub-AEM-1 (A1,B29)

FIGURA 45 (CONTINUACION)



Conjugado **II-5**
TSAT-C6-Di-sub-AETM-2 (A1,B1)

FIGURA 45 (CONTINUACION)



Conjugado II-6
TSAT-C6-Di-sub-AETM-2 (B1,B29)

FIGURA 46

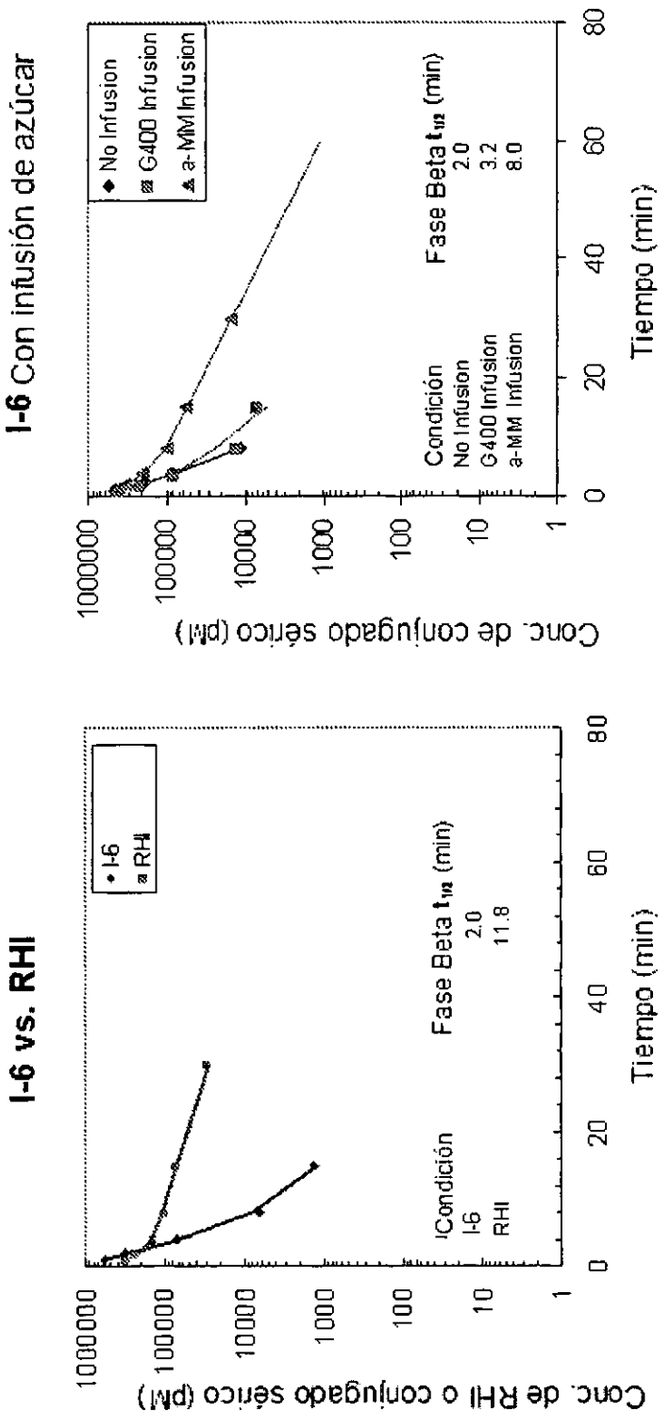

I-6 Con infusión de azúcar
Conc. de conjugado sérico (pM)
Tiempo (min)
No Infusion
G400 Infusion
a-MM Infusion
Condición
Fase Beta t1/2 (min)
No Infusion 2.0
G400 Infusion 3.2
a-MM Infusion 8.0
I-6 vs. RHI
Conc. de RHI o conjugado sérico (pM)
Tiempo (min)
I-6
RHI
Condición
Fase Beta t1/2 (min)
I-6 2.0
RHI 11.8

FIGURA 47

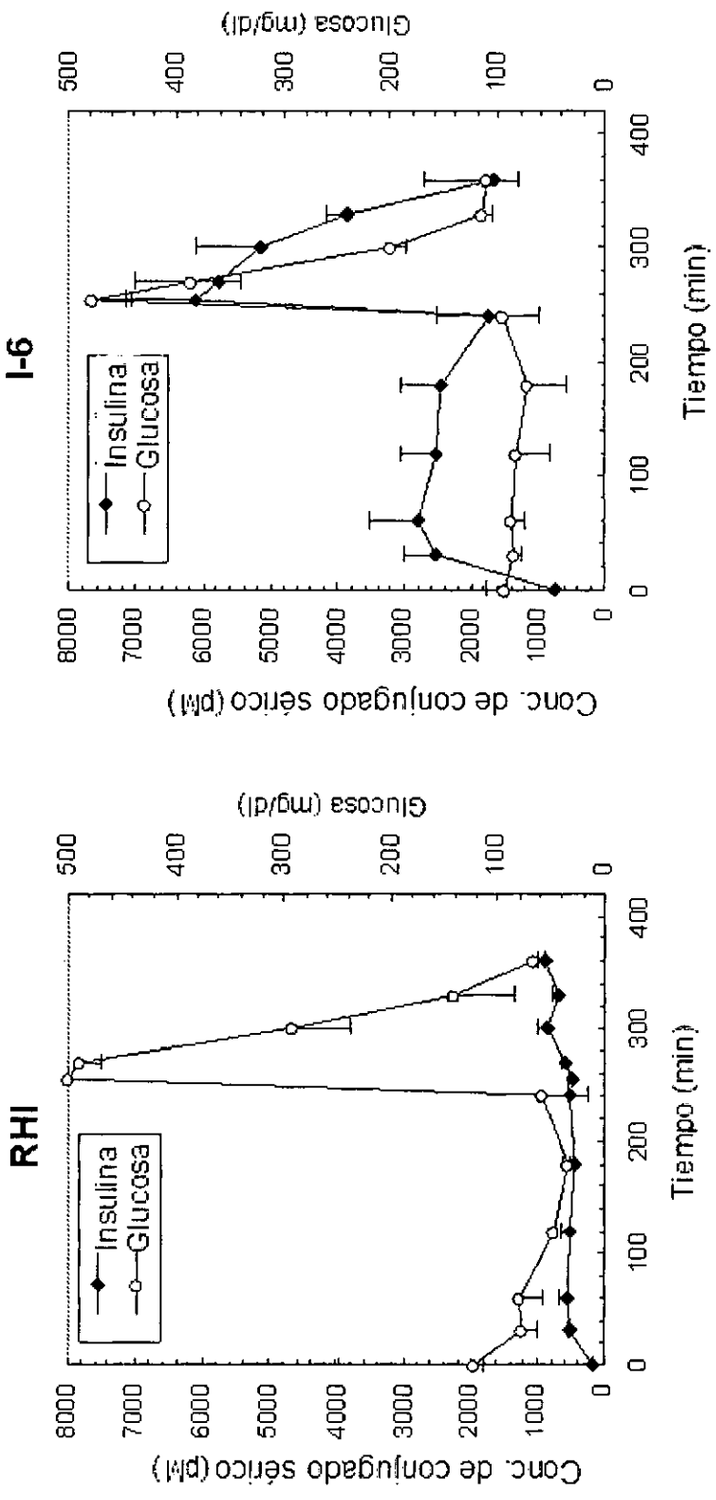

I-6
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
RHI
Insulina
Glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)

FIGURA 47 (CONTINUACION)

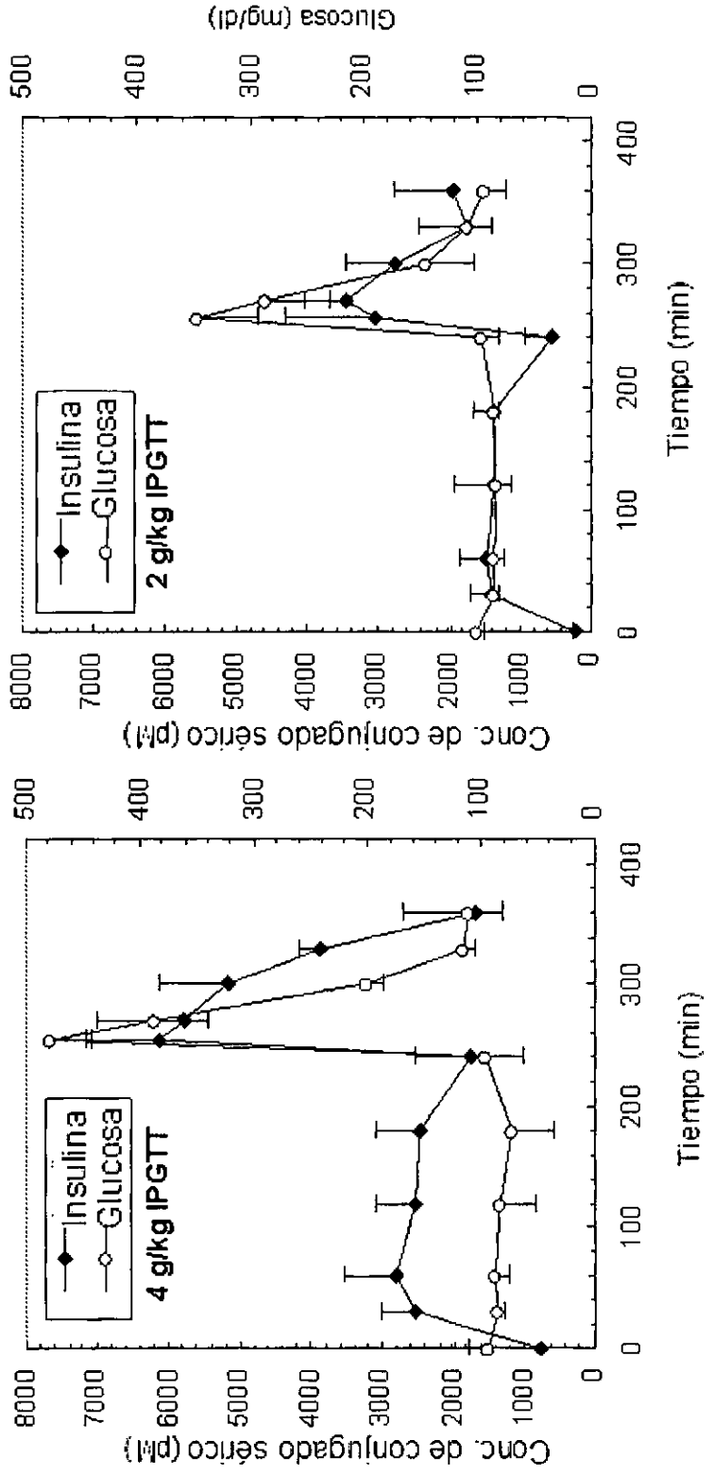


FIGURA 47 (CONTINUACION)

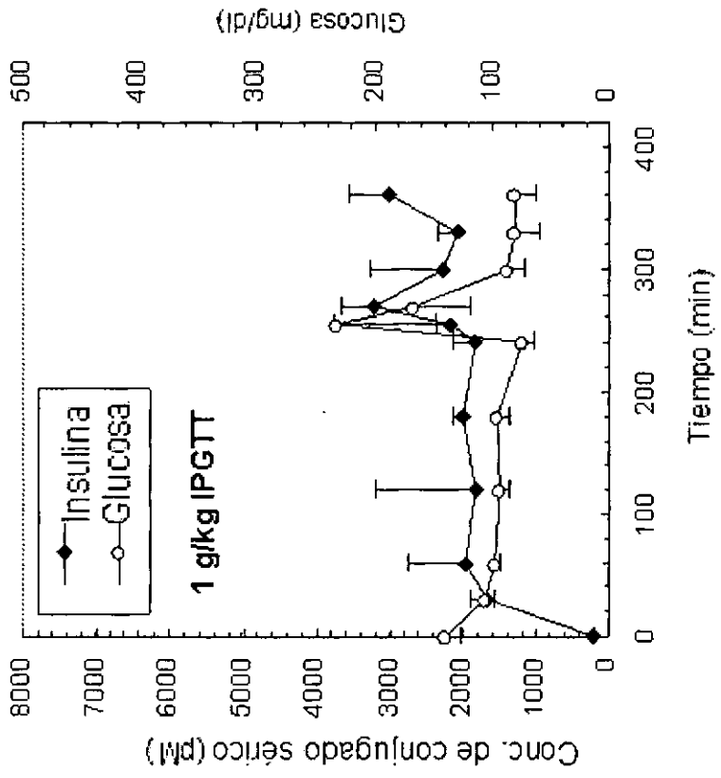


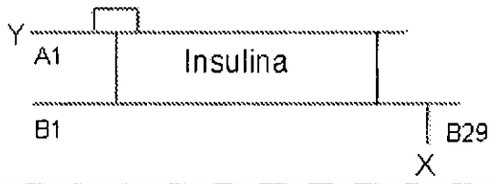
FIGURA 48

Condición	Fase Beta $t_{1/2}$(min)
No Infusion	11.8
G400 Infusion	8.6
a-MM Infusion	8.0

Condición	Fase Beta $t_{1/2}$ (min)
No Infusion	2.0
G400 Infusion	6.9
a-MM Infusion	14.4

Condición	Fase Beta $t_{1/2}$ (min)
No Infusion	2.0
G400 Infusion	3.2
a-MM Infusion	8.0

FIGURA 49

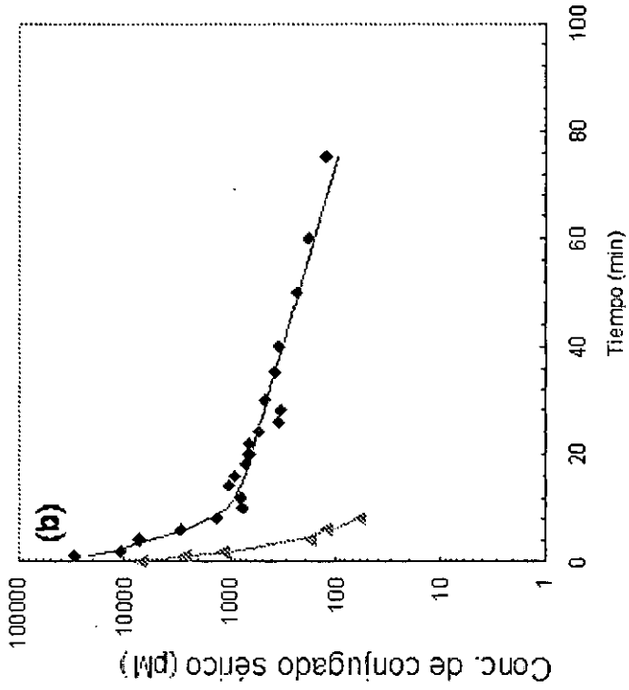


Formulación	Andamio – **X**	Andamio – **Y**	Azúcar **(n)**
RHI	n/a	n/a	n/a
I-7: AEM-2	n/a	TSAT-C_6	AEM (2)
I-6: AETM-2	n/a	TSAT-C_6	AETM (2)
I-11: AETM-3	n/a	TSPE	AETM (3)
II-2: Di-sub-AETM-2	TSAT-C_6	TSAT-C_6	AETM (2x2)

FIGURA 50

	β-Fase media-vida **(min)** Para cada tipo de infusión		
Formulación	Sol. Salina	Glucosa	α-Metil manosa
RHI	2.7	2.3	3.3
I-7: AEM-2	5.5	5.8	5.4
I-6: AETM-2	4.8	3.3	8.1
I-11: AETM-3	6.7	3.7	10.8
II-2: Di-sub-AETM-2	2.5	n/a	20.3

FIGURA 51


(b)
Conc. de conjugado sérico (pM)
100000
10000
1000
100
10
1
0
20
40
60
80
100
Tiempo (min)

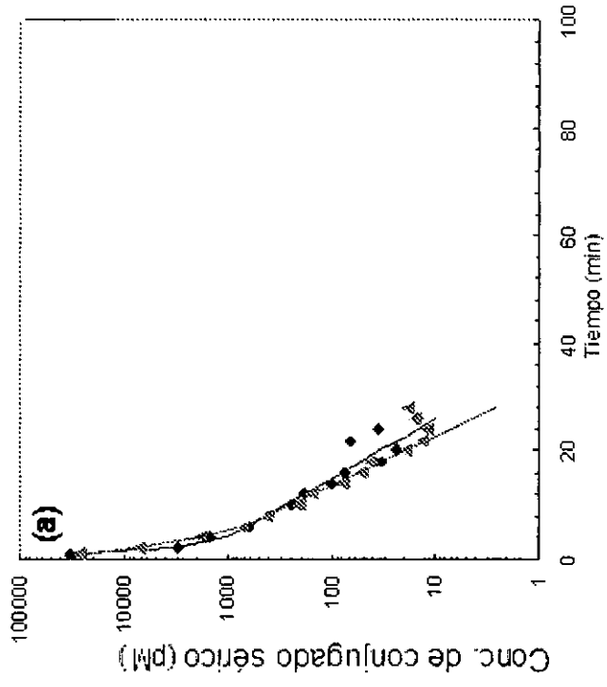
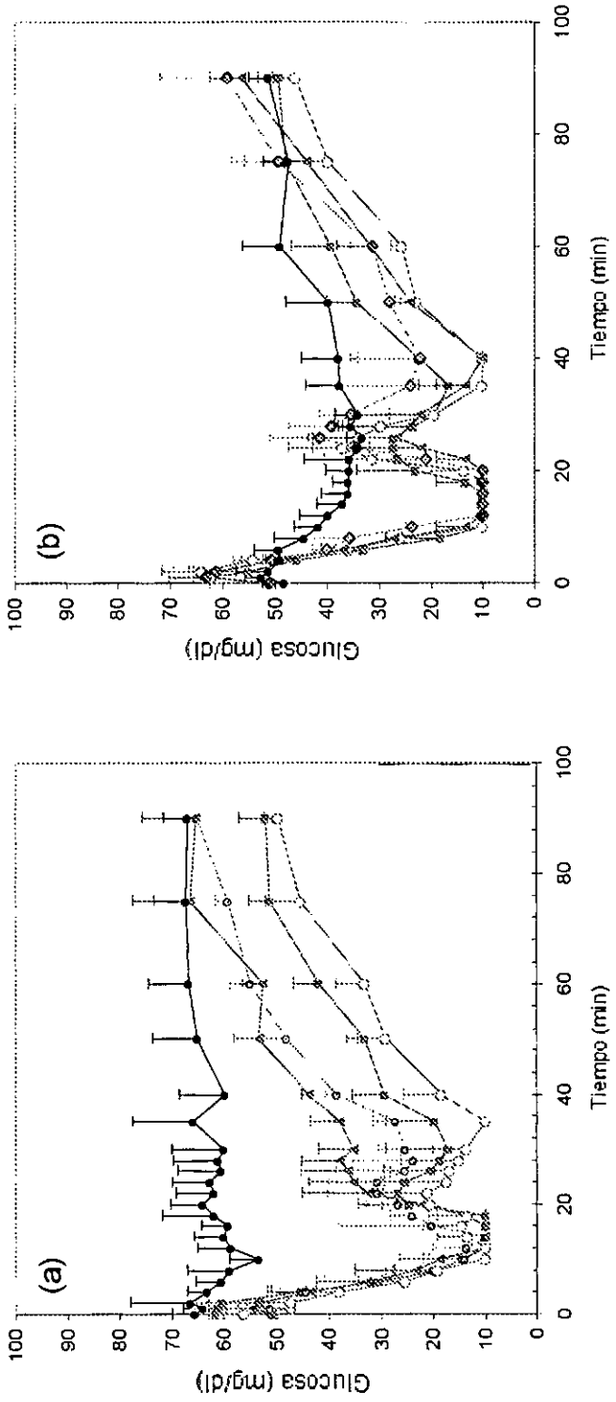

(a)
Conc. de conjugado sérico (pM)
100000
10000
1000
100
10
1
0
20
40
60
80
100
Tiempo (min)

FIGURA 52



(a)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
Diabéticos - 1.00 U_kg
Diabéticos - 0.50 U/kg
Diabéticos - 0.25 U/kg
(b)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
Normales - 1.00 U/kg
Normales - 0.50 U/kg
Normales - 0.25 U/kg

FIGURA 53

FIGURA 54

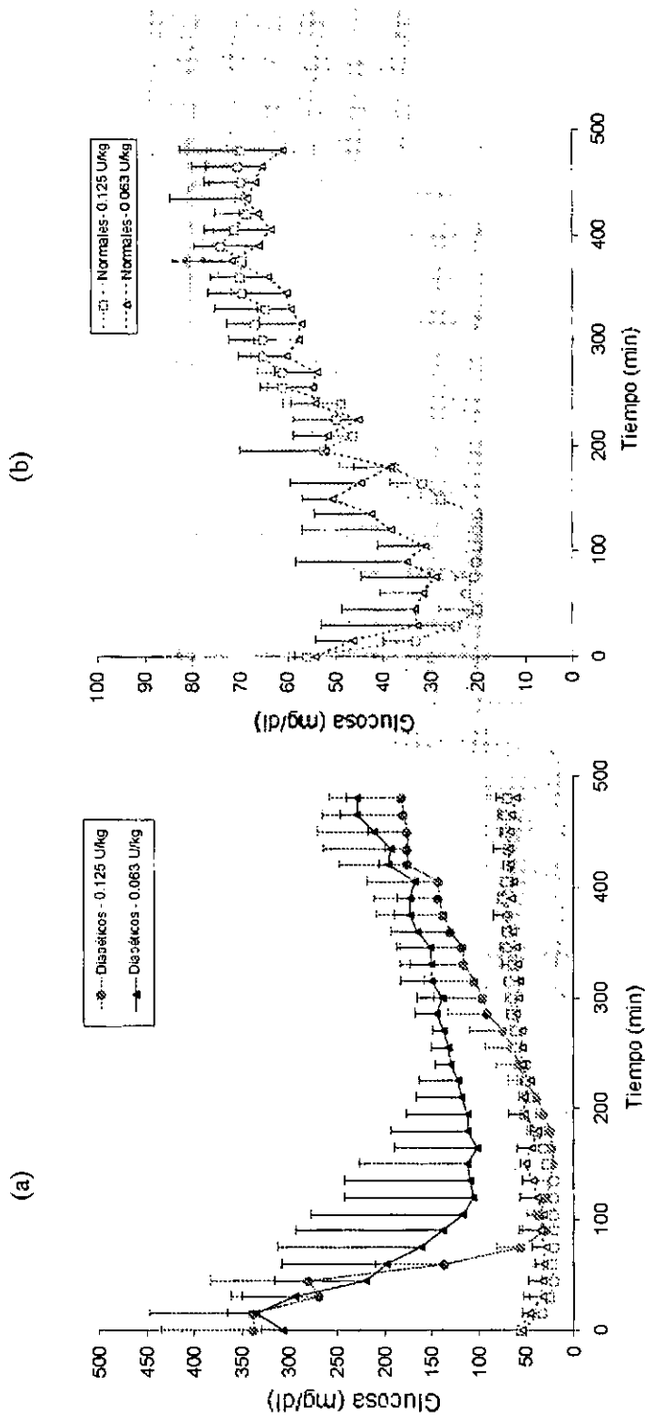
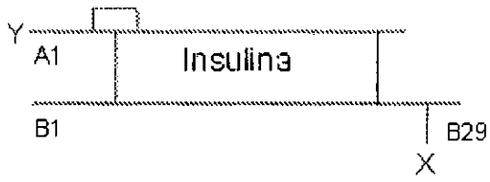
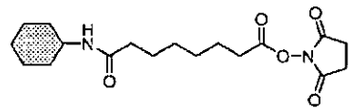

(a)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
Diabéticos - 0.125 U/kg
Diabéticos - 0.063 U/kg
(b)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
Normales - 0.125 U/kg
Normales - 0.063 U/kg

FIGURA 55





DSS

Formulación	Andamio – **X**	Andamio – **Y**	Azúcar **(n)**
I-12: AETM-2	n/a	TSAT-C_6	AETM (2)
I-13: AEM-2	n/a	TSAT-C_6	AEM (2)
I-15: AEM-3	n/a	TSPE	AEM (3)
I-14: AETM-3	n/a	TSPE	AETM (3)
II-1: Di-sub-AEM-2	TSAT-C_6	TSAT-C_6	AEM (2x2)
II-3: Di-sub-AETM-1	DSS	DSS	AETM (2x1)
II-4: Di-sub-AEM-1	DSS	DSS	AEM (2x1)

FIGURA 56

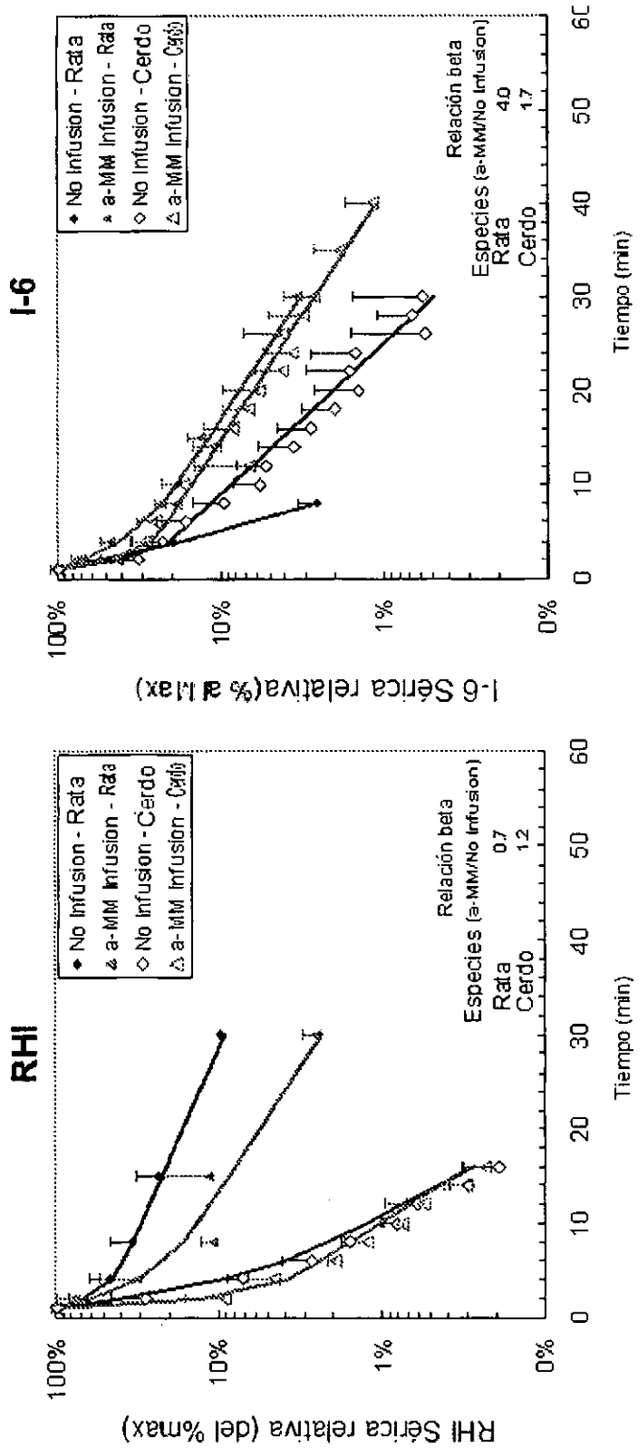

I-6
No Infusion - Rata
a-MM Infusion - Rata
No Infusion - Cerdo
a-MM Infusion - Cerdo
Relación beta
Especies (a-MM/No Infusion)
Rata 40
Cerdo 1.7
I-6 Sérica relativa(% del max)
Tiempo (min)
RHI
No Infusion - Rata
a-MM Infusion - Rata
No Infusion - Cerdo
a-MM Infusion - Cerdo
Relación beta
Especies (a-MM/No Infusion)
Rata 0.7
Cerdo 1.2
RHI Sérica relativa (del %max)
Tiempo (min)

FIGURA 57

Insulina-conjugada	Composición de azúcar	$t_{1/2,\beta}$ (a-MM)/ $t_{1/2,\beta}$ (No Inf)
II-2	B29: AETMx2, A1: AETMx2	8.1
I-12	A1: AETMx2	2.3
I-6	B29: AETMx2	1.7
I-11	B29: AETMx3	1.6
I-9	B29: AEMx3	1.6
II-1	B29: AEMx2, A1: AEMx2	1.5
II-3	B29: AETMx1, A1: AETMx1	1.3
RHI	n/a	1.2
I-7	B29: AEMx2	1.0
II-4	B29: AEMx1, A1: AEMx1	0.9

FIGURA 58

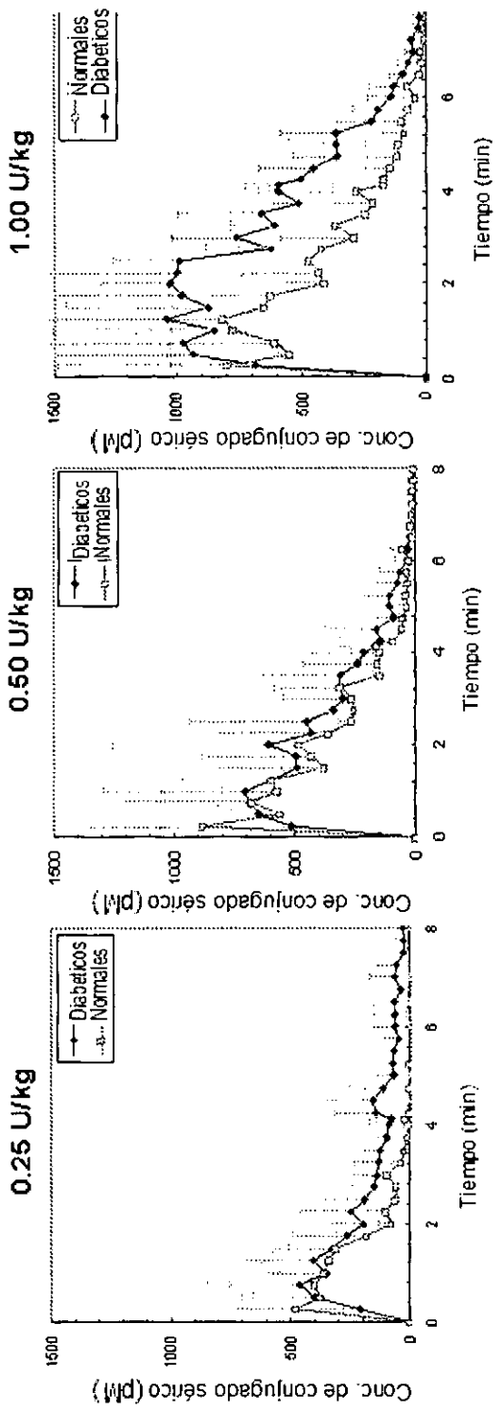
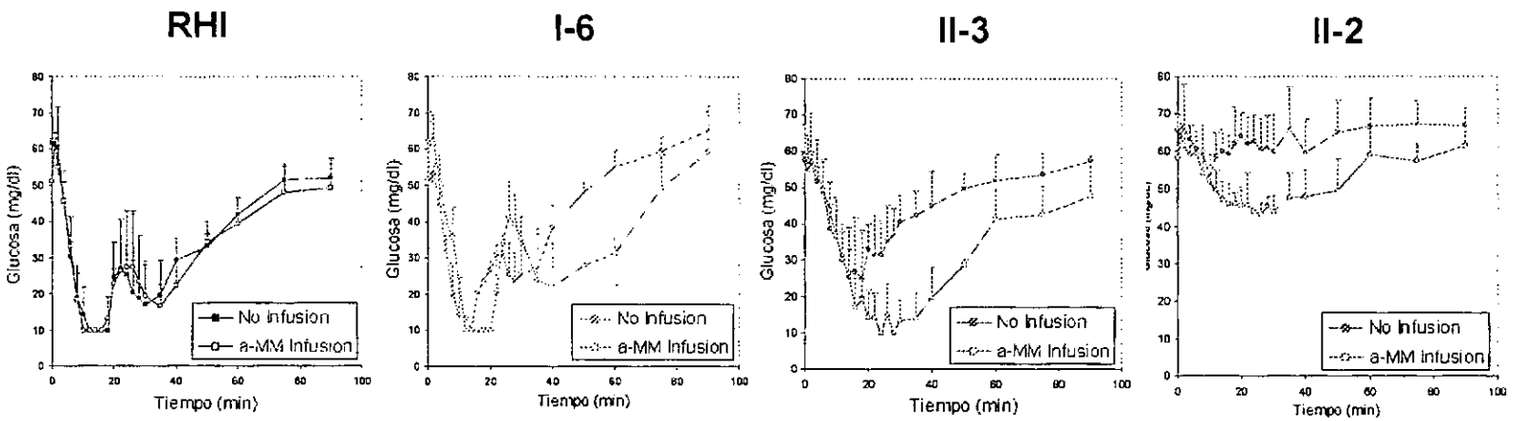

0.25 U/kg
0.50 U/kg
1.00 U/kg
Diabeticos
Normales
Conc. de conjugado sérico (pM)
Tiempo (min)
0
500
1000
1500
0
2
4
6
8

FIGURA 59



Formulación	Relación AOC (a-MM/no infusion)	$t_{1/2,\beta}$ (a-MM)/ $t_{1/2,\beta}$ (no infusion)
RHI	0.99	1.2
I-6	1.36	1.6
II-3	2.34 ←	1.3 ←
II-2	2.58 ←	8.1 ←

Falta de correlación entre vida media azúcar – dependiente y bioactividad

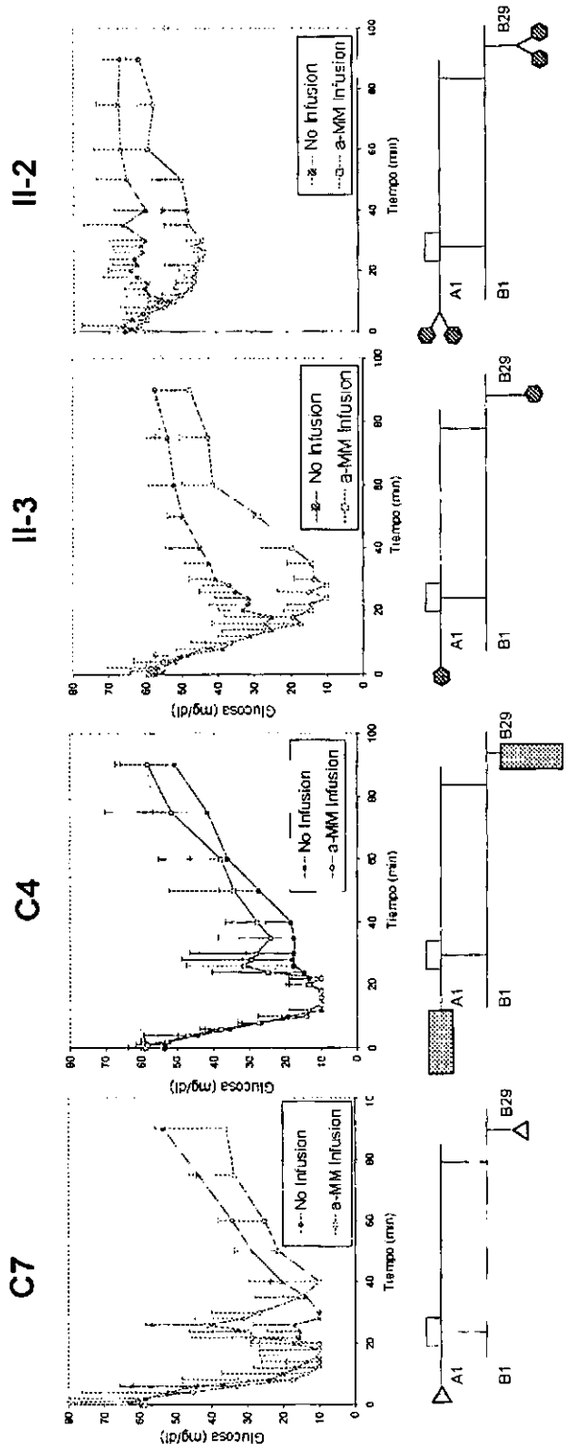
I-6
A1
B1
B29
I-12
A1
B1
B29
II-2
A1
B1
B29
II-3
A1
B1
B29
C3
A1
B1
B29
C4
A1
B1
B29
C7
A1
B1
B29
AETM
Oligómero de óxido de polietileno
Grupo acetilo

FIGURA 60

I-6
I-12
II-2
C3
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
No Infusion
a-MM Infusion
A1
B1
B29

FIGURA 61

FIGURA 62


II-2
II-3
C4
C7
No Infusion
a-MM Infusion
Glucose (mg/dl)
Tiempo (min)
A1
B1
B29

A-Cadena
Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21
B-Cadena
Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

FIGURA 63

SEQUENCE LISTING

<110> Lancaster, Thomas M.
Zion, Todd C.

<120> Insulin-Conjugates

<130> 2005700-0040

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Glu Asn Tyr Cys Asn
20

<210> 2
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
20 25 30

373

PATENT COOPERATION TREATY PCT/US2010/022268

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

LYON, Charles, E.
Choate, Hall & Stewart LLP
Two International Place
Boston, MA 02110
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
22 July 2011 (22.07.2011)

Applicant's or agent's file reference
2005700-0040

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2010/022268

International filing date *(day/month/year)*
27 January 2010 (27.01.2010)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address
LANCASTER, Thomas, C.
65 Elm Street
Stoneham, MA 02180
United States of America

State of Nationality: US
State of Residence: US
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
LANCASTER, Thomas, M.
65 Elm Street
Stoneham, MA 02180
United States of America

State of Nationality: US
State of Residence: US
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 71 30

Authorized officer
Suarez Javier
e-mail pt09.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 09

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 2005700-0040	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US 10/22268	International filing date *(day/month/year)* 27 January 2010 (27.01.2010)	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)* 28 January 2009 (28.01.2009)
Applicant SMARTCELLS, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**

   a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

   ☒ the international application in the language in which it was filed.

   ☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

   b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

   c. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ **Certain claims were found unsearchable** (see Box No. II).

3. ☒ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III).

4. With regard to the **title**,

   ☒ the text is approved as submitted by the applicant.

   ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

   ☒ the text is approved as submitted by the applicant.

   ☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the **drawings**,

   a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____

   ☐ as suggested by the applicant.

   ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

   ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

   b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 10/22268

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 41-42, 106-191, 227-322, 362-379
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Group I+: claims 1-40, 43-105, 388-429, drawn to a conjugate comprising a drug and a ligand including a first saccharide; wherein the conjugate is characterized in that, when the conjugate is administered to a mammal, at least one pharmacokinetic or pharmacodynamic property of the conjugate is sensitive to serum concentration of a second saccharide. The first invention encompasses a conjugate, wherein the anti-diabetic drug is an insulin sensitizer, and wherein the ligand is glucose. Should an additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect an additional drug(s) to be searched and/or ligand(s) to be searched. The exact claims searched will depend on the specifically elected drug(s): and ligand(s).
[NOTE: Claims 45-60, 62-73, 75, 77-83, 88-105 and 388-429 were excluded from Group I, because they are drawn to a non-elected subject matter.]

---------- Continued in the Supplemental Box ----------

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Claims 1-40, 43-44, 61, 74, 76 and 84-87, restricted to an insulin sensitizer, and glucose

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 10/22268

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A01N 45/00 (2010.01)
USPC - 514/26; 514/32
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC(8): A01N 45/00 (2010.01)
USPC: 514/26; 514/32

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
IPC(8): A61K 38/00; A01N 43/04; C12N 5/00; C07H 1/00, C07H 17/00; C07J 41/00; C40B 30/04; C07K 17/00; C08H 1/00
USPC: 514/12; 435/375; 536/17.4, 536/5, 536/1.11; 506/9; 530/395, 530/396, 530/411

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWEST; PGPB, USPT, EPAB, JPAB; GoogleScholar; Dialog: drug conjugate, saccharide, glucose, pharmacokinetic, pharmacodynamic, PK/PD, serum concentration curve, AUC, area under curve, fasted, hyperglycemic, insulin sensitizer, biguanides, antihyperglycemic, metformin, Phenformin, buformin, proguanil, glitazones

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ----- Y	US 2007/0099820 A1 (LANCASTER et al.) 3 May 2007 (03.05.2007) Abstract, para [0024], [0049], [00067]-[0070], [0072], [0090], [0104], [0134]	1-3, 7-10, 13-40, 43-44, 61, 74, 76 and 84-87 ---------- 4-6, 11-12
Y	PubChem Entry "L-fucose" (01 June 2005) [Retrieved from the Internet 5 May 2010: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=17106&loc=ec_rcs>]; Entire document	4
Y	PubChem Entry "N-acetylglucosamine" (24 June 2005) [Retrieved from the Internet 5 May 2010:<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=439174&loc=ec_rcs>]; Entire document	5
Y	PubChem Entry "alpha Methyl Mannose" (25 March 2005) [Retrieved from the Internet 5 May 2010: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=2108&loc=ec_rcs>]; Entire document	6
Y	US 3,697,502 A (CHRISTENSEN) 10 October 1972 (10.10.1972) col 4, ln 1-5	11-12
A	PubChem entr "glucose". (8 June 2005) Retrieved from internet 7 May 2010 [http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5793&loc=ec_rcs]; Entire document	7-9 and 11-12
A	PubChem Entry "Metformin" (24 June 2005) [Retrieved from the Internet 5 May 2010:<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=14219&loc=ec_rcs>]; Entire document	7-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
6 May 2010 (06.05.2010)	17 JUN 2010
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US 10/22268

---------- Supplemental Box ----------

Continued from Box III:

Group II+, claims 192-226, 323-361, 380-387, drawn to a conjugate of a specific formula. Should an additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect a conjugate of a specific formula, i.e. any of the formulae VIa-VId, VIII, IX, to be searched. The exact claims searched will depend on the specifically elected formulae.

The inventions listed as Groups I+ and II+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The inventions of Groups I+ and II+ share the technical feature of a conjugate comprising a drug and a ligand including a first saccharide. However, this shared technical feature does not represent a contribution over the prior art of 2007/0099820 A1 to Lancaster et al. (hereinafter 'Lancaster') discloses a conjugate (para [0011]) comprising a drug (para [0011]) and a ligand (para [0012], [0066] and [0067]) including a first saccharide (para [0068], indicator analog); wherein the conjugate is characterized in that, when the conjugate is administered to a mammal, at least one pharmacokinetic or pharmacodynamic property (para [0043]-[0045]) of the conjugate is sensitive to serum concentration of a second saccharide (para [0067] and [0068], indicator). As said conjugate was known at the time of the invention, there is no special technical feature that would otherwise unify the groups.

In addition and with respect to Group I+, there are two other special technical features, a specific drug and a specific ligand recited therein. The inventions do not share these two special technical features, because Lancaster further discloses that the anti-diabetic drug is an insulin sensitizer (para [0049]) and the ligand is either glucose, or bimannose, or trimannose (para [0068]). Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

The special technical feature of the inventions listed as Group II+ is the specific formulae of conjugates recited therein. The inventions do not share these two special technical features, because no significant structural similarities can readily be ascertained among the formulae. Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Groups I+ and II+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To: CHARLES E. LYON
CHOATE, HALL & STEWART LLP
TWO INTERNATIONAL PLACE
BOSTON, MA 02110

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43*bis*.1)

Date of mailing *(day/month/year)*	17 JUN 2010
Applicant's or agent's file reference 2005700-0040	**FOR FURTHER ACTION** See paragraph 2 below

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US 10/22268	27 January 2010 (27.01.2010)	28 January 2009 (28.01.2009)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
IPC(8) - A01N 45/00 (2010.01)
USPC - 514/26; 514/32

Applicant SMARTCELLS, INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/US	Date of completion of this opinion	Authorized officer:
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	6 May 2010 (06.05.2010)	Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/237 (cover sheet) (July 2009)

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 10/22268

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:

   ☒ the international application in the language in which it was filed.

   ☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43*bis*.1(a))

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:

   a. (means)

      ☐ on paper

      ☐ in electronic form

   b. (time)

      ☐ in the international application as filed

      ☐ together with the international application in electronic form

      ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

5. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No. PCT/US 10/22268

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 41-42, 106-191, 227-322, 362-379

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. _____ relate to the following subject matter which does not require an international search *(specify)*:

☒ the description, claims or drawings *(indicate particular elements below)* or said claims Nos. see below are so unclear that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

Claims 41-42, 106-191, 227-322, 362-379 are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4 (a). These claims are improper multiple dependent claims.

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

☒ no international search report has been established for said claims Nos. 41-42, 106-191, 227-322, 362-379

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rule 13*ter*.1(a) or (b).

☐ See Supplemental Box for further details.

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 10/22268

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees the applicant has, within the appicable time limit:

   ☐ paid additional fees

   ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee

   ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid

   ☒ not paid additional fees

2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is

   ☐ complied with

   ☒ not complied with for the following reasons:

Group I+: claims 1-40, 43-105, 388-429, drawn to a conjugate comprising a drug and a ligand including a first saccharide; wherein the conjugate is characterized in that, when the conjugate is administered to a mammal, at least one pharmacokinetic or pharmacodynamic property of the conjugate is sensitive to serum concentration of a second saccharide. The first invention encompasses a conjugate, wherein the anti-diabetic drug is an insulin sensitizer, and wherein the ligand is glucose. Should an additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect an additional drug(s) to be searched and/or ligand(s) to be searched. The exact claims searched will depend on the specifically elected drug(s): and ligand(s).
[NOTE: Claims 45-60, 62-73, 75, 77-83, 88-105 and 388-429 were excluded from Group I, because they are drawn to a non-elected subject matter.]

Group II+, claims 192-226, 323-361, 380-387, drawn to a conjugate of a specific formula. Should an additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect a conjugate of a specific formula, i.e. any of the formulae VIa-VId, VIII, IX, to be searched. The exact claims searched will depend on the specifically elected formulae.

The inventions listed as Groups I+ and II+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The inventions of Groups I+ and II+ share the technical feature of a conjugate comprising a drug and a ligand including a first saccharide. However, this shared technical feature does not represent a contribution over the prior art of 2007/0099820 A1 to Lancaster et al. (hereinafter 'Lancaster') discloses a conjugate (para [0011]) comprising a drug (para [0011]) and a ligand (para [0012], [0066] and [0067]) including a first saccharide (para [0068], indicator analog); wherein the conjugate is characterized in that, when the conjugate is administered to a mammal, at least one pharmacokinetic or pharmacodynamic property (para [0043]-[0045]) of the conjugate is sensitive to serum concentration of a second saccharide (para [0067] and [0068], indicator). As said conjugate was known at the time of the invention, there is no special technical feature that would otherwise unify the groups.

In addition and with respect to Group I+, there are two other special technical features, a specific drug and a specific ligand recited therein. The inventions do not share these two special technical features, because Lancaster further discloses that the anti-diabetic drug is an insulin sensitizer (para [0049]) and the ligand is either glucose, or bimannose, or trimannose (para [0068]). Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

The special technical feature of the inventions listed as Group II+ is the specific formulae of conjugates recited therein. The inventions do not share these two special technical features, because no significant structural similarities can readily be ascertained among the formulae. Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Groups I+ and II+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

4. Consequently, this opinion has been established in respect of the following parts of the international application:

   ☐ all parts

   ☒ the parts relating to claims Nos. 1-40, 43-44, 61, 74, 76 and 84-87, restricted to an insulin sensitizer, and glucose

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 10/22268

Box No. V **Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Statement

Novelty (N)	Claims	3-6, 11-12, 14-40 and 76	YES
	Claims	1-2, 7-10, 13, 43-44, 61, 74 and 84-87	NO
Inventive step (IS)	Claims	NONE	YES
	Claims	1-40, 43-44, 61, 74, 76 and 84-87	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-40, 43-44, 61, 74, 76 and 84-87	YES
	Claims	NONE	NO

2. Citations and explanations:

Claims 1-2, 7-10, 13, 43-44, 61, 74 and 84-87 lack novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by US 2007/0099820 A1 to Lancaster et al. (hereinafter 'Lancaster').

Regarding claim 1, Lancaster teaches a conjugate (para [0011]) comprising a drug (para [0011]; such as biguanides (e.g., metformin)) and a ligand (para [0012], [0066]-[0067]) including a first saccharide (para [0068], indicator analog such as glucose); wherein the conjugate is characterized in that, when the conjugate is administered to a mammal, at least one pharmacokinetic or pharmacodynamic property (para [0043]-[0045]) of the conjugate is sensitive to serum concentration of a second saccharide (para[0067] and para[0068], indicator).

Regarding claim 2, Lancaster teaches wherein the second saccharide is glucose (para [0068]).

Regarding claims 7-9, Lancaster teaches that the molecular weight of the conjugate absent the drug is less than about 10,000 Da and is in the range of 900 - 2000 (para [0068], to the extent that the elected species of ligand is glucose and para[0118]; to the extent that the drug-conjugate has a MW of 1000). Although Lancaster does not recite the MW of the glucose ligand, such MW is a unique and non-varying characteristic of the elected ligand. To that end, glucose has a MW of about 180 as evidenced by PubChem glucose entry (08 June 2005) [Retrieved from the Internet 7 May 2010: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5793&loc=ec_rcs (2005-06-08). Moreover, as evidenced by PubChem metformin entry (24 June 2005) [Retrieved from the Internet 6 May 2010: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=14219&loc=ec_rcs>], it is noted that the MW of metformin is 165.632. Therefore, the conjugate absent the drug (plus the ligand) has a MW of about 1000 and therefore provides a conjugate-ligand absent the drug having a MW of less than 10,000 and in the range of 900 - 2000. PubChem glucose is used to show a characteristic of a compound and to that end is not used as a prior art but to show what is necessarily taught in Lancaster. Since a compound and its properties are inseparable, the ligand, which is glucose, of the claims must have the same properties of the glucose in Lancaster. Therefore, Lancaster necessarily teaches wherein the molecular weight of the conjugate absent the drug is less than about 10,000 Da.

Regarding claim 10, Lancaster teaches that the molecular weight of the conjugate including the drug is less than about 20,000 Da such that that Lancaster teaches wherein the conjugate is a drug such and that the drug is a biguanide (para [0049]; such as metformin given that the elected species calls for an insulin sensitizer) and the drug-conjugate is 1000 (para[0118]) and further teaches wherein the ligand is glucose (para [0068], to the extent that the elected species of ligand is glucose). Although Lancaster does not recite the MW of the drug or the ligand, this limitation is inherently present in the disclosure of Lancaster, as evidenced by PubChem metformin entry (24 June 2005) [Retrieved from the Internet 6 May 2010: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=14219&loc=ec_rcs>], that discloses that MW of metformin is 165.632. Also, glucose has a MW of about 180 as evidenced by PubChem glucose entry (08 June 2005) [Retrieved from the Internet 7 May 2010: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5793&loc=ec_rcs (2005-06-08) that discloses that the MW of glucose is about 180. Since a compound and its properties are inseparable, the insulin sensitizer, which includes metformin, in combination with the glucose ligand of the claims must have the same properties of the metformin/glucose conjugate in Lancaster. Therefore, Lancaster necessarily teaches that the molecular weight of the conjugate including the drug is less than about 20,000 Da.

Regarding claim 13, Lancaster teaches wherein the conjugate has a unique molecular weight (Abstract; such that each and every conjugate has a unique molecular weight because a compound and its properties are inseparable. To that end, each and every combination has its own characteristic MW. Such as para[0049]; which teaches metformin).

Regarding claim 43, Lancster teaches wherein the drug is an anti-diabetic (para[0049]; such as metformin).
Regarding claim 44, Lancster teaches wherein the drug is an insulin sensitizer (para[0049]; such as metformin).
Regarding claim 61, Lancaster teaches wherein the conjugate includes a single ligand (para[0068]; such as glucose).
Regarding claim 74, Lancaster teaches wherein the ligand includes a first saccharide glucose (para[0068]; such as glucose).

Regarding claims 84-87, Lancaster teaches that the ligand is of formula (IIIa) or (IIIb): wherein R1 is OH or CH2-OH (para [0068]; to the extent its glucose).

----------continued in Supplemental Box----------

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 10/22268

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:
Box V.2. Citations and explanations:

Claims 3, 14-40 and 76 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Lancaster, as above.

Regarding claim 3, Lancaster teaches a second saccharide (para [0068]) wherein the second saccharide is a saccharide in general (para[0072]). Although Lancaster does not specifically recite that the second saccharide is mannose, Lancaster teaches that the conjugate comprises an analog of the indicator (para [0066]) wherein the indicator has essentially the same composition as the analog (para [0068]) and further provides an example of same such that the indicator is glucose and the analog is glucose (para [0068]). To that end, the teachings in Lancaster directed to a mannose indicator analog (para [0070], [0072] which teaches that the indicator a saccharide in general and para[0024] teaches that saccharides include mannose, galactose etc.as well as para [0134] which teaches mannose as analog) all teach and suggest that the indicator is mannose or a chemically related species (para [0068]). Therefore, wherein the second saccharide is mannose would have been obvious to one of ordinary skill in the art.

Regarding claim 14, Lancaster teaches that the conjugate has a substantially different serum concentration curve under fasted and hyperglycemic conditions (para[0134]; such that the sensitivity to the conjugate is modified by modifying the conjugate itself and para[0135]; such that the conjugate acts similar to the drug without the ligand (para[0042]). Moreover, a composition and its characteristics are inseparable. Since the claimed conjugate is taught in the reference they are the same. To that end, the conjugate of both the claims and the reference is the same and must have the same characteristics. Therefore, that the conjugate has a substantially different serum concentration curve under fasted and hyperglycemic conditions would have been taught by Lancaster and obvious to one of ordinary skill in the art.

Regarding claim 15, Lancaster teaches that the hyperglycemic conditions are induced by concurrent administration of conjugate and glucose to the mammal (para[0134]; such that the sensitivity to the conjugate is modified by modifying the conjugate itself and para[0135]; such that the conjugate acts similar to the drug without the ligand (para[0042] and will mimic the effects of insulin). Moreover, a composition and its characteristics are inseparable. Since the claimed conjugate is taught in the reference they are the same. To that end, the conjugate of both the claims and the reference is the same and must have the same characteristics. Therefore, that the hyperglycemic conditions are induced by concurrent administration of conjugate and glucose to the mammal would have been taught by Lancaster and obvious to one of ordinary skill in the art.

Regarding claim 16, Lancaster teaches that the pharmacodynamic profile of the conjugate is manipulated (para[0134]). Lancaster does not specifically recite wherein the conjugate has a serum Cmax that is higher under hyperglycemic conditions as compared to fasted conditions. However, this limitation is a function of the conjugate itself. Since a composition and its characteristics are inseparable, and the claimed conjugate is taught in the reference they both must have the same properties. To that end, the conjugate of both the claims and the reference is the same and must have the same characteristics. Therefore, that the conjugate has a serum Cmax that is higher under hyperglycemic conditions as compared to fasted conditions would have been taught by Lancaster and obvious to one of ordinary skill in the art.

Regarding claim 17, Lancaster teaches that the pharmacodynamic profile of the conjugate is manipulated (para[0134]). Lancaster does not specifically recite wherein the conjugate has a serum AUC that is higher under hyperglycemic conditions as compared to fasted conditions. However, this limitation is a function of the conjugate itself. Since a composition and its characteristics are inseparable, and the claimed conjugate is taught in the reference they both must have the same properties. To that end, the conjugate of both the claims and the reference is the same and must have the same characteristics. Therefore, that the conjugate has a serum AUC that is higher under hyperglycemic conditions as compared to fasted conditions would have been taught by Lancaster and obvious to one of ordinary skill in the art.

Regarding claim 18, Lancaster teaches that the pharmacodynamic profile of the conjugate is manipulated (para[0134]). Lancaster does not specifically recite wherein the conjugate has a serum elimination rate that is slower under hyperglycemic conditions as compared to fasted conditions. However, this limitation is a function of the conjugate itself. Since a composition and its characteristics are inseparable, and the claimed conjugate is taught in the reference they both must have the same properties. To that end, the conjugate of both the claims and the reference is the same and must have the same characteristics. Therefore, that the conjugate has a serum elimination rate that is slower under hyperglycemic conditions as compared to fasted conditions would have been taught by Lancaster and obvious to one of ordinary skill in the art.

Regarding claim 19, Lancaster teaches that the pharmacodynamic profile of the conjugate is manipulated (para[0134]). Lancaster does not specifically recite wherein the conjugate has a serum concentration curve that can be fit using a two-compartment bi-exponential model with one short and one long half-life and the long half-life is longer under hyperglycemic conditions as compared to fasted conditions. However, this limitation is a function of the conjugate itself. Since a composition and its characteristics are inseparable, and the claimed conjugate is taught in the reference they both must have the same properties. To that end, the conjugate of both the claims and the reference is the same and must have the same characteristics. Therefore, that the conjugate has a serum concentration curve that can be fit using a two-compartment bi-exponential model with one short and one long half-life and the long half-life is longer under hyperglycemic conditions as compared to fasted conditions would have been taught by Lancaster and obvious to one of ordinary skill in the art.

Regarding claim 20, Lancaster further teaches that the fasted conditions involve a serum glucose Cmax of less than 100 mg/dL (para[0134]; such that the low end of the glucose concentration is 50mg/dL).

Regarding claim 21, Lancaster further teaches that the hyperglycemic conditions involve a serum glucose Cmax in excess of 200 mg/dL (para[0134]; such that the high end of the glucose concentration is 500mg/dL).

----------continued in Supplemental Box----------

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 10/22268

Supplemental Box

In case **the space in any of the preceding boxes is not sufficient.**
Continuation of:
Prior supplemental box:

Regarding claim 22, Lancaster further teaches that the pharmacodynamic profile of the conjugate is manipulated (para[0134]). Lancaster does not specifically recite wherein the conjugate has a serum concentration curve that is substantially different at 100 and 300 mg/dL glucose. However, this limitation is a function of the conjugate itself. Since a composition and its characteristics are inseparable, and the claimed conjugate is taught in the reference they both must have the same properties. To that end, the conjugate of both the claims and the reference is the same and must have the same characteristics. Therefore, that the conjugate has a serum concentration curve that is substantially different at 100 and 300 mg/dL glucose would have been taught by Lancaster and obvious to one of ordinary skill in the art.

Regarding claim 23, Lancaster teaches that the pharmacodynamic profile of the conjugate is manipulated (para[0134]). Lancaster does not specifically recite that the conjugate has a Cmax that is higher at 300 mg/dL glucose than at 100 mg/dL glucose. However, this limitation is a function of the conjugate itself. Since a composition and its characteristics are inseparable, and the claimed conjugate is taught in the reference they both must have the same properties. To that end, the conjugate of both the claims and the reference is the same and must have the same characteristics. Therefore, that the conjugate has a Cmax that is higher at 300 mg/dL glucose than at 100 mg/dL glucose would have been taught by Lancaster and obvious to one of ordinary skill in the art.

Regarding claim 24, Lancaster teaches wherein the pharmacodynamic profile of the conjugate is manipulated (para[0134]). Lancaster does not specifically recite wherein the Cmax of the conjugate is at least 50% higher at 300 mg/dL glucose. However, this limitation is a function of the conjugate itself. Since a composition and its characteristics are inseparable, and the claimed conjugate is taught in the reference they both must have the same properties. To that end, the conjugate of both the claims and the reference is the same and must have the same characteristics. Therefore, wherein the Cmax of the conjugate is at least 50% higher at 300 mg/dL glucose would have been taught by Lancaster and obvious to one of ordinary skill in the art.

Regarding claim 25, Lancaster teaches wherein the pharmacodynamic profile of the conjugate is manipulated (para[0134]). Lancaster does not specifically recite wherein the conjugate has an AUC that is higher at 300 mg/dL glucose than at 100 mg/dL glucose. However, this limitation is a function of the conjugate itself. Since a composition and its characteristics are inseparable, and the claimed conjugate is taught in the reference they both must have the same properties. To that end, the conjugate of both the claims and the reference is the same and must have the same characteristics. Therefore, wherein the conjugate has an AUC that is higher at 300 mg/dL glucose than at 100 mg/dL glucose would have been taught by Lancaster and obvious to one of ordinary skill in the art.

Regarding claim 26, Lancaster teaches wherein the pharmacodynamic profile of the conjugate is manipulated (para[0134]). Lancaster does not specifically recite wherein the AUC of the conjugate is at least 50% higher at 300 mg/dL glucose. However, this limitation is a function of the conjugate itself. Since a composition and its characteristics are inseparable, and the claimed conjugate is taught in the reference they both must have the same properties. To that end, the conjugate of both the claims and the reference is the same and must have the same characteristics. Therefore, wherein the AUC of the conjugate is at least 50% higher at 300 mg/dL glucose would have been taught by Lancaster and obvious to one of ordinary skill in the art.

Regarding claim 27, Lancaster teaches wherein the pharmacodynamic profile of the conjugate is manipulated (para[0134]). Lancaster does not specifically recite wherein the conjugate has a serum elimination rate that is faster at 100 mg/dL glucose than at 300 mg/dL glucose. However, this limitation is a function of the conjugate itself. Since a composition and its characteristics are inseparable, and the claimed conjugate is taught in the reference they both must have the same properties. To that end, the conjugate of both the claims and the reference is the same and must have the same characteristics. Therefore, wherein the conjugate has a serum elimination rate that is faster at 100 mg/dL glucose than at 300 mg/dL glucose would have been taught by Lancaster and obvious to one of ordinary skill in the art.

Regarding claim 28, Lancaster teaches wherein the pharmacodynamic profile of the conjugate is manipulated (para[0134]). Lancaster does not specifically recite wherein the serum elimination rate of the conjugate is at least 25% faster at 100 mg/dL glucose. However, this limitation is a function of the conjugate itself. Since a composition and its characteristics are inseparable, and the claimed conjugate is taught in the reference they both must have the same properties. To that end, the conjugate of both the claims and the reference is the same and must have the same characteristics. Therefore, wherein the serum elimination rate of the conjugate is at least 25% faster at 100 mg/dL glucose would have been taught by Lancaster and obvious to one of ordinary skill in the art.

Regarding claim 29, Lancaster teaches wherein the pharmacodynamic profile of the conjugate is manipulated (para[0134]). Lancaster does not specifically recite wherein the serum concentration curve of the conjugate can be fit using a two-compartment bi-exponential model with one short and one long half-life and the long half-life is longer at 300 mg/dL. However, this limitation is a function of the conjugate itself. Since a composition and its characteristics are inseparable, and the claimed conjugate is taught in the reference they both must have the same properties. To that end, the conjugate of both the claims and the reference is the same and must have the same characteristics. Therefore, wherein the serum concentration curve of the conjugate can be fit using a two-compartment bi-exponential model with one short and one long half-life and the long half-life is longer at 300 mg/dL would have been taught by Lancaster and obvious to one of ordinary skill in the art.

Regarding claim 30, Lancaster teaches wherein the pharmacodynamic profile of the conjugate is manipulated (para[0134]). Lancaster does not specifically recite wherein the long half-life is at least 50% longer at 300 mg/dL glucose. However, this limitation is a function of the conjugate itself. Since a composition and its characteristics are inseparable, and the claimed conjugate is taught in the reference they both must have the same properties. To that end, the conjugate of both the claims and the reference is the same and must have the same characteristics. Therefore, wherein the long half-life is at least 50% longer at 300 mg/dL glucose would have been taught by Lancaster and obvious to one of ordinary skill in the art.

---------- continued in Supplemental Box ----------

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 10/22268

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:
Prior supplemental box:

Regarding claim 31, Lancaster teaches wherein the conjugate and an unconjugated version of the drug have serum concentration curves that are substantially the same under hyperglycemic conditions (para[0134]; such that the sensitivity to the conjugate is modified by modifying the conjugate itself and para[0135]; such that the conjugate acts similar to the drug without the ligand (para[0042]). Moreover, a composition and its characteristics are inseparable. Since the claimed conjugate is taught in the reference they are the same. To that end, the conjugate of both the claims and the reference is the same and must have the same characteristics. Therefore, wherein the conjugate and an unconjugated version of the drug have serum concentration curves that are substantially the same under hyperglycemic conditions would have been taught by Lancaster and obvious to one of ordinary skill in the art.

Regarding claim 32, Lancaster teaches wherein the pharmacodynamic profile of the conjugate is manipulated (para[0134]). Lancaster does not specifically recite wherein the conjugate and an unconjugated version of the drug have serum concentration curves that are substantially different under fasted conditions. However, this limitation is a function of the conjugate itself. Since a composition and its characteristics are inseparable, and the claimed conjugate is taught in the reference they both must have the same properties. To that end, the conjugate of both the claims and the reference is the same and must have the same characteristics. Therefore, wherein the conjugate and an unconjugated version of the drug have serum concentration curves that are substantially different under fasted conditions would have been taught by Lancaster and obvious to one of ordinary skill in the art.

Regarding claim 33, Lancaster teaches wherein the pharmacodynamic profile of the conjugate is manipulated (para[0134]). Lancaster does not specifically recite wherein the conjugate and an unconjugated version of the drug have serum concentration curves that are substantially the same under hyperglycemic conditions and substantially different under fasted conditions. However, this limitation is a function of the conjugate itself. Since a composition and its characteristics are inseparable, and the claimed conjugate is taught in the reference they both must have the same properties. To that end, the conjugate of both the claims and the reference is the same and must have the same characteristics. Therefore, wherein the conjugate and an unconjugated version of the drug have serum concentration curves that are substantially the same under hyperglycemic conditions and substantially different under fasted conditions would have been taught by Lancaster and obvious to one of ordinary skill in the art.

Regarding claim 34, Lancaster further teaches that the fasted conditions involve a serum glucose Cmax of less than 100 mg/dL (para[0134]; such that the low end of the glucose concentration is 50mg/dL).

Regarding claim 35, Lancaster further teaches that the hyperglycemic conditions involve a serum glucose Cmax in excess of 200 mg/dL (para[0134]; such that the high end of the glucose concentration is 500mg/dL).

Regarding claim 36, Lancaster further teaches that the pharmacodynamic profile of the conjugate is manipulated (para [0134]) and the bioactivity tested (para [0104]). Lancaster does not specifically recite wherein the conjugate has lower bioactivity under fasted conditions as compared to hyperglycemic conditions. However, this limitation is a function of the conjugate itself. Since a composition and its characteristics are inseparable, and the claimed conjugate is taught in the reference they both must have the same properties. To that end, the conjugate of both the claims and the reference is the same and must have the same characteristics. Therefore, wherein the conjugate has lower bioactivity under fasted conditions as compared to hyperglycemic conditions would have been taught by Lancaster and obvious to one of ordinary skill in the art.

Regarding claim 37, Lancaster further teaches that the fasted conditions involve a serum glucose Cmax of less than 100 mg/ dL (para[0134]; such that the low end of the glucose concentration is 50mg/dL).

Regarding claim 38, Lancaster further teaches that the hyperglycemic conditions involve a serum glucose Cmax in excess of 200 mg/dL (para[0134]; such that the high end of the glucose concentration is 500mg/dL).

Regarding claim 39, Lancaster teaches wherein the pharmacodynamic profile of the conjugate is manipulated (para[0134]) and the bioactivity tested (para[0104]). Lancaster does not specifically recite wherein the conjugate has lower bioactivity at 100 mg/dL glucose than 300 mg/dL glucose. However, this limitation is a function of the conjugate itself. Since a composition and its characteristics are inseparable, and the claimed conjugate is taught in the reference they both must have the same properties. To that end, the conjugate of both the claims and the reference is the same and must have the same characteristics. Therefore, wherein the conjugate has lower bioactivity at 100 mg/dL glucose than 300 mg/dL glucose would have been taught by Lancaster and obvious to one of ordinary skill in the art.

Regarding claim 40, Lancaster teaches wherein the pharmacodynamic profile of the conjugate is manipulated (para[0134]) and the bioactivity tested (para[0104]). Lancaster does not specifically recite wherein the bioactivity of the conjugate is at least 25% higher at 300 mg/dL glucose. However, this limitation is a function of the conjugate itself. Since a composition and its characteristics are inseparable, and the claimed conjugate is taught in the reference they both must have the same properties. To that end, the conjugate of both the claims and the reference is the same and must have the same characteristics. Therefore, wherein the bioactivity of the conjugate is at least 25% higher at 300 mg/dL glucose would have been taught by Lancaster and obvious to one of ordinary skill in the art.

Regarding claim 76, Lancaster teaches wherein the ligand includes a first saccharide selected from the group consisting of methylglucose, methylmannose, ethylglucose, ethylmannose, propylglucose and propylmannose (para[0068]; such as derivatives of glucose).

---------- continued in Supplemental Box ----------

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 10/22268

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.
Continuation of:
Prior supplemental box:

Claim 4 lacks an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Lancaster, as above, in view of PubChem entry titled "L-fucose" (hereinafter "PubChem L-fucose").

Regarding claim 4, Lancaster teaches a second saccharide (para[0068]) wherein the second saccharide is a saccharide in general (para[0072]). Lancaster does not specifically recite that the second saccharide is L-fucose. PubChem discloses that L-fucose is a galactose analog (entire document). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art to combine the L-fucose of PubChem L-fucose with Lancaster since Lancaster teaches that the conjugate comprises an analog of the indicator (para[0066]) wherein the indicator has essentially the same composition as the analog (para [0068]) and further provides an example of same such that the indicator is glucose and the analog is glucose (para [0068]). In light of such teaching and example along with the teaching that the indicator is a saccharide in general (para[0072]) and that saccharides include mannose, galactose etc (para[0024]), the teachings in Lancaster direct one of ordinary skill in the art to galactose analogs.

Claim 5 lacks an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Lancaster, as above, in view of PubChem entry titled "N-acetylglucosamine" (hereinafter 'PubChem N-acetyl glucosamine').

Regarding claim 5, Lancaster teaches a second saccharide (para[0068]) wherein the second saccharide is a saccharide in general (para[0072]). Lancaster does not specifically recite wherein the second saccharide is N-acetyl glucosamine. PubChem teaches N-acetyl glucosamine (entire document). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art to combine the N-acetyl glucosamine of PubChem N-acetyl glucosamine with Lancaster since Lancaster teaches that the conjugate comprises an analog of the indicator (para [0066]) wherein the indicator has essentially the same composition as the analog (para [0068]) and further provides an example of same such that the indicator is glucose and the analog is glucose (para [0068]). In light of such teaching and example along with the teaching that the indicator is a glucosamine in general (para[0090]; such that the conjugated sugar is glucosamine) the teachings in Lancaster direct one of ordinary skill in the art to glucosamine analogs.

Claim 6 lacks an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Lancaster, as above, in view of PubChem titled "alpha Methyl Mannose" (hereinafter 'PubChem alpha methyl mannose')

Regarding claim 6, Lancaster teaches a second saccharide (para[0068]) wherein the second saccharide is a saccharide in general (para[0072]). Lancaster does not specifically recite wherein the second saccharide is alpha-methyl mannose. PubChem alpha methyl mannose teaches alpha-methyl mannose (entire document). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art to combine the alpha methyl mannose of PubChem alpha methyl mannose.with Lancaster since Lancaster teaches that the conjugate comprises an analog of the indicator (para[0066]) wherein the indicator has essentially the same composition as the analog (para [0068]) and further provides an example of same such that the indicator is glucose and the analog is glucose (para [0068]). To that end, the teachings in Lancaster directed to a mannose indicator analog (para[0070]; para [0072] which teaches that the indicator a saccharide in general and para [0024] teaches that saccharides include mannose, galactose etc. as well as para [0134] which teaches mannose as analog) all teach and suggest that the indicator is mannose or a chemically related species (para[0068]). Therefore, wherein the second saccharide is alpha methyl mannose would have been obvious to one of ordinary skill in the art.

Claim 11-12 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Lancaster, as above, in view of US 3,697,502 A (Christensen).

Regarding claims 11-12, Lancaster teaches examples of the molecular weights of drug-conjugates (para[0118]; wherein the conjugate is a dextran for example) and teaches that there are many different conjugates that are appropriate depending on the ligand of choice (para[0072]). Lancaster does not teach wherein the molecular weight of the conjugate including the drug is in the range of about 6,500 to about 8,000 Da. Christensen teaches wherein dextran has a MW of 7000 (col 4, ln 1-5). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art to combine the dextran of Christensen with the drug of Lancaster since Lancaster teaches dextran in general and that the conjugate is any applicable conjugate depending on the type of ligand desired. Therefore, the 7000 Da MW dextran, plus the drug such as metformin which as evidenced by PubChem metformin entry (24 June 2005) [Retrieved from the Internet 6 May 2010: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=14219&loc=ec_rcs>], has a MW of 165.632 as well as the ligand, glucose, which has a MW of about 180 as evidenced by PubChem glucose entry (08 June 2005) [Retrieved from the Internet 7 May 2010: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5793&loc=ec_rcs (2005-06-08) provides a drug-conjugate with a MW in the range of about 6,500 to about 8,000 Da.

Claims 1-40, 43-44, 61, 74, 76 and 84-87 have industrial applicability as defined by PCT Article 33(4) because the subject matter can be made or used in industry.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-095147- -00000-0000

Fecha: 2011-07-28 17:44:30 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 378

Act. 411 PRESENTACION Folios: 380

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO DE ☐

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
- ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☒ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Prosperidad para todos

Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
SMARTCELLS, INC

REFERENCIA	Radicación No.	11 095147
	Solicitud internacional	PCT/US2010/022268
	Fecha inicio fase nacional	28/08/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	14225

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Con respecto al resumen y de conformidad con lo dispuesto en el artículo 31 D. 486 en el cual se establece que el resumen consiste en una síntesis de la divulgación técnica contenida en la solicitud de patente, debe adecuar el resumen a los dispuesto en dicha norma, teniendo en cuenta que el extracto permitirá precisar el objeto de la invención, sus elementos característicos y el campo de aplicación.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

3. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se consideraró abandonada y perderá su prelación.

Continua en la página siguiente...

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (C)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 09 SET. 2011.
adpa11

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Prosperidad para todos

Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
SMARTCELLS, INC

REFERENCIA	Radicación No.	11 095147
	Solicitud internacional	PCT/US2010/022268
	Fecha inicio fase nacional	28/08/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	E 14226

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de diez reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del titulo primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (C)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 09 SET. 2011
adpa11