SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-095151- -00000-0000
Fecha: 2011-07-28 17:46:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 206

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

"SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO"
INVENTARIO

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

11-095151.

SOLICITUD DIVISIONAL

DE PATENTE DE

INVENCIÓN

TITULO: CONJUGADOS DE INSULINA CRISTALINA.

SOLICITANTE: SMARTCELLS, INC

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

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ: 28 de julio de 2011

P2011/000142

28-08-2011

OLARTEM(

OLARTE MOURE & ASOCI

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-095151- -00000-0000

Fecha: 2011-07-28 17:46:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONAL!
Act. 411 PRESENTACION Folios: 206

Act. 411 PRESENTACION Folios: 186

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL **P2011/000142**

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/US2010/022277 Fecha Enero 27, 2010

Publicación Internacional No. WO 2010/088300 Fecha Agosto 5, 2010

(6) **Título (54)** **CONJUGADOS DE INSULINA CRISTALINA.**

Clasificación Internacional (51) C07K 14/62; A61K 38/28.

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

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

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0072516

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. 11-095151- -00000-0000
Fecha: 2011-07-28 17:46:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 206

LISTA DE PRIORIDADES

PCT/US2010/022277

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	61/219,896
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

(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 2010/088300 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 14/62 (2006.01) *A61K 38/28* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2010/022277

(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
61/219,896	24 June 2009 (24.06.2009)	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 419e, 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, M.** [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))*

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

(54) Title: CRYSTALLINE INSULIN-CONJUGATES

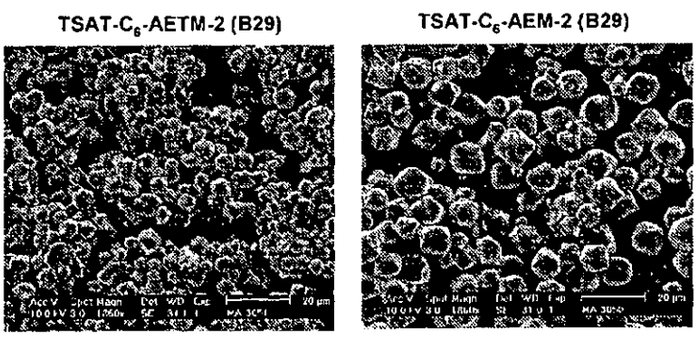


Figure 28

(57) Abstract: The present disclosure provides crystalline insulin-conjugates. The present disclosure also provides formulations, methods of treatment, methods of administering, and methods of making that encompass these crystalline insulin-conjugates.

WO 2010/088300 A1

CRYSTALLINE INSULIN-CONJUGATES

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. 61/219,896 filed June 24, 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 insulin in a manner that is responsive to the systemic concentrations of a saccharide such as glucose. As discussed in the Examples, we have discovered that when insulin was conjugated to high affinity saccharide ligands it 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 insulin systems.

Sustained release formulations of conventional insulins are commonly used in order to slow the insulin release into systemic circulation. For example, PZI (protamine zinc insulin) formulations may be used for this purpose. When conventional insulins are formulated with protamine and zinc, crystalline sustained release formulations are generally produced. In contrast, when insulin-conjugates described herein are formulated with protamine and zinc using similar methods, amorphous formulations are produced, and much more protamine and zinc is required to provide sustained release than is required for conventional insulins, e.g. RHI. We have surprisingly found that certain insulin-conjugates described herein can be crystallized. Insulin-conjugates are difficult to crystallize using standard insulin crystallization conditions, most likely due to their saccharide-containing, sterically bulky structures. As described herein, the crystalline insulin-conjugates of the present disclosure can then be formulated to provide crystalline sustained release formulations. The present disclosure provides crystalline insulin-conjugates and formulations thereof. Also provided are methods of making and using crystalline

insulin-conjugates. Crystalline formulations of insulin-conjugates may be advantageous in improving batch to batch reproducibility, increasing formulation stability, and decreasing particle agglomeration over long periods of storage.

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°, $-(CH_2)_{0-4}OC(O)NR^\circ_2$; $-C(O)N(OR^\circ)R^\circ$; $-C(O)C(O)R^\circ$; $-C(O)CH_2C(O)R^\circ$; $-C(NOR^\circ)R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}SSR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)_2R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)_2OR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}OS(O)_2R^\circ$; $-S(O)_2NR^\circ_2$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)R^\circ$; $-N(R^\circ)S(O)_2NR^\circ_2$; $-N(R^\circ)S(O)_2R^\circ$; $-N(OR^\circ)R^\circ$; $-C(NH)NR^\circ_2$; $-P(O)_2R^\circ$; $-P(O)R^\circ_2$; $-OP(O)R^\circ_2$; $-OP(O)(OR^\circ)_2$; 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)$_2$R*, =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•, –(haloR•), –OH, –OR•, –O(haloR•), –CN, –C(O)OH, –C(O)OR•, –NH$_2$, –NHR•, –NR•$_2$, or –NO$_2$, wherein each R• is unsubstituted or where preceded by "halo" is substituted only with one or more halogens, and is independently C_{1-4} aliphatic, –CH$_2$Ph, –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†, –NR†$_2$, –C(O)R†, –C(O)OR†, –C(O)C(O)R†, –C(O)CH$_2$C(O)R†, –S(O)$_2$R†, –S(O)$_2$NR†$_2$, –C(S)NR†$_2$, –C(NH)NR†$_2$, or –N(R†)S(O)$_2$R†; wherein each R† 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†, 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† are independently halogen, –R•, –(haloR•), –OH, –OR•, –O(haloR•), –CN, –C(O)OH, –C(O)OR•, –NH$_2$, –NHR•, –NR•$_2$, or –NO$_2$, wherein each R• is unsubstituted or where preceded by "halo" is substituted only with one or more halogens, and is independently C_{1-4} aliphatic, –CH$_2$Ph, –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.

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, 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.

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 an insulin-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: Chemical structures of exemplary insulin-conjugate frameworks and ligands.

Figure 2: Structures of exemplary B29 insulin-conjugates. As described in the Examples, these conjugates were each prepared with recombinant wild-type human insulin (see Figure 33 for the structure of wild-type human insulin). The symbol "insulin" inside an oval as shown in Figure 2 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 3: Plot of (◆) serum insulin and (○) blood glucose levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats at time 0 with conjugate **I-7** (5 U/kg). Data represents the average and standard deviation for n = 3 rats.

Figure 4: Plot of serum insulin and blood glucose levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3) at time 0 with conjugate **I-7** followed by IP injection of alpha-methyl mannose (left) or saline (right) after 15 minutes.

Figure 5: Plot of serum insulin and blood glucose levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3) at time 0 with conjugate **I-5** followed by IP injection of alpha-methyl mannose (left) or saline (right) after 15 minutes.

Figure 6: Plot of serum insulin and blood glucose levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3) at time 0 with conjugate **I-8** followed by IP injection of alpha-methyl mannose (left) or saline (right) after 15 minutes.

Figure 7: Plot of serum insulin and blood glucose levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3) at time 0 with conjugate **I-9** followed by IP injection of alpha-methyl mannose (left) or saline (right) after 15 minutes.

Figure 8: Plot of serum insulin and blood glucose levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3) at time 0 with conjugate **I-10** followed by IP injection of alpha-methyl mannose (left) or saline (right) after 15 minutes.

Figure 9: Plot of serum insulin and blood glucose levels following subcutaneous injection in non-diabetic, male SD rats (n=3) at time 0 with conjugate **I-11** followed by IP injection of alpha-methyl mannose (left) or saline (right) after 15 minutes.

Figure 10: Plot of serum insulin concentration as a function of time for 0.4 mg/kg i.v. injections of (♦) RHI and (▲) 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.

Figure 11: 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 conjugate **I-6** followed by IP injection of glucose (4 g/kg) at 240 minutes. Formulations were prepared as described in Example 20: (a) 1xP-1xZ, (b) 4xP-4xZ, and (c) 10xP-4xZ.

Figure 12: 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 conjugate **I-6** followed by IP injection of glucose (4 g/kg) at 240 minutes. Formulations were prepared as described in Example 21: (a) 4xP-1xZ and (b) 4xP-2xZ.

Figure 13: 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 conjugate **I-6** followed by IP injection of glucose (4 g/kg) at 240 minutes. Formulations were prepared as described in Example 21: (a) 10xP-1xZ and (b) 10xP-2xZ.

Figure 14: 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 conjugate **I-6** followed by IP injection of glucose (4 g/kg) at 240 minutes. Formulations were prepared as described in Example 22: (a) no cresol and (b) 4x cresol.

Figure 15: 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 conjugate **I-6** followed by IP injection of glucose (4 g/kg) at 240 minutes. Formulations were prepared as described in Example 23: (a) no salt, (b) 3.3x salt, and (c) glycerol.

Figure 16: 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 conjugate **I-6** followed by IP injection of glucose (4 g/kg) at 240 minutes. Formulations were prepared containing incrfeasing amounts of unmodified insulin as described in Example 24: (a) 1/24, (b) 1/12, and (c) 1/6.

Figure 17: 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-6** prepared according to Example 25 followed by IP injection of glucose (4 g/kg) at 240 minutes.

Figure 18: 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 **I-6** prepared according to Example 26 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 19: 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 **I-6** prepared according to Example 26 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 20: 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 (**I-8, I-10, I-7, I-17, I-9, I-11**) prepared according to Example 27 followed by IP injection of glucose (4 g/kg) at 240 minutes.

Figure 21: 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 formulations of conjugates **I-6** (a) and **I-5** (b) prepared according to Example 28 followed by IP injection of alpha-methyl mannose (4 g/kg) at 240 minutes.

Figure 22: Plot of blood glucose levels following subcutaneous injection in non-diabetic (normals) and diabetic (DM's) male SD rats at time 0 with 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 23: 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 PZI conjugate **I-6**. The conjugate was administered at 7, 14 and 28 U/kg.

Figure 24: Plots of serum insulin concentration as a function of time following injection of conjugate **I-6** or RHI with and without glucose or α-methyl mannose.

Figure 25: 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 26: 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 27: Index Buffer solutions for crystallization and visual observation results using microscopy.

Figure 28: SEM micrographs of representative crystals formed by mixing Index Buffer 19 with an equal volume of a 2.5 mg/ml solution of conjugate in deionized water (left: **I-6**; right: **I-7**).

Figure 29: Plot of (◆) serum insulin-conjugate concentrations and (O) blood glucose levels in fasted, non-diabetic male SD rats (n=2) resulting from a 15 U/kg sub-Q injection of conjugate **I-6** crystal dispersion (no protamine or m-cresol) at time 0 followed by a 4 g/kg i.p. glucose tolerance test (IPGTT) at 240 min. Serum insulin levels were measured using an iso-insulin ELISA. Data are plotted as the average values ± one standard deviation.

Figure 30: Plot of (◆) serum insulin-conjugate concentrations and (O) blood glucose levels in fasted, non-diabetic male SD rats (n=2) resulting from a 15 U/kg sub-Q injection of conjugate **I-6** crystal dispersion containing protamine and m-cresol at time 0 followed by a 4 g/kg i.p. glucose tolerance test (IPGTT) at 240 min. Serum insulin levels were measured using an iso-insulin ELISA. Data are plotted as the average values ± one standard deviation.

Figure 31: Plot of (◆) serum insulin-conjugate concentrations and (O) blood glucose levels in fasted, non-diabetic male SD rats (n=3) resulting from a 15 U/kg sub-Q injection of conjugate **I-7** crystal dispersion containing protamine and m-cresol at time 0 followed by a 4 g/kg i.p. glucose tolerance test (IPGTT) at 240 min. Serum insulin levels were measured using an iso-insulin ELISA. Data are plotted as the average values ± one standard deviation.

Figure 32: Plot of (◆) serum insulin-conjugate concentrations and (O) blood glucose levels in fasted, non-diabetic male SD rats (n=3) resulting from a 15 U/kg sub-Q injection of conjugate **I-9** crystal dispersion (aged in 1x PBS containing protamine and m-cresol) at time 0 followed by a 4 g/kg i.p. glucose tolerance test (IPGTT) at 240 min. Serum insulin levels were measured using an iso-insulin ELISA. Data are plotted as the average values ± one standard deviation.

Figure 33: 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 insulin in a manner that is responsive to the systemic concentrations of a saccharide such as glucose. As discussed herein, these methods are based in part on the discovery that certain synthetic insulin-conjugates that include high affinity

saccharide ligands (e.g., see those in Figure 1) exhibit PK/PD profiles that respond to saccharide concentration changes even in the absence of an exogenous multivalent saccharide-binding molecule such as Con A. This finding was unexpected and provided an unprecedented opportunity to generate simple lectin-free saccharide-responsive insulin systems.

One example of such an insulin-conjugate, known as **I-6**, is shown in Figure 2. Conjugate **I-6** comprises a discrete, low molecular weight synthetic framework (tris-succinimidyl (6-aminocaproyl)aminotriacetate or TSAT-C6) with two aminoethyltrimannose (AETM) saccharide moieties. The framework is covalently conjugated to insulin via the B29 epsilon-amino group (wild-type human insulin has a lysine residue at position B29). As discussed in the Examples, insulin-conjugates such as **I-6** exhibit glucose-responsive pharmacokinetics. As a result, the availability and therefore the bioactivity, of insulin-conjugates such as **I-6** vary in response to endogenous glucose levels. We have prepared sustained release formulations of conjugate **I-6** using protamine and zinc (PZI formulations) that provide both basal and bolus insulin "delivery" on demand without inducing hypoglycemia. In contrast, conventional insulins are either rapid-acting (e.g., RHI) or slow-acting (e.g., Lantus) and cannot change profiles in response to changes in glucose levels. When compared with conventional insulin in diabetic and normal rats, conjugate **I-6** shows a substantially improved therapeutic window, with minimal risk of hypoglycemia at four times the therapeutic dose.

Significantly, our studies have shown that the TSAT-C6 framework employed by conjugate **I-6** is not required for glucose-responsive activity. Indeed, as shown in the Examples, we have found that other insulin-conjugated frameworks such as those depicted in Figures 1 and 2 can provide similar results. Our studies also suggest that the type and number of conjugated sugars and, in certain situations, the point of conjugation on the insulin molecule play a more important role in modulating the *in vivo* glucose-response.

Without wishing to be bound by any particular theory, it is believed that the glucose-responsiveness exhibited by conjugates such as **I-6** is mediated by binding to endogenous lectins. Thus, we theorize that when glucose levels in the body are low, the endogenous lectins have glucose binding sites available for binding by the synthetic insulin-conjugate, essentially inactivating the insulin-like activity of the conjugate. Conversely, when glucose levels in the body are high, the binding sites on the lectins are satisfied by endogenous glucose, thus allowing the synthetic insulin-conjugate to circulate and exert its effect. Figure 1 shows the relative lectin binding affinities of four sugars; AETM binds lectins with the highest affinity of the four sugars shown. We theorize that the lectin binding affinity of a particular sugar is responsible at least in part for the modulation of *in vivo* glucose-responsiveness of our synthetic insulin-conjugates.

Sustained release formulations of conventional insulins are commonly used in order to slow the insulin release into systemic circulation. For example, PZI (protamine zinc insulin) formulations may be used for this purpose. When conventional insulins are formulated with protamine and zinc, crystalline sustained release formulations are generally produced. In contrast, when insulin-conjugates such as **I-6** are formulated with protamine and zinc using similar methods, amorphous formulations are produced, and much more protamine and zinc is required to provide sustained release than is required for conventional insulins, e.g., RHI. We have surprisingly found that insulin-conjugates such as **I-6** can be crystallized in the absence of additives such as protamine or zinc, unlike conventional insulins. As described herein, these crystalline insulin-conjugates can then be formulated to provide crystalline sustained release formulations. Crystalline formulations of insulin-conjugates may be advantageous in improving batch to batch reproducibility, increasing formulation stability, and decreasing particle agglomeration over long periods of storage.

Conjugates

In one aspect, the disclosure provides crystalline conjugates that comprise an insulin molecule and a ligand that includes a first saccharide. The ligand or ligands are such that when the crystalline insulin-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.

In certain embodiments, the molecular weight of the conjugate absent the insulin is less than about 10,000 Da. For example, the molecular weight of the conjugate absent the insulin 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 insulin is less than about 20,000 Da. For example, the molecular weight of the conjugate including the insulin 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 crystalline insulin-conjugate 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 crystalline insulin-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 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 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 serum concentration curve of a conjugate is substantially the same as the serum concentration curve of an unconjugated version of the insulin 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 insulin 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 insulin 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 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

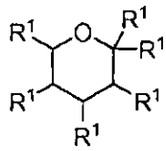
conditions, the PK and/or PD properties may be compared under fasted conditions with and without administration of the exogenous saccharide. It is to be understood that conjugates can be designed that respond to different C_{max} values of a given exogenous saccharide.

Ligand(s)

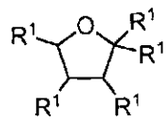
In general, provided crystalline insulin-conjugates include at least one ligand. In certain embodiments, the conjugates include a single ligand. In certain embodiments, the conjugates include at least two separate ligands, e.g., 2, 3, 4, 5 or more ligands. When more than one ligand is present the ligands 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 (IVa) or (IVb):



IVa



IVb

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 (IVa) or (IVb) 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 (IVa) or (IVb) 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 $-C(O)N(R^2)_2$.

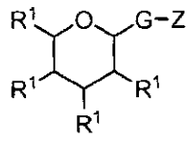
As defined generally above, Y is a monosaccharide, disaccharide, or trisaccharide. In certain embodiments, Y is a monosaccharide. In some embodiments, Y is a disaccharide. In other embodiments, Y is a trisaccharide. In some embodiments, Y is mannose, glucose, fructose, galactose, rhamnose, or xylopyranose. 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 $-OCH_2CH_2NH_2$.

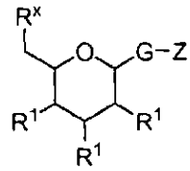
In some embodiments, the R^1 substituent on the C1 carbon of formula (IVa) is –G-Z to give a compound of formula (IVa-*i*):



IVa-*i*

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

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



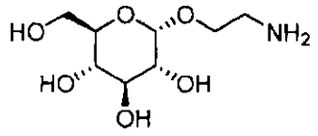
IVa-*ii*

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

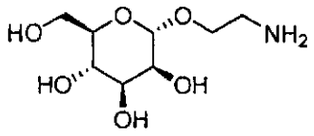
In certain embodiments, the ligand(s) may have the same chemical structure as glucose or may be a chemically related species of glucose. In various embodiments it may be advantageous for the ligand(s) to have a different chemical structure from glucose, e.g., in order to fine tune the glucose response 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.).

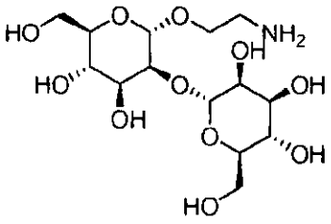
In certain embodiments, the ligand includes a monosaccharide. In certain embodiments, the ligand includes a disaccharide. In certain embodiments, the ligand is includes a trisaccharide. In some embodiments, the ligand comprises a saccharide and one or more amine groups. In certain embodiments the saccharide 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.



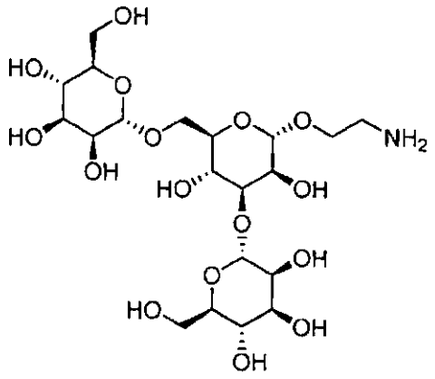
AEG



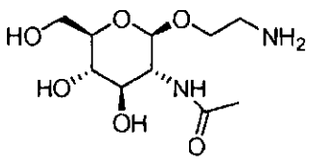
AEM



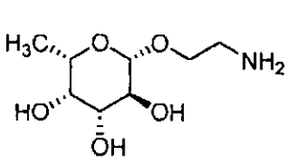
AEBM



AETM



AEGA



AEF

In general, ligands may be directly or indirectly conjugated (i.e., via a linker or framework) to the insulin molecule. 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 insulin molecule 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 insulin molecule. 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.

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 insulin molecule 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.

Insulin

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 33.

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 is 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.

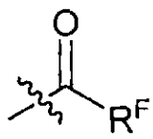
In certain embodiments, an insulin molecule of the present disclosure is mutated such that one or more amidated amino acids are replaced with acidic forms. For example, asparagine may be replaced with aspartic acid or glutamic acid. Likewise, glutamine may be replaced with aspartic acid or glutamic acid. 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 insulin or may be acylated on lysine residue that has been introduced into the wild-type 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). 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) is attached to Lys^{B29}.

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}-Gln^{B3}-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 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 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.

Exemplary insulin-conjugates

In various embodiments, a crystalline insulin-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 epsilon-amino group of Lys^{B29}.

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

In various embodiments, a crystalline insulin-conjugate of the present disclosure comprises an insulin molecule conjugated to two or more separate ligands. In some embodiments, a crystalline insulin-conjugate of the present disclosure comprises an insulin molecule conjugated to two separate ligands. In other embodiments, a crystalline insulin-conjugate of the present disclosure comprises an insulin molecule conjugated to three separate ligands. In certain embodiments, the two or more separate ligands of such a crystalline insulin-conjugate are aminoethylglucose (AEG). In certain embodiments, the two or more separate ligands of such a crystalline insulin-conjugate are aminoethylmannose (AEM). In certain embodiments, the two or more separate ligands of such a crystalline insulin-conjugate are aminoethylbimannose (AEBM). In certain embodiments, the two or more separate ligands of such a crystalline insulin-conjugate are aminoethyltrimannose (AETM). In certain embodiments, the two or more separate ligands of such a crystalline insulin-conjugate are β-aminoethyl-N-acetylglucosamine (AEGA). In certain embodiments, the two or more separate ligands of such a crystalline insulin-conjugate are aminoethylfucose (AEF).

In various embodiments, a crystalline insulin-conjugate of the present disclosure comprises two or more separate ligands are 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 crystalline insulin-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 crystalline insulin-conjugate are each located on termini of separate branches of a single branched conjugate framework.

In various embodiments, a crystalline insulin-conjugate of the present disclosure comprises an insulin molecule conjugated to aminoethylglucose (AEG). In certain embodiments, a crystalline insulin-conjugate of the present disclosure comprises an insulin molecule conjugated to aminoethylglucose (AEG) via the epsilon-amino group of Lys^{B29}.

In various embodiments, a crystalline insulin-conjugate of the present disclosure comprises an insulin molecule conjugated to aminoethylmannose (AEM). In certain embodiments, a crystalline insulin-conjugate of the present disclosure comprises an insulin molecule conjugated to aminoethylmannose (AEM) via the epsilon-amino group of Lys^{B29}.

In various embodiments, a crystalline insulin-conjugate of the present disclosure comprises an insulin molecule conjugated to aminoethylbimannose (AEBM). In certain embodiments, a crystalline insulin-conjugate of the present disclosure comprises an insulin molecule conjugated to aminoethylbimannose (AEBM) via the epsilon-amino group of Lys^{B29}.

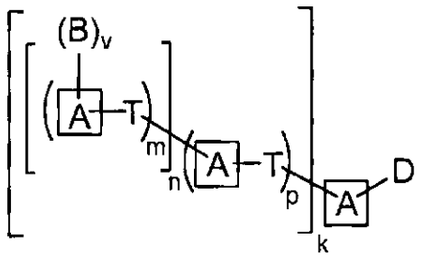
In various embodiments, a crystalline insulin-conjugate of the present disclosure comprises an insulin molecule conjugated to aminoethyltrimannose (AETM). In certain embodiments, a crystalline insulin-conjugate of the present disclosure comprises an insulin molecule conjugated to aminoethyltrimannose (AETM) via the epsilon-amino group of Lys^{B29}.

In various embodiments, a crystalline insulin-conjugate of the present disclosure comprises an insulin molecule conjugated to β-aminoethyl-N-acetylglucosamine (AEGA). In certain embodiments, a crystalline insulin-conjugate of the present disclosure comprises an insulin molecule conjugated to β-aminoethyl-N-acetylglucosamine (AEGA) via the epsilon-amino group of Lys^{B29}.

In various embodiments, a crystalline insulin-conjugate of the present disclosure comprises an insulin molecule conjugated to aminoethylfucose (AEF). In certain embodiments, a crystalline insulin-conjugate of the present disclosure comprises an insulin molecule conjugated to aminoethylfucose (AEF) via 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 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 $-T-L^D-W^I$;

W^I is an insulin molecule;

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

k is an integer from 1 to 12, 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

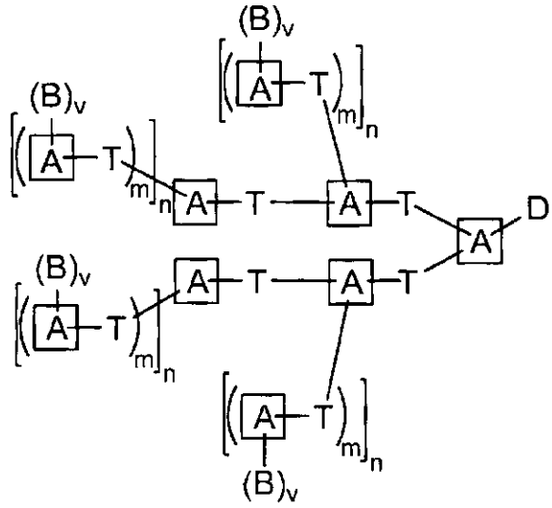
each occurrence of m is independently an integer from 1 to 5, inclusive; and

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 < 5 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).

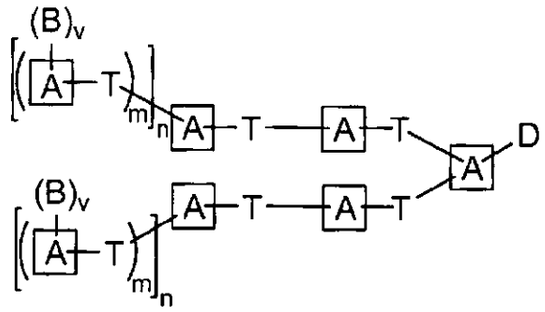
In certain embodiments, each occurrence of A in a p-bracketed moiety is substituted by a number of n-bracketed moieties corresponding to a value of n ≥ 1. For example, when k = 2 and p = 2 in both k-branches, the conjugate may be of the formula (Ia):



Ia

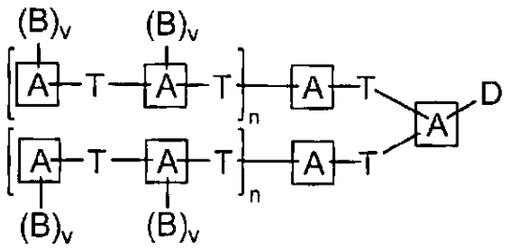
In other embodiments, only terminal occurrences of A in a p-bracketed moiety are substituted by a number of n-bracketed moieties corresponding to a value of n ≥ 1. For example,

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):



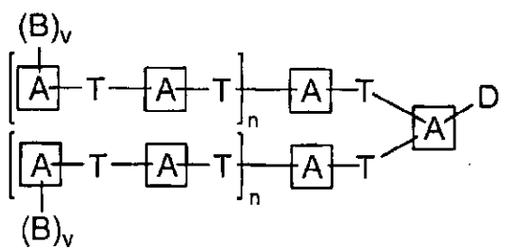
Ib

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):



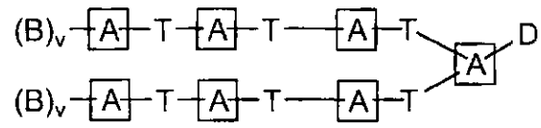
Ic

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):



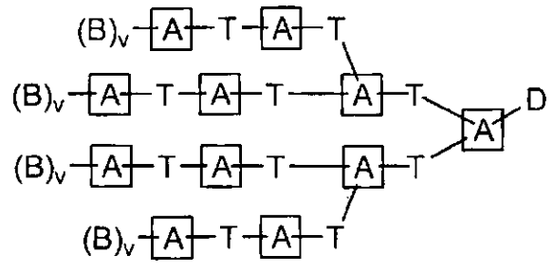
Id

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



Ie

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



If

Description of Exemplary Groups

[A] *(node)*

In certain embodiments, each occurrence of [A] is 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.

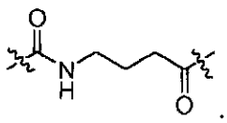
In certain embodiments, [A] is a heteroatom selected from N, O, or S. In some embodiments, [A] is nitrogen atom. In some embodiments, [A] is an oxygen atom. In some embodiments, [A] is sulfur atom. In some embodiments, [A] is a carbon atom.

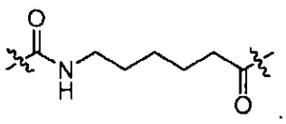
T (spacer)

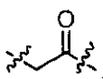
In certain embodiments, each occurrence of T is independently a bivalent, straight or branched, saturated or unsaturated, optionally substituted C_{1-20} hydrocarbon chain wherein one or

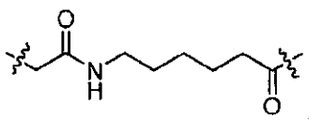
more methylene units of T are optionally and independently replaced by -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, $-S(O)_2-$, $-N(R)SO_2-$, $-SO_2N(R)-$, a heterocyclic group, an aryl group, or a heteroaryl group. In certain embodiments, one, two, three, four, or five 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-.

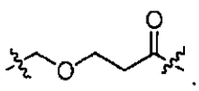
In some embodiments, T is  .

In some embodiments, T is  .

In some embodiments, T is  .

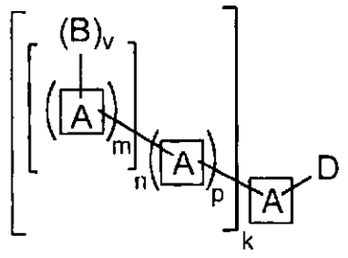
In some embodiments, T is  .

In some embodiments, T is  .

In some embodiments, T is  .

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

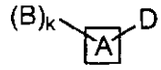
In certain embodiments, each occurrence of T (outside groups B and D) is a covalent bond and the conjugate is of the general formula (II):



II

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

In certain embodiments of general formula (II), 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 (III):



III

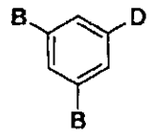
wherein [A], B, D, q, k, and j are as defined and described herein.

In certain such embodiments for formula (III), k = 1.

In other embodiments, k = 2.

In other embodiments, k = 3.

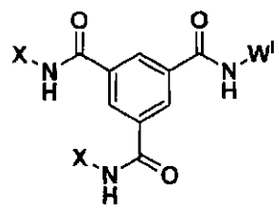
In some embodiments, the present disclosure provides conjugates of general formula (IIIa):

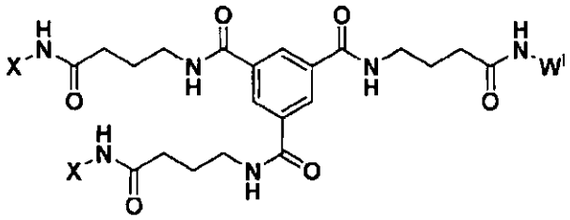


IIIa

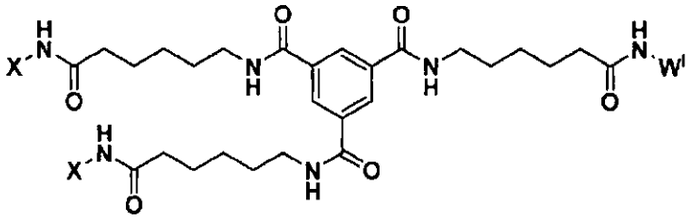
wherein B and D are as defined and described herein.

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





; or



wherein W^1 and X are as defined and described herein.

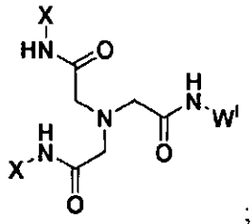
In some embodiments, the present disclosure provides conjugates of general formula (IIIb):



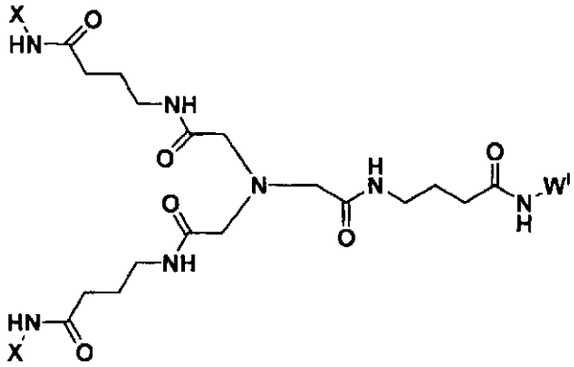
IIIb

wherein B and D are as defined and described herein.

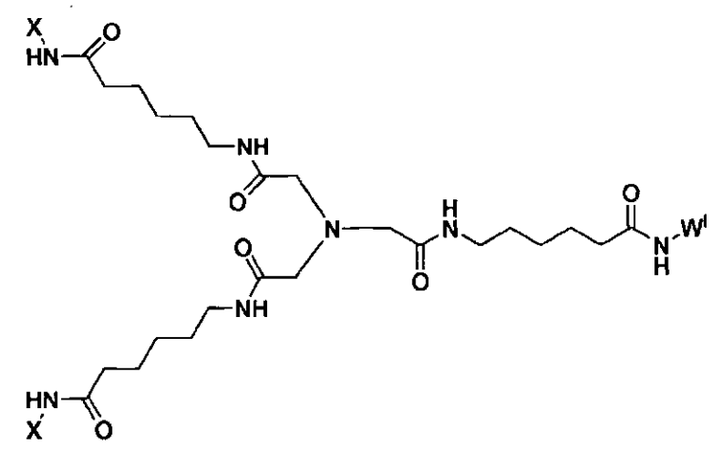
For example, in some embodiments, the present disclosure provides conjugates of formula:



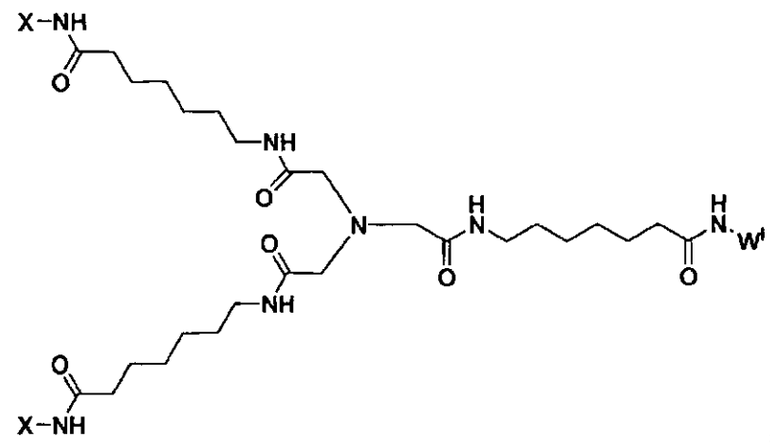
;



;



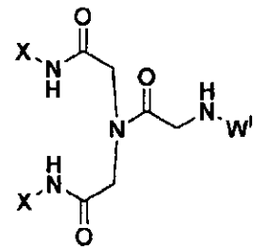
; or



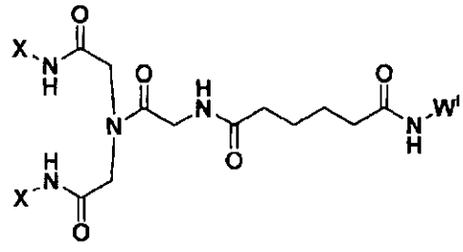
,

wherein W^1 and X are as defined and described herein.

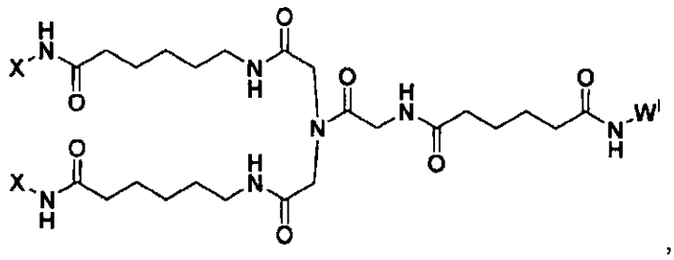
For example, in some embodiments, the present disclosure provides conjugates of formula:



;

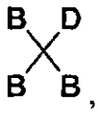


; or



wherein W^1 and X are as defined and described herein.

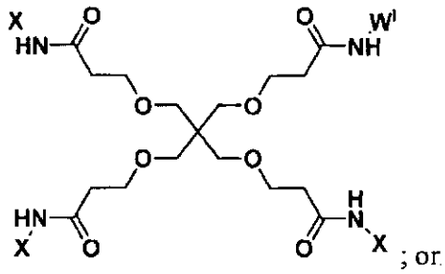
In some embodiments, the present disclosure provides conjugates of general formula (IIIc):



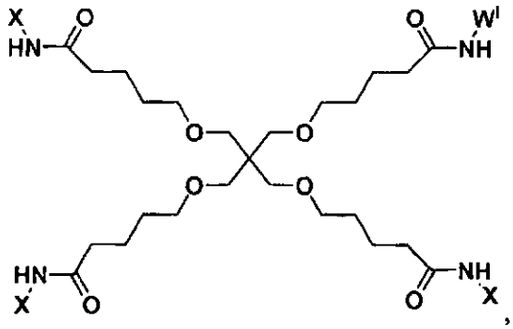
IIIc

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^1 and X are as defined and described herein.

In some embodiments, the present disclosure provides conjugates of general formula (IIId) and (IIIe):



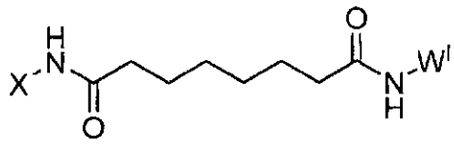
IIId and



IIIe

wherein B and D are as defined and described herein.

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



wherein W^1 and X are as defined and described herein.

B (ligand)

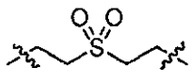
–B is –T–L^B–X where X is a ligand that includes a saccharide; and L^B is a covalent bond or a group derived from the covalent conjugation of an X with a T. Exemplary ligands and their saccharide components are described herein.

D (insulin)

–D is –T–L^D–W^1 where W^1 is an insulin molecule and L^D is a covalent bond or a group derived from the covalent conjugation of a W^1 with a T. Exemplary insulin molecules are described herein.

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^1 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^1. 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^1 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.

k

k is an integer from 1 to 12, inclusive. In certain embodiments, k = 1 to 6, e.g., 1, 2, or 3.

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.

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 $n \geq 1$, 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 $n \geq 1$, e.g., see formula (Ib) above. In certain embodiments, each k-branch includes just one occurrence of $n \geq 1$ (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 $v \geq 1$, 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 $v \geq 1$, e.g., see formula (Id) above. In certain embodiments, each k-branch includes just one occurrence of $v \geq 1$ (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 $v \geq 1$. In certain embodiment, each n-branch includes just one occurrence of $v \geq 1$ (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.

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.

Methods for preparing insulin-conjugates

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

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 insulin molecules, 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 insulin 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 insulin-conjugates with 4 and 6 ligands per insulin 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 insulin molecule.

In all cases, it should be recognized that a mixture of different ligands may be conjugated to the same insulin molecule 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 insulin molecule. 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 insulin molecule in separate steps. For example, an insulin molecule 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.

Crystallization of insulin-conjugates

It has been surprisingly found that certain insulin-conjugates described herein can be crystallized without the use of additives such as protamine or zinc. Crystalline formulations of insulin-conjugates may be advantageous in improving batch to batch reproducibility, increasing formulation stability, and decreasing particle agglomeration over long periods of storage.

As described in the Examples, screening experiments can be performed to determine appropriate crystallization conditions. Generally, a solution of the insulin-conjugate to be crystallized is dissolved in water and suspended over a buffer, and solutions are observed for evidence of crystallization. The crystalline insulin-conjugate can then be prepared on a larger scale using an appropriate buffer identified in the screening experiment.

In certain embodiments, the framework of the crystalline insulin-conjugate is conjugated at the Lys^{B29} position. In certain embodiments, the crystalline insulin-conjugate is one of the conjugates shown in Figure 2. In certain embodiments, the crystalline insulin-conjugate is **I-6, I-7,** or **I-9**.

In certain embodiments, the buffer used for crystallization has a pH greater than 7. In certain embodiments, the buffer has a pH between about 7.5 and about 8.5. In certain embodiments, the buffer is a phosphate, TRIS, or HEPES buffer.

In certain embodiments, the buffer used for crystallization is a phosphate buffer. In certain embodiments, the buffer has a higher concentration of potassium than sodium. In certain embodiments, the buffer has a higher concentration of potassium phosphate dibasic than sodium phosphate monobasic. In certain embodiments, the buffer has a pH in the range of about 6 to 9. In certain embodiments, the buffer has a pH of about 8. In certain embodiments, the buffer has a pH of about 8.2. In certain embodiments, the buffer is sodium phosphate monobasic monohydrate, potassium phosphate dibasic, with a pH of about 8.2.

In certain embodiments, the crystallization occurs in the presence of one or more additives. In certain embodiments, the additive is m-cresol, phenol, protamine, poly(arginine), glycerol, zinc chloride, or zinc acetate. In certain embodiments, the additive is polyethylene glycol.

In certain embodiments, an organic solvent is added to facilitate crystallization. In certain embodiments, the organic solvent is methanol, ethanol, or isopropanol. In certain embodiments, the organic solvent is removed prior to the final preparation of a pharmaceutical composition.

Formulations of crystalline insulin-conjugates

As discussed in the Examples, in certain embodiments it may be advantageous to administer a crystalline insulin-conjugate in a sustained fashion (i.e., in a form that exhibits an absorption profile that is more sustained than soluble recombinant human insulin), thus providing 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, sustained absorption may be achieved by combining the crystalline insulin-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 amorphous insulin-conjugates 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.

In certain embodiments, a pre-crystallized insulin-conjugate dispersion is mixed with protamine to form a crystalline insulin-conjugate protamine formulation. In some embodiments, the dispersion is neutralized to physiological buffer strength during formulation.

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.

In certain embodiments, one or more of the following components is added to a 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.

In certain embodiments the present disclosure provides a sustained release formulation comprising a crystalline conjugate of the present disclosure, wherein the formulation comprises protamine and zinc. In certain embodiments, the framework of the crystalline insulin-conjugate is conjugated at the Lys^{B29} position. In certain embodiments, the crystalline insulin-conjugate is one of the conjugates shown in Figure 2. In certain embodiments, the crystalline insulin-conjugate is **I-6**, **I-7**, or **I-9**.

In certain embodiments, 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.

In certain embodiments, the formulation includes protamine and zinc in a ratio (w/w) in the range of about 40:1 to about 10:1.

In certain embodiments, the formulation further comprises an amount of unconjugated insulin molecule. In certain embodiments, 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.

In certain embodiments, the formulation further comprises an antimicrobial preservative. In certain embodiments, the antimicrobial preservative is m-cresol. In certain embodiments, the formulation comprises from about 0.15 to about 0.35% v/v m-cresol.

In certain embodiments, the formulation further comprises an isotonic agent. In certain embodiments, the isotonic agent is glycerol. In certain embodiments, the isotonic agent is NaCl. In certain embodiments, the formulation comprises from about 0.1 to about 0.2 M NaCl.

In certain embodiments, the formulation comprises:

protamine and zinc in a ratio (w/w) in the range of about 40:1 to about 10:1;

a molar ratio of conjugated insulin molecule to unconjugated insulin molecule in the range of about 25:1 to about 2:1;

about 0.15 to about 0.35% v/v m-cresol; and

glycerol or from about 0.1 to about 0.2 M NaCl.

In certain embodiments, the formulation comprises:

about 3.6 mg protamine/mg conjugate; and

about 0.2 mg zinc/mg conjugate.

In certain embodiments, the formulation comprises:

about 3.6 mg protamine/mg conjugate;

about 0.2 mg zinc/mg conjugate; and

a molar ratio of conjugated insulin molecule to unconjugated insulin molecule of about 5:1.

In certain embodiments, the formulation comprises:

about 3.6 mg protamine/mg conjugate;

about 0.2 mg zinc/mg conjugate;

a molar ratio of conjugated insulin molecule to unconjugated insulin molecule of about 5:1; and

about 0.2% v/v m-cresol.

In certain embodiments, the formulation comprises:

about 3.6 mg protamine/mg conjugate;

about 0.2 mg zinc/mg conjugate;

a molar ratio of conjugated insulin molecule to unconjugated insulin molecule of about 5:1;

about 0.2% v/v m-cresol; and

glycerol or about 0.15 M NaCl.

Uses of crystalline insulin-conjugates

In another aspect, the present disclosure provides methods of using crystalline insulin-conjugates. In general, the crystalline conjugates can be used to controllably provide bioactive insulin 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 crystalline insulin-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 crystalline insulin-conjugate can be administered to a patient by various routes. 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 condition of the patient, etc. In general, the present disclosure

encompasses administration by oral, intramuscular, subcutaneous, 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, a crystalline insulin-conjugate suspension may be administered subcutaneously, e.g., by injection. The suspension 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 crystalline insulin-conjugate will be administered. By a "therapeutically effective amount" is meant a sufficient amount of the crystalline insulin-conjugate to treat the disease or condition at a reasonable benefit/risk ratio, which involves a balancing of the efficacy and toxicity of the conjugate. 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 insulin. Although in general a large therapeutic index is 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 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.

In certain embodiments, a crystalline insulin-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 crystalline insulin-conjugate may be used to treat diabetes.

In certain embodiments, when a crystalline insulin-conjugate or formulation thereof of the present disclosure 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 crystalline insulin-conjugate formulation of the present disclosure 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 provided conjugate 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 insulin molecule 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 insulin molecule employed; the duration of the treatment; drugs used in combination or coincidental with the specific insulin molecule 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 crystalline insulin-conjugate suspension 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 crystalline insulin-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.

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 a crystalline insulin-conjugate of the present disclosure than an otherwise identical patient would. Thus, in certain embodiments, a crystalline insulin-conjugate may be administered to a patient who is also being treated with an insulin sensitizer. In various embodiments, the crystalline insulin-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 crystalline insulin-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 crystalline insulin-conjugate of the present invention is administered to provide a controlled supplement of bioactive insulin when needed by the patient. Thus, in certain embodiments, crystalline 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 a crystalline insulin-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 crystalline insulin-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 crystalline insulin-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-5** to **I-11** and **I-17** that are described and used in the Examples are shown in Figure 2.

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 bezene 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-triflluoromethanesulfonate (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 1 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 – 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 7 – Insulin conjugation with multivalent activated esters in organic solvent

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 insulin is then dissolved separately in 7.5 ml of anhydrous DMSO at a concentration of 8.1 mM. Once dissolved, the entire insulin 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 DeltaPrep 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 molecule, 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 8 – 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, the resulting conjugate should be predominantly substituted at the Lys-B29 position. Using the method described in Example 7 and recombinant human insulin (MW=5808 Da, Sigma Aldrich, St. Louis, MO), 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 9 – Insulin conjugation with multivalent activated esters in aqueous solvent

This example describes an alternative to the method described in Example 7 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 insulin molecule 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 insulin/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 insulin molecule, 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 10 – B29-AEM-2-insulin conjugate I-7 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, the resulting conjugate should be predominantly substituted at the Lys-B29 position. Using the method described in Example 9 and recombinant human insulin (MW = 5808, Sigma Aldrich, St. Louis, MO), 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 11 – 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 recombinant 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 recombinant 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 12 – 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 recombinant 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 recombinant 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.

Example 13 – 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 2, was synthesized using TSAT-C6 as the framework, AEM as the ligand, and recombinant human insulin to produce a B29-substituted conjugate. 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 3, the B29-substituted conjugate is rapidly absorbed into and eliminated from serum following a subcutaneous injection.

Example 14 – Effect of a-MM on PK and bioactivity as a function of ligand affinity

In this example, the TSAT-C6 framework was used and the following conjugates were synthesized according to the methods described in Example 9 (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 2 as conjugates **I-7** and **I-5**, respectively.

Conjugates (5 U/kg) were 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 4 and 5 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. The **I-5** conjugate profile was unaffected by the a-MM injection.

Example 15 – 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 9 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 2 as **I-8**, **I-9**, **I-10**, and **I-11**.

The same type of experiment described in Example 14 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 6 and 7 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.

Figures 8 and 9 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.

Example 16 – In vivo half life/elimination rate comparison

The following experiments were conducted using 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 9.

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 10 shows the serum concentration of either RHI or TSAT-C6-AETM-2 conjugate, shown as **I-6** in Figure 2, 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 10, 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 2):

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.

Example 17 – 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 16:

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

In this example, it was further hypothesized that the clearance rate of insulin-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 17 and those obtained for RHI with no saccharide infusion from Example 16:

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.

Example 19 – Long acting insulin conjugates using protamine, zinc, and other excipients

In order to generate long acting conjugates, we prepared PZI (protamine zinc insulin) formulations from B29-substituted conjugates prepared based on the methods of Example 9. The excipients used in these formulations comprise protamine, zinc, m-cresol, and salt all of which are 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 20 – 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 9, was tested using the generalized formulation and *in vivo* protocol described in Example 19:

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 11a-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 releases a significant portion of the insulin conjugate payload over a short period of time immediately following the injection such that very little signal is detected after the IP glucose challenge. On the other hand, the 10xP-4xZ formulation releases a low basal amount of insulin over the first four hours with no hypoglycemia and subsequently attains > 4x increase in measured insulin concentration immediately following the IP glucose injection.

Example 21 – 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 9, was tested using the generalized formulation and in vivo protocol described in Example 19:

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 Figures 12a-b and 13a-b demonstrate that within experimental error, the concentration of zinc does 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 20, the higher protamine (10xP) formulations release 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 22 – 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 9, was tested using the generalized formulation and in vivo protocol described in Example 19:

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 14a-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 is 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 23 – 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 9, was tested using the generalized formulation and in vivo protocol described in Example 19:

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 15a-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 is 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 20, 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 24 – 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 9, was tested using the generalized formulation and in vivo protocol described in Example 19:

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 16a-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 26 below).

Example 25 – 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 9, was tested using the generalized formulation and in vivo protocol described in Example 19:

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 = 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 17, 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).

Example 26 – Stability of exemplary long-acting, glucose-responsive conjugates

In this example, we synthesized the same exact long acting formulation from Example 25 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 25 at a 15 U/kg dose (body weight in grams/1.87 = microliters of injection volume). As shown in Figures 18-19, this formulation demonstrates similar performance even after being stored refrigerated (Figure 18) or at room temperature (Figure 19) for at least two weeks.

Example 27 – 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 9 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 20, 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 16-17 and that each of them demonstrates an a-MM-induced increase in PK/PD profile as described in Examples 14-15.

Example 28 – 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 9. 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 21a, the peak:baseline serum concentration ratio following the IP a-MM injection for the long-acting TSAT-C6-AETM-2 (**I-6**) formulation is 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 21b) does 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 is nearly identical to unmodified insulin (Example 16), and that it exhibited no a-MM-induced change in PK (Example 14).

Example 29 – 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 22, 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 23.

Example 30 – 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 24. 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 31 – Glucose-responsive PK for I-6 i.v. infusion

In this example, the i.v. elimination rate experiment described in Example 30 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 25 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 25 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 32 – 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 26 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 26 showing conjugate **I-6** with sugar infusion is replotted from the Example 31 results. The middle panel of Figure 26 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 33 - Crystallization of conjugate solutions in aqueous buffer

The dispersions of long-acting conjugates synthesized according to Examples 25-27 were confirmed to be amorphous (non-crystalline) by light and scanning electron microscopy. Conventional unconjugated insulin dispersions formulated under similar conditions, on the other hand, are usually crystalline. Crystalline formulations of insulin conjugates may be advantageous in improving batch to batch reproducibility, increasing formulation stability, and decreasing particle agglomeration over long periods of storage. Therefore, we set out to determine whether an appropriate set of aqueous conditions exist that are amenable to crystallizing our conjugates.

A set of 48 crystallization screening solutions (HR2-144) was purchased from Hampton Research, Inc. (Alta Vista, CA) along with the specially designed Hanging Drop Vapor Diffusion plates. Briefly, a thin bead of cover slide sealant was applied to the upper edge of each of the 24 reservoirs on each of two plates. 1 ml of Index reagent 1 was pipetted into reservoir A1, and 1 ml of Index reagent 2 was pipetted into reservoir A2, and so on. 2 microliters of a 2.5 mg/ml conjugate solution in deionized water was added to the center of a clean, siliconized 22 mm diameter circle cover slide and mixed with 2 microliters of the Index reagent 1 from reservoir 1. The cover slide was inverted and sealed over the A1 reservoir so that the droplet was hanging above the reservoir solution. This entire process was repeated for all 48 Index solutions tested, and the plates were allowed to sit at room temperature overnight prior to observation through a light microscope.

The results of the screening experiment are summarized in Figure 27. Most of the 48 Index solutions did not produce crystalline particles or any precipitation at all for that matter. Index Buffer 19 (pH 8.2, 0.056 M Sodium phosphate monobasic monohydrate with 1.344 M Potassium phosphate dibasic) clearly produced the largest quantity of well-defined crystals. Further testing using Index Buffer 19 revealed substantial crystal formation with the TSAT-C_6-AEM-2 (B29) and TSPE-AEM-3 (B29) conjugates **I-6** and **I-9**. The structures of these compounds are shown in Figure 2. Figure 28 shows scanning electron micrograph (SEM) images of representative crystals formed using Buffer 19 with the TSAT-C_6-AETM-2 (B29) and TSAT-C_6-AEM-2 (B29) conjugates **I-6** and **I-7**.

Example 34 - Long-acting neutral protamine formulations from pre-crystallized conjugates

A scaled-up batch of crystals synthesized using a 50/50 v/v mixture (0.5 ml of 2.5 mg/ml TSAT-C_6-AETM-2 (B29) conjugate **I-6** and 0.5 ml of Index Buffer 19) was prepared and allowed to sit for 24 hours at room temperature to enable full and complete crystallization. To 0.5 ml of the resulting dispersion, 0.0795 ml of a 3% m-cresol solution was added followed by 0.097 ml of a 50 mg/ml protamine solution (pH adjusted to 7.0). The resulting dispersion was mixed gently for approximately 2 hours prior to dosing in rats.

The following experiment was conducted to test the sustained release and glucose-responsive PK profiles profile for the crystalline dispersion (no protamine or m-cresol added) as well as the protamine/cresol-containing dispersion described above. Behind the necks of fasted non-diabetic rats (Male Sprague-Dawley, 400-500 gm, n = 2 each), the non-protamine crystal dispersion was injected with a volume (in microliters) equal to the animals' body weight (in grams) divided by 2.19, and the protamine/cresol-containing crystal dispersion was injected with a volume (in microliters) equal to the animals' body weight (in grams) divided by 1.62. 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).

As shown in Figure 30, the protamine/m-cresol-containing crystals exhibited an extremely flat, protracted absorption profile with a significant glucose-responsive increase in serum concentration following the 4 hour glucose injection. The crystalline dispersion without protamine and m-cresol, however, exhibited a large bolus release of conjugate immediately after

injection followed by some glucose-responsive increase in serum concentration following the 4 hour glucose injection (Figure 29). These results indicate the value of combining protamine and m-cresol with the crystals to maintain the desired long-acting pharmacokinetic profile.

This same experiment was repeated with the TSAT-C_6-AEM-2 (B29) conjugate **I-7**. A scaled-up batch of crystals synthesized using a 50/50 v/v mixture (1.0 ml of 2.5 mg/ml conjugate + 1.0 ml of Index Buffer 19) was prepared and allowed to sit for 24 hours at room temperature to enable full and complete crystallization. To 1.0 ml of the resulting dispersion from each conjugate, 0.159 ml of a 3% m-cresol solution was added followed by 0.194 ml of a 50 mg/ml protamine solution (pH adjusted to 7.0). The resulting dispersions were mixed gently for approximately 2 h prior to dosing in rats.

Behind the necks of fasted non-diabetic rats (Male Sprague-Dawley, 400-500 gm, n = 3 each), the protamine/cresol-containing crystal dispersion was injected with a volume (in microliters) equal to the animals' body weight (in grams) divided by 1.62. 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.

As shown in Figure 31, the protamine/cresol-containing crystals exhibited an extremely flat, protracted absorption profile with a significant increase in measured serum insulin concentration following the 4 hour glucose injection.

The protamine/cresol crystal dispersions described above do not require addition of unconjugated free insulin to maintain stability and improve performance over time. We have found that even after several weeks of refrigerated storage, each crystalline dispersion performs the same as the freshly prepared material.

Example 35 - Long-acting neutral protamine formulations from pre-crystallized conjugates at physiological buffer strength

The protamine/cresol-containing crystalline dispersions described above still contain much higher than physiological concentrations of potassium and phosphate that may potentially lead to unwanted injection site inflammation after repeated dosing. The following experiment was performed to determine if the crystals, once formed, were stable in physiological saline containing protamine and cresol. 3.0 ml of TSPE-AEM-3 (B29) conjugate **I-9** (2.5 mg/ml) was mixed with 3.0 ml of Buffer 19 and allowed to stand at room temperature overnight to enable full and complete crystallization. The next day, 0.956 ml of 3% m-cresol solution and 1.164 ml of a 50 mg/ml protamine solution (pH 7.0) were added to the resulting dispersion and allowed to sit overnight at 4°C. The next day, the dispersion was centrifuged at 1,000g for three minutes after which 7.5 ml of supernatant was removed followed by redispersion in 5.6 ml of 1x phosphate buffered saline (PBS). To 2.8 ml of the resulting dispersion, 0.447 ml of 3% m-cresol solution, 0.204 ml of 1x PBS, and 0.338 ml of a 50 mg/ml protamine solution (pH 7.0) were added. The resulting dispersion was stored at 4°C for week prior to testing in rats.

The aged crystalline dispersion was injected at a volume (in microliters) equal to the animals' body weight (in grams) divided by 1.62 behind the necks of fasted 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). As shown in Figure 32, the crystals dispersed and aged in 1x PBS containing cresol and protamine exhibited an extremely flat, protracted absorption profile with a significant glucose-responsive increase in serum concentration following the 4 hour glucose injection.

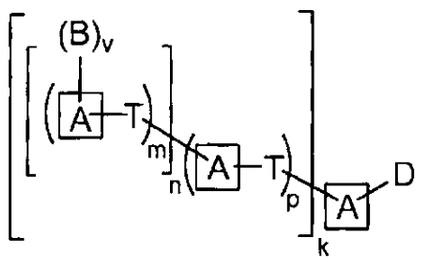
OTHER EMBODIMENTS

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 the specification and examples be considered as exemplary only, with the true scope and spirit of the invention being indicated by the following claims.

CLAIMS

We claim:

1. A crystalline insulin-conjugate of formula (I):



I

wherein:

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

each occurrence of $\left(\boxed{A}\text{—}T\right)$ 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 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 $-T-L^D-W^1$;

W^1 is an insulin molecule;

each occurrence of L^D is independently a covalent bond or a group derived from the covalent conjugation of a T with a W^1;

k is an integer from 1 to 12, inclusive;

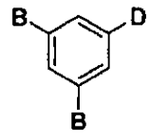
each occurrence of p is independently an integer from 1 to 5, inclusive; and

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

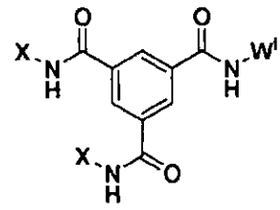
each occurrence of v is independently an integer from 0 to 5, inclusive, with the proviso that within each k-branch at least one occurrence of n is ≥ 1 and at least one occurrence of v is ≥ 1.

2. The crystalline insulin-conjugate of claim 1, wherein the conjugate is of formula (IIIa):



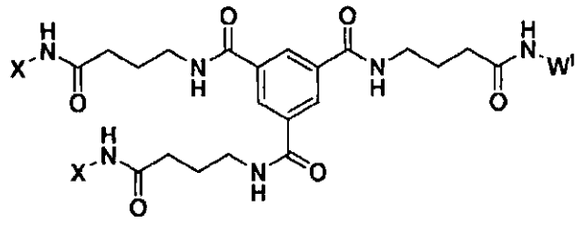
IIIa

3. The crystalline insulin-conjugate of claim 2, wherein the conjugate is of formula (IIIa-1):



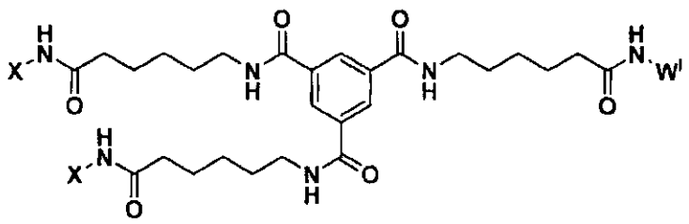
IIIa-1

4. The crystalline insulin-conjugate of claim 2, wherein the conjugate is of formula (IIIa-2):



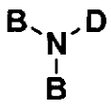
IIIa-2

5. The crystalline insulin-conjugate of claim 2, wherein the conjugate is of formula (IIIa-3):



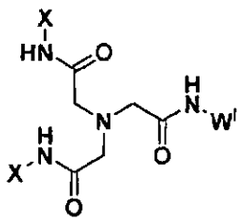
IIIa-3

6. The crystalline insulin-conjugate of claim 1, wherein the conjugate is of formula (IIIb):



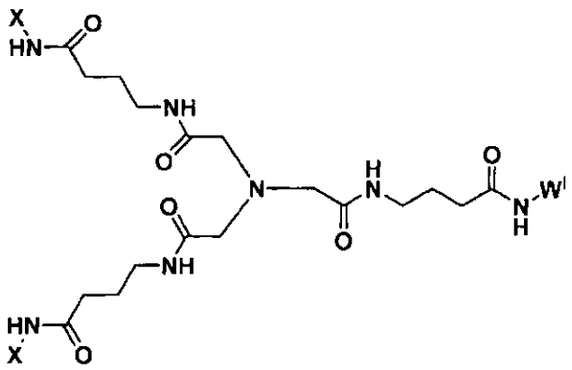
IIIb

7. The crystalline insulin-conjugate of claim 6, wherein the conjugate is of the formula (IIIb-1):



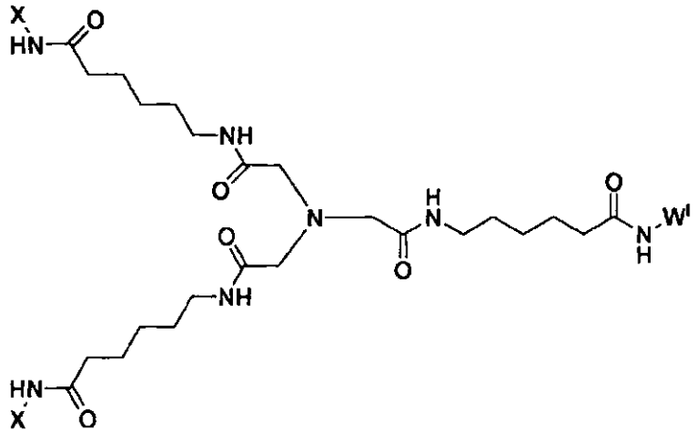
IIIb-1

8. The crystalline insulin-conjugate of claim 6, wherein the conjugate is of formula (IIIb-2):



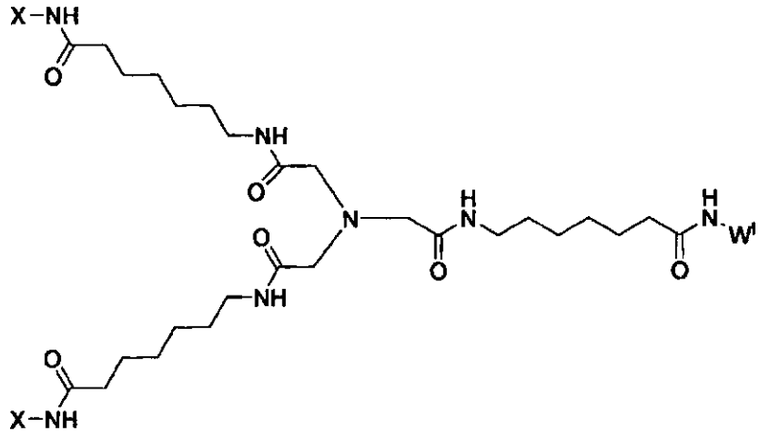
IIIb-2

9. The crystalline insulin-conjugate of claim 6, wherein the conjugate is of formula (IIIb-3):



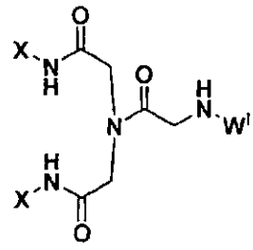
IIIb-3

10. The crystalline insulin-conjugate of claim 6, wherein the conjugate is of formula (IIIb-4):



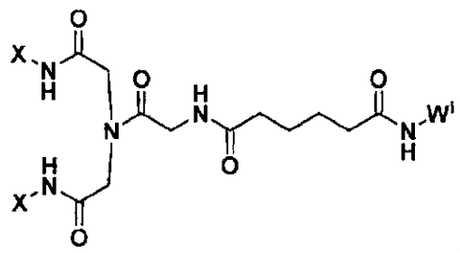
IIIb-4

11. The crystalline insulin-conjugate of claim 6, wherein the conjugate is of the formula (IIIb-5):



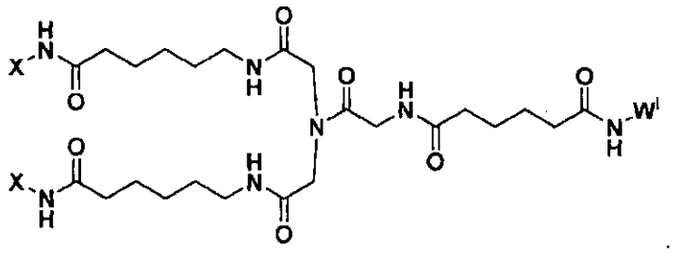
IIIb-5

12. The crystalline insulin-conjugate of claim 6, wherein the conjugate is of formula (IIIb-6):



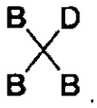
IIIb-6

13. The crystalline insulin-conjugate of claim 6, wherein the conjugate is of formula (IIIb-7):



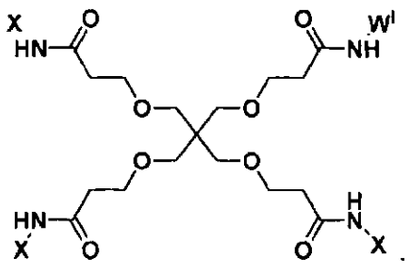
IIIb-7

14. The crystalline insulin-conjugate of claim 1, wherein the conjugate is of formula (IIIc):



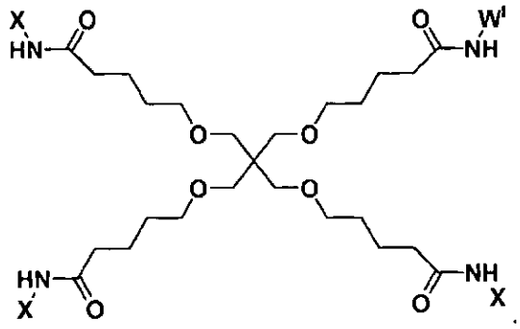
IIIc

15. The crystalline insulin-conjugate of claim 14, wherein the conjugate is of formula (IIIc-1):



IIIc-1

16. The crystalline insulin-conjugate of claim 14, wherein the conjugate is of formula (IIIc-2):



IIIc-2

17. The crystalline insulin-conjugate of claim 2, 6 or 14, 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.

18. The crystalline insulin-conjugate of claim 17, wherein one, two, three, four, or five 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.

19. The crystalline insulin-conjugate of claim 17, 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.

20. The crystalline insulin-conjugate of claim 17, wherein one or more methylene units of T is replaced by -C(O)-.

21. The crystalline insulin-conjugate of claim 17, wherein one or more methylene units of T is replaced by -C(O)N(R)-.

22. The crystalline insulin-conjugate of claim 17, wherein one or more methylene units of T is replaced by -O-.

23. The crystalline insulin-conjugate of claim 17, wherein each occurrence of T is the same.

24. The crystalline insulin-conjugate of claim 2, 6 or 14, wherein L^B and/or L^D is a covalent bond.

25. The crystalline insulin-conjugate of claim 2, 6 or 14, wherein L^B and/or 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^1.

26. The crystalline insulin-conjugate of claim 2, 6 or 14, wherein L^B and/or 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^1 with a carboxyl, thiol, amine, or hydroxyl group of T.

27. The crystalline insulin-conjugate of any one of claims 1-26, wherein the insulin molecule is selected from the group consisting of human insulin, porcine insulin, and bovine insulin.

28. The crystalline insulin-conjugate of any one of claims 1-26, wherein the insulin molecule is selected from the group consisting of insulin lispro, insulin aspart and insulin glulisine.

29. The crystalline insulin-conjugate of any one of claims 1-26, wherein the insulin molecule is insulin glargine or insulin detemir.

30. The crystalline insulin-conjugate of any one of claims 1-26, wherein the insulin molecule includes three disulfide bridges.

31. The crystalline insulin-conjugate of any one of the preceding claims, wherein the insulin molecule is conjugated via the epsilon-amino group of Lys^{B29}.

32. The crystalline insulin-conjugate of any one of claims 1-26, wherein the insulin molecule is human insulin conjugated via the epsilon-amino group of Lys^{B29}.

33. The crystalline insulin-conjugate of any one of claims 1-32, wherein each occurrence of X is a ligand that includes a bimannose.

34. The crystalline insulin-conjugate of any one of claims 1-32, wherein each occurrence of X is a ligand that includes a trimannose.

35. The crystalline insulin-conjugate of any one of claims 1-32, wherein each occurrence of X is a ligand that includes a linear trimannose.

36. The crystalline insulin-conjugate of any one of claims 1-32, wherein each occurrence of X is a ligand that includes a branched trimannose.

37. The crystalline insulin-conjugate of any one of claims 1-32, wherein each occurrence of X is a ligand that includes a saccharide and an amine group.

38. The crystalline insulin-conjugate of claim 37, wherein the saccharide and amine group are separated by a C_1-C_6 alkyl group.

39. The crystalline insulin-conjugate of claim 38, wherein each occurrence of X is independently a ligand that includes aminoethylglucose (AEG), aminoethylmannose (AEM), aminoethylbimannose (AEBM) or aminoethyltrimannose (AETM).

40. The crystalline insulin-conjugate of claim 39, wherein each occurrence of X is a ligand that includes aminoethyltrimannose (AETM).

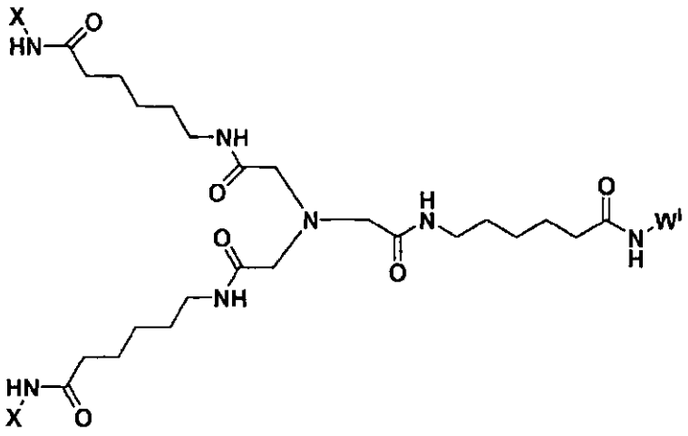
41. The crystalline insulin-conjugate of claim 40, wherein the conjugate includes two or three occurrences where X is a ligand that includes aminoethyltrimannose (AETM).

42. The crystalline insulin-conjugate of any one of the preceding claims, wherein each occurrence of X is a ligand that includes a saccharide that is conjugated via an anomeric carbon.

43. The crystalline insulin-conjugate of claim 42, wherein the anomeric carbon is an alpha anomer.

44. The crystalline insulin-conjugate of any one of claims 1-30, wherein each occurrence of X is aminoethyltrimannose (AETM) conjugated to the conjugate framework via an alpha anomeric carbon; and W^1 is an insulin molecule conjugated to the conjugate framework via the epsilon amino group of Lys^{B29}.

45. A crystalline insulin-conjugate of formula (IIIb-3):

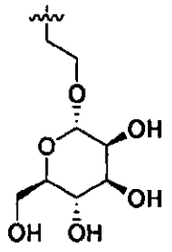


IIIb-3

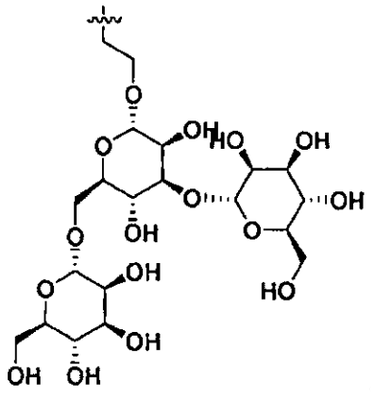
wherein:

W^1 is an insulin molecule; and

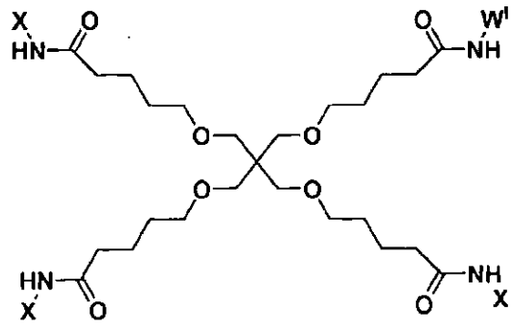
each occurrence of -X is



or



46. A crystalline insulin-conjugate of formula (IIIc-2):

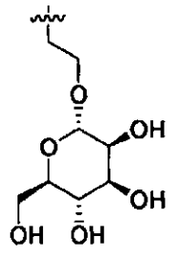


IIIc-2

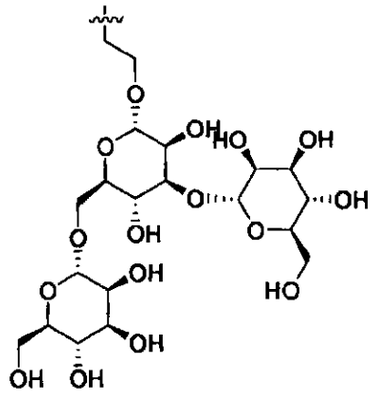
wherein:

W^I is an insulin molecule; and

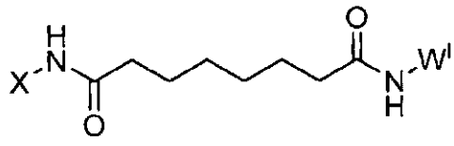
each occurrence of -X is



or



47. A crystalline insulin-conjugate of formula (IIId-1):

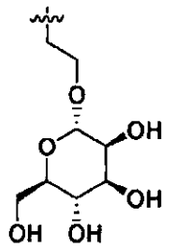


IIId-1

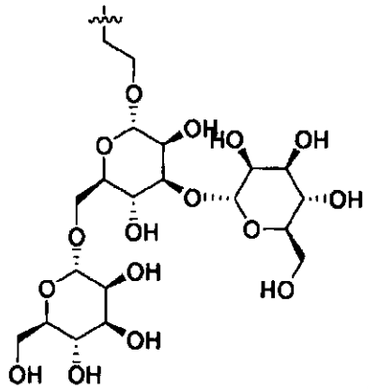
wherein:

W^I is an insulin molecule; and

each occurrence of -X is



or



48. The crystalline insulin-conjugate of claim 45, 46 or 47, wherein the insulin molecule is selected from the group consisting of human insulin, porcine insulin, and bovine insulin.

49. The crystalline insulin-conjugate of claim 45, 46, or 47, wherein the insulin molecule is selected from the group consisting of insulin lispro, insulin aspart and insulin glulisine.

50. The crystalline insulin-conjugate of claim 45, 46, or 47, wherein the insulin molecule is insulin glargine or insulin detemir.

51. A crystalline insulin-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).

52. The crystalline insulin-conjugate of claim 51, wherein the insulin molecule is conjugated via the epsilon-amino group of Lys^{B29}.

53. The crystalline insulin-conjugate of claim 52, wherein the one or more ligands are aminoethylglucose (AEG).

54. The crystalline insulin-conjugate of claim 52, wherein the one or more ligands are aminoethylmannose (AEM).

55. The crystalline insulin-conjugate of claim 52, wherein the one or more ligands are aminoethylbimannose (AEBM).

56. The crystalline insulin-conjugate of claim 52, wherein the one or more ligands are aminoethyltrimannose (AETM).

57. The crystalline insulin-conjugate of claim 52, wherein the one or more ligands are β-aminoethyl-N-acetylglucosamine (AEGA).

58. The crystalline insulin-conjugate of claim 52, wherein the one or more ligands are aminoethylfucose (AEF).

59. The crystalline insulin-conjugate of claim 51, wherein the insulin molecule is conjugated to two or more separate ligands.

60. The crystalline insulin-conjugate of claim 59, wherein the insulin molecule is conjugated to two separate ligands.

61. The crystalline insulin-conjugate of claim 59, wherein the insulin molecule is conjugated to three separate ligands.

62. The crystalline insulin-conjugate of claim 59, wherein the two or more separate ligands are conjugated to a single conjugate framework that is also conjugated to the insulin molecule.

63. The crystalline insulin-conjugate of claim 59, wherein the two or more separate ligands and insulin molecule are each located on a separate branch of a single branched conjugate framework.

64. The crystalline insulin-conjugate of claim 59, wherein the two or more separate ligands and insulin molecule are each located on termini of separate branches of a single branched conjugate framework.

65. The crystalline insulin-conjugate of any one of claims 59-64, wherein the two or more separate ligands are aminoethylglucose (AEG).

66. The crystalline insulin-conjugate of any one of claims 59-64, wherein the two or more separate ligands are aminoethylmannose (AEM).

67. The crystalline insulin-conjugate of any one of claims 59-64, wherein the two or more separate ligands are aminoethylbimannose (AEBM).

68. The crystalline insulin-conjugate of any one of claims 59-64, wherein the two or more separate ligands are aminoethyltrimannose (AETM).

69. The crystalline insulin-conjugate of any one of claims 59-64, wherein the two or more separate ligands are β-aminoethyl-N-acetylglucosamine (AEGA).

70. The crystalline insulin-conjugate of any one of claims 59-64, wherein the two or more separate ligands are aminoethylfucose (AEF).

71. A crystalline insulin-conjugate comprising an insulin molecule conjugated to aminoethylglucose (AEG).

72. A crystalline insulin-conjugate comprising an insulin molecule conjugated to aminoethylmannose (AEM).

73. A crystalline insulin-conjugate comprising an insulin molecule conjugated to aminoethylbimannose (AEBM).

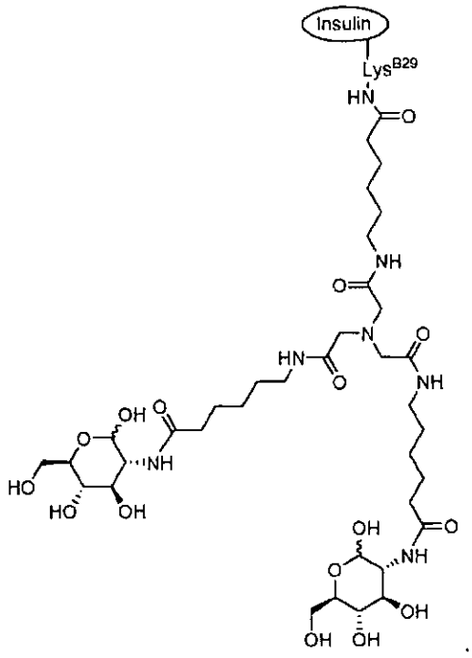
74. A crystalline insulin-conjugate comprising an insulin molecule conjugated to aminoethyltrimannose (AETM).

75. A crystalline insulin-conjugate comprising an insulin molecule conjugated to β-aminoethyl-N-acetylglucosamine (AEGA).

76. A crystalline insulin-conjugate comprising an insulin molecule conjugated to aminoethylfucose (AEF).

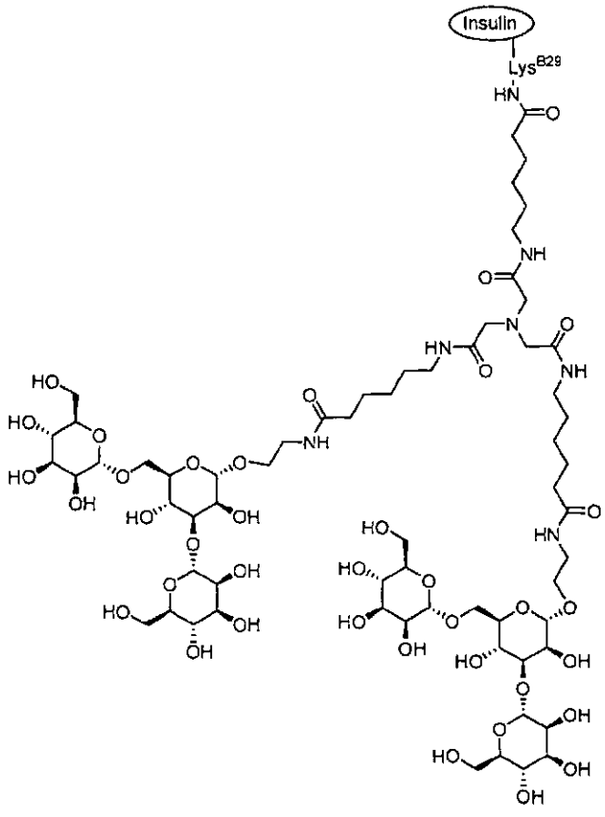
77. The crystalline insulin-conjugate of any one of claims 71-76, wherein the insulin molecule is conjugated via the epsilon-amino group of Lys^{B29}.

78. A crystalline insulin-conjugate of formula:



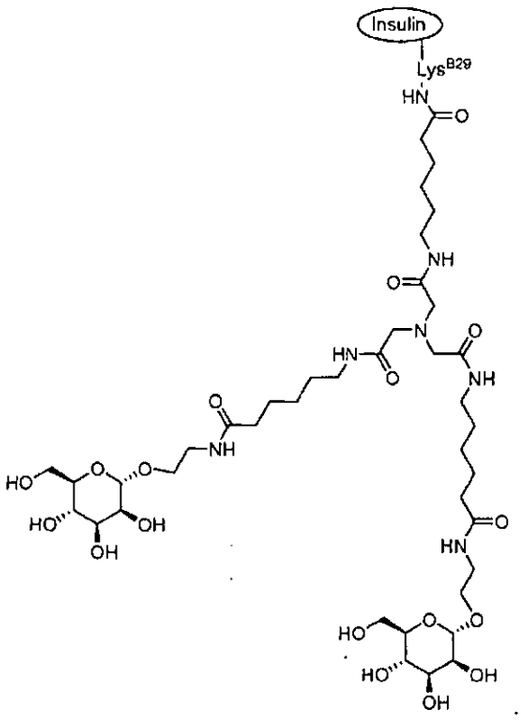
I-5

79. A crystalline insulin-conjugate of formula:



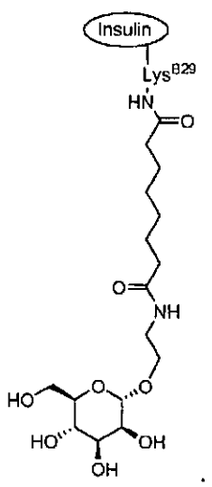
I-6

80. A crystalline insulin-conjugate of formula:



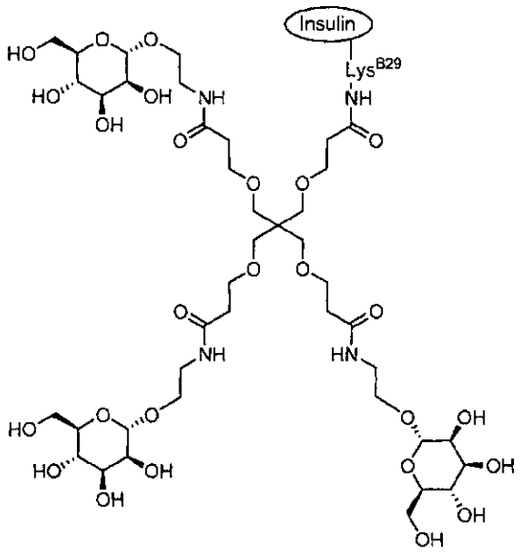
I-7

81. A crystalline insulin-conjugate of formula:



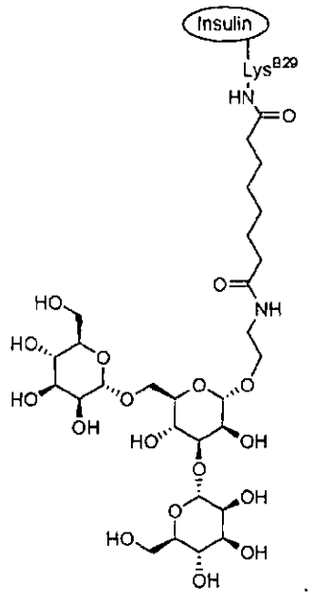
I-8

82. A crystalline insulin-conjugate of formula:



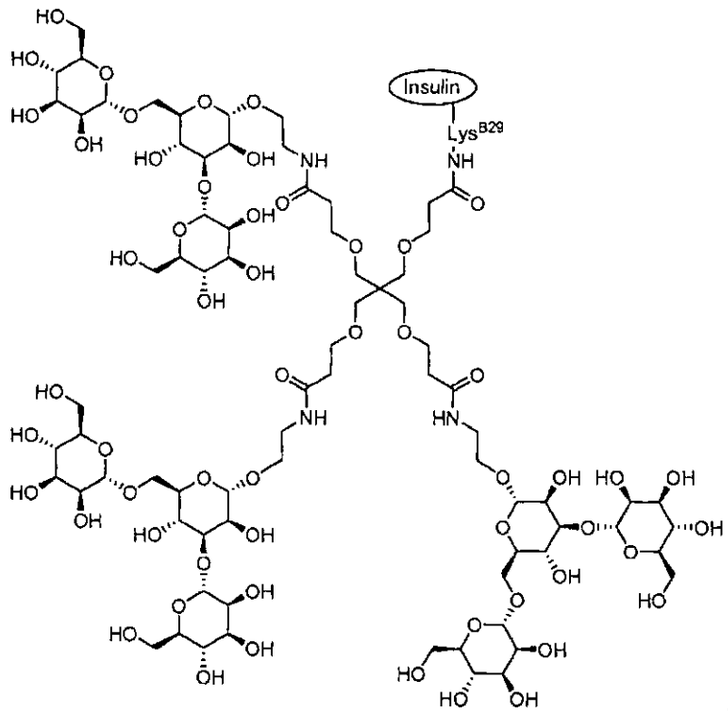
I-9

83. A crystalline insulin-conjugate of formula:



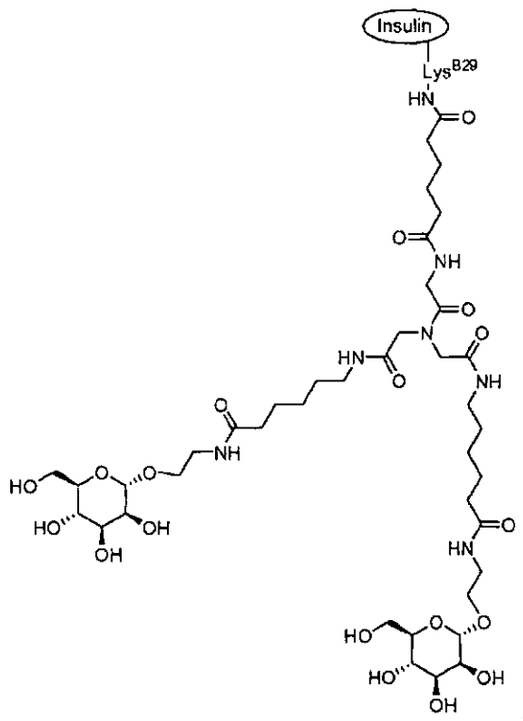
I-10

84. A crystalline insulin-conjugate of formula:



I-11

85. A crystalline insulin-conjugate of formula:



I-17

86. A sustained release formulation comprising a crystalline insulin-conjugate of any one of the preceding claims.

87. The formulation of claim 86, wherein the formulation exhibits a zero-order release of the conjugate when administered to a mammal under fasting conditions.

88. The formulation of claim 86, wherein the formulation exhibits a zero-order release of the conjugate when administered subcutaneously to a mammal under fasting conditions.

89. The formulation of claim 86, wherein the formulation comprises protamine.

90. The formulation of claim 86, wherein the formulation comprises protamine and zinc.

91. The formulation of claim 90, wherein the formulation includes from about 0.05 to about 10 mg protamine/mg conjugate.

92. The formulation of claim 90, wherein the formulation includes from about 1 to about 5 mg protamine/mg conjugate.

93. The formulation of claim 90, wherein the formulation includes from about 0.006 to about 0.5 mg zinc/mg conjugate.

94. The formulation of claim 90, wherein the formulation includes from about 0.1 to about 0.25 mg zinc/mg conjugate.

95. The formulation of claim 90, wherein the formulation includes protamine and zinc in a ratio (w/w) in the range of about 100:1 to about 5:1.

96. The formulation of claim 90, wherein the formulation includes protamine and zinc in a ratio (w/w) in the range of about 40:1 to about 10:1.

97. The formulation of any one of claims 86-96, wherein the formulation further comprises an antimicrobial preservative.

98. The formulation of claim 97, wherein the antimicrobial preservative is selected from the group consisting of m-cresol, phenol, methylparaben, and propylparaben.

99. The formulation of claim 97, wherein the antimicrobial preservative is m-cresol.

100. The formulation of claim 99, wherein the formulation comprises from about 0.1 to about 1.0% v/v m-cresol.

101. The formulation of claim 99, wherein the formulation comprises from about 0.15 to about 0.35% v/v m-cresol.

102. The formulation of any one of claims 86-96, wherein the formulation further comprises an isotonic agent.

103. The formulation of claim 102, wherein the isotonic agent is a polyol.

104. The formulation of claim 103, wherein the isotonic agent is selected from the group consisting of mannitol, propylene glycol and glycerol.

105. The formulation of claim 104, wherein the isotonic agent is glycerol.

106. The formulation of claim 102, wherein the isotonic agent is a salt.

107. The formulation of claim 106, wherein the salt is NaCl.

108. The formulation of claim 107, wherein the formulation comprises from about 0.05 to about 0.5 M NaCl.

109. The formulation of claim 108, wherein the formulation comprises from about 0.1 to about 0.2 M NaCl.

110. The formulation of any one of claims 86-96, wherein the formulation further comprises an amount of unconjugated insulin molecule.

111. The formulation of claim 110, wherein the formulation comprises a molar ratio of crystalline insulin-conjugate to unconjugated insulin molecule in the range of about 100:1 to about 1:1.

112. The formulation of claim 110, wherein the formulation comprises a molar ratio of crystalline insulin-conjugate to unconjugated insulin molecule in the range of about 25:1 to about 2:1.

113. The formulation of any one of claims 86-112, wherein the crystalline insulin-conjugate is any one of the crystalline insulin-conjugates of claims 78-85.

114. The formulation of claim 113, wherein the crystalline insulin-conjugate is the crystalline insulin-conjugate of claim 79, 80, or 82.

115. The formulation of claim 114, wherein the crystalline insulin-conjugate is the crystalline insulin-conjugate of claim 79.

116. A pump delivery system comprising a suspension of a crystalline insulin-conjugate of any one of claims 1-85, wherein the pump delivery system operates by infusing the crystalline insulin-conjugate suspension into a mammal.

117. The pump of claim 116, wherein the pump operates by infusing the crystalline insulin-conjugate suspension subcutaneously or intraperitoneally.

118. The pump of claim 116 or 117, wherein the crystalline insulin-conjugate is any one of the crystalline insulin-conjugates of claims 78-85.

119. The pump of claim 118, wherein the crystalline insulin-conjugate is the crystalline insulin-conjugate of claims 79, 80, or 82.

120. The pump of claim 119, wherein the crystalline insulin-conjugate is the crystalline insulin-conjugate of claim 79.

121. A method of treating hyperglycemia comprising administering a crystalline insulin-conjugate or formulation thereof of any one of claims 1-115 to a mammalian patient in need thereof.

122. The method of claim 121, wherein the patient is diabetic.

123. The method of claim 121, wherein the patient has an infection associated with impaired glycemic control.

124. The method of claim 121, wherein the formulation does not include a lectin.

125. The method of claim 121, wherein the formulation is administered by subcutaneous injection.

126. The method of claim 121, wherein the patient is a human.

127. The method of any one of claims 121-126, wherein the crystalline insulin-conjugate is any one of the crystalline insulin-conjugates of claims 78-85.

128. The method of claim 127, wherein the crystalline insulin-conjugate is the crystalline insulin-conjugate of claim 79, 80, or 82.

129. The method of claim 128, wherein the crystalline insulin-conjugate is the crystalline insulin-conjugate of claim 79.

130. The method of claim 121, wherein the crystalline insulin-conjugate or formulation thereof is administered such that the average daily dose of the insulin molecule is in the range of 10 to 200 U.

131. The method of claim 130, wherein the crystalline insulin-conjugate or formulation thereof is administered daily.

132. The method of claim 130, wherein the crystalline insulin-conjugate or formulation thereof is administered weekly.

133. The method of claim 130, wherein the crystalline insulin-conjugate or formulation thereof is administered monthly.

134. The method of claim 130, wherein the patient is also receiving an insulin sensitizer.

135. The method of claim 130, wherein the patient is also receiving an insulin secretagogue.

136. A method comprising administering a crystalline insulin-conjugate or formulation thereof of any one of claims 1-115 to a mammalian patient in need thereof.

137. The method of claim 136, wherein the crystalline insulin-conjugate induces less hypoglycemia than an unconjugated version of the insulin molecule.

138. The method of claim 136 or 137, wherein the crystalline insulin-conjugate is any one of the crystalline insulin-conjugates of claims 78-85.

139. The method of claim 138, wherein the crystalline insulin-conjugate is the crystalline insulin-conjugate of claim 79, 80, or 82.

140. The method of claim 138, wherein the crystalline insulin-conjugate is the crystalline insulin-conjugate of claim 79.

141. A method comprising administering a formulation of any one of claims 86-96 to a mammalian patient in need thereof.

142. The method of claim 141, wherein the formulation induces less hypoglycemia than a formulation comprising an unconjugated version of the insulin molecule.

143. The method of claim 141, wherein the formulation induces a lower HbA1c than a formulation comprising an unconjugated version of the insulin molecule.

144. The method of any one of claims 141-143, wherein the formulation comprises the crystalline insulin-conjugate of any one of claims 78-85.

145. The method of claim 144, wherein the formulation comprises the crystalline insulin-conjugate of claim 79, 80, or 82.

146. The method of claim 145, wherein the formulation comprises the crystalline insulin-conjugate of claim 79.

147. The method of any one of claims 136-146, further comprising administering a triggering amount of an exogenous saccharide to the patient.

148. The method of claim 147, wherein the exogenous saccharide is mannose.

149. The method of claim 147, wherein the exogenous saccharide is L-fucose.

150. The method of claim 147, wherein the exogenous saccharide is N-acetyl glucosamine.

151. The method of claim 147, wherein the exogenous saccharide is alpha-methyl mannose.

152. The method of claim 147, wherein the conjugate or formulation and the exogenous saccharide are administered to the mammal via different routes.

153. The method of claim 147, wherein the conjugate or formulation is administered subcutaneously and the exogenous saccharide is administered orally.

154. The method of claim 147, wherein the conjugate or formulation is administered subcutaneously and the exogenous saccharide is administered intravenously.

155. A method of making a crystalline insulin-conjugate of any one of claims 1-85 comprising crystallizing the insulin-conjugate from a phosphate buffer.

156. The method of claim 155, wherein the buffer has a higher concentration of potassium than sodium.

157. The method of claim 155, wherein the buffer has a higher concentration of potassium phosphate monobasic than sodium phosphate dibasic.

158. The method of claim 155, wherein the buffer has a pH in the range of about 6 to 9.

159. The method of claim 155, wherein the buffer has a pH of about 8.

160. The method of claim 155, wherein the buffer has a pH of 8.2.

161. The method of claim 155, wherein the crystalline insulin-conjugate is conjugated at Lys^{B29}.

162. The method of claim 155, wherein the crystalline insulin-conjugate is the crystalline insulin-conjugate of claim 79, 80, or 82.

163. The method of claim 155, wherein one or more additives is added, wherein the additive is selected from the group consisting of cresol, phenol, protamine, poly(arginine), glycerol, zinc chloride, or zinc acetate.

164. The method of claim 155, wherein polyethylene glycol is added.

165. The method of claim 155, wherein an organic solvent is added to facilitate crystallization.

166. The method of claim 155, wherein the organic solvent is methanol, ethanol, or isopropanol.

167. A method of making a crystalline insulin-conjugate of any one of claims 1-85 comprising crystallizing the insulin-conjugate from HEPES buffer.

168. A method of making a crystalline insulin-conjugate of any one of claims 1-85 comprising crystallizing the insulin-conjugate from TRIS buffer.

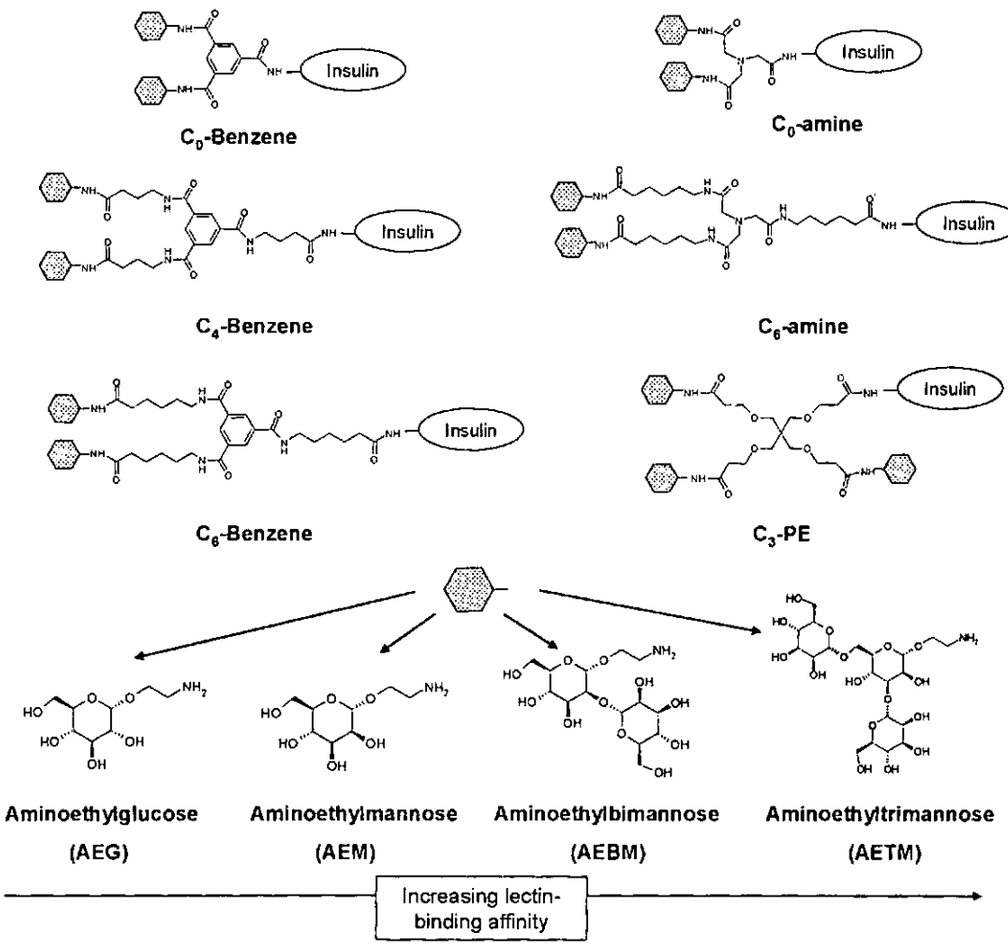
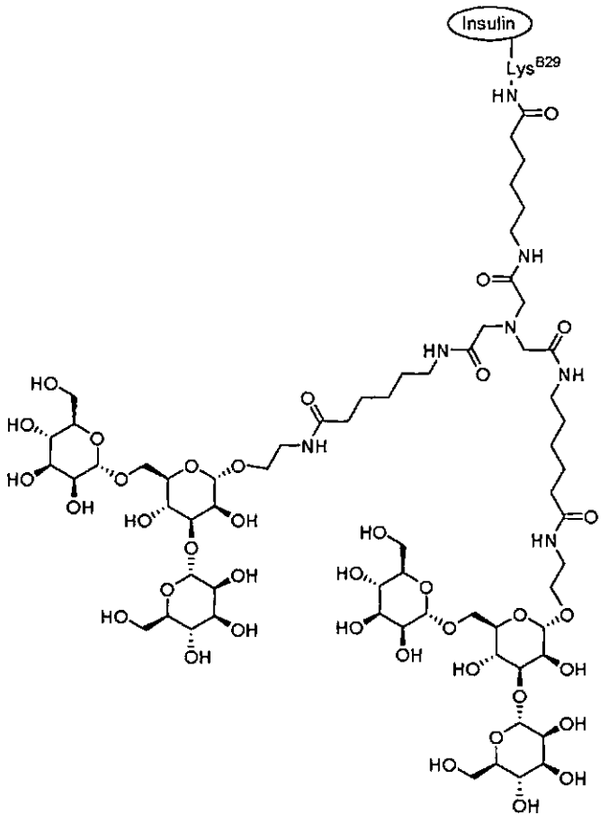
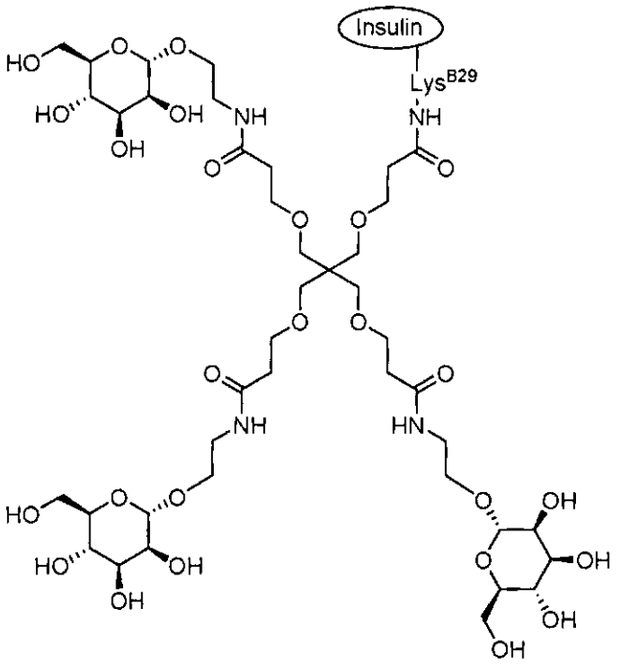

Insulin
C0-Benzene
Insulin
C0-amine
Insulin
C4-Benzene
Insulin
C6-amine
Insulin
C6-Benzene
Insulin
C3-PE
Aminoethylglucose
(AEG)
Aminoethylmannose
(AEM)
Aminoethylbimannose
(AEBM)
Aminoethyltrimannose
(AETM)
Increasing lectin-binding affinity

Figure 1

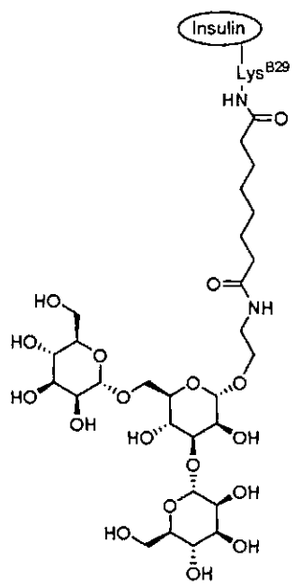


Conjugate I-6
TSAT-C6-AETM-2 (B29)

Figure 2 (continued)

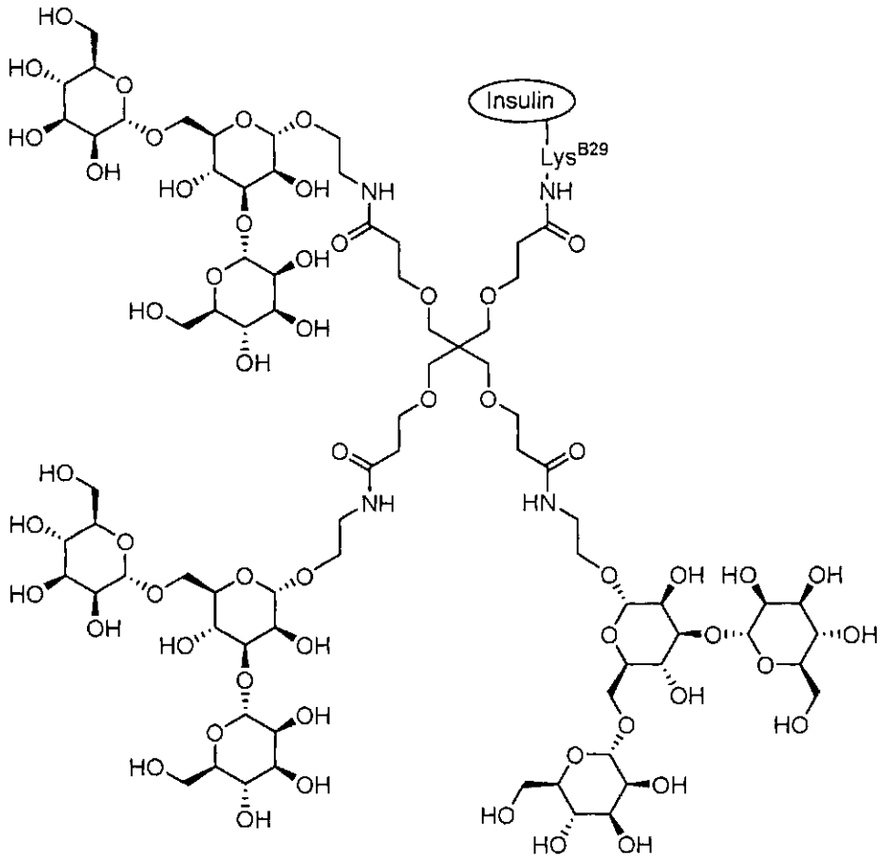


Conjugate I-9
TSPE-AEM-3 (B29)



Conjugate I-10
DSS-AETM-1 (B29)

Figure 2 (continued)



Conjugate I-11
TSPE-AETM-3 (B29)

Figure 2 (continued)

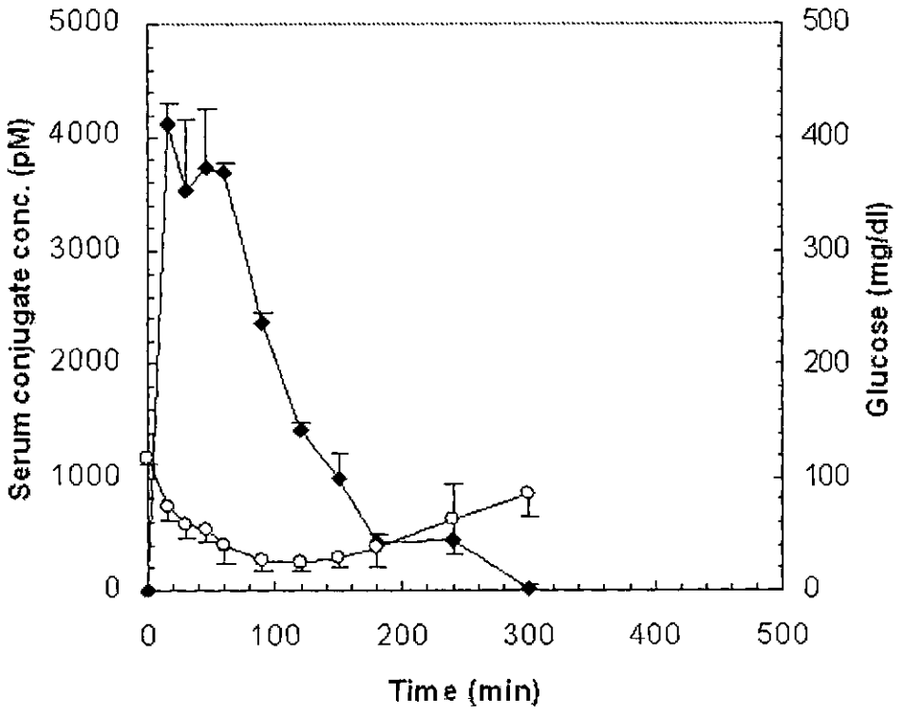

5000
4000
3000
2000
1000
0
Serum conjugate conc. (pM)
500
400
300
200
100
0
Glucose (mg/dl)
0
100
200
300
400
500
Time (min)

Figure 3

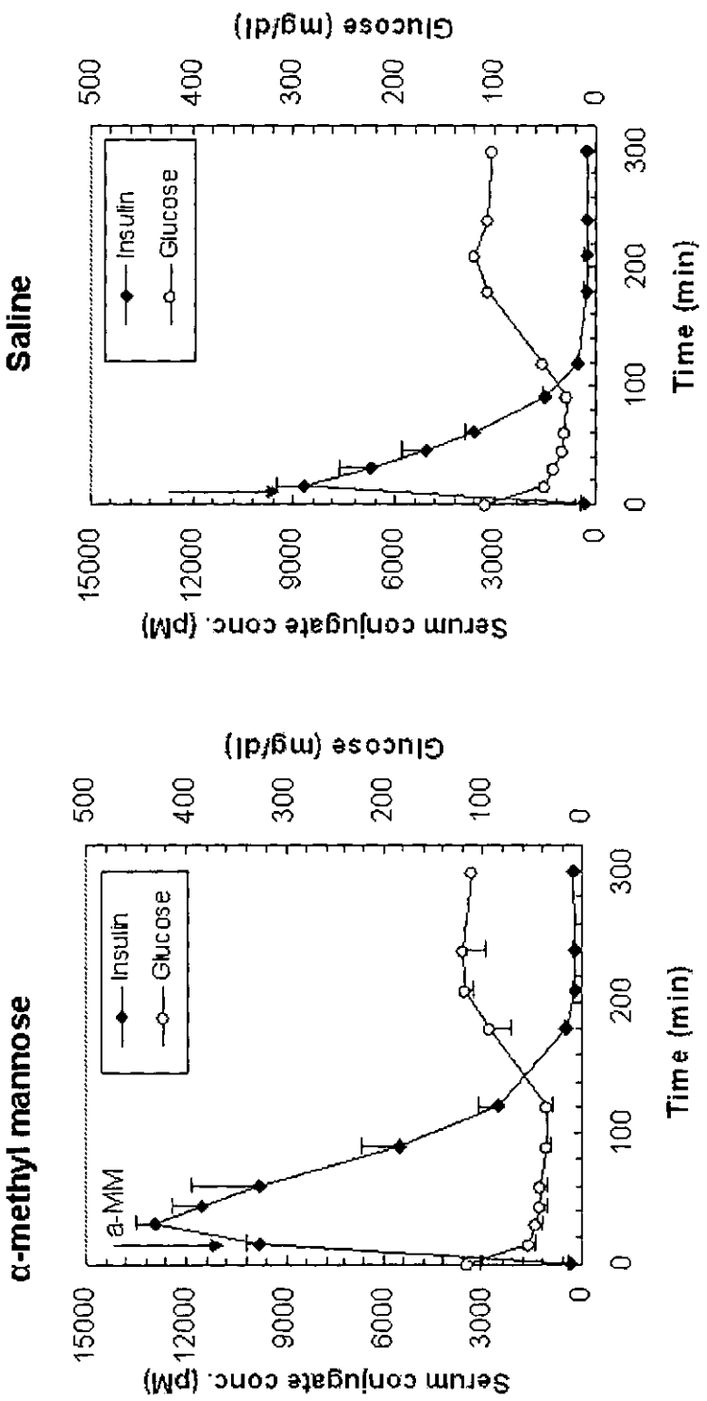

Saline
α-methyl mannose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
Insulin
Glucose
a-MM
0
3000
6000
9000
12000
15000
100
200
300
400
500

Figure 4

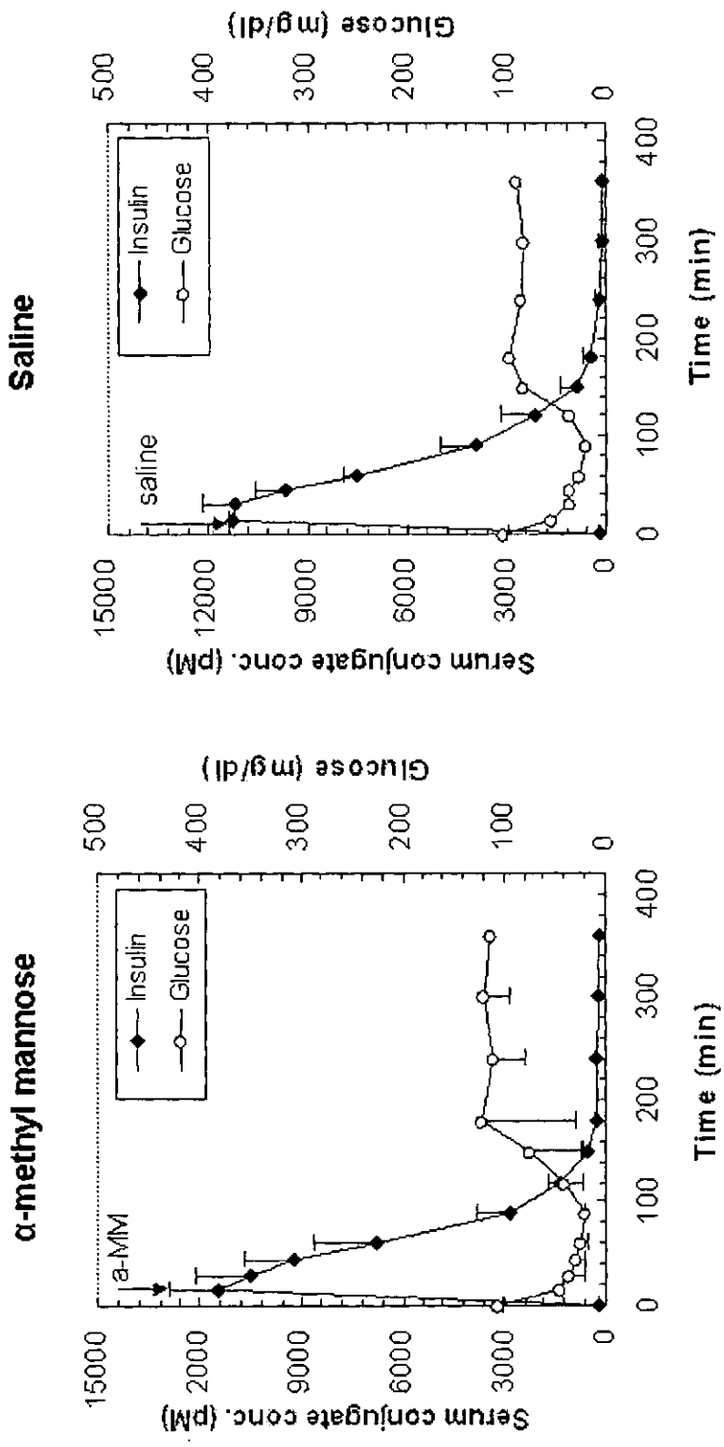

α-methyl mannose
a-MM
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
Saline
saline
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)

Figure 5

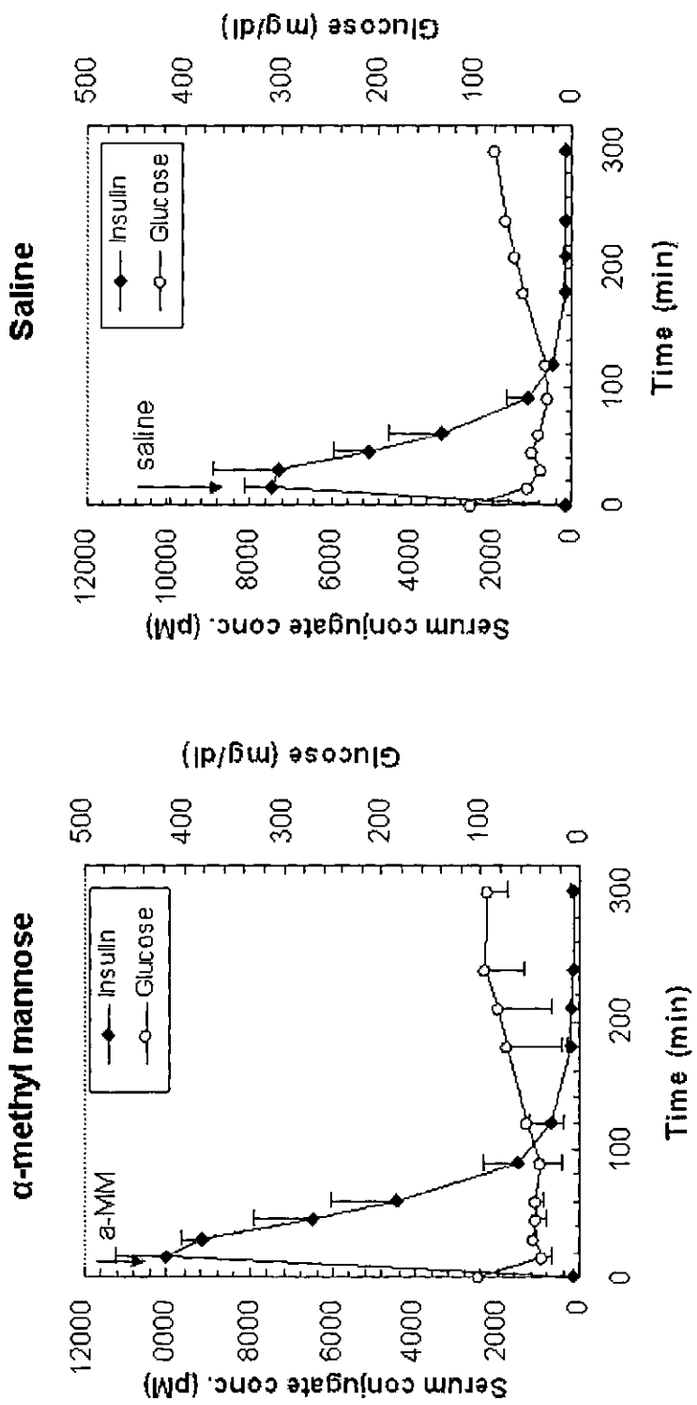

Saline
saline
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
α-methyl mannose
a-MM
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)

Figure 6

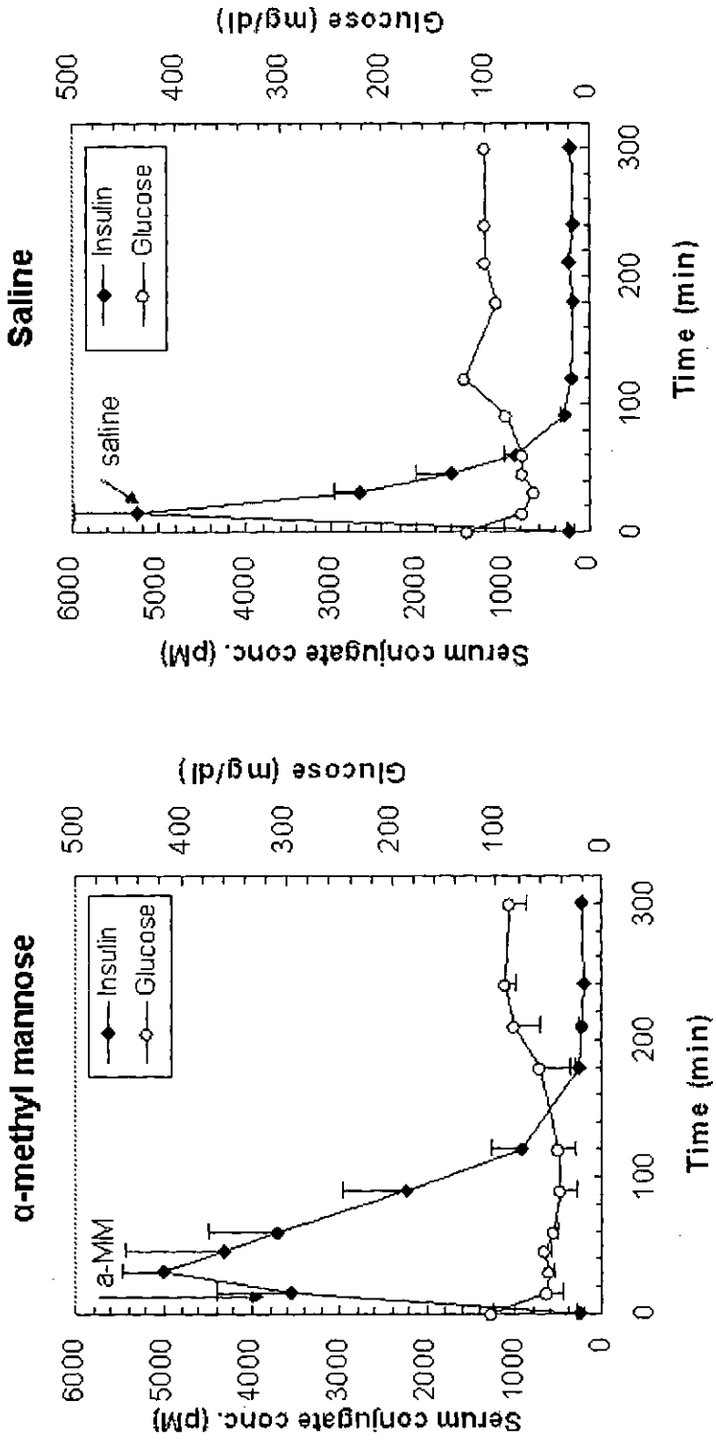

Saline
saline
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
α-methyl mannose
a-MM
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)

Figure 7

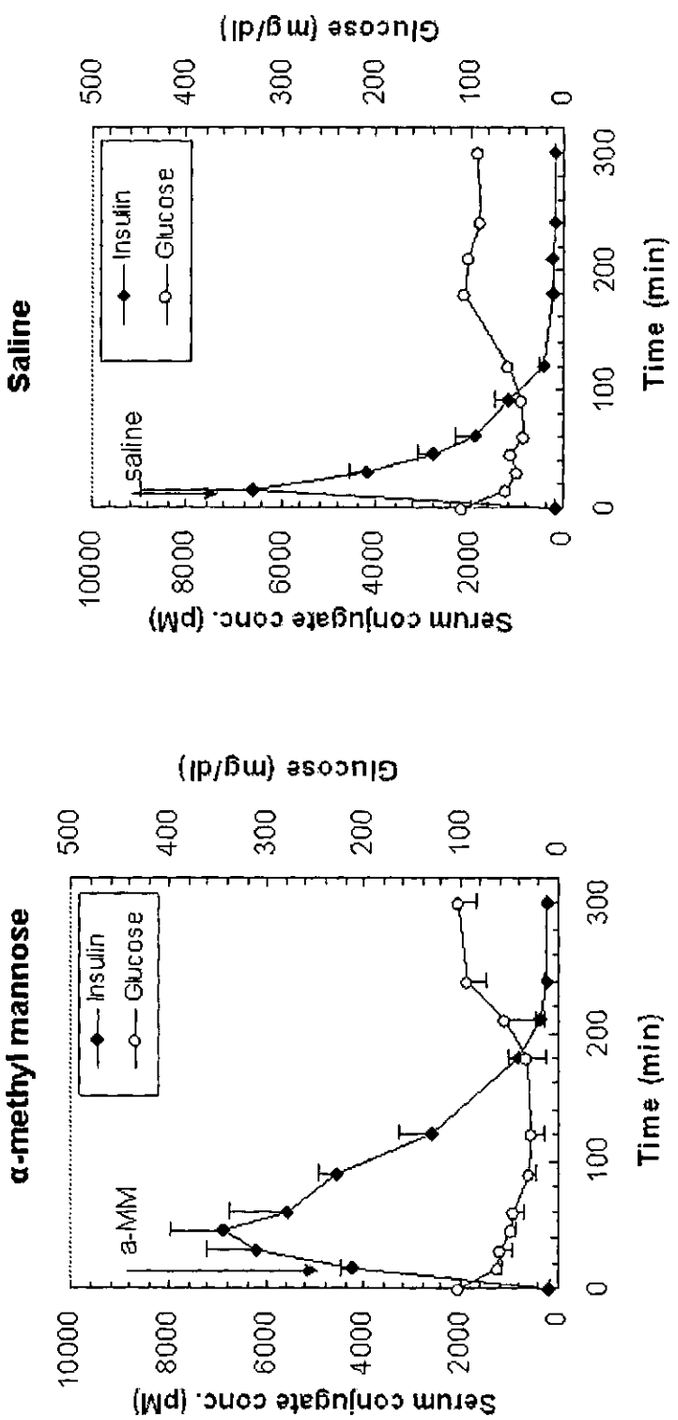

α-methyl mannose
a-MM
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
Saline
saline
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)

Figure 8

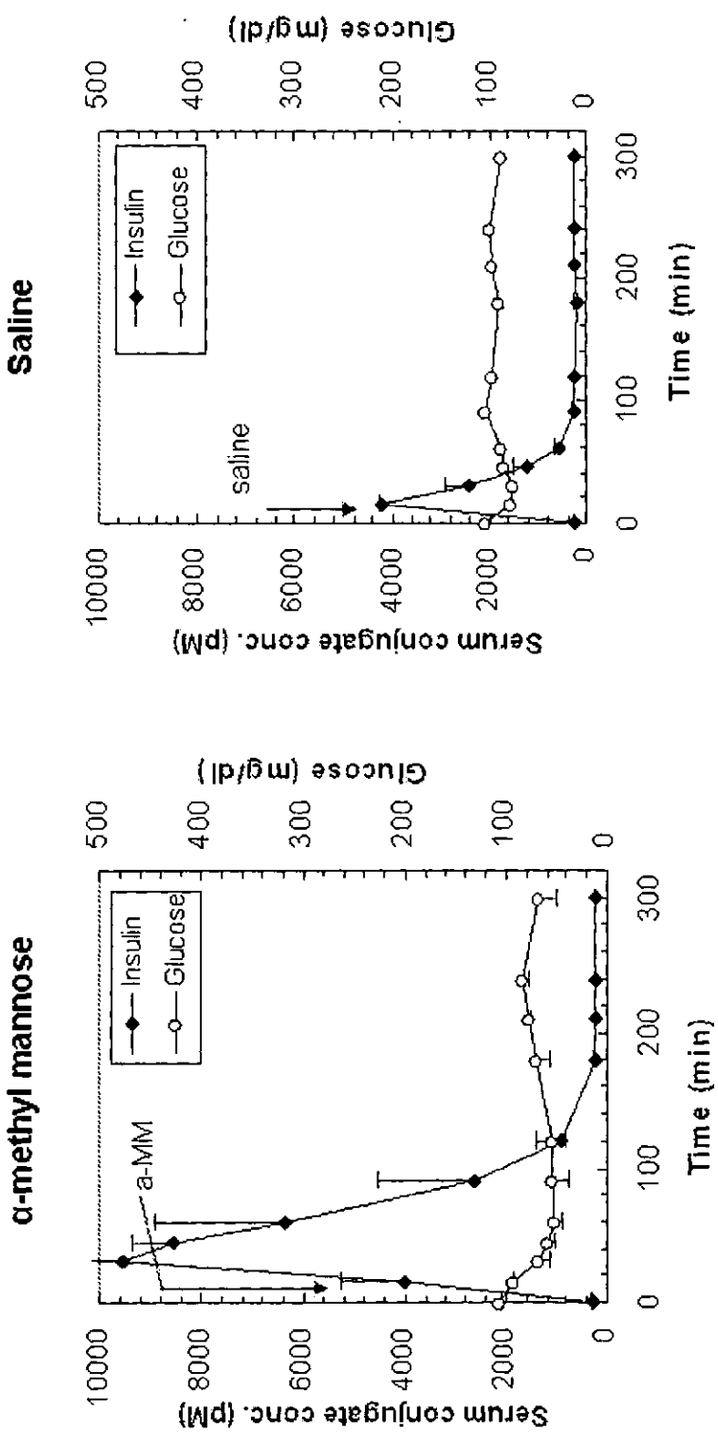

α-methyl mannose
Saline
Insulin
Glucose
a-MM
saline
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
0
2000
4000
6000
8000
10000
100
200
300
400
500

Figure 9

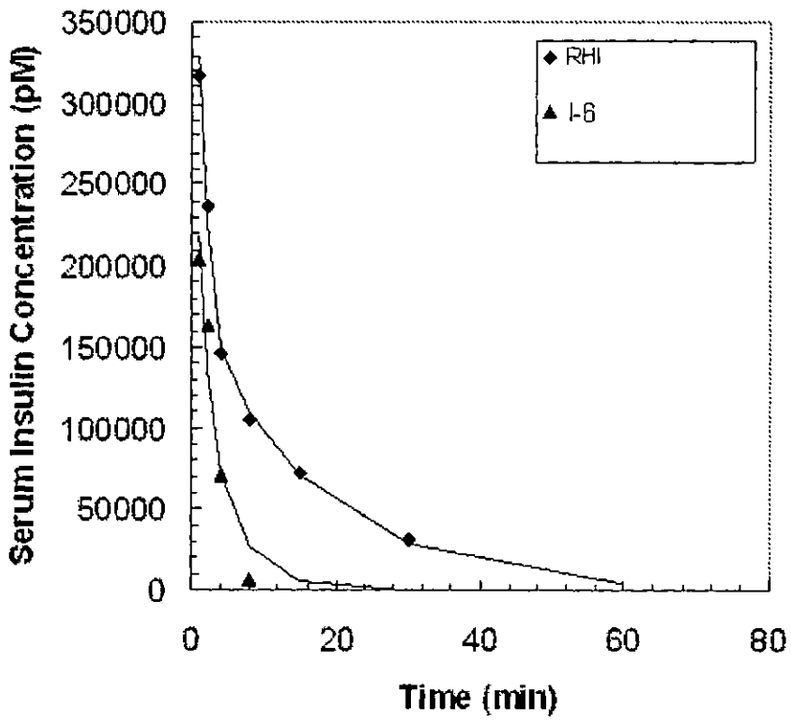

350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
Serum Insulin Concentration (pM)
0
20
40
60
80
Time (min)
RHI
I-6

Figure 10

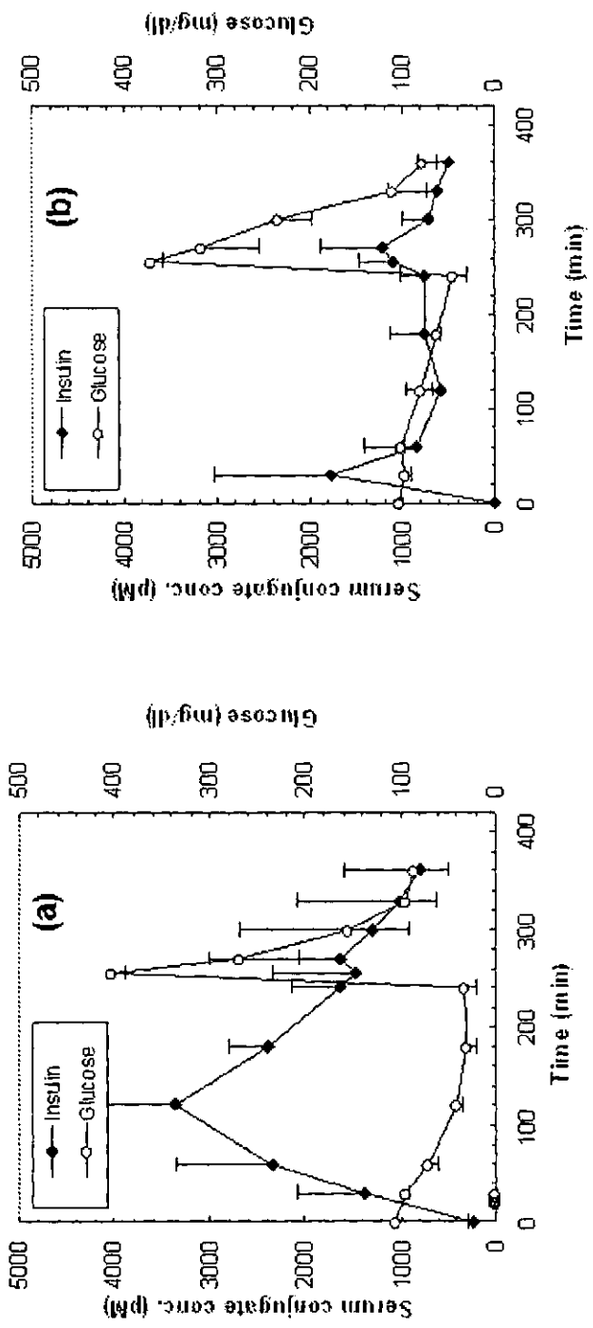

(a)
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
100
200
300
400
500
(b)
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)

Figure 11

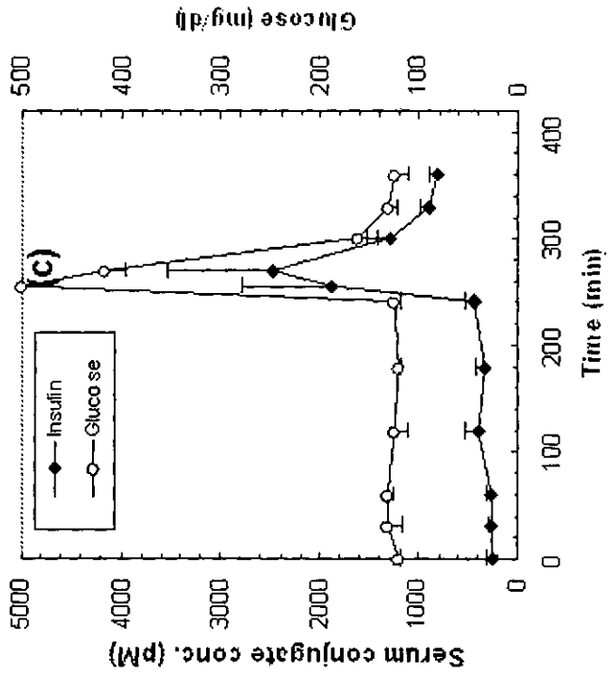


Figure 11 (continued)

(a)
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
100
200
300
400
500
(b)
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)

Figure 12

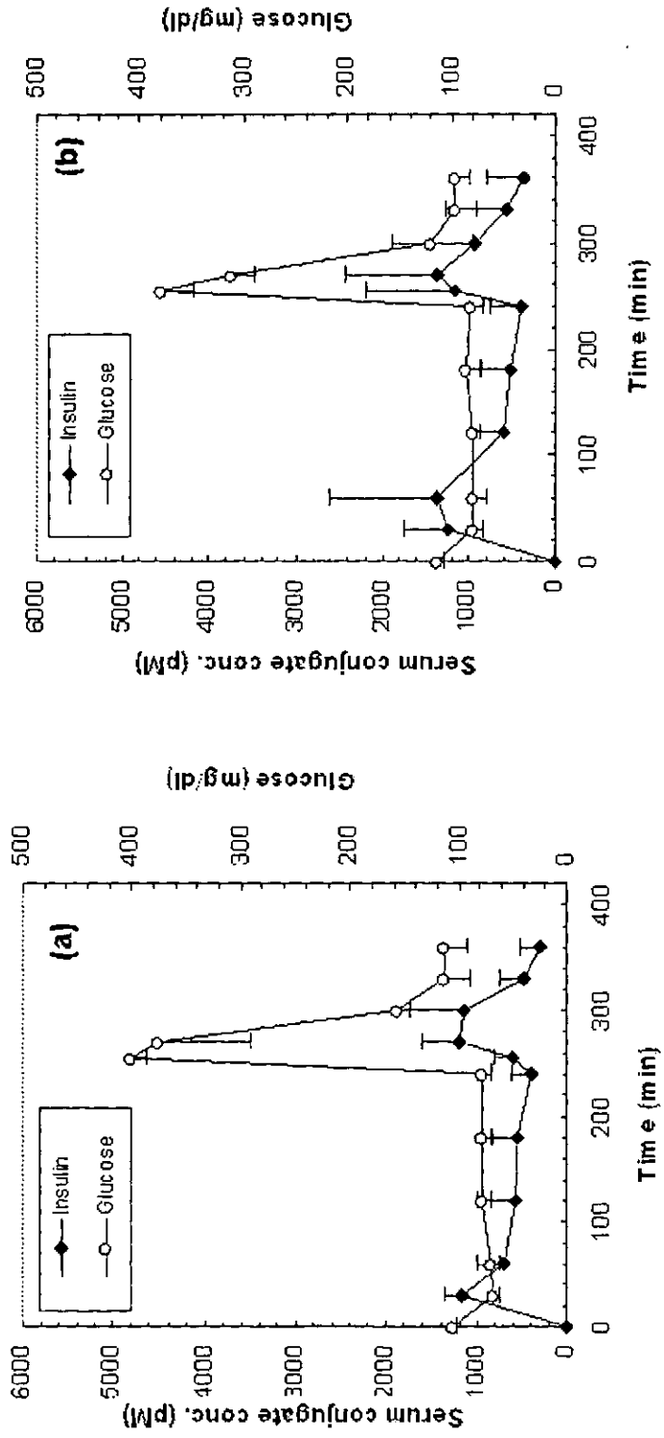

(a)
(b)
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
100
200
300
400
500

Figure 13

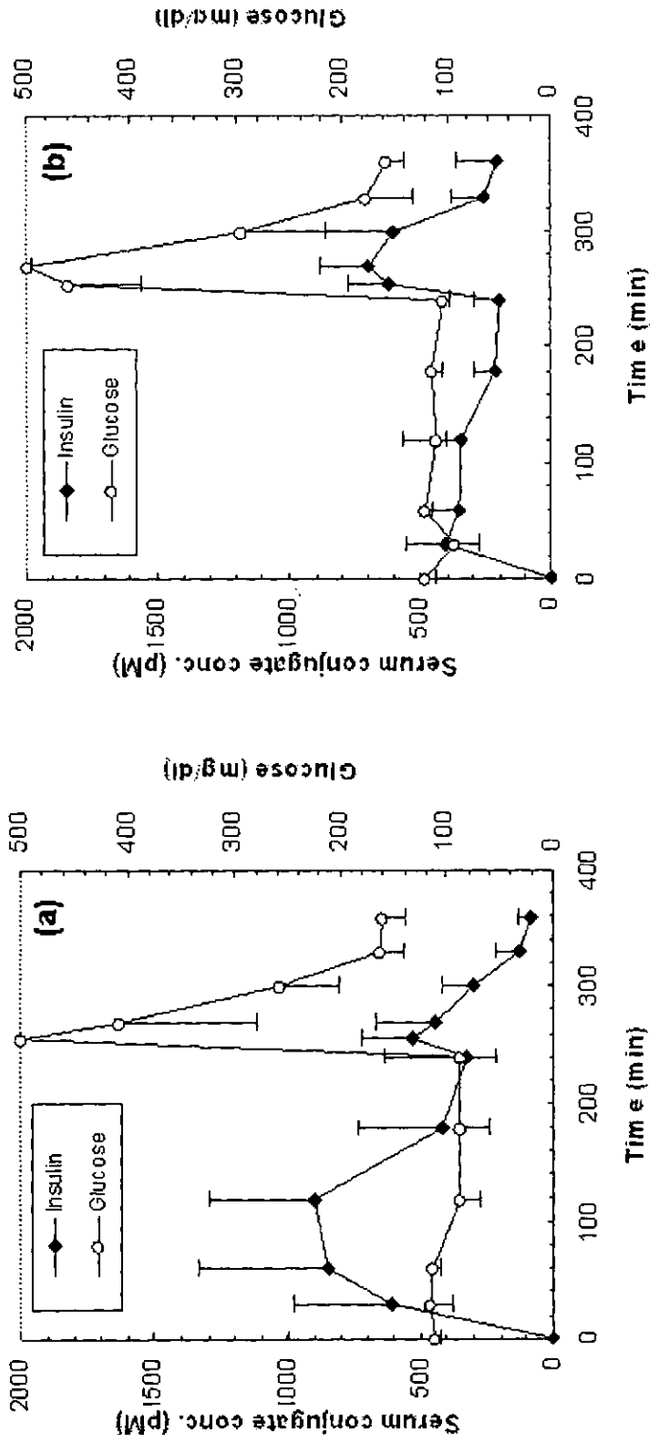

(a)
(b)
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
0
500
1000
1500
2000
100
200
300
400

Figure 14

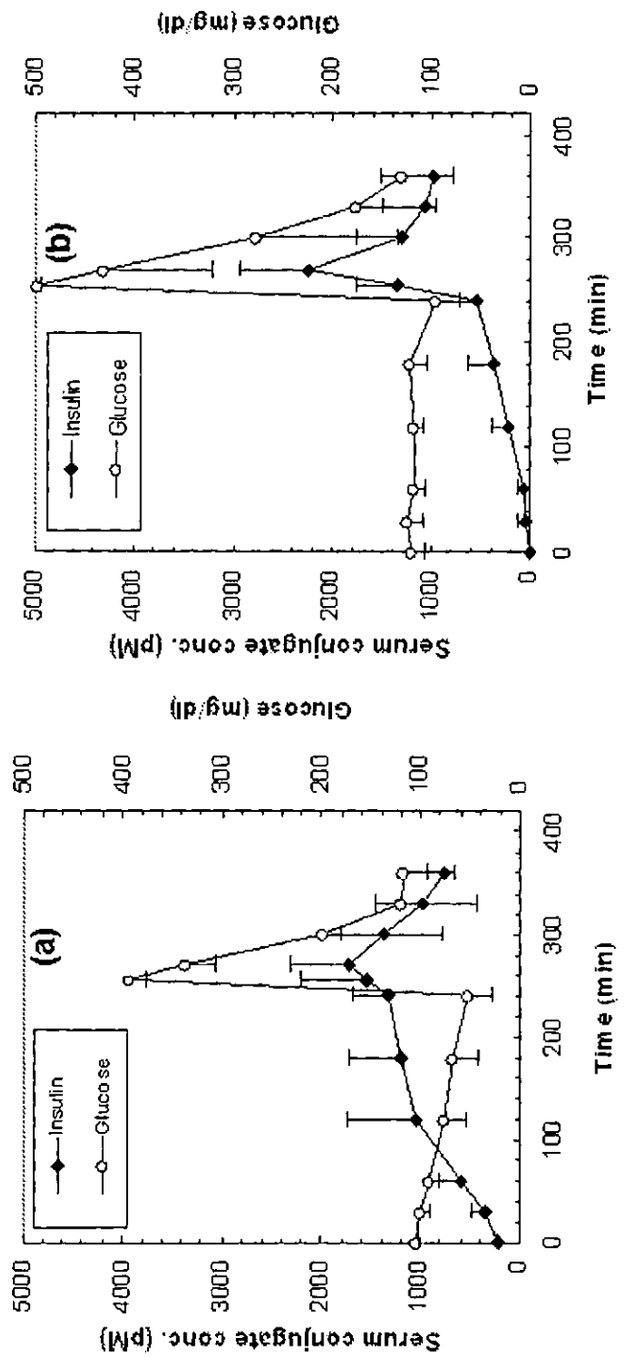

(a)
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
(b)
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)

Figure 15

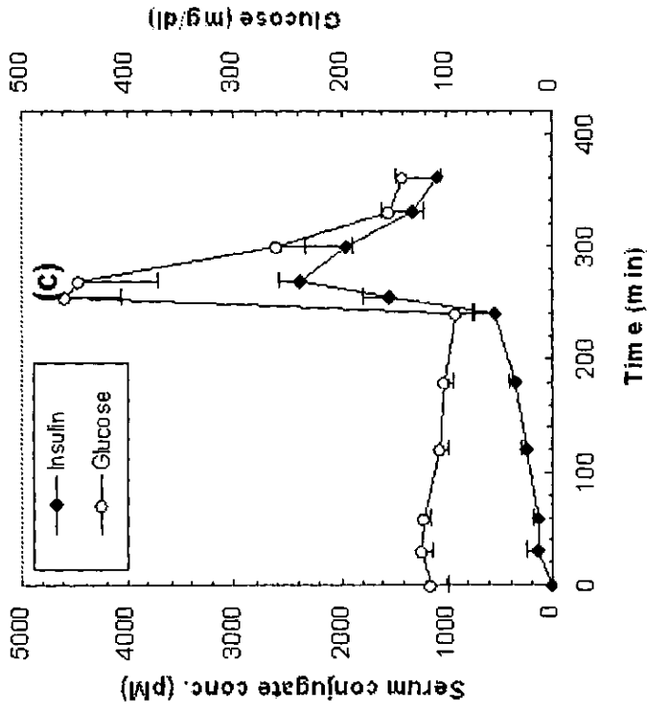


Figure 15 (continued)

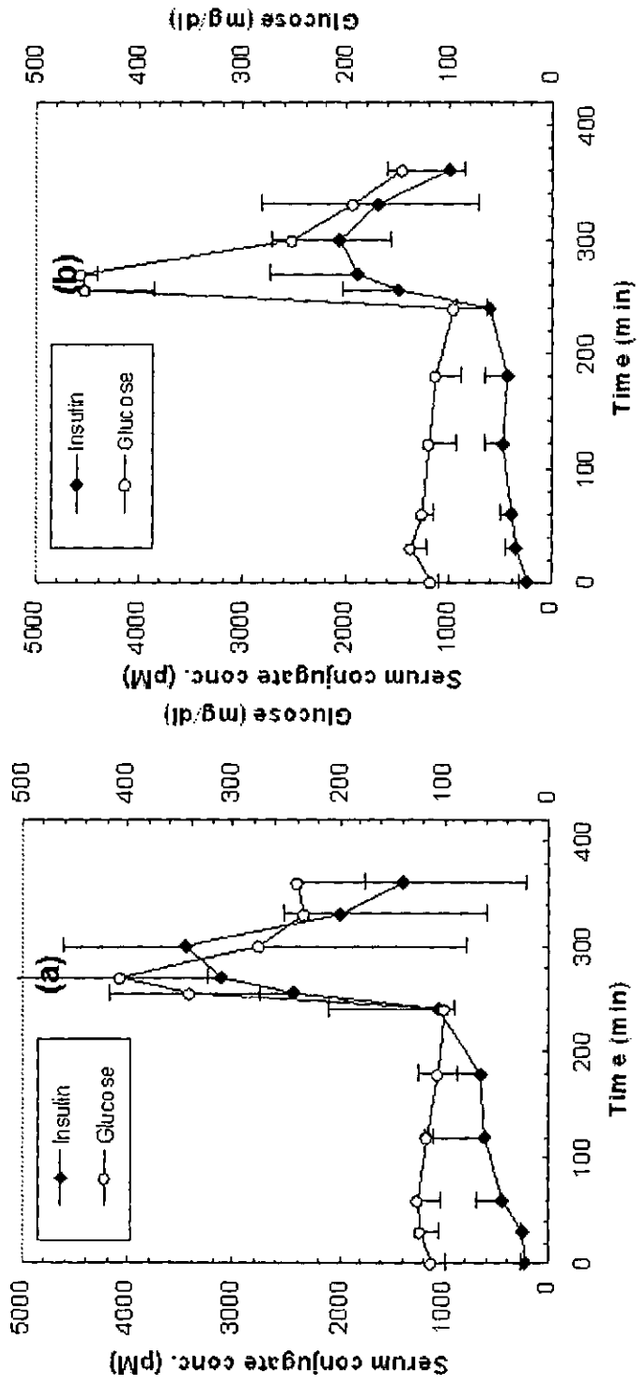

(a)
(b)
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
100
200
300
400
500

Figure 16

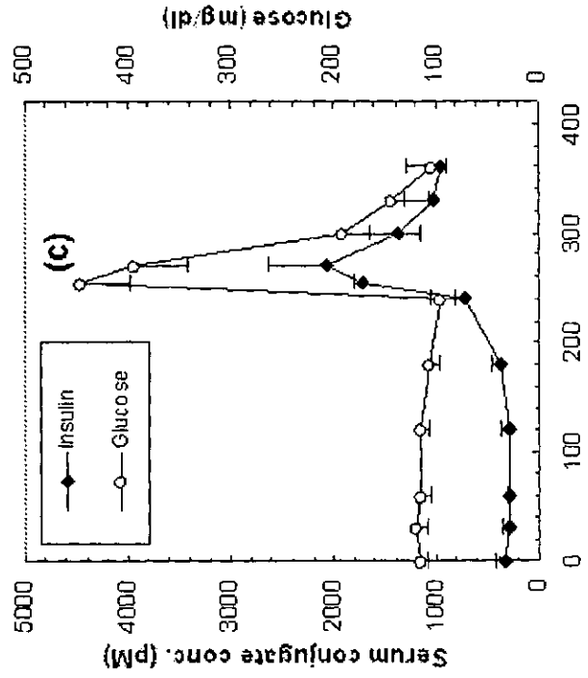


Figure 16 (continued)

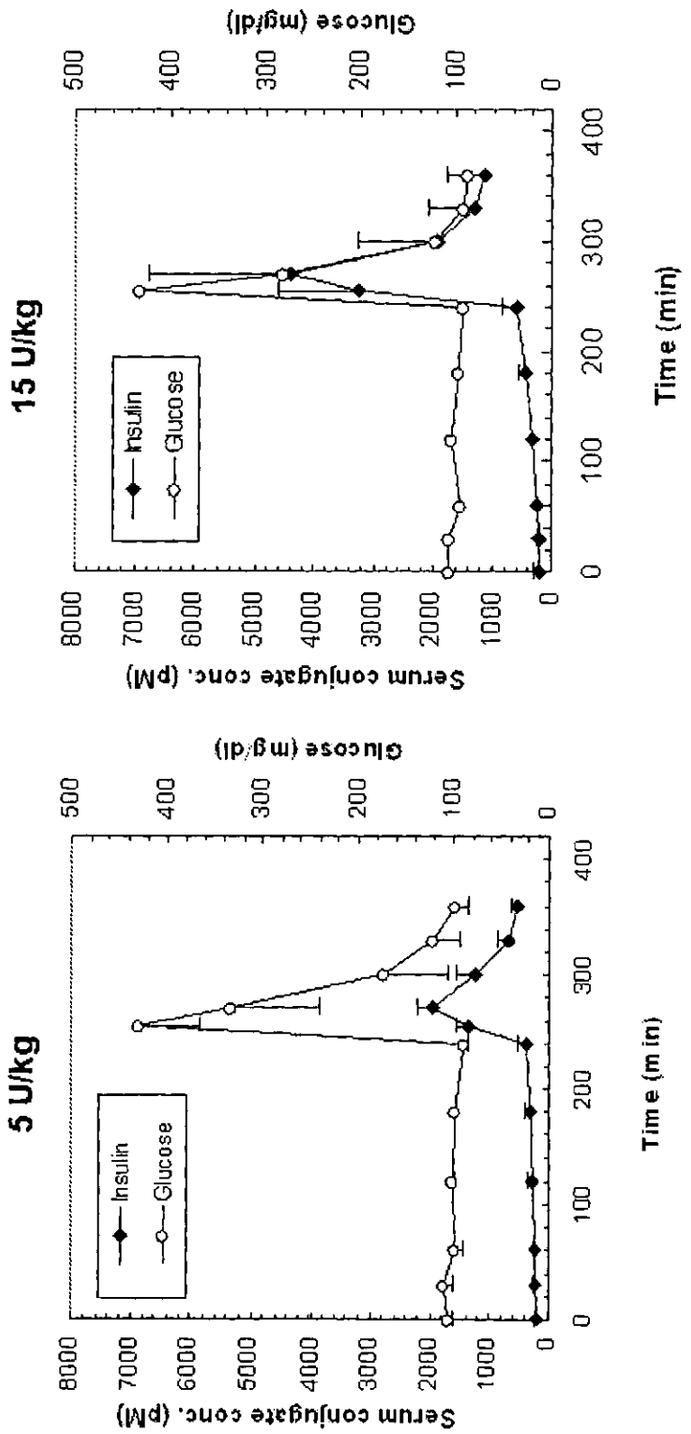

5 U/kg
15 U/kg
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
100
200
300
400
500

Figure 17

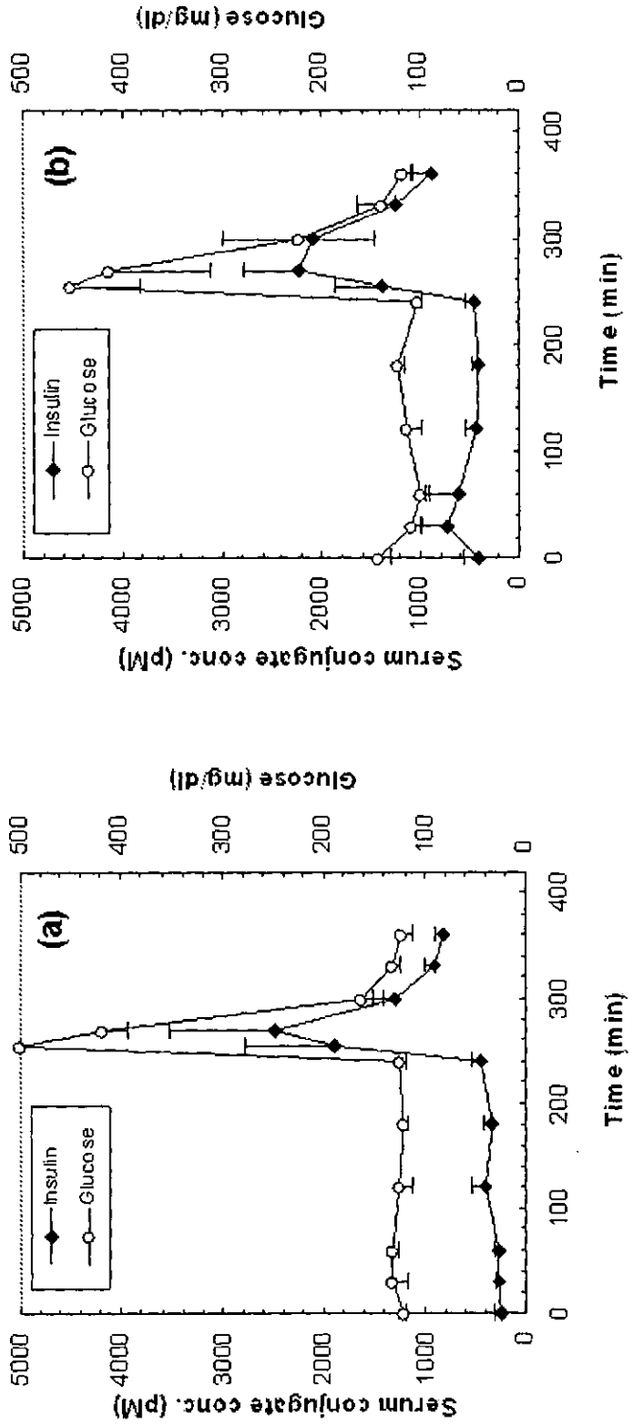

(a)
(b)
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
100
200
300
400
500

Figure 18

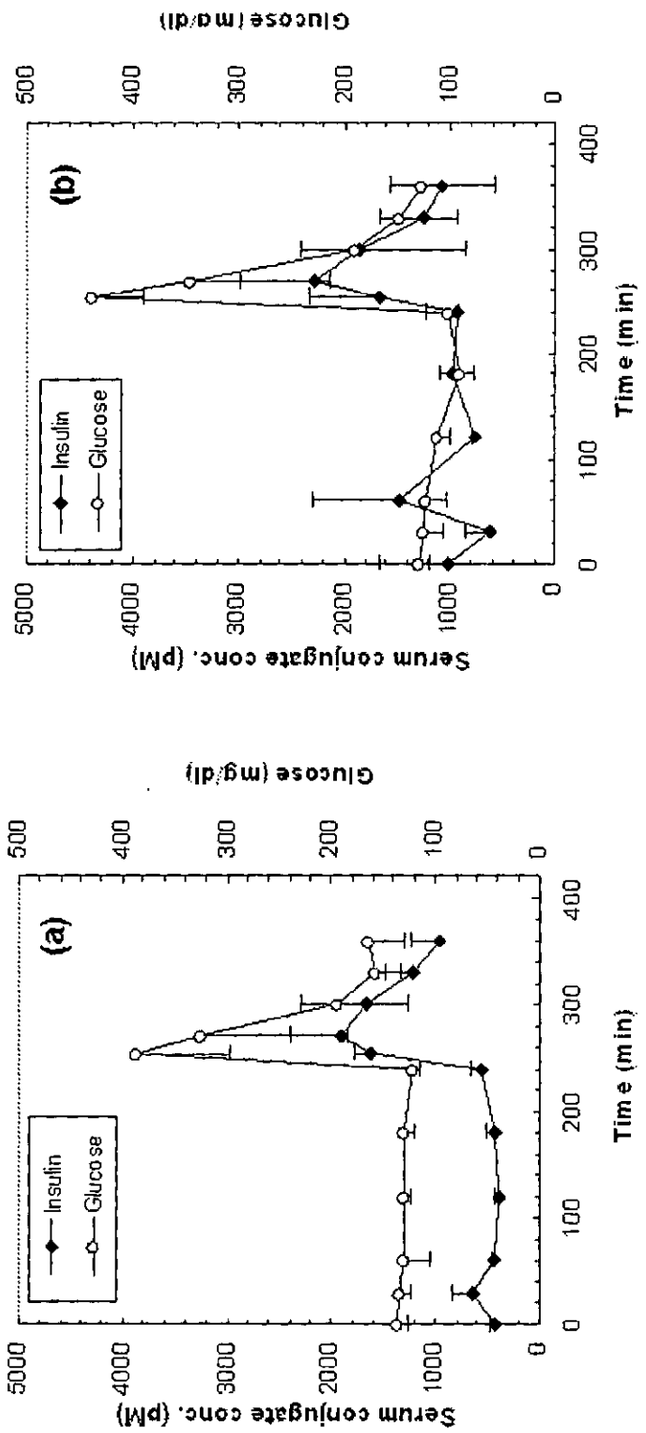

(a)
(b)
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
100
200
300
400
500

Figure 19

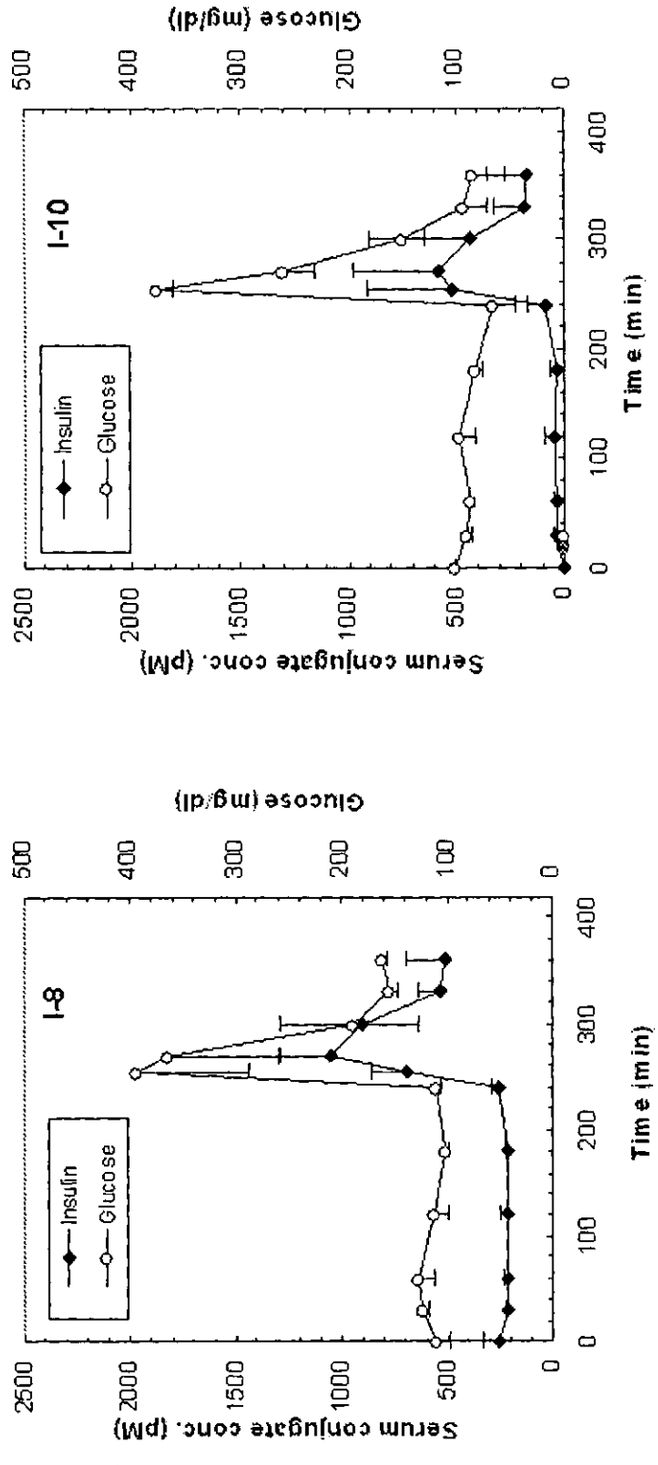

I-10
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
I-8
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)

Figure 20

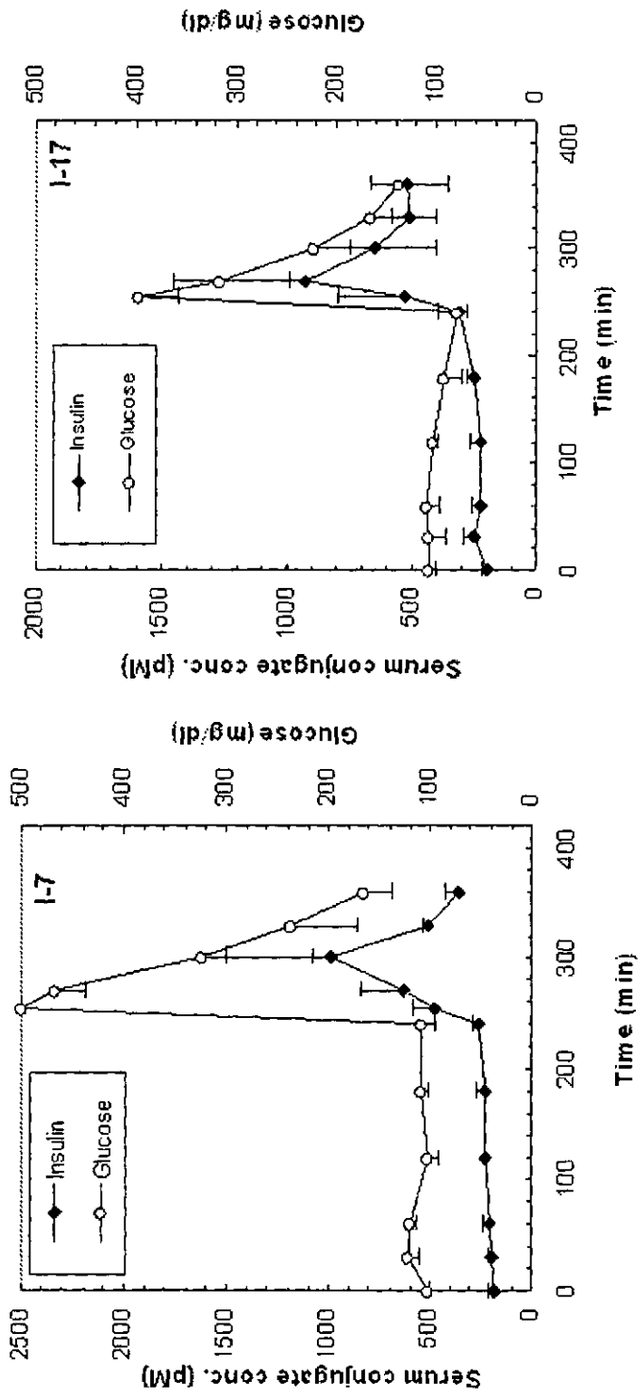


Figure 20 (continued)

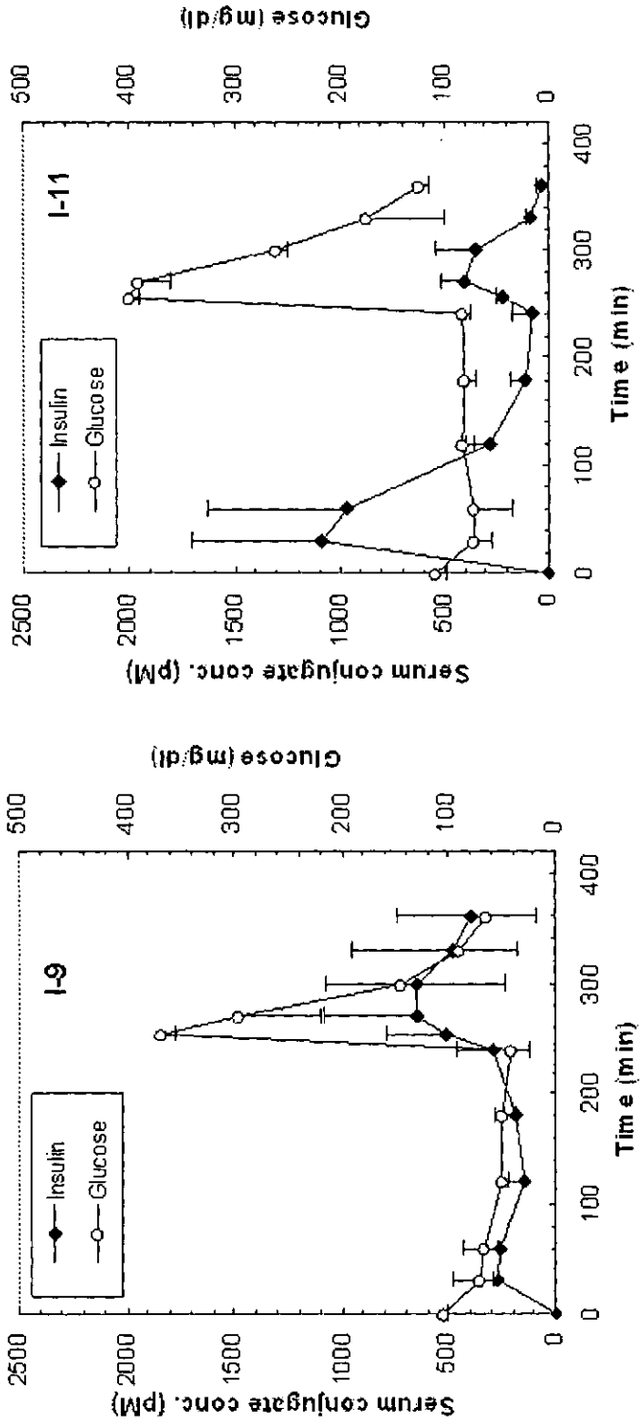


Figure 20 (continued)

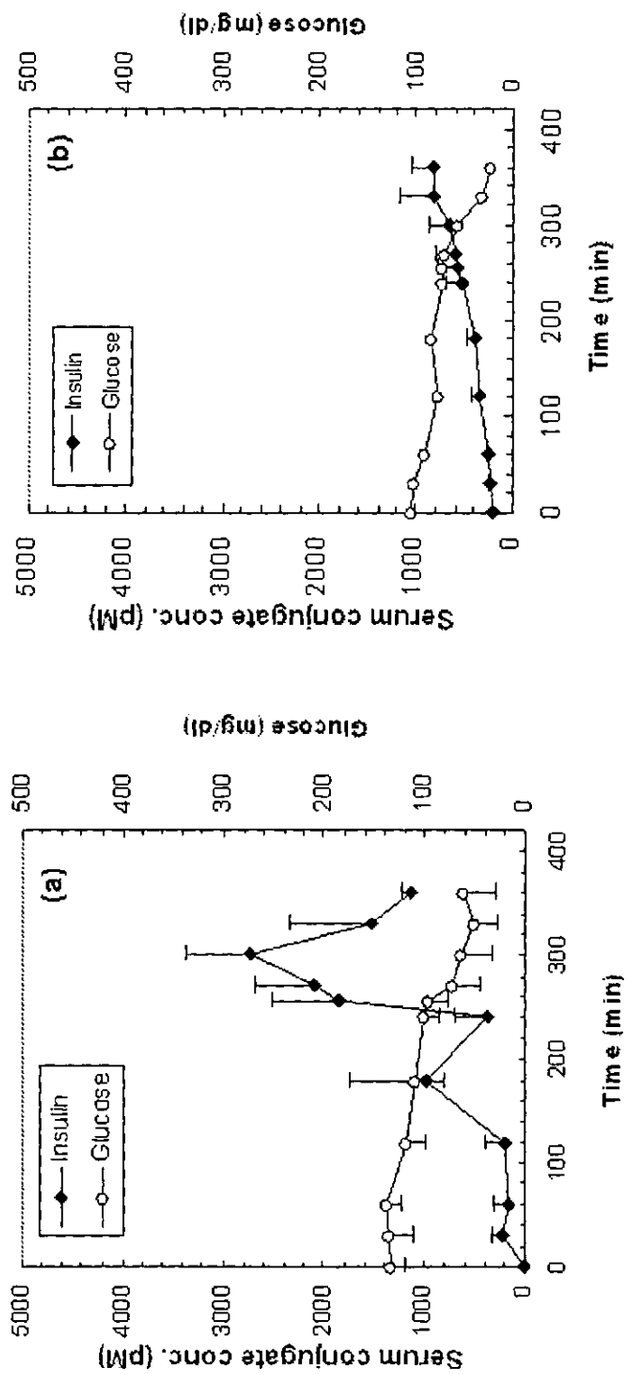
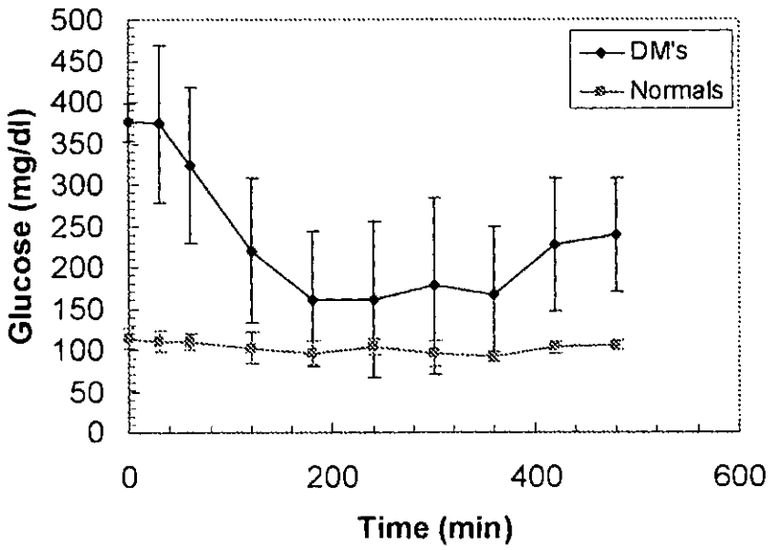

(a)
(b)
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
100
200
300
400
500

Figure 21

5 U/kg



10 U/kg

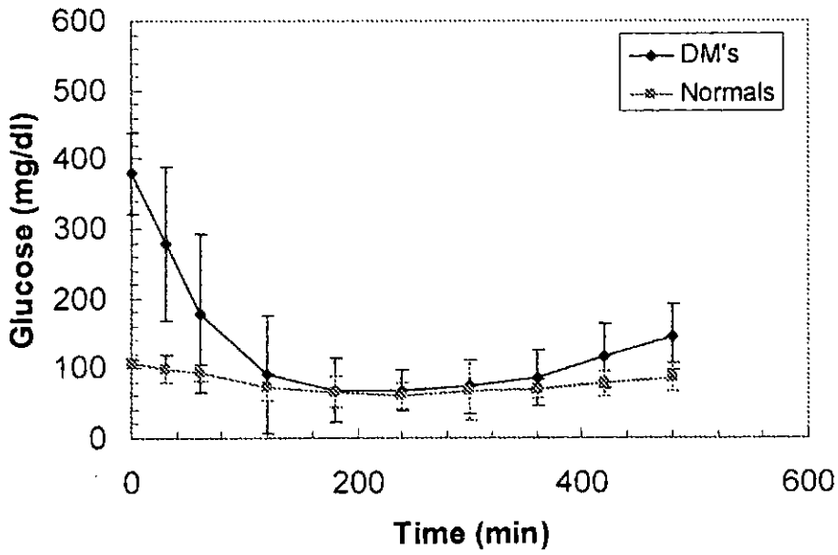


Figure 22

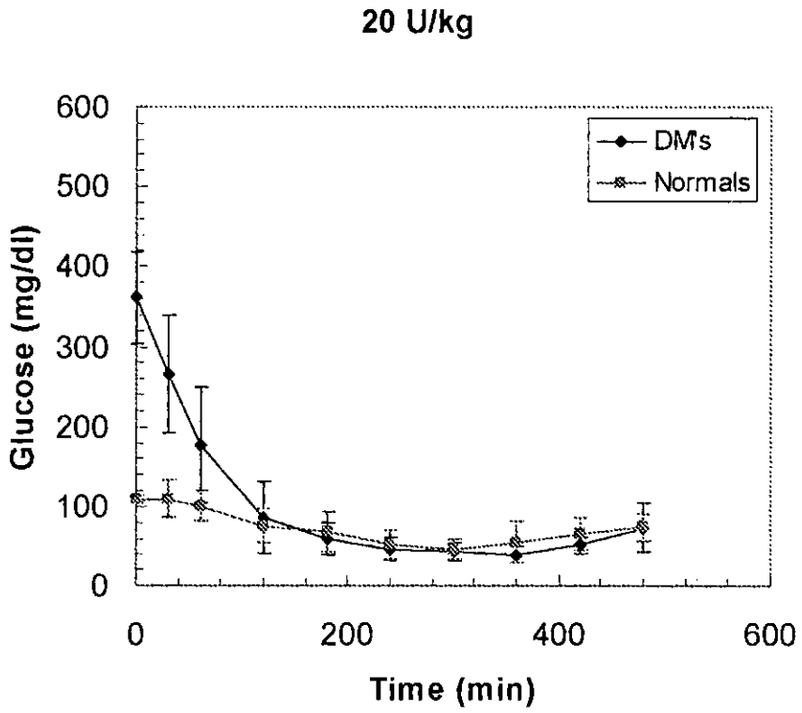


Figure 22 (continued)

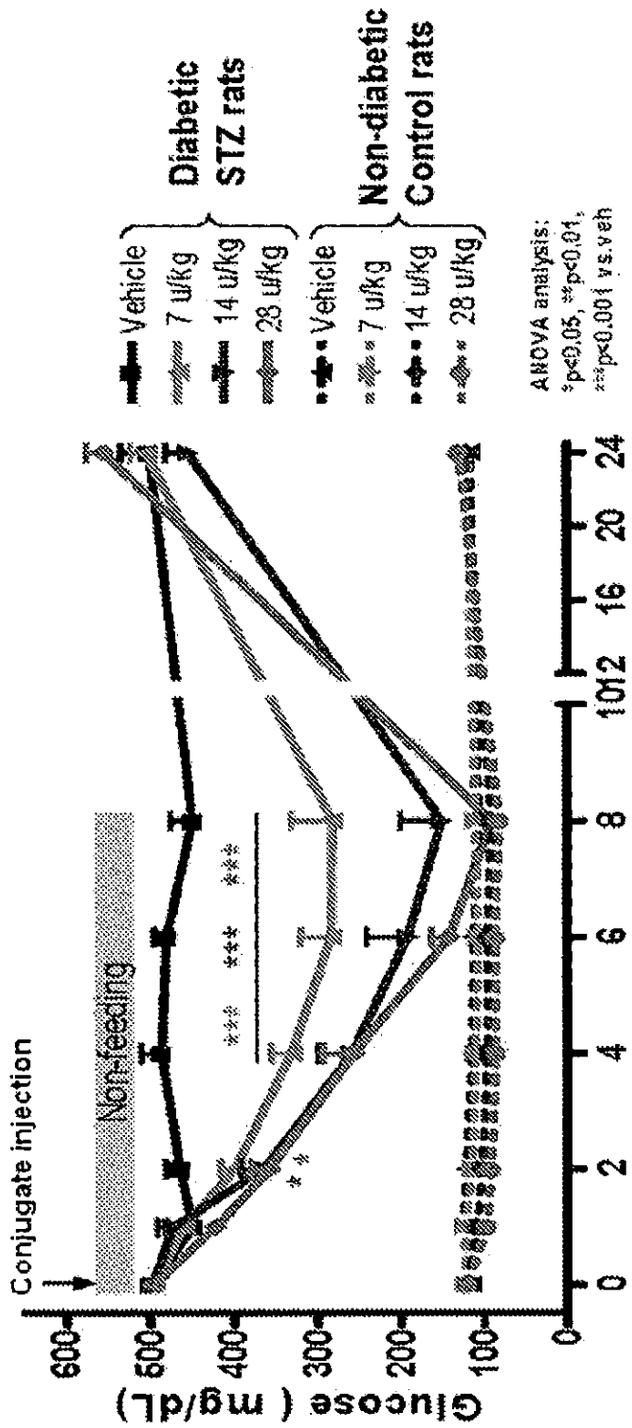

Conjugate injection
Non-feeding
Glucose (mg/dL)
600
500
400
300
200
100
0
2
4
6
8
10
12
16
20
24
Time (hour)
Vehicle
7 u/kg
14 u/kg
28 u/kg
Diabetic STZ rats
Vehicle
7 u/kg
14 u/kg
28 u/kg
Non-diabetic Control rats
ANOVA analysis:
*p<0.05, **p<0.01,
***p<0.001 vs.veh

Figure 23

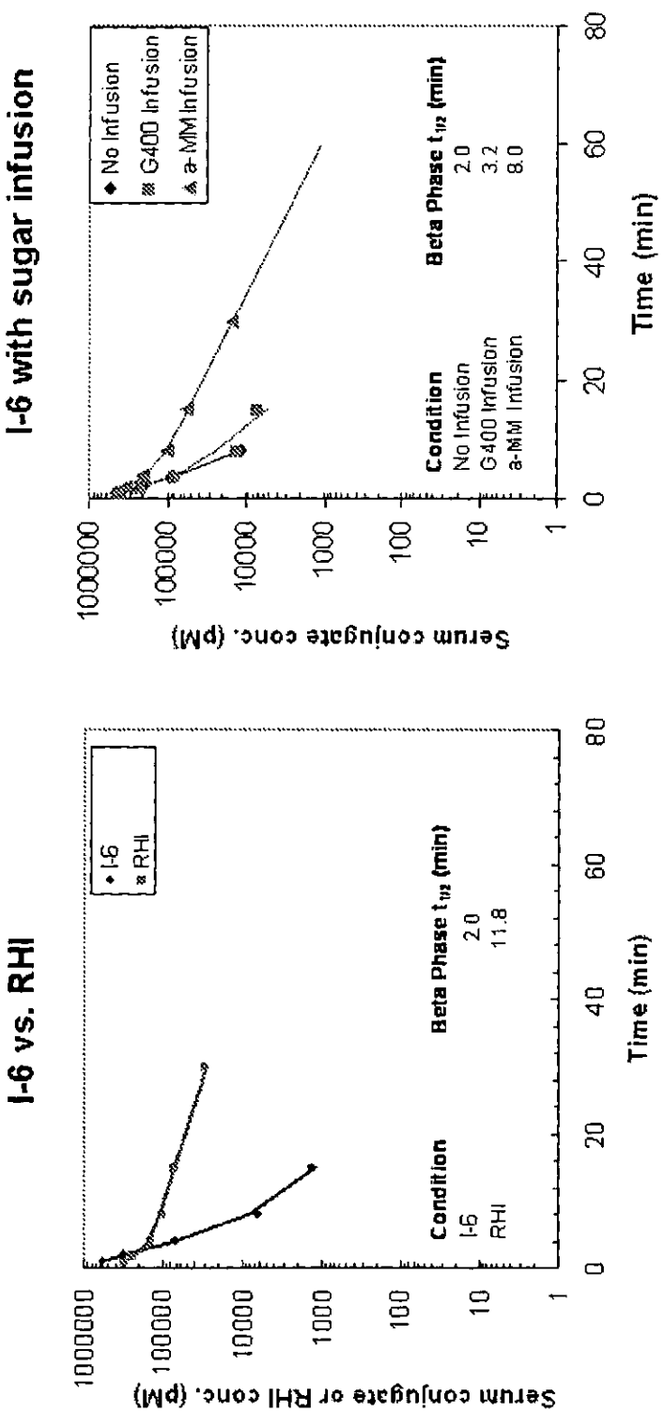

I-6 with sugar infusion
Serum conjugate conc. (pM)
Time (min)
No Infusion
G400 Infusion
a-MM Infusion
Condition
Beta Phase t1/2 (min)
No Infusion 2.0
G400 Infusion 3.2
a-MM Infusion 8.0
I-6 vs. RHI
Serum conjugate or RHI conc. (pM)
Time (min)
I-6
RHI
Condition
Beta Phase t1/2 (min)
I-6 2.0
RHI 11.8

Figure 24

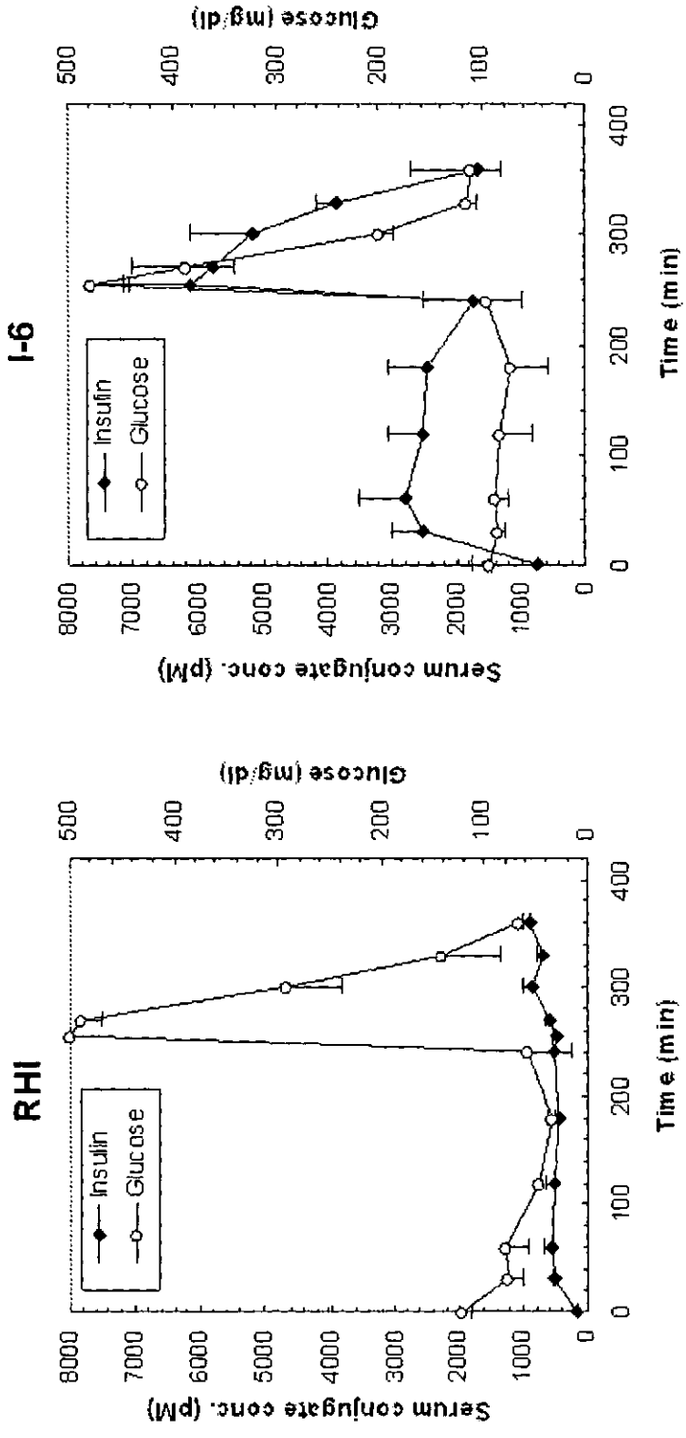

RHI
I-6
Insulin
Glucose
Serum conjugate conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
100
200
300
400
500

Figure 25

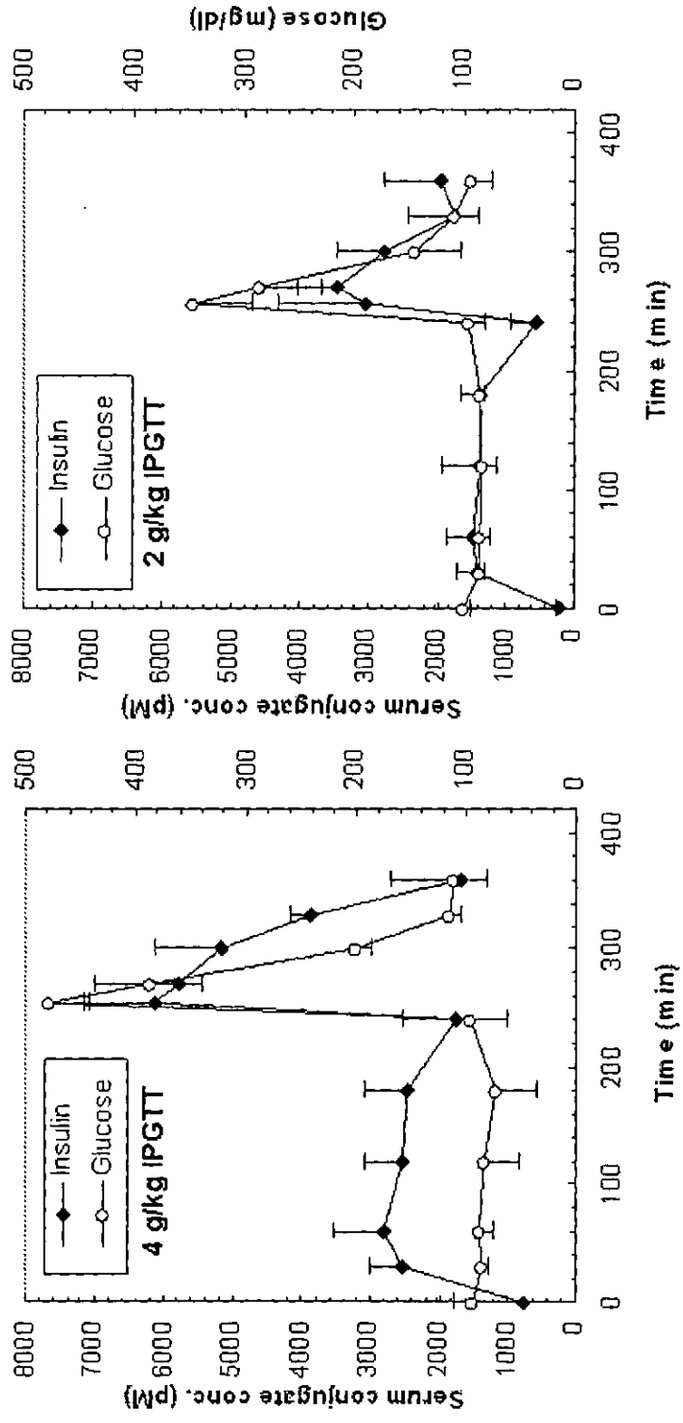


Figure 25 (continued)

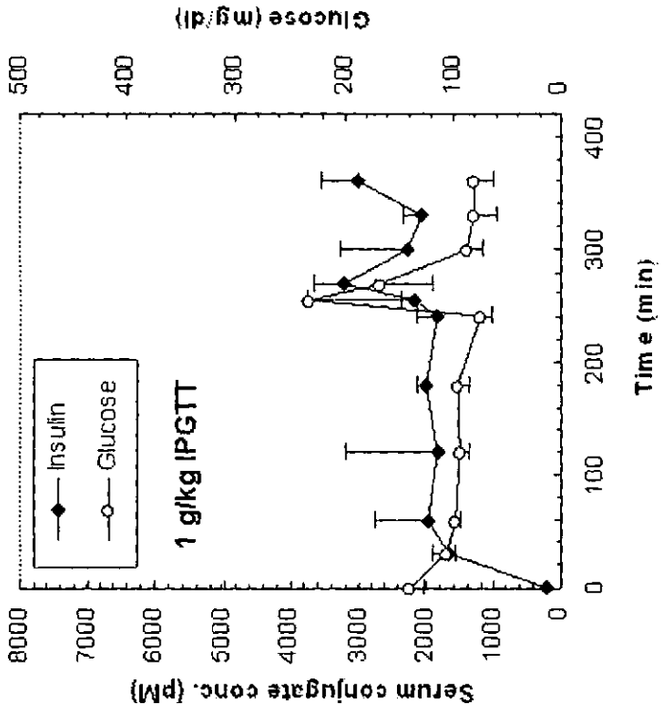
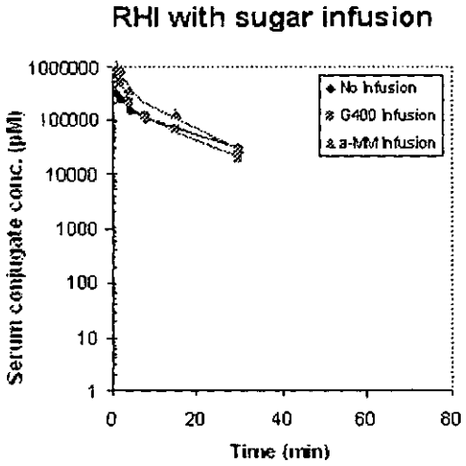
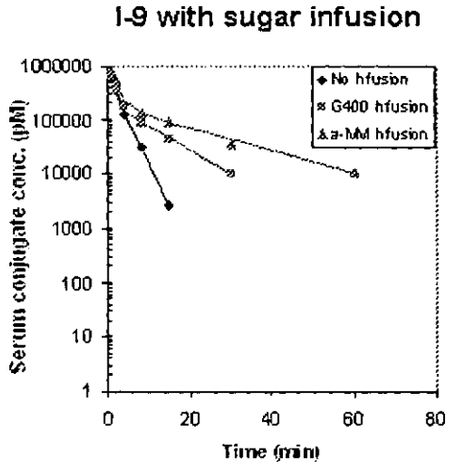


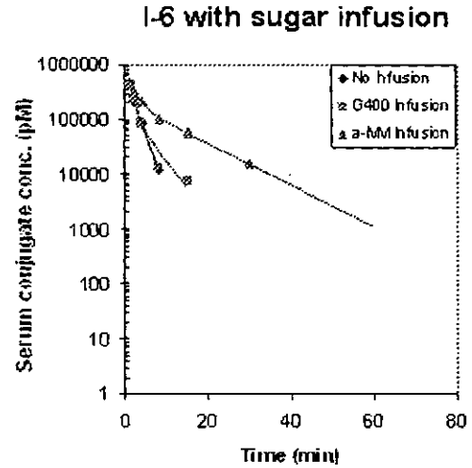
Figure 25 (continued)



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 26

Buffer	Score
1. 0.1 M Citric acid pH 3.5, 2.0 M Ammonium sulfate	3
2. 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5, 2.0 M Ammonium sulfate	4
3. 0.1 M BIS-TRIS pH 5.5, 2.0 M Ammonium sulfate	1
4. 0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 2.0 M Ammonium sulfate	3
5. 0.1 M HEPES pH 7.5, 2.0 M Ammonium sulfate	3
6. 0.1 M Tris pH 8.5, 2.0 M Ammonium sulfate	3
7. 0.1 M Citric acid pH 3.5, 3.0 M Sodium chloride	1
8. 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5, 3.0 M Sodium chloride	1
9. 0.1 M BIS-TRIS pH 5.5, 3.0 M Sodium chloride	1
10. 0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 3.0 M Sodium chloride	1
11. 0.1 M HEPES pH 7.5, 3.0 M Sodium chloride	8
12. 0.1 M Tris pH 8.5, 3.0 M Sodium chloride	1
13. 0.1 M BIS-TRIS pH 5.5, 0.3 M Magnesium formate dihydrate	1
14. 0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 0.5 M Magnesium formate dihydrate	1
15. 0.1 M HEPES pH 7.5, 0.5 M Magnesium formate dihydrate	8
16. 0.1 M Tris pH 8.5, 0.3 M Magnesium formate dihydrate	1
17. 1.26 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, 0.14 M Potassium phosphate dibasic, pH 5.6	1
18. 0.49 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, 0.91 M Potassium phosphate dibasic, pH 6.9	1
19. 0.056 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, 1.344 M Potassium phosphate dibasic, pH 8.2	8
20. 0.1 M HEPES pH 7.5, 1.4 M Sodium citrate tribasic dihydrate	3
21. 1.8 M Ammonium citrate tribasic pH 7.0	3
22. 0.8 M Succinic acid pH 7.0	1
23. 2.1 M DL-Malic acid pH 7.0	3
24. 2.8 M Sodium acetate trihydrate pH 7.0	1
25. 3.5 M Sodium formate pH 7.0	1
26. 1.1 M Ammonium tartrate dibasic pH 7.0	3
27. 2.4 M Sodium malonate pH 7.0	1
28. 35% v/v Tacsimate pH 7.0	3
29. 60% v/v Tacsimate pH 7.0	1

Legend:

1	Clear drop	5	Posettes or Spherulites
2	Phase separation	6	Needles (1D growth)
3	Regular granular precipitate	7	Plates (2D growth)
4	Birefringent Precipitate or Microcrystals	8	Single crystals (3D growth < 0.2 mm)
		9	Single crystals (3D growth > 0.2 mm)

Figure 27

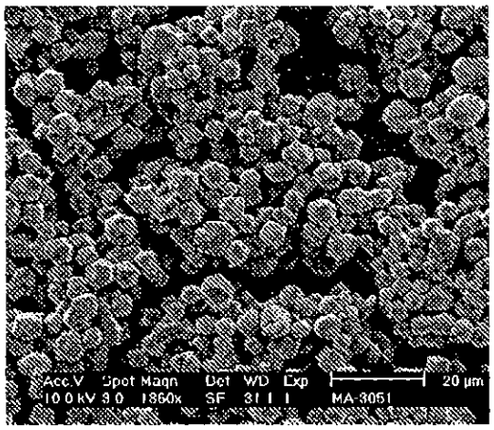
Buffer	Score
30. 0.1 M Sodium chloride, 0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 1.5 M Ammonium sulfate	1
31. 0.8 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate, 0.1 M Tris pH 8.5, 0.5% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000	1→3
32. 1.0 M Ammonium sulfate, 0.1 M BIS-TRIS pH 5.5, 1% w/v Polyethylene glycol 3,350	4
33. 1.1 M Sodium malonate pH 7.0, 0.1 M HEPES pH 7.0, 0.5% v/v Jeffamine ED-2001® pH 7.0	1
34. 1.0 M Succinic acid pH 7.0, 0.1 M HEPES pH 7.0, 1% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000	1
35. 1.0 M Ammonium sulfate, 0.1 M HEPES pH 7.0, 0.5% w/v Polyethylene glycol 8,000	1
36. 15% v/v Tacsimate pH 7.0, 0.1 M HEPES pH 7.0, 2% w/v Polyethylene glycol 3,350	1
37. 25% w/v Polyethylene glycol 1,500	3
38. 0.1 M HEPES pH 7.0, 30% v/v Jeffamine M-600® pH 7.0	7
39. 0.1 M HEPES pH 7.0, 30% v/v Jeffamine ED-2001 ® pH 7.0	1
40. 0.1 M Citric acid pH 3.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350	6
41. 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350	3
42. 0.1 M BIS-TRIS pH 5.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350	3/5
43. 0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350	1
44. 0.1 M HEPES pH 7.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350	1
45. 0.1 M Tris pH 8.5, 25% w/v Polyethylene glycol 3,350	1
46. 0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 20% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000	1
47. 0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 28% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000	1
48. 0.2 M Calcium chloride dihydrate, 0.1 M BIS-TRIS pH 5.5, 45% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol	1

Legend:

1	Clear drop	5	Posettes or Spherulites
2	Phase separation	6	Needles (1D growth)
3	Regular granular precipitate	7	Plates (2D growth)
4	Birefringent Precipitate or Microcrystals	8	Single crystals (3D growth < 0.2 mm)
		9	Single crystals (3D growth > 0.2 mm)

Figure 27 (continued)

TSAT-C_6-AETM-2 (B29)



TSAT-C_6-AEM-2 (B29)

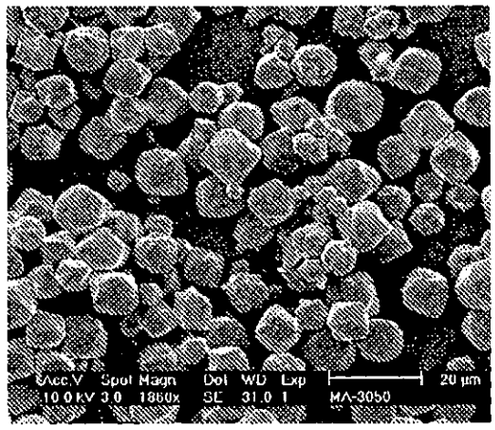


Figure 28

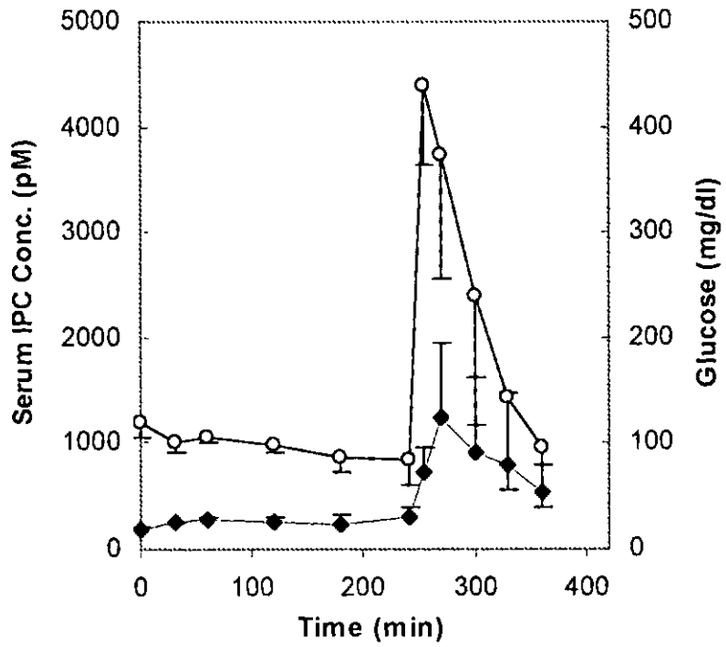

5000
4000
3000
2000
1000
0
Serum IPC Conc. (pM)
500
400
300
200
100
0
Glucose (mg/dl)
0
100
200
300
400
Time (min)

Figure 30

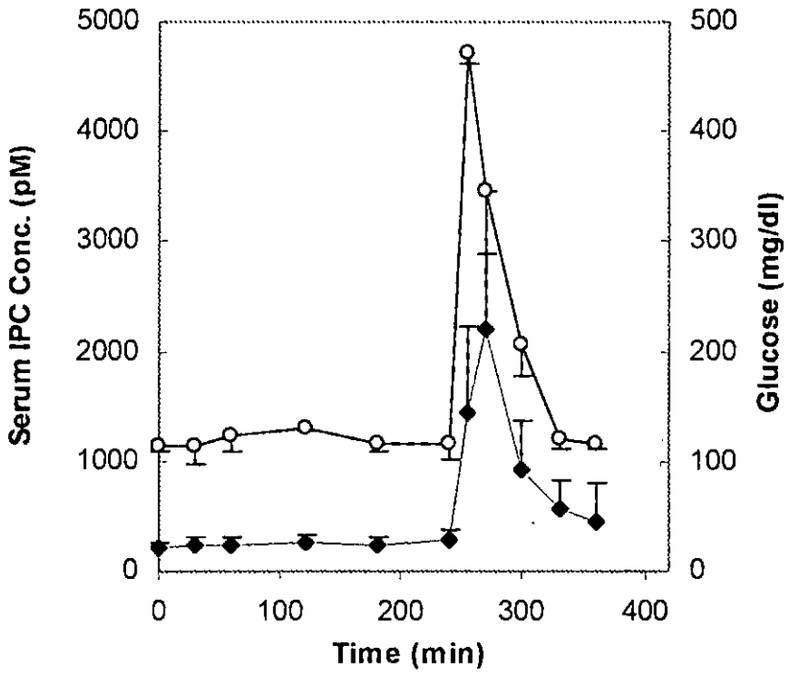

5000
4000
3000
2000
1000
0
Serum IPC Conc. (pM)
500
400
300
200
100
0
Glucose (mg/dl)
0
100
200
300
400
Time (min)

Figure 31

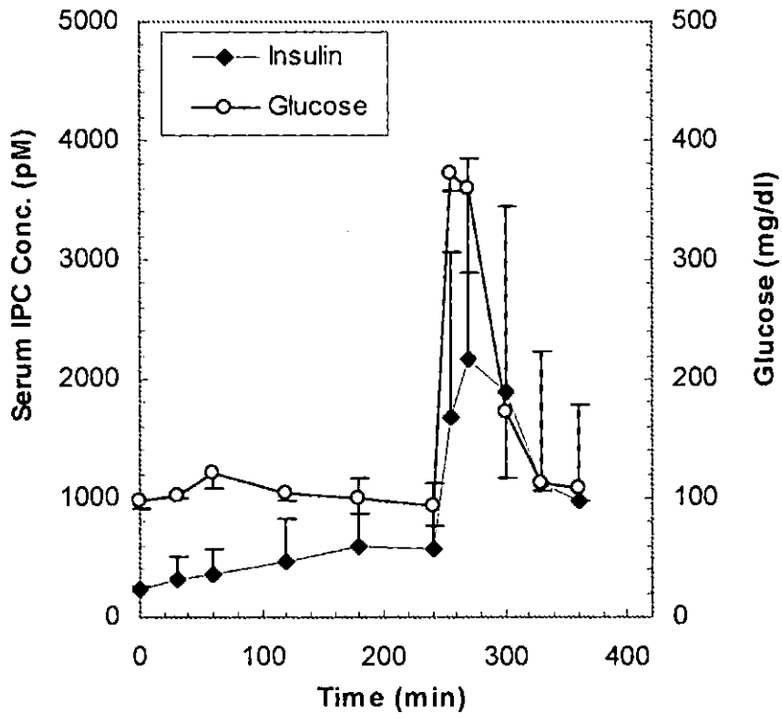

Insulin
Glucose
Serum IPC Conc. (pM)
Glucose (mg/dl)
Time (min)
5000
4000
3000
2000
1000
0
500
400
300
200
100
0
0
100
200
300
400

Figure 32

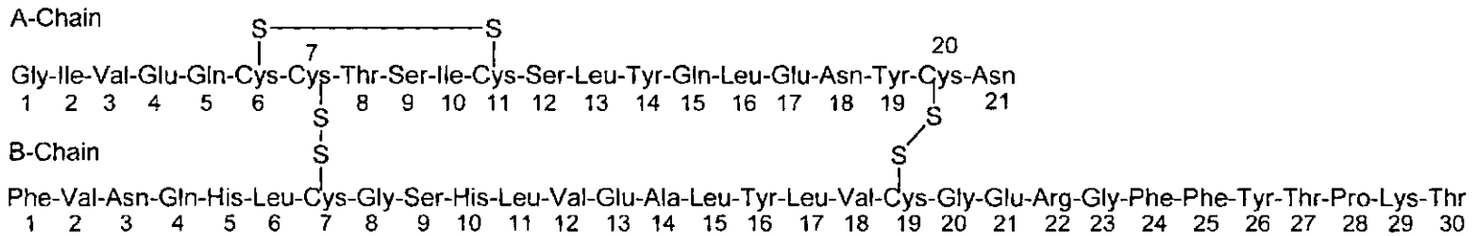

A-Chain
S
S
7
20
Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn
1 2 3 4 5 6 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 21
S
S
S
S
B-Chain
Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

Figure 33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 10/22277

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C07K 14/62, A61K 38/28 (2010.01)
USPC - 514/3; 530/303
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) C07K 14/62, A61K 38/28 (2010.01)
USPC-514/3; 530/303

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC-514/12

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWEST(PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB); Google Patents; Google Scholar
glucose, responsive, controlled release, insulin, conjugate, crosslinked, Zion, chain terminator, lectin, concanavalin a, diabetic, affinity, ligand, competitive, triaminobenzene, triamidobenzene, amidoamine, polylysine, propanamide, dendrimer

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 2006/0019874 A1 (RHADHAKRISHNAN et al.) 26 January 2006 (26.01.2006) (para [0067], [0082], [0471]-[0487], [0511])	51-77, 81, and 83 --- 1-26, 45, 46, 78-80, 82, 84, and 85
X --- Y	US 2006/0216265 A1 (GOODMAN et al.) 28 September 2006 (28.09.2006) (para [0019], [0116], [0145], [0201], [0215], [0227], [0263],)	47-50 --- 1-26, 45, 46, 82, and 84
Y	US 5,527,524 A (TOMALIA et al.) 18 June 1996 (18.06.1996) ((col 1 ln 35-50; col 4 ln 25-30; col 5 ln 50-55; col 18 ln 25)	6-13, 45, 78-80, and 85

☐ 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
18 March 2010 (18.03.2010)	12 APR 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 10/22277

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.: 27-44 and 86-168
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:

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.:

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.

SEQUENCE LISTING

<110> Lancaster, Thomas M.
Zion, Todd C.

<120> Crystalline Insulin-Conjugates

<130> 2005700-0032

<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

CONJUGADOS DE INSULINA CRISTALINA

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 de 2009, Solicitud Provisional estadounidense No. 61/163.084 presentada el 25 de marzo de 2009, Solicitud Provisional estadounidense No. 61/219.896, presentada el 24 de junio 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 liberación farmacológica de "liberación controlada" conocidos en el estado de la técnica anterior (ej., Patente estadounidense No. 4.145.410 de Sears la cual describe la liberación farmacológica desde cápsulas que son enzimáticamente lábiles) no pueden suministrar fármacos a un paciente en intervalos y concentraciones que estén 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 liberación 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 liberación lenta no controlada de insulina es indeseable. En realidad, es evidente 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

liberación 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 Americana 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 anafilaxis. Además, las lectinas vegetales son conocidas por 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 liberación. 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 liberación farmacológica que también requiera que moléculas de glucosa se difundan libremente hacia dentro y hacia fuera del dispositivo.

Los riesgos y dificultades que están involucrados con estos y otros usos de lectinas in vivo podrían disminuirse significativamente si pudiera proporcionarse un sistema de liberación controlada de fármacos que no requiera lectinas.

RESUMEN

En un aspecto, la divulgación proporciona métodos para controlar los perfiles farmacocinéticos (PK) y/o farmacodinámicos (PD) de insulina de una forma que es sensible a las concentraciones sistémicas de un sacárido tal como la glucosa. Como se discute en los Ejemplos, se descubrió que cuando la insulina fuera conjugada con ligandos sacáridos de alta afinidad, pudo hacerse para 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.

Las formulaciones de liberación sostenida de insulinas convencionales comúnmente se utilizan para retardar la liberación de insulina en circulación sistémica. Por ejemplo, las formulaciones PZI (insulina de protamina de zinc) pueden utilizarse para este propósito. Cuando se formulan insulinas convencionales con protamina y zinc, generalmente se producen formulaciones de liberación sostenida cristalinas. Por el contrario, cuando se formulan los conjugados de insulina descritos en la presente con protamina y zinc utilizando métodos similares, se producen formulaciones amorfas, y se requiere mucha más protamina y zinc para proporcionar liberación sostenida que la requerida para insulinas convencionales, ej. RHI (insulina humana recombinante). Sorprendentemente se ha descubierto que ciertos conjugados de insulina descritos en la presente pueden cristalizarse. Los conjugados de insulina son difíciles de cristalizar utilizando condiciones estándares de cristalización de insulina, más probablemente debido a sus estructuras estéricamente voluminosas que contienen sacáridos. Como se describió en la presente, los conjugados de insulina cristalina de la presente divulgación pueden entonces formularse para proporcionar formulaciones de liberación sostenida cristalinas. La presente divulgación proporciona conjugados de insulina cristalina y formulaciones de los mismos. También se proporcionan métodos para fabricar y utilizar conjugados de insulina cristalina. Las formulaciones cristalinas de los conjugados de insulina pueden ser ventajosas para mejorar reproducibilidad de lote en lote, aumentando estabilidad de la formulación, y disminuyendo la aglomeración de partículas durante largos periodos de almacenamiento.

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 versión, 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 - $C(=O)R^{X1}$, - $C(=O)OR^{X1}$, - C(=O)- O- $C(=O)R^{X1}$, - $C(=O)SR^{X1}$, - $C(=O)N(R^{X1})_2$, - $C(=S)R^{X1}$, - $C(=S)N(R^{X1})_2$, 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 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 hidrocarburos bivalentes - Como se utiliza en la presente, el término "cadena de hidrocarburos bivalentes" (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 hidrocarburos bivalentes sustituidos 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, éster, 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 flúor (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 de intervención, 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 de intervención), 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 independientemente 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^τ, - NR^τ_2, - C(O)R^τ, - C(O)OR^τ, - C(O)C(O)R^τ, - $C(O)CH_2C(O)R^\tau$, - $S(O)_2R^\tau$, - $S(O)_2NR^\tau_2$, - C(S)NR^τ_2, - C(NH)NR^τ_2, o - $N(R^\tau)S(O)_2R^\tau$; en donde cada R^τ 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^τ, tomadas junto con sus átomos de intervención 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 nitrógeno, oxigeno, o azufre.

Sustituyentes apropiados sobre el grupo alifático de R^τ son independientemente halógeno, - $R^\bullet$, - (halo$R^\bullet$), - OH, - $OR^\bullet$, - O(halo$R^\bullet$), - 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- 10,10,10,10-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 1,1-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* '-metoxifenilazo)bencilo, carbamato de 1- metilciclobutilo, carbamato de 1- metilciclohexilo, carbamato de 1- metil- 1- ciclopropilmetilo, carbamato de 1- metil- 1- (3,5- dimetoxifenil)etiilo, 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 1,3- dimetil- 1,3,5- triazaciclohexan- 2-ona, 5- sustituido 1,3- dibenzil- 1,3,5- triazaciclohexan- 2- ona, 1- sustituido 3,5- dinitro- 4-piridona, N- metilamina, N- alilamina, N- [2- (trimetilsilil)etoxi]metilamina (SEM), N- 3-acetoxipropilamina, N- (1- 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- 1,1- 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- 1-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, 1- [(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- 1- 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- 1- il)bis(4',4"- dimetoxifenil)metilo, 1,1- bis(4- metoxifenil)- 1'- pirenilmetilo, 9- antrilo, 9- (9- fenil)xantenilo, 9- (9- fenil- 10- oxo)antrilo, 1,3- 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(1,1- 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 l,3- (l,l,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.

Biomolécula - Como se utiliza en la presente, el término "biomolécula" se refiere a moléculas (ej., polipéptidos, aminoácidos, polinucleotidos, nucleotidos, polisacaridos, azúcares, lipidos, 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 pequeñasque 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 muscle contractants 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 *the United States Pharmacopeia*- 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 dendrimérica). 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 juntar 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.

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 DESCRIPCIONDE LAS ILUSTRACIONES

Figura 1: Estructuras químicas de estructuras y ligados de conjugados de insulina de ejemplo.

Figura 2: Estructuras de conjugados de insulina B29 de ejemplo. Como se describió en los Ejemplos, estos conjugados se prepararon cada uno con insulina humana recombinante tipo silvestre (ver Figura 33 para la estructura de insulina humana tipo silvestre). El símbolo "insulina" dentro del ovalo como se muestra en la Figura 2 por lo tanto pretende representar una insulina humana tipo silvestre. Como se discutió en la presente, se debe entender que la presente divulgación también comprende entre otras versiones de estos y otros conjugados que incluyen una molécula de insulina diferente de la insulina humana tipo silvestre.

Figura 3: Representación de (♦) insulina en suero y (O) niveles de glucosa en sangre después de inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas en tiempo 0 con conjugado 1-7 (5 U/kg). Los datos representan la media y desviación estándar para n = 3 ratas.

Figura 4: Representación de insulina en suero y niveles de glucosa en sangre después de inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n=3) en tiempo 0 con conjugado 1- 7 seguido por inyección IP de alfa- metil manosa (izquierda) o solución salina (derecha) después de 15 minutos.

Figura 5: Representación de insulina en suero y niveles de glucosa en sangre después de inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n=3) en tiempo 0 con conjugado 1- 5 seguido por inyección IP de alfa- metil manosa (izquierda) o solución salina (derecha) después de 15 minutos.

Figura 6: Representación de insulina en suero y niveles de glucosa en sangre después de inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n=3) en tiempo 0 con conjugado 1- 8 seguido por inyección IP de alfa- metil manosa (izquierda) o solución salina (derecha) después de 15 minutos.

Figura 7: Representación de insulina en suero y niveles de glucosa en sangre después de inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n=3) en tiempo 0 con conjugado 1- 9

seguido por inyección IP de alfa- metil manosa (izquierda) o solución salina (derecha) después de 15 minutos.

Figura 8: Representación de insulina en suero y niveles de glucosa en sangre después de inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n=3) en tiempo 0 con conjugado 1- 10 seguido por inyección IP de alfa- metil manosa (izquierda) o solución salina (derecha) después de 15 minutos.

Figura 9: Representación de insulina en suero y niveles de glucosa en sangre después de inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n=3) en tiempo 0 con conjugado 1- 11 seguido por inyección IP de alfa- metil manosa (izquierda) o solución salina (derecha) después de 15 minutos.

Figura 10: Representación de concentración de insulina en suero como una función de tiempo para inyecciones intravenosas de 0.4 mg/kg de (♦) RHI y (A) conjugado 1- 6 en ratas macho SD no diabéticas (n=3 por grupo). Datos (promedio de n=3) se ajustan utilizando un modelo bi- exponencial de dos compartimientos.

Figura 11: Representaciones de insulina en suero (♦) y niveles de glucosa en sangre (O) después de inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n=3 por dosis) en tiempo 0 con conjugado 1- 6 de acción prolongada seguido por inyección IP de glucosa (4 g/kg) a 240 minutos. Las formulaciones se prepararon como se describió en el Ejemplo 20: (a) lxP- lxZ, (b) 4xP- 4xZ, y (c) 10xP- 4xZ.

Figura 12: Representaciones de insulina en suero (♦) y niveles de glucosa en sangre (O) después de inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n=3 por dosis) en tiempo 0 con conjugado 1- 6 de acción prolongada seguido por inyección IP de glucosa (4 g/kg) a 240 minutos. Las formulaciones se prepararon como se describió en el Ejemplo 21: (a) 4xP- lxZ y (b) 4xP- 2xZ.

Figura 13: Representaciones de insulina en suero (♦) y niveles de glucosa en sangre (O) después de inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n=3 por dosis) en tiempo 0 con conjugado 1- 6 de acción prolongada seguido por inyección IP de glucosa (4 g/kg) at 240 minutos. Las formulaciones se prepararon como se describió en el Ejemplo 21: (a) lOxP- lxZ y (b) 10xP- 2xZ.

Figura 14: Representaciones de insulina en suero (♦) y niveles de glucosa en sangre (O) después de inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n=3 por dosis) en tiempo 0

con conjugado 1- 6 de acción prolongada seguido por inyección IP de glucosa (4 g/kg) a 240 minutos. Las formulaciones se prepararon como se describió en el Ejemplo 22: (a) sin cresol y (b) 4x cresol.

Figura 15: Representaciones de insulina en suero (♦) y niveles de glucosa en sangre (O) después de inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n=3 por dosis) en tiempo 0 con conjugado 1- 6 de acción prolongada seguido por inyección IP de glucosa (4 g/kg) a 240 minutos. Las formulaciones se prepararon como se describió en el Ejemplo 23: (a) sin sal, (b) 3.3x sal, y (c) glicerol.

Figura 16: Representaciones de insulina en suero (♦) y niveles de glucosa en sangre (O) después de inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n=3 por dosis) en tiempo 0 con conjugado 1- 6 de acción prolongada seguido por inyección IP de glucosa (4 g/kg) a 240 minutos. Las formulaciones se prepararon conteniendo cantidades crecientes de insulina sin modificar como se describió en el Ejemplo 24: (a) 1/24, (b) 1/12, y (c) 1/6.

Figura 17: Representación de insulina en suero (♦) y niveles de glucosa en sangre (O) después de inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n=3 por dosis) en tiempo 0 con un conjugado 1- 6 de acción prolongada preparado según el Ejemplo 25 seguido por inyección IP de glucosa (4 g/kg) a 240 minutos.

Figura 18: Representación de insulina en suero (♦) y niveles de glucosa en sangre (O) después de inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n=3 por dosis) en tiempo 0 con conjugado 1- 6 de acción prolongada preparado según el Ejemplo 26 seguido por inyección IP de glucosa (4 g/kg) a 240 minutos. El material se inyectó después de almacenamiento a 2- 8 °C durante (a) una semana o (b) dos semanas.

Figura 19: Representación de insulina en suero (♦) y niveles de glucosa en sangre (O) después de inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n=3 por dosis) en tiempo 0 con conjugado 1- 6 de acción prolongada preparado según el Ejemplo 26 seguido por inyección IP de glucosa (4 g/kg) a 240 minutos. El material se inyectó después de almacenamiento a temperatura ambiente para (a) una semana o (b) dos semanas.

Figura 20: Representación de insulina en suero (♦) y niveles de glucosa en sangre (O) después de inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n=3 por dosis) en tiempo 0 con formulaciones de conjugado de acción prolongada (1- 8,1- 10,1- 7,1- 17,1- 9,1- 11) preparado según el Ejemplo 27 seguido por inyección IP de glucosa (4 g/kg) a 240 minutos.

Figura 21: Representación de insulina en suero (♦) y niveles de glucosa en sangre (O) después de inyección subcutánea en ratas macho SD no diabéticas (n=3 por dosis) en tiempo 0 con formulaciones de conjugados 1- 6 de acción prolongada (a) y 1- 5 (b) preparados según el Ejemplo 28 seguido por inyección IP de alfa- metil manosa (4 g/kg) a 240 minutos.

Figura 22: Representación de niveles de glucosa en sangre después de inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas (normales) y diabéticas (DMs) en tiempo 0 con conjugado PZI 1- 6. El conjugado se administró a 5, 10 y 20 U/kg. Como se muestra, las ratas SD macho no diabéticas no mostraron ninguna hipoglicemia mientras los niveles de glucosa en ratas SD macho diabéticas mostraron una clara respuesta proporcional a dosis que se prolongó por más de 8 horas a la dosis más alta.

Figura 23: Representación de niveles de glucosa en sangre durante 24 horas después de inyección subcutánea en ratas SD macho no diabéticas (normales) y diabéticas (DMs) en tiempo 0 con conjugado PZI 1- 6. El conjugado se administró a 7, 14 y 28 U/kg.

Figura 24: Representaciones de la concentración de insulina en suero en función del tiempo después de inyección de conjugado 1- 6 o RHI con y sin glucosa o una metil- manosa.

Figura 25: Los dos primeros paneles muestran las representaciones de insulina en suero (♦) y niveles de glucosa en sangre (O) después de infusión intravenosa constante de RHI (3.5 mU/min) o 1- 6 (15 mU/min) en ratas macho SD no diabéticas (n=3). La inyección IP de glucosa (4 g/kg) fue dada a los 240 minutos. Los siguientes tres paneles comparan representaciones de insulina en suero (♦) y niveles de glucosa en sangre (O) después de infusión intravenosa constante de RHI (3.5 mU/min) o 1- 6 (15 mU/min) en ratas macho SD no diabéticas (n=3) cuando una inyección IP de glucosa (4, 2, o 1 g/kg) se administró a 240 minutos.

Figura 26: Representaciones de concentración de insulina en suero en función del tiempo después de inyección de conjugados con y sin glucosa o una metil- manosa. Las ratas fueron infundidas por via intravenosa con una solución de azúcar a t = - 60 min y a lo largo del estudio. Cada conjugado se inyectó a 10 U/kg por via intravenosa en tiempo 0, y las concentraciones séricas del conjugado se midieron.

Figura 27: Soluciones buffer índice para cristalización y resultados de observación visual mediante microscopía.

Figura 28: Micrografías SEM de cristales representativos formados al mezclar Index Buffer 19 con un volumen igual de 2.5 mg/ml de solución de conjugado en agua destilada (izquierda: 1- 6; derecha: 1- 7).

Figura 29: Representación de (♦) concentraciones de insulina- conjugado en suero y (O) niveles de glucosa en sangre en ratas SD macho no diabéticas en ayunas (n=2) como resultado de una inyección sub- Q de 15 U/kg de conjugado 1- 6 dispersión de cristales (no protamina o m-cresol) en tiempo 0 seguido por seguido por un prueba de tolerancia a la glucosa intraperitonea de 4 g/kg (IPGTT) a 240 min. Los niveles de insulina en suero se midieron utilizando una prueba de iso- insulina ELISA. Los datos se presentan como los valores promedio + la desviación estándar.

Figura 30: Representación de (♦) concentraciones de insulina- conjugado en suero y (O) niveles de glucosa en sangre en ratas SD macho no diabéticas en ayunas (n=2) como resultado de una inyección sub- Q de 15 U/kg de conjugado 1- 6 dispersión de cristales que contiene protamina y m- cresol en tiempo 0 seguido por un prueba de tolerancia a la glucosa intraperitonea de 4 g/kg (IPGTT) a 240 min. Los niveles de insulina en suero se midieron utilizando una prueba de iso- insulina ELISA. Los datos se presentan como los valores promedio + la desviación estándar.

Figura 31: Representación de (♦) concentraciones de insulina- conjugado en suero y (O) niveles de glucosa en sangre en ratas SD macho no diabéticas en ayunas (n=3) como resultado de una inyección sub- Q de 15 U/kg de conjugado 1- 7 dispersión de cristales que contiene protamina y m- cresol en tiempo 0 seguido por un prueba de tolerancia a la glucosa intraperitonea de 4 g/kg (IPGTT) a 240 min. Los niveles de insulina en suero se midieron utilizando una prueba de iso- insulina ELISA. Los datos se presentan como los valores promedio + la desviación estándar.

Figura 32: Representación de (♦) concentraciones de insulina- conjugado en suero y (O) niveles de glucosa en sangre en ratas SD macho no diabéticas en ayunas (n=3) como resultado de una inyección sub- Q de 15 U/kg de conjugado 1- 9 dispersión de cristales (envejecido en 1x PBS que contiene protamina y m- cresol) en tiempo 0 seguido por un prueba de tolerancia a la glucosa intraperitonea de 4 g/kg (IPGTT) a 240 min. Los niveles de insulina en suero se midieron utilizando una prueba de iso- insulina ELISA. Los datos se presentan como los valores promedio + la desviación estándar.

Figura 33: Estructura de la insulina humana tipo silvestre.

DESCRIPCION DETALLADA DE LAS DIVERSAS 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 como 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.

Un ejemplo de este tipo de conjugado de la insulina, conocido como 1- 6, se muestra en la Figura 2. El conjugado 1- 6 comprende una estructura sintética discreta de bajo peso molecular (tris- succinimidil (6- aminocaproil)aminotriacetato o TSAT- C6) con dos fracciones sacáridas de aminoetiltrimanosa (AETM). La estructura se conjuga covalentemente a la insulina a través del grupo B29 épsilon- amino (la insulina humana tipo silvestre tiene un residuo de lisina en la posición B29). Como se discutió en los Ejemplos, los conjugados de la insulina tal como 1- 6 exhiben farmacocinética sensible a la glucosa. Como resultado, la disponibilidad y por lo tanto la bioactividad, de los conjugados de la insulina tal como 1- 6 varian en función de los niveles de glucosa endógena. Se han preparado las formulaciones de liberación sostenida de conjugado 1- 6 utilizando protamina y zinc (formulaciones PZI) que proporcionan "liberación" de insulina tanto basal como en bolo a solicitud sin inducir hipoglicemia. Por el contrario, las insulinas convencionales son de acción rápida (ej., RHI) o de acción lenta (ej., Lantus) y no pueden cambiar los perfiles en respuesta a los cambios en niveles de glucosa. En comparación con la insulina convencional en ratas diabéticas y normales, el conjugado 1- 6 muestra una ventana terapéutica sustancialmente mejorada, con un mímino riesgo hipoglicemia a cuatro veces la dosis terapéutica.

Significativamente, nuestros estudios han demostrado que la estructura TSAT- C6 empleado por el conjugado 1.6 no es necesario para la actividad sensible a la glucosa. En efecto, como se muestra en los ejemplos, hemos encontrado que otras estructuras de conjugados de insulina como los representados en las figuras 1 y 2 pueden obtener resultados similares. Nuestros estudios también sugieren que el tipo y la cantidad de azúcares conjugados y, en ciertas situaciones, el punto de la conjugación de la molécula de insulina juega un papel más importante en la modulación de la respuesta de glucosa in vivo.

Sin ánimo de ser limitados por ninguna teoría en particular, se cree que la capacidad de respuesta de la glucosa mostrada por los conjugados como 1- 6 es mediada por la unión de las lectinas endógenas. Por lo tanto, la teoría de que cuando los niveles de glucosa en el cuerpo son bajos, las lectinas endógenas tienen sitios de unión de glucosa disponibles para la unión mediante el conjugado de insulina sintética, esencialmente inactivando la actividad tipo insulina del conjugado. Por el contrario, cuando los niveles de glucosa en el cuerpo son altos, los sitios de unión sobre las lectinas son satisfechos por la glucosa endógena, lo que permite que el conjugado de insulina sintética circule y ejerza su efecto. La figura 1 muestra las afinidades relativas de unión de lectina de cuatro azúcares; AETM une las lectinas con la mayor afinidad de los cuatro azúcares mostrados. Podemos teorizar que la afinidad de unión de lectina de un azúcar en particular es responsable, al menos en parte, por la modulación de la capacidad de respuesta de glucosa in vivo de nuestros conjugados de insulina sintética.

Las formulaciones de liberación sostenida de las insulinas convencionales comúnmente se utilizan para retardar la liberación de la insulina en la circulación sistémica. Por ejemplo, las formulaciones PZI (insulina de protamina de zinc) pueden utilizarse para este propósito. Cuando se formulan insulinas convencionales con protamina y zinc, generalmente se producen formulaciones de liberación sostenida cristalinas. por el contrario, cuando los conjugados de la insulina tal como 1- 6 se formulan con protamina y zinc utilizando métodos similares, se producen formulaciones amórfas, y se requiere mucha más protamina y zinc para proporcionar liberación sostenida que la requerida por unas insulinas convencionales, ej., RHI. Se ha encontrado sorprendentemente que los conjugados de la insulina tal como 1- 6 pueden cristalizarse en ausencia de aditivos tales como protamina o zinc, a diferencia de las insulinas convencionales. Como se describe en la presente, estos conjugados de la insulina cristalinos pueden entonces formularse para proporcionar formulaciones de liberación sostenida cristalinas.

Las formulaciones critalinas de los conjugados de la insulina pueden ser ventajosas para mejorar reproducibilidad por lotes, aumentando la estabilidad de la formulación, y disminuyendo la aglomeración de partículas durante largos periodos de almacenamiento.

Conjugados

En un aspecto, la divulgación proporciona conjugados cristalinos que comprenden una molécula de insulina y un ligando que incluye un primer sacárido. El ligando o ligandos son tales que cuando el conjugado de insulina cristalina se administra a un mamífero al menos una propiedad farmacocinética o farmacodinámica del conjugado es sensible a la concentración en suero de un segundo sacárido. En ciertas realizaciones, las propiedades PK y/o PD del conjugado son sensibles a la concentración en suero de un sacárido endógeno tal como glucosa. En ciertas realizaciones, las propiedades PK y/o PD del conjugado son sensibles a la concentración en suero de un sacárido exógeno , ej., sin limitación, manosa, L- fucosa, glucosamina de N- acetilo y/o manosa de alfa- metilo.

En ciertas realizaciones, el peso molecular del conjugado en ausencia de la insulina es menor de aproximadamente 10.000 Da. Por ejemplo, el peso molecular del conjugado en ausencia de la insulina puede estar en el rango de 250 a 5.000 Da, de 450 a 3.500 Da, de 750 a 2.500 Da, o de 900 a 2.000 Da.

En ciertas realizaciones, el peso molecular del conjugado incluyendo la insulina es menor de aproximadamente 20.000 Da. Por ejemplo, el peso molecular del conjugado incluyendo la insulina puede estar en el rango de 2.000 a 18.000 Da, alrededor de 4.000 a 15.000 Da, de 5.000 a aproximadamente 10.000 Da, o alrededor de 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).

Propiedades PK y PD

En diversas realizaciones, el comportamiento farmacocinético y/o farmacodinámico del conjugado de insulina cristalina 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 conjugado de insulina cristalina es muy diferente cuando se administra al mamífero 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 usa aquí, el término "condiciones de ayuno" significa que la curva de concentración sérica se obtuvo mediante la combinación de datos de cinco o más de individuos no diabéticos en ayuno. 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 programificaciónda 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 puede 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 promedio de residencia en suero (MRT), tiempo promedio 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 euglucémica y la curva de la concentración sérica del conjugado puede ser muy diferente cuando se administra a 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 Tmax, suero Cmax, tiempo promedio de residencia en suero (MRT), tiempo promedio 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 ha de entenderse sin embargo, que la presente exposición 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 curva de concentración sérica de un conjugado es sustancialmente la misma que la curva de concentración sérica de una versión conjugada de la insulina cuando se administra al mamífero en condiciones de hiperglicemia. 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 conjugada de la insulina cuando se administra en ayunas. En ciertas realizaciones, la curva de concentración sérica del conjugado es sustancialmente la misma que la curva de concentración sérica de una versión conjugada de la insulina 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 cualquiera de los parámetros PK mencionados tales como suero Tmax, suero Cmax, AUC, tiempo promedio de permanencia en suero (MRT), tiempo promedio de absorción de suero (MAT) y/o vida media en suero puede ser comparado.

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 comportamiento PD para la insulina se puede observar al comparar el tiempo para alcanzar la concentración mínima de glucosa en sangre (T_{nadir}), la duración en la que el nivel de glucosa en sangre se mantiene por debajo de un cierto porcentaje del valor inicial (por ejemplo, el 70% de inicial valor 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 el suministro 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 cristalina 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.

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 moléculas de insulina se describen a continuación. En ciertas realizaciones, una molécula de insulina se conjuga con un ligando o estructura de conjugados a través del residuo ácido amino Al. En ciertas realizaciones el residuo aminoácido Al 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 pueden 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.

Conjugados de Insulina de Ejemplo

En varias realizaciones, un conjugado de insulina cristalina de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con uno o más ligandos que se seleccionan independientemente del grupo que consiste 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 cristalina de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con uno o más ligandos de aminoetilglucosa (AEG). En ciertas realizaciones, un conjugado de insulina cristalina de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con uno o más ligandos de aminoetilmanosa (AEM). En ciertas realizaciones, un conjugado de insulina cristalina de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con uno o más ligandos de aminoetilbimanosa

(AEBM). En ciertas realizaciones, un conjugado de insulina cristalina de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con uno o más ligandos de aminoetiltrimanosa (AETM). En ciertas realizaciones, un conjugado de insulina cristalina de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con uno o más ligandos de P- aminoetil- N-acetilglucosamina (AEGA) ligandos. En ciertas realizaciones, un conjugado de insulina cristalina de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con uno o más ligandos de aminoetilfucosa (AEF).

En varias realizaciones, un conjugado de insulina cristalina de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con dos o más ligandos diferentes. En algunas realizaciones, un conjugado de insulina cristalina de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con dos ligandos distintos. En otras realizaciones, un conjugado de insulina cristalina de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con tres ligandos distintos. En ciertas realizaciones, los dos o más ligandos distintos de un conjugado de insulina cristalinas son aminoetilglucosa (AEG). En ciertas realizaciones, los dos o más ligandos distintos de un conjugado de insulina cristalina son aminoetilmanosa (AEM). En ciertas realizaciones, los dos o más ligandos distintos de un conjugado de insulina cristalina son aminoetilbimanosa (AEBM). En ciertas realizaciones, los dos o más ligandos distintos de un conjugado de insulina cristalina son aminoetiltrimanosa (AETM). En ciertas realizaciones, los dos o más ligandos distintos de un conjugado de insulina cristalina son P- aminoetil- N-acetilglucosamina (AEGA). En ciertas realizaciones, los dos o más ligandos distintos de un conjugado de insulina cristalina son aminoetilfucosa (AEF).

En varias realizaciones, un conjugado de insulina cristalina de la presente divulgación se compone de dos o más ligandos distintos que se conjugan con una única estructura conjugada que se conjuga también con una molécula de insulina. En algunas realizaciones, los dos o más ligandos distintos y la molécula de insulina de tal conjugado de insulina cristalina se encuentran cada uno en uno ramificación distinta de una única estructura conjugada ramificada. En algunas realizaciones, los dos o más ligandos distintos y la molécula de insulina de un conjugado de insulina cristalina se encuentran cada uno sobre los extremos de ramificaciones distintas de una única estructura conjugada ramificada.

En varias realizaciones, un conjugado de insulina cristalina de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con aminoetilglucosa (AEG). En ciertas

realizaciones, un conjugado de insulina cristalina de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con aminoetilglucosa (AEG) a través del grupo épsilon- amino de Lys^{B29}.

En varias realizaciones, un conjugado de insulina cristalina de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con aminoetilmanosa (AEM). En ciertas realizaciones, un conjugado de insulina cristalina de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con aminoetilmanosa (AEM) a través del grupo épsilon- amino de Lys^{B29}.

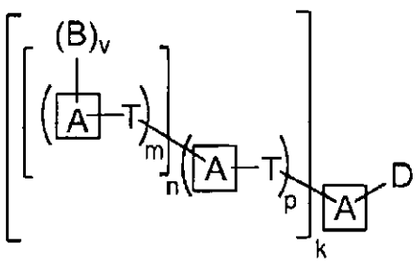
En varias realizaciones, un conjugado de insulina cristalina de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con aminoetilbimanosa (AEBM). En ciertas realizaciones, un conjugado de insulina cristalina de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con aminoetilbimanosa (AEBM) a través del grupo épsilon-amino de Lys^{B29}.

En varias realizaciones, un conjugado de insulina cristalina de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con aminoetiltrimanosa (AETM). En ciertas realizaciones, un conjugado de insulina cristalina de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con aminoetiltrimanosa (AETM) a través del grupo épsilon-amino de LysB29.

En varias realizaciones, un conjugado de insulina cristalina de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con P- aminoetil- N- acetilglucosamina (AEGA). En ciertas realizaciones, un conjugado de insulina cristalina de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con β- aminoetil- N- acetilglucosamina (AEGA) a través del grupo épsilon- amino de Lys^{B29}.

En varias realizaciones, un conjugado de insulina cristalina de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con aminoetilfucosa (AEF). En ciertas realizaciones, un conjugado de insulina cristalina de la presente divulgación comprende una molécula de insulina conjugada con aminoetilfucosa (AEF) a través del grupo épsilon- amino de Lys^{B29}.

Estructuras de conjugados



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 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 que incluye un sacárido;

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^I;

W^I es una molécula de insulina;

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^1;

k es un entero entre 1 y 12, 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

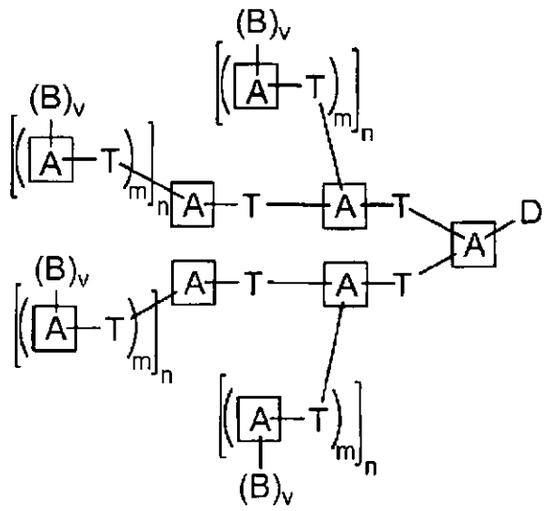
cada ocurrencia de m es independientemente un entero entre 1 y 5, inclusive; y

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 una ocurrencia de v es ≥ 1.

Se debe entender que la 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 $k < 5$ se apreciará que las posiciones abiertas sobre el anillo arilo C_6 incluyen un hidrógeno.

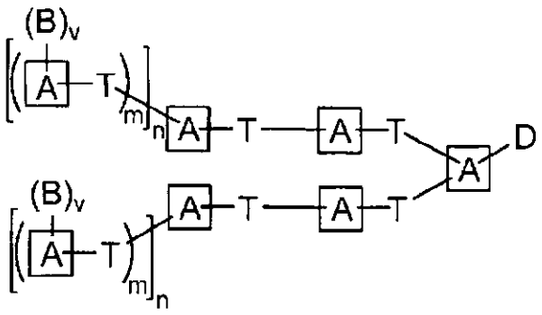
En general, se apreciará que cada ocurrencia de [A] representa un nodo ramificador potencial y que el número de ramificaciones en cada nodo se determina por los valores de k para [A] central y n para ocurrencias no centrales de [A]. Un experto podrá apreciar que debido a que cada aparición de n puede 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):



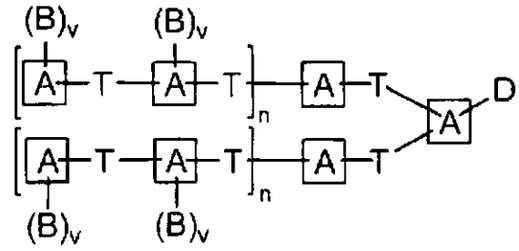
Ia

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):



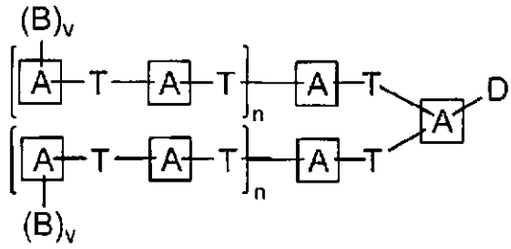
Ib

En ciertas realizaciones, cada ocurrencia de [A] en una fracción m entre corchetes es sustituida por un número de fracciones B que corresponde al valor de $v \geq 1$. Por ejemplo, cuando $k = 2$, cada ocurrencia de $p = 1$, y cada ocurrencia de $m = 2$, el conjugado puede ser de la fórmula (Ic):



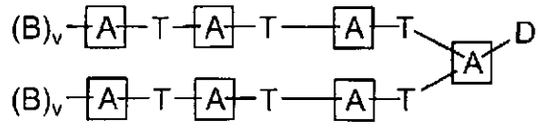
Ic

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):



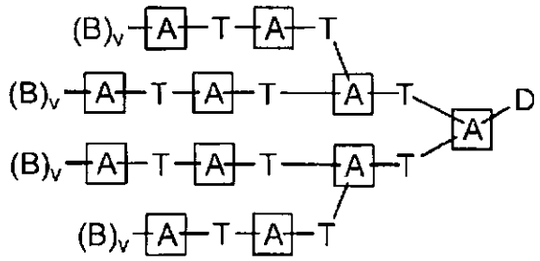
Id

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 n = 2 en ambas ramificaciones k de la fórmula anterior, el conjugado puede ser de la fórmula (If):



If

Descripción de Grupos de ejemplo

(nodo) [A]

En ciertas realizaciones, cada ocurrencia de [A] es 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, las 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.

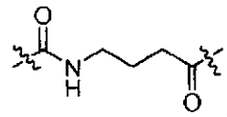
En ciertas realizaciones, [A] es un heteroátomo seleccionado a partir N, O, o S. En algunas realizaciones, [A] es un átomo de nitrógeno. En algunas realizaciones, [A] es un átomo de oxigeno. En algunas realizaciones, [A] es un átomo de azufre. En algunas realizaciones, [A] es un átomo de carbono.

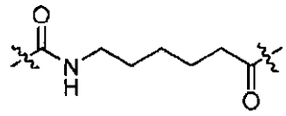
T (espaciador)

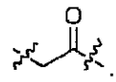
En ciertas realizaciones, cada ocurrencia de T es independientemente una cadena de hidrocarburos C_{1-20} bivalente, lineal o ramificada, saturada o no saturada, opcionalmente sustituida en donde una o más unidades de metileno de T son opcionalmente e independientemente reemplazadas por - O- , - S- , - 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. En ciertas realizaciones, una, dos, tres, cuatro, o cinco

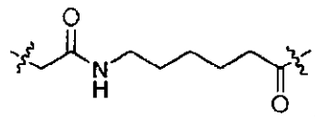
unidades de metileno de T son opcionalmente e independientemente reemplazadas. En ciertas realizaciones, T se construye a partir de una cadena de hidrocarburos C_{1-10}, C_{1-8}, C_{1-6}, C_{1-4}, C_{2-12}, C_{4-12}, C_{6-12}, C_{8-12}, o C_{10-12} en donde una o más unidades de metileno de T son opcionalmente 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- .

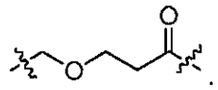
En algunas realizaciones, T es  .

En algunas realizaciones, T es  .

En algunas realizaciones, T es  .

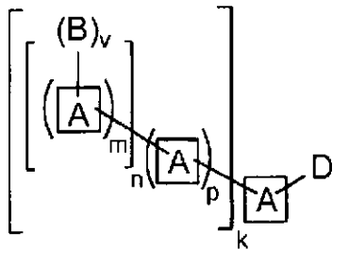
En algunas realizaciones, T es  .

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 (II):

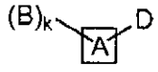


,

II

en donde [A], B, D, v, m, n, p, k, y j son como se definieron y describieron en la presente.

En ciertas realizaciones de la fórmula general (II), cada ocurrencia de [A] excepto para [A] central es un enlace covalente, cada ocurrencia de v = 1, y el conjugado es de la fórmula (III):



III

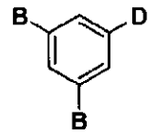
en donde [A], B, D, q, k, y j son como se definieron y describieron en la presente.

En ciertas de éstas realizaciones para fórmula (III), k = 1.

En otras realizaciones, k = 2.

En otras realizaciones, k = 3.

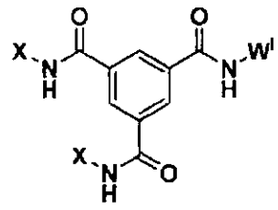
En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de la fórmula general (IIIa):



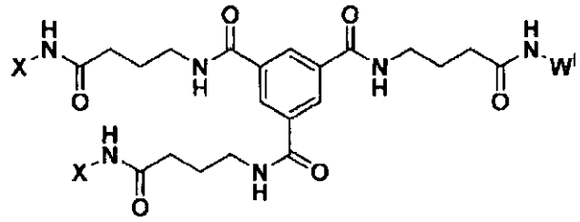
IIIa

en donde B y D son como se definieron y describieron en la presente.

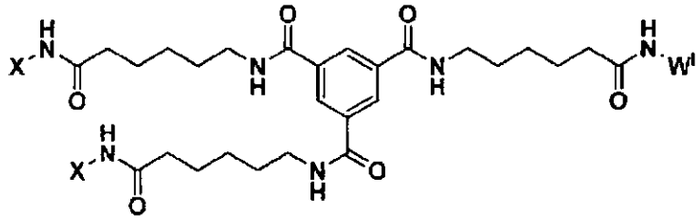
Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de la fórmula:



;



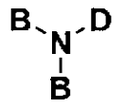
; or



en donde W^1 y X son como se definieron y describieron en la presente.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de la fórmula general

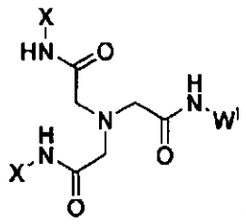
(IIIb):



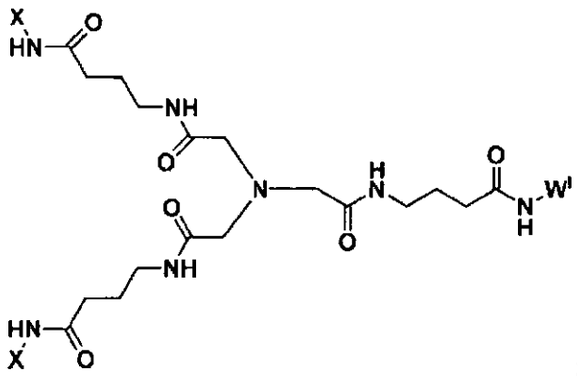
IIIb

en donde B y D son como se definieron y describieron en la presente.

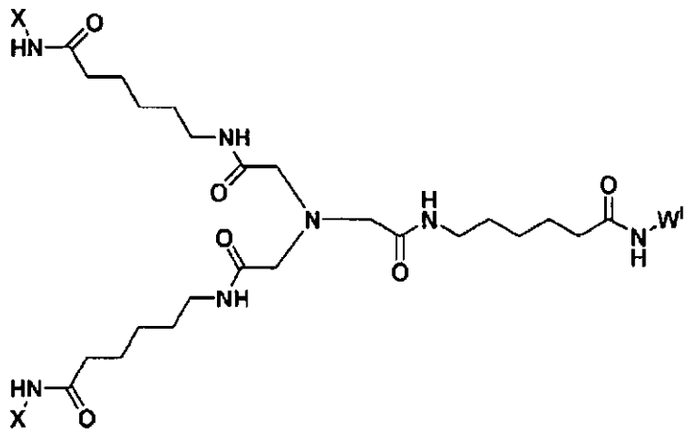
Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de la fórmula:



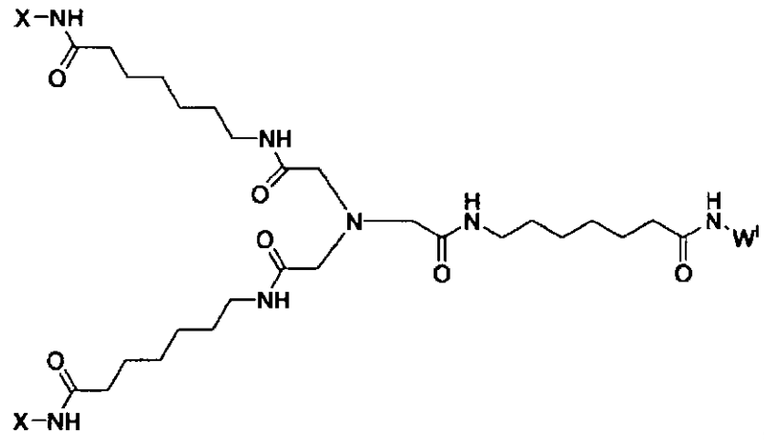
;



;

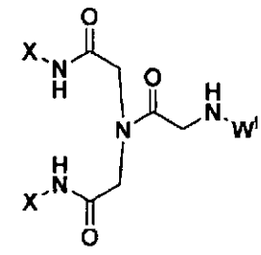


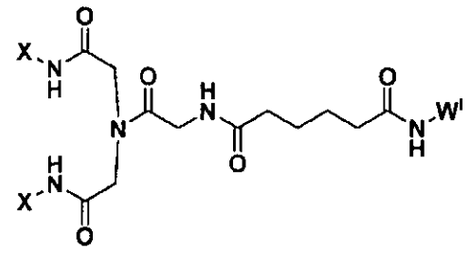
; o



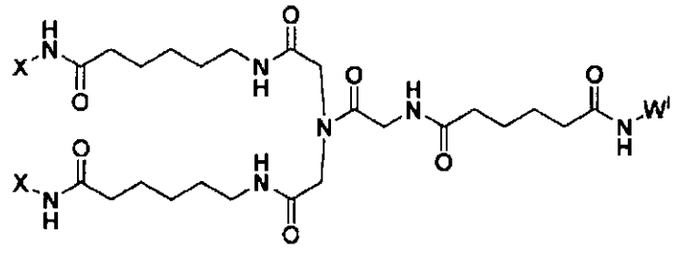
en donde W^1 y X son como se definieron y describieron en la presente.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de la fórmula:



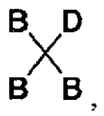


o



en donde W^1 y X son como se definieron y describieron en la presente.

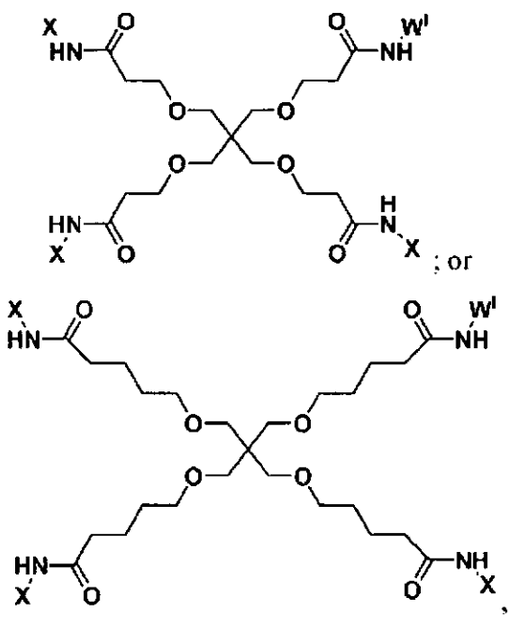
En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de la fórmula general (IIIc):



IIIc

en donde B y D son como se definieron y describieron en la presente.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de la fórmula:



; or

en donde W^1 y X son como se definieron y describieron en la presente.

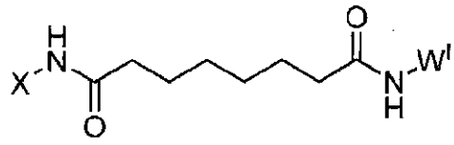
En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de la fórmula general (IIId) y (IIIe):



IIId y IIIe

en donde B y D son como se definieron y describieron en la presente.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de la fórmula:



en donde W^1 y X son como se definieron y describieron en la presente.

B (ligando)

- B es - T- L^B- X donde X es un ligando que incluye un sacárido; y L^B es un enlace covalente o un grupo derivado a partir de la conjugación covalente de una X con un T. Ligandos de ejemplo y sus componentes sacaridos se describen en la presente.

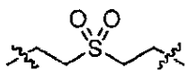
D (insulina)

- D es - T- L^D- W^1 donde W^1 es una molécula de insulina y L^D es un enlace covalente o un grupo derivado a partir de la conjugación covalente de un W^1 con un T. Moleculas de insulina de ejemplo se describen en la presente.

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^1 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 de conjugados). Es de entenderse que los componentes pueden unirse covalentemente a una estructura de conjugados a través de cualquier número de enlaces químicos, incluyendo pero no limitado a, amida, amina, éster, éter, 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 de conjugados utilizando reacciones de "química de 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, véase 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 de conjugados 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 amino que reaccionan para producir un enlace amida) pueden estar presentes en cada 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 que llevan carboxilo (o éster reactivo) pueden conjugarse con estructuras que llevan - 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 que lleva carboxilo y reacciona a través de N',N'- diciclohexilcarbodiimida (DCC) y 4- dimetilaminopiridina (DMAP) como catalizadores en una atmósfera seca. Los componentes que llevan carboxilo pueden conjugarse con estructuras que llevan - NH2 (MBFs), utilizando un procedimiento de acoplamiento de carbodiimida (EDAC). Utilizando este procedimiento, el componente que lleva 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 por exclusión de tamaños, cromatografía de fase inversa, cromatografía de gel de sílice, cromatografía de intercambio iónico, ultrafiltración y precipitación selectiva.

En varias realizaciones, los componentes que portan amina pueden acoplarse a estructuras que portan - 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 con 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 que lleva aminas en dimetilsulfóxido (DMSO) en condiciones anhidras. Componentes con 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 con 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 con aminas pueden conjugarse con estructuras que tienen 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 con 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 conjugarse con 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 pueden conjugar con una estructura teniendo 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 solvente, 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 HC1 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 somete a rotavapor para eliminar el acetonitrilo, y se liofiliza para obtener el producto puro.

k

k es un entero entre 1 y 12, inclusive. En ciertas realizaciones, k = 1 a 6, ej., 1, 2, o 3.

p y m

Cada ocurrencia de p es independientemente un entero entre 1 y 5, inclusive. En ciertas realizaciones, cada ocurrencia de p es la misma. En ciertas realizaciones, p = 1, 2 o 3. En ciertas realizaciones, p = 1.

Cada ocurrencia de m es independientemente un entero entre 1 y 5, inclusive. En ciertas realizaciones, cada ocurrencia de m es la misma. En ciertas realizaciones, m = 1, 2 o 3. En ciertas realizaciones, m = 1.

n y v

Cada ocurrencia de n es independientemente un entero entre 0 y 5, inclusive, con la salvedad de que dentro cada ramificación- k al menos una ocurrencia de n es $\geq$ 1. Las ramificaciones dentro de una ramificación- k dada se conocen en la presente 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, véase 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, véase 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, véase 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, véase 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.

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 de conjugados 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 divulgadas.

Métodos para la preparación de conjugados de insulina

Como se describe en los ejemplos, hemos ejemplificado métodos para la preparación de los conjugados antes mencionados utilizando insulina humana recombinante como una molécula de insulina de ejemplo y aminoetilglucosa (AEG), aminoetilmanosa (AEM), aminoetilbimanosa (AEBM), aminoetiltrimanosa (AETM), aminoetilfucosa (AEF), β- aminoetil- N-acetilglucosamina (AEGA), y/o la glucosamina (GA) 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 a una estructura TSAT- C6 a través de ésteres terminales activados para producir conjugados de insulina TSAT-C6- AEG- 2, TSAT- C6- AEM- 2- insulina, TSAT- C6- AEMB- 2- insulina, e TSAT- C6-AETM- 2- insulina. 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 10x 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 BOC2- insulina sin reaccionar. El pico de elución deseado se recoge y se somete a rotavapor 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 0.150 M de NaCl. 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 de 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 iniciales por estructura, entonces se agrega (3x (3- 1) x60mM/370 mm) = 0,973 ml de solución de ligando. Si hay N = 4 grupos de

éster activado iniciales 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.

La molécula de insulina se disuelve por separado en 17,2 mM en buffer de carbonato de sodio (0,1 M, pH 11) y el pH ajustado posteriormente a 10.8 con hidróxido de sodio 1,0 N. Una vez disuelto, toda la solución de la estructura/DMSO/ligando/TEA se agrega gota a gota a lo largo de 75 minutos a la solución de buffer de insulina/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 20 mM HEPES pH 5.0 conteniendo 0,150 M de 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 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 sometió a rotavapor para eliminar acetonitrilo y se liofilizó para obtener conjugado puro.

En otro aspecto, conjugados de insulina monosustituidos por B29 son sintetizados usando secuencias aminoácidas protectoras N- terminales usando métodos similares a los descritos en la Patente estadounidense. No. 7.402.565. Especificamente, las secuencias péptidicas N- terminales son modificadas sobre la cadena- A y 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 LysB29 sobre el intermedio de insulina, mientras los N- terminos están protegidos de productos secundarios 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 donde únicamente LysB29 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 LysB29 y se realiza una síntesis análoga a la descrita para LysB29.

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 con 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 listadas 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 a una estructura adecuado al 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 a una estructura adecuado al cual una amina reactiva también se conjuga. Los sacáridos

NH2- divalentes pueden reaccionar con las mismas estructuras descritos 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 descritos 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 a la misma molécula de insulina a través de una estructura multivalente mediante el ajuste de la química de la estructura, la valencia, y la estoiquiometria de ligando: estructura. Por ejemplo, la AEM- l- AEBM- 1- insulina, la AEBM- 1- AETM- 1- insulina, 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 ala estructura a través de un medio diferente de la molécula de insulina. Por ejemplo, una estructura funcionalizado a bivalente maleimida / estructura monovalente éster activar funcionalizados (por ejemplo, succinimidil- 3 ,5- dimaleimidophenyl benzoato (SDMB)) puede 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 a 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.

Cristalización de conjugados de la insulina

Sorprendentemente, se ha descubierto que algunos de conjugados de insulina descritos en este documento se pueden cristalizar sin el uso de aditivos tales como la protamina o zinc. Las formulaciones cristalinas de conjugados de insulina pueden ser ventajosas en la mejora de reproducibilidad por lotes, aumentando la estabilidad de la formulación, y la disminuyendo la aglomeración de partículas durante largos períodos de almacenamiento.

Como se describe en los ejemplos, los experimentos de clasificación se pueden realizar para determinar las condiciones de cristalización apropiadas. Por lo general, una solución del conjugado de insulina a cristalizar se disuelve en agua y se suspende sobre un buffer, y las

soluciones se observan en busca de evidencia de cristalización. El conjugado de insulina cristalina puede prepararse a mayor escala utilizando un buffer apropiado identificado en el experimento de clasificación.

En ciertas realizaciones, la estructura del conjugado de insulina cristalina se conjuga en la posición LysB29. En ciertas realizaciones, el conjugado de insulina cristalina es uno de los conjugados mostrados en la Figura 2. En ciertas realizaciones, el conjugado de insulina cristalina es I- 6, I- 7, o I- 9.

En ciertas realizaciones, la estructura del conjugado de insulina cristalina se conjuga en la posición LysB29. En ciertas realizaciones, el conjugado de insulina cristalina es uno de los conjugados mostrados en la Figura 2. En ciertas realizaciones, el conjugado de insulina cristalina es 1- 6,17, o 1- 9.

En ciertas realizaciones, el buffer utilizado para la cristalización tiene un pH mayor que 7. En ciertas realizaciones, el buffer tiene un pH entre 7,5 y 8,5. En ciertas realizaciones, el buffer es un buffer de fosfato, TRIS, o HEPES.

En ciertas realizaciones, el buffer utilizado para la cristalización es un buffer de fosfato. En ciertas realizaciones, el buffer tiene una mayor concentración de potasio que sodio. En ciertas realizaciones, el buffer tiene una mayor concentración de fosfato de potasio dibásico que de fosfato de sodio monobásico. En ciertas realizaciones, el buffer tiene un pH en el rango de 6 a 9. En ciertas realizaciones, el buffer tiene un pH de alrededor de 8. En ciertas realizaciones, el buffer tiene un pH de alrededor de 8,2. En ciertas realizaciones, el buffer es monohidrato monobásico de fosfato de sodio, fosfato de potasio dibásico, con un pH de 8,2 aproximadamente.

En ciertas realizaciones, la cristalización se produce en presencia de uno o más aditivos. En ciertas realizaciones, el aditivo es m- cresol, fenol, protamina, poli(arginina), glicerol, cloruro de zinc o acetato de zinc. En ciertas realizaciones, el aditivo es el glicol de polietileno.

En ciertas realizaciones, se agrega un solvente orgánico, para facilitar la cristalización. En ciertas realizaciones, el solvente orgánico es el metanol, etanol o isopropanol. En ciertas realizaciones, el solvente orgánico se elimina antes de la preparación final de una composición farmacéutica.

Formulaciones de conjugados de insulina cristalina

Como se discutió en los ejemplos, en ciertas realizaciones, puede ser ventajoso administrar un conjugado de insulina cristalina de manera sostenida (es decir, en una forma que presenta un perfil de absorción que es más sostenido que la insulina humana recombinante soluble), proporcionando así un nivel sostenido de conjugado que puede responder a las fluctuaciones en glucosa sobre una escala de tiempo más estrechamente relacionada con la escala de tiempo de fluctuaciones de glucosa típicas (es decir, las horas en cambio de minutos). En ciertas realizaciones, la formulación de liberación sostenida pueden exhibir una liberación 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 de insulina cristalina con otros ingredientes que disminuyen sus propiedades de liberación 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 liberación frente a un conjugado de insulina sustituido en el grupo B29- amina.

En ciertas realizaciones, una dispersión de conjugado pre- cristalizado de insulina se mezcla con protamina para formar una formulación de protamina de conjugado de insulina

cristalina. En algunas realizaciones, la dispersión se neutraliza a una capacidad fisiológica del buffer para la formulación.

En ciertas realizaciones, una formulación de la presente exposición abarca desde 0,05 a 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 invención incluye protamina y zinc en una relación (por 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 (por 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.

En ciertas realizaciones, uno o más de los siguientes componentes se añade a una formulación: un conservante antimicrobiano, un agente isotónico, y/o una molécula de insulina no conjugada.

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, propilenglicol 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 con 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.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una formulación de liberación sostenida que comprende un conjugado cristalino de la presente divulgación, en donde la formulación comprende protamina y zinc. En ciertas realizaciones, la estructura del conjugado de insulina cristalina se conjuga en la posición LysB29. En ciertas realizaciones, el conjugado de insulina cristalina es uno de los conjugados mostrados en la Figura 2. En ciertas realizaciones, el conjugado de insulina cristalina es **I- 6, I- 7** o **I- 9**.

En ciertas realizaciones, la formulación incluye de 1 a 5 mg de protamina/mg de conjugado, y de 0,1 a alrededor de 0,25 mg de zinc/mg de conjugado.

En ciertas realizaciones, la formulación incluye protamina y zinc en una relación (peso/peso) en el rango de aproximadamente 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 con una molécula de insulina no conjugada en el intervalo de aproximadamente 25:1 a aproximadamente 2:1.

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 de 0,15 a 0,35% por volumen 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 de 0,1 a 0,2 M de NaCl.

En ciertas realizaciones, la formulación comprende:

Protamina y zinc en una relación (peso/peso) en el rango de aproximadamente 40:1 a 10:1, una proporción molar de la molécula de insulina conjugada con una molécula de insulina no conjugada en el intervalo de aproximadamente 25:1 a aproximadamente 2:1;

entre 0.15 a 0,35% aproximadamente volumen/volumen de m- cresol, y

glicerol o entre 0,1 y 0,2 M de NaCl.

En ciertas realizaciones, la formulación comprende:

3,6 mg aproximadamente de protamina/mg de conjugado;

0,2 mg de zinc/mg de conjugado.

En ciertas realizaciones, la formulación comprende:

3,6 mg aproximadamente de protamina/mg de conjugado;

0.2 mg aproximadamente de zinc/mg de conjugado, y

una relación molar de la molécula de insulina conjugada con la molécula de insulina no conjugada de alrededor de 5:1.

En ciertas realizaciones, la formulación comprende:

3.6 mg aproximadamente de protamina/mg de conjugado;

0.2 mg aproximadamente de zinc/mg de conjugado;

una relación molar de la molécula de insulina conjugada con la molécula de insulina sin conjugar de 5:1 aproximadamente; y

0.2% v/v de m- cresol.

En ciertas realizaciones, la formulación comprende:

3.6 mg aproximadamente de protamina/mg de conjugado;

0.2 mg aproximadamente de zinc/mg de conjugado;

una relación molar de la molécula de insulina conjugada con la molécula de insulina sin conjugar 5:1 aproximadamente;

0.2% aproximadamente v/v de m- cresol; y

glicerol o 0.15 M aproximadamente de NaCl.

Usos de conjugados de la insulina cristalinos

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para utilizar los conjugados de insulina cristalina. En general, los conjugados cristalinos se pueden utilizar para proporcionar de forma controlada la insulina bioactiva en respuesta a un sacárido (por ejemplo, glucosa o un sacárido exógeno, tal como la manosa, la 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 insulina cristalina de la presente divulgación. Aunque los conjugados pueden utilizarse para tratar cualquier paciente (por ejemplo, perros, gatos, vacas, caballos, ovejas, cerdos, ratones, etc), más preferiblemente se utilizan para el tratamiento de los seres humanos. Un conjugado de insulina cristalina puede administrarse a un paciente por varias rutas. En general la ruta de administración más adecuada dependerá de una variedad de factores

incluyendo la naturaleza de la enfermedad o la afección a tratar, la condición del paciente, etc. En general, la presente divulgación incluye la administración por vía oral, intramuscular, subcutánea, 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 rutas se pueden encontrar, por ejemplo, en *Remington Pharmaceutical Sciences*, 19a ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. En diversas realizaciones, una suspension de conjugado de insulina cristalina se puede administrar por vía subcutánea, por ejemplo, por inyección. El vehículo de suspensión puede ser una solución acuosa, incluyendo pero no limitado a, agua estéril, solución salina o solución salina amortiguada.

En general, una cantidad terapéuticamente efectiva de un conjugado de insulina cristalina será administrada. Por una "cantidad terapéuticamente efectiva" se entiende una cantidad suficiente de conjugado de insulina cristalina para el tratamiento de la enfermedad o condición en una razonable relación beneficio/riesgo, lo que implica un equilibrio entre la eficacia y la toxicidad del conjugado. En general, la eficacia terapéutica y la toxicidad pueden determinarse mediante procedimientos farmacológicos estándares en cultivos celulares o con animales de experimentación, por ejemplo, mediante el cálculo de ED50 (la dosis que es terapéuticamente eficaz en el 50% de los sujetos tratados) y DL50 (la dosis que es letal para el 50% de los tratados). El ED_{50}/LD_{50} representa el índice terapéutico de la insulina. Aunque, en general, se prefiere un índice terapéutico, como es bien sabido en el estado de la técnica, un índice terapéutico menor 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 es determinada en el curso de los ensayos clínicos.

En diversas realizaciones, 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 la dosis de insulina se administra una vez al mes.

En ciertas realizaciones, un conjugado de insulina cristalina de la presente divulgación puede ser utilizado para tratar la hiperglicemia en el 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 el paciente con una infección asociada con el control glucémico deteriorado. En ciertas realizaciones, un conjugado de insulina cristalina se puede utilizar para tratar la diabetes.

En ciertas realizaciones, cuando un conjugado de insulina cristalina y su formulación de la presente divulgación se administra a un paciente (por ejemplo, un paciente mamífero) éste induce menos hipoglicemia que una versión no conjugada de la molécula de insulina. En ciertas realizaciones, una formulación de conjugado de insulina cristalina de la presente divulgación induce a un valor 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% menor) 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 conjugado proporcionado para cualquier paciente dado se decidirá por el médico tratante en el ámbito del criterio médico. La cantidad terapéuticamente eficaz específica para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores, incluyendo la enfermedad o afección que se trata, la actividad de la molécula de insulina específica empleada, la composición específica empleada, la edad, peso corporal, salud general, el sexo y la dieta del paciente, el tiempo de administración, la ruta de administración y la tasa de excreción de la molécula de insulina específica empleada, la duración del tratamiento, los fármacos utilizados en combinación o coincidentes con la molécula de insulina específica empleada, y factores similares bien conocidos en las artes medicas. En varias realizaciones, un conjugado de la presente divulgación se puede administrar en más de una ocasión. Por ejemplo, la presente divulgación abarca específicamente los métodos en que se administra una suspensión

de conjugado de insulina cristalina por vía 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 diversas realizaciones, un conjugado de insulina cristalina 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 está destinada a tratar la misma enfermedad o trastorno que el conjugado administrado.

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 cristalina de la presente divulgación que un paciente de otra manera idéntico. Así, en ciertas realizaciones, un conjugado de insulina cristalina puede administrarse a un paciente que también está siendo tratado con un sensibilizador de insulina. En varias realizaciones, el conjugado de insulina cristalina 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 de insulina cristalina 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 cristalina 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 de insulina cristalinas 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 liberación 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 cristalina 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 cristalina estarán relacionados 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 liberación inmediata. Por el contrario, si se desea una activación más prologada menos intensa del conjugado entonces una formulación oral de liberación prolongada puede utilizarse en su lugar. Consideraciones generales en la formulación y fabricación de formulación de liberación 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 insulina cristalina 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- 5** a **I- 11 y I- 17** que se describen y se utilizan en los ejemplos se muestran en la Figura 2.

Se debe entender que estos métodos pueden modificarse para producir otros conjugados que caen dentro del alcance de la divulgación.

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 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 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 filtraron y se evaporaron a sequedad para producir azidoetilglucosa (86 g) como un sólido blancuzco. TLC (20% MeOH/DCM; residuo de carbonización (char) 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 microfibra 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 microfibra de vidrio. El filtrado amarillo claro resultante fue evaporado a un sólido 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 empaquetado 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, 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 microfibra 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 microfibra 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 man(α- 1,3)- man(α- 1.6)- α- l- azidoetilmannopiranosida perbenzoilada (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 deben ser escaladas al numeró 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) arrojo una adsorción uv del material en vacío de la columna de inyección, Rt 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 la columna Rt 2,5 min, material UV a Rt 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 NH_2- B29- BOC2 (Al, Bl)- insulina

a. Fmoc- 1- (B29)- insulina

En una síntesis típica, 4 g de insulina en polvo (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) se disuelve 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 N- succinimidil carbonato de 9- fluorenilmetilo (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 que contiene 250 ul de etanolamina en 5 ml de DMSO seguido por la mezcla durante cinco minutos. Después de apagar, toda la solución se vierte en 1600 ml de acetona y se mezclo brevemente con una espátula. A continuación, 8 x 400 µl alícuotas de una solución HCl al 18,9%: agua se agregan gota a gota 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 se coloca a un lado. A la solución sobrenadante, se agrega otras 8 x 400 ul alícuotas de una solución HCl al 18,9%: agua gota a gota sobre la superficie de la mezcla para obtener un segundo precipitado de insulina reaccionada. Este segundo precipitado se centrifuga y se descarta el sobrenadante. Las tortas de centrifugación combinadas de las dos etapas de precipitación se lavan una vez con acetona seguido de secado al vacío a temperatura ambiente para producir el polvo en bruto, que normalmente contiene un 20% del producto Fmocl, el 65% del producto Fmoc2, y el 15% de insulina sin reaccionar.

Un método de HPLC de fase inversa se utiliza para aislar la Fmocl- insulina deseada pura a partir del polvo crudo. El buffer A es agua desionizada que contiene TFA al 0.1% y el Buffer B es acetonitrilo que contiene TFA al 0.1%. El polvo crudo se disuelve a 25 mg/ml en una mezcla de A70%/ B/30%) y se filtra por jeringa antes de la inyección en la columna. Antes de la purificación, la columna (Waters SymmetryPrep C18, 7 um, 19 x 150 mm) se equilibra a 15 ml/minuto con una fase móvil 70% A/30% B utilizando un sistema DeltraPrep 600 Waters. Aproximadamente 5 ml de la solución de 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 un gradiente lineal se emplea desde 70%A/30%B a 62% A/38%B en el transcurso de los próximos 3,5 minutos y se mantiene allí durante 2,5 minutos adicionales. Utilizando este método, el pico de Fmocl deseado eluye a aproximadamente 3 minutos después del pico RHI sin reaccionar, seguido de cerca por el pico de Fmoc2- insulina. Una vez recolectada, la solución se somete a rotovapor para retirar acetonitrilo y se liofiliza para obtener polvo de Fmocl- insulina puro. La identidad es verificada por LC- MS (HT Laboratories, San Diego, CA) y el sitio de conjugación se determina por secuenciación N- terminal (Western analítica, St. Louis, MO).

b. BOC2 (Al, Bl)- Fmoc- (B29)- insulina

En una síntesis típica, 1 g de Fmocl (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 agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se agrega lentamente 0.379 ml (2,2 equivalentes) de solución 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 1 ml de una solución concentrada que contiene 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, se agregan alícuotas de 8 x de 100 ul de una solución de HCl al 18%: agua gota a gota sobre la superficie de la mezcla para precipitar la insulina reaccionada. Luego el material precipitado es centrifugado y el sobrenadante se decanta en un segundo vaso, mientras que la torta de precipitado se coloca aparte. A la solución de sobrenadante, se agregan otras alícuotas de 8 x 100 ul de una solución HCl al18,9%: agua gota a gota sobre la superficie de la mezcla para obtener un segundo precipitado de insulina reaccionada. Este segundo

precipitado se centrifuga y se descarta el sobrenadante. Las tortas de centrifugación combinada de los dos pasos de precipitación se lavan una vez con acetona seguida por el secado al vacío a temperatura ambiente para producir el polvo crudo el cual generalmente contiene más del 90% del producto BOC2- Fmoc- 1 deseado.

Un método de HPLC de fase inversa preparativa se utiliza para aislar BOC2- Fmoc- 1-insulina pura a partir del polvo crudo. El buffer A es agua desionizada que contiene TFA al 0.1% y el Buffer B es acetonitrilo que contiene TFA al 1%. El polvo crudo se disuelve a 25 mg/ml en una mezcla de A70%/ B/30% y se filtra por jeringa antes de la inyección en la columna. Antes de la purificación, la columna (Waters SymmetryPrep CI8, 7 um, 19 x 150 mm) se equilibra a 15 ml/minuto con una fase móvil 70% A/30%B utilizando un sistema DeltraPrep 600 Waters. 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 lo cual se emplea un gradiente lineal desde 70%A//30%B a 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- Fmoc- 1 deseado eluye en aproximadamente 5 minutos después del material inicial Fmocl- insulina. Una vez recolectada, la solución se somete a rotovapor eliminar el acetonitrilo y se liofiliza para obtener polvo de BOC2(Al, B l)- Fmoc(B29)- insulina pura. La identidad es verificada por LC- MS (HT Laboratories, San Diego, CA) y el sitio de la conjugación se determina por secuenciación N-terminal (Western Analytical, St. Louis, MO).

c. NH_2- (B29)- BOC2 (Al, 1l)- insulina

El grupo protector Fmoc de la BOC2 (Al, Bl)- Fmoc (B29) se retira al disolver el polvo liofilizado obtenido según el paso anterior en piperidina al 20% en dimetilformamida (DMF) durante 30 minutos a 4 °C seguido por superdilución 10X en HEPES 25 mM buffer pH 8.2 que contiene 0.150 M NaCl. El pH se ajusta entre 7.0 y 8.0 utilizando solución de NaOH después de lo cual el material se pasa a través de una columna de Biogel P2 para eliminar Fmoc, DMF, y cualquier otra sale contaminante. La NH_2- (B29)- B0C2 (A1, Bl)- insulina es liofilizada en un polvo si es necesario o se utiliza directamente en una solución acuosa si se desea.

Ejemplo 7 - Conjugación de insulina con ésteres activados multivalentes en solvente orgánico

Una estructura que contiene ésteres N terminales activados se disuelve en 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 disuelto, se agrega suficiente solución de ligando gota a gota en el transcurso de diez minutos para proporcionar una serie de equivalentes reactivos exactamente igual al número de grupos éster activados en la estructura, N, menos uno. Por ejemplo, si hay N = 3 grupos éster activados en la estructura, entonces (lx (3- l) x60mM/122 mM) = 0,98 ml de solución de ligando se agrega. Si hay N = 4 grupos éster activados en la estructura, entonces (lx (4- l) x60mM/122 mM) = 1,5 ml de solución de ligando se agrega, y así sucesivamente. Después de agregar la solución de ligando, la solución se agita durante dos horas a temperatura ambiente.

La insulina se disuelve por separado en 7,5 ml de DMSO anhidro a una concentración de 8,1 mM. Una vez disuelta, la solución de insulina se agrega en el transcurso de un minuto a la solución de la estructura/DMSO/ligando/TEA seguido por mezclado a temperatura ambiente durante dos horas para asegurar la reacción completa.

Luego la solución resultante se superdiluyó por 10x en una solución salina amortiguada con 20 mM HEPES pH 5,0 conteniendo 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 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 luego se concentra utilizando una membrana de ultrafiltración de tamaño adecuado a aproximadamente 10 ml. Esta solución se purifica para obtener el producto deseado utilizando HPLC de fase reversa preparativa en una columna Waters SymmetryPrep CI8, 7um, 19 x 150 mm. El buffer A es agua desionizada que contiene TFA al 0.1% y el buffer B es acetonitrilo que contiene 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 a una tasa de flujo de 15 ml/minuto después de lo cual se emplea un gradiente lineal desde 80%A/20%B a 75% A/25 % B durante los próximos 5 minutos, seguido por un gradiente lineal más lento desde 75%A/25%B a 62%A/38%B durante los próximos 22 minutos. El tiempo de retención del pico deseado variará en función dc la molécula de insulina, la estructura, y ligando utilizados. Una vez recolectada, la

solución es sometida a rotovapor para eliminar el acetonitrilo y se liofiliza para obtener conjugado puro cuya identidad puede ser verificada por LC- MS (HT Laboratories, San Diego, CA).

Ejemplo 8 – Conjugados de insulina B29 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 Lys B29- épsilon- amino es la amina más reactiva, seguida Al y luego Bl. Por lo tanto, cuando se utiliza insulina no protegida, el conjugado resultante debe ser predominantemente sustituido en la posición Lys- B29. Utilizando el método descrito en el Ejemplo 7 e insulina humana recombinante (Peso molecular = 5808 Da, Sigma Aldrich, St. Louis, MO), los siguientes conjugados de insulina se prepararon utilizando la estructura de éster activado TSAT- C6 adquirido en Molecular Biosciences (Boulder, CO) . La AEM y AETM fueron sintetizadas como se describió anteriormente. El medio de exclusión por tamaños fue Biogel P2 (Bio- Rad Laboratories, Hercules, CA), y el corte de peso molecular de membrana de ultrafiltración de tamaño adecuado fue 3kDa.

Conjugado	Estructura	Peso Molecular Estructura	Ligando	Peso molecular AE-azúcar	Pureza (HPLC)	PESO MOLECULAR (LC-MS)	azúcar/insulina
I- 7: TSAT-C6- AEM- 2 (B29)	TSAT- C6	822	AEM	223	93%	6729	2.0
1- 6: TSAT-C6- AETM- 2 (B29)	TSAT- C6	822	AETM	547	95%	7378	2.0

De acuerdo con la secuenciación N- terminal, aproximadamente el 85% de la estructura que contiene AEM se conjugó con insulina a través de Lys- B29 y aproximadamente 87% de la estructura que contiene AETM se conjugó con la insulina a través de Lys- B29.

Ejemplo 9 - conjugación de insulina con ésteres activados multivalentes en solvente acuoso

En este ejemplo se describe una alternativa al método descrito en el Ejemplo 7 en el que la reacción se lleva a cabo en un solvente acuoso en cambio de un solvente orgánico.

La estructura que contiene 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 suficiente solución de ligando por goteo en el transcurso de diez minutos para proporcionar un número 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 agregan (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 agregan (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 agitó durante una hora a temperatura ambiente.

Luego la molécula de insulina se disuelve por separado a 17,2 mm en 2,67 ml de 0.1 M buffer de carbonato de sodio 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 la estructura/DMSO/ligando/TEA se agrega gota a gota a lo largo de 75 minutos a la solución de buffer de insulina/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 10x en una solución salina amortiguada por 20 mM HEPES pH 5,0 con 0.150 M de 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 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 luego se concentra utilizando una membrana de ultrafiltración de tamaño adecuado a aproximadamente 40 ml. Esta solución se purifica adicionalmente para obtener el producto deseado con HPLC preparativa de fase reversa en una columna Waters SymmetryPrep Aguas CI8, 7 um, 19 x 150 mm. El buffer A es agua desionizada que contiene TFA al 0.1% y el buffer B es acetonitrilo que contiene 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 un móvil Water DeltraPrep 600. Aproximadamente 5 ml de la solución cruda se inyecta en la columna a lo largo de 2 minutos a una tasa de flujo de 15 ml/minuto después de que un gradiente lineal se emplea entre el 80%A/20B% al 75% A/25% B en los próximos 5 minutos, seguido por un gradiente lineal más lento del 75% A/25 B% al 62% A/38% B durante los próximos 22 minutos. El tiempo de retención del pico deseado variará en función de la molécula de insulina, la estructura, y ligando utilizados. Una vez recolectada, la solución es sometida a rotovapor para eliminar acetonitrilo y se liofiliza para obtener conjugado puro cuya identidad puede ser verificada por LC- MS (HT Laboratories, San Diego, CA).

Ejemplo 10 – Conjugado de B29- AEM- 2- insulina 1- 7 sintetizado en solvente acuoso a partir de insulina no protegida

Este ejemplo hace uso del hecho de que en insulina no protegida, la fracción Lys B29-épsilon- amino es la amina más reactiva, seguido por Al y Bl. Por lo tanto, cuando se utiliza insulina no protegida, el conjugado resultante debe ser predominantemente sustituido en la posición Lys- B29. Utilizando el método descrito en el Ejemplo 9 y la insulina humana recombinante (MW = 5808, Sigma Aldrich, St. Louis, MO), se preparó un conjugado de insulina AEM- 2 utilizando la estructura de éster activado TSAT- C6 adquirido en Molecular Biosciences (Boulder, CO). La AEM utilizada como el análogo de insulina se sintetizó como se describió anteriormente. El medio de medio de exclusión por tamaños adecuadamente dimensionado fue Biogel P2 (Bio- Rad Laboratories, Hercules, CA), y el corte de peso molecular de membrana de ultrafiltración de tamaño adecuado fue de 3 kD. El producto final (pureza del 95% por HPLC) se encontró con el MW deseado de 6729 g/mol (LC- MS), lo que representa un total de 2.0 moléculas AEM conjugadas por la insulina, con más del 85% de las moléculas de conjugado conjugadas en el sitio Lys- B29 (secuenciado N- terminal).

Ejemplo 11 - Conjugados preparados utilizando insulinas naturales de otras especies, como bovinas y porcinas

Las insulinas de otras especies que contienen 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 recombinante. Los expertos en el estado de

la técnica apreciarán que los pesos moleculares de los conjugados resultantes hechos partir de la insulina bovina o porcina, serán diferentes de los hechos de la insulina humana recombinante por las cantidades que figuran en la siguiente tabla.

Tipo de insulina	Peso molecular (g/mol)	Diferencia en insulina humana MW (g/mol)
La insulina humana	5808	-
Insulina porcina	5778	- 30
Insulina bovina	5733	- 75

Los expertos en el estado de la técnica también apreciarán que los conjugados resultantes hechos a partir de la insulina bovina o porcina, pueden tener tiempos de retención máximos cromatográficos que difieren ligeramente de aquellos conjugados hechos a partir de la insulina humana, debido a las pequeñas diferencias en las estructuras entre las insulinas.

Ejemplo 12 - conjugados preparados con análogos de la insulina, tales como lispro, aspart, glulosina, glargina y detemir

Todos análogos de la insulina conocidos los cuales contienen al menos una funcionalidad amina reactiva (por ejemplo, lispro, aspart, glulisina, glargina y detemir) pueden acoplarse con cualquiera de los métodos utilizados para conjugar la insulina humana recombinante. Los expertos en el estado de la técnica apreciarán que los pesos moleculares de los conjugados resultantes hechos a partir de los análogos de insulina se diferencian de los hechos de la insulina humana recombinante por las cantidades que figuran en la siguiente tabla.

Tipo de insulina	Peso molecular (G/mol)	Diferencia en insulina humana MW (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 el estado de la técnica también apreciarán que los conjugados resultantes hechos a partir de los análogos de la insulina pueden tener tiempos de retención máximos cromatográficos que difieren ligeramente de los conjugados hechos a partir de la insulina humana, debido a las pequeñas diferencias en las estructuras entre las insulinas.

Ejemplo 13 - PK y la bioactividad de una versión sustituida por B29 del conjugado de AEM- 2- TSAT- C6- insulina

Este ejemplo describe la insulina en suero y los perfiles de depresión de glucosa en sangre obtenidos para un conjugado de ejemplo administrado por vía subcutánea. El conjugado de ejemplo, **1- 7** en la figura 2, se sintetizó utilizando TSAT- C6 como la estructura, AEM como el ligando, y la insulina humana recombinante para producir un Conjugado sustituido por B29. En este caso, el conjugado se inyectó a 5 U/kg por detrás del cuello de ratas 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 comercialmente disponibles (Precision Xtra, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Además, la sangre de cada punto de tiempo se centrifugó a 4 ° C para recoger 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 3, el conjugado sustituido por B29 se absorbe rápidamente en y se eliminada del suero después de una inyección subcutánea.

Ejemplo 14 - Efecto de a- MM en PK y bioactividad en función de la afinidad de ligando

En este ejemplo, la estructura TSAT- C6 se utilizó y los conjugados siguientes fueron sintetizados de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 9 (nota glucosamina HCl o GA-HCl fue comprada en Sigma- Aldrich (St. Louis, MO) y se utiliza sin purificación adicional):

Conjugado	Estructura	Peso Molecular Estructura	Ligando	Peso molecular AE-azúcar	Pureza (HPLC)	PESO MOLECULAR (LC-	azúcar/insulina

						MS)	
1 - 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- HC1	216	95%	6641	2.0

Según la secuenciación N- terminal, aproximadamente el 90% de cada estructura que contiene sacáridos se conjugó con insulina a través de la Lys- B29. TSAT- C6- AEM- 2 (B29) y TSAT- C6- GA- 2 (B29) se muestran en la Figura 2 como conjugados 1- 7 y 1- 5, respectivamente.

Los conjugados (5 U/kg) fueron inyectados por detrás del cuello de ratas 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 la hemorragia de 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 recoger el suero. Las concentraciones de insulina en suero se midieron posteriormente con un kit ELISA disponible en el mercado (Prueba de iso- insulina ELISA, Mercodia, Uppsala, Suecia). Se realizó un control mediante la inyección de solución salina en cambio de un a- MM después de 15 minutos.

Las figuras 4 y 5 muestran los resultados obtenidos cuando se administró a- MM por inyección IP 15 minutos después de la inyección subcutánea de 1- 7 y 1- 5, 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 el conjugado 1.7 en comparación con el grupo de control de inyección de solución salina. El perfil del conjugado 1- 5 no se vio afectado por la inyección de a- MM.

Ejemplo 15 - Efecto de a- MM sobre farmacocinética (PK) y bioactividad en función de la valencia de ligando

En este ejemplo, nos propusimos determinar el comportamiento farmacocinético y farmacodinámico de los conjugados a los cuales un creciente número de ligandos sacáridos se ha

fijado covalentemente. Todos los conjugados fueron sintetizados según los métodos descritos en el Ejemplo 9 utilizando las estructuras y los ligandos sacáridos especificados a continuación:

Conjugado	Estructura	Peso Molecular Estructura	Ligando	Peso molecular AE-azúcar	Pureza (HPLC)	PESO MOLECULAR (LC-MS)	De azúcar/insulina
1- 8: DSS- AEM-1 (B29)	DSS	368	AEM	223	> 95%	6168	1.0
1-9: TSPE- AEM-3 (B29)	TSPE	813	AEM	223	> 95%	6829	3.0
1- 10: DSS-AETM- 1 (B29)	DSS	368	AETM	547	> 95%	6491	1.0
1- 11: TSPE-AETM- 3 (B29)	TSPE	813	AETM	547	> 95%	7800	3.0

Según secuenciación N- terminal, aproximadamente el 90% de cada estructura que contiene sacáridos se conjugó con insulina a través de Lys- B29. Los conjugados se muestran en la Figura 2 como 1- 8,1- 9, 1- 10, y 1- 11.

El mismo tipo de experimento descrito en el Ejemplo 14 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 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 hemorragia de 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 (prueba de iso- insulina ELISA,

Mercodia, Uppsala, Suecia). Se realizó un control mediante la inyección de solución salina en cambio de a- MM después de 15 minutos.

Las figuras 6 y 7 muestran los resultados obtenidos cuando se administra a- MM por inyección IP 15 minutos después de la inyección subcutánea de 1- 8 y 1- 9, 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 **1- 9** y por lo tanto menor para 8- 1 en comparación con el grupo de control de inyección de solución salina.

Figuras 8 y 9 muestran los resultados obtenidos cuando se administra a- MM mediante inyección IP 15 minutos después de la inyección subcutánea de 1- 10 y 1- 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 1- 11 y un levemente menor para **1- 10** en comparación con el grupo de control de inyección de solución salina.

Ejemplo 16 - Comparación in vivo de vida media/tasa de eliminación

Los siguientes experimentos se realizaron utilizando conjugados de ejemplo para determinar la tasa a la que se evacuaron desde suero *in vivo* frente a la insulina no conjugada. Todos los conjugados utilizados en este estudio fueron sintetizados según los métodos generales descritos en el Ejemplo 9.

En cada caso el conjugado soluble se administró a 0.4 mg de conjugado/kg de peso corporal en ratas macho Sprague- Dawley mediante cánula dual en la vena yugular (Taconic, JV/JV, 350- 400g, n = 3). Una solución conjugada estéril o insulina de control se inyectó por vía intravenosa a través de una cánula JV, seguida inmediatamente por una solución de caza 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 en 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 recoger el suero. Las concentraciones de insulina en suero o conjugado en suero se midieron posteriormente con un kit ELISA disponible comercialmente (prueba de iso- insulina ELISA, Mercodia, Uppsala, Suecia).

La figura 10 muestra la concentración séricas de cualquiera conjugado RHI o TSAT- C6- AETM- 2, mostrado como I- 6 en la Figura 2, como una función de tiempo después de la inyección intravenosa. Claramente, 1- 6 se elimina mucho más rápidamente a partir del suero que RHI. Los datos se ajustan mejor utilizando un modelo bi- exponencial de dos compartimientos con la siguiente fórmula general: $C(t) = A_0 EXP(-at) + B_0 EXP(-bt)$, donde t es el tiempo, C (t) es la concentración en el 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 exposición del segundo compartimiento. Las vidas medias de eliminación (en minutos) asociadas con cada compartimiento son, t1/2 (a) = 0.693/y t1/2 (b) = 0.693/b. En la Figura 10, para RHI la t1/2 (a) = 0.76 y t1/2 (b) = 11.46 y para 1- 6 la t1/2 (a) = 0.47 y t1/2 (b) = 2.87. En otras palabras, la t1/2 (b) de 6- 1 es aproximadamente cuatro veces más corta que la t1/2 (b) para RHI.

La siguiente tabla resume los parámetros t1/2 para un número de conjugados probados utilizando exactamente el mismo procedimiento descrito anteriormente (las estructuras se muestran en la Figura 2):

Formulación	t1/2 (a)	t1/2 (b)	Relación a RHI t1/2 (a)	Relación a RHI t1/2 (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
1- 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
1- 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 desde el suero más rápido que la insulina no conjugada, la medida de esto se rige por la

afinidad del conjugado particular para la lectina endógena y el número de ligandos sustituidos por conjugado.

Ejemplo 17 –Tasa de vida media in vivo/eliminación bajo infusión de glucosa

En este ejemplo, se planteó la hipótesis adicional que la tasa de evacuación 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 cual los conjugados se evacuan desde suero *in vivo* en condiciones de hiperglicemia, se realizó el siguiente experimento. En cada caso, se administró 7- 1 a 0.4 mg de conjugado/kg de peso corporal en ratas macho Sprague- Dawley mediante cánula dual en la vena yugular (Taconic, JV/JV, 350- 400g, n = 3).

Una hora antes del inicio del experimento una cánula de rata se conectó a una bomba de infusión de jeringa conteniendo una solución de glucosa de 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, tras lo cual una solución de conjugado estéril o insulina de control se inyectó por vía intravenosa a través de la segunda cánula de rata, seguida inmediatamente por una solución de caza 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 cánula con heparina- solución salina, la segunda cánula se utilizó para recoger muestras de sangre en t = 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos después de la dosis.

La sangre de cada punto de tiempo se centrifuga 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 (prueba de iso- insulina ELISA, Mercodia, Uppsala, Suecia). Los datos concentración sérica de insulina o conjugado frente a tiempo se ajustan mejor con la suma de dos exponenciales independientes de descomposición ($C(t) = \exp(-k_a t) + b \exp(-K_b T)$) según el modelo de dos compartimentos, donde $t1/2\ (a) = (\ln 2)/k_a$ y $t1/2\ (b) = (\ln 2)/kb$. La

siguiente tabla resume los parámetros t1/2 para **1- 7** con y sin infusión de glucosa junto con los obtenidos por RHI a partir del ejemplo 16:

Infusión	Formulación	t1/2 (a)	t1/2 (b)	Relación a RHI t1/2 (a)	Relación a RHI t1/2 (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
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 eliminación de fase b de 2.77 a 5.11 minutos.

Ejemplo 18 – Tasa de vida media in vivo/eliminación bajo infusión de a- MM

En este ejemplo, se planteó la hipótesis adicional que la tasa de depuración de conjugados de insulina puede ser inhibida por la presencia de concentraciones arbitrariamente altas de sacáridos inhibidores diferentes de la glucosa, tales como α- metil- manosa (a- MM). Con el fin de determinar la tasa a la cual los conjugados de ejemplo fueron evacuados desde el 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 ratas macho Sprague-Dawley (Taconic, JV/JV, 350- 400g, n = 3) mediante cánula dual en la vena yugular.

Una hora antes del inicio del experimento una cánula para rata se conectó a una bomba de infusión de jeringa conteniendo una solución de a- MM estéril 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, tras 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 de caza de heparina- solución salina para asegurar 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.

Además, la glucosa en sangre se midió utilizando tiras de prueba comercialmente disponibles (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 y conjugado en suero se midieron posteriormente utilizando un kit ELISA disponible comercialmente (prueba de iso- insulina ELISA, Mercodia, Uppsala, Suecia). Los datos de concentración sérica de insulina o conjugado frente a tiempo se ajustan mejor con la suma de dos exponenciales independientes de descomposición ($C(t) = \exp(-k_a t) + b \exp(-K_b T)$) según el modelo de dos compartimentos, donde t1/2 (a) = (ln 2)/ka y t1/2 (b) = (ln 2)/kb. La siguiente tabla resume los 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 17 y los obtenidos para RHI sin infusión de sacárido del ejemplo 16:

Infusión	Formulación	t1/2 (A)	t1/2 (B)	Relación a RHI t1/2 (a)	Relación a RHI t1/2 (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
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

Se puede concluir a partir de estos datos que no sólo a- MM inhibe la eliminación acelerada de suero para este conjugado, sino que lo hace en un grado aún mayor que la glucosa. En este caso, la vida media de eliminación de la fase b casi se cuadruplica de 2.77 a 10.09 minutos.

Ejemplo 19 - conjugados de insulina de acción prolongada utilizando protamina, zinc y otros excipientes

Con el fin de generar conjugados de acción prolongada, se prepararon formulaciones PZI (insulina protamina zinc) a partir de conjugados sustituidos por B29 preparados con base en los métodos del Ejemplo 9. 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 variarse con el fin de obtener una tasa de absorción sostenida óptimamente constante. Además, en algunos casos se encontró que la adición de una pequeña cantidad de insulina no modificada ayudó a estabilizar la formulación. En estos casos, la concentración de insulina no modificada contenida en la muestra fue variada para obtener una tasa de absorción sostenida óptimamente constante. En todas las formulaciones probadas, se utilizó la siguiente receta:

Componente	Variable	Volumen (ml)
Solución de Conjugado a 2.7 mg/ml	Contenido de insulina no modificada porcentual (M/M)	1.000
Solución salina amortiguada por 250 mM HEPES	Concentración de NaCl (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 dc los componentes en el orden descrito en la tabla anterior, estos se mezclaron suavemente durante 30 minutos antes de las pruebas *in vivo*.

Para probar el perfil de liberación sostenida para una formulación dada, así como también el perfil PK sensible a glucosa, se realizó el siguiente experimento. La formulación se inyecta 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 no diabéticas en ayuno (Sprague- Dawley, 400- 500 g, n = 3). Después de un retraso de 240 minutos, una dosis de glucosa (4 g/kg) fue inyectada IP. Se tomaron muestras de sangre a través de la hemorragia de 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 de conjugado inicial. 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 (prueba de 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 insulina de rata. Las muestras de suero se diluyeron 10x con el fin de minimizar la cantidad de insulina de rata endógena detectada en cada muestra, pero la posibilidad de detección de la insulina de rata no pudo ser completamente descartada. Por lo tanto, los resultados son generalmente reportados como "insulina medida", que puede consistir en una cierta cantidad de insulina de rata endógena, 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 de rendimiento.

Ejemplo 20 - Efecto de la concentración de protamina sobre desempeño del 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 la glucosa de un conjugado de ejemplo. En este ejemplo, I- 6 sintetizado según los métodos descritos en el ejemplo 9 se probó utilizando la formulación generalizada y protocolo in vivo descrito en el ejemplo 19:

Componente	Variable	Volumen (ml)
TSAT- C6- AETM- 2 (I-6) en la solución de 2,7 mg/ml	insulina no modificada = 16,7%	1.000

solución salina amortiguada con 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 con 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

Los experimentos de inyección intraperitoneal de glucosa de 4 horas (4 g/kg) se realizaron al administrar 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 11a- c demuestran que a medida que aumenta la concentración de protamina en la formulación, más prolongada la formulación resultante y más pronunciado el aumento medido en el perfil de la insulina en suero después de la inyección de glucosa de cuatro horas. La formulación 1xP-1xZ libera una parte significativa de la carga del conjugado de insulina durante un corto período de tiempo inmediatamente después de la inyección de tal manera que se detecta una señal muy débil después de la exposición intraperotoneal de glucosa. Por otro lado, la formulación 10xP-4xZ libera una cantidad baja de insulina basal en las primeros cuatro horas, sin hipoglicemia y luego logra un aumento > 4 veces en la concentración de insulina medida inmediatamente después de la inyección intraperitoneal de glucosa.

Ejemplo 21 - Efecto de la concentración de zinc en el rendimiento del conjugado insulina de acción prolongada

El propósito de este ejemplo fue demostrar el efecto de la concentración de zinc sobre la estabilidad de la formulación, 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 9 se probó mediante la formulación generalizada y protocolo *in vivo* descrito en el ejemplo 19:

Componente	Variable	Volumen (ml)
Solución de TSAT- C6-AETM- 2 (I- 6) a 2.7 mg/ml	insulina no modificada = 0%	1.000
solución salina amortiguada con 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 con 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
10xP LXZ	1.15	12.5

10XP- 2xz	2.30	12.5

Se realizaron experimentos de inyección intraperitoneal de glucosa de 4 horas (4 g/kg) administrando 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 las figuras 12a- b y 13a- b demuestran que dentro del error experimental, la concentración de zinc no tiene un efecto significativo sobre la naturaleza global de liberación sostenida de la formulación o el perfil sensible a glucosa. En todos los casos, un aumento estadísticamente significativo en la concentración de insulina medida se observó después de la inyección intraperitoneal de glucosa. Como se demostró en el ejemplo 20, las formulaciones mayores de protamina (10xP) liberan menos conjugado en el tiempo que las formulaciones de protamina inferiores (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 10xP se transformaron de una solución particulada de fácil dispersión a una solución de dos fases aglomerada pegajosa. Esto no sucedió con la formulación 10xP- 4xZ correspondiente. Del mismo modo, la formulación 4xP- LxZ se encontró que se transformó de la misma manera que la formulación 10xP 1xZ mientras que la 4 xP- 2xZ se mantuvo relativamente estable a temperatura ambiente durante semanas. Por lo tanto, la concentración de zinc para una concentración de protamina determinada puede ajustarse fácilmente para preparar formulaciones de fácil dispersión que sean estables durante largos períodos de tiempo.

Ejemplo 22 - Efecto de la concentración de m- cresol en el rendimiento de conjugado insulina de acción prolongada

El propósito de este ejemplo es demostrar el efecto de la concentración de m- cresol en 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 9, se probó mediante la formulación generalizada y el protocolo *in vivo* descrito en el ejemplo 19:

Componente	Variable	Volumen (ml)
Solución TSAT- C6- AETM- 2 (I- 6) a 2.7 mg/ml	Insulina no modificada = 0%	1.000

solución salina amortiguada con 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 con HEPES 25 mM	Concentración de protamina = 12,5 mg/ml	4x0.194 alícuotas

Formulación	Cresol concentración
No cresol	0
4x cresol	12% v/v

Se realizaron experimentos de inyección intraperitoneal de glucosa (4 g/kg) al administrar 15 U/kg (peso corporal en grams/1.87 = microlitros de volumen de inyección) de las dos formulaciones descritas anteriormente. Los resultados mostrados en la Figura 14a- b demuestran que la presencia de m- cresol mantiene una formulación más prolongada. La formulación sin cresol libera una parte significativa de la carga del conjugado de insulina durante un corto período de tiempo inmediatamente después de la inyección, tal que muy poco incremento en la concentración de insulina medida se observa se observa después de exposición intraperitoneal de glucosa. Por otro lado, la formulación de cresol 4x libera una cantidad baja de insulina basal en las primeras cuatro horas, sin hipoglicemia y luego logra un aumento de 3 a 4 veces en la concentración de insulina medida inmediatamente después de la inyección intraperitoneal de glucosa.

Ejemplo 23 - Efecto de la concentración de agente isotónico/sal sobre rendimiento de conjugado de insulina de acción prolongada

El propósito de este ejemplo es demostrar el efecto de la concentración de sal y la elección del agente isotónico 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 9, se probó mediante la formulación generalizada y el protocolo *in vivo* descrito en el ejemplo 19:

Componente	Variable	Volumen (ml)
TSAT- C6- AETM- 2 (I-6) en la solución de 2,7 mg/ml	insulina no modificada = 16,7%	1.000
solución salina amortiguada con 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 7.2en solución salina amortiguada con HEPES 25 mM	Concentración de protamina = 12,5 mg/ml	4x0.194 alícuotas

Formulación	Concentración de NaCl
Sin sal	0.0 M
sal 3.3x	5.0 M
Glicerol	Solución de glicerol puro en cambio de solución salina amortiguada

Se realizaron experimentos de inyección de glucosa 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 15a- c demuestran que la presencia de sal en la formulación mantiene una formulación más prolongada. 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 se observó muy poco incremento en la concentración de insulina medida después de exposición intraperitoneal de glucosa. Por otro lado, la formulación de sal 3.3 x liberó una cantidad basal baja de conjugado en las primeras cuatro horas, sin hipoglicemia y posteriormente alcanzó un incremento de ~ 4 veces en la concentración de insulina medida inmediatamente después de la inyección intraperitoneal de glucosa. Este desempeño fue similar al obtenido con la formulación 10xP- 4xZ del Ejemplo 20, que era exactamente la misma 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 24 - Efecto de la concentración de insulina no modificada sobre el desempeño de conjugado de insulina de acción prolongada

El propósito de este ejemplo es demostrar el efecto de la inclusión de diferentes concentraciones de insulina no modificada en la acción del tiempo y el perfil PK sensible a glucosa de un conjugado de ejemplo. En este ejemplo, 1- 6 sintetizado según los métodos descritos en el ejemplo 9, se probó mediante la formulación generalizada y el protocolo *in vivo* descrito en el ejemplo 19:

Componente	Variable	Volumen (ml)
Solución TSAT- C6-AETM- 2 (I- 6) a 2.7 mg/ml	% de insulina no modificada = ver a continuación	1.000
solución salina amortiguada con 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	3% v/v	0.159

agua		
Solución de protamina pH 7.2 en solución salina amortiguada con HEPES 25 mM	Concentración de protamina = 12,5 mg/ml	alícuotas 4x0.194

Formulación	% No modificada la insulina
01.24	4.17
12.01	8.33
6.1	16.7

Se realizaron experimentos de inyección de glucosa de 4 horas mediante la administración 15 U/kg (peso corporal en grams/1.87 = microlitros de volumen de inyección) de cada una de las tres formulaciones anteriormente descritas. Los resultados mostrados en la Figura 16a- c demuestran que la presencia de insulina no modificada en la formulación benéficamente produce una formulación más prolongada con un aumento sustancial en la concentración de insulina medida después de una inyección intraperitoneal de glucosa. 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 Ejemplo 26).

Ejemplo 25 – Conjugados de insulina de acción prolongada - efecto de respuesta a dosis

En este ejemplo, se evaluó el efecto de respuesta a dosis de una formulación particular de un conjugado de ejemplo de acción prolongada. El Conjugado 1- 6 sintetizado según los métodos descritos en el ejemplo 9, se probó mediante la formulación generalizada y el protocolo *in vivo* descrito en el ejemplo 19:

Componente	Variable	Volumen (ml)
Solución TSAT- C6-AETM- 2 (I- 6) a 2.7 mg/ml	insulina no modificada = 16,7%	1.000

solución salina amortiguada con 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 con HEPES 25 mM	Concentración de protamina = 12,5 mg/ml	alícuotas 4x0.194

Se realizó un experimento de inyección intraperitoneal de glucosa (4g/kg) 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 17, el conjugado mostró un perfil PK plano hasta que la glucosa se inyectó. El aumento en la concentración de insulina medida después exposición intraperitoneal de glucosa fue dramático y dependiente de dosis (comparar datos obtenidos con un 5 U/kg (izquierda) y 15 U/kg (derecha) de dosis de conjugado).

Ejemplo 26 - Estabilidad de conjugados sensibles a glucosa de acción prolongada de ejemplo

En este ejemplo, hemos sintetizado la misma formulación de acción prolongada del ejemplo 25 en una escala 2x. La mitad del material fue almacenado 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 fue redispersado y probado utilizando el mismo protocolo de inyección intraperitoneal de glucosa de cuatro horas descrito en el Ejemplo 25 a 15 U/kg (peso corporal en grams/1.87 = microlitros de volumen de inyección). Como se muestra en las figuras 18- 19, esta formulación demuestra un rendimiento similar incluso después de ser almacenada refrigerada (Figura 18) o a temperatura ambiente (Figura 19) durante por lo menos dos semanas.

Ejemplo 27 – Desempeño de conjugados de acción prolongada preparados a partir de conjugados con la afinidad ligando variable y multivalencia

En este ejemplo, nos dispusimos a determinar la acción del tiempo y perfil farmacocinético sensible a glucosa de formulaciones de acción prolongada de los conjugados construidos a partir de diferentes tipos y números de los ligandos. Todos los conjugados de este ejemplo fueron sintetizados según los métodos descritos en el Ejemplo 9 utilizando las estructuras y los ligandos sacáridos especificados a continuación:

Conjugado	Estructura	Peso Molecular Estructura	Ligando	Peso molecular AE-azúcar	Pureza (HPLC)	PESO MOLECULAR (LC-MS)	De azúcar/insulina
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
L-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	insulina no modificada = 16,7%	1.000

2.7 mg/ml		
solución salina amortiguada con 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 con HEPES 25 mM	Concentración de protamina = 12,5 mg/ml	4x0.194 alícuotas

Se realizaron experimentos de inyección de glucosa de 4 horas mediante la administración 15 U/kg (peso corporal en grams/1.87 = microlitros de volumen de inyección) de cada uno de los conjugados descritos anteriormente. Como se muestra en la Figura 20, todos los conjugados mostraron un perfil de absorción prolongado con algún elemento de aumento en la concentración insulina medida en suero tras la inyección de glucosa de 4 horas. Parece que hubo cierta absorción conjugada importante en las primeras cuatro horas después de la inyección del conjugado de acción prolongada TSPE- AETM- 3 I- 11. Sin embargo, todos los otros conjugados exhibieron perfiles planos de absorción, como los observados para los conjugados TSAT- C6- AETM- 2. Estos resultados se correlacionan bien con el hecho de que las vidas medias de estos conjugados son todas menores que la insulina no modificada como se describe en los Ejemplos 16 a 17 y que cada una de ellas demuestra un aumento inducido por a- MM en perfil PK/PD como se describe en los ejemplos 14- 15.

Ejemplo 28 – Desempeño de conjugados de acción prolongada bajo condiciones de prueba intraperitoneal a- MM

En este ejemplo, hemos probado el perfil el perfil sensible a a- MM de formulaciones de acción prolongada de los conjugados construidos a partir de conjugados TSAT- C6- AETM- 2 (1- 6) y TSAT- C6- GA- 2 (1- 5) conjugados. Ambos conjugados fueron preparados según los

métodos generales descritos en el Ejemplo 9. 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 no modificada = 16,7%	1.000
solución salina amortiguada con 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 con HEPES 25 mM	Concentración de protamina = 12,5 mg/ml	alícuotas 4x0.194

Para probar la naturaleza de liberación sostenida de las formulaciones, así como el perfil PK sensible 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 no diabéticas normales en ayuno (Sprague- Dawley, 400- 500 g, n = 3). Después de un retraso de 240 minutos, una dosis de a- MM (4 g/kg) fue inyectada por vía intraperitonea. Se tomaron muestras de sangre a través de la hemorragia de 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 (prueba de iso-insulina ELISA, Mercodia, Uppsala, Suecia).

Como se muestra en la Figura 21a, la relación de concentración sérica máxima: de referencia después de la inyección intraperitoneal de a- MM para la formulación TSAT- C6-

AETM- 2 (I- 6) de acción prolongada es aún mayor que la observada para la misma formulación cuando la glucosa se sustituye por a- MM. Además, la formulación TSAT- C6- GA- 2 (1- 5) (Figura 21b) no demuestra 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 (1- 5) conjugado es casi idéntica a la insulina no modificada (Ejemplo 16), y que no mostró cambios inducidos por a- MM en PK (Ejemplo 14).

Ejemplo 29 – Conjugados de acción prolongada en diabéticos y no diabéticos

Con el fin de confirmar la utilidad de vivo de la formulación TSAT- C6- AETM- 2 (1- 6) de acción prolongada, ésta se administró (5, 10 y 20 U/kg) a ratas diabéticas normales e inducidas por STZ (Sprague- Dawley Macho, 400- 500 g, n = 6). La formulación se preparó mediante el siguiente procedimiento:

Componente	Variable	Volumen (ml)
Solución TSAT- C6- AETM- 2 (I- 6) a 2.7 mg/ml	insulina no modificada = 0%	1.000
solución salina amortiguada con 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 con HEPES 25 mM	Concentración de protamina = 12,5 mg/ml	alícuotas 4x0.194

No se utilizaron inyecciones intraperitoneales externas de glucosa para activar la bioactividad de los conjugados. En su lugar, se basó en los niveles endógenos de la glucosa en las ratas para controlar el perfil PK y PD de la formulación de conjugado. Tomaron muestras de sangre a través de sangrado por la vena de la cola en diversos 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 22, 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 concentraciones de glucosa superiores 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 con 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 23.

Ejemplo 30 - Comparación de vida media in vivo/tasa de eliminación

Con el fin de determinar la tasa a la que se evacuó el conjugado 6.1 del suero in vivo en la presencia o ausencia de los 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 ratas macho Sprague- Dawley con cánula dual para vena yugular (Taconic, JV/JV, 350- 400g, n = 3).

Para determinar la tasa de eliminación en la presencia de niveles elevados de glucosa, una hora antes del inicio del experimento se conecta una cánula de ratas a una bomba de infusión de jeringa que contiene 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 típicamente fue mayor de 85 uL/min. Una muestra de sangre fue tomada en t = 0 min, tras lo cual una solución de conjugado estéril o insulina de control se inyectó por vía intravenosa a través de la segunda cánula para rata, seguido inmediatamente por una solución de caza 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 de la presencia de a- MM, una hora antes del inicio del experimento una cánula para rata se conectó a una bomba de infusión de jeringa conteniendo una solución estéril al 25% peso/volumen de a- MM. 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, tras lo cual una solución de conjugado estéril o insulina de control se inyectó por vía intravenosa a través de la segunda cánula para rata, seguido inmediatamente por una solución de caza 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 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.

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 y conjugado en suero se midieron posteriormente con un kit ELISA disponible comercialmente (prueba de iso- insulina ELISA, Mercodia, Uppsala, Suecia). Los datos de concentración sérica de insulina o conjugado frente a tiempo se ajustaron mejor con la suma de dos exponenciales independientes de descomposición ($C(t) = \exp(-k_a t) + b \exp(-k_b t)$) según el modelo de dos compartimentos, donde $t1/2\ (a) = (\ln 2)/k_a$ y $t1/2\ (b) = (\ln 2)/k_b$. Los resultados se muestran en la Figura 24. El panel izquierdo demuestra la tasa de eliminación significativamente mayor (> 5 veces) para el conjugado 1- 6 frente RHI en la 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 31 - Glucosa sensibles PK para 1- 6 i.v. infusión

En este ejemplo, el experimento de tasa de eliminación intra venoso descrito en el Ejemplo 30 fue modificado desde un único bolo intra venoso de 0.4 mg de conjugado/kg de peso corporal a una infusión intra venoso continua. El objetivo del experimento era mantener un tasa constante de entrada de conjugado (o RHI como un control) durante seis horas con una inyección i.p. 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 Sprague-Dawley macho (Taconic, JV/JV, 350- 400g, n = 3) con cánula dual en la vena yugular en cada experimento tal que una línea de vena yugular se utilizó para conjugado o infusión RHI y la otra para recolección de sangre.

Para RHI, una solución 50 mU/ml se filtró estéril a través de una membrana de filtración de 0.2 um y se infundió a 0.07 ml/min para proporcionar una tasa constante de entrada de 3.5 mU/min para el experimento de seis horas. Una muestra de sangre fue tomada en t = 0 min, tras lo cual la infusión constante por vía intravenosa se inició. La segunda cánula se utilizó para recolectar muestras de sangre en t = 30, 60, 120, 180 y 240 min. En t = 240 min, una dosis de 4 g/kg de glucosa se administró a través de inyección vía i.p., seguida por recolección de sangre en t = 255, 270, 300, 330 y 360 min.

Para el conjugado I- 6, una solución de 150 mU/ml se filtró estéril a través de una membrana de filtración 0.2 um y se infundió en 0.10 ml/min para proporcionar una tasa de entrada constante de 15 mU/min para todo el experimento de seis horas. Una muestra de sangre fue tomada en t = 0 min, tras lo cual se inició la infusión constante por vía intravenosa. La segunda cánula se utilizó para recolectar muestras de sangre en t = 30, 60, 120, 180 y 240 min. En t = 240 minutos, se administró una dosis de glucosa de 1, 2, o 4 g/kg a través de inyección i.p., seguida por la extracción de sangre en t = 255, 270, 300, 330 y 360 min.

A lo largo de 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 concentraciones de insulina en suero y conjugado en suero se midieron posteriormente con un kit ELISA disponible comercialmente (prueba de iso- insulina ELISA, Mercodia, Uppsala, Suecia).

Los dos primeros paneles de la Figura 25 comparan los perfiles de concentración de glucosa en sangre e insulina/conjugado en suero para una infusión de RHI de 3,5 mU/min e infusión de de 1- 6 de 15 mU/min antes y después de una inyección i.p. de glucosa de 4 g/kg. La infusión de RHI provoca hipoglicemia significativa antes de la inyección de glucosa en comparación con la infusión de 1- 6. Después de la inyección i.p. de glucosa, la concentración insulina en suero medida 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 de base 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 inyección i.p. de glucosa bajo las mismas condiciones experimentales. Los próximos tres paneles de la Figura 25 muestran que el grado en que la concentración de insulina medida aumenta durante inyección i.p. de glucosa está directamente relacionado 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% de 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 4g/kg.

Ejemplo 32 – 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 del suero *in vivo* en presencia o ausencia de azúcares inhibidores tales como 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 ratas macho Sprague- Dawley (Taconic, JV/JV, 350-400g, n = 3) con cánula dual en la vena yugular.

Para determinar la tasa de eliminación en presencia de niveles elevados de glucosa, una hora antes del inicio del experimento se conectó una cánula para ratas 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 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 típicamente fue mayor de 85 uL/min. La muestra de sangre fue tomada en t = 0 min, tras lo cual una solución de conjugado estéril o insulina de control se inyectó por vía intravenosa a través de la segunda cánula para ratas, seguido inmediatamente por una solución de caza de heparina- solución salina para asegurarse 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.

Para determinar la tasa de eliminación en presencia de a- MM, una hora antes del inicio del experimento se conectó una cánula 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, tras 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 de caza de la heparina- solución salina para asegurar que toda la dosis se administró al animal. Después de una descarga adicional de la línea de la 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.

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 y conjugado en suero se midieron posteriormente con un kit ELISA disponible comercialmente (prueba de iso- insulina ELISA, Mercodia, Uppsala, Suecia). Los datos de concentración sérica de insulina o conjugado frente al tiempo se ajustaron mejor con la suma de dos exponenciales independientes de descomposición ($C(t) = a \exp(-k_a t) + b \exp(-k_b t)$) según el modelo de dos compartimentos, donde $t1/2\ (a) = (\ln 2)/k_a$ y $t1/2\ (b) = (\ln 2)/k_b$. El primer panel de la figura 26 muestra que la tasa de eliminación de la insulina no modificada no se ve afectada en presencia de azúcares (glucosa G400 o a- MM). Para efectos de comparación, el último panel de la figura 26 que muestra el conjugado 1- 6 con una infusión de azúcar se grafica a partir de los resultados del Ejemplo 31. El panel central de la figura 26 que muestra conjugado 1- 9 con infusión de azúcar muestra una disminución mucho más pronunciada en la tasa de eliminación (~ 350% frente a ~ 50%) en presencia de glucosa (infusión G400) frente al conjugado **1- 6**. El conjugado **1- 9** también demuestra una disminución más significativa en la tasa de eliminación (~ 700 ~% vs 400%), en presencia de a- MM(infusión de a- MM) versus el conjugado **I- 6**.

Ejemplo 33 - Cristalización de soluciones de conjugado en buffer acuoso

Las dispersiones de conjugados de acción prolongada sintetizados según los ejemplos 25-27 se confirmaron como amorfas (no cristalinas) mediante microscopía de luz y electrónica de barrido. Las dispersiones convencionales de insulina no conjugada formuladas en condiciones similares, por el contrario, suelen ser cristalinas. Las formulaciones cristalinas de conjugados de la insulina pueden ser ventajosas para mejorar reproducibilidad por lotes, lo que aumenta la

estabilidad de la formulación, y disminuye la aglomeración de partículas durante largos períodos de almacenamiento. Por lo tanto, nos propusimos determinar si existe un conjunto apropiado de condiciones acuosas susceptibles de cristalizar nuestros conjugados.

Un conjunto de 48 soluciones de screening de cristalización (HR2- 144) fue adquirido en Hampton Research, Inc. (Alta Vista, CA), junto con las placas de difusión de Vapor por gota colgante ("hanging drop") especialmente diseñadas. En pocas palabras, un delgado lecho de sellante de crubeobjetos se aplicó al borde superior de cada uno de los 24 depósitos en cada una de las dos placas. 1 ml de Reactivo Index 1 fue pipeteado en el resorvorio Al, y 1 ml de reactivo de índice 2 se pipeta en el depósito A2, y así sucesivamente. Dos microlitros de una solución de conjugado de 2.5 mg/ml en agua destilada se agregó en el centro de un lugar limpio, con un cubreobjetos limpio circular con diámetro de 22 mm siliconado y se mezcló con 2 microlitros del reactivo Index 1 desde el depósito 1. La tapa deslizante se invirtió y se selló sobre el reservorio Al de manera que la gota estuvo congaldo por encima de la solución de reservorio. Todo este proceso se repitió para todas las 48 soluciones de Índice probadas, y las placas se dejaron sentar a temperatura ambiente durante la noche antes de la observación a través de un microscopio de luz.

Los resultados del experimento de *screening* se resumen en la Figura 27. La mayoría de las 48 soluciones Índice no produjeron partículas cristalinas o más bien ninguna precipitación en últimas. El buffer índice19 (pH 8.2, 0,056 M monohidrato monobásico de fosfato sódico con 1.344 M de fosfato potásico dibásico) claramente produjo la mayor cantidad de cristales bien definidos. Más pruebas utilizando Buffer índice 19 revelaron formación sustancial de cristales con los conjugados **1- 6** y **1- 9** TSAT- Cg- AEM- 2 (B29) y TSPE- AEM- 3 (B29). Las estructuras de estos compuestos se muestran en la Figura 2. La figura 28 muestra imágenes de micrografía electrónica de barrido (SEM) de los cristales representativos formados utilizando Buffer 19 con los conjugados I- 6 y I- 7 TSAT- Cg- AETM- 2 (B29) y TSAT- Ce- AEM- 2 (B29)

Ejemplo 34 – Formulaciones de protamina neutral de acción prolongada a partir de conjugados pre- cristalizados

Un lote experimental a nivel industrial de cristales sintetizados utilizando una mezcla 50/50 v/v (0.5 ml de 2.5 mg/ml de conjugado TSAT- C_6- AETM- 2 (B29) 1- 6 y 0.5 ml de Buffer

Indice 19) se preparó y se dejó sentar durante 24 horas a temperatura ambiente para permitir cristalización plena y completa. A 0.5 ml de la dispersión resultante, se agregó 0.0795 ml de una solución de m- cresol al 3%, seguido de 0.097 ml de 50 mg/ml de solución de protamina (pH ajustado a 7.0). La dispersión resultante se mezcló suavemente durante aproximadamente 2 horas antes de administrar a ratas.

Se realizó el siguiente experimento para probar la liberación sostenida y perfiles PK sensibles a glucosa para la dispersión cristalina (no se agregó protamina ni m- cresol) así como también la dispersión conteniendo protamina/cresol descrita anteriormente. Detrás de los cuellos de ratas no diabéticas en ayuno (Sprague- Dawley, 400- 500 g, n = 2 cada uno), se inyectó dispersión de cristal no protamina con un volumen (en microlitros) igual al peso corporal de los animales (en gramos) dividido por 2.19, y la dispersión de cristales conteniendo protamina/cresol se inyectó con un volumen (en microlitros) igual al peso corporal de los animales (en gramos) dividido por 1,62. Después de un retraso de 240 minutos, una dosis de glucosa (4 g/kg) fue inyectada 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 inical 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 (prueba de iso-insulina ELISA, Mercodia, Uppsala, Suecia).

Como se muestra en la Figura 30, los cristales conteniendo protamina/m- cresol exhibieron un perfil de absorción prolongada extremadamente plano con un aumento significativo sensible a glucosa en concentración sérica después de la inyección de glucosa de 4 horas. La dispersión cristalina sin protamina y m- cresol, sin embargo, mostró una liberación en bolo grande de conjugado inmediatamente después de la inyección seguido por un cierto aumento sensible a glucosa en la concentración sérica después de la inyección de glucosa de 4 horas (Figura 29). Estos resultados indican la importancia de combinar protamina y m- cresol con los cristales para mantener el perfil farmacocinético deseado de acción prolongada.

Este mismo experimento se repitió con el conjugado I- 7 TSAT- C6- AEM- 2 (B29). Un lote experimental a nivel industrial de cristales sintetizados utilizando una mezcla 50/50/ v/v (1,0 ml de 2,5 mg/ml de conjugado + 1.0 ml de búfer de índice 19) se preparó y se deja reposar

durante 24 horas a temperatura ambiente para permitir plena y completa cristalización. A 1.0 ml de la dispersión resultante de cada conjugado, se agregó 0.159 ml de una solución de m- cresol al 3% seguido de 0.194 ml de una solución de protamina 50 mg/ml (pH ajustado a 7,0). Las dispersiones resultantes se mezclaron suavemente durante aproximadamente 2 horas antes de administrar en ratas.

Detrás de los cuellos de ratas no diabéticas en ayuno (Sprague- Dawley, 400- 500 g, n = 3), se inyectó la dispersión de cristales conteniendo protamina/cresol con un volumen (en microlitros) igual al peso corporal de los animales (en gramos) dividido por 1,62. Después de un retraso de 240 minutos, se inyectó IP una dosis de glucosa (4 g/kg). Tomaron muestras de sangre a través de hemorragia en 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 (prueba de iso- insulina ELISA, Mercodia, Uppsala, Suecia). De acuerdo a las especificaciones de ensayo del fabricante, la prueba de iso-insulina ELISA tiene reactividad cruzada del 71% con la insulina de rata. Las muestras de suero se diluyeron 10x con el fin de minimizar la cantidad de insulina de rata endógena detectada en cada muestra, pero la posibilidad de detección de insulina de rata no puede ser completamente descartada. Por lo tanto, los resultados generalmente se reportan como la "insulina medida", que puede consistir de alguna cantidad de insulina de rata endógena, además del conjugado.

Como se muestra en la Figura 31, los cristales que contienen protamina/cresol exhibieron un perfil de absorción prolongado extremadamente plano con un aumento significativo de la concentración insulina sérica medida después de la inyección de glucosa de 4 horas.

Las dispersiones de cristales de protamina/cresol descritas anteriormente no requieren adición de insulina libre no conjugada para mantener la estabilidad y mejorar el desempeño en el tiempo. Hemos encontrado que, incluso después de varias semanas de almacenamiento refrigerado, cada dispersión cristalina realiza lo mismo que el material recién preparado.

Ejemplo 35 – Formulaciones neutrales de protamina a partir de conjugados pre-cristalizados a resistencia fisiológica de buffer

Las dispersiones cristalinas que contienen protamina/cresol descritas anteriormente contienen aún mucho más que las concentraciones fisiológicas de potasio y fosfato que pueden llevar potencialmente a la inflamación no deseada del sitio de inyección tras la dosificación repetida. El siguiente experimento se realizó para determinar si los cristales, una vez formados, se mantuvieron estables en solución salina fisiológica que contiene protamina y cresol. Se mezcló 3.0 ml de conjugado 9.1 TSPE- AEM- 3 (B29) (2.5 mg/ml) con 3.0 ml de Buffer 19 y se dejó reposar a temperatura ambiente durante la noche para permitir la cristalización plena y completa. Al día siguiente se agregó 0.956 ml de solución de m- cresol al 3% y 1,164 ml de solución de protamina 50 mg/ml (pH 7,0) a la dispersión resultante y se dejó reposar toda la noche a 4 ° C. Al día siguiente, la dispersión se centrifugó a 1.000 g durante tres minutos después de lo cual 7.5 ml de sobrenadante fue retirado seguido por redispersión en 5.6 ml de solución salina amortiguada por fosfato 1x (PBS). A 2.8 ml de la dispersión resultante, se agregó 0.447 ml de solución de m- cresol al 3%, 0.204 ml de 1x PBS, y 0.338 ml de una solución de protamina 50 mg/ml (pH 7,0). La dispersión resultante se almacenó a 4 ° C durante la semana antes de la prueba en ratas.

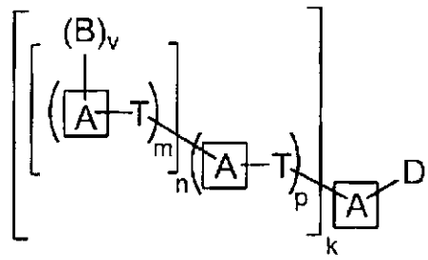
La dispersión cristalina añejada se inyectó a un volumen (en microlitros) igual al peso corporal de los animales (en gramos) dividido por 1.62 detrás de los cuellos de ratas no diabéticas en ayuno (Sprague- Dawley, 400- 500 g, n = 3). Después de un retraso de 240 minutos, se inyectó intraperitonealmente una dosis de glucosa (4 g/kg). Se tomaron muestras de sangre a través de hemorragia en 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 de conjugado inicial. 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 (prueba de iso- insulina ELISA, Mercodia, Uppsala, Suecia). Como se muestra en la Figura 32, los cristales dispersos y añejados en lx PBS conteniendo cresol y protamina exhibieron un perfil de absorción prolongado muy plano con un importante aumento sensible a glucosa de la concentración sérica después de la inyección de glucosa de 4 horas.

OTRAS REALIZACIONES

Otras realizaciones del invento serán evidentes para los expertos en el estado de la técnica a partir de una consideración de la especificación o la práctica de la divulgación aquí descrita. La intención es que la especificación y los ejemplos se consideren como de ejemplo unicamente, con el verdadero alcance y espíritu del invento que se indica en las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de insulina cristalina de la fórmula (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 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 que incluye un sacárido;

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^I;

W^I es una molécula de insulina;

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^I;

k es un entero entre 1 y 12, inclusive;

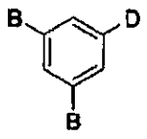
cada ocurrencia de p es independientemente un entero entre 1 y 5, inclusive; y

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

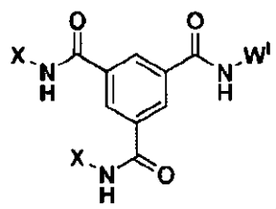
cada ocurrencia de v es independientemente un entero de 0 a 5, inclusive, con la salvedad de que dentro de cada ramificación- k al menos una ocurrencia de n es ≥ 1 y al menos una ocurrencia de v es ≥ 1.

2. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 1, en donde el conjugado es de la fórmula (IIIa):



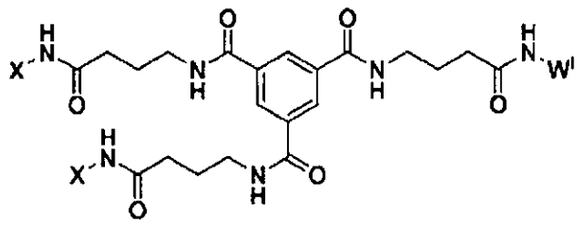
IIIa

3. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 2, en donde el conjugado es de la fórmula (IIIa- 1):



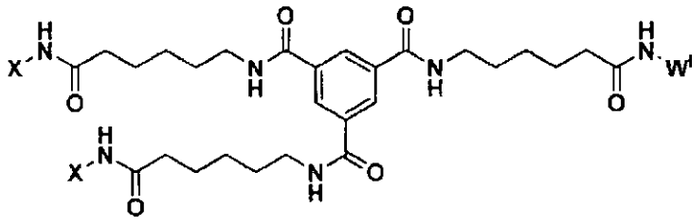
IIIa-1

4. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 2, en donde el conjugado es de la fórmula (IIIa- 2):



IIIa-2

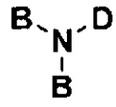
5. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 2, en donde el conjugado es de la fórmula (IIIa- 3):



IIIa-3

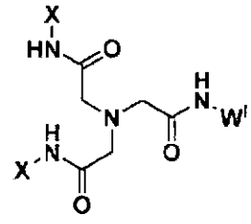
5

6. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 1, en donde el conjugado es de la fórmula (IIIb):



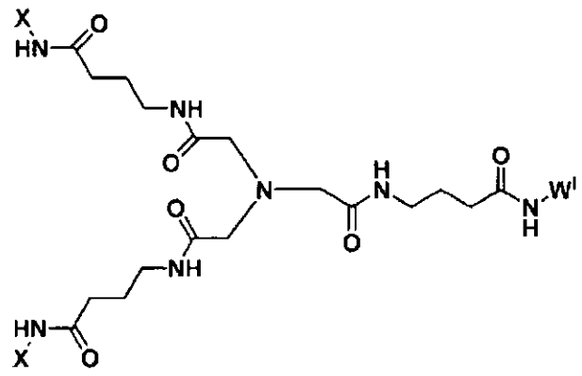
IIIb

10 7. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 6, en donde el conjugado es de la fórmula (IIIb- 1):



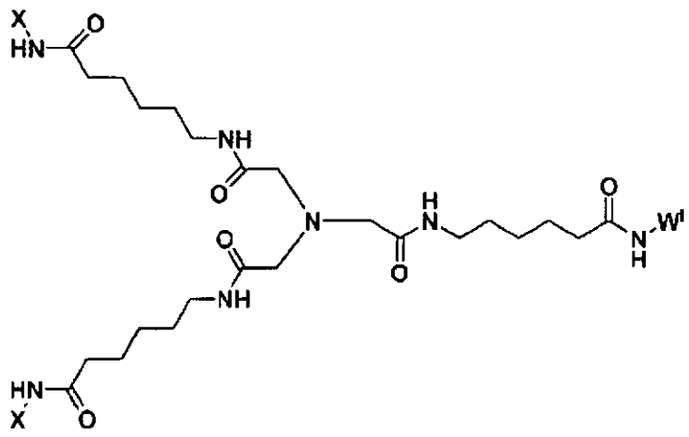
IIIb-1

8. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 6, en donde el conjugado es de la fórmula (IIIb- 2):



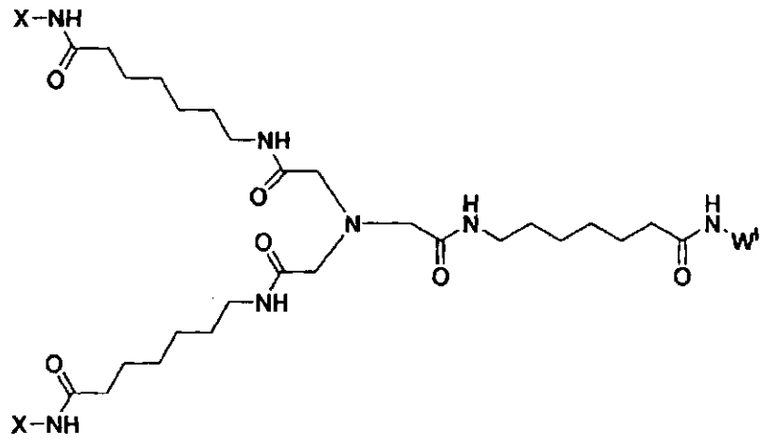
IIIb-2

9. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 6, en donde el conjugado es de la fórmula (IIIb- 3):



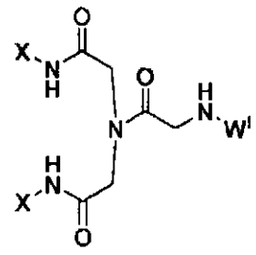
IIIb-3

10. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 6, en donde el conjugado es de la fórmula (IIIb- 4):



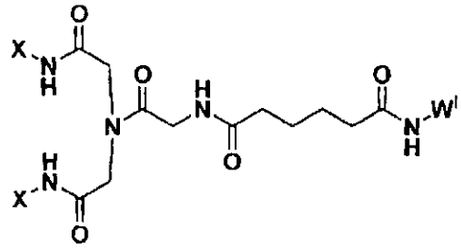
IIIb-4

11. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 6, en donde el conjugado es de la fórmula (IIIb- 5):



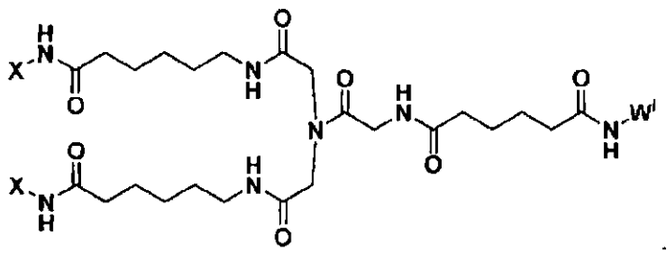
IIIb-5

12. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 6, en donde el conjugado es de la fórmula (IIIb- 6):



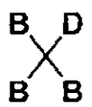
IIIb-6

13. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 6, en donde el conjugado es de la fórmula (IIIb- 7):



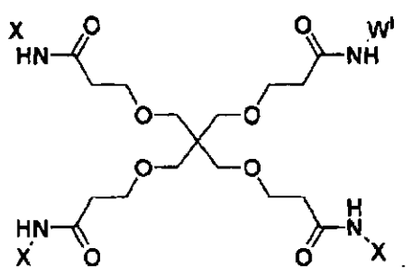
IIIb-7

14. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 1, en donde el conjugado es de la fórmula (IIIc):



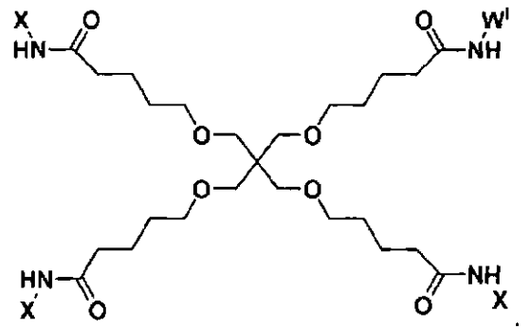
IIIc

15. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 14, en donde el conjugado es de la fórmula (IIIc- 1):



IIIc-1

16. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 14, en donde el conjugado es de la fórmula (IIIc- 2):



IIIc-2

17. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 2, 6 o 14, en donde cada ocurrencia de T es independientemente una cadena de hidrocarburos C_{1-20} bivalentes, lineales o ramificados, saturados o no saturados, opcionalmente sustituidos 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)SC>2- , - $SO_2N(R)$- , un grupo heterocíclico, un grupo arilo, o un grupo heteroarilo.

18. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 17, en donde uno, dos, tres, cuatro, o cinco 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.

19. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 17, en donde T se construye a partir de una cadena de hidrocarburos C_{1-10} 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.

20. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 17, en donde una o más unidades de metileno de T se reemplazan por - C(O)- .

21. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 17, en donde una o más unidades de metileno de T se reemplaza por - C(O)N(R)- .

22. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 17, en donde una o más unidades de metileno de T se reemplaza por - O- .

23. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 17, en donde cada ocurrencia de T es la misma.

24. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 2, 6 o 14, en donde L^B y/o L^D es un enlace covalente.

25. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 2, 6 o 14, en donde L^B y/o L^D es una fracción opcionalmente sustituida derivada a partir de conjugar una fracción opcionalmente sustituida de reactivo de carbonilo, reactivo de tiol, reactivo de amina, o reactivo de hidroxilo de T con un grupo carboxilo, tiol, amina, o hidroxilo de X o W^1.

26. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 2, 6 o 14, en donde L^B y/o L^D es una fracción opcionalmente sustituida derivada a partir de conjugar una fracción opcionalmente sustituida de reactivo de carboxilo, reactivo de tiol, reactivo de amina, o reactivo de hidroxilo de X o W^1 con un grupo carboxilo, tiol, amina, o hidroxilo de T.

27. El conjugado de insulina cristalina de cualquiera de las reivindicaciones 1- 26, en donde la molécula de insulina se selecciona a partir del grupo que consta de insulina humana, insulina porcina, e insulina bovina.

28. El conjugado de insulina cristalina de cualquiera de las reivindicaciones 1- 26, en donde la molécula de insulina se selecciona a partir del grupo que consta de la insulina lispro, insulina aspart e insulina glulisina.

29. El conjugado de insulina cristalina de cualquiera de las reivindicaciones 1- 26, en donde la molécula de insulina es insulina glargina o insulina detemir.

30. El conjugado de insulina cristalina de cualquiera de las reivindicaciones 1- 26, en donde la molécula de insulina incluye tres puentes de disulfuro.

31. El conjugado de insulina cristalina de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la molécula de insulina se conjuga a través del grupo épsilon- amino de Lys^{B29}.

32. El conjugado de insulina cristalina de cualquiera de las reivindicaciones 1- 26, en donde la molécula de insulina es insulina humana conjugada a través del grupo épsilon- amino de Lys^{B29}.

33. El conjugado de insulina cristalina de cualquiera de las reivindicaciones 1- 32, en donde cada ocurrencia de X es un ligando que incluye una bimanosa.

34. El conjugado de insulina cristalina de cualquiera de las reivindicaciones 1- 32, en donde cada ocurrencia de X es a ligando que incluye una trimanosa.

35. El conjugado de insulina cristalina de cualquiera de las reivindicaciones 1- 32, en donde cada ocurrencia de X es un ligando que incluye una trimanosa lineal.

36. El conjugado de insulina cristalina de cualquiera de las reivindicaciones 1- 32, en donde cada ocurrencia de X es un ligando que incluye una trimanosa ramificada.

37. El conjugado de insulina cristalina de cualquiera de las reivindicaciones 1- 32, en donde cada ocurrencia de X es un ligando que incluye un sacárido y un grupo amina.

38. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 37, en donde el sacárido y grupo amina son separados por un grupo C_1- C_6alquilo.

39. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 38, en donde cada ocurrencia de X es independientemente un ligando que incluye aminoetilglucosa (AEG), aminoetilmanosa (AEM), aminoetilbimanosa (AEBM) o aminoetiltrimanosa (AETM).

40. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 39, en donde cada ocurrencia de X es un ligando que incluye aminoetiltrimanosa (AETM).

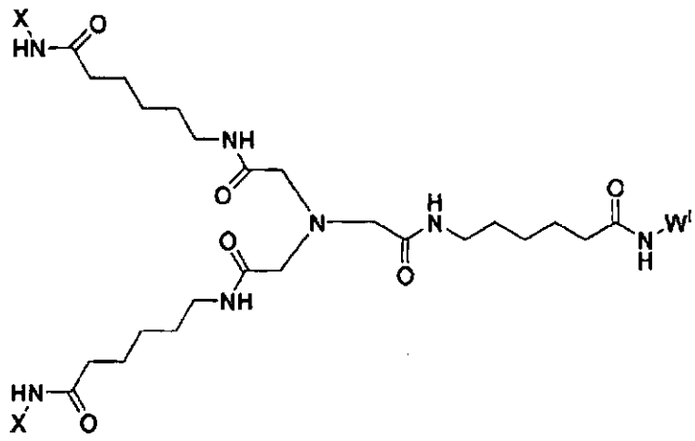
41. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 40, en donde el conjugado incluye dos o tres ocurrencias donde X es un ligando que incluye aminoetiltrimanosa (AETM).

42. El conjugado de insulina cristalina de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde cada ocurrencia de X es un ligando que incluye un sacárido que se conjuga vía un carbono anomérico.

43. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 42, en donde el carbono anomérico es un alfa anómero.

44. El conjugado de insulina cristalina de cualquiera de las reivindicaciones 1- 30, en donde cada ocurrencia de X es aminoetiltrimanosa (AETM) conjugada a la estructura de conjugado vía un carbono anomérico alfa; y W^1 es una molécula de insulina conjugada con la estructura de conjugado vía el grupo épsilon amino de Lys^{B29}.

45. Un conjugado de insulina cristalina de la fórmula (IIIb- 3):

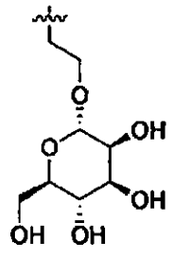


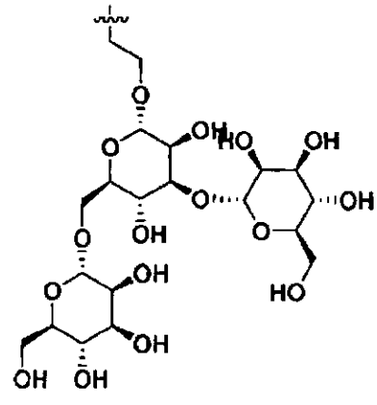
IIIb-3

en donde:

W^1 es una molécula de insulina; y

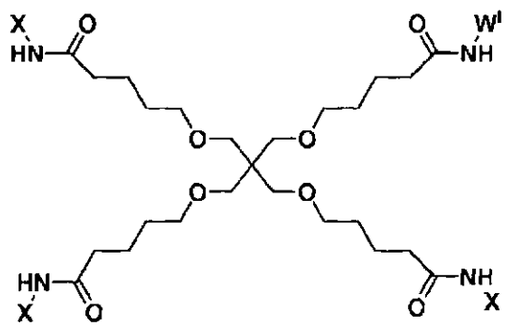
cadaocurrencia de - X es





o

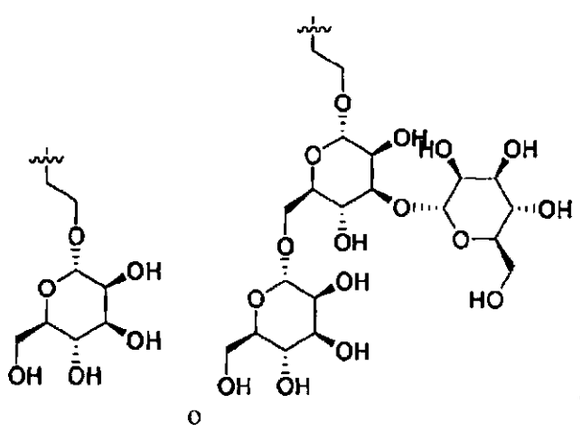
46. Un conjugado de insulina cristalina de la fórmula (IIIc- 2):



IIIc-2

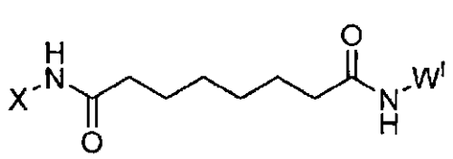
en donde: W^1 es una molécula de insulina; y

cada ocurrencia de - X es



o

47. Un conjugado de insulina cristalina de la fórmula (IIId- 1):

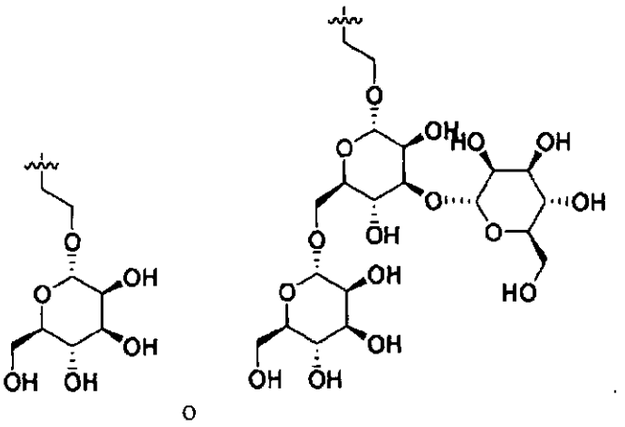


IIId-1

en donde:

W^1 es una molécula de insulina; y

cada ocurrencia de - X es



48. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 45, 46 o 47, en donde la molécula de insulina se selecciona a partir del grupo que consta de insulina humana, insulina porcina, e insulina bovina.

49. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 45, 46, o 47, en donde la molécula de insulina se selecciona a partir del grupo que consta de la insulina lispro, insulina aspart e insulina glulisina.

50. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 45, 46, o 47, en donde la molécula de insulina es insulina glargina o insulina detemir.

51. Un conjugado de insulina cristalina que comprende una molécula de insulina conjugada con uno o más ligandos que son independientemente seleccionados a partir del grupo que consta de aminoetilglucosa (AEG), aminoetilmanosa (AEM), aminoetilbimanosa (AEBM), aminoetiltrimanosa (AETM), β-aminoetil- N - acetilglucosamina (AEGA), y aminoetilfucosa (AEF).

52. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 51, en donde la molécula de insulina se conjuga a través del grupo épsilon- amino de Lys^{B29}.

53. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 52, en donde el uno o más ligandos son aminoetilglucosa (AEG).

54. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 52, en donde el uno o más ligandos son aminoetilmanosa (AEM).

55. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 52, en donde el uno o más ligandos son aminoetilbimanosa (AEBM).

56. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 52, en donde el uno o más ligandos son aminoetiltrimanosa (AETM).

57. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 52, en donde uno o más ligandos son β-aminoetil- N - acetilglucosamina (AEGA).

58. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 52, en donde el uno o más ligandos son aminoetilfucosa (AEF).

59. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 51, en donde la molécula de insulina se conjuga con dos o más ligandos separados.

60. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 59, en donde la molécula de insulina se conjuga con dos ligandos diferentes.

61. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 59, en donde la molécula de insulina se conjuga a tres ligandos diferentes.

62. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 59, en donde los dos o más ligandos separados se conjugan con una única estructura de conjugados que también se conjuga con la molécula de insulina.

63. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 59, en donde los dos o más ligandos separados y la molécula de insulina se localizan sobre una ramificación separada de una única estructura de conjugados ramificado.

64. El conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 59, en donde los dos o más ligandos separados y la molécula de insulina se localizan sobre los extremos de ramificaciones separadas de una única estructura de conjugado ramificado.

65. El conjugado de insulina cristalina de cualquiera de las reivindicaciones 59- 64, en donde los dos o más ligandos separados son aminoetilglucosa (AEG).

66. El conjugado de insulina cristalina de cualquiera de las reivindicaciones 59- 64, en donde los dos o más ligandos separados son aminoetilmanosa (AEM).

67. El conjugado de insulina cristalina de cualquiera de las reivindicaciones 59- 64, en donde los dos o más ligandos separados son aminoetilbimanosa (AEBM).

68. El conjugado de insulina cristalina de cualquiera de las reivindicaciones 59- 64, en donde los dos o más ligandos separados son aminoetiltrimanosa (AETM).

69. El conjugado de insulina cristalina de cualquiera de las reivindicaciones 59- 64, en donde los dos o más ligandos separados son β- aminoetil- N- acetilglucosamina (AEGA).

70. El conjugado de insulina cristalina de cualquiera de las reivindicaciones 59- 64, en donde los dos o más ligandos separados son aminoetilfucosa (AEF).

71. Un conjugado de insulina cristalina que comprende una molécula de insulina conjugada con aminoetilglucosa (AEG).

72. Un conjugado de insulina cristalina que comprende una molécula de insulina conjugada con aminoetilmanosa (AEM).

73. Un conjugado de insulina cristalina que comprende una molécula de insulina conjugada con aminoetilbimanosa (AEBM).

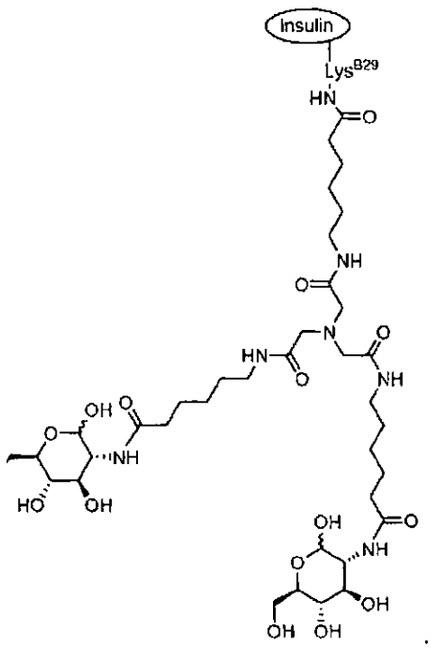
74. Un conjugado de insulina cristalina que comprende una molécula de insulina conjugada con aminoetiltrimanosa (AETM).

75. Un conjugado de insulina cristalina que comprende una molécula de insulina conjugada con β- aminoetil- N- acetilglucosamina (AEGA).

76. Un conjugado de insulina cristalina que comprende una molécula de insulina conjugada con aminoetilfucosa (AEF).

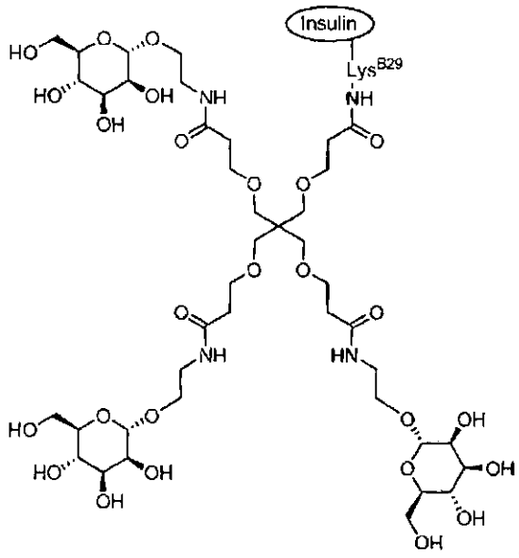
77. El conjugado de insulina cristalina de cualquiera de las reivindicaciones 71- 76, en donde la molécula de insulina se conjuga a través del grupo épsilon- amino de Lys^{B29}.

78. Un conjugado de insulina cristalina de la fórmula:



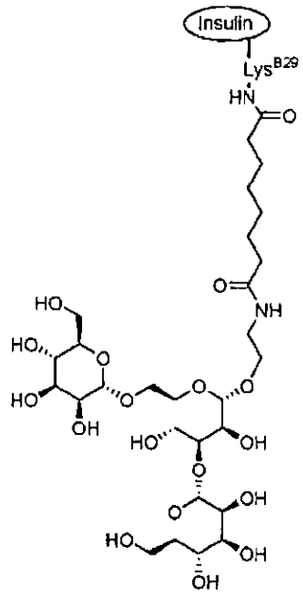
I-5

82. Un conjugado de insulina cristalina de la fórmula:



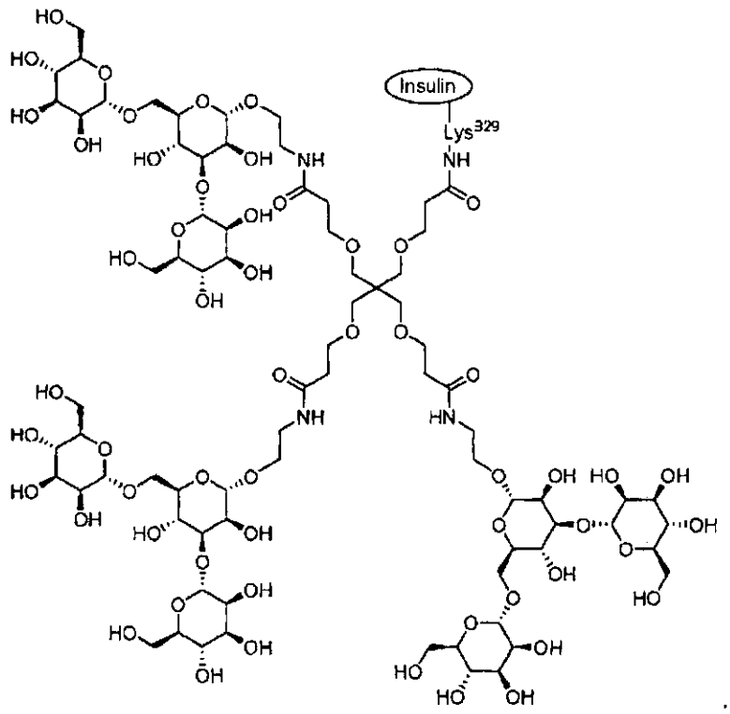
I-9

83. Un conjugado de insulina cristalina de la fórmula:



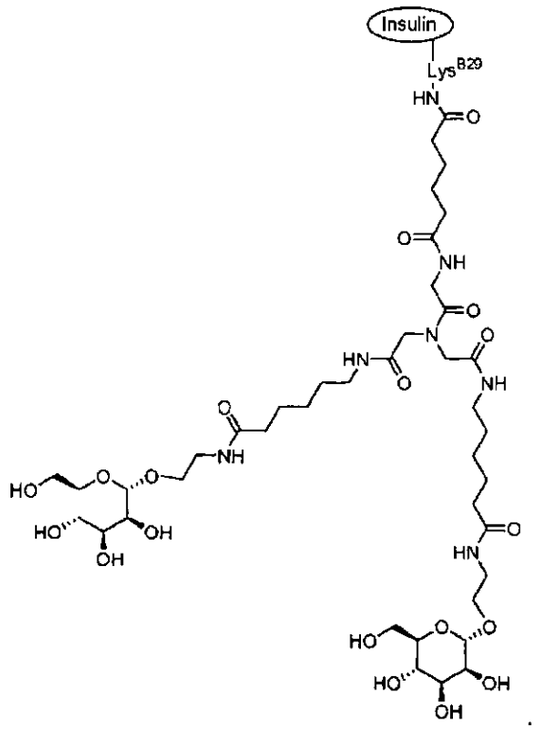
I-10

84. Un conjugado de insulina cristalina de la fórmula:



I-11

85. Un conjugado de insulina cristalina de la fórmula:



I-17

86. Una formulación de liberación sostenida que comprende un conjugado de insulina cristalina de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

87. La formulación de la reivindicación 86, en donde la formulación exhibe una liberación de orden cero del conjugado cuando se administra en un mamífero en condiciones de ayuno.

88. La formulación de la reivindicación 86, en donde la formulación exhibe una liberación de orden cero del conjugado cuando se administra subcutáneamente en un mamífero en condiciones de ayuno.

89. La formulación de la reivindicación 86, en donde la formulación comprende protamina.

90. La formulación de la reivindicación 86, en donde la formulación comprende protamina y zinc.

91. La formulación de la reivindicación 90, en donde la formulación incluye entre 0.05 y 10 mg aproximadamente de protamina/mg de conjugado.

92. La formulación de la reivindicación 90, en donde la formulación incluye entre 1 y 5 mg aproximadamente de protamina/mg de conjugado.

93. La formulación de la reivindicación 90, en donde la formulación incluye entre 0.006 y 0.5 mg aproximadamente de zinc/mg de conjugado.

94. La formulación de la reivindicación 90, en donde la formulación incluye entre 0.1 y 0.25 mg aproximadamente de zinc/mg de conjugado.

95. La formulación de la reivindicación 90, en donde la formulación incluye protamina y zinc en una proporción (peso/peso) en un rango entre 100:1 y 5:1 aproximadamente.

96. La formulación de la reivindicación 90, en donde la formulación incluye protamina y zinc en una relación (peso/peso) en un rango entre 40:1 y 10:1 aproximadamente.

97. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones 86- 96, en donde la formulación comprende además un conservante antimicrobiano.

98. La formulación de la reivindicación 97, en donde el conservante antimicrobiano se selecciona a partir del grupo que consta de m- cresol, fenol, metilparabeno, y propilparabeno.

99. La formulación de la reivindicación 97, en donde el conservante antimicrobiano es m- cresol.

100. La formulación de la reivindicación 99, en donde la formulación comprende entre 0.1 y 1.0% v/v aproximadamente de m- cresol.

101. La formulación de la reivindicación 99, en donde la formulación comprende entre 0.15 y 0.35% v/v aproximadamente de m- cresol.

102. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones 86- 96, en donde la formulación comprende además un agente isotónico.

103. La formulación de la reivindicación 102, en donde el agente isotónico es un poliol.

104. La formulación de la reivindicación 103, en donde el agente isotónico se selecciona a partir del grupo que consta de manitol, glicol de propileno y glicerol.

105. La formulación de la reivindicación 104, en donde el agente isotónico es glicerol.

106. La formulación de la reivindicación 102, en donde el agente isotónico es una sal.

107. La formulación de la reivindicación 106, en donde la sal es NaCl.

108. La formulación de la reivindicación 107, en donde la formulación comprende entre 0.05 y 0.5 M aproximadamente de NaCl.

109. La formulación de la reivindicación 108, en donde la formulación comprende entre 0.1 y 0.2 M aproximadamente de NaCl.

110. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones 86- 96, en donde la formulación además comprende una cantidad de molécula de insulina no conjugada.

111. La formulación de la reivindicación 110, en donde la formulación comprende una relación molar de conjugado de insulina cristalina a la molécula de insulina sin conjugar en un rango entre 100:1 y 1:1 aproximadamente.

112. La formulación de la reivindicación 110, en donde la formulación comprende una relación molar de conjugado de insulina cristalina a la molécula de insulina sin conjugar en el rango entre 25:1 y 2:1 aproximadamente.

113. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones 86- 112, en donde el conjugado de insulina cristalina es cualquiera de los conjugados de la insulina cristalinos de las reivindicaciones 78- 85.

114. La formulación de la reivindicación 113, en donde el conjugado de insulina cristalina es el conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 79, 80, u 82.

115. La formulación de la reivindicación 114, en donde el conjugado de insulina cristalina es el conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 79.

116. Un sistema de liberación de bomba que comprende una suspensión de un conjugado de insulina cristalina de cualquiera de las reivindicaciones 1- 85, en donde el sistema de liberación de bomba opera de tal manera que infunde la suspensión de conjugado de insulina cristalina en un mamífero.

117. La bomba de la reivindicación 116, en donde la bomba opera de tal manera que infunde la suspensión de conjugado de insulina cristalina de manera subcutánea o intraperitoneal.

118. La bomba de la reivindicación 116 o 117, en donde el conjugado de insulina cristalina es cualquiera de los conjugados de la insulina cristalinos de las reivindicaciones 78- 85.

119. La bomba de la reivindicación 118, en donde el conjugado de insulina cristalina es el conjugado de insulina cristalina de las reivindicaciones 79, 80, u 82.

120. La bomba de la reivindicación 119, en donde el conjugado de insulina cristalina es el conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 79.

121. Un método de tratar la hiperglicemia el cual comprende administrar un conjugado de insulina cristalina o una formulación del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1- 115 en un paciente mamífero en necesidad del mismo.

122. El método de la reivindicación 121, en donde el paciente es diabético.

123. El método de la reivindicación 121, en donde el paciente tiene una infección asociada con un deteriorado control glicémico.

124. El método de la reivindicación 121, en donde la formulación no incluye una lectina.

125. El método de la reivindicación 121, en donde la formulación se administra mediante inyección subcutánea.

126. El método de la reivindicación 121, en donde el paciente es un humano.

127. El método de cualquiera de las reivindicaciones 121- 126, en donde el conjugado de insulina cristalina es cualquiera de los conjugados de insulina cristalina de las reivindicaciones 78- 85.

128. El método de la reivindicación 127, en donde el conjugado de insulina cristalina es el conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 79, 80, u 82.

129. El método de la reivindicación 128, en donde el conjugado de insulina cristalina es el conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 79.

130. El método de la reivindicación 121, en donde el conjugado de insulina cristalina o una formulación del mismo se administra de tal manera que la dosis diaria promedio de la molécula de insulina está en el rango de 10 a 200 U.

131. El método de la reivindicación 130, en donde el conjugado de insulina cristalina o una formulación del mismo se administra diariamente.

132. El método de la reivindicación 130, en donde el conjugado de insulina cristalina o una formulación del mismo se administra una vez por semana.

133. El método de la reivindicación 130, en donde el conjugado de insulina cristalina o una formulación del mismo se administra una vez por mes.

134. El método de la reivindicación 130, en donde el paciente también recibe un sensibilizador de insulina.

135. El método de la reivindicación 130, en donde el paciente también recibe un secretagogo de insulina.

136. Un método que comprende administrar un conjugado de insulina cristalina o una formulación del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1- 115 en un paciente mamífero en necesidad del mismo.

137. El método de la reivindicación 136, en donde el conjugado de insulina cristalina induce menos hipoglicemia que una versión sin conjugar de la molécula de insulina.

138. El método de la reivindicación 136 o 137, en donde el conjugado de insulina cristalina es cualquiera de los conjugados de insulina cristalina de las reivindicaciones 78- 85.

139. El método de la reivindicación 138, en donde el conjugado de insulina cristalina es el conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 79, 80, u 82.

140. El método de la reivindicación 138, en donde el conjugado de insulina cristalina es el conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 79.

141. Un método que comprende administrar una formulación de cualquiera de las reivindicaciones 86- 96 en un paciente mamífero en necesidad del mismo.

142. El método de la reivindicación 141, en donde la formulación induce menos hipoglicemia que una formulación que comprende una versión sin conjugar de la molécula de insulina.

143. El método de la reivindicación 141, en donde la formulación induce un HbAlc menor que una formulación que comprende una versión sin conjugar de la molécula de insulina.

144. El método de cualquiera de las reivindicaciones 141- 143, en donde la formulación comprende el conjugado de insulina cristalina de cualquiera de las reivindicaciones 78- 85.

145. El método de la reivindicación 144, en donde la formulación comprende el conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 79, 80, u 82.

146. El método de la reivindicación 145, en donde la formulación comprende el conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 79.

147. El método de cualquiera de las reivindicaciones 136- 146, que comprende además administrar una cantidad activadora de un sacárido exógeno al paciente.

148. El método de la reivindicación 147, en donde el sacárido exógeno es manosa.

149. El método de la reivindicación 147, en donde el sacárido exógeno es L- fucosa.

150. El método de la reivindicación 147, en donde el sacárido exógeno es N- acetil glucosamina

151. El método de la reivindicación 147, en donde el sacárido exógeno es alfa- metil manosa.

152. El método de la reivindicación 147, en donde el conjugado o formulación y el sacárido exógeno se administran al mamífero a través de diferentes rutas.

153. El método de la reivindicación 147, en donde el conjugado o formulación se administra por vía subcutánea y el sacárido exógeno se administra por vía oral.

154. El método de la reivindicación 147, en donde el conjugado o formulación se administra por vía subcutánea y el sacárido exógeno se administra por vía intravenosa.

155. Un método de fabricar un conjugado de insulina cristalina de cualquiera de las reivindicaciones 1- 85 que comprende cristalizar el conjugado de la insulina de un buffer de fosfato.

156. El método de la reivindicación 155, en donde el buffer tiene una concentración mayor de potasio que de sodio.

157. El método de la reivindicación 155, en donde el buffer tiene una concentración mayor de fosfato potásico monobásico que de fosfato sódico dibásico.

158. El método de la reivindicación 155, en donde el buffer tiene un pH en un rango entre 6 y 9.

159. El método de la reivindicación 155, en donde el buffer tiene un pH de 8 aproximadamente.

160. El método de la reivindicación 155, en donde el buffer tiene un pH de 8.2.

161. El método de la reivindicación 155, en donde el conjugado de insulina cristalina se conjuga en Lys^{B29}.

162. El método de la reivindicación 155, en donde el conjugado de insulina cristalina es el conjugado de insulina cristalina de la reivindicación 79, 80, u 82.

163. El método de la reivindicación 155, en donde se agregan uno o más aditivos, en donde el aditivo se selecciona a partir del grupo que consta de cresol, fenol, protamina, poli(arginina), glicerol, cloruro de zinc, o acetato de zinc.

164. El método de la reivindicación 155, en donde se agrega glicol de polietileno.

165. El método de la reivindicación 155, en donde un solvente orgánico se agrega para facilitar la cristalización.

166. El método de la reivindicación 155, en donde el solvente orgánico es metanol, etanol, o isopropanol.

167. Un método de fabricar un conjugado de insulina cristalina según cualquiera de las reivindicaciones 1- 85 el cual comprende cristalizar el conjugado de la insulina a partir de buffer HEPES.

168. Un método de fabricar un conjugado de insulina cristalina según cualquiera de las reivindicaciones 1- 85 el cual comprende cristalizar el conjugado de insulina a partir de buffer TRIS.

FIGURA 1

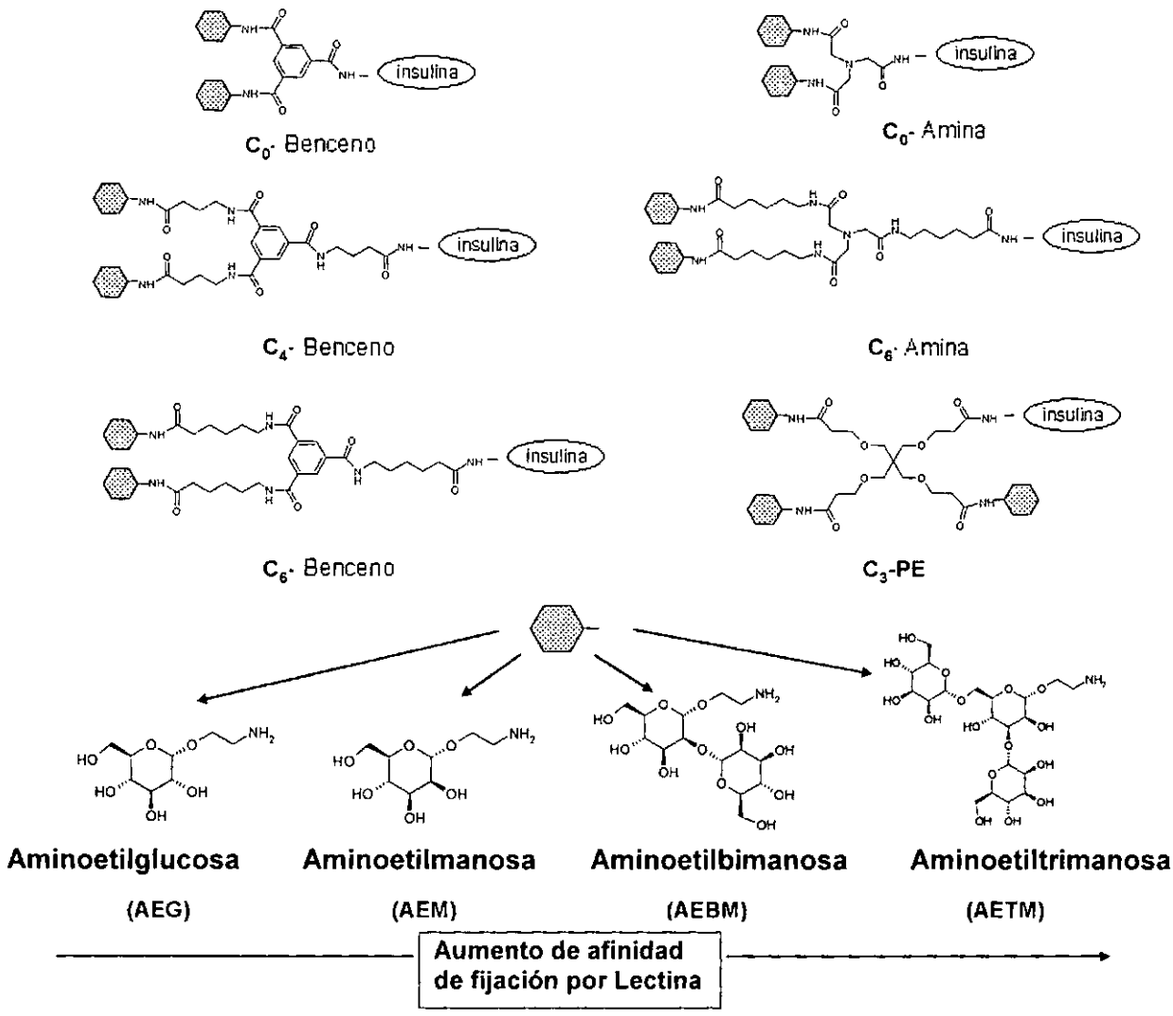
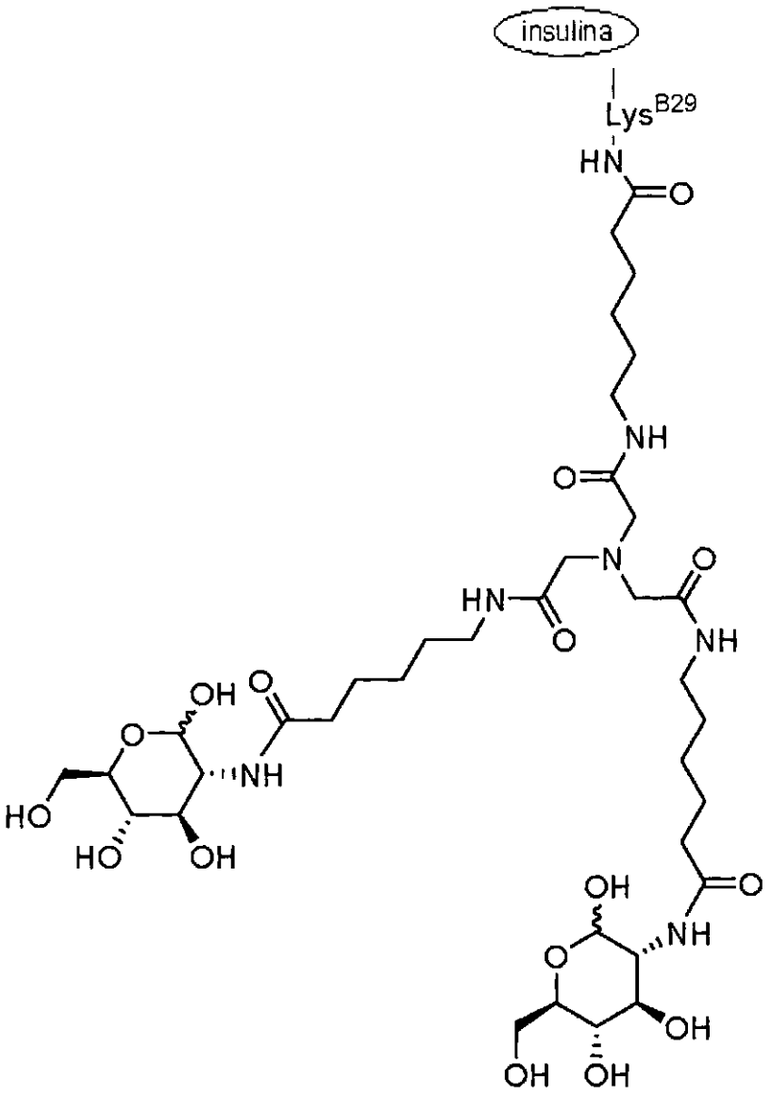

insulina
C_0- Benceno
C_0- Amina
C_4- Benceno
C_6- Amina
C_6- Benceno
C_3-PE
Aminoetilglucosa
(AEG)
Aminoetilmanosa
(AEM)
Aminoetilbimanosa
(AEBM)
Aminoetiltrimanosa
(AETM)
Aumento de afinidad
de fijación por Lectina

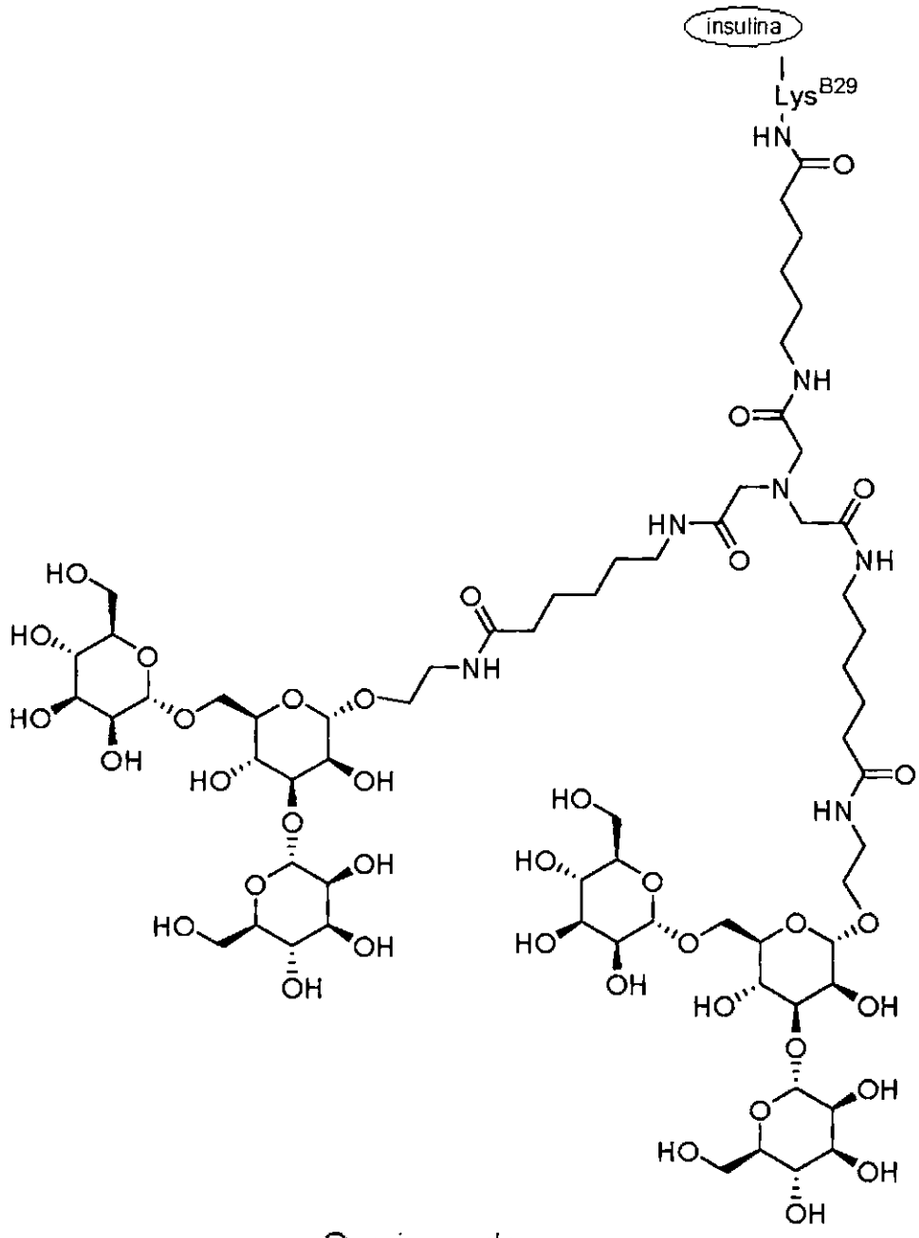
FIGURA 2



Conjugado **I-5**

TSAT-C6-GA-2 (B29)

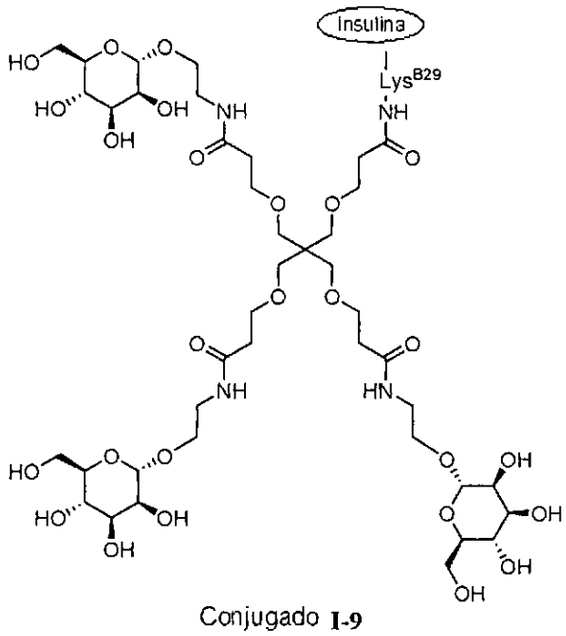
FIGURA 2 (CONTINUACIÓN)



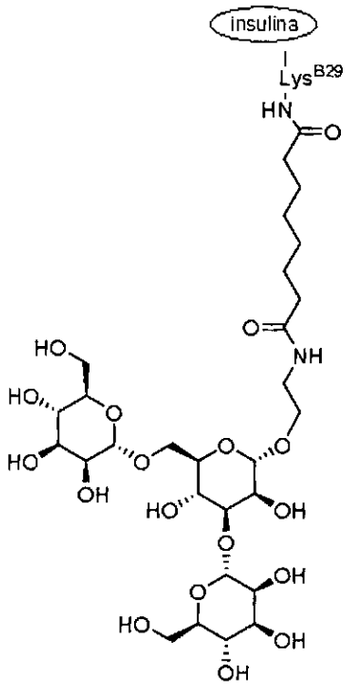
Conjugado **I-6**

TSAT-C6-AETM-2 (B29)

FIGURA 2 (CONTINUACIÓN)

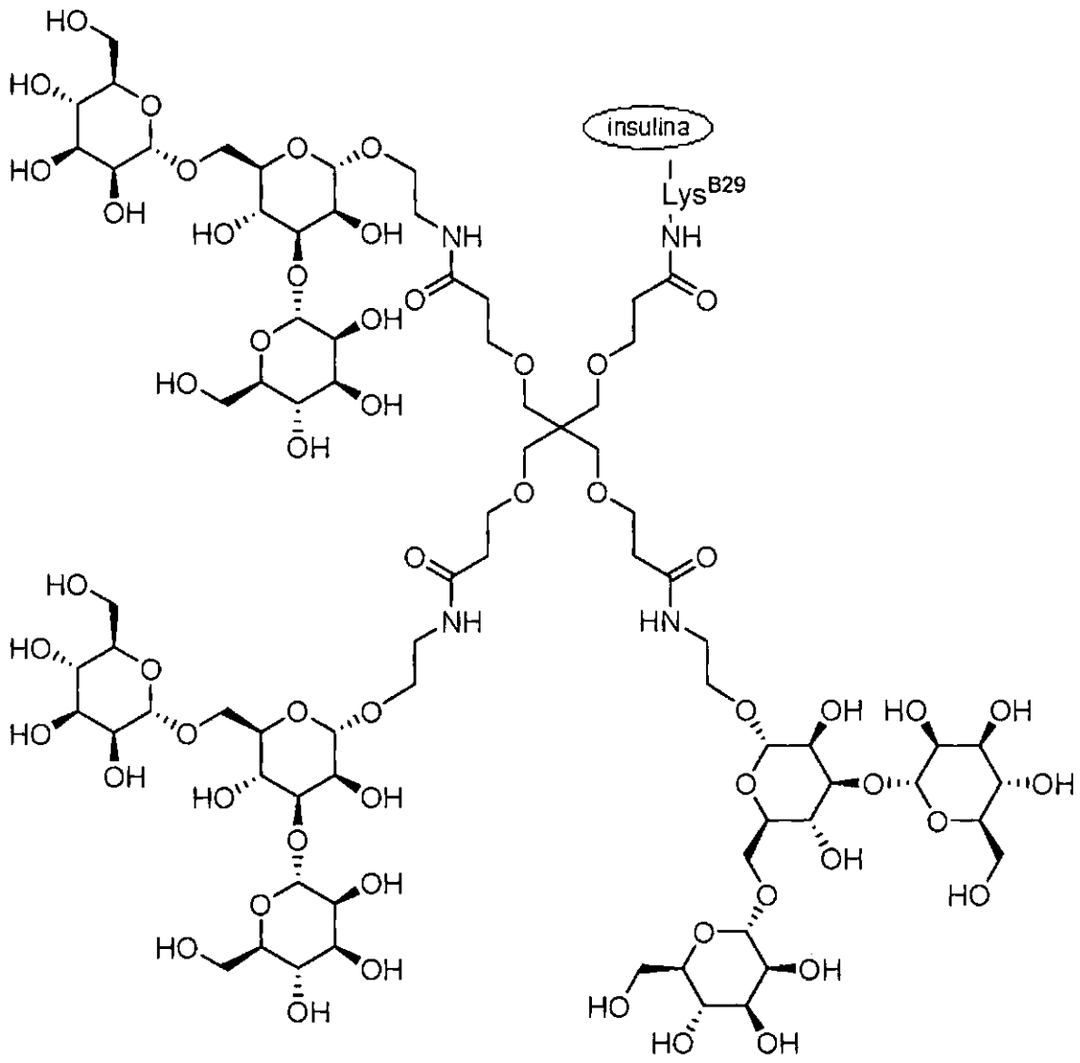


Conjugado **I-9**
TSPE-AEM-3 (B29)



Conjugado : **I-10**
DSS-AETM-1 (B29)

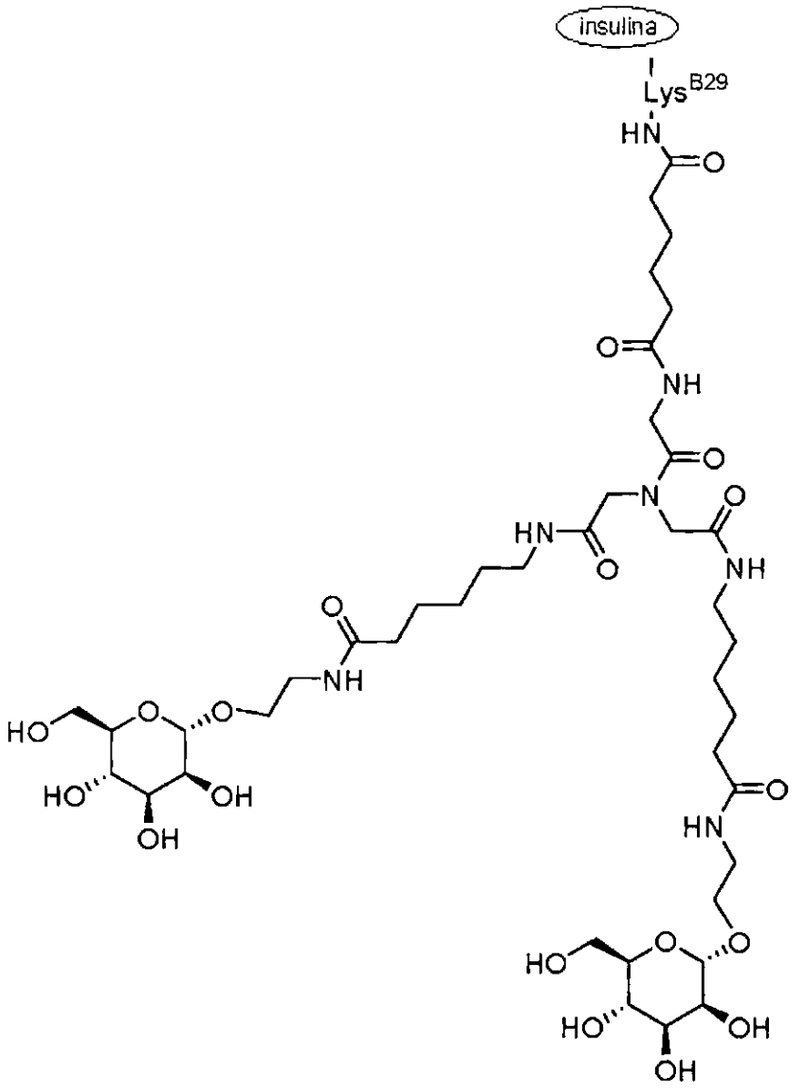
FIGURA 2 (CONTINUACIÓN)



Conjugado **I-11**

TSPE-AETM-3 (B29)

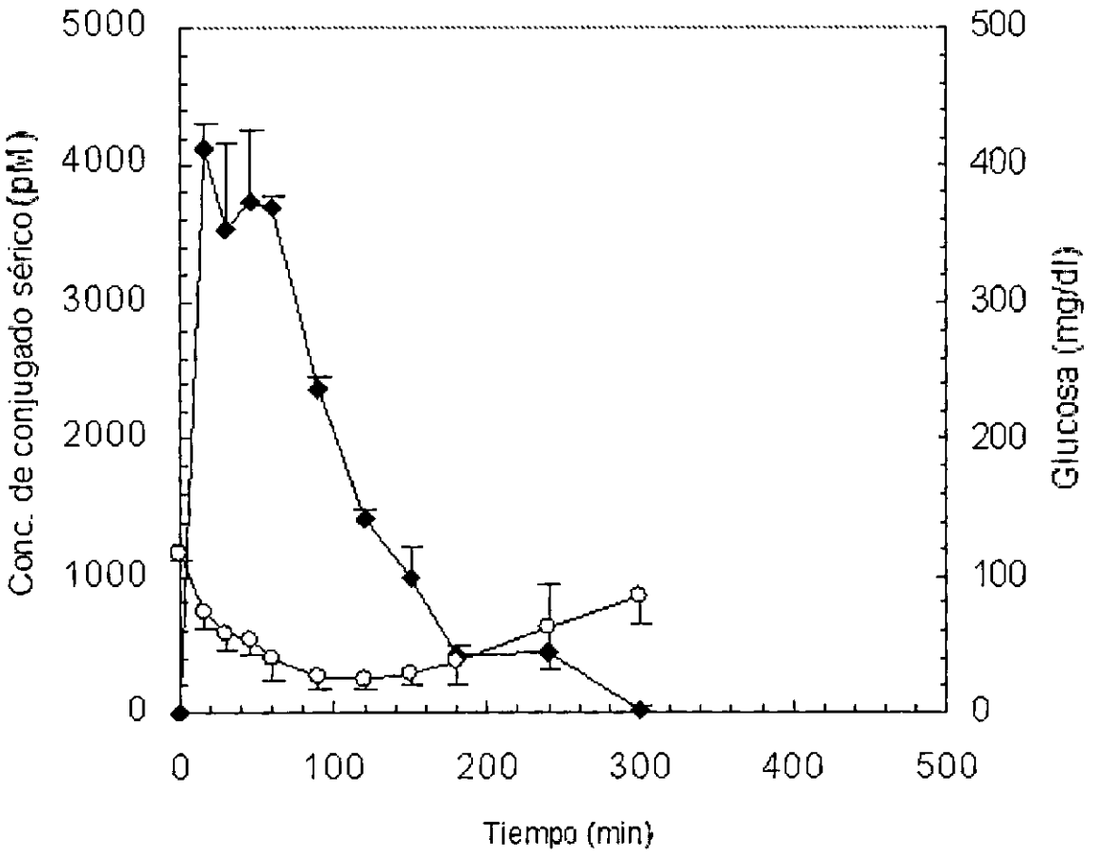
FIGURA 2 (CONTINUACIÓN)



Conjugado **I-17**

C6- Amida **-AEM-2 (B29)**

FIGURA 3


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)

182

FIGURA 4

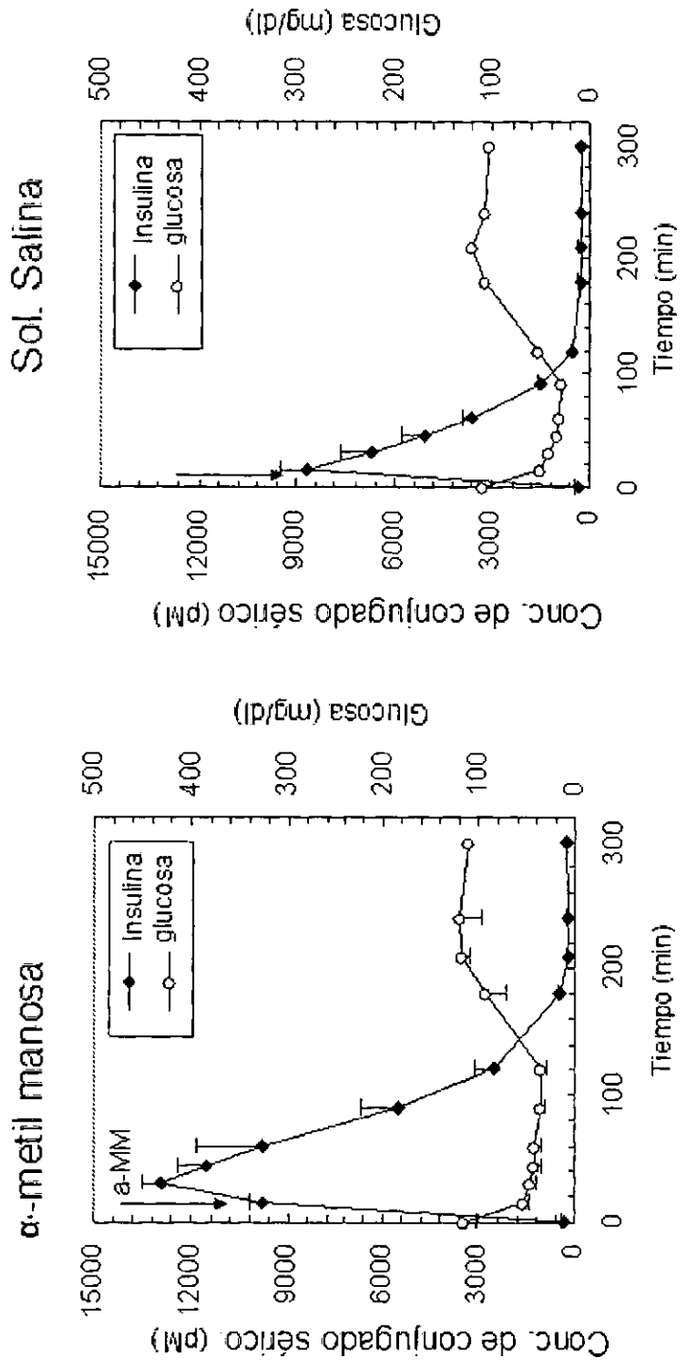

Sol. Salina
Insulina
glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
α-metil manosa
a-MM
Insulina
glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)

FIGURA 5

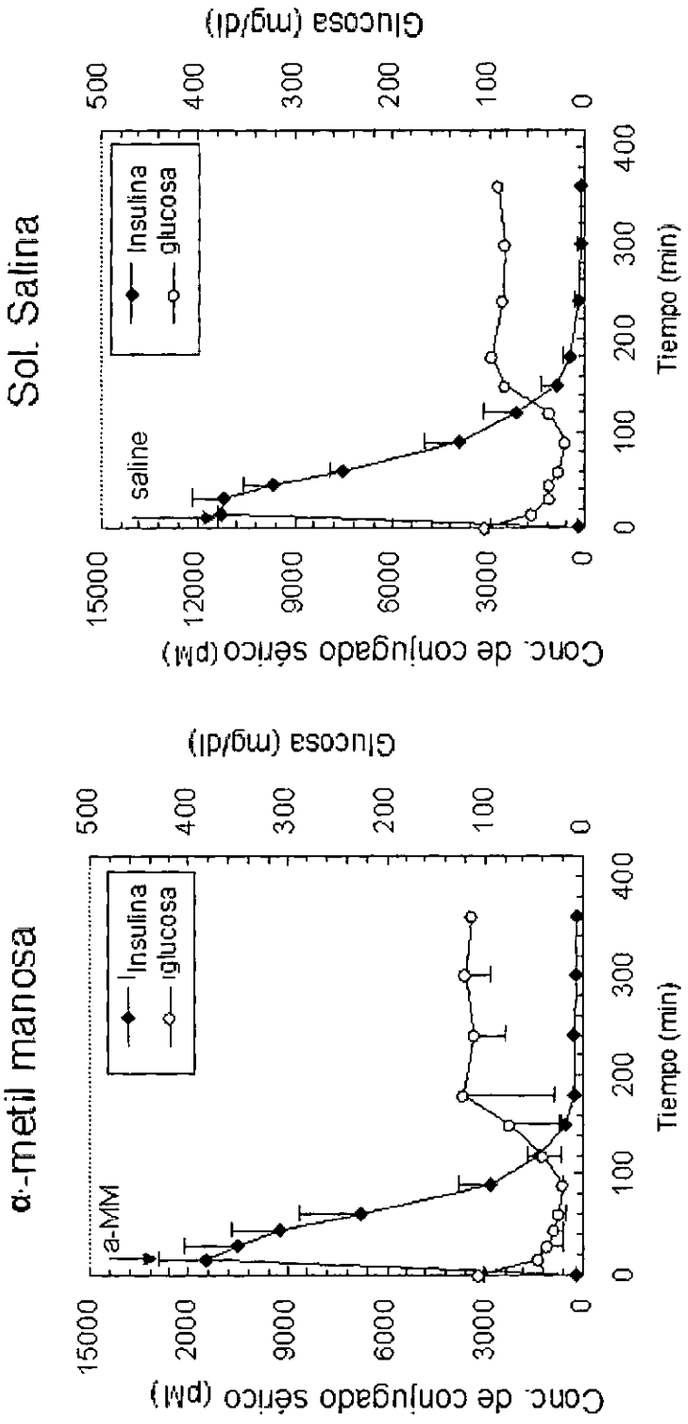

Sol. Salina
saline
Insulina
glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
α-metil manosa
a-MM
Insulina
glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)

FIGURA 6

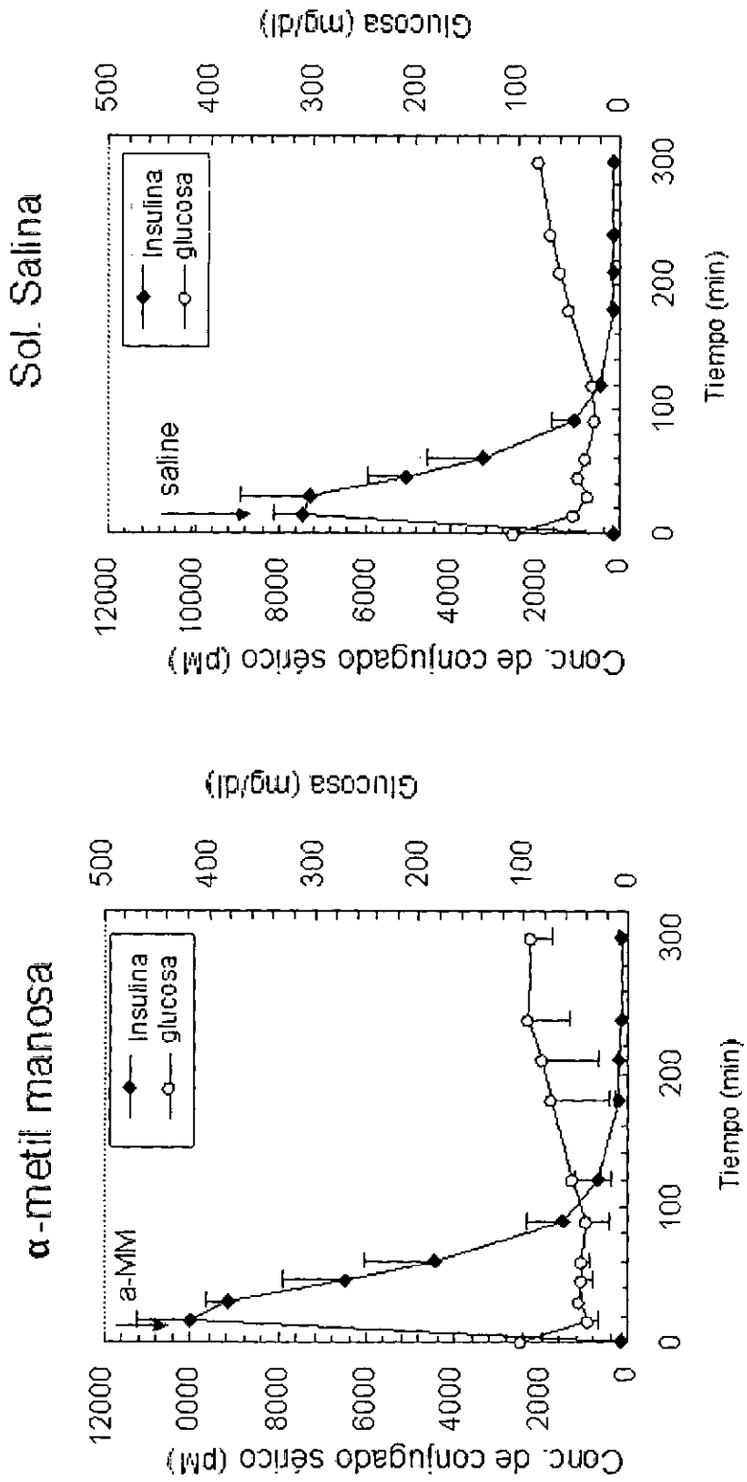

α-metil manosa
a-MM
Insulina
glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
Sol. Salina
saline
Insulina
glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)

FIGURA 7

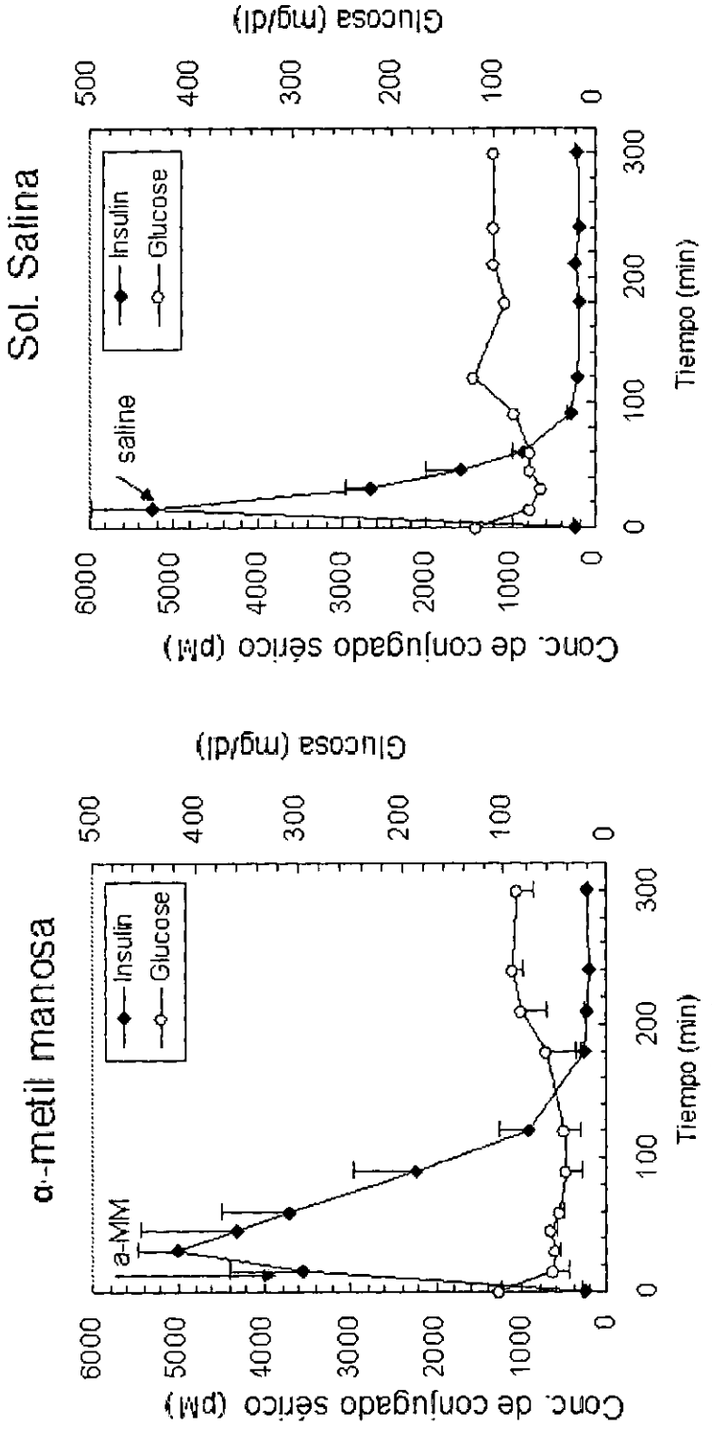

Sol. Salina
saline
Insulin
Glucose
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
α-metil manosa
α-MM
Insulin
Glucose
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)

FIGURA 8

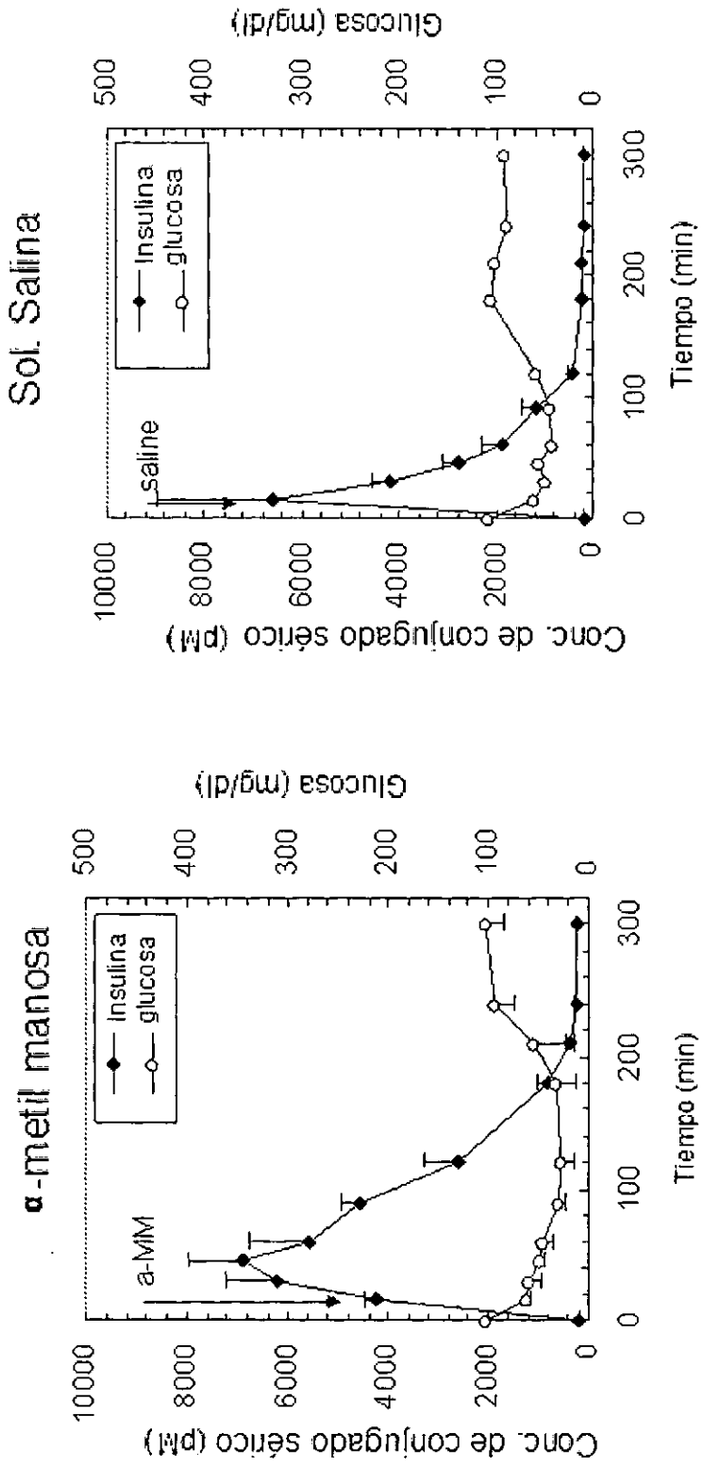

Sol. Salina
saline
Insulina
glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
α-metil manosa
a-MM
Insulina
glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)

FIGURA 9

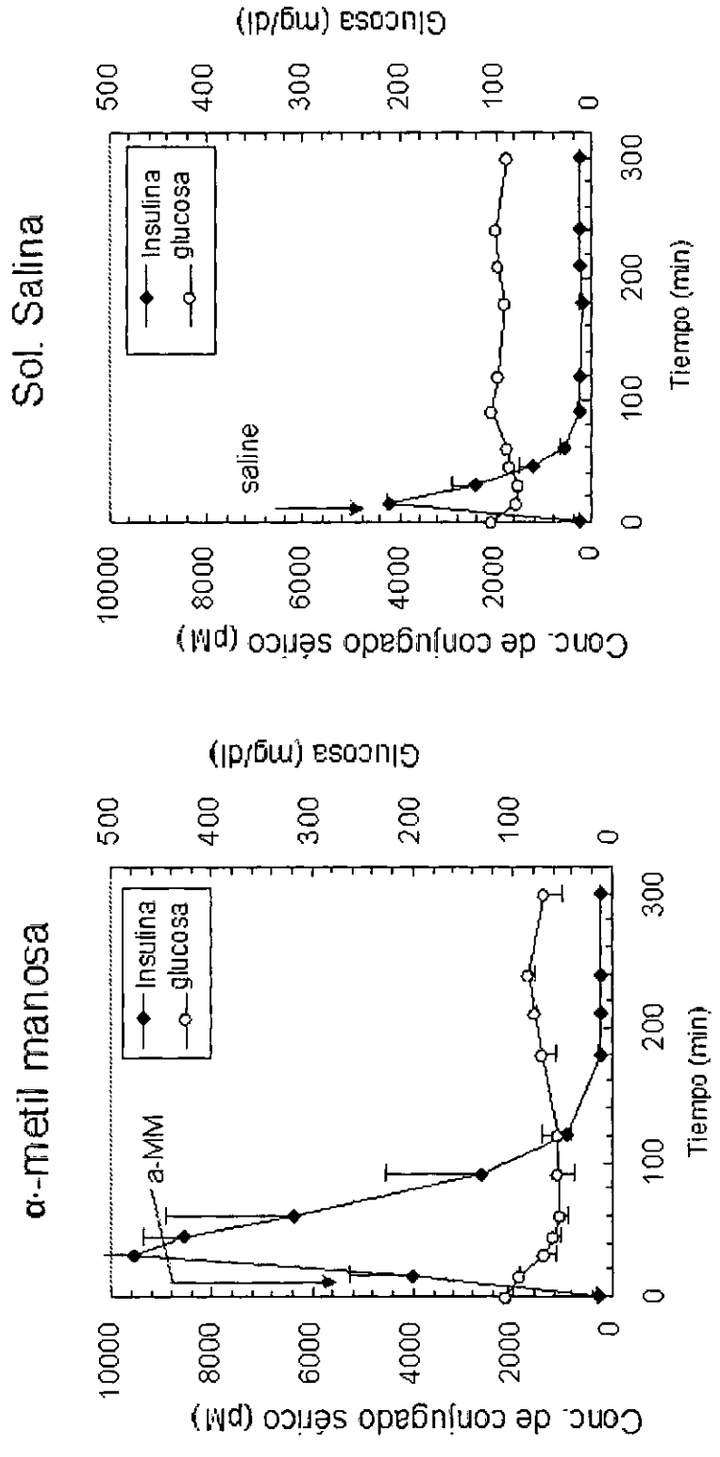

Sol. Salina
saline
Insulina
glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
α-metil manosa
a-MM
Insulina
glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)

FIGURA 10

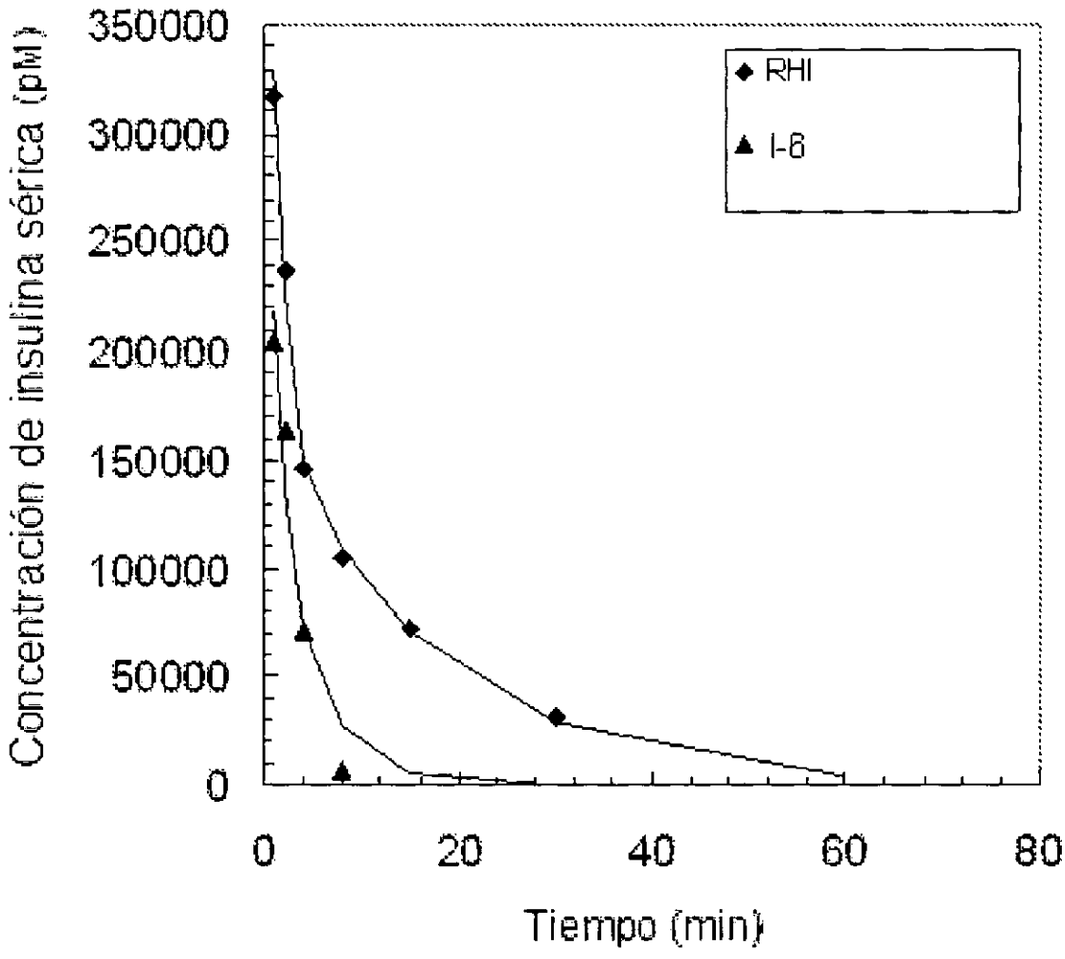
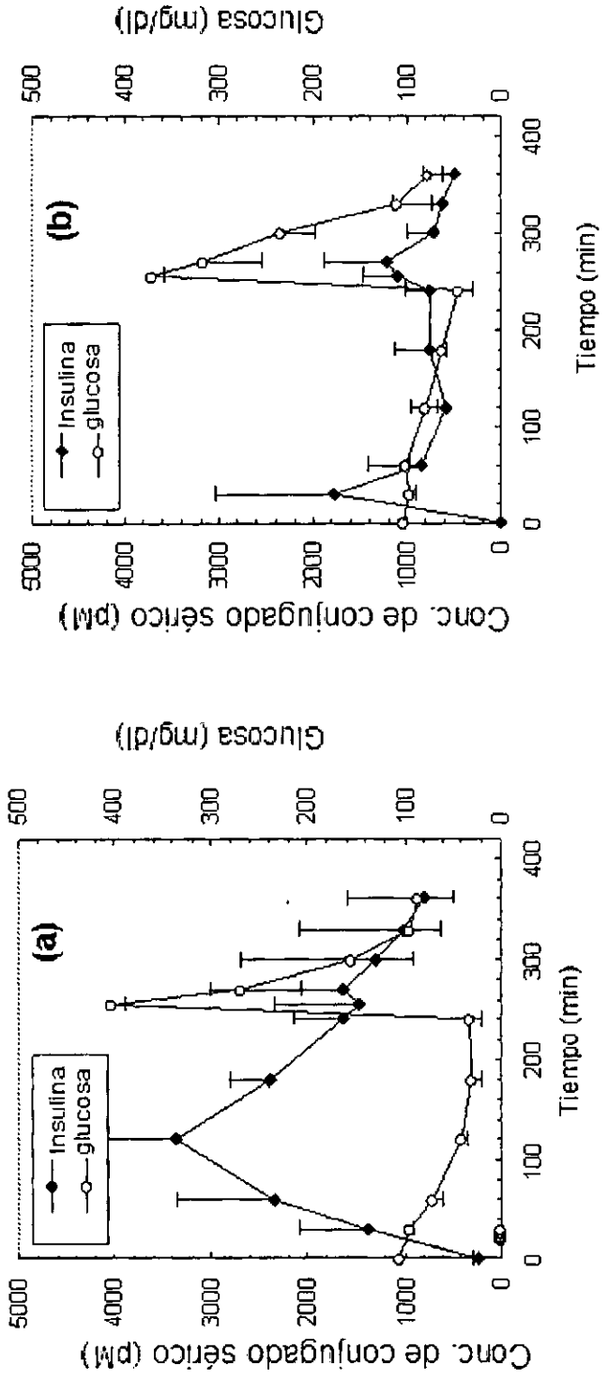

Concentración de insulina sérica (pM)
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
0
20
40
60
80
Tiempo (min)
RHI
I-6

FIGURA 11


(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 11 (CONTINUACIÓN)

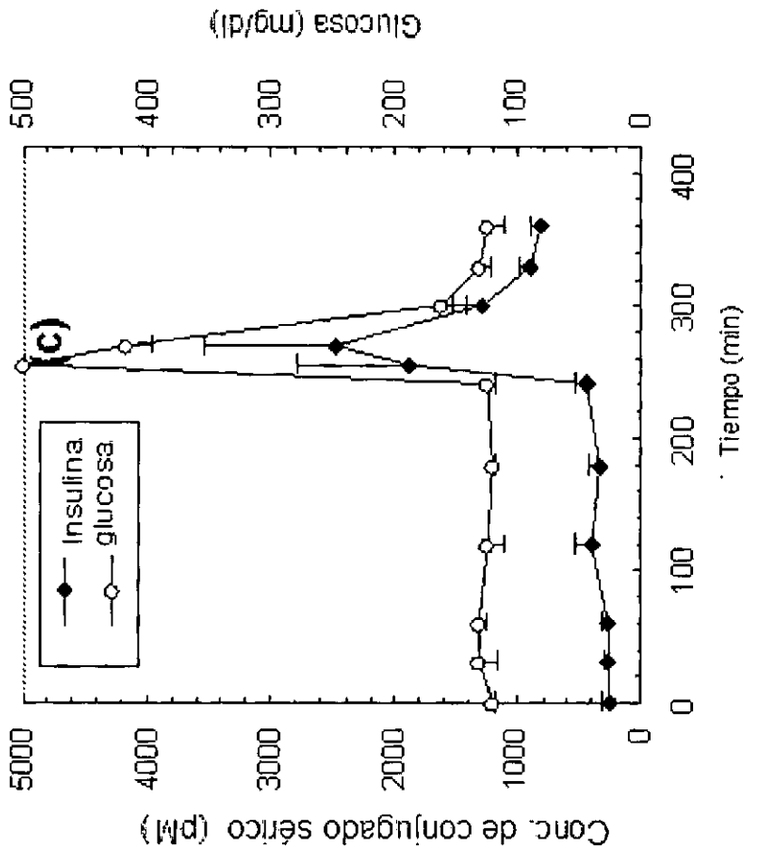


FIGURA 12

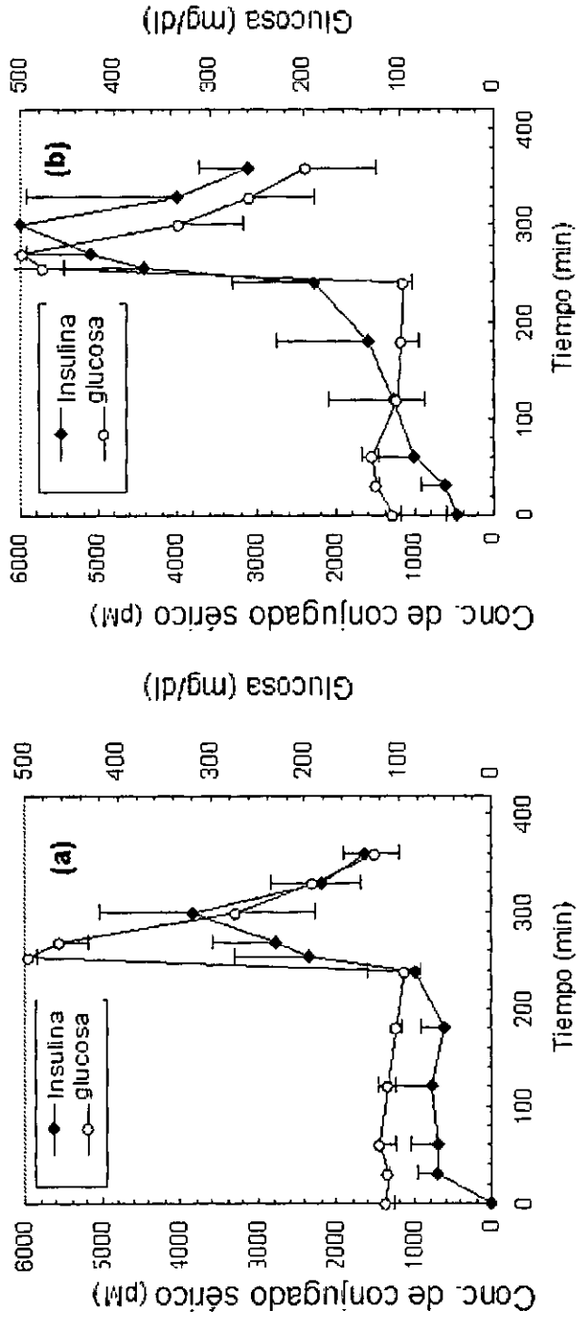

(a)
Insulina
glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
(b)
Insulina
glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)

FIGURA 13

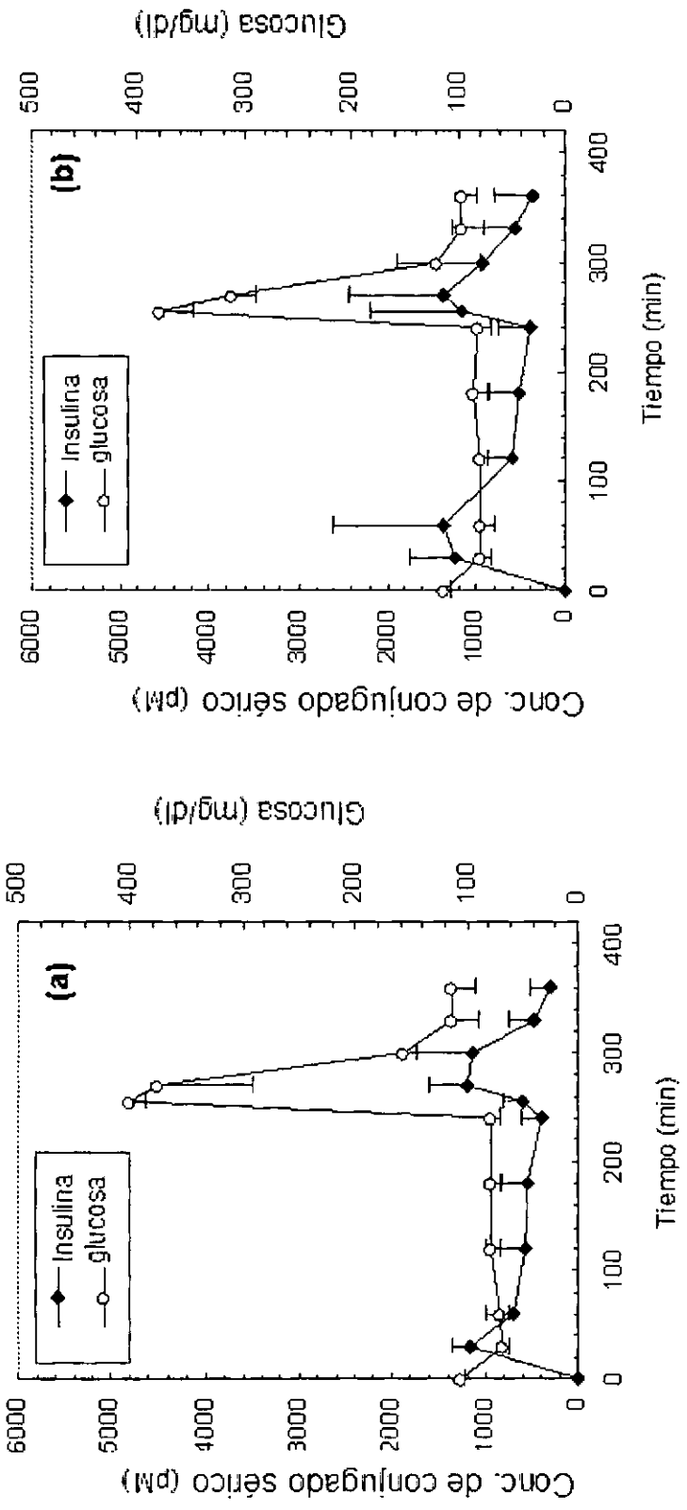

(a)
Insulina
glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
100
200
300
400
500
(b)
Insulina
glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)

FIGURA 14

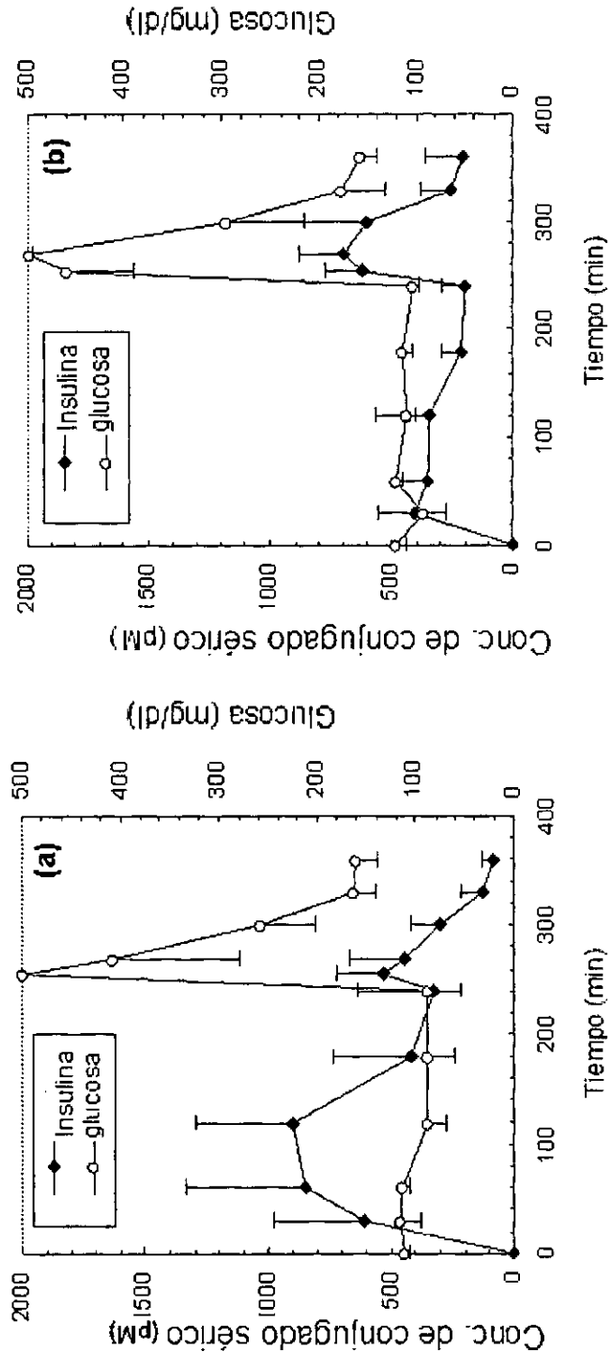

(a)
(b)
Insulina
glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
500
1000
1500
2000
100
200
300
400

FIGURA 15

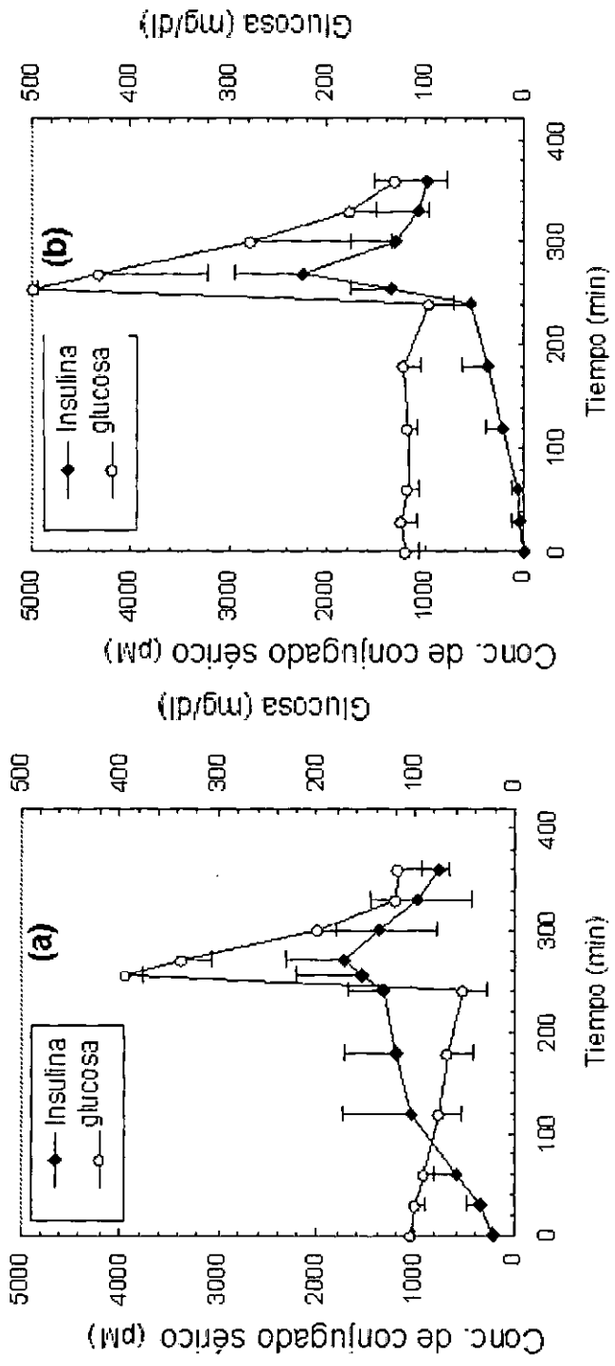

(a)
(b)
Insulina
glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
100
200
300
400
500

FIGURA 15 (CONTINUACIÓN)

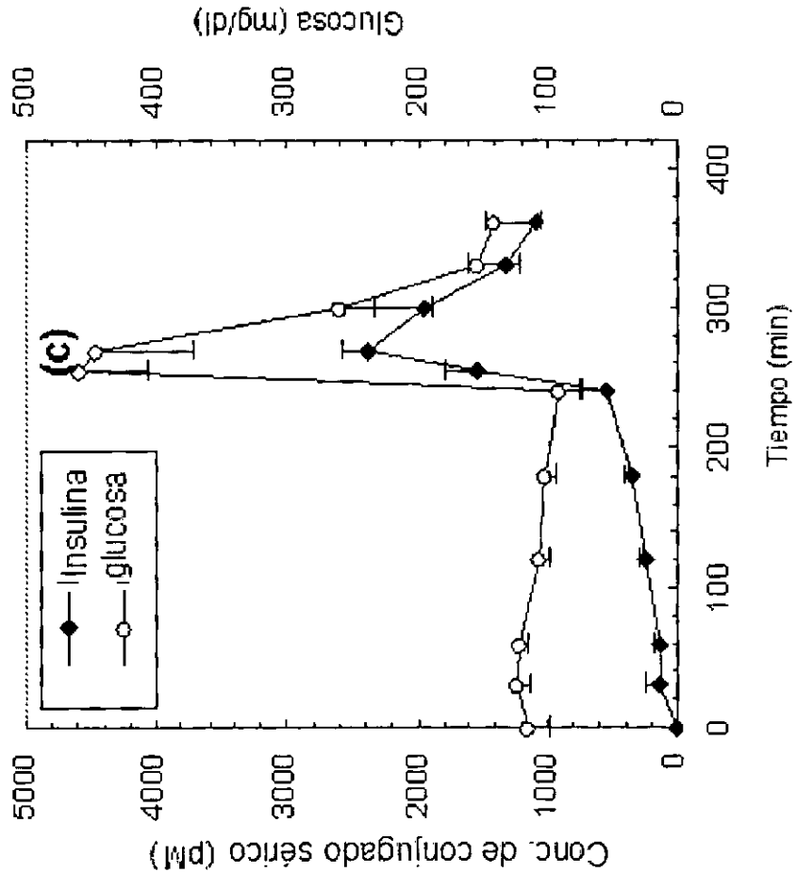


FIGURA 16

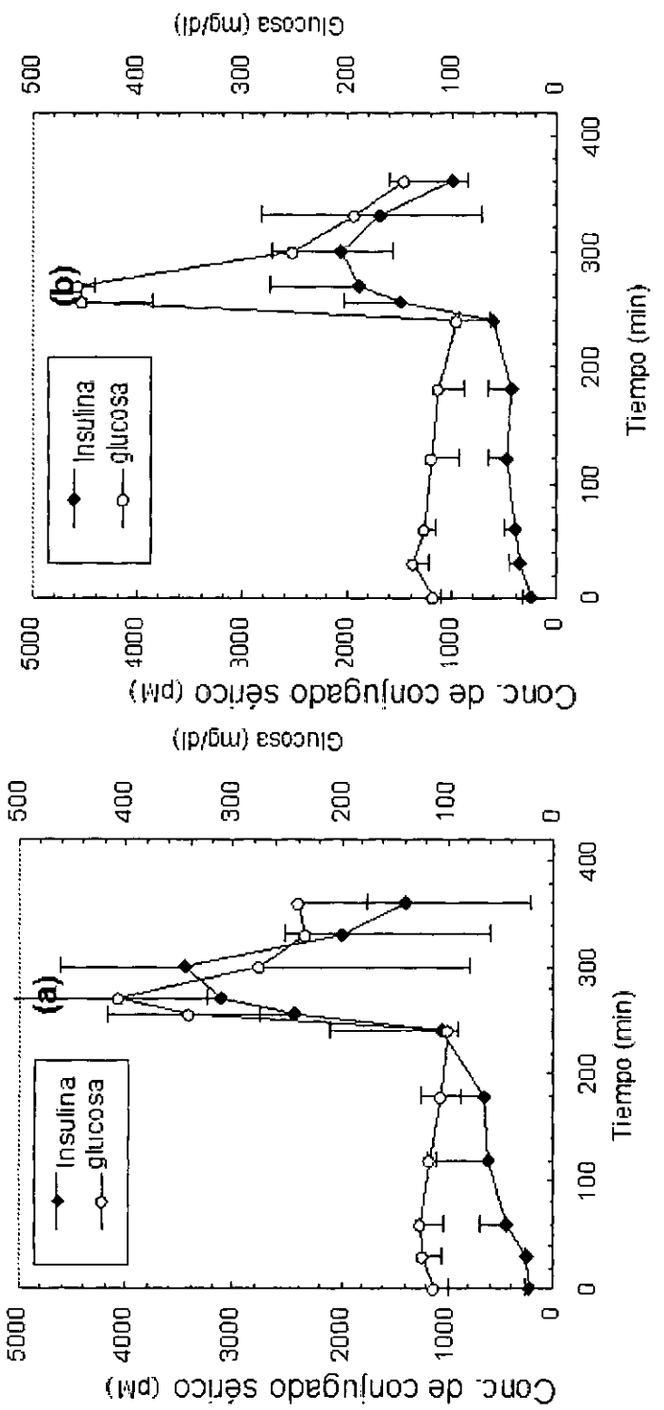

(a)
(b)
Insulina
glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
100
200
300
400
500

FIGURA 16 (CONTINUACIÓN)

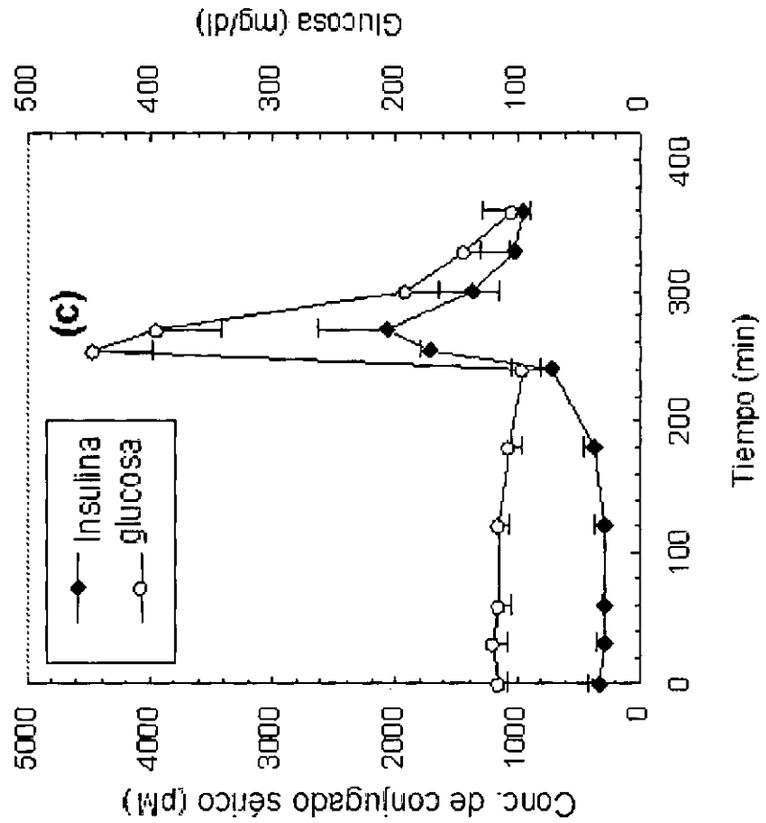


FIGURA 17

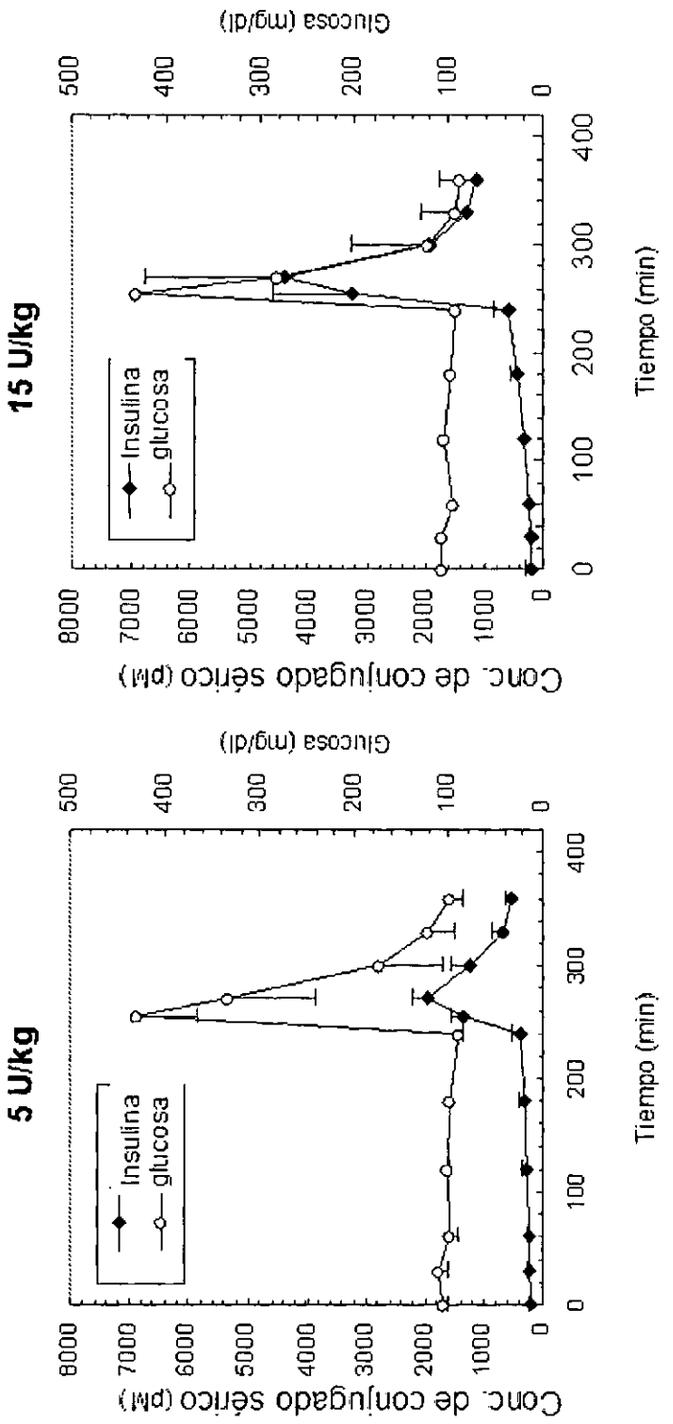

5 U/kg
Insulina
glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
15 U/kg
Insulina
glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)

FIGURA 18

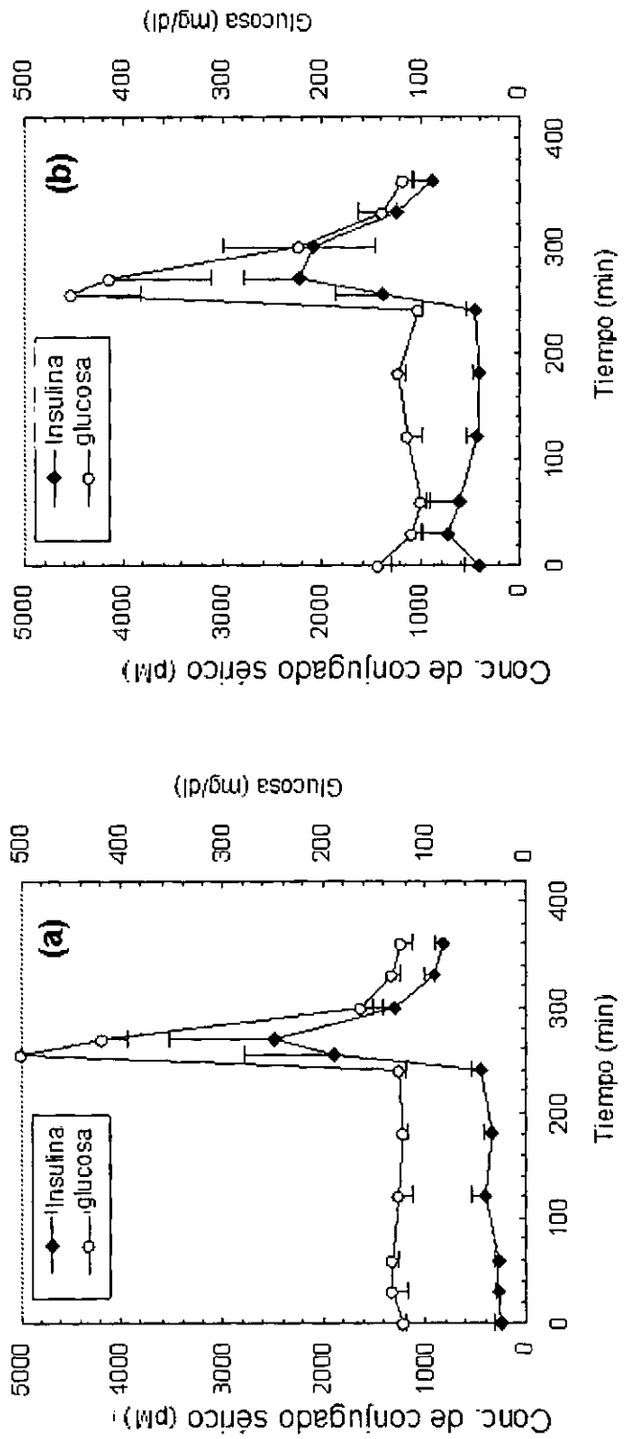
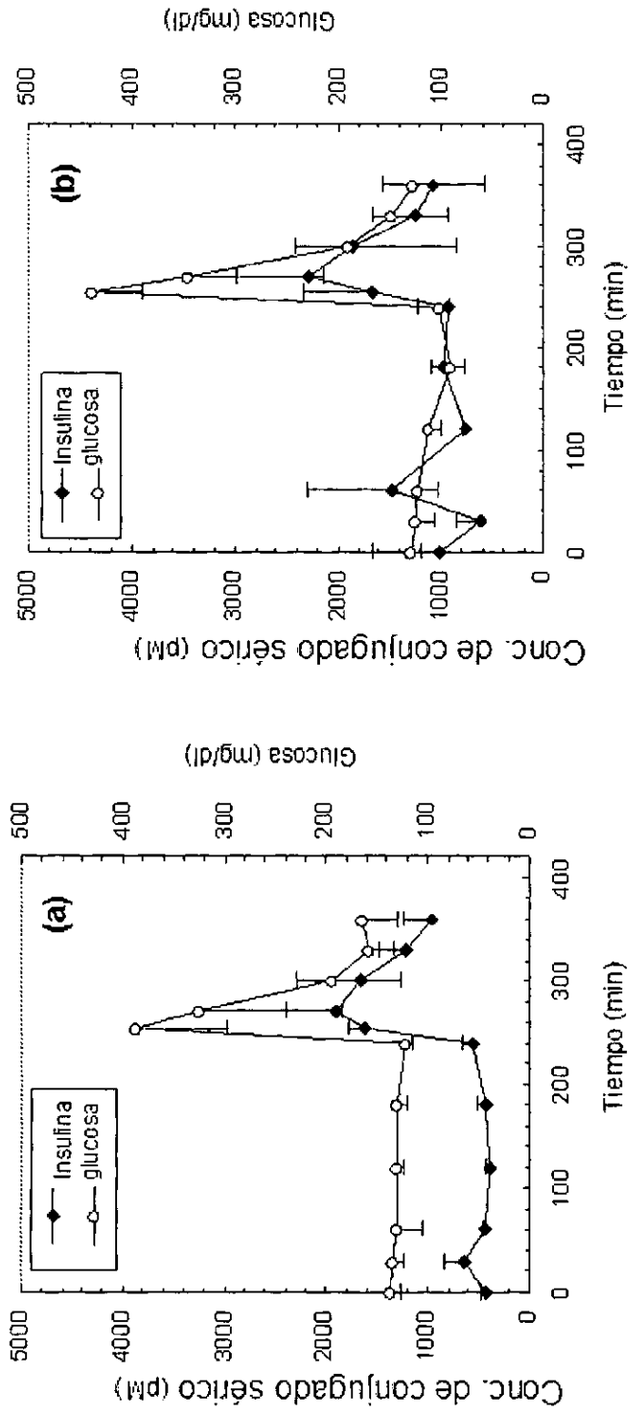
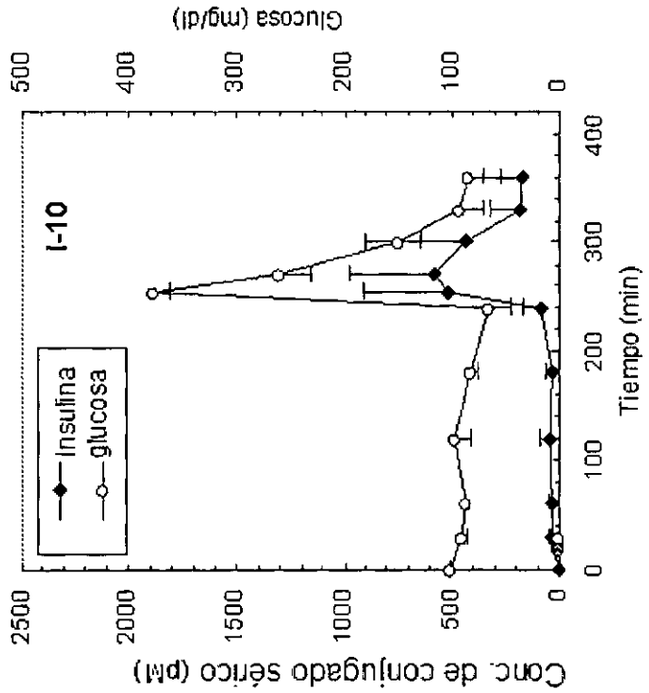

(a)
(b)
Insulina
glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
100
200
300
400
500

FIGURA 19


(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 20


I-10
Insulina
glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
500
1000
1500
2000
2500
100
200
300
400

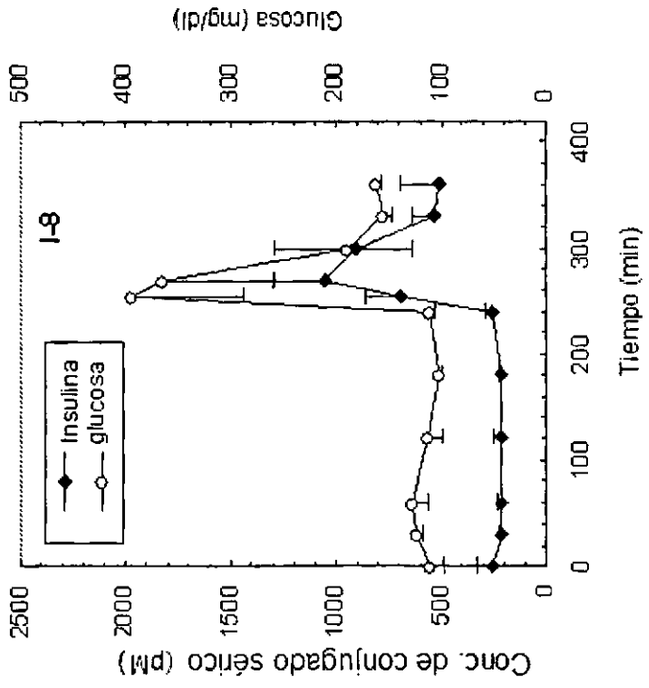

I-8
Insulina
glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
500
1000
1500
2000
2500
100
200
300
400

FIGURA 20 (CONTINUACIÓN)

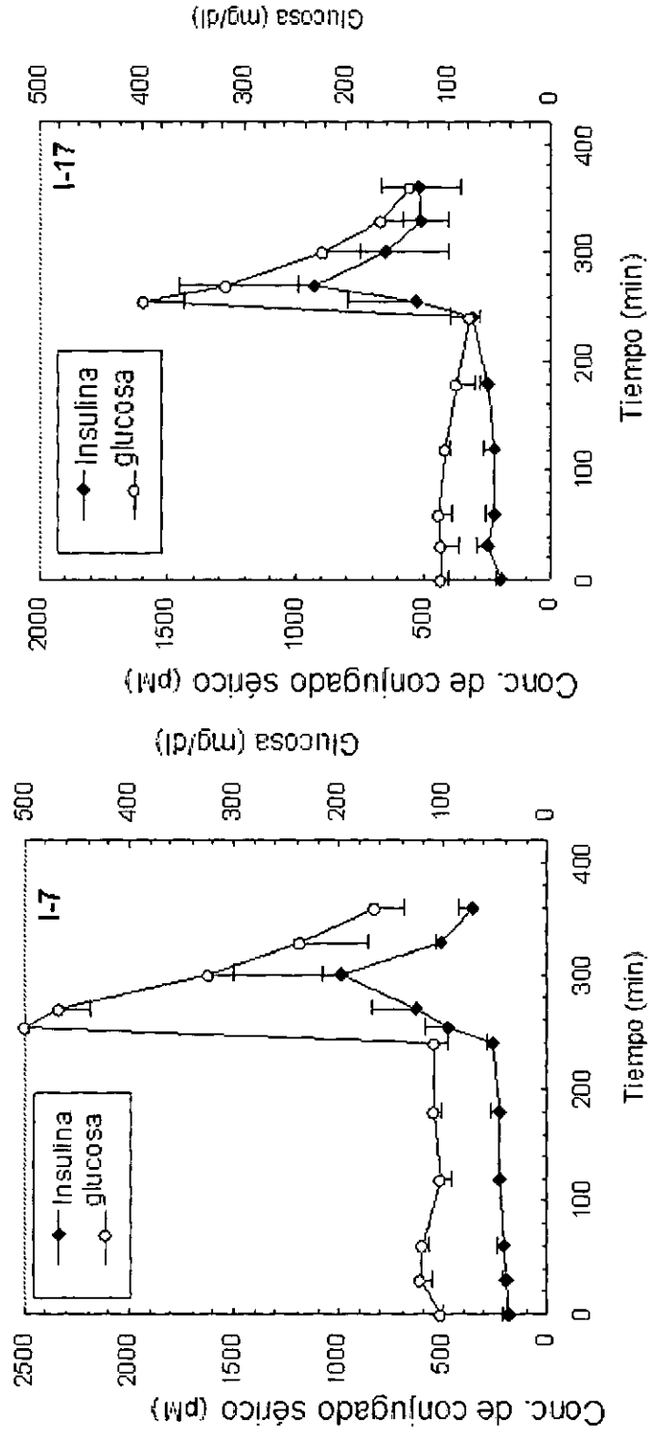


FIGURA 20 (CONTINUACIÓN)

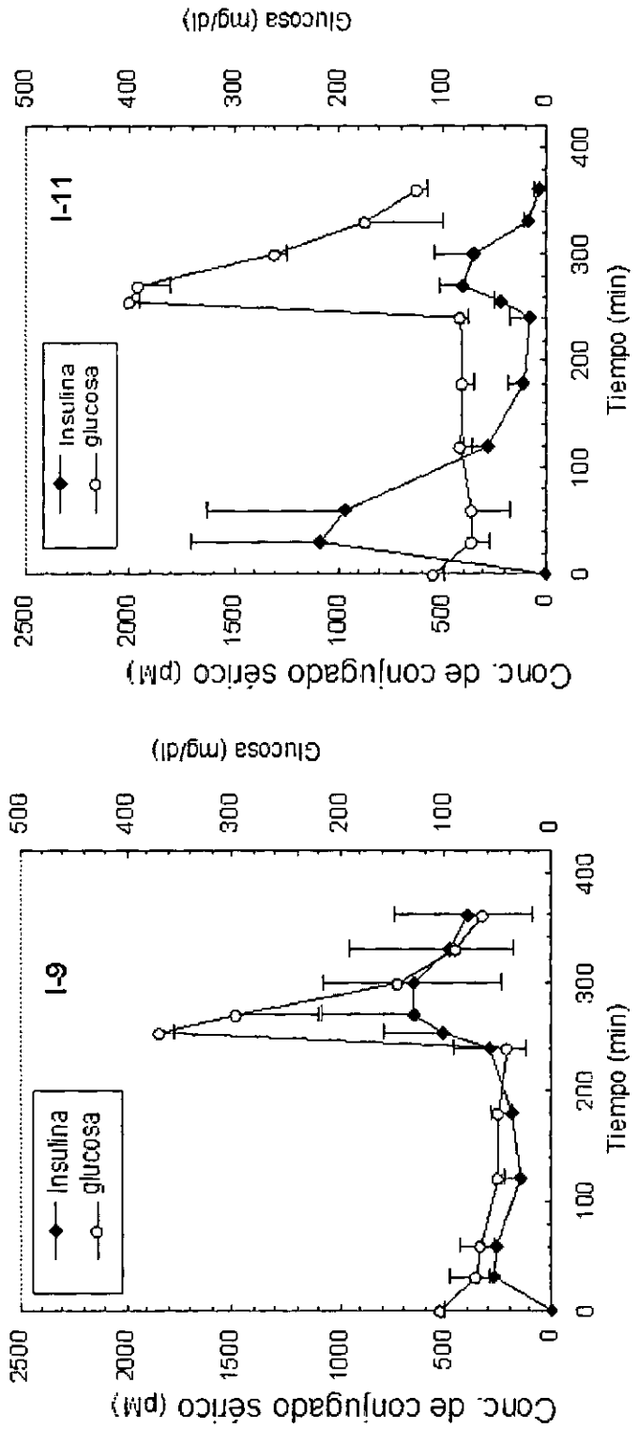


FIGURA 21

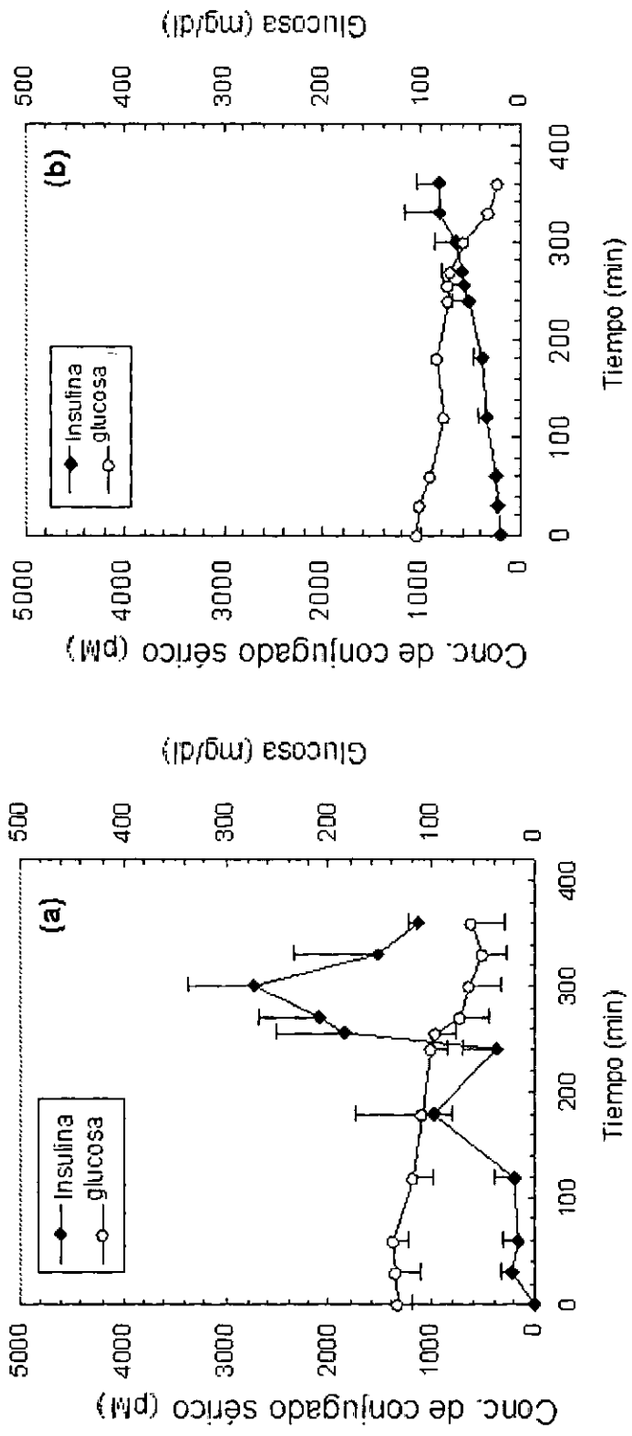
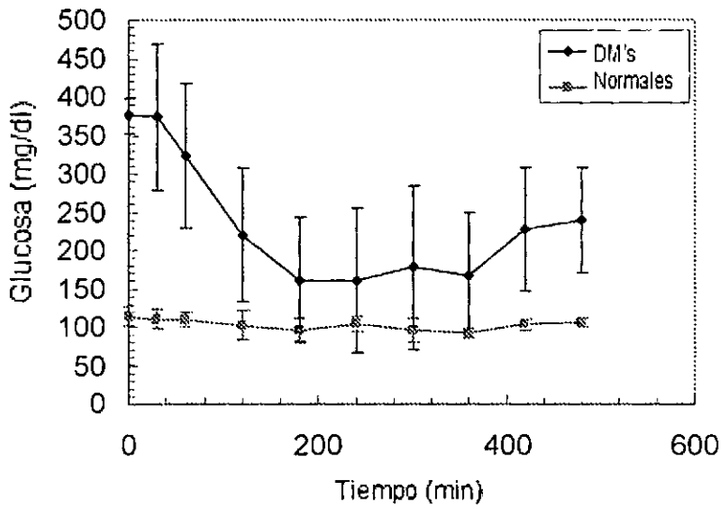

(a)
Insulina
glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
100
200
300
400
500
(b)
Insulina
glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)

FIGURA 22

5 U/kg



10 U/kg

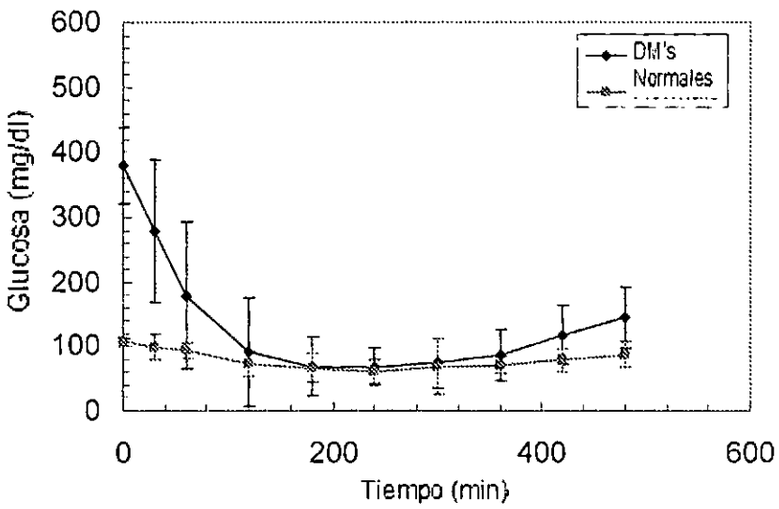


FIGURA 22 (CONTINUACIÓN)

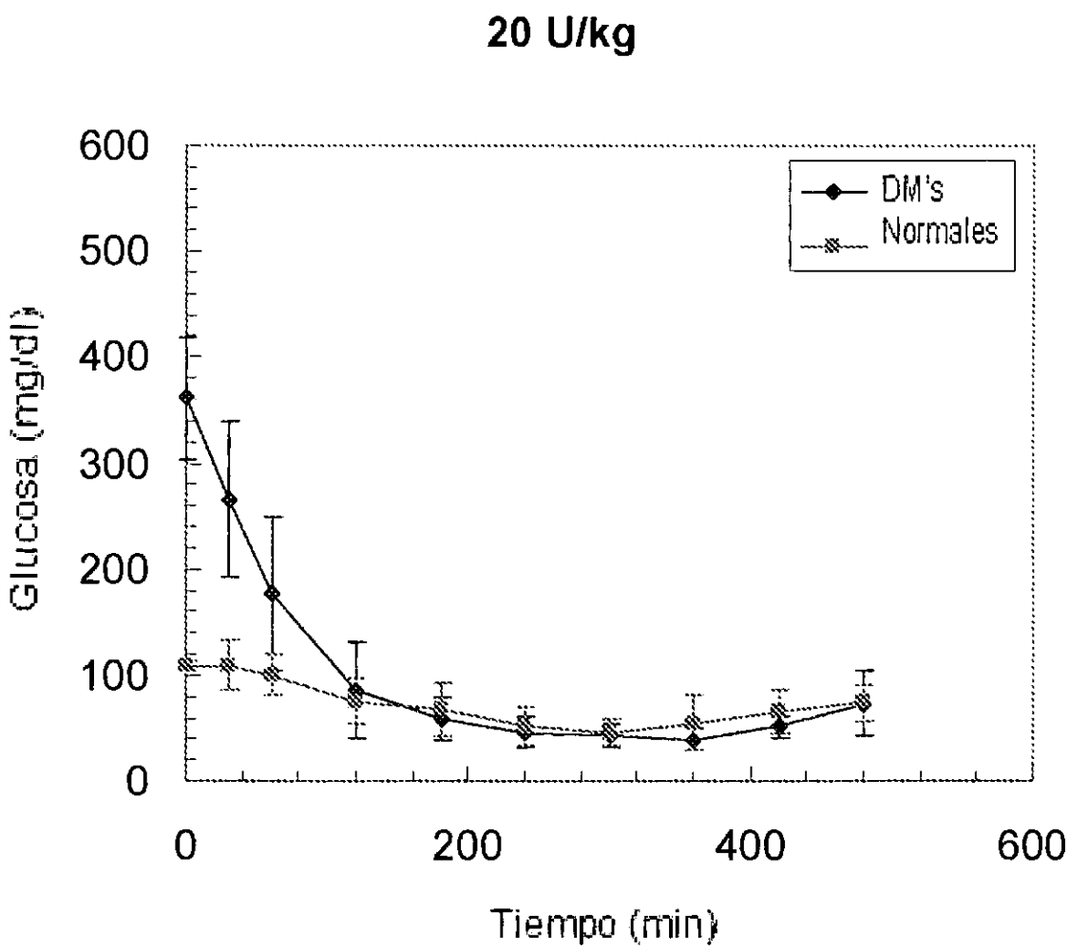


FIGURA 23

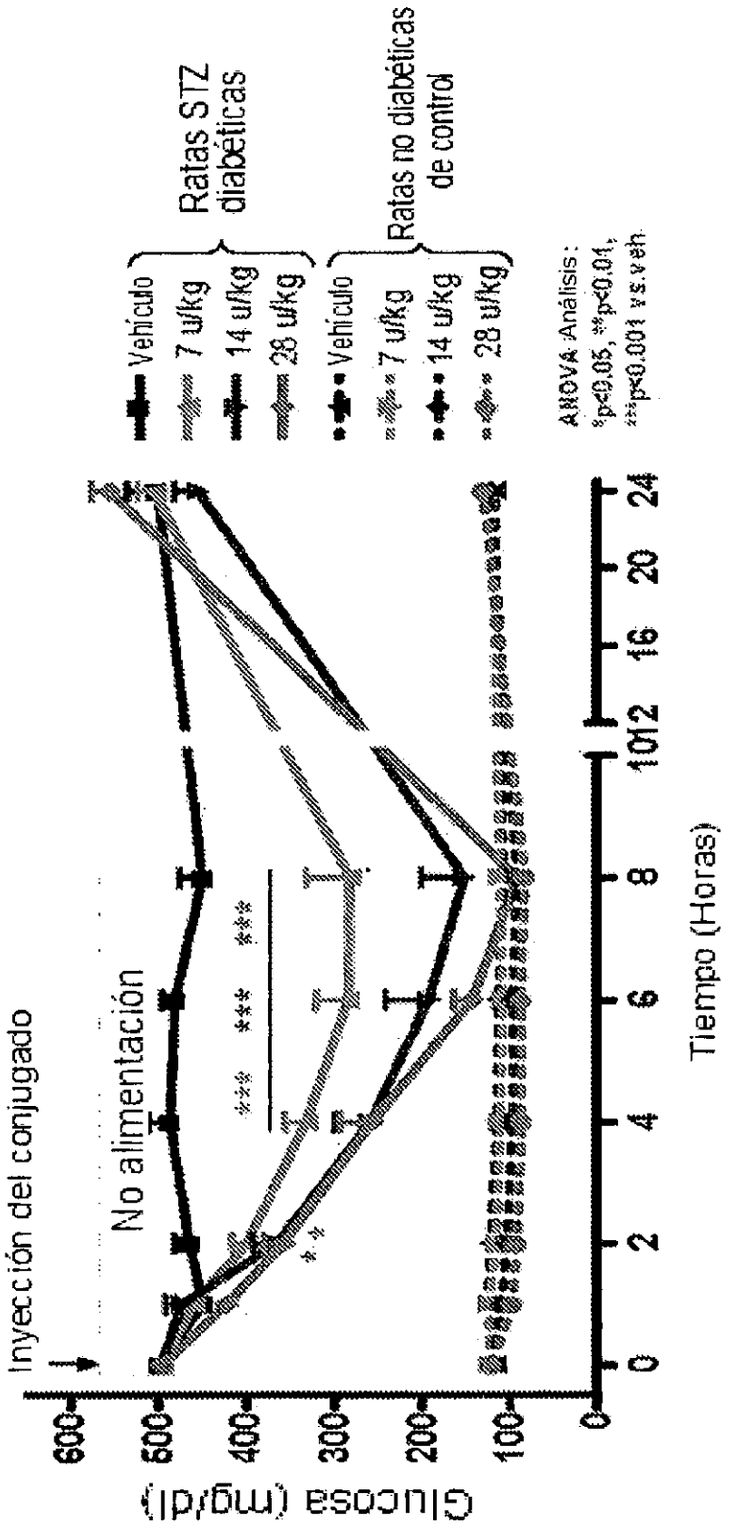

Inyección del conjugado
No alimentación
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (Horas)
Vehículo
7 u/kg
14 u/kg
28 u/kg
Ratas STZ diabéticas
Vehículo
7 u/kg
14 u/kg
28 u/kg
Ratas no diabéticas de control
ANOVA Análisis:
*p<0,05, **p<0,01,
***p<0,001 vs. veh

FIGURA 24

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
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

FIGURA 25

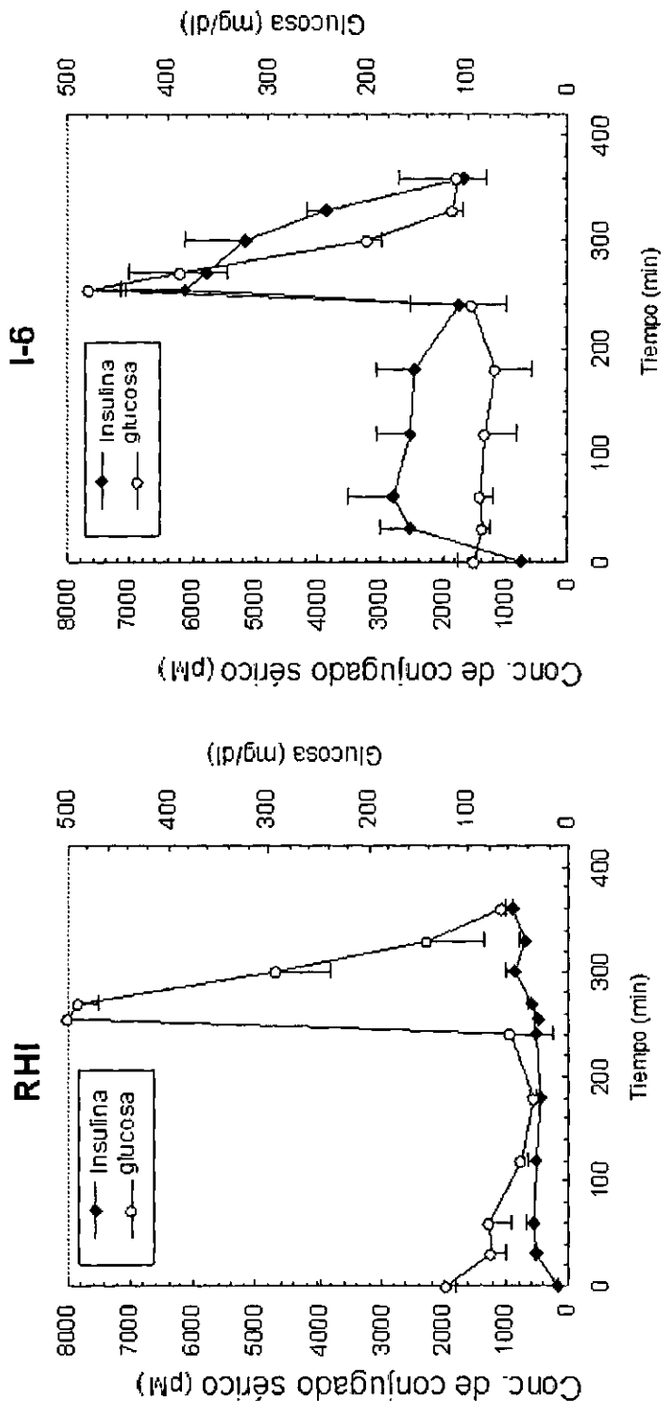

I-6
RHI
Insulina
glucosa
Conc. de conjugado sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
100
200
300
400
500

FIGURA 25 (CONTINUACIÓN)

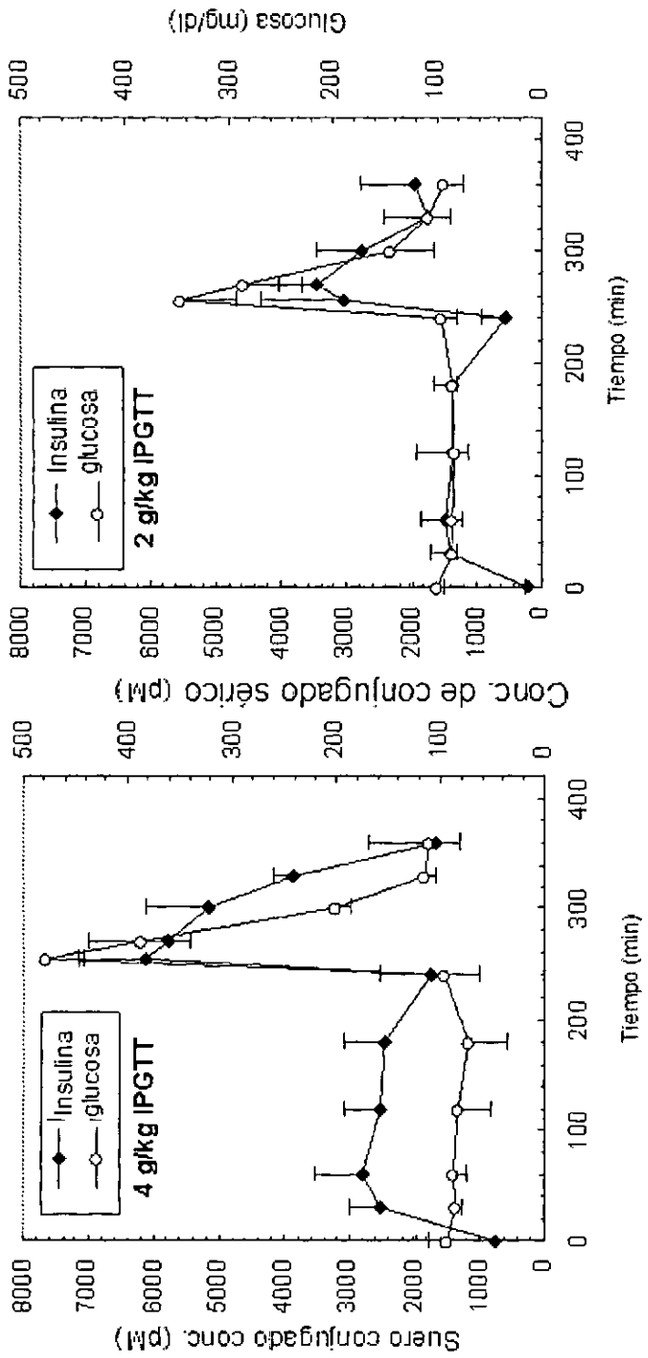


FIGURA 25 (CONTINUACIÓN)

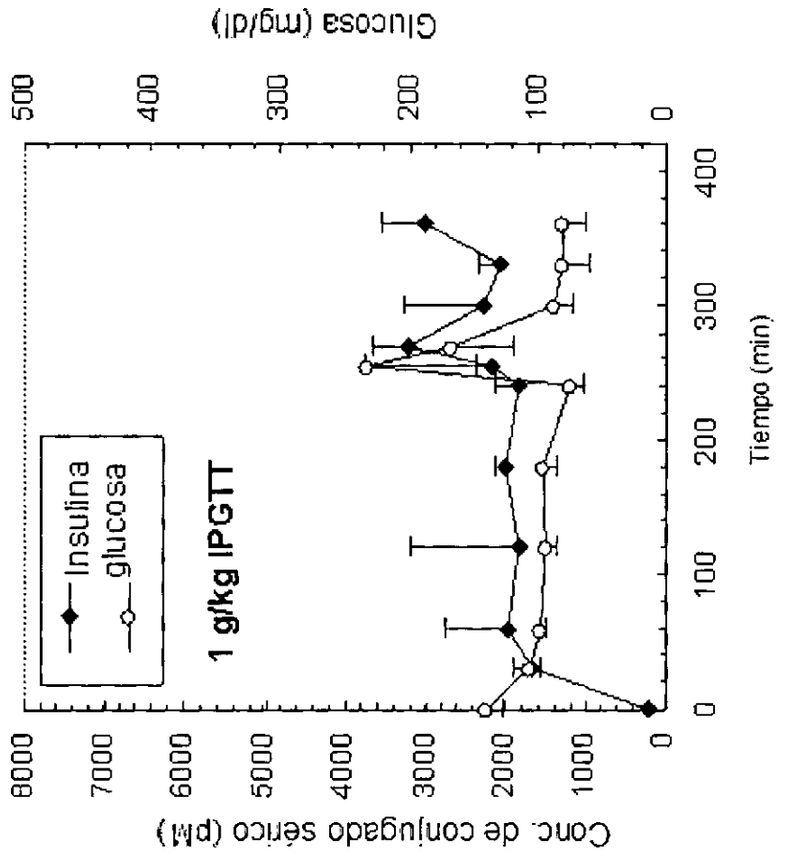


FIGURA 26

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 27

Buffer	puntuación
1. 0.1 M ácido cítrico pH 3.5, 2.0 M Sulfato de Amonio	3
2. 0.1 M Trihidrato de acetato de sodio pH 4.5, 2.0 M Sulfato de Amonio	4
3. 0.1 M BIS-TRIS pH 5.5, 2.0 M Sulfato de Amonio	1
4. 01 M BIS-TRIS pH 6.5, 2.0 M Sulfato de Amonio	3
5. 01 M HEPES pH 7.5, 2.0 M Sulfato de Amonio	3
6. 01 M Tris pH 8.5, 2.0 M Sulfato de Amonio	3
7. 01 M ácido cítrico pH 3.5, 3.0 M Cloruro de Sodio	1
8. 01 M Trihidrato de acetato de sodio pH 4.5, 3.0 M Cloruro de Sodio	1
9. 0.1 M BIS-TRIS pH 5.5, 3.0 M Cloruro de Sodio	1
10. 01 M BIS-TRIS pH 6.5, 3.0 M Cloruro de Sodio	1
11.01 M HEPES pH 7.5, 3.0 M Cloruro de Sodio	8
12.01 M Tris pH 8.5, 3.0 M Cloruro de Sodio	1
13.01 M BIS-TRIS pH 5.5, 0.3 M Dihidrato de formato de magnesio	1
14.01 M BIS-TRIS pH 6.5, 0.3 M Dihidrato de formato de magnesio	1
15.01 M HEPES pH 7.5, 0.5 M Dihidrato de formato de magnesio	8
16.01 M Tris pH 8.5, 0.3 M Dihidrato de formato de magnesio	1
17. 1.26 M Monohidrato de fosfato de Sodio monobásico, 0.14 M Fosfato de potasio Dibásico, pH 5.6	1
18. 0.49 M Monohidrato de fosfato de Sodio monobásico, 0.91 M Fosfato de potasio Dibásico, pH 6.9	1
19. 0.056 M Monohidrato de fosfato de Sodio monobásico, 1.344 M Fosfato de potasio Dibásico, pH 8.2	8
20. 0.1 M HEPES pH 7.5, 1.4 M Dihidrato de citrato de sodio tribásico	3
21. 1.8 M Citrato de amonio Tribásico pH 7.0	3
22. 0.8 M ácido Succínico pH 7.0	1
23. 2.1 M DL-ácido Málico PH 7.0	3
24. 2.8 M Trihidrato de acetato de sodio pH 7.0	1
25. 3.5 M. Formato de Sodio pH 7.0	1
26. 1.1M Tartrato de amonio dibásico pH 7.0	3
27. 2.4 M Malonato de sodio pH 7.0	1
28. 35 % v/v Tacsimato pH 7.0	3
29. 60 % v/v Tacsimato pH 7.0	1

Relato

1	Gota transparente	5	Esferulitos
2	Separación de fases	6	Agujas (crecimiento 1D)
3	Precipitado granular regular	7	Placas (crecimiento 2D)
4	Precipitado birrefringente o microcristales	8	Cristales sencillos (crecimiento 3D < 0.2 mm)
		9	Cristales sencillos (crecimiento 3D > 0.2mm)

FIGURA 27 (CONTINUACIÓN)

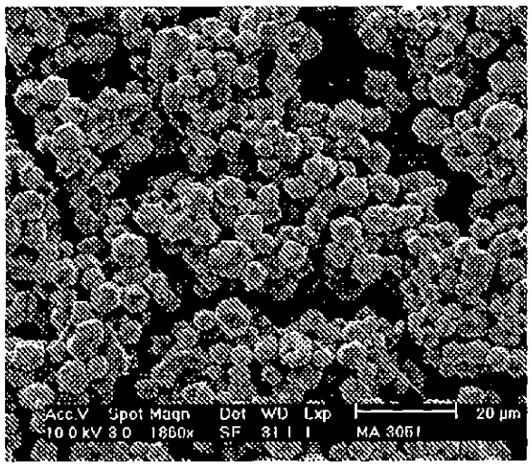
Buffer	Puntuación
30. 0.1 M Cloruro de Sodio, 0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 1.5 M Sulfato de Amonio	1
31. 0.8 M Tetrahidrato de tartrato de sodio y potasio, 0.1 M Tris pH 8.5, 0.5 % w/v polietilenglicol monometil eter 5,000	1→ 3
32. 1.0 M Sulfato de Amonio, 0.1 M BIS TRIS Ph 5.5, 1% w/v polietilenglicol 3.350	4
33. 1.1 M Malonato de sodio pH 7.0, 0.1 M HEPES pH 7.0, 0.5% v/v Jeffamine ED-2001 ® pH 7.0	1
34. 1.0 M ácido succinico pH 7.0, 0.1 M HEPES pH 7.0, 1 % w/v polietilenglicol monometil eter 2,000	1
35. 1.0 M Sulfato de amonio, 0.1 M HEPES pH 7.0, 0.5% w/v Polietilenglicol 8,000	1
36. 15 % v/v Tacsimato pH 7.0, 0.1 M HEPES pH 7.0, 2% w/v Polietilenglicol 3,350	1
37. 25 % w/v Polietilenglicol 1,500	3
38. 0.1 M HEPES pH 7.0, 30% v/v Jeffamine M-600 ® pH 7.0	7
39. 0.1 M HEPES pH 7.0, 30% v/v Jeffamine ED-2001 ® pH 7.0	1
40. 0.1 M ácido cítrico pH 3.5, 25% w/v Polietilenglicol 3,350	6
41. 0.1 M Trihidrato de acetato de sodio pH 4.5, 25% w/v Polietilenglicol 3,350	3
42. 0.1 M BIS-TRIS pH 5.5, 25% w/v Polietilenglicol 3,350	3/5
43. 0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 25% w/v Polietilenglicol 3,350	1
44. 0.1 M HEPES pH 7.5, 25% w/v Polietilenglicol 3,350	1
45. 0.1 M Tris pH 8.5, 25% w/v Polietilenglicol 3,350	1
46. 0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 20% w/v polietilenglicol monometil eter 5,000	1
47. 0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 28% w/v polietilenglicol monometil eter 2,000	1
48. 0.2 M Dihidrato de cloruro de calcío, 0.1 M BIS-TRIS pH 5.5, 45% v/v (+/-) -2- metil -2,4-pentanediol	1

Relato

1	Gota transparente	5	Esferulitos
2	Separación de fases	6	Agujas (crecimiento 1D)
3	Precipitado granular regular	7	Placas (crecimiento 2D)
4	Precipitado birrefringente o microcristales	8	Cristales sencillos (crecimiento 3D < 0.2 mm)
		9	Cristales sencillos (crecimiento 3D > 0.2mm)

FIGURA 28

TSAT-C_6-AETM-2 (B29)



TSAT-C_6-AEM-2 (B29)

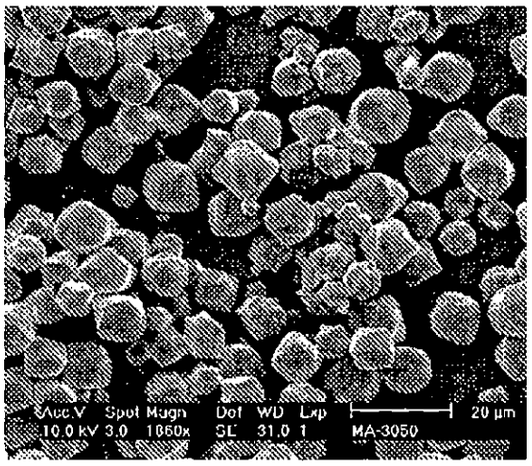


FIGURA 29

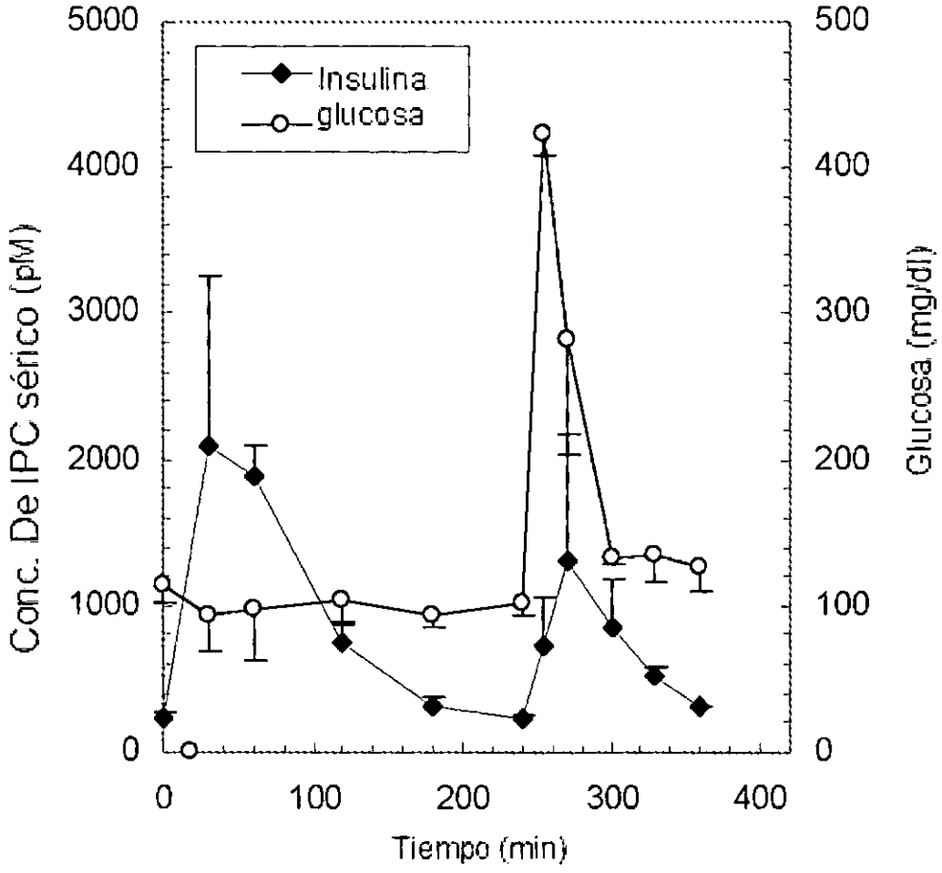

Insulina
glucosa
Conc. De IPC sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
5000
4000
3000
2000
1000
0
500
400
300
200
100
0
0
100
200
300
400

FIGURA 30

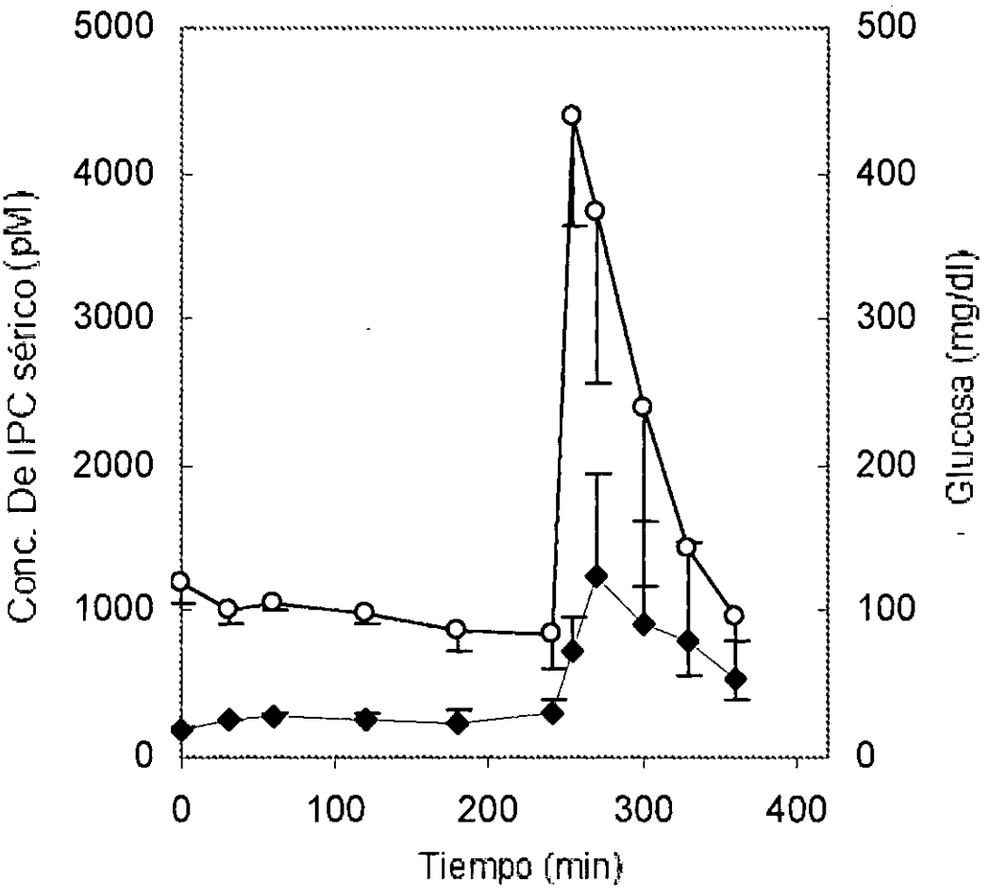

5000
4000
3000
2000
1000
0
500
400
300
200
100
0
0
100
200
300
400
Conc. De IPC sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)

FIGURA 31

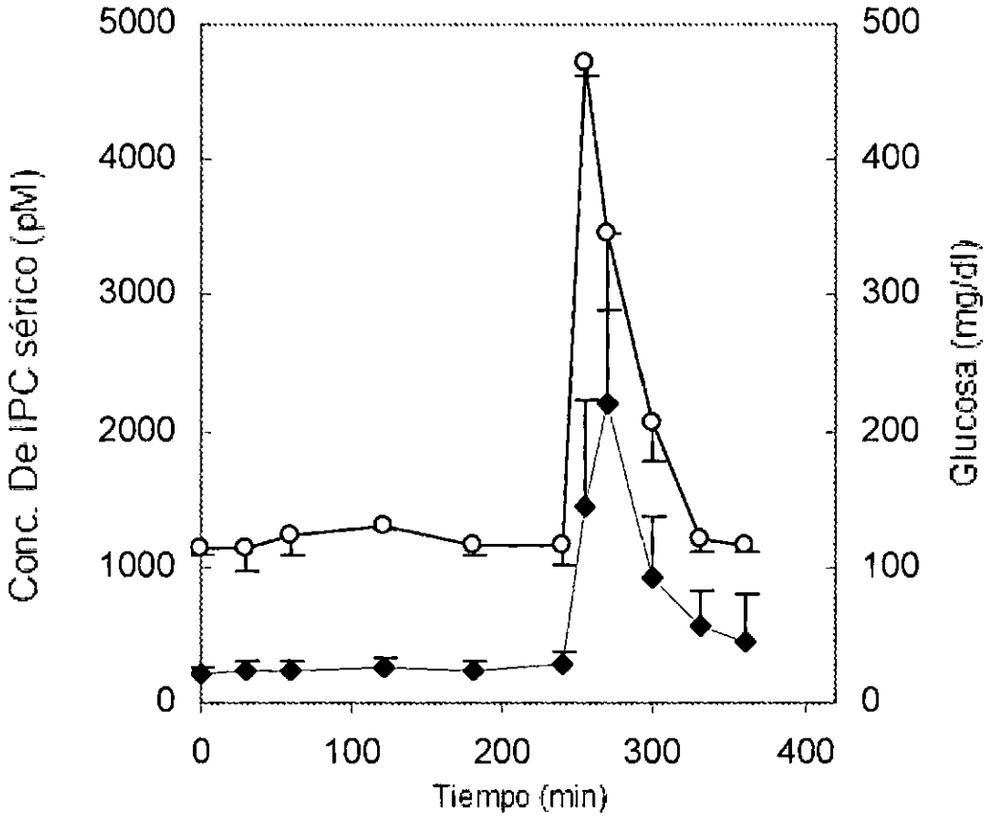
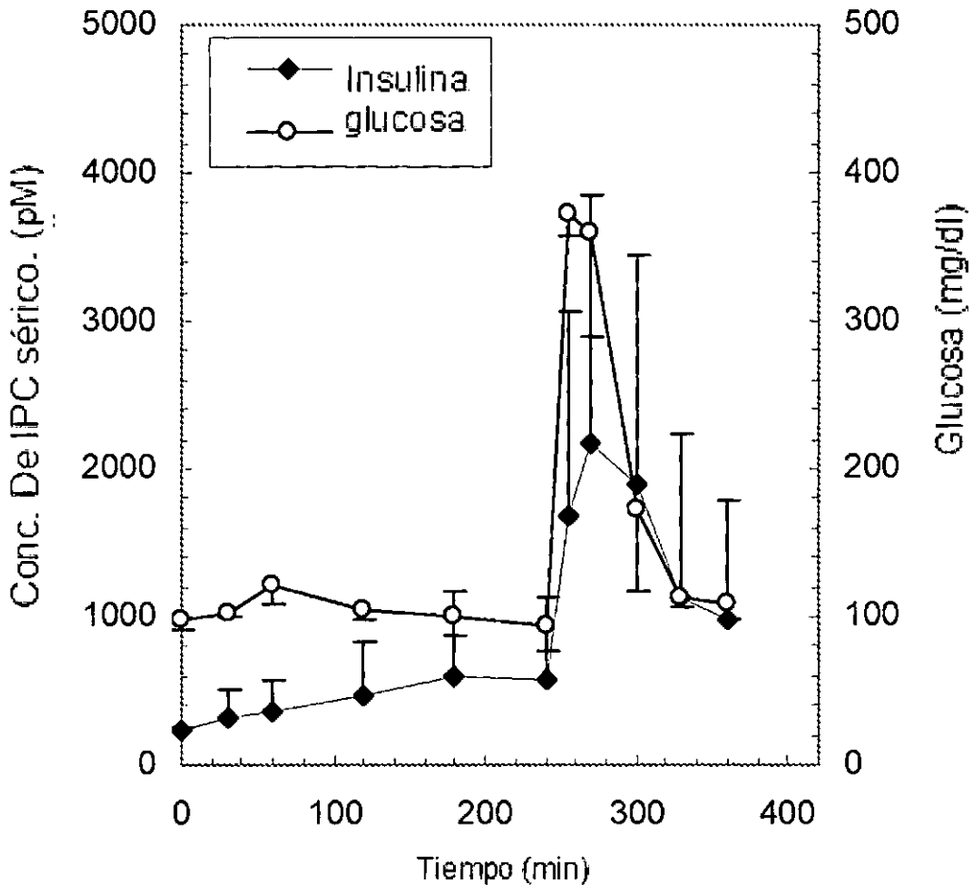

5000
4000
3000
2000
1000
0
500
400
300
200
100
0
0
100
200
300
400
Tiempo (min)
Conc. De IPC sérico (pM)
Glucosa (mg/dl)

FIGURA 32


Insulina
glucosa
Conc. De IPC sérico. (pM)
Glucosa (mg/dl)
Tiempo (min)
5000
4000
3000
2000
1000
0
500
400
300
200
100
0
0
100
200
300
400

SEQUENCE LISTING

<110> Lancaster, Thomas M.
Zion, Todd C.

<120> Crystalline Insulin-Conjugates

<130> 2005700-0032

<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

183

PATENT COOPERATION TREATY PCT/US2010/022277

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)*
10 May 2010 (10.05.2010)

Applicant's or agent's file reference
2005700-0032

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2010/022277

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 70 80

Authorized officer
Snell Matthew
e-mail pt11.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 11

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 2005700-0032	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US 10/22277	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 3 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. 28

☒ 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 10/22277

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.: 27-44 and 86-168
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:

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.:

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 10/22277

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C07K 14/62, A61K 38/28 (2010.01)
USPC - 514/3; 530/303
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) C07K 14/62, A61K 38/28 (2010.01)
USPC-514/3; 530/303

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC-514/12

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWEST(PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB); Google Patents; Google Scholar
glucose, responsive, controlled release, insulin, conjugate, crosslinked, Zion, chain terminator, lectin, concanavalin a, diabetic, affinity, ligand, competitive, triaminobenzene, triamidobenzene, amidoamine, polylysine, propanamide, dendrimer

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 2006/0019874 A1 (RHADHAKRISHNAN et al.) 26 January 2006 (26.01.2006) (para [0067], [0082], [0471]-[0487], [0511])	51-77, 81, and 83 --- 1-26, 45, 46, 78-80, 82, 84, and 85
X --- Y	US 2006/0216265 A1 (GOODMAN et al.) 28 September 2006 (28.09.2006) (para [0019], [0116], [0145], [0201], [0215], [0227], [0263],)	47-50 --- 1-26, 45, 46, 82, and 84
Y	US 5,527,524 A (TOMALIA et al.) 18 June 1996 (18.06.1996) ((col 1 ln 35-50; col 4 ln 25-30; col 5 ln 50-55; col 18 ln 25)	6-13, 45, 78-80, and 85

☐ 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
18 March 2010 (18.03.2010)	12 APR 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)

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-095151- -00000-0000
Fecha: 2011-07-28 17:46:40 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 206

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ Art 33 Decisión 486/00

- ☐ 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 095151
	Solicitud internacional	PCT/US2010/022277
	Fecha inicio fase nacional	28/08/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	№ 14227

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, Titulo 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...

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5 , 7 y 10 PBX: 5870000
Sede CAN: Av. Cra 50 No. 26-55 int. 2 Tel: 5880070
Call Center 5920400. Línea 01800-910165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia

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 095151
	Solicitud internacional	PCT/US2010/022277
	Fecha inicio fase nacional	28/08/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	№ 14228

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)

09 SET. 2011

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha_____.
adpa11

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5 , 7 y 10 PBX: 5870000
Sede CAN: Av. Cra 50 No. 26-55 int. 2 Tel: 5880070
Call Center 5920400. Linea 01800-910165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia