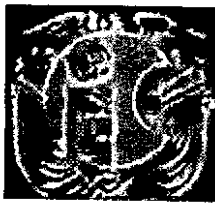




No. 12-011783- -00000-0000

Fecha: 2012-01-26 14:12:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 247



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

República de Colombia
Ministerio de Comercio, Industria y Turismo

PROPIEDAD
INDUSTRIAL

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD DE

PATENTE DE INVENCION
PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TITULO: PROFARMACOS QUE COMPRENDEN UN CONJUGADO
DE INSULINA-CONECTOR

52. CLASIFICACION INTERNACIONAL: A61K 47/48, A61P'3/10,
A61K 38/28, C07K 14/62

71. SOLICITANTE: SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH

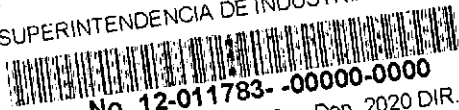
DOMICILIO: Brüningstrasse 50, D-65929 Frankfurt -
ALEMANIA

74. APODERADO: DRA. MARGARITA CASTELLANOS A.

22. BOGOTA, D.C., _____



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-011783- -00000-0000

A

Fecha: 2012-01-26 14:12:32
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 247

PATENTE DE INVENCION

☐

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 INVENCION PCT

☒

MODELO DE UTILIDAD PCT

☐

Art. 33 Decisión 486/00
Circular Única

☒

Indicación que se solicita una PCT

☒

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☒

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

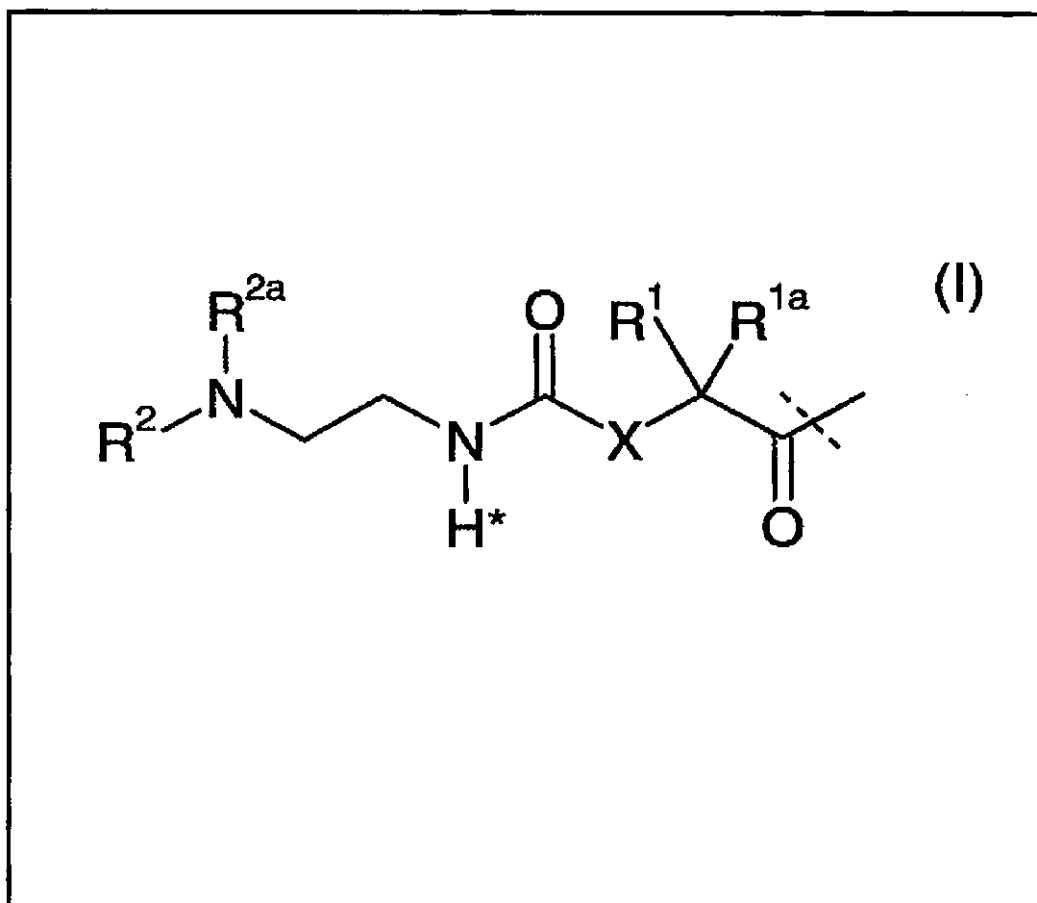
☐

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		PETITORIO		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 12-011783- -00000-0000 Fecha: 2012-01-26 14:12:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act 411 PRESENTACION Folios: 247	
FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTES PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL					
SOLICITUD DE:					
☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad. ☒ Capítulo I ☐ Capítulo II					
② SOLICITANTE (71)		Nombre: SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH Dirección: Brünigstrasse 50 D-65929 Frankfurt ALEMANIA Nacionalidad o Domicilio: Frankfurt ALEMANIA Lugar de Constitución: ALEMANIA Teléfono: Fax: E-mail:		IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____	
③ REPRESENTANTE O APODERADO		Nombre: MARGARITA CASTELLANOS A. Dirección: CALLE 94A No. 7A-09 Teléfono: 7560770 Fax: 7550158 E-mail: info@castellanosyco.co		IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número <u>39'779.654</u> TPA <u>70.819</u>	
④ INVENTOR (ES) (72)		VER ANEXO # 1			
⑤ PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/EP2010/061159</u> Fecha <u>30/07/2010</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2011/012718 A1</u> Fecha <u>03/02/2011</u>					
⑥ Título (54) <u>PROFARMACOS QUE COMPRENDEN UN CONJUGADO DE INSULINA-CONECTOR</u>					
⑦ Clasificación Internacional (51) <u>A61K 47/48, A61P 3/10, A61K 38/28, C07K 14/62</u>					
⑧ Prioridad		(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud	
SI ☒ NO ☐		EP	31/07/2009	09167027,3	
		EP	29/10/2009	09174525,7	
		EP	15/12/2009	09179336,4	
		EP	18/12/2009	09179818,1	
⑨ Comprobantes de pago Nos. <u>12-001788 y 12-001791</u> Fecha <u>Enero 06 de 2012</u>					

10 Anexos

- ☒ 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, junto con la sustitución del mismo a mi favor
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ 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 12x12
- ☐ 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.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Tarjeta Propietario, Extracto para la publicación, Formas PCT/IB/306

11 FIGURA CARACTERISTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

MARGARITA CASTELLANOS A.

FIRMA:

Margarita Castellanos A.

C.C. No. 39'779.654 Bogotá - TPA 70.819 C.S.J.

26 ENE. 2012

CASTELLANOS & CO LTDA
A B O G A D O S
Calle 94 A No. 7 A-09
Bogotá, D.C. – COLOMBIA

ANEXO # 1
INVENTORES

1. **HARALD RAU**
Schwarzwaldstr. 51/2
69124 Heidelberg
ALEMANIA
2. **FELIX CLEEMANN**
Turnerstrasse 114
69126 Heidelberg
ALEMANIA
3. **ULRICH HERSEL**
Fritz-Frey-Strasse 2
69121 Heidelberg
ALEMANIA
4. **SILVIA KADEN-VAGT**
Langgewann 79-81
69121 Heidelberg
ALEMANIA
5. **TORBEN LESSMANN**
Schimperstrasse 2
68167 Mannheim
ALEMANIA
6. **THOMAS WEGGE**
Kurfürstenanlage 45
69115 Heidelberg
ALEMANIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 001788

Bogotá D.C., Enero 06 de 2012 - 14:00:50

RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO

NI 800.174.641

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	444798900	06/01/2012	7.650.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00
				\$590.000.00

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-011783- -00000-0000

Fecha: 2012-01-26 14:12:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASOR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 247

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870264 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 6 de 2012 - 14:00:54

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 001791	
				Bogotá D.C., Enero 06 de 2012 - 14:00:50	
RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO				NI 800.174.641	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	444798900	06/01/2012	7.650.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO	
61 50005-01-01	SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	1.830.000.00	
				\$1.830.000.00	
=====					
SON: **UN MILL&OACUTE;N OCHOCIENTOS TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***					
Responsable: _____ ***** Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____			SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 12-011783- -00000-0000 Fecha: 2012-01-26 14:12:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 247		
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia Web: www.slc.gov.co e-mail: info@slc.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-810165 Call Center: (571) 6513240 Enero 6 de 2012 - 14:00:54					

000006

COLOMBIA

PODER

El (los) suscrito (s)

Sanofi-Aventis Deutschland GmbH

Domiciliado (s) en

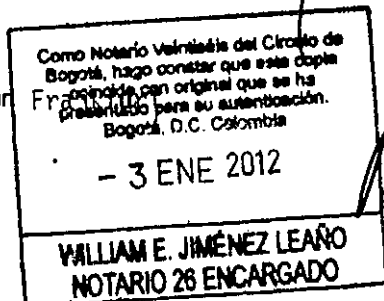
Bruningstrasse 50, 65929 Frankfurt,
Alemania

Por el presente confieren a **XIMENA CASTELLANOS A;** y/o **MARGARITA CASTELLANOS A.** abogadas con oficinas en la Calle 94A No. 7A-09, Bogotá - Colombia para y para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad Industrial y con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso - administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones:

a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; registro de marcas de fábrica de servicio, colectivas o defensivas; depósitos de nombres y enseñas comerciales; su renovación, prórroga, inscripción de traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Obtención de registros sanitarios; c) Acciones de oposición, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso - administrativos que promovamos o se nos promuevan, pudiendo en todos los actos y gestiones arriba mencionados sustituir éste mandato, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extrajudiciales.

Dado y firmado en

el 18-08-11



VOLLMACHT

Der die Unterzeichnenden (n)

Sanofi-Aventis Deutschland GmbH

Wohnhaft in

Brüningstraße 50, 65929 Frankfurt
Alemania

hiermit bevollmächtigt (en) **XIMENA CASTELLANOS A. und/oder MARGARITA CASTELLANOS A.** mit Büro in der Calle 94A No. 7A-09, Bogotá - Colombia, zu

und zur Gewährung des Schutzes meines (unseres) industriellen Eigentums, und zu diesem Zweck ermächtigen wir die genannten Bevollmächtigten, damit sie uns vertreten vor jedweder Behörde oder Person der Verwaltung, im Verwaltungsstreitverfahren und vor Gericht in allen Handlungen und Betreibungen in folgendem Zusammenhang:

a) Erlangung von Erfindungs-, Modell- und Industriellen Zeichnungspatenten; Registrierung von Fabrikmarken, Service-Kollektiv- und Schutzmarken; Hinterlegung von Handelsnamen und Zeichen; deren Erneuerung, Verlaengerung, Einschreibung ihrer Uebertragung und Namensoder Wohnsitzwechsel, freiwillige Löschung und die Lizenzregistrierung zum Gebrauch der obigen Rechte; b) Erlangung von Sanitären Registern c) Handlungen im Zusammenhang mit Widerspruch, Löschung, Ungültigkeit, vorbeugende Massnahmen und, allgemein Zivil, Straf-, Verwaltungs- oder Verwaltungsstreitprozesse, die wir einleiten oder welche gegen uns eingeleitet werden, wobei in allen oben genannten Handlungen und Betreibungen dieses Mandat ersetzt werden kann, Vergleiche geschlossen, verzichtet, entgegengenommen, kassiert, aufgegeben, Zustellungen angenommen und gerichtliche und aussergerichtliche Bevollmächtigte ernannt werden können.

Ausgestellt und unterzeichnet in

Datum

Sanofi-Aventis Deutschland GmbH

[Signature]

CASTELLANOS & Co.

ABOGADOS EN PROPIEDAD INTELECTUAL

CALLE 94 A No. 7 A - 09 / P.O. BOX 6349

TELÉFONO (57 1) 756 07 70 / FAX (57 1) 755 01 58

BOGOTÁ D.C. COLOMBIA

info@castellanosyco.com

No. 139 of the Roll of Deeds for 2011

I, the undersigned Dr. Oleg de Lousanoff, Notary in Frankfurt am Main (Federal Republic of Germany), hereby certify that

Dr. Michael Bankmann, date of birth: September 29, 1959, having his business address at: Industriepark Höchst, Building K 801, 65926 Frankfurt am Main (Germany), personally known to me,

and

Mr. Dieter Breuer, date of birth: May 01, 1950, having his business address at: Industriepark Höchst, Building K 801, 65926 Frankfurt am Main (Germany), who is personally known to me,

have subscribed the signatures on the foregoing page of the annexed document in my presence.

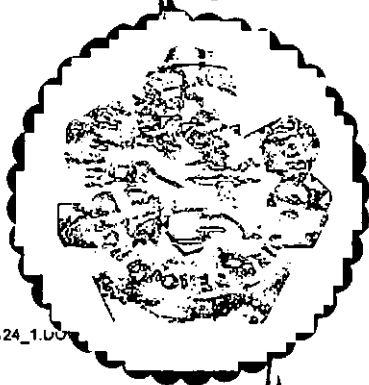
To document the power of representation regarding Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, (formerly: Aventis Pharma Deutschland GmbH), Frankfurt am Main, a certified copy of an instrument dated July 18, 2005 granting "Handlungsvollmacht" to Dr. Dieter Breuer for Sanofi-Aventis Deutschland GmbH is attached; I herewith certify that the attached copy of said document "Handlungsvollmacht" is a true copy of the original which has been presented to me.

I further certify that the electronic Commercial Register maintained by the local court in Frankfurt am Main - which I have inspected - shows under docket number HRB 40661 the registration of Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt am Main and of Dr. Michael Bankmann as Officer with statutory power of attorney ("Prokurist"), with joint Power of representation.

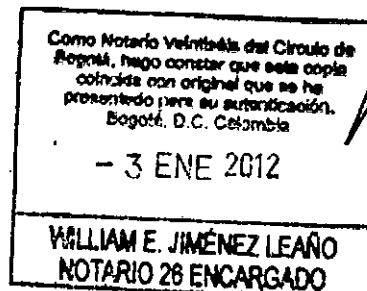
The Notary has informed the persons appearing about the provision of Section 3, Subsection 1, No. 7 of the Recording Act (Beurkundungsgesetz). The persons appearing thereupon have stated that the Notary is not prevented from recording under such provision.

The foregoing document has not been drafted by me. I am fluent in the German language. The non-German version of the text signed has not been reviewed by me, neither the conformity with the German version.

Frankfurt am Main, August 18, 2011



de Lousanoff
de Lousanoff
Notary



Beglaubigte Abschrift



Aventis Pharma Deutschland GmbH · D-65926 Frankfurt am Main

Persönlich/Vertraulich

Herrn

Dieter Breuer

Patent A. License Department Frankfurt

K 801

18.07.2005

Sehr geehrter Herr Breuer,

wir freuen uns, Ihnen mitzuteilen, dass sich die Geschäftsführung entschlossen hat, für unser Unternehmen Aventis Pharma Deutschland GmbH

HANDLUNGSVOLLMACHT

gemäß § 54 Abs. 1 HGB zu erteilen.

Diese Vollmacht berechtigt Sie, alle Geschäfte und Rechtshandlungen vorzunehmen, die Ihre Position als Leiter Patentverwaltung gewöhnlich mit sich bringt. Die Einschränkung des § 54 Abs. 2 HGB ist zu beachten.

Sie sind ermächtigt, innerhalb Ihres Aufgabengebietes im Rahmen der jeweils gültigen Unterschriftenrichtlinie von Aventis Pharma Deutschland GmbH zu zeichnen. Hierbei ist nach § 57 HGB der Zusatz „i.V.“ vor Ihrem Namen zu verwenden.

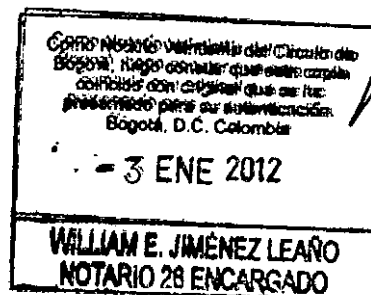
Die Handlungsvollmacht kann jederzeit von der Gesellschaft widerrufen werden. Sie erlischt mit Beendigung des Arbeitsverhältnisses mit der Gesellschaft.

Wir hoffen auf eine weiterhin gute Zusammenarbeit und verbleiben mit freundlichen Grüßen

Aventis Pharma Deutschland GmbH

Dieter Kohl

ppa. Brigitte Fuchs



Aventis Pharma Deutschland GmbH · Ein Unternehmen der sanofi-aventis Gruppe · Brigitte Fuchs · HR Frankfurt & CS · Industriepark Höchst ·
D-65926 Frankfurt am Main · Telefon 0 69 / 3 05-73 52 · Fax 0 69 / 3 05-1 88 99 · Brigitte.Fuchs@sanofi-aventis.com · www.sanofi-aventis.com ·

Vorsitzender des Aufsichtsrats: Hanspeter Spek
Geschäftsführer: Dr. Heinz-Werner Meier (Vorsitzender), Dr. Matthias Braun, Dieter Kohl, Dr. Martin Siewert, Prof. Dr. Günther Wess, Dr. Jean-Yves Wessely
Sitz der Gesellschaft: Frankfurt am Main · Handelsregister: Frankfurt am Main, Abt. B Nr. 40661

Statement of Fees

Value: EUR 38.000,00 pursuant to § 30 I KostO

Fee pursuant to §§ 141, 45 I KostO	EUR	27,00
Fee pursuant to §§ 141, 32, 58 I KostO	EUR	27,00
Fee pursuant to §§ 141, 55 I, 33 KostO	EUR	10,00
Fee pursuant to § 150 No. 1 KostO	EUR	13,00
Flat fee for copies pursuant to §§ 141, 136 I No. 1, II KostO	EUR	0,50
Postage pursuant to § 152 II Nr. 1 a) KostO	EUR	1,45
Subtotal	EUR	78,95
VAT 19 % pursuant to § 151a KostO	EUR	15,00
Total	EUR	93,95

Oleg de Lousanoff
de Lousanoff
Notary

**APOSTILLE**

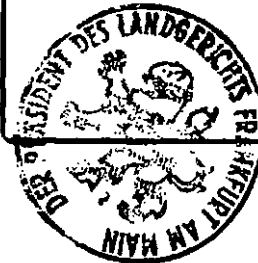
(Convention de la Haye du 5 octobre 1961)

1. Land: Bundesrepublik Deutschland
Diese öffentliche Urkunde
2. ist unterschrieben von Dr. Oleg de Lousanoff
3. in seiner Eigenschaft als amtlich bestellter Notar
4. sie ist versehen mit dem Siegel/Stempel des(der)
Notars

Bestätigt

5. in Frankfurt/Main
6. am 24.08.11
7. durch den Herrn Präsidenten des Landgerichts
8. unter Nr. 91 Ea A 7934
9. Siegel/Stempel
10. Unterschrift

i.A. Labernier



Como letrado valiente del Circuito de Bogotá, hago constar que esta copia coincide con el original que se ha presentado para su autenticación.
Bogotá, D.C. Colombia

- 3 ENE 2012

WILLIAM E. JIMÉNEZ LEAÑO
NOTARIO 26 ENCARGADO

Traducción Oficial del Idioma Inglés de la certificación adjunta (No. 139 del Registro de Actas para el año 2011) al poder que Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, domiciliada en Frankfurt am Main, Alemania, otorga a Ximena Castellanos A. y/o Margarita Castellanos A.

Registro de Actas No. 139 para el año 2011

Yo, el suscrito Dr. Oleg de Lousanoff, Notario en Frankfurt am Main, República Federal de Alemania, mediante este documento certifico que

el Dr. Michael Bankmann

fecha de nacimiento: 29 de Septiembre de 1959,

con domicilio comercial en: Industriepark Höchst,

Edificio K 801, 65926 Frankfurt am Main, Alemania,

quien es conocido personalmente por el suscrito Notario,

y

el Señor Dieter Breuer,

fecha de nacimiento: 01 de Mayo de 1950

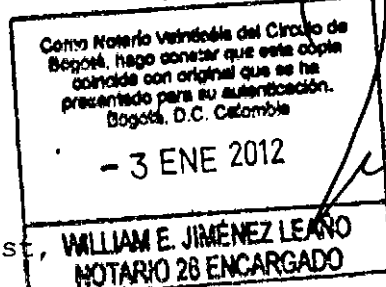
con domicilio comercial en: Industriepark Höchst,

Edificio K 801, 65926 Frankfurt am Main, Alemania,

quien es conocido personalmente por el suscrito Notario,

suscribieron en mi presencia las firmas que aparecen en el documento adjunto.

Con el fin de documentar el poder de representación con respecto a Sanofi-Aventis Deutschland GmbH (anteriormente llamada: Sanofis Pharma Deutschland GmbH), con domicilio en Frankfurt am Main, se adjunta una copia certificada de un instrumento fechado el día 18 de Julio de 2005, mediante el cual se otorga "Poder Especial" al Señor Dieter Breuer para



Sanofi-Aventis Deutschland GmbH. Mediante el presente documento certifico que la copia adjunta de dicho instrumento de "Poder Especial" es una copia auténtica del original, la cual me fue presentada y yo tuve a la vista.

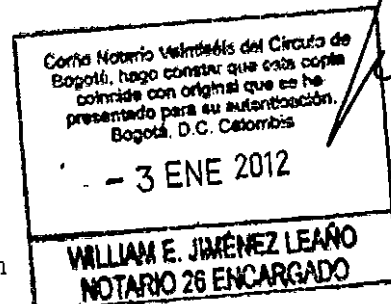
Certifico además que, con base en la revisión que yo llevé a cabo personalmente, el Registro Comercial Electrónico que es llevado por el Juzgado Municipal de Frankfurt am Main muestra bajo la minuta Número HRB 40661 el registro de la compañía Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, domiciliada en Frankfurt am Main, y que el Señor Dr. Michael Bankmann es un funcionario de dicha compañía quien tiene poder estatutario ("Apoderado"), con poder colectivo de representación.

El Notario informó a las personas comparecientes acerca de lo dispuesto en la Sección 3, Subsección 1, Numeral 7 de la Ley Federal Alemana de Notarización. Las personas comparecientes declararon acto seguido que de conformidad con tal disposición el Notario no tiene impedimento alguno.

El documento "Poder" adjunto no fue redactado por mí. Yo domino el idioma Alemán. Yo no revisé la versión no-Alemana del texto que aparece firmada ni tampoco he constatado su concordancia con la versión Alemana.

Frankfurt am Main, 18 de Agosto de 2011

Dr. Oleg de Lousanoff
Notario en Frankfurt am Main
(Firma y Sello Oficial)

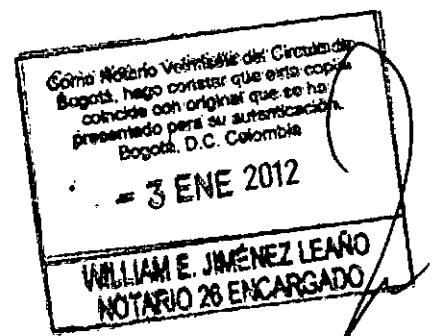


----- (continúa en la 3ª página) -----

Nota de Gastos

Valor del negocio: EUR 38.000,00 art. 30 I Disp. Imp.	
Impuesto según art. 141 45I Disp. Impuestos	EUR 27,00
Impuesto según art. 141, 32, 58I Disp. Imp.	EUR 27,00
Impuesto según art. 141, 55I, 33 Disp. Imp.	EUR 10,00
Impuesto según art 150 No. 1 Disp. Imp.	EUR 13,00
Impuesto art. 141, 136I No. 1,II Disp. Imp.	EUR 0,50
Impuesto según art. 152II 1a) Disp. Imp.	EUR 1,45
19% IVA según art. 151 a Disp. Imp.	EUR 15,00
Total	EUR 93,95

Dr. Oleg de Lousanoff
 Notario en Frankfurt am Main
 (Firma y Sello Oficial)



[Aparece Apostilla en Alemán fechada el día 24.08.11 que legaliza la firma del Dr. Oleg de Lousanoff Notario en Frankfurt am Main bajo el No. 91 Ea A 7934]

M. Méndez S.
JOSE MIGUEL MENDEZ
 Traductor Oficial
 Res. 911 de Mayo 1988 MINJUSTICIA

Traducción Oficial del Alemán de la Fotocopia Autenticada de una comunicación ("Poder Especial") fechada el 18.07.2005 y de la Apostille adjuntas al poder que Sanofi-Aventis Deutschland GmbH otorga a Ximena Castellanos y/o Margarita Castellanos.

Fotocopia Autenticada

Grupo
sanofi aventis

Aventis Pharma Deutschland GmbH • D-65929 Frankfurt am Main

Personal/Confidencial

Señor Dieter Breuer

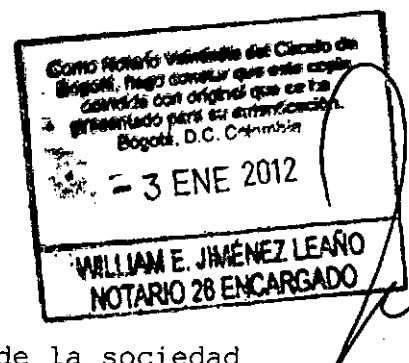
Departamento Patentes

K 801

18.07.2005

Muy Apreciado Señor Breuer:

Nos alegra comunicarle a Usted que la Gerencia de la sociedad ha decidido otorgarle



PODER ESPECIAL

para nuestra empresa Aventis Pharma Deutschland GmbH de conformidad con el Artículo 54 inciso 1 Código de Comercio.

Este poder lo autoriza a Usted a realizar todos los negocios y actos legales que habitualmente conlleva su posición como Director de la Administración de Patentes. Es de tener presente la restricción conforme al Artículo 54 inciso 2 del Código de Comercio.

Usted queda habilitado para firmar, dentro del ámbito de sus tareas en el marco de las normas vigentes sobre firmas de Aventis Pharma Deutschland GmbH. De conformidad con el Artículo 57 del Código de Comercio, Usted debe emplear la abreviatura "e. r." (= en representación) antes de su nombre.

El Poder Especial puede ser revocado en cualquier momento por la sociedad. Dicho poder caduca al terminar Usted su relación laboral con la sociedad.

000014

Esperamos que el buen trabajo conjunto siga como hasta ahora y nos despedimos de Usted con saludos cordiales.

Aventis Pharma Deutschland GmbH

Dieter Kohl (firma)

Por poder: Brigitte Fuchs (firma)

APOSTILLE

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

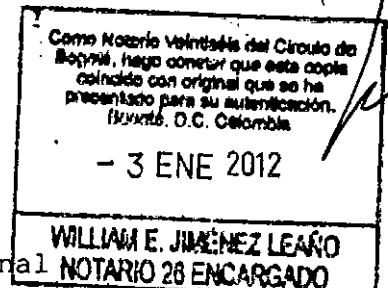
MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES
20 SET 20
V. DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ, D.C.

1. País: República Federal de Alemania
Este documento público
2. Está firmado por: Dr. Oleg de Lousanoff
3. En su calidad de: Notario nombrado oficialmente
de la Notaría de Alfred Kluge en Ludwigshafen am Rhein
4. Y lleva el sello oficial: del Notario

Confirmado

5. En: Frankfurt/Main
6. El día: 24.08.11
7. Por: El Señor Presidente del Tribunal Regional
8. Bajo el No. 91 Ea A 7934
9. Sello: EL PRESIDENTE TRIBUNAL REGIONAL
EN FRANKFURT AM MAIN

NOTARIAL
RECEIVED
095183
RECEIVED
RECEIVED



ADOLF WATZKE

ADOLF WATZKE
Traductor Oficial
Res. 2433 Minjusticia

DE 2009/2295

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 340)

To:

SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH
Patents Germany
Industriepark Hoechst
Bldg. K801
65926 Frankfurt am Main

Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, FRANKFURT AM MAIN

Patentabteilung K-801

Vorg.

Date of mailing (day/month/year)

14 March 2011 (14.03.2011)

Applicant's or agent's file reference

CPX66580PC

Eing.:

28. März 2011

International application No.

PCT/EP2010/061159

O WW

O ablegen

O Vert. wie Vorg. / angegeben

International filing date (day/month/year)

30 July 2010 (30.07.2010)

IMPORTANT NOTIFICATION

The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant☐ the inventor☐ the agent☐ the common representative

Name and Address

ASCENDIS PHARMA AS
Tuborg Boulevard 12
DK-2900 Hellerup
Denmark

State of Nationality

DK

State of Residence

DK

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

SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH
Patents Germany
Industriepark Hoechst
Bldg. K801
65926 Frankfurt am Main
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

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 89 70

Authorized officer

Rochaix Thomas

e-mail pt06.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 06

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT**NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE**(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

BÜCHEL, Edwin
Isenbruck Bösl Hörschler LLP
Eastsite One
Seckenheimer Landstraße 4
68163 Mannheim
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 04 February 2011 (04.02.2011)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference CPX66580PC	
International application No. PCT/EP2010/061159	International filing date (day/month/year) 30 July 2010 (30.07.2010)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address WEGGE, Thomas Kurfürstenanlage 43 69115 Heidelberg Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	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 WEGGE, Thomas Kurfürstenanlage 45 69115 Heidelberg Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	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 Preliminary Examining Authority
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned
	☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 89 70

Authorized officer

Croci Christelle

e-mail pt06.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 06

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 February 2011 (03.02.2011)(10) International Publication Number
WO 2011/012718 A1

(51) International Patent Classification:

A61K 47/48 (2006.01) A61K 38/28 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01) C07K 14/62 (2006.01)

(74) Agent: BÜCHEL, Edwin; Isenbruck Bösl Hörschler
LLP, Eastsite One, Seckenheimer Landstraße 4, 68163
Mannheim (DE).

(21) International Application Number:

PCT/EP2010/061159

(22) International Filing Date:

30 July 2010 (30.07.2010)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

09167027.3 31 July 2009 (31.07.2009) EP
09174525.7 29 October 2009 (29.10.2009) EP
09179336.4 15 December 2009 (15.12.2009) EP
09179818.1 18 December 2009 (18.12.2009) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): AS-
CENDIS PHARMA AS [DK/DK]; Tuborg Boulevard
12, DK-2900 Hellerup (DK).

(72) Inventors; and

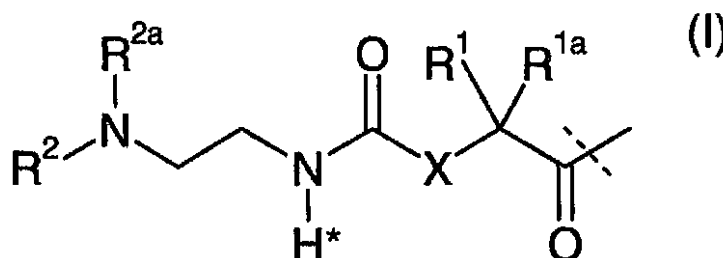
(75) Inventors/Applicants (for US only): RAU, Harald [DE/
DE]; Schwarzwaldstr. 51/2, 69124 Heidelberg (DE).
CLEEMANN, Felix [DE/DE]; Turnerstraße 114, 69126
Heidelberg (DE). HERSEL, Ulrich [DE/DE]; Fritz-Frey-
Strasse 2, 69121 Heidelberg (DE). KADEN-VAGT, Sil-
via [DE/DE]; Langgewann 79-81, 69121 Heidelberg
(DE). LESSMANN, Torben [DE/DE]; Schimperstrasse
2, 68167 Mannheim (DE). WEGGE, Thomas [DE/DE];
Kurfürstenanlage 43, 69115 Heidelberg (DE).

(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, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AL, 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))

(54) Title: PRODRUGS COMPRISING AN INSULIN LINKER CONJUGATE



(57) Abstract: The present invention relates to a prodrug or a pharmaceutically acceptable salt thereof comprising an insulin linker conjugate D-L, wherein D represents the insulin moiety; and -L is a non-biologically active linker moiety -L¹ represented by formula (I), wherein the dashed line indicates the attachment to one of the amino groups of the insulin by forming an amide bond. The invention further relates to pharmaceutical compositions comprising said prodrugs as well as their use as a medicament for treating or preventing diseases or disorders which can be treated by insulin.

Prodrugs comprising an insulin linker conjugate

The present invention relates to prodrugs, pharmaceutical compositions comprising said prodrugs as well as their use as a medicament for treating or preventing diseases or disorders which can be treated by insulin.

Insulin therapy is characterized by a high need for keeping the insulin drug release within very strict levels as the therapeutic window is narrow, and the adverse effects of hyperinsulinemia can potentially be life threatening. Numerous insulin preparations have been commercialized, with different action profiles to suit specific needs of the diabetic population. Fast acting insulin analogs are administered just before meals, in order to control the peak in plasma glucose following food ingestion, whereas long acting insulin analogs are typically given once or twice a day to provide a steady basal insulin level.

Therefore, there is a clear need for novel long acting preparations of insulin, that continuously release insulin throughout the entire period between administrations.

WO-A 2006/003014 describes a hydrogel capable of releasing insulin with the possibility of reduced dosing frequency as compared to standard daily basal insulin injections. However, the insulin is released at a rate too fast for ensuring strict insulintropic control for periods extending 2 days. In fact the insulin is released with a half life of approximately 30 hours, meaning that the prodrug must be administered at least every 30 hours in order for the peak to trough ratio to be below 2 at steady state.

The concept of preparing a reversible polymer prodrug conjugate of insulin has been explored by Shechter et al. and described in scientific articles and patent applications (e.g. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2008(70), 19–28 and WO-A 2004/089280). The insulin is conjugated to a 40 kDa PEG polymer through a fluorenyl-linker. Hydrolysis of said linker molecule releases insulin with a half life of approximately 30 hours, meaning that the prodrug must be administered at least every 30 hours in order for the peak to trough ratio to be below 2 at steady state.

Other attempts of reducing the insulin dosing frequency have been made. Hinds et al., Journal of Controlled Release, 2005 (104), 447–460, describe a method of producing a once weekly insulin, by first permanently PEGylating the insulin molecule and then subsequently microencapsulating the

PEGylated insulin in PLGA microparticles. In this case, the insulin was subjected to substantial structural modification through permanent modification by a high molecular weight polymer entity. Such high molecular weight modified insulins may exhibit reduced efficacy by diminished receptor binding and may also exhibit injection site reactions such as lipoatrophy due to the extended presence of high concentrations of the high molecular weight insulin in the subcutaneous tissue. Furthermore, such PEGylated insulins will exhibit a lower distribution volume, which is of particular disadvantage in the treatment of diabetes.

Nevertheless, PEGylation of insulin apparently serves to protect the peptide from deterioration in the PLGA polymer formulation. The effect of PEGylation to protect peptides from acylation in a degrading PLGA formulation was demonstrated for octreotide by D. H. Na et al., AAPS PharmSciTech 2003, 4 (4) Article 72.

PLGA encapsulation of proteins has been shown to cause side reactions of the polymer esters with peptide or protein amino groups. Lactic acid acylation products have been observed after exposure of the formulations to buffered solutions at neutral pH (G. Zhu et al., Nature Biotechnology 18 (2000) 52-57; A. J. Domb et al., Pharm. Res. 11 (1994) 865-868; A. Lucke et al., Pharm. Res. 19 (2002) 175-181).

Specifically for insulin, detrimental effects of polymer formulations have been demonstrated by P. G. Shao et al., Pharm. Dev. Technol. 4 (1999) 633-642 (see also P. G. Shao et al., Pharm. Dev. Technol. 5 (2000) 1-9).

Furthermore, insulin is known to readily undergo side reactions that are related to the presence of three disulfide bridges in the molecule. For instance, insulin may be split into A and B chains by disulfide bond cleavage or dimers or oligomers may be formed due to disulfide interchange reactions. Such disulfide reshuffling is particularly likely, if insulin molecules are forced into close contact in a random way. This intrinsic lability of the insulin molecule has significantly hampered progress in long-acting depot development and prevented the use of other polymer formulations where insulin is encapsulated in a way similar to an amorphous precipitate which is well known to give rise to various degradation products arising from extensive disulfide exchange.

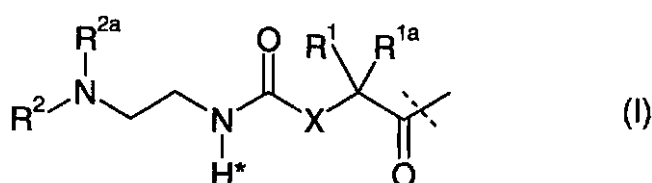
Therefore the challenge remains to develop long-acting insulin without compromising the insulin pharmacodynamics by permanent attachment of a high molecular weight entity or by causing structural damage to the molecule while during its presence in the depot.

Thus an object of the present invention is to provide an insulin containing prodrug that meets at least partially the above requirements.

The object is achieved by a prodrug or a pharmaceutically acceptable salt thereof comprising an insulin linker conjugate D-L, wherein

D represents the insulin moiety; and

-L is a non-biologically active linker moiety -L¹ represented by formula (I),



wherein the dashed line indicates the attachment to one of the amino groups of the insulin by forming an amide bond;

X is C(R³R^{3a}); or N(R³);

R^{1a}, R^{3a} are independently selected from the group consisting of H, NH(R^{2b}), N(R^{2b})C(O)R⁴ and C₁₋₄ alkyl;

R¹, R², R^{2a}, R^{2b}, R³, R⁴ are independently selected from the group consisting of H and C₁₋₄ alkyl,

wherein L¹ is substituted with one L²-Z and optionally further substituted, provided that the hydrogen marked with the asterisk in formula (I) is not replaced by a substituent and wherein

L² is a single chemical bond or a spacer; and

Z is a hydrogel.

It was now surprisingly discovered, that a prodrug of the present invention may provide insulin release from a subcutaneous depot in structurally intact form over time periods of at least 2 days between administrations. As a further advantage structural integrity of the released insulin may be provided by a well-hydrated polymer matrix minimizing intermolecular contact of insulin molecules

and sustained release may be enabled by means of a self-cleaving prodrug linker between the insulin and the polymer matrix.

Thus it should be possible to administer insulin in form of a prodrug of the present invention less frequently than current long acting insulins. Further advantages should be a small peak to trough ratio, which greatly reduce the risk of hypoglycemic episodes. This may help patients to reduce the frequency of injections, while being able to maintain optimal control the plasma levels of insulin and consequently blood glucose.

"Insulin" according to the present invention means recombinant human insulin, lantus, insulin glargine, insulin detemir, insulin glulisine, insulin aspart, insulin lispro, insulin conjugated to low-molecular-weight PEG. Low-molecular-weight PEG has a molecular weight smaller than 10 kDa.

Insulin bound to a non-biologically active linker is referred to as "insulin moiety".

By "insulin analogue" as used herein is meant a polypeptide which has a molecular structure which formally can be derived from the structure of a naturally occurring insulin, for example that of human insulin, by deleting and/or exchanging at least one amino acid residue occurring in the naturally occurring insulin and/or adding at least one amino acid residue. The added and/or exchanged amino acid residues can either be codable amino acid residues or other naturally occurring residues or purely synthetic amino acid residues.

The insulin analogues may be such wherein position 28 of the B chain may be modified from the natural Pro residue to one of Asp, Lys, or Ile. In another aspect Lys at position B29 is modified to Pro. Also, Asn at position A21 may be modified to Ala, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr or Val, in particular to Gly, Ala, Ser, or Thr and preferably to Gly. Furthermore, Asn at position B3 may be modified to Lys or Asp. Further examples of insulin analogues are des(B30) human insulin; des(B30) human insulin analogues; insulin analogues wherein PheB1 has been deleted; insulin analogues wherein the A-chain and/or the B-chain have an N-terminal extension and insulin analogues wherein the A-chain and/or the B-chain have a C-terminal extension. Thus one or two Arg may be added to position B1.

With desB30 insulin", "desB30 human insulin" is meant a natural insulin or an analogue thereof lacking the B30 amino acid residue. Similarly, "desB29desB30 insulin" or desB29desB30 human insulin" means a natural insulin or an analogue thereof lacking the B29 and B30 amino acid residues.

With "B1", "A1" etc. is meant the amino acid residue at position 1 in the B-chain of insulin (counted from the N-terminal end) and the amino acid residue at position 1 in the A-chain of insulin (counted from the N-terminal end), respectively. The amino acid residue in a specific position may also be denoted as e.g. PheB1 which means that the amino acid residue at position B1 is a phenylalanine residue.

"Non-biologically active linker" means a linker which does not show the pharmacological effects of the drug derived from the biologically active agent.

"Protective groups" refers to a moiety which temporarily protects a chemical functional group of a molecule during synthesis to obtain chemoselectivity in subsequent chemical reactions. Protective groups for alcohols are, for example, benzyl and trityl, protective groups for amines are, for example, tert-butyloxycarbonyl, 9-fluorenylmethyloxycarbonyl and benzyl and for thiols examples of protective groups are 2,4,6-trimethoxybenzyl, phenylthiomethyl, acetamidomethyl, p-methoxybenzyloxycarbonyl, tert-butylthio, triphenylmethyl, 3-nitro-2-pyridylthio, 4-methyltrityl.

"Protected functional groups" means a chemical functional group protected by a protective group.

"Acylating agent" means a moiety of the structure $R-(C=O)-$, providing the acyl group in an acylation reaction, optionally connected to a leaving group, such as acid chloride, N-hydroxy succinimide, pentafluorophenol and para-nitrophenol.

"Alkyl" means a straight-chain or branched carbon chain. Each hydrogen of an alkyl carbon may be replaced by a substituent.

"Aryl" refers to any substituent derived from a monocyclic or polycyclic or fused aromatic ring, including heterocyclic rings, e.g. phenyl, thiophene, indolyl, naphthyl, pyridyl, which may optionally be further substituted.

"Acyl" means a chemical functional group of the structure $R-(C=O)-$, wherein R is an alkyl or aryl.

"C₁₋₄ alkyl" means an alkyl chain having 1 - 4 carbon atoms, e.g. if present at the end of a molecule: methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, or e.g. $-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH(C_2H_5)-$, $-C(CH_3)_2-$, when two moieties of a molecule are linked by the alkyl group. Each hydrogen of a C₁₋₄ alkyl carbon may be replaced by a substituent.

"C₁₋₆ alkyl" means an alkyl chain having 1 - 6 carbon atoms, e.g. if present at the end of a molecule: C₁₋₄ alkyl, methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, isobutyl, sec-butyl; tert-butyl, n-pentyl, n-hexyl, or e.g. -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -CH(CH₃)-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH(C₂H₅)-, -C(CH₃)₂-, when two moieties of a molecule are linked by the alkyl group. Each hydrogen of a C₁₋₆ alkyl carbon may be replaced by a substituent.

Accordingly, "C₁₋₁₈ alkyl" means an alkyl chain having 1 to 18 carbon atoms and "C₈₋₁₈ alkyl" means an alkyl chain having 8 to 18 carbon atoms. Accordingly, "C₁₋₅₀ alkyl" means an alkyl chain having 1 to 50 carbon atoms.

"C₂₋₅₀ alkenyl" means a branched or unbranched alkenyl chain having 2 to 50 carbon atoms, e.g. if present at the end of a molecule: -CH=CH₂, -CH=CH-CH₃, -CH₂-CH=CH₂, -CH=CH-CH₂-CH₃, -CH=CH-CH=CH₂, or e.g. -CH=CH-, when two moieties of a molecule are linked by the alkenyl group. Each hydrogen of a C₂₋₅₀ alkenyl carbon may be replaced by a substituent as further specified. Accordingly, the term "alkenyl" relates to a carbon chain with at least one carbon carbon double bond. Optionally, one or more triple bonds may occur.

"C₂₋₅₀ alkynyl" means a branched or unbranched alkynyl chain having 2 to 50 carbon atoms, e.g. if present at the end of a molecule: -C≡CH, -CH₂-C≡CH, CH₂-CH₂-C≡CH, CH₂-C≡C-CH₃, or e.g. -C≡C- when two moieties of a molecule are linked by the alkynyl group. Each hydrogen of a C₂₋₅₀ alkynyl carbon may be replaced by a substituent as further specified. Accordingly, the term "alkynyl" relates to a carbon chain with at least one carbon carbon triple bond. Optionally, one or more double bonds may occur.

"C₃₋₇ cycloalkyl" or "C₃₋₇ cycloalkyl ring" means a cyclic alkyl chain having 3 to 7 carbon atoms, which may have carbon-carbon double bonds being at least partially saturated, e.g. cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, cyclohexyl, cyclohexenyl, cycloheptyl. Each hydrogen of a cycloalkyl carbon may be replaced by a substituent. The term "C₃₋₇ cycloalkyl" or "C₃₋₇ cycloalkyl ring" also includes bridged bicycles like norbornane or norbornene. Accordingly, "C₃₋₅ cycloalkyl" means a cycloalkyl having 3 to 5 carbon atoms.

Accordingly, "C₃₋₁₀ cycloalkyl" means a cyclic alkyl having 3 to 10 carbon atoms, e.g. C₃₋₇ cycloalkyl; cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, cyclohexyl, cyclohexenyl, cycloheptyl, cyclooctyl, cyclononyl, cyclodecyl. The term "C₃₋₁₀ cycloalkyl" also includes at least partially saturated carbomono- and -bicycles.

"Halogen" means fluoro, chloro, bromo or iodo. It is generally preferred that halogen is fluoro or chloro.

"4 to 7 membered heterocyclyl" or "4 to 7 membered heterocycle" means a ring with 4, 5, 6 or 7 ring atoms that may contain up to the maximum number of double bonds (aromatic or non-aromatic ring which is fully, partially or un-saturated) wherein at least one ring atom up to 4 ring atoms are replaced by a heteroatom selected from the group consisting of sulfur (including -S(O)-, -S(O)₂-), oxygen and nitrogen (including =N(O)-) and wherein the ring is linked to the rest of the molecule via a carbon or nitrogen atom. Examples for a 4 to 7 membered heterocycles are azetidine, oxetane, thietane, furan, thiophene, pyrrole, pyrroline, imidazole, imidazoline, pyrazole, pyrazoline, oxazole, oxazoline, isoxazole, isoxazoline, thiazole, thiazoline, isothiazole, isothiazoline, thiadiazole, thiadiazoline, tetrahydrofuran, tetrahydrothiophene, pyrrolidine, imidazolidine, pyrazolidine, oxazolidine, isoxazolidine, thiazolidine, isothiazolidine, thiadiazolidine, sulfolane, pyran, dihydropyran, tetrahydropyran, imidazolidine, pyridine, pyridazine, pyrazine, pyrimidine, piperazine, piperidine, morpholine, tetrazole, triazole, triazolidine, tetrazolidine, diazepane, azepine or homopiperazine.

"9 to 11 membered heterobicyclyl" or "9 to 11 membered heterobicycle" means a heterocyclic system of two rings with 9 to 11 ring atoms, where at least one ring atom is shared by both rings and that may contain up to the maximum number of double bonds (aromatic or non-aromatic ring which is fully, partially or un-saturated) wherein at least one ring atom up to 6 ring atoms are replaced by a heteroatom selected from the group consisting of sulfur (including -S(O)-, -S(O)₂-), oxygen and nitrogen (including =N(O)-) and wherein the ring is linked to the rest of the molecule via a carbon or nitrogen atom. Examples for a 9 to 11 membered heterobicycle are indole, indoline, benzofuran, benzothiophene, benzoxazole, benzisoxazole, benzothiazole, benzisothiazole, benzimidazole, benzimidazoline, quinoline, quinazoline, dihydroquinazoline, quinoline, dihydroquinoline, tetrahydroquinoline, decahydroquinoline, isoquinoline, decahydroisoquinoline, tetrahydroisoquinoline, dihydroisoquinoline, benzazepine, purine or pteridine. The term 9 to 11 membered heterobicycle also includes spiro structures of two rings like 1,4-dioxo-8-azaspiro[4.5]decane or bridged heterocycles like 8-aza-bicyclo[3.2.1]octane.

In case the insulin prodrugs comprising the compounds according to formula (I) contain one or more acidic or basic groups, the invention also comprises their corresponding pharmaceutically or toxicologically acceptable salts, in particular their pharmaceutically utilizable salts. Thus, the insulin prodrugs comprising the compounds of the formula (I) which contain acidic groups can be used according to the invention, for example, as alkali metal salts, alkaline earth metal salts or as

ammonium salts. More precise examples of such salts include sodium salts, potassium salts, calcium salts, magnesium salts or salts with ammonia or organic amines such as, for example, ethylamine, ethanolamine, triethanolamine or amino acids. Insulin prodrugs comprising the compounds of the formula (I) which contain one or more basic groups, i.e. groups which can be protonated, can be present and can be used according to the invention in the form of their addition salts with inorganic or organic acids. Examples for suitable acids include hydrogen chloride, hydrogen bromide, phosphoric acid, sulfuric acid, nitric acid, methanesulfonic acid, p-toluenesulfonic acid, naphthalenedisulfonic acids, oxalic acid, acetic acid, tartaric acid, lactic acid, salicylic acid, benzoic acid, formic acid, propionic acid, pivalic acid, diethylacetic acid, malonic acid, succinic acid, pimelic acid, fumaric acid, maleic acid, malic acid, sulfaminic acid, phenylpropionic acid, gluconic acid, ascorbic acid, isonicotinic acid, citric acid, adipic acid, and other acids known to the person skilled in the art. If the insulin prodrugs comprising the compounds of the formula (I) simultaneously contain acidic and basic groups in the molecule, the invention also includes, in addition to the salt forms mentioned, inner salts or betaines (zwitterions). The respective salts according to insulin prodrugs comprising the formula (I) can be obtained by customary methods which are known to the person skilled in the art like, for example by contacting these with an organic or inorganic acid or base in a solvent or dispersant, or by anion exchange or cation exchange with other salts. The present invention also includes all salts of the insulin prodrugs comprising the compounds of the formula (I) which, owing to low physiological compatibility, are not directly suitable for use in pharmaceuticals but which can be used, for example, as intermediates for chemical reactions or for the preparation of pharmaceutically acceptable salts.

To enhance physicochemical or pharmacokinetic properties of a drug, such as insulin, *in vivo*, such drug can be conjugated with a carrier. If the drug is transiently bound to a carrier and/or a linker, such systems are commonly assigned as carrier-linked prodrugs. According to the definitions provided by IUPAC (as given under <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac.medchem>, accessed on July 22, 2009), a carrier-linked prodrug is a prodrug that contains a temporary linkage of a given active substance with a transient carrier group that produces improved physicochemical or pharmacokinetic properties and that can be easily removed *in vivo*, usually by a hydrolytic cleavage.

The linkers employed in such carrier-linked prodrugs are transient, meaning that they are non-enzymatically hydrolytically degradable (cleavable) under physiological conditions (aqueous buffer at pH 7.4, 37°C) with half-lives ranging from, for example, one hour to three months.

Suitable carriers are polymers and can either be directly conjugated to the linker or via a non-cleavable spacer. The term "insulin hydrogel prodrug" refers to carrier-linked prodrugs of insulin, wherein the carrier is a hydrogel. The terms "hydrogel prodrug" and "hydrogel-linked prodrug" refer to prodrugs of biologically active agents transiently linked to a hydrogel and are used synonymously. A "hydrogel" may be defined as a three-dimensional, hydrophilic or amphiphilic polymeric network capable of taking up large quantities of water. The networks are composed of homopolymers or copolymers, are insoluble due to the presence of covalent chemical or physical (ionic, hydrophobic interactions, entanglements) crosslinks. The crosslinks provide the network structure and physical integrity. Hydrogels exhibit a thermodynamic compatibility with water which allows them to swell in aqueous media. The chains of the network are connected in such a fashion that pores exist and that a substantial fraction of these pores are of dimensions between 1 nm and 1000 nm.

"Free form" of a drug refers to the drug in its unmodified, pharmacologically active form, such as after being released from a polymer conjugate.

The terms "drug", "biologically active molecule", "biologically active moiety", "biologically active agent", "active agent", and the like mean any substance which can affect any physical or biochemical properties of a biological organism, including but not limited to viruses, bacteria, fungi, plants, animals, and humans. In particular, as used herein, biologically active molecules include any substance intended for diagnosis, cure, mitigation, treatment, or prevention of disease in humans or other animals, or to otherwise enhance physical or mental well-being of humans or animals. Specifically, the terms "drug", "biologically active molecule", "biologically active moiety", "biologically active agent", "active agent", and the like refer to insulin.

A "therapeutically effective amount" of insulin as used herein means an amount sufficient to cure, alleviate or partially arrest the clinical manifestations of a given disease and its complications. An amount adequate to accomplish this is defined as "therapeutically effective amount". Effective amounts for each purpose will depend on the severity of the disease or injury as well as the weight and general state of the subject. It will be understood that determining an appropriate dosage may be achieved using routine experimentation, by constructing a matrix of values and testing different points in the matrix, which is all within the ordinary skills of a trained physician.

"Stable" and "stability" means that within the indicated storage time the hydrogel conjugates remain conjugated and do not hydrolyze to a substantial extent and exhibit an acceptable impurity profile

relating to insulin. To be considered stable, the composition contains less than 5% of the drug in its free form.

The term "pharmaceutically acceptable" means approved by a regulatory agency such as the EMEA (Europe) and/or the FDA (US) and/or any other national regulatory agency for use in animals, preferably in humans.

"Pharmaceutical composition" or "composition" means one or more active ingredients, and one or more inert ingredients, as well as any product which results, directly or indirectly, from combination, complexation or aggregation of any two or more of the ingredients, or from dissociation of one or more of the ingredients, or from other types of reactions or interactions of one or more of the ingredients. Accordingly, the pharmaceutical compositions of the present invention encompass any composition made by admixing a compound of the present invention and a pharmaceutically acceptable excipient (pharmaceutically acceptable carrier).

"Dry composition" means that the insulin hydrogel prodrug composition is provided in a dry form in a container. Suitable methods for drying are spray-drying and lyophilization (freeze-drying). Such dry composition of insulin hydrogel prodrug has a residual water content of a maximum of 10 %, preferably less than 5% and more preferably less than 2% (determined according to Karl Fischer). The preferred method of drying is lyophilization. "Lyophilized composition" means that the insulin hydrogel polymer prodrug composition was first frozen and subsequently subjected to water reduction by means of reduced pressure. This terminology does not exclude additional drying steps which occur in the manufacturing process prior to filling the composition into the final container.

"Lyophilization" (freeze-drying) is a dehydration process, characterized by freezing a composition and then reducing the surrounding pressure and, optionally, adding heat to allow the frozen water in the composition to sublime directly from the solid phase to gas. Typically, the sublimed water is collected by desublimation.

"Reconstitution" means the addition of a liquid to bring back the original form of a composition.

"Reconstitution solution" refers to the liquid used to reconstitute the dry composition of a insulin hydrogel prodrug prior to administration to a patient in need thereof.

"Container" means any container in which the insulin hydrogel prodrug composition is comprised and can be stored until reconstitution.

"Buffer" or "buffering agent" refers to chemical compounds that maintain the pH in a desired range. Physiologically tolerated buffers are, for example, sodium phosphate, succinate, histidine, bicarbonate, citrate and acetate, sulphate, nitrate, chloride, pyruvate. Antacids such as $\text{Mg}(\text{OH})_2$ or ZnCO_3 may be also used. Buffering capacity may be adjusted to match the conditions most sensitive to pH stability.

"Excipients" refers to compounds administered together with the therapeutic agent, for example, buffering agents, isotonicity modifiers, preservatives, stabilizers, anti-adsorption agents, oxidation protection agents, or other auxiliary agents. However, in some cases, one excipient may have dual or triple functions.

A "lyoprotectant" is a molecule which, when combined with a protein of interest, significantly prevents or reduces chemical and/or physical instability of the protein upon drying in general and especially during lyophilization and subsequent storage. Exemplary lyoprotectants include sugars, such as sucrose or trehalose; amino acids such as arginine, glycine, glutamate or histidine; methylamines such as betaine; lyotropic salts such as magnesium sulfate; polyols such as trihydric or higher sugar alcohols, e.g. glycerin, erythritol, glycerol, arabitol, xylitol, sorbitol, and mannitol; ethylene glycol; propylene glycol; polyethylene glycol; pluronics; hydroxyalkyl starches, e.g. hydroxyethyl starch (HES), and combinations thereof.

"Surfactant" refers to wetting agents that lower the surface tension of a liquid.

"Isotonicity modifiers" refer to compounds which minimize pain that can result from cell damage due to osmotic pressure differences at the injection depot.

The term "stabilizers" refers to compounds used to stabilize the polymer prodrug. Stabilisation is achieved by strengthening of the protein-stabilising forces, by destabilisation of the denatured state, or by direct binding of excipients to the protein.

"Anti-adsorption agents" refers to mainly ionic or non-ionic surfactants or other proteins or soluble polymers used to coat or adsorb competitively to the inner surface of the composition's container.

Chosen concentration and type of excipient depends on the effect to be avoided but typically a monolayer of surfactant is formed at the interface just above the CMC value.

"Oxidation protection agents" refers to antioxidants such as ascorbic acid, ectoine, glutathione, methionine, monothioglycerol, morin, polyethylenimine (PEI), propyl gallate, vitamin E, chelating agents such as citric acid, EDTA, hexaphosphate, thioglycolic acid.

"Antimicrobial" refers to a chemical substance that kills or inhibits the growth of microorganisms, such as bacteria, fungi, yeasts, protozoans and/or destroys viruses.

"Sealing a container" means that the container is closed in such way that it is airtight, allowing no gas exchange between the outside and the inside and keeping the content sterile.

The term "reagent" or "precursor" refers to an intermediate or starting material used in the assembly process leading to a prodrug of the present invention.

The term "chemical functional group" refers to carboxylic acid and activated derivatives, amino, maleimide, thiol and derivatives, sulfonic acid and derivatives, carbonate and derivatives, carbamate and derivatives, hydroxyl, aldehyde, ketone, hydrazine, isocyanate, isothiocyanate, phosphoric acid and derivatives, phosphonic acid and derivatives, haloacetyl, alkyl halides, acryloyl and other alpha-beta unsaturated michael acceptors, arylating agents like aryl fluorides, hydroxylamine, disulfides like pyridyl disulfide, vinyl sulfone, vinyl ketone, diazoalkanes, diazoacetyl compounds, oxirane, and aziridine.

If a chemical functional group is coupled to another chemical functional group, the resulting chemical structure is referred to as "linkage". For example, the reaction of an amine group with a carboxyl group results in an amide linkage.

"Reactive functional groups" are chemical functional groups of the backbone moiety, which are connected to the hyperbranched moiety.

"Functional group" is the collective term used for "reactive functional group", "degradable interconnected functional group", or "conjugate functional group".

A "degradable interconnected functional group" is a linkage comprising a biodegradable bond which on one side is connected to a spacer moiety connected to a backbone moiety and on the other side is connected to the crosslinking moiety. The terms "degradable interconnected functional group", "biodegradable interconnected functional group", "interconnected biodegradable functional group" and "interconnected functional group" are used synonymously.

The terms "blocking group" or "capping group" are used synonymously and refer to moieties which are irreversibly connected to reactive functional groups to render them incapable of reacting with for example chemical functional groups.

The terms "protecting group" or "protective group" refers to a moiety which is reversibly connected to reactive functional groups to render them incapable of reacting with for example other chemical functional groups.

The term "interconnectable functional group" refers to chemical functional groups, which participate in a radical polymerization reaction and are part of the crosslinker reagent or the backbone reagent.

The term "polymerizable functional group" refers to chemical functional groups, which participate in a ligation-type polymerization reaction and are part of the crosslinker reagent and the backbone reagent.

A backbone moiety may comprise a spacer moiety which at one end is connected to the backbone moiety and on the other side to the crosslinking moiety.

The term "derivatives" refers to chemical functional groups suitably substituted with protecting and/or activation groups or to activated forms of a corresponding chemical functional group which are known to the person skilled in the art. For example, activated forms of carboxyl groups include but are not limited to active esters, such as succinimidyl ester, benzotriazyl ester, nitrophenyl ester, pentafluorophenyl ester, azabenzotriazyl ester, acyl halogenides, mixed or symmetrical anhydrides, acyl imidazole.

The term "non-enzymatically cleavable linker" refers to linkers that are hydrolytically degradable under physiological conditions without enzymatic activity.

"Non-biologically active linker" means a linker which does not show the pharmacological effects of the drug (D-H) derived from the biologically active moiety.

The terms "spacer", "spacer group", "spacer molecule", and "spacer moiety" are used interchangeably and if used to describe a moiety present in the hydrogel carrier of the invention, refer to any moiety suitable for connecting two moieties, such as C₁₋₅₀ alkyl, C₂₋₅₀ alkenyl or C₂₋₅₀ alkynyl, which fragment is optionally interrupted by one or more groups selected from -NH-, -N(C₁₋₄ alkyl)-, -O-, -S-, -C(O)-, -C(O)NH-, -C(O)N(C₁₋₄ alkyl)-, -O-C(O)-, -S(O)-, -S(O)₂-, 4 to 7 membered heterocyclyl, phenyl or naphthyl.

The terms "terminal", "terminus" or "distal end" refer to the position of a functional group or linkage within a molecule or moiety, whereby such functional group may be a chemical functional group and the linkage may be a degradable or permanent linkage, characterized by being located adjacent to or within a linkage between two moieties or at the end of an oligomeric or polymeric chain.

The phrases "in bound form" or "moiety" refer to sub-structures which are part of a larger molecule. The phrase "in bound form" is used to simplify reference to moieties by naming or listing reagents, starting materials or hypothetical starting materials well known in the art, and whereby "in bound form" means that for example one or more hydrogen radicals (-H), or one or more activating or protecting groups present in the reagents or starting materials are not present in the moiety.

It is understood that all reagents and moieties comprising polymeric moieties refer to macromolecular entities known to exhibit variabilities with respect to molecular weight, chain lengths or degree of polymerization, or the number of functional groups. Structures shown for backbone reagents, backbone moieties, crosslinker reagents, and crosslinker moieties are thus only representative examples.

A reagent or moiety may be linear or branched. If the reagent or moiety has two terminal groups, it is referred to as a linear reagent or moiety. If the reagent or moiety has more than two terminal groups, it is considered to be a branched or multi-functional reagent or moiety.

The term "poly(ethylene glycol) based polymeric chain" or "PEG based chain" refers to an oligo- or polymeric molecular chain.

Preferably, such poly(ethylene glycol) based polymeric chain is connected to a branching core, it is a linear poly(ethylene glycol) chain, of which one terminus is connected to the branching core and the other to a hyperbranched dendritic moiety. It is understood that a PEG-based chain may be terminated or interrupted by alkyl or aryl groups optionally substituted with heteroatoms and chemical functional groups.

If the term "poly(ethylene glycol) based polymeric chain" is used in reference to a crosslinker reagent, it refers to a crosslinker moiety or chain comprising at least 20 weight % ethylene glycol moieties.

Preferably, in formula (I) R^2 is replaced by L^2-Z .

Preferably, in formula (I) R^1 is replaced by L^2-Z .

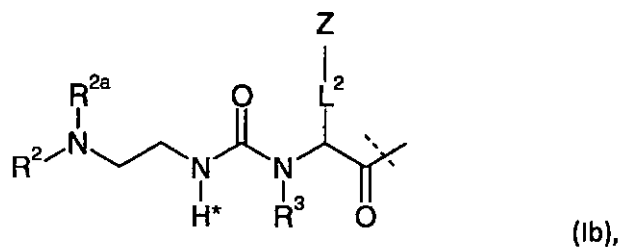
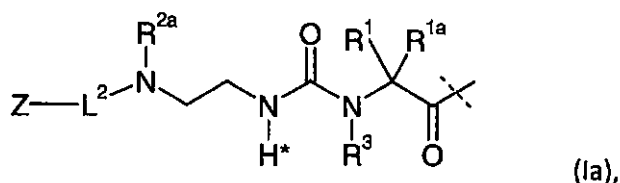
Preferably, in formula (I) X is $N(R^3)$.

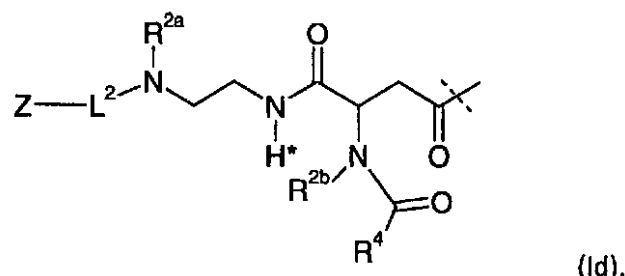
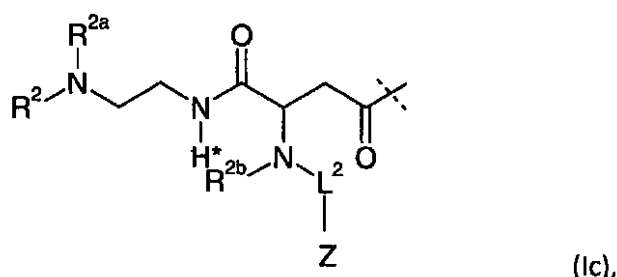
Preferably, in formula (I) X is $C(R^3R^{3a})$ and R^{3a} is $N(R^{2b})C(O)R^4$.

Preferably, in formula (I) X is $C(R^3R^{3a})$ and R^{3a} is replaced by L^2-Z .

Preferably, X is $C(R^3R^{3a})$, R^{3a} is $N(R^{2b})-L^2-Z$.

Preferred prodrugs of the present invention comprise an insulin linker conjugate D-L, wherein L^1 of formula (I) is represented by formulae (Ia), (Ib), (Ic) or (Id):





wherein R^1 , R^{1a} , R^2 , R^{2a} , R^{2b} , R^3 , R^4 , L^2 , Z have the meaning as indicated herein and wherein L^1 is optionally further substituted, provided that the hydrogen marked with the asterisk in formula (Ia) to (Id) is not replaced by a substituent.

Preferably, L^1 is not further substituted (apart from the mandatory substituent L^2-Z).

Preferably, the insulin moiety is attached to L^1 through the nitrogen N^{AA1} or through the nitrogen of a lysine side chain of the insulin moiety.

Preferably, the insulin moiety is recombinant human insulin.

As shown in, e.g., formulae (Ia) to (Id) one hydrogen is replaced by the group L^2-Z .

In general, L^2 can be attached to L^1 at any position apart from the replacement of the hydrogen marked with an asterisk in formula (I). Preferably, one of the hydrogens given by R^1 , R^{1a} , R^2 , R^{2a} , R^{2b} , R^3 , R^{3a} , R^4 directly or as hydrogen of the C_{1-4} alkyl or further groups is replaced by L^2-Z .

Furthermore, L^1 may be optionally further substituted. In general, any substituent may be used as far as the cleavage principle is not affected. However it is preferred that L^1 is not further substituted.

Preferably, one or more further optional substituents are independently selected from the group consisting of halogen; CN; $COOR^9$; OR^9 ; $C(O)R^9$; $C(O)N(R^9R^{9a})$; $S(O)_2N(R^9R^{9a})$; $S(O)N(R^9R^{9a})$; $S(O)_2R^9$; $S(O)R^9$; $N(R^9)S(O)_2N(R^9R^{9b})$; SR^9 ; $N(R^9R^{9a})$; NO_2 ; $OC(O)R^9$; $N(R^9)C(O)R^{9a}$; $N(R^9)S(O)_2R^{9a}$; $N(R^9)S(O)R^{9a}$;

$N(R^9)C(O)OR^{9a}$; $N(R^9)C(O)N(R^{9a}R^{9b})$; $OC(O)N(R^9R^{9a})$; T; C_{1-50} alkyl; C_{2-50} alkenyl; or C_{2-50} alkynyl, wherein T; C_{1-50} alkyl; C_{2-50} alkenyl; and C_{2-50} alkynyl are optionally substituted with one or more R^{10} , which are the same or different and wherein C_{1-50} alkyl; C_{2-50} alkenyl; and C_{2-50} alkynyl are optionally interrupted by one or more groups selected from the group consisting of T, $-C(O)O-$; $-O-$; $-C(O)-$; $-C(O)N(R^{11})-$; $-S(O)_2N(R^{11})-$; $-S(O)N(R^{11})-$; $-S(O)_2-$; $-S(O)-$; $-N(R^{11})S(O)_2N(R^{11a})-$; $-S-$; $-N(R^{11})-$; $-OC(O)R^{11}$; $-N(R^{11})C(O)-$; $-N(R^{11})S(O)_2-$; $-N(R^{11})S(O)-$; $-N(R^{11})C(O)O-$; $-N(R^{11})C(O)N(R^{11a})-$; and $-OC(O)N(R^{11}R^{11a})$;

R^9 , R^{9a} , R^{9b} are independently selected from the group consisting of H; T; and C_{1-50} alkyl; C_{2-50} alkenyl; or C_{2-50} alkynyl, wherein T; C_{1-50} alkyl; C_{2-50} alkenyl; and C_{2-50} alkynyl are optionally substituted with one or more R^{10} , which are the same or different and wherein C_{1-50} alkyl; C_{2-50} alkenyl; and C_{2-50} alkynyl are optionally interrupted by one or more groups selected from the group consisting of T, $-C(O)O-$; $-O-$; $-C(O)-$; $-C(O)N(R^{11})-$; $-S(O)_2N(R^{11})-$; $-S(O)N(R^{11})-$; $-S(O)_2-$; $-S(O)-$; $-N(R^{11})S(O)_2N(R^{11a})-$; $-S-$; $-N(R^{11})-$; $-OC(O)R^{11}$; $-N(R^{11})C(O)-$; $-N(R^{11})S(O)_2-$; $-N(R^{11})S(O)-$; $-N(R^{11})C(O)O-$; $-N(R^{11})C(O)N(R^{11a})-$; and $-OC(O)N(R^{11}R^{11a})$;

T is selected from the group consisting of phenyl; naphthyl; indenyl; indanyl; tetralinyl; C_{3-10} cycloalkyl; 4 to 7 membered heterocyclyl; or 9 to 11 membered heterobicyclyl, wherein T is optionally substituted with one or more R^{10} , which are the same or different;

R^{10} is halogen; CN; oxo (=O); $COOR^{12}$; OR^{12} ; $C(O)R^{12}$; $C(O)N(R^{12}R^{12a})$; $S(O)_2N(R^{12}R^{12a})$; $S(O)N(R^{12}R^{12a})$; $S(O)_2R^{12}$; $S(O)R^{12}$; $N(R^{12})S(O)_2N(R^{12a}R^{12b})$; SR^{12} ; $N(R^{12}R^{12a})$; NO_2 ; $OC(O)R^{12}$; $N(R^{12})C(O)R^{12a}$; $N(R^{12})S(O)_2R^{12a}$; $N(R^{12})S(O)R^{12a}$; $N(R^{12})C(O)OR^{12a}$; $N(R^{12})C(O)N(R^{12a}R^{12b})$; $OC(O)N(R^{12}R^{12a})$; or C_{1-6} alkyl, wherein C_{1-6} alkyl is optionally substituted with one or more halogen, which are the same or different;

R^{11} , R^{11a} , R^{12} , R^{12a} , R^{12b} are independently selected from the group consisting of H; or C_{1-6} alkyl, wherein C_{1-6} alkyl is optionally substituted with one or more halogen, which are the same or different.

The term "interrupted" means that between two carbons a group is inserted or at the end of the carbon chain between the carbon and hydrogen.

L^2 is a single chemical bond or a spacer. In case L^2 is a spacer, it is preferably defined as the one or more optional substituents defined above, provided that L^2 is substituted with Z.

Accordingly, when L^2 is other than a single chemical bond, L^2-Z is $COOR^9$; OR^9 ; $C(O)R^9$; $C(O)N(R^9R^{9a})$; $S(O)_2N(R^9R^{9a})$; $S(O)N(R^9R^{9a})$; $S(O)_2R^9$; $S(O)R^9$; $N(R^9)S(O)_2N(R^{9a}R^{9b})$; SR^9 ; $N(R^9R^{9a})$; $OC(O)R^9$; $N(R^9)C(O)R^{9a}$; $N(R^9)S(O)_2R^{9a}$; $N(R^9)S(O)R^{9a}$; $N(R^9)C(O)OR^{9a}$; $N(R^9)C(O)N(R^{9a}R^{9b})$; $OC(O)N(R^9R^{9a})$; T; C_{1-50} alkyl; C_{2-50} alkenyl; or C_{2-50} alkynyl, wherein T; C_{1-50} alkyl; C_{2-50} alkenyl; and C_{2-50} alkynyl are optionally substituted with one or more R^{10} , which are the same or different and wherein C_{1-50} alkyl; C_{2-50} alkenyl; and C_{2-50} alkynyl are optionally interrupted by one or more groups selected from the group consisting of -T-, -C(O)O-, -O-, -C(O)-, -C(O)N(R^{11})-, -S(O) $_2$ N(R^{11})-, -S(O)N(R^{11})-, -S(O) $_2$ -, -S(O)-, -N(R^{11})S(O) $_2$ N(R^{11a})-, -S-, -N(R^{11})-, -OC(O) R^{11} -, -N(R^{11})C(O)-, -N(R^{11})S(O) $_2$ -, -N(R^{11})S(O)-, -N(R^{11})C(O)O-, -N(R^{11})C(O)N(R^{11a})-, and -OC(O)N($R^{11}R^{11a}$);

R^9 , R^{9a} , R^{9b} are independently selected from the group consisting of H; Z; T; and C_{1-50} alkyl; C_{2-50} alkenyl; or C_{2-50} alkynyl, wherein T; C_{1-50} alkyl; C_{2-50} alkenyl; and C_{2-50} alkynyl are optionally substituted with one or more R^{10} , which are the same or different and wherein C_{1-50} alkyl; C_{2-50} alkenyl; and C_{2-50} alkynyl are optionally interrupted by one or more groups selected from the group consisting of T, -C(O)O-, -O-, -C(O)-, -C(O)N(R^{11})-, -S(O) $_2$ N(R^{11})-, -S(O)N(R^{11})-, -S(O) $_2$ -, -S(O)-, -N(R^{11})S(O) $_2$ N(R^{11a})-, -S-, -N(R^{11})-, -OC(O) R^{11} -, -N(R^{11})C(O)-, -N(R^{11})S(O) $_2$ -, -N(R^{11})S(O)-, -N(R^{11})C(O)O-, -N(R^{11})C(O)N(R^{11a})-, and -OC(O)N($R^{11}R^{11a}$);

T is selected from the group consisting of phenyl; naphthyl; indenyl; indanyl; tetralinyl; C_{3-10} cycloalkyl; 4 to 7 membered heterocyclyl; or 9 to 11 membered heterobicyclyl, wherein t is optionally substituted with one or more R^{10} , which are the same or different;

R^{10} is Z; halogen; CN; oxo (=O); $COOR^{12}$; OR^{12} ; $C(O)R^{12}$; $C(O)N(R^{12}R^{12a})$; $S(O)_2N(R^{12}R^{12a})$; $S(O)N(R^{12}R^{12a})$; $S(O)_2R^{12}$; $S(O)R^{12}$; $N(R^{12})S(O)_2N(R^{12a}R^{12b})$; SR^{12} ; $N(R^{12}R^{12a})$; NO_2 ; $OC(O)R^{12}$; $N(R^{12})C(O)R^{12a}$; $N(R^{12})S(O)_2R^{12a}$; $N(R^{12})S(O)R^{12a}$; $N(R^{12})C(O)OR^{12a}$; $N(R^{12})C(O)N(R^{12a}R^{12b})$; $OC(O)N(R^{12}R^{12a})$; or C_{1-6} alkyl, wherein C_{1-6} alkyl is optionally substituted with one or more halogen, which are the same or different;

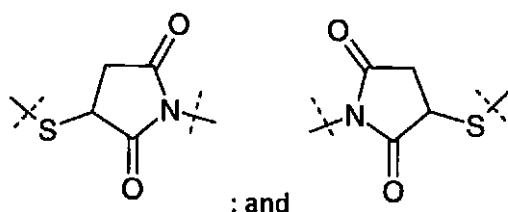
R^{11} , R^{11a} , R^{12} , R^{12a} , R^{12b} are independently selected from the group consisting of H; Z; or C_{1-6} alkyl, wherein C_{1-6} alkyl is optionally substituted with one or more halogen, which are the same or different;

provided that only one of R^9 , R^{9a} , R^{9b} , R^{10} , R^{11} , R^{11a} , R^{12} , R^{12a} , R^{12b} is Z.

More preferably, L^2 is a C_{1-20} alkyl chain, which is optionally interrupted by one or more groups independently selected from -O-; and $C(O)N(R^{3aa})$; optionally substituted with one or more groups independently selected from OH; and $C(O)N(R^{3aa}R^{3aaa})$; and wherein R^{3aa} , R^{3aaa} are independently selected from the group consisting of H; and C_{1-4} alkyl.

Preferably, L^2 has a molecular weight in the range of from 14 g/mol to 750 g/mol.

Preferably, L^2 is attached to Z via a terminal group selected from



In case L^2 has such terminal group it is furthermore preferred that L^2 has a molecular weight in the range of from 14 g/mol to 500 g/mol calculated without such terminal group.

Preferably, the covalent attachment formed between the linker and hydrogel Z is a permanent bond.

Preferably, the hydrogel Z is a biodegradable polyethylene glycol (PEG) based water-insoluble hydrogel. The term "PEG based" as understood herein means that the mass proportion of PEG chains in the hydrogel is at least 10% by weight, preferably at least 25%, based on the total weight of the hydrogel. The remainder can be made up of other spacers and/or oligomers or polymers, such as oligo- or polylysines.

Moreover the term "water-insoluble" refers to a swellable three-dimensionally crosslinked molecular network forming the hydrogel. The hydrogel if suspended in a large surplus of water or aqueous buffer of physiological osmolality may take up a substantial amount of water, e.g. up to 10-fold on a weight per weight basis, and is therefore swellable but after removing excess water still retains the physical stability of a gel and a shape. Such shape may be of any geometry and it is understood that such an individual hydrogel object is to be considered as a single molecule consisting of components wherein each component is connected to each other component through chemical bonds.

According to this invention, the hydrogel may be composed of backbone moieties interconnected by hydrolytically degradable bonds.

Preferably, L^2 is connected to a backbone moiety

Preferably, the backbone moiety has a molecular weight in the range of from 1 kDa to 20 kDa, more preferably from 1 kDa to 15 kDa and even more preferably from 1 kDa to 10 kDa. The backbone moieties are preferably also PEG-based comprising one or more PEG chains.

In a hydrogel carrying drug-linker conjugates according to the invention, a backbone moiety is characterized by a number of functional groups, comprising interconnected biodegradable functional groups and hydrogel-connected drug-linker conjugates, and optionally capping groups. This means that a backbone moiety is characterized by a number of hydrogel-connected drug-linker conjugates; functional groups, comprising biodegradable interconnected functional groups; and optionally capping groups. Preferably, the sum of interconnected biodegradable functional groups and drug-linker conjugates and capping groups is 16-128, preferred 20-100, more preferred 24-80 and most preferred 30-60.

Preferably, the sum of interconnected functional groups and hydrogel-connected drug-linker conjugates and capping groups of a backbone moiety is equally divided by the number of PEG-based polymeric chains extending from the branching core. For instance, if there are 32 interconnected functional groups and hydrogel-connected drug-linker conjugates and capping groups, eight groups may be provided by each of the four PEG-based polymeric chains extending from the core, preferably by means of dendritic moieties attached to the terminus of each PEG-based polymeric chain. Alternatively, four groups may be provided by each of eight PEG-based polymeric chains extending from the core or two groups by each of sixteen PEG-based polymeric chains. If the number of PEG-based polymeric chains extending from the branching core does not allow for an equal distribution, it is preferred that the deviation from the mean number of the sum of interconnected functional groups and hydrogel-connected drug-linker conjugates and capping groups per PEG-based polymeric chain is kept to a minimum.

In such carrier-linked prodrugs according to the invention, it is desirable that almost all drug release (> 90 %) has occurred before a significant amount of release of the backbone moieties (< 10 %) has taken place. This can be achieved by adjusting the carrier-linked prodrug's half-life versus the degradation kinetics of the hydrogel according to the invention.

Preferentially, a backbone moiety is characterized by having a branching core, from which at least three PEG-based polymeric chains extend. Accordingly, in a preferred aspect of the present invention

the backbone reagent comprises a branching core, from which at least three PEG-based polymeric chains extend. Such branching cores may be comprised of poly- or oligoalcohols in bound form, preferably pentaerythritol, tripentaerythritol, hexaglycerine, sucrose, sorbitol, fructose, mannitol, glucose, cellulose, amyloses, starches, hydroxyalkyl starches, polyvinylalcohols, dextrans, hyaluronans, or branching cores may be comprised of poly- or oligoamines such as ornithine, diaminobutyric acid, trilycine, tetralysine, pentalysine, hexalysine, heptalysine, octalysine, nonalysine, decalysine, undecalysine, dodecalysine, tridecalysine, tetradecalysine, pentadecalysine or oligolysines, polyethyleneimines, polyvinylamines in bound form.

Preferably, the branching core extends three to sixteen PEG-based polymeric chains, more preferably four to eight. Preferred branching cores may be comprised of pentaerythritol, ornithine, diaminobutyric acid, trilycine, tetralysine, pentalysine, hexalysine, heptalysine or oligolysine, low-molecular weight PEI, hexaglycerine, tripentaerythritol in bound form. Preferably, the branching core extends three to sixteen PEG-based polymeric chains, more preferably four to eight. Preferably, a PEG-based polymeric chain is a linear poly(ethylene glycol) chain, of which one end is connected to the branching core and the other to a hyperbranched dendritic moiety. It is understood that a polymeric PEG-based chain may be terminated or interrupted by alkyl or aryl groups optionally substituted with heteroatoms and chemical functional groups.

Preferably, a PEG-based polymeric chain is a suitably substituted polyethylene glycol derivative (PEG based).

Preferred structures for corresponding PEG-based polymeric chains extending from a branching core contained in a backbone moiety are multi-arm PEG derivatives as, for instance, detailed in the products list of JenKem Technology, USA (accessed by download from www.jenkemusa.com on July 28, 2009), 4ARM-PEG Derivatives (pentaerythritol core), 8ARM-PEG Derivatives (hexaglycerin core) and 8ARM-PEG Derivatives (tripentaerythritol core). Most preferred are 4arm PEG Amine (pentaerythritol core) and 4arm PEG Carboxyl (pentaerythritol core), 8arm PEG Amine (hexaglycerin core), 8arm PEG Carboxyl (hexaglycerin core), 8arm PEG Amine (tripentaerythritol core) and 8arm PEG Carboxyl (tripentaerythritol core). Preferred molecular weights for such multi-arm PEG-derivatives in a backbone moiety are 1 kDa to 20 kDa, more preferably 1 kDa to 15 kDa and even more preferably 1 kDa to 10 kDa.

It is understood that the terminal amine groups of the above mentioned multi-arm molecules are present in bound form in the backbone moiety to provide further interconnected functional groups and reactive functional groups of a backbone moiety.

It is preferred that the sum of interconnected functional groups and reactive functional groups of a backbone moiety is equally divided by the number of PEG-based polymeric chains extending from the branching core. If the number of PEG-based polymeric chains extending from the branching core does not allow for an equal distribution, it is preferred that the deviation from the mean number of the sum of interconnected and reactive functional groups per PEG-based polymeric chain is kept to a minimum.

More preferably, the sum of interconnected and reactive functional groups of a backbone moiety is equally divided by the number of PEG-based polymeric chains extending from the branching core. For instance, if there are 32 interconnected functional groups and reactive functional groups, eight groups may be provided by each of the four PEG-based polymeric chains extending from the core, preferably by means of dendritic moieties attached to the terminus of each PEG-based polymeric chain. Alternatively, four groups may be provided by each of eight PEG-based polymeric chains extending from the core or two groups by each of sixteen PEG-based polymeric chains.

Such additional functional groups may be provided by dendritic moieties. Preferably, each dendritic moiety has a molecular weight in the range of from 0.4 kDa to 4 kDa, more preferably 0.4 kDa to 2 kDa. Preferably, each dendritic moiety has at least 3 branchings and at least 4 reactive functional groups, and at most 63 branchings and 64 reactive functional groups, preferred at least 7 branchings and at least 8 reactive functional groups and at most 31 branchings and 32 reactive functional groups.

Examples for such dendritic moieties are comprised of trilylsine, tetralysine, pentalysine, hexalysine, heptalysine, octalysine, nonalysine, decalysine, undecalysine, dodecalysine, tridecalysine, tetradecalysine, pentadecalysine, hexadecalysine, heptadecalysine, octadecalysine, nonadecalysine in bound form. Examples for such preferred dendritic moieties are comprised of trilylsine, tetralysine, pentalysine, hexalysine, heptalysine in bound form, most preferred trilylsine, pentalysine or heptalysine, ornithine, diaminobutyric acid in bound form.

Most preferably, the hydrogel carrier of the present invention is characterized in that the backbone moiety has a quarternary carbon of formula $C(A-Hyp)_4$, wherein each A is independently a poly(ethylene glycol) based polymeric chain terminally attached to the quarternary carbon by a permanent covalent bond and the distal end of the PEG-based polymeric chain is

covalently bound to a dendritic moiety Hyp, each dendritic moiety Hyp having at least four functional groups representing the interconnected functional groups and reactive functional groups.

Preferably, each A is independently selected from the formula $-(CH_2)_{n1}(OCH_2CH_2)_nX-$, wherein $n1$ is 1 or 2; n is an integer in the range of from 5 to 50; and X is a chemical functional group covalently linking A and Hyp.

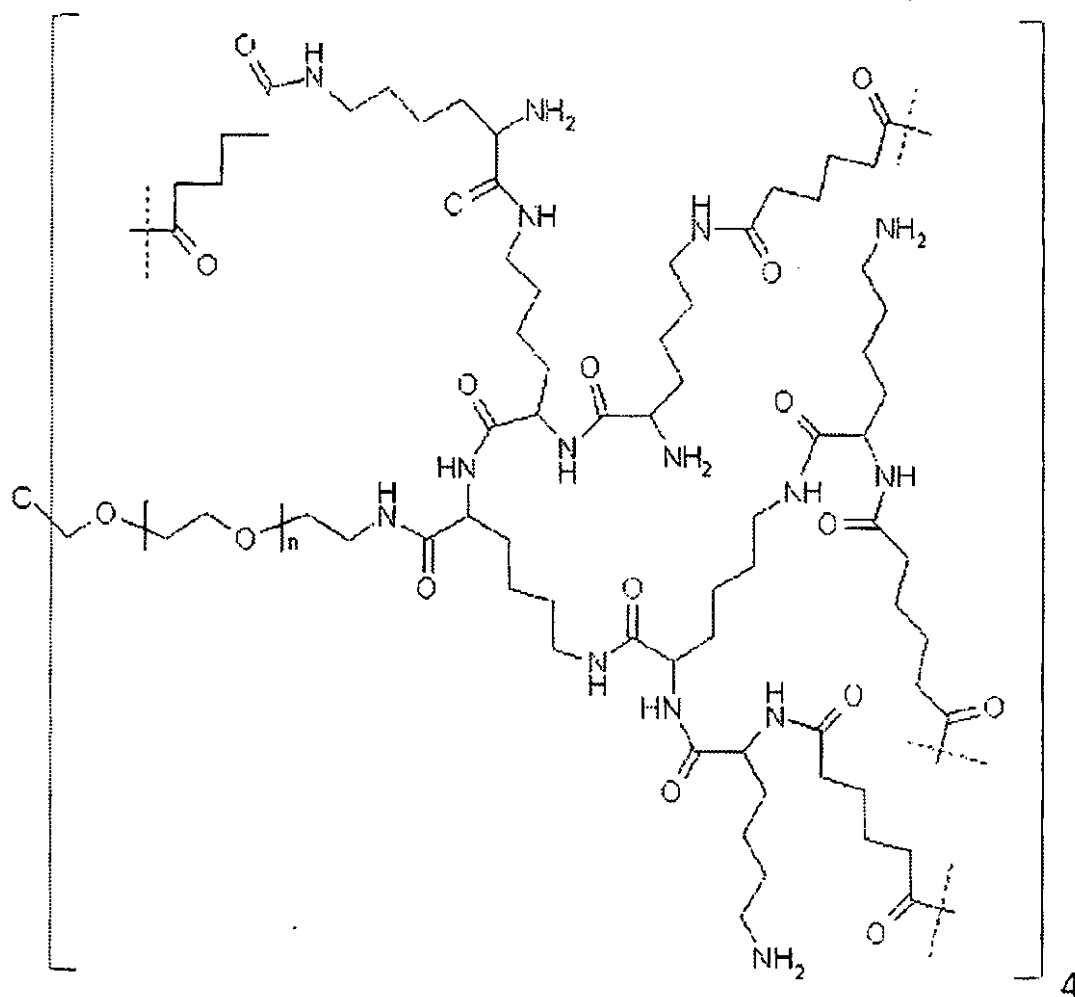
Preferably, A and Hyp are covalently linked by an amide linkage.

Preferably, the dendritic moiety Hyp is a hyperbranched polypeptide. Preferably, the hyperbranched polypeptide comprises lysine in bound form. Preferably, each dendritic moiety Hyp has a molecular weight in the range of from 0.4 kDa to 4 kDa. It is understood that a backbone moiety $C(A-Hyp)_4$ can consist of the same or different dendritic moieties Hyp and that each Hyp can be chosen independently. Each moiety Hyp consists of between 5 and 32 lysines, preferably of at least 7 lysines, i.e. each moiety Hyp is comprised of between 5 and 32 lysines in bound form, preferably of at least 7 lysines in bound form. Most preferably Hyp is comprised of heptalysinyl.

The reaction of polymerizable functional groups a backbone reagent, more specifically of Hyp with the polymerizable functional groups of polyethyleneglycol based crosslinker reagents results in a permanent amide bond.

Preferably, $C(A-Hyp)_4$ has a molecular weight in the range of from 1 kDa to 20 kDa, more preferably 1 kDa to 15 kDa and even more preferably 1 kDa to 10 kDa.

One preferred backbone moiety is shown below, dashed lines indicate interconnecting biodegradable linkages to crosslinker moieties and n is an integer of from 5 to 50:



Biodegradability of the hydrogels according to the present invention is achieved by introduction of hydrolytically degradable bonds.

The terms "hydrolytically degradable", "biodegradable" or "hydrolytically cleavable", "auto-cleavable", or "self-cleavage", "self-cleavable", "transient" or "temporary" refers within the context of the present invention to bonds and linkages which are non-enzymatically hydrolytically degradable or cleavable under physiological conditions (aqueous buffer at pH 7.4, 37°C) with half-lives ranging from one hour to three months, including, but are not limited to, aconityls, acetals, amides, carboxylic anhydrides, esters, imines, hydrazones, maleamic acid amides, ortho esters, phosphamides, phosphoesters, phosphosilyl esters, silyl esters, sulfonic esters, aromatic carbamates, combinations thereof, and the like.

If present in a hydrogel according to the invention as degradable interconnected functional group, preferred biodegradable linkages are carboxylic esters, carbonates, phosphoesters and sulfonic acid esters and most preferred are carboxylic esters or carbonates.

Permanent linkages are non-enzymatically hydrolytically degradable under physiological conditions (aqueous buffer at pH 7.4, 37°C) with half-lives of six months or longer, such as, for example, amides.

To introduce the hydrolytically cleavable bonds into the hydrogel carrier of the invention, the backbone moieties can be directly linked to each other by means of biodegradable bonds.

In one embodiment, the backbone moieties of the biodegradable hydrogel carrier may be linked together directly, i.e. without crosslinker moieties. The hyperbranched dendritic moieties of two backbone moieties of such biodegradable hydrogel may either be directly linked through an interconnected functional group that connects the two hyperbranched dendritic moieties. Alternatively, two hyperbranched dendritic moieties of two different backbone moieties may be interconnected through two spacer moieties connected to a backbone moiety and on the other side connected to a crosslinking moiety separated by an interconnected functional groups.

Alternatively, backbone moieties may be linked together through crosslinker moieties, each crosslinker moiety is terminated by at least two of the hydrolytically degradable bonds. In addition to the terminating degradable bonds, the crosslinker moieties may contain further biodegradable bonds. Thus, each end of the crosslinker moiety linked to a backbone moiety comprises a hydrolytically degradable bond, and additional biodegradable bonds may optionally be present in the crosslinker moiety.

Preferably, the biodegradable hydrogel carrier is composed of backbone moieties interconnected by hydrolytically degradable bonds and the backbone moieties are linked together through crosslinker moieties.

The biodegradable hydrogel carrier may contain one or more different types of crosslinker moieties, preferably one. The crosslinker moiety may be a linear or branched molecule and preferably is a linear molecule. In a preferred embodiment of the invention, the crosslinker moiety is connected to backbone moieties by at least two biodegradable bonds.

Preferably, crosslinker moieties have a molecular weight in the range of from 60 Da to 5 kDa, more preferably, from 0.5 kDa to 4 kDa, even more preferably from 1 kDa to 4 kDa, even more preferably from 1 kDa to 3 kDa. In one embodiment, a crosslinker moiety consists of a polymer.

In addition to oligomeric or polymeric crosslinking moieties, low-molecular weight crosslinking moieties may be used, especially when hydrophilic high-molecular weight backbone moieties are used for the formation of a biodegradable hydrogel according to the invention.

Preferably, the poly(ethylene glycol) based crosslinker moieties are hydrocarbon chains comprising ethylene glycol units, optionally comprising further chemical functional groups, wherein the poly(ethylene glycol) based crosslinker moieties comprise at least each m ethylene glycol units, wherein m is an integer in the range of from 3 to 100, preferably from 10 to 70. Preferably, the poly(ethylene glycol) based crosslinker moieties have a molecular weight in the range of from 0.5 kDa to 5 kDa.

If used in reference to a crosslinker moiety or a PEG-based polymeric chain connected to a branching core, the term "PEG-based" refers to a crosslinker moiety or PEG-based polymeric chain comprising at least 20 weight % ethylene glycol moieties.

In one embodiment, monomers constituting the polymeric crosslinker moieties are connected by biodegradable bonds. Such polymeric crosslinker moieties may contain up to 100 biodegradable bonds or more, depending on the molecular weight of the crosslinker moiety and the molecular weight of the monomer units. Examples for such crosslinker moieties are poly(lactic acid) or poly(glycolic acid) based polymers. It is understood that such poly(lactic acid) or poly(glycolic acid) chain may be terminated or interrupted by alkyl or aryl groups and that they may optionally be substituted with heteroatoms and chemical functional groups.

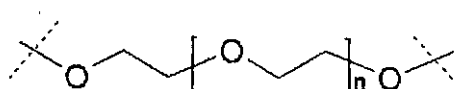
Preferably, the crosslinker moieties are PEG based, preferably represented by only one PEG based molecular chain. Preferably, the poly(ethylene glycol) based crosslinker moieties are hydrocarbon chains comprising ethylene glycol units, optionally comprising further chemical functional groups, wherein the poly(ethylene glycol) based crosslinker moieties comprise at least each m ethylene glycol units, wherein m is an integer in the range of from 3 to 100, preferably from 10 to 70. Preferably, the poly(ethylene glycol) based crosslinker moieties have a molecular weight in the range of from 0.5 kDa to 5 kDa.

In a preferred embodiment of the present invention the crosslinker moiety consists of PEG, which is symmetrically connected through ester bonds to two alpha, omega-aliphatic dicarboxylic spacers provided by backbone moieties connected to the hyperbranched dendritic moiety through permanent amide bonds.

The dicarboxylic acids of the spacer moieties connected to a backbone moiety and on the other side is connected to a crosslinking moiety consist of 3 to 12 carbon atoms, most preferably between 5 and 8 carbon atoms and may be substituted at one or more carbon atom. Preferred substituents are alkyl groups, hydroxyl groups or amido groups or substituted amino groups. One or more of the aliphatic dicarboxylic acid's methylene groups may optionally be substituted by O or NH or alkyl-substituted N. Preferred alkyl is linear or branched alkyl with 1 to 6 carbon atoms.

Preferably, there is a permanent amide bond between the hyperbranched dendritic moiety and the spacer moiety connected to a backbone moiety and on the other side is connected to a crosslinking moiety.

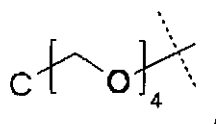
One preferred crosslinker moiety is shown below; dashed lines indicate interconnecting biodegradable linkages to backbone moieties:



wherein n is an integer of from 5 to 50.

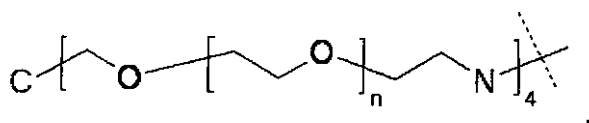
Preferably, the hydrogel carrier is composed of backbone moieties interconnected by hydrolytically degradable bonds.

More preferably, the backbone moieties comprise a branching core of the following formula:



wherein the dashed line indicates attachment to the remainder of the backbone moiety.

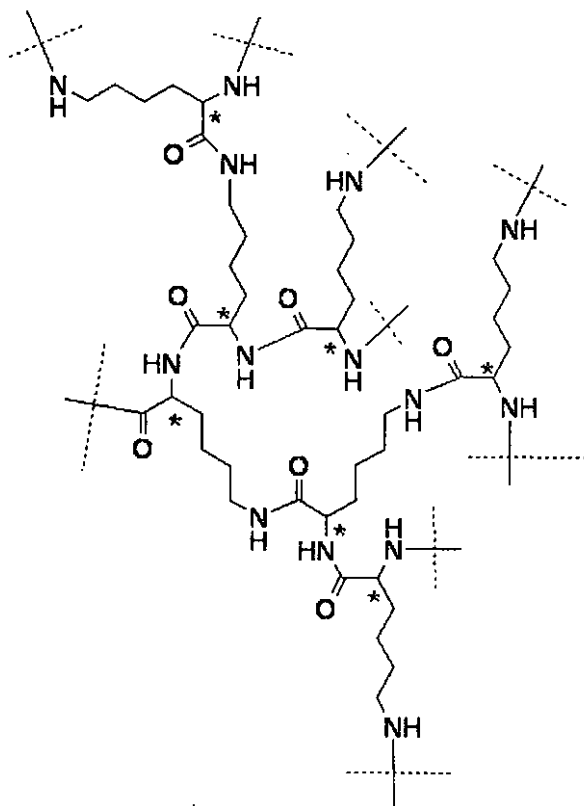
More preferably, the backbone moieties comprise a structure of the following formula:



wherein n is an integer of from 5 to 50 and the dashed line indicates attachment to the remainder of the backbone moiety.

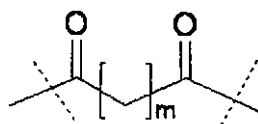
Preferably, backbone moiety comprises a hyperbranched moiety Hyp.

More preferably, the backbone moiety comprises a hyperbranched moiety Hyp of the following formula:



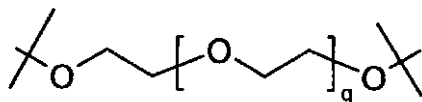
wherein the dashed lines indicate attachment to the rest of the molecule and carbon atoms marked with asterisks indicate S-configuration.

Preferably, the backbone moieties are attached to at least one spacer of the following formula:



wherein one of the dashed lines indicates attachment to the hyperbranched moiety Hyp and the second dashed line indicates attachment to the rest of the molecule; and wherein m is an integer of from 2 to 4.

Preferably, the backbone moieties are linked together through crosslinker moieties having the following structure



wherein

q is an integer from 3 to 100, preferably from 5 to 50.

In hydrogel prodrugs of the invention, the hydrolysis rate of the biodegradable bonds between backbone moieties and crosslinker moieties is influenced or determined by the number and type of connected atoms adjacent to the PEG-ester carboxy group. For instance, by selecting from succinic, adipic or glutaric acid for PEG ester formation it is possible to vary the degradation half-lives of the biodegradable hydrogel carrier according to the invention.

Preferably, L^2 is attached to Z through a thiosuccinimide group which in turn is attached to the hydrogel's backbone moiety through a spacer, such as an oligoethylene glycol chain. Preferably, the linkage of this spacer chain to the backbone moiety is a permanent bond, preferably an amide bond.

Biodegradability of the hydrogels according to the present invention is achieved by introduction of hydrolytically degradable bonds.

For interconnected functional groups, the term "hydrolytically degradable" refers within the context of the present invention to linkages which are non-enzymatically hydrolytically degradable under physiological conditions (aqueous buffer at pH 7.4, 37°C) with half-lives ranging from one hour to three months, include, but are not limited to, aconityls, acetals, carboxylic anhydrides, esters, imines, hydrazones, maleamic acid amides, ortho esters, phosphamides, phosphoesters, phosphosilyl esters, silyl esters, sulfonic esters, aromatic carbamates, combinations thereof, and the like. Preferred biodegradable linkages are carboxylic esters, carbonates, phosphoesters and sulfonic acid esters and most preferred are carboxylic esters or carbonates. It is understood that for in vitro studies accelerated conditions like, for example, pH 9, 37°C, aqueous buffer, may be used for practical purposes.

Permanent linkages are non-enzymatically hydrolytically degradable under physiological conditions (aqueous buffer at pH 7.4, 37°C) with half-lives of six months or longer, such as, for example, amides.

The degradation of the biodegradable hydrogel carrier according to the invention is a multi-step reaction where a multitude of degradable bonds is cleaved resulting in degradation products which may be water-soluble or water-insoluble. However, water-insoluble degradation products may further comprise degradable bonds so that they can be cleaved in that water-soluble degradation products are obtained. These water-soluble degradation products may comprise one or more backbone moieties. It is understood that released backbone moieties may, for instance, be

permanently conjugated to spacer or blocking or linker groups or affinity groups and/or prodrug linker degradation products and that also water-soluble degradation products may comprise degradable bonds.

The structures of the branching core, PEG-based polymeric chains, hyperbranched dendritic moieties and moieties attached to the hyperbranched dendritic moieties can be inferred from the corresponding descriptions provided in the sections covering the hydrogel carriers of the present invention. It is understood that the structure of a degradant depends on the type of hydrogel according to the invention undergoing degradation.

The total amount of backbone moieties can be measured in solution after complete degradation of the hydrogel according to the invention, and during degradation, fractions of soluble backbone degradation products can be separated from the insoluble hydrogel according to the invention and can be quantified without interference from other soluble degradation products released from the hydrogel according to the invention. A hydrogel object according to the invention may be separated from excess water or buffer of physiological osmolality by sedimentation or centrifugation. Centrifugation may be performed in such way that the supernatant provides for at least 10% of the volume of the swollen hydrogel according to the invention. Soluble hydrogel degradation products remain in the aqueous supernatant after such sedimentation or centrifugation step, and water-soluble degradation products comprising one or more backbone moieties are detectable by subjecting aliquots of such supernatant to suitable separation and/or analytical methods.

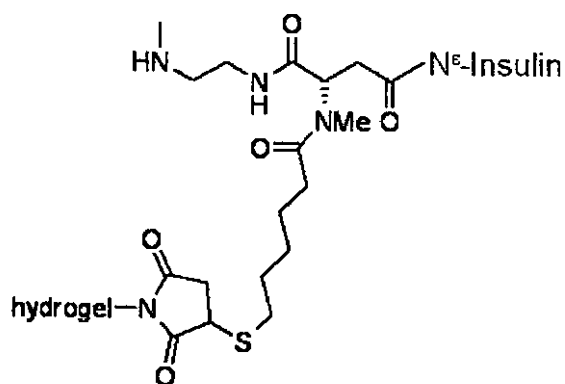
Preferably, water-soluble degradation products may be separated from water-insoluble degradation products by filtration through 0.45 μm filters, after which the water-soluble degradation products can be found in the flow-through. Water-soluble degradation products may also be separated from water-insoluble degradation products by a combination of a centrifugation and a filtration step.

For instance the backbone moieties may carry groups that exhibit UV absorption at wavelengths where other degradation products do not exhibit UV absorption. Such selectively UV-absorbing groups may be structural components of the backbone moiety such as amide bonds or may be introduced into the backbone by attachment to its reactive functional groups by means of aromatic ring systems such as indoyl groups.

In such hydrogel-linked insulin prodrugs according to the invention, it is desirable that almost all insulin release (> 90 %) has occurred before a significant amount of release of the backbone

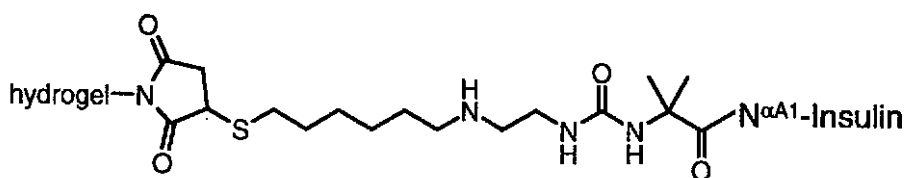
degradation products (< 10 %) has taken place. This can be achieved by adjusting the hydrogel-linked insulin prodrug's half-life versus the hydrogel degradation kinetics.

Preferably, insulin prodrugs have the structure of formula (IIa) or (IIb)



(IIa),

wherein N^ε-Insulin refers to insulin connected via one lysine side chain; or

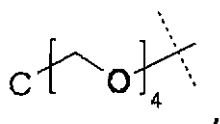


(IIb).

Preferably, the hydrogel in (IIa) or (IIb) is a biodegradable polyethylene glycol (PEG) based water-insoluble hydrogel.

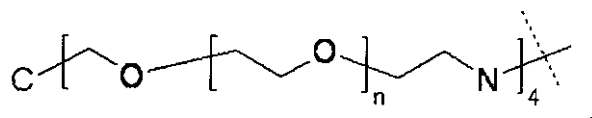
Preferably, the hydrogel in (IIa) or (IIb) is composed of backbone moieties interconnected by hydrolytically degradable bonds.

More preferably, the backbone moieties comprise a branching core of the following formula:



wherein the dashed line indicates attachment to the remainder of the backbone moiety.

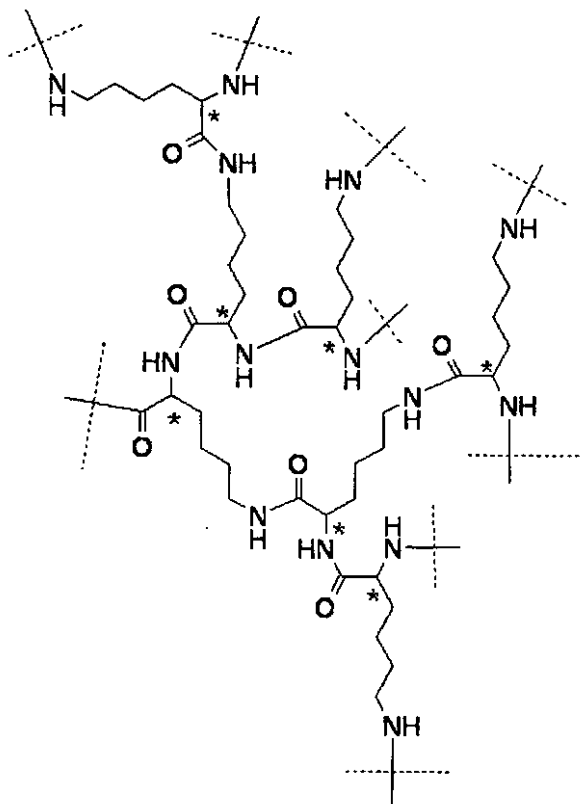
More preferably, the backbone moieties comprise a structure of the following formula:



wherein n is an integer of from 5 to 50 and the dashed line indicates attachment to the rest of the molecule.

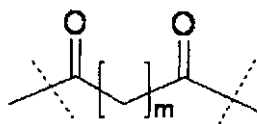
Preferably, backbone moiety comprises a hyperbranched moiety Hyp.

More preferably, the backbone moiety comprises a hyperbranched moiety Hyp of the following formula:



wherein the dashed lines indicate attachment to the rest of the molecule and carbon atoms marked with asterisks indicate S-configuration.

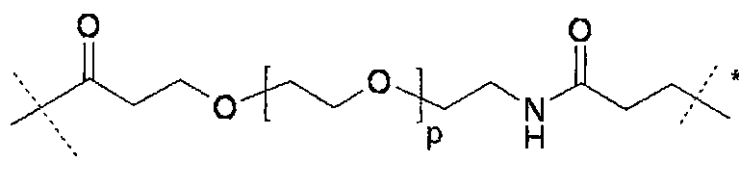
Preferably, the backbone moieties are attached to at least one spacer of the following formula:



wherein one of the dashed lines indicates attachment to the hyperbranched moiety Hyp and the second dashed line indicates attachment to the rest of the molecule; and

wherein m is an integer of from 2 to 4.

Preferably, the backbone moieties are attached to at least one spacer of the following formula:

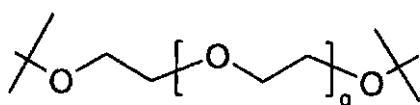


wherein the dashed line marked with the asterisk indicates the bond between the hydrogel and the N of the thiosuccinimide group,

wherein the other dashed line indicates attachment to Hyp, and

wherein p is an integer of from 0 to 10.

Preferably, the backbone moieties are linked together through crosslinker moieties having the following structure



wherein

q is an integer from 3 to 100;

The hydrolysis rate of the biodegradable bonds between backbone and crosslinker moieties is determined by the number and type of connected atoms adjacent to the PEG-ester carboxy group. For instance by selecting from succinic, adipic or glutaric acid for PEG ester formation it is possible to vary the degradation half-lives of the crosslinker.

The hydrogel-linked insulin prodrug of the present invention can be prepared starting from the hydrogel of the present invention by convenient methods known in the art. It is clear to a practitioner in the art that several routes exist. For example the prodrug linker mentioned above to which the biologically active moiety is covalently attached can be reacted with the reactive functional groups of the hydrogel of the present invention with or with already bearing the active moiety in part or as whole.

In a preferable method of preparation, the hydrogel is generated through chemical ligation reactions. The hydrogel may be formed from two macromolecular educts with complementary functionalities which undergo a reaction such as a condensation or addition. One of these starting materials is a crosslinker reagent with at least two identical functional groups and the other starting material is a homomultifunctional backbone reagent. Suitable functional groups present on the crosslinker reagent include terminal amino, carboxylic acid and derivatives, maleimide and other alpha,beta unsaturated Michael acceptors like vinylsulfone, thiol, hydroxyl groups. Suitable functional groups

present in the backbone reagent include but are not limited to amino, carboxylic acid and derivatives, maleimide and other alpha,beta unsaturated Michael acceptors like vinylsulfone, thiol, hydroxyl groups.

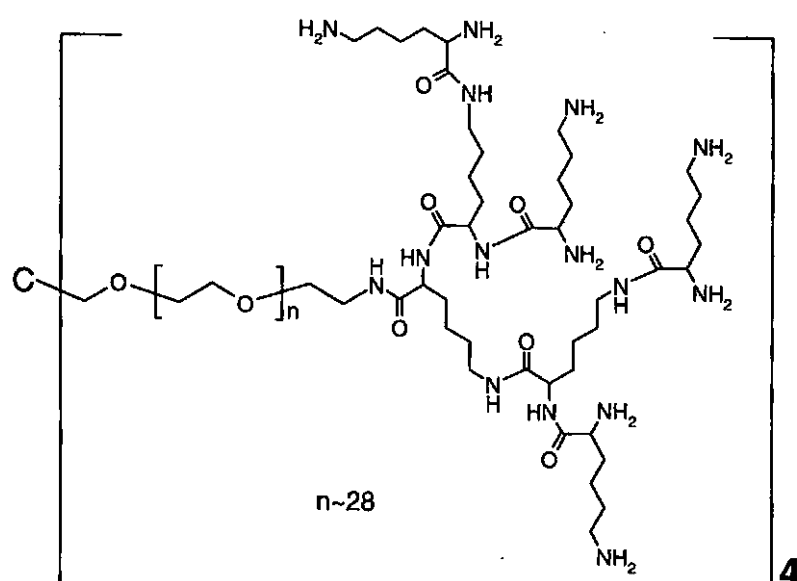
If the crosslinker reagent reactive functional groups are used substoichiometrically with respect to backbone reactive functional groups, the resulting hydrogel will be a reactive hydrogel with free reactive functional groups attached to the backbone structure.

Optionally, the prodrug linker may be first conjugated to insulin and the resulting insulin-prodrug linker conjugate may then react with the hydrogel's reactive functional groups. Alternatively, after activation of one of the functional groups of the prodrug linker, the linker-hydrogel conjugate may be contacted with insulin in the second reaction step and excess insulin may be removed by filtration after conjugation of the insulin to the hydrogel-bound prodrug linker.

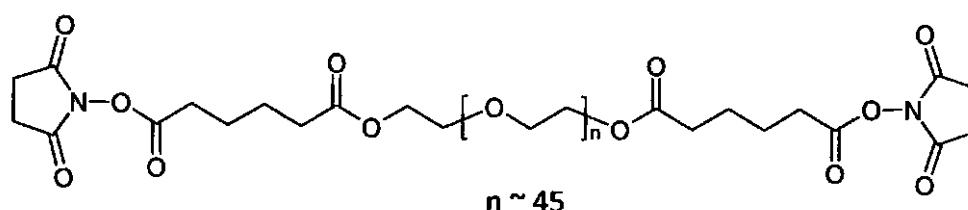
A preferred process for the preparation of a prodrug according to the present invention is as follows:

A preferred starting material for the backbone reagent synthesis is a 4-arm PEG tetra amine or 8-arm PEG octa amine, with the PEG reagent having a molecular weight ranging from 2000 to 10000 Dalton, most preferably from 2000 to 5000 Da. To such multi-arm PEG-derivatives, lysine residues are coupled sequentially to form the hyperbranched backbone reagent. It is understood that the lysines can be partially or fully protected by protective groups during the coupling steps and that also the final backbone reagent may contain protective groups. A preferred building block is bis-boc lysine. Alternatively, instead of sequential additions of lysine residues, a dendritic poly-lysine moiety may be assembled first and subsequently coupled to the 4-arm PEG tetra amine or 8-arm PEG octa amine. It is desirable to obtain backbone reagent carrying 32 amino groups, consequently seven lysines would be attached to each arm of a 4-arm PEG, or five lysines would be attached to each arm of a 8-arm PEG. In another embodiment, the multi-arm PEG derivative is a tetra- or octa carboxy PEG. In this case, the dendritic moieties may be generated from glutaric or aspartic acid, and the resulting backbone reagent would carry 32 carboxy groups. It is understood that all or a fraction of the backbone reagent's functional groups may be present in a free form, as salts or conjugated to protecting groups. It is understood that due to practical reasons the backbone reagent's number of lysines per PEG-arm will be between six and seven, more preferably approximately seven.

A preferred backbone reagent is shown below:



Synthesis of the crosslinker reagent starts from a linear PEG chain with a molecular weight ranging from 0.2 to 5 kDa, more preferably from 0.6 to 2 kDa, which is esterified with a half ester of a dicarboxylic acid, most adipic acid or glutaric acid. Preferred protecting group for half ester formation is the benzylic group. The resulting bis dicarboxylic acid PEG half esters are converted into more reactive carboxy compounds such as acyl chlorides or active esters, eg pentafluorophenyl or N-hydroxysuccinimide esters, most preferred N-hydroxysuccinimide esters, of which preferred selected structure is shown below.



Alternatively, the bis dicarboxylic acid PEG half esters may be activated in the presence of a coupling agent such as DCC or HOBt or PyBOP.

In an alternative embodiment the backbone reagent carries carboxy groups and the corresponding crosslinker reagent would be selected from ester-containing amino-terminated PEG-chains.

Backbone reagent and crosslinker reagent may be polymerized to form the hydrogel according to the invention using inverse emulsion polymerization. After selecting the desired stoichiometry between backbone and crosslinker functional groups, backbone and crosslinker are dissolved in DMSO and a

suitable emulgator with an appropriately selected HLB value, preferably Arlacel P135, is employed to form an inverse emulsion using a mechanical stirrer and controlling the stirring speed. Polymerization is initiated by the addition of a suitable base, preferably by N,N,N',N'-tetramethylethylene diamine. After stirring for an appropriate amount of time, the reaction is quenched by the addition of an acid, such as acetic acid and water. The beads are harvested, washed, and fractionated according to particle size by mechanical sieving. Optionally, protecting groups may be removed at this stage.

Further, such hydrogel according to the invention may be functionalized with a spacer carrying a different reactive functional group than provided by the hydrogel. For instance maleimide reactive functional groups may be introduced into the hydrogel by coupling a suitable heterobifunctional spacer such as Mal-PEG6-NHS to the hydrogel. Such functionalized hydrogel can be further conjugated to insulin-linker reagents, carrying a reactive thiol group on the linker moiety to form hydrogel-linked insulin prodrugs according to the present invention.

After loading the insulin-linker conjugate to the functionalized maleimido group-containing hydrogel, all remaining functional groups are capped with a suitable blocking reagent, such as mercaptoethanol, to prevent undesired side-reactions.

In a preferred embodiment of the invention, an insulin-linker conjugate carrying a free thiol group connected to the linker moiety, is reacted with a maleimide-functionalized hydrogel at temperatures between room temperature and 4°C, more preferred at room temperature, in a buffered aqueous solution of pH 2-5, preferably pH 2.5-4.5, more preferably pH 3.0-4.0. Subsequently, the corresponding resulting insulin-linker-hydrogel conjugate is treated with mercaptoethanol at temperatures between room temperature and 4°C, more preferred at room temperature, in a buffered aqueous solution of pH 2-5, preferably pH 2.5-4.0, more preferably pH 2.5-3.5.

In another preferred embodiment of the invention, an insulin-linker conjugate carrying a maleimide group connected to the linker moiety, is reacted with a thiol-functionalized hydrogel at temperatures between room temperature and 4°C, more preferred at room temperature, in a buffered aqueous solution of pH 2-5, preferably pH 2.5-4.5, more preferably pH 3.0-4.0. Subsequently, the corresponding resulting insulin-linker-hydrogel conjugate is treated with a low molecular weight compound comprising a maleimide group, preferably a maleimide-containing compound of 100 to 300 Da, e.g. N-ethyl-maleimide, at temperatures between room temperature and 4°C, more preferred at room temperature, in a buffered aqueous solution of pH 2-5, preferably pH 2.5-4.0, more preferably pH 2.5-3.5.

Another aspect of the present invention is a process comprising the steps of

- (a) contacting an aqueous suspension comprising maleimide-functionalized hydrogel microparticles with a solution comprising an insulin-linker reagent carrying thiol groups at temperatures between room temperature and 4°C in a buffered aqueous solution of pH 2-5, resulting in an insulin-linker-hydrogel conjugate;
- (b) optionally, treating the insulin-linker-hydrogel conjugate from step (a) with a thiol-containing compound of 34 Da to 500 Da at temperatures between room temperature and 4°C in a buffered aqueous solution of pH 2-5.

Another aspect of the present invention is a process comprising the steps of

- (a) contacting an aqueous suspension comprising thiol-functionalized hydrogel microparticles with a solution comprising an insulin-linker reagent carrying maleimide groups at temperatures between room temperature and 4°C in a buffered aqueous solution of pH 2-5, resulting in an insulin-linker-hydrogel conjugate;
- (b) optionally, treating the insulin-linker-hydrogel conjugate from step (a) with a maleimide-containing compound of 100 to 300 Da at temperatures between room temperature and 4°C in a buffered aqueous solution of pH 2-5.

A particularly preferred method for the preparation of a prodrug of the present invention comprises the steps of

- (a) reacting a compound of formula $C(A'-X^1)_4$, wherein $A'-X^1$ represents A before its binding to Hyp or a precursor of Hyp and X^1 is a suitable functional group, with a compound of formula $Hyp'-X^2$, wherein $Hyp'-X^2$ represents Hyp before its binding to A or a precursor of Hyp and X^2 is a suitable functional group to react with X^1 ;
- (b) optionally reacting the resulting compound from step (a) in one or more further steps to yield a compound of formula $C(A-Hyp)_4$ having at least four functional groups;
- (c) reacting the at least four functional groups of the resulting compound from step (b) with a polyethyleneglycol based crosslinker precursor, wherein the active ester groups of the crosslinker precursor are used in a sub-stoichiometric amount compared to the total number of reactive functional groups of $C(A-Hyp)_4$ to yield a hydrogel;

- (d) reacting remaining un-reacted functional groups (representing the reactive functional groups of the backbone comprised in the hydrogel) in the hydrogel backbone of step (c) with a covalent conjugate of biologically active moiety and transient prodrug linker or first reacting the un-reacted functional groups with the transient prodrug linker and subsequently with the biologically active moiety;
- (e) optionally capping remaining un-reacted functional groups to yield a prodrug of the present invention.

Specifically, hydrogels for the insulin prodrugs of the present invention are synthesized as follows:

For bulk polymerization, backbone reagent and crosslinker reagent are mixed in a ratio amine/active ester of 2:1 to 1.05:1.

Both backbone reagent and crosslinker reagent are dissolved in DMSO to give a solution with a concentration of 5 to 50 g per 100 mL, preferably 7.5 to 20 g per 100 ml and most preferably 10 to 20 g per 100 ml.

To effect polymerization, 2 to 10 % (vol.) N,N,N',N'-tertramethylethylene diamine (TMEDA) are added to the DMSO solution containing crosslinker reagent and backbone reagent and the mixture is shaken for 1 to 20 sec and left standing. The mixture solidifies within less than 1 min.

Such hydrogel according to the invention is preferably comminuted by mechanical processes such as stirring, crushing, cutting pressing, or milling, and optionally sieving.

For emulsion polymerization, the reaction mixture is comprised of the dispersed phase and the continuous phase.

For the dispersed phase, backbone reagent and crosslinker reagent are mixed in a ratio amine/active ester of 2:1 to 1.05:1 and are dissolved in DMSO to give a to give a solution with a concentration of 5 to 50 g per 100 mL, preferably 7.5 to 20 g per 100 ml and most preferably 10 to 20 g per 100 ml.

The continuous phase is any solvent, that is not miscible with DMSO, not basic, aprotic and shows a viscosity lower than 10 Pa*s. Preferably, the solvent is not miscible with DMSO, not basic, aprotic, shows a viscosity lower than 2 Pa*s and is non-toxic. More preferably, the solvent is a saturated

linear or branched hydrocarbon with 5 to 10 carbon atoms. Most preferably, the solvent is n-heptane.

To form an emulsion of the dispersed phase in the continuous phase, an emulsifier is added to the continuous phase before adding the dispersed phase. The amount of emulsifier is 2 to 50 mg per mL dispersed phase, more preferably 5 to 20 mg per mL dispersed phase, most preferably 10 mg per mL dispersed phase.

The emulsifier has an HLB-value of 3 to 8. Preferably, the emulsifier is a triester of sorbitol and a fatty acid or an poly(hydroxyl fatty acid)-poly(ethylene glycol) conjugate. More preferably, the emulsifier is an poly(hydroxy-fatty acid)-polyethylene glycol conjugate, with a linear poly(ethylene glycol) of a molecular weight in the range of from 0.5 kDa to 5 kDa and poly(hydroxy-fatty acid) units of a molecular weight in the range of from 0.5 kDa to 3 kDa on each end of the chain. Most preferably, the emulsifier is poly(ethylene glycol) dipolyhydroxy stearate, Cithrol DPHS (Cithrol DPHS, former Arlacel P135, Croda International Plc).

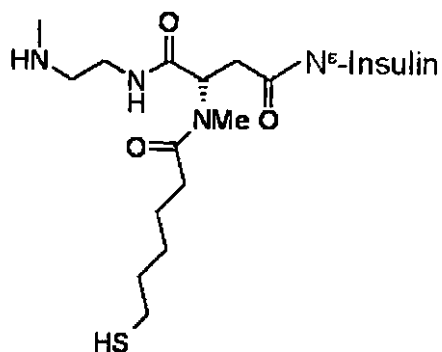
Droplets of the dispersed phase are generated by stirring with an axial flow impeller with a geometry similar to stirrers such as Isojet, Intermig, Propeller (EKATO Rühr- und Mischtechnik GmbH, Germany)), most preferably similar to Isojet with a diameter of 50 to 90 % of the reactor diameter. Preferably, stirring is initiated before addition of the dispersed phase. Stirrer speed is set to 0.6 to 1.7 m/s. The dispersed phase is added at room temperature, and the concentration of the disperse phase is 2% to 70%, preferably 5 to 50% , more preferably 10 to 40%, and most preferably 20 to 35% of the total reaction volume. The mixture of dispersed phase, emulsifier and continuous phase is stirred for 5 to 60 min before adding the base to the effect polymerization.

5 to 10 equivalents (referred to each amide bond to be formed) of a base are added to the mixture of dispersed and continuous phase. The base is aprotic, non nucleophilic and soluble in the disperse phase. Preferably, the base is aprotic, non nucleophilic, well soluble in both disperse phase and DMSO. More preferably, the base is aprotic, non nucleophilic, well soluble in both disperse phase and DMSO, an amine base and non-toxic. Most preferably, the base is N,N,N',N'-tertramethylethylene diamine (TMEDA). Stirring in the presence of base is continued for 1 to 16 h.

During stirring, droplets of dispersed phase are hardened to become crosslinked hydrogel beads according to the invention which can be collected and fractionation according to size is performed on

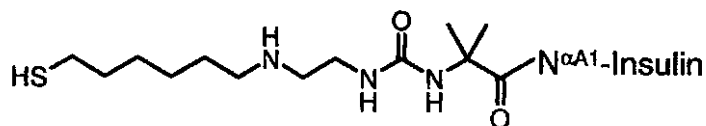
a vibrational continuous sieving machine with a 75 μm and a 32 μm deck to give hydrogel microparticles according to the invention.

Another aspect of the present invention are insulin-linker conjugates of formula (IIIa) and (IIIb)



(IIIa),

wherein N^{ϵ} -Insulin refers to insulin connected via one lysine side chain; and



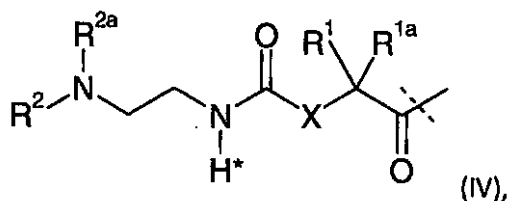
(IIIb).

Another aspect of the present invention are insulin-linker reagents D-L*,

wherein

D represents an insulin moiety; and

L* is a non-biologically active linker reagent represented by formula (IV),



(IV),

wherein the dashed line indicates the attachment to one of the amino groups of the insulin by forming an amide bond;

X is $C(R^3R^{3a})$; or $N(R^3)$;

R^{1a} , R^{3a} are independently selected from the group consisting H, $NH(R^{2b})$, $N(R^{2b})C(O)R^4$ and C_{1-4} alkyl;

$R^1, R^2, R^{2a}, R^{2b}, R^3, R^4$ are independently selected from the group consisting of H and C_{1-4} alkyl,

wherein L^* is substituted with one L^{2*} and optionally further substituted, provided that the hydrogen marked with the asterisk in formula (IV) is not replaced by a substituent and wherein

L^{2*} is a spacer connected to L^* and comprising a chemical functional group intended for conjugation to a reactive biodegradable hydrogel;

Preferably, R^2 in formula (IV) is replaced by L^{2*} .

Preferably, R^1 in formula (IV) is replaced by L^{2*} .

Preferably, X in formula (IV) is $N(R^3)$.

More preferably, X in formula (IV) is $C(R^3R^{3a})$ and R^{3a} is $N(R^{2b})C(O)R^4$.

More preferably, X in formula (IV) is $C(R^3R^{3a})$ and R^{3a} is replaced by L^{2*} .

Even more preferably, X in formula (IV) is $C(R^3R^{3a})$, R^{3a} is $N(R^{2b})-L^{2*}$.

Preferably, L^* in formula (IV) is not further substituted.

Preferably, L^{2*} in formula (IV) comprises a thiol group.

Preferably, L^{2*} in formula (IV) comprises a maleimide group.

The hydrogel for the prodrug of the present invention can be obtained from the preparation methods in form of microparticles. In a preferred embodiment of the invention, the reactive hydrogel is a shaped article such as a mesh or a stent. Most preferably, the hydrogel is formed into microparticulate beads which can be administered as subcutaneous or intramuscular injection by means of a standard syringe. Such soft beads may have a diameter of between 1 and 500 micrometer.

Preferably, the microparticles have a diameter of between 10 and 100 micrometer if suspended in an isotonic aqueous formulation buffer, most preferably a diameter of between 20 and 100 micrometer, most preferably a diameter of between 25 and 80 micrometer.

Preferably, the microparticles can be administered by injection through a needle smaller than 0.6 mm inner diameter, preferably through a needle smaller than 0.3 mm inner diameter, more preferably through a needle smaller than 0.225 mm inner diameter, even more preferably through a needle smaller than 0.175 mm inner diameter, and most preferably through a needle small than 0.16 mm inner diameter.

It is understood that the terms "can be administered by injection", "injectable" or "injectability" refer to a combination of factors such as a certain force applied to a plunger of a syringe containing the biodegradable hydrogel according to the invention swollen in a liquid at a certain concentration (w/v) and at a certain temperature, a needle of a given inner diameter connected to the outlet of such syringe, and the time required to extrude a certain volume of the biodegradable hydrogel according to the invention from the syringe through the needle.

In order to provide for injectability, a volume of 1 mL of the insulin prodrugs according to the invention swollen in water to a concentration of at least 5% (w/v) and contained in a syringe holding a plunger of a diameter of 4.7 mm can be extruded at room temperature within 10 seconds by applying a force of less than 50 Newton.

Preferably injectability is achieved for an insulin prodrug according to the invention swollen in water to a concentration of ca. 10% (w/v).

Furthermore a one-step process is provided to selectively acylate single free ϵ -amino groups found in the B-chain of insulin and its analoga with an acylating agent containing a protected thiol or other functional group. For recombinant human insulin, insulin glargine and insuline aspart the site of acylation is the ϵ -amino group of LysB29, in the case of insulin Lispro the site of acylation is the ϵ -amino group of LysB28, and in the case of insulin glulisine the site of acylation is the ϵ -amino group of LysB3. It is understood that this proces is not limited to the before-mentioned insulin and insulin analoga, but can be applied to other insulin analoga as long as they contain ϵ -amino groups and the person skilled in the art will be able to identify the corresponding lysine residue suitable for acylation.

Thus another aspect of the present invention is a process for acylating the ϵ -amino group of insulin or an insulin analog, having one or more free α -amino groups and the free ϵ -amino group with an acylating agent containing one or more protected functional groups, which comprises reacting the insulin or insulin analog with a soluble acylating agent containing one or more protected functional groups at a pH of 8.0 to below 9.0 in a polar solvent. It is understood that only such protective groups are to be used that are stable in the before mentioned conditions.

The reaction is carried out by reacting an acylating agent, such as a linker reagent, which contains one or more protected functional groups, with the ϵ -amino group of the insulin or insulin analog under basic conditions with a pH ranging from about 8.00 to below 9.0, preferably, from 8.0 to 8.9, more preferably, from 8.3 to 8.7 in a polar solvent, such as aqueous mixtures of, for example, methanol, ethanol, propanol, isopropanol, DMSO, DMF, NMP, dimethylacetamid, acetonitrile.

Another aspect of the present invention is an insulin compound characterized by having an acyl group linked to the ϵ -nitrogen of insulin or an insulin analog and wherein such acyl group has one or more protected functional groups.

Another aspect of the present invention is a pharmaceutical composition comprising a prodrug of the present invention or a pharmaceutically acceptable salt thereof together with a pharmaceutically acceptable excipient. The pharmaceutical composition is further described in the following paragraphs.

The composition of insulin-hydrogel prodrug may be provided as a suspension composition or as a dry composition. Preferably, the pharmaceutical composition of insulin-hydrogel prodrug is a dry composition. Suitable methods of drying are, for example, spray-drying and lyophilization (freeze-drying). Preferably, the pharmaceutical composition of insulin-hydrogel prodrug is dried by lyophilization.

Preferably, the insulin hydrogel prodrug is sufficiently dosed in the composition to provide therapeutically effective amount of insulin for at least three days in one application. More preferably, one application of the insulin hydrogel prodrug is sufficient for one week.

The pharmaceutical composition of insulin-hydrogel prodrug according to the present invention contains one or more excipients.

Excipients used in parenteral compositions may be categorized as buffering agents, isotonicity modifiers, preservatives, stabilizers, anti-adsorption agents, oxidation protection agents, viscosifiers/viscosity enhancing agents, or other auxiliary agents. In some cases, these ingredients may have dual or triple functions. The compositions of insulin-hydrogel prodrugs according to the present invention contain one or more than one excipient, selected from the groups consisting of:

- (i) Buffering agents: physiologically tolerated buffers to maintain pH in a desired range, such as sodium phosphate, bicarbonate, succinate, histidine, citrate and acetate, sulphate, nitrate, chloride, pyruvate. Antacids such as $\text{Mg}(\text{OH})_2$ or ZnCO_3 may be also used. Buffering capacity may be adjusted to match the conditions most sensitive to pH stability
- (ii) Isotonicity modifiers: to minimize pain that can result from cell damage due to osmotic pressure differences at the injection depot. Glycerin and sodium chloride are examples. Effective concentrations can be determined by osmometry using an assumed osmolality of 285-315 mOsmol/kg for serum
- (iii) Preservatives and/or antimicrobials: multidose parenteral preparations require the addition of preservatives at a sufficient concentration to minimize risk of patients becoming infected upon injection and corresponding regulatory requirements have been established. Typical preservatives include m-cresol, phenol, methylparaben, ethylparaben, propylparaben, butylparaben, chlorobutanol, benzyl alcohol, phenylmercuric nitrate, thimerosal, sorbic acid, potassium sorbate, benzoic acid, chlorocresol, and benzalkonium chloride
- (iv) Stabilizers: Stabilisation is achieved by strengthening of the protein-stabilising forces, by destabilisation of the denatured stater, or by direct binding of excipients to the protein. Stabilizers may be amino acids such as alanine, arginine, aspartic acid, glycine, histidine, lysine, proline, sugars such as glucose, sucrose, trehalose, polyols such as glycerol, mannitol, sorbitol, salts such as potassium phosphate, sodium sulphate, chelating agents such as EDTA, hexaphosphate, ligands such as divalent metal ions (zinc, calcium, etc.), other salts or organic molecules such as phenolic derivatives. In addition, oligomers or polymers such as cyclodextrins, dextran, dendrimers, PEG or PVP or protamine or HSA may be used
- (v) Anti-adsorption agents: Mainly ionic or inon-ionic surfactants or other proteins or soluble polymers are used to coat or adsorb competitively to the inner surface of the composition's or composition's container. E.g., poloxamer (Pluronic F-68), PEG dodecyl ether (Brij 35),

polysorbate 20 and 80, dextran, polyethylene glycol, PEG-polyhistidine, BSA and HSA and gelatines. Chosen concentration and type of excipient depends on the effect to be avoided but typically a monolayer of surfactant is formed at the interface just above the CMC value

- (vi) Lyo- and/or cryoprotectants: During freeze- or spray drying, excipients may counteract the destabilising effects caused by hydrogen bond breaking and water removal. For this purpose sugars and polyols may be used but corresponding positive effects have also been observed for surfactants, amino acids, non-aqueous solvents, and other peptides. Trehalose is particularly efficient at reducing moisture-induced aggregation and also improves thermal stability potentially caused by exposure of protein hydrophobic groups to water. Mannitol and sucrose may also be used, either as sole lyo/cryoprotectant or in combination with each other where higher ratios of mannitol:sucrose are known to enhance physical stability of a lyophilized cake. Mannitol may also be combined with trehalose. Trehalose may also be combined with sorbitol or sorbitol used as the sole protectant. Starch or starch derivatives may also be used
- (vii) Oxidation protection agents: antioxidants such as ascorbic acid, ectoine, methionine, glutathione, monothioglycerol, morin, polyethylenimine (PEI), propyl gallate, vitamin E, chelating agents such as citric acid, EDTA, hexaphosphate, thioglycolic acid
- (viii) Viscosifiers or viscosity enhancers: retard settling of the particles in the vial and syringe and are used in order to facilitate mixing and resuspension of the particles and to make the suspension easier to inject (i.e., low force on the syringe plunger). Suitable viscosifiers or viscosity enhancers are, for example, carbomer viscosifiers like Carbopol 940, Carbopol Ultrez 10, cellulose derivatives like hydroxypropylmethylcellulose (hypromellose, HPMC) or diethylaminoethyl cellulose (DEAE or DEAE-C), colloidal magnesium silicate (Veegum) or sodium silicate, hydroxyapatite gel, tricalcium phosphate gel, xanthans, carrageenans like Satia gum UTC 30, aliphatic poly(hydroxy acids), such as poly(D,L- or L-lactic acid) (PLA) and poly(glycolic acid) (PGA) and their copolymers (PLGA), terpolymers of D,L-lactide, glycolide and caprolactone, poloxamers, hydrophilic poly(oxyethylene) blocks and hydrophobic poly(oxypropylene) blocks to make up a triblock of poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene)-poly(oxyethylene) (e.g. Pluronic®), polyetherester copolymer, such as a polyethylene glycol terephthalate/polybutylene terephthalate copolymer, sucrose acetate isobutyrate (SAIB), dextran or derivatives thereof, combinations of dextrans and PEG, polydimethylsiloxane, collagen, chitosan, polyvinyl alcohol (PVA) and derivatives, polyalkylimides, poly (acrylamide-

co-diallyldimethyl ammonium (DADMA)), polyvinylpyrrolidone (PVP), glycosaminoglycans (GAGs) such as dermatan sulfate, chondroitin sulfate, keratan sulfate, heparin, heparan sulfate, hyaluronan, ABA triblock or AB block copolymers composed of hydrophobic A-blocks, such as polylactide (PLA) or poly(lactide-co-glycolide) (PLGA), and hydrophilic B-blocks, such as polyethylene glycol (PEG) or polyvinyl pyrrolidone. Such block copolymers as well as the abovementioned poloxamers may exhibit reverse thermal gelation behavior (fluid state at room temperature to facilitate administration and gel state above sol-gel transition temperature at body temperature after injection).

- (ix) Spreading or diffusing agent: modifies the permeability of connective tissue through the hydrolysis of components of the extracellular matrix in the intrastitial space such as but not limited to hyaluronic acid, a polysaccharide found in the intercellular space of connective tissue. A spreading agent such as but not limited to hyaluronidase temporarily decreases the viscosity of the extracellular matrix and promotes diffusion of injected drugs.
- (x) Other auxiliary agents: such as wetting agents, viscosity modifiers, antibiotics, hyaluronidase. Acids and bases such as hydrochloric acid and sodium hydroxide are auxiliary agents necessary for pH adjustment during manufacture.

Preferably, the composition of insulin-hydrogel prodrug contains one or more than one viscosifier and/or viscosity modifying agent.

The term "excipient" preferably refers to a diluent, adjuvant, or vehicle with which the therapeutic is administered. Such pharmaceutical excipient can be sterile liquids, such as water and oils, including those of petroleum, animal, vegetable or synthetic origin, including but not limited to peanut oil, soybean oil, mineral oil, sesame oil and the like. Water is a preferred excipient when the pharmaceutical composition is administered orally. Saline and aqueous dextrose are preferred excipients when the pharmaceutical composition is administered intravenously. Saline solutions and aqueous dextrose and glycerol solutions are preferably employed as liquid excipients for injectable solutions. Suitable pharmaceutical excipients include starch, glucose, lactose, sucrose, gelatin, malt, rice, flour, chalk, silica gel, sodium stearate, glycerol monostearate, talc, sodium chloride, dried skim milk, glycerol, propylene, glycol, water, ethanol and the like. The composition, if desired, can also contain minor amounts of wetting or emulsifying agents, or pH buffering agents. These compositions can take the form of solutions, suspensions, emulsions, tablets, pills, capsules, powders, sustained-release formulations and the like. The composition can be formulated as a suppository, with traditional binders and excipients such as triglycerides. Oral formulation can include standard

excipients such as pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharine, cellulose, magnesium carbonate, etc. Examples of suitable pharmaceutical excipients are described in "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin. Such compositions will contain a therapeutically effective amount of the therapeutic, preferably in purified form, together with a suitable amount of excipient so as to provide the form for proper administration to the patient. The formulation should suit the mode of administration.

In a general embodiment a pharmaceutical composition of the present invention whether in dry form or as a suspension or in another form may be provided as single or multiple dose composition.

In one embodiment of the present invention, the dry composition of insulin-hydrogel prodrug is provided as a single dose, meaning that the container in which it is supplied contains one pharmaceutical dose.

Thus in another aspect of the present invention the composition is provided as a single dose composition.

Preferably, the suspension composition is a multiple dose composition, meaning that it contains more than one therapeutic dose. Preferably, a multiple dose composition contains at least 2 doses. Such multiple dose composition of insulin-hydrogel can either be used for different patients in need thereof or is intended for use in one patient, wherein the remaining doses are stored after the application of the first dose until needed.

In another aspect of the present invention the composition is comprised in a container. Preferably the container is a dual-chamber syringe. Especially the dry composition according to the present invention is provided in a first chamber of the dual-chamber syringe and reconstitution solution is provided in a second chamber of the dual-chamber syringe.

Prior to applying the dry composition of insulin-hydrogel prodrug to a patient in need thereof, the dry composition is reconstituted. Reconstitution can take place in the container in which the dry composition of insulin-hydrogel prodrug is provided, such as in a vial, syringe, dual-chamber syringe, ampoule, and cartridge. Reconstitution is done by adding a predefined amount of reconstitution solution to the dry composition. Reconstitution solutions are sterile liquids, such as water or buffer, which may contain further additives, such as preservatives and/or antimicrobials. If the insulin-hydrogel prodrug composition is provided as single dose, the reconstitution solution may contain one

or more preservative and/or antimicrobial. Preferably, the reconstitution solution is sterile water. If the composition of insulin-hydrogel prodrug is a multiple dose composition, it is preferred that the reconstitution solution contains one or more preservative and/or antimicrobial, such as, for example, benzylalcohol and cresol.

An additional aspect of the present invention relates to the method of administration of a reconstituted insulin hydrogel prodrug composition. The insulin hydrogel prodrug composition can be administered by methods of injection or infusion, including intradermal, subcutaneous, intramuscular, intravenous, intraosseous, and intraperitoneal.

A further aspect is a method of preparing a reconstituted composition comprising a therapeutically effective amount of an insulin hydrogel prodrug, and optionally one or more pharmaceutically acceptable excipients, wherein the insulin is transiently linked to a hydrogel, the method comprising the step of

- contacting the composition of the present invention with a reconstitution solution.

Another aspect is a reconstituted composition comprising a therapeutically effective amount of an insulin hydrogel prodrug, and optionally one or more pharmaceutically acceptable excipients, wherein the insulin is transiently linked to a hydrogel obtainable by the method above.

Another aspect of the present invention is the method of manufacturing a dry composition of insulin-hydrogel prodrug. In one embodiment, such suspension composition is made by

- (i) admixing the insulin-hydrogel prodrug with one or more excipients,
- (ii) transferring amounts equivalent to single or multiple doses into a suitable container,
- (iii) drying the composition in said container, and
- (iv) sealing the container.

Suitable containers are vials, syringes, dual-chamber syringes, ampoules, and cartridges.

Another aspect is a kit of parts. When the administration device is simply a hypodermic syringe then the kit may comprise the syringe, a needle and a container comprising the dry insulin-hydrogel prodrug composition for use with the syringe and a second container comprising the reconstitution solution. In more preferred embodiments, the injection device is other than a simple hypodermic syringe and so the separate container with reconstituted insulin-hydrogel prodrug is adapted to engage with the injection device such that in use the liquid composition in the container is in fluid

connection with the outlet of the injection device. Examples of administration devices include but are not limited to hypodermic syringes and pen injector devices. Particularly preferred injection devices are the pen injectors in which case the container is a cartridge, preferably a disposable cartridge.

A preferred kit of parts comprises a needle and a container containing the composition according to the present invention and optionally further containing a reconstitution solution, the container being adapted for use with the needle. Preferably, the container is a dual-chamber syringe.

In another aspect, the invention provides a cartridge containing a composition of insulin-hydrogel prodrug as hereinbefore described for use with a pen injector device. The cartridge may contain a single dose or multiplicity of doses of insulin.

In one embodiment of the present invention the suspension composition of insulin-hydrogel prodrug does not only comprise an insulin-hydrogel prodrug and one or more than one excipients, but also other biologically active agents, either in their free form or as prodrugs. Preferably, such additional one or more biologically active agent is a prodrug, more preferably a hydrogel prodrug. Such biologically active agents include, but are not limited to, compounds of the following classes:

- (i) Sulfonylureas, such as, for example, chlorpropamide, tolazamide, tolbutamide, glyburide, glipizide, glimepiride, and the like,
- (ii) Meglitinides, such as, for example, repaglinide,
- (iii) Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1) and its mimetics, Glucose-insulinotropic peptide (GIP) and its mimetics, Exendin and its mimetics, and Dipeptyl Protease Inhibitors (DPPIV),
- (iv) Biguanides, such as, for example, metformin,
- (v) Thiazolidinediones, such as, for example, rosiglitazone, pioglitazone, troglitazone, isaglitazone (known as MCC-555), 2-[2-[(2R)-4-hexyl-3,4-dihydro-3-oxo-2H-1,4-benzoxazin-2-yl]ethoxy]-benzene acetic acid, and the like
- (vi) GW2570, and the like,
- (vii) Retinoid-X receptor (RXR) modulators, such as, for example, targretin, 9-cis-retinoic acid, and the like,

- (viii) Other insulin sensitizing agents , such as, for example, INS-1, PTP-1B inhibitors, GSK3 inhibitors, glycogen phosphorylase a inhibitors, fructose-1,6-bisphosphatase inhibitors, and the like,
- (ix) Insulins, including regular or short-acting, intermediate-acting, and long-acting insulins, inhaled insulin and insulin analogues, such as insulin molecules with minor differences in the natural amino acid sequence
- (x) Small molecule mimics of insulin, including, but not limited to L-783281, TE-17411, and the like,
- (xi) Na-glucose co-transporter inhibitors , such as T-1095, T-1095A, phlorizin, and the like,
- (xii) Amylin agonists which include, but are not limited to pramlintide, and the like,
- (xiii) Glucagon antagonists such as AY-279955, and the like.

In addition to antidiabetic agents, bioactive compounds may be anti-obesity agents such as orlistat, a pancreatic lipase inhibitor, which prevents the breakdown and absorption of fat; or sibutramine, an appetite suppressant and inhibitor of the reuptake of serotonin, norepinephrine and dopamine in the brain, growth factors increasing fat mobilization (eg, growth hormone, IGF-1, growth hormone releasing factor), oxyntomodulin and ghrelin modulators. Other potential bioactive anti-obesity agents include, but are not limited to, appetite-suppressants acting through adrenergic mechanisms such as benzphetamine, phenmetrazine, phentermine, diethylpropion, mazindol, sibutramine, phenylpropanolamine or, ephedrine; appetite-suppressant agents acting through serotonergic mechanisms such as quipazine, fluoxetine, sertraline, fenfluramine, or dexfenfluramine; appetite-suppressant agents acting through dopamine mechanisms, eg, apomorphine; appetite-suppressant agents acting through histaminergic mechanisms (eg, histamine mimetics, H3 receptor modulators); enhancers of energy expenditure such as beta-3 adrenergic agonists and stimulators of uncoupling protein function; leptin and leptin mimetics (eg, metreleptin); neuropeptide Y antagonists; melanocortin-1, 3 and 4 receptor modulators; cholecystokinin agonists; glucagon-like peptide-1 (GLP-1) mimetics and analogues (eg, Exendin); androgens (eg, dehydroepiandrosterone and derivatives such as etiocholanolone), testosterone, anabolic steroids (eg, oxandrolone), and steroidal hormones; galanin receptor antagonists; cytokine agents such as ciliary neurotrophic factor; amylase inhibitors; enterostatin agonists/mimetics; orexin/hypocretin antagonists; urocortin antagonists; bombesin agonists; modulators of protein kinase A; corticotropin-releasing factor mimetics; cocaine- and amphetamine-regulated transcript mimetics; calcitonin-gene related peptide mimetics; and fatty acid synthase inhibitors.

In an alternative embodiment, the insulin-hydrogel prodrug composition according to the present invention is combined with a second biologically active compound in such way that the insulin-hydrogel prodrug is administered to a patient in need thereof first, followed by the administration of the second compound. Alternatively, the insulin-hydrogel composition is administered to a patient in need thereof after another compound has been administered to the same patient.

Yet another aspect of the present invention is a prodrug of the present invention or a pharmaceutical composition of the present invention for use as a medicament.

Yet another aspect of the present invention is a prodrug of the present invention or a pharmaceutical composition of the present invention for use in a method of treating or preventing diseases or disorders which can be treated by insulin.

Such diseases or disorders are e.g. hyperglycemia, pre-diabetes, impaired glucose tolerance, diabetes type I, diabetes type II, syndrome X, obesity, hypertension.

Patients in need of treatment with the long acting insulin compositions described in the present invention are at high risk of developing comorbidities. Accordingly, the combination of the long acting insulin of the present with appropriate bioactive compounds may be used, e.g., for the prevention, delay of progression or treatment of diseases and disorders selected from the group consisting of hypertension (including but not limited to isolated systolic hypertension and familial dyslipidemic hypertension), congestive heart failure, left ventricular hypertrophy, peripheral arterial disease, diabetic retinopathy, macular degeneration, cataract, diabetic nephropathy, glomerulosclerosis, chronic renal failure, diabetic neuropathy, syndrome X, premenstrual syndrome, coronary heart disease, angina pectoris, thrombosis, atherosclerosis, myocardial infarction, transient ischemic attacks, stroke, vascular restenosis, hyperglycemia, hyperinsulinemia, hyperlipidemia, hypertriglyceridemia insulin resistance, impaired glucose metabolism, conditions of impaired glucose tolerance, conditions of impaired fasting plasma glucose, obesity, erectile dysfunction, skin and connective tissue disorders, foot ulcerations and ulcerative colitis, endothelial dysfunction and impaired vascular compliance.

Prevention, delay of progression or treatment of diseases and disorders selected from the group above can be achieved by combination of the long acting insulin composition of the present invention with at least one bioactive compound selected from the drug classes used for treating said conditions, including AT_1 -receptor antagonists; angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors; renin inhibitors; beta adrenergic receptor blockers; alpha adrenergic receptor blockers; calcium channel

blockers; aldosterone synthase inhibitors; aldosterone receptor antagonists; neutral endopeptidase (NEP) inhibitors; dual angiotensin converting enzyme/neutral endopetidase (ACE/NEP) inhibitors; an endothelin receptor antagonists; diuretics; statins; nitrates; anti clotting agents; natriuretic peptides; digitalis compounds; PPAR modulators.

In case the biologically active agents; prodrugs, especially hydrogel prodrugs contain one or more acidic or basic groups, the invention also comprises their corresponding pharmaceutically or toxicologically acceptable salts, in particular their pharmaceutically utilizable salts. Thus, the prodrugs which contain acidic groups can be used according to the invention, for example, as alkali metal salts, alkaline earth metal salts or as ammonium salts. More precise examples of such salts include sodium salts, potassium salts, calcium salts, magnesium salts or salts with ammonia or organic amines such as, for example, ethylamine, ethanolamine, triethanolamine or amino acids. Prodrugs which contain one or more basic groups, i.e. groups which can be protonated, can be present and can be used according to the invention in the form of their addition salts with inorganic or organic acids. Examples for suitable acids include hydrogen chloride, hydrogen bromide, phosphoric acid, sulfuric acid, nitric acid, methanesulfonic acid, p-toluenesulfonic acid, naphthalenedisulfonic acids, oxalic acid, acetic acid, tartaric acid, lactic acid, salicylic acid, benzoic acid, formic acid, propionic acid, pivalic acid, diethylacetic acid, malonic acid, succinic acid, pimelic acid, fumaric acid, maleic acid, malic acid, sulfaminic acid, phenylpropionic acid, gluconic acid, ascorbic acid, isonicotinic acid, citric acid, adipic acid, and other acids known to the person skilled in the art. If the prodrugs simultaneously contain acidic and basic groups in the molecule, the invention also includes, in addition to the salt forms mentioned, inner salts or betaines (zwitterions). The respective salts can be obtained by customary methods which are known to the person skilled in the art like, for example by contacting these with an organic or inorganic acid or base in a solvent or dispersant, or by anion exchange or cation exchange with other salts. The present invention also includes all salts of the prodrugs which, owing to low physiological compatibility, are not directly suitable for use in pharmaceuticals but which can be used, for example, as intermediates for chemical reactions or for the preparation of pharmaceutically acceptable salts.

The term "pharmaceutically acceptable" means approved by a regulatory agency such as the EMEA (Europe) and/or the FDA (US) and/or any other national regulatory agency for use in animals, preferably in humans.

Yet another aspect of the present invention is a method of treating, controlling, delaying or preventing in a mammalian patient, preferably in a human, in need of the treatment of one or more conditions comprising administering to said patient a therapeutically effective amount of a prodrug of the present invention or a pharmaceutical composition of the present invention or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

Fig. 1a: UPLC chromatogram of insulin-linker conjugate **12a**

Fig. 1b: UPLC chromatogram of insulin-linker conjugate **12b**

Figure 2 shows the average plasma insulin concentration of animal 1-10 after a single subcutaneous dose of test item **11a** containing 6 mg insulin into healthy rats over a 2 week period. (error bars are given as $\pm$ standard deviation as derived from all 10 animals, t_0 values were taken 3 days before dosage.)

Figure 3: Average plasma insulin concentration of animal 1-8 after a single subcutaneous dose of test item **11da** containing 3 mg insulin into healthy rats over a period of 13 days. (error bars are given as $\pm$ standard deviation as derived from all 8 animals, t_0 values were taken 1 day before dosage.)

Figure 4: Plasma insulin concentration (grey squares) and blood glucose level (black circles) after a single subcutaneous dose of test item **11da** containing 6.4 mg insulin into diabetic rats ($n=7$). (error bars are given as $\pm$ standard deviation as derived from all 7 animals, t_0 values were taken 4 days before dosage.)

Figure 5: Average plasma insulin level after a single subcutaneous dose of 8mg/kg of test item **11db** into healthy rats during the first 24 hours after dosage (burst analysis). 8 rats were divided into 2 groups and blood samples for pharmacokinetics were taken alternating between both groups. In neither group was a burst effect perceivable. (Error bars are given as $\pm$ standard deviation as derived from all animals per group, t_0 values were taken 1 day before dosage.)

Figure 6: Plasma insulin concentration (grey squares) and blood glucose level (black circles) during a 4 week period after 3 weekly subcutaneous doses of 8mg/kg of test item **11da** into diabetic rats ($n=8$). (error bars are given as $\pm$ standard deviation as derived from all 8 animals, t_0 values were taken 3 days before dosage.)

Figure 7: Average plasma insulin concentration of animal 1-8 (animal 1-4 and animal 5-8 for 0.3, 1h, 2, and 4h value, respectively) after a single subcutaneous injection of 12 mg/kg insulin formulated in test item **11dc** into healthy rats over a period of 13 days. (error bars are given as $\pm$ standard deviation as derived from all 8 animals, t_0 values were taken 4 days before dosage)

Figure 8: Overlay of insulin release and hydrogel degradation of insulin-linker-hydrogel **11a**. Amount of insulin content in insulin-linker-hydrogel (triangles) and backbone moieties release (circles) upon incubation of insulin-linker-hydrogel at pH 7.4 and 37°C is plotted against incubation time.

Figure 9 shows a graph plotting force versus flow using a 30 G needle. Data points: black squares = ethylene glycol; black triangles = water; black dots = hydrogel insulin prodrug.

Examples

Materials and Methods

Recombinant human insulin was obtained from Biocon Ltd., Bangalore, India.

Amino 4-arm PEG 5kDa was obtained from JenKem Technology, Beijing, P. R. China.

N-(3-maleimidopropyl)-21-amino-4,7,10,13,16,19-hexaoxa-heneicosanoic acid NHS ester (Mal-PEG6-NHS) was obtained from Celares GmbH, Berlin, Germany.

2-Chlorotrityl chloride resin, HATU, N-cyclohexyl-carbodiimide-N'-methyl polystyrene, and amino acids were from Merck Biosciences GmbH, Schwalbach/Ts, Germany, if not stated otherwise. Fmoc(NMe)-Asp(OtBu)-OH was obtained from Bachem AG, Bubendorf, Switzerland. S-Trityl-6-mercaptohexanoic acid was purchased from Polypeptide, Strasbourg, France. Amino acids used were of L configuration if not stated otherwise.

All other chemicals were from Sigma-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany.

Solid phase synthesis was performed on 2-Chlorotrityl chloride (TCP) resin with a loading of 1.3 mmol/g. Syringes equipped with polypropylene frits were used as reaction vessels.

Loading of the first amino acid to resins was performed according to manufacturer's instructions.

Fmoc deprotection:

For Fmoc protecting-group removal, the resin was agitated with 2/2/96 (v/v/v) piperidine/DBU/DMF (two times, 10 min each) and washed with DMF (ten times).

Fmoc deprotection of Fmoc-Aib-loaded resins

Fmoc deprotection of immobilized Fmoc-Aib-OH was achieved by stirring the resin in DMF/piperidine 4/1 (v/v) at 50 °C for 20 min (2 times).

Cleavage protocol for 2-chlorotrityl chloride resin:

Upon completed synthesis, the resin was washed with DCM, dried in vacuo and treated two times for 30 minutes with 6/4 (v/v) DCM/HFIP. Eluates were combined, volatiles were removed under a stream of nitrogen and the resulting crude product was purified by RP-HPLC. HPLC fractions containing product were combined and lyophilized.

Amine containing products obtained as TFA salts were converted to the corresponding HCl salts using ion exchange resin (Discovery DSC-SAX, Supelco, USA). This step was performed in case the residual TFA was expected to interfere with e.g. a subsequent coupling reaction.

RP-HPLC purification:

RP-HPLC was done on a 100x20 mm or 100x40 mm C18 ReproSil-Pur 300 ODS-3 5 μ column (Dr. Maisch, Ammerbuch, Germany) connected to a Waters 600 HPLC System and Waters 2487 Absorbance detector. Linear gradients of solution A (0.1% TFA in H₂O) and solution B (0.1% TFA in acetonitrile) were used. HPLC fractions containing product were lyophilized.

Flash Chromatography

Flash chromatography purifications were performed on an Isolera One system from Biotage AB, Sweden, using Biotage KP-Sil silica cartridges and *n*-heptane and ethyl acetate as eluents. Products were detected at 254 nm.

For hydrogel beads, syringes equipped with polypropylene frits were used as reaction vessels or for washing steps.

Analytical methods

Analytical ultra-performance LC (UPLC) was performed on a Waters Acquity system equipped with a Waters BEH300 C18 column (2.1 x 50 mm, 1.7 μ m particle size) coupled to a LTQ Orbitrap Discovery mass spectrometer from Thermo Scientific.

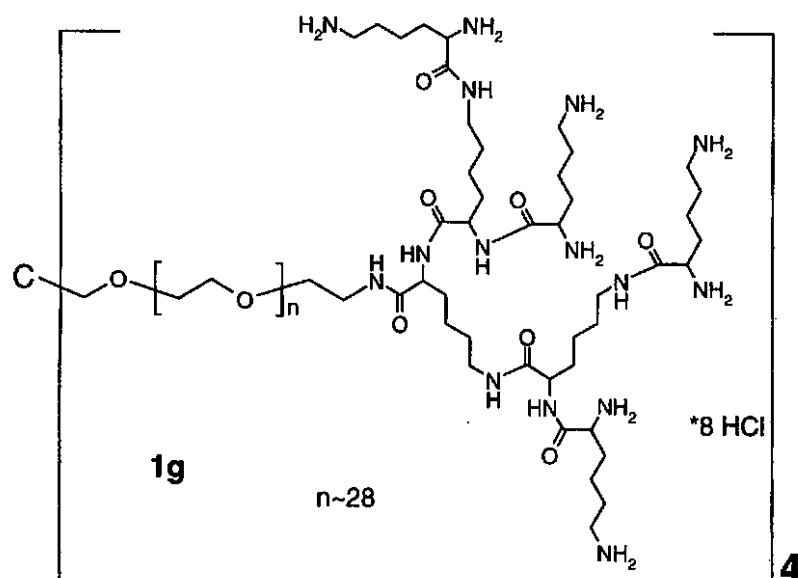
MS of PEG products showed a series of (CH₂CH₂O)_n moieties due to polydispersity of PEG starting materials. For easier interpretation only one single representative m/z signal is given in the examples. MS of insulin conjugates are reported for representative isotopes and refer to the four-proton adducts [M+4H]⁴⁺.

Size exclusion chromatography (SEC) was performed using an Amersham Bioscience AEKTAbasic system equipped with a Superdex200 5/150 GL column (Amersham Bioscience/GE Healthcare)

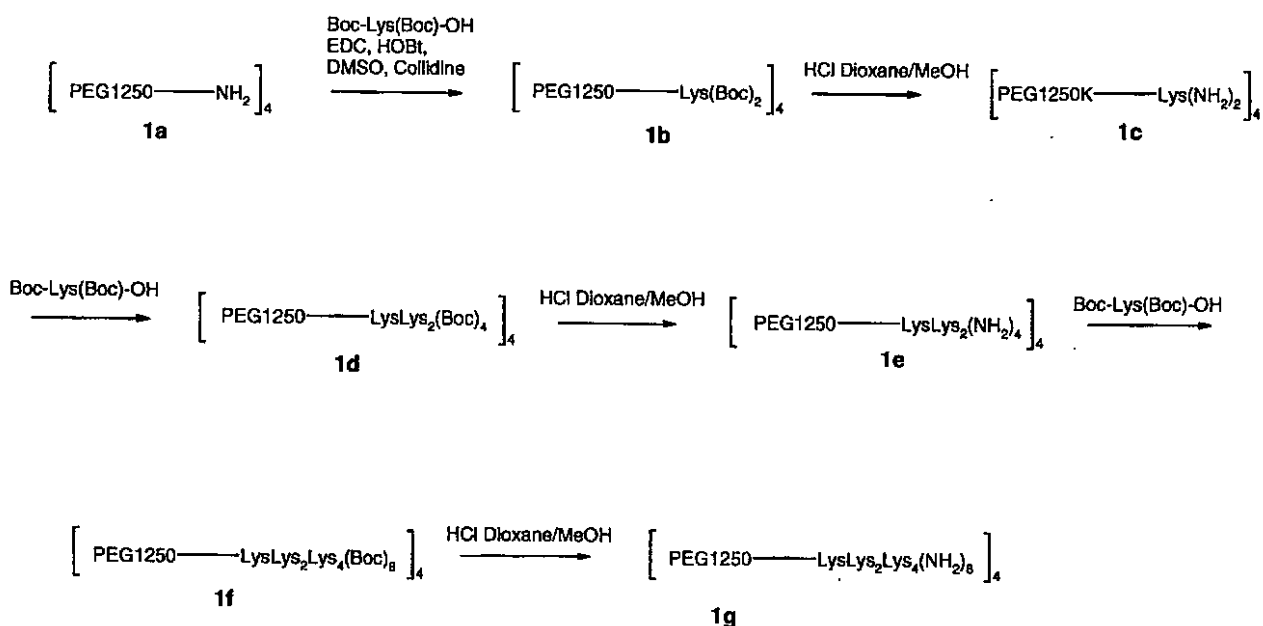
equipped with a 0.45 μm inlet filter, if not stated otherwise. 20 mM sodium phosphate, 140 mM NaCl, pH 7.4, was used as mobile phase.

Example 1

Synthesis of backbone reagent 1g



Backbone reagent **1g** was synthesized from amino 4-arm PEG5000 **1a** according to following scheme:



For synthesis of compound **1b**, amino 4-arm PEG5000 **1a** (MW ca. 5200 g/mol, 5.20 g, 1.00 mmol, HCl salt) was dissolved in 20 mL of DMSO (anhydrous). Boc-Lys(Boc)-OH (2.17 g, 6.25 mmol) in 5 mL of DMSO (anhydrous), EDC HCl (1.15 g, 6.00 mmol), HOBT-H₂O (0.96 g, 6.25 mmol), and collidine (5.20 mL, 40 mmol) were added. The reaction mixture was stirred for 30 min at RT.

The reaction mixture was diluted with 1200 mL of dichloromethane and washed with 600 mL of 0.1 N H₂SO₄ (2 x), brine (1 x), 0.1 M NaOH (2 x), and 1/1 (v/v) brine/water (4 x). Aqueous layers were reextracted with 500 mL of DCM. Organic phases were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to give 6.3 g of crude product **1b** as colorless oil. Compound **1b** was purified by RP-HPLC.

Yield 3.85 g (59%) colorless glassy product **1b**.

MS: m/z 1294.4 = [M+5H]⁵⁺ (calculated = 1294.6).

Compound **1c** was obtained by stirring of 3.40 g of compound **1b** (0.521 mmol) in 5 mL of methanol and 9 mL of 4 N HCl in dioxane at RT for 15 min. Volatiles were removed in vacuo. The product was used in the the next step without further purification.

MS: m/z 1151.9 = [M+5H]⁵⁺ (calculated = 1152.0).

For synthesis of compound **1d**, 3.26 g of compound **1c** (0.54 mmol) were dissolved in 15 mL of DMSO (anhydrous). 2.99 g Boc-Lys(Boc)-OH (8.64 mmol) in 15 mL DMSO (anhydrous), 1.55 g EDC HCl (8.1 mmol), 1.24 g HOBT·H₂O (8.1 mmol), and 5.62 mL of collidine (43 mmol) were added. The reaction mixture was stirred for 30 min at RT.

Reaction mixture was diluted with 800 mL DCM and washed with 400 mL of 0.1 N H₂SO₄ (2 x), brine (1 x), 0.1 M NaOH (2 x), and 1/1 (v/v) brine/water (4 x). Aqueous layers were reextracted with 800 mL of DCM. Organic phases were dried with Na₂SO₄, filtered and evaporated to give a glassy crude product.

Product was dissolved in DCM and precipitated with cooled (– 18 °C) diethylether. This procedure was repeated twice and the precipitate was dried in vacuo.

Yield: 4.01 g (89%) colorless glassy product **1d**, which was used in the next step without further purification.

MS: m/z 1405.4 = [M+6H]⁶⁺ (calculated = 1405.4).

Compound **1e** was obtained by stirring a solution of compound **1d** (3.96 g, 0.47 mmol) in 7 mL of methanol and 20 mL of 4 N HCl in dioxane at RT for 15 min. Volatiles were removed in vacuo. The product was used in the the next step without further purification.

MS: m/z 969.6 = [M+7H]⁷⁺ (calculated = 969.7).

For the synthesis of compound **1f**, compound **1e** (3.55 g, 0.48 mmol) was dissolved in 20 mL of DMSO (anhydrous). Boc-Lys(Boc)-OH (5.32 g, 15.4 mmol) in 18.8 mL of DMSO (anhydrous), EDC HCl (2.76 g, 14.4 mmol), HOBT·H₂O (2.20 g, 14.4 mmol), and 10.0 mL of collidine (76.8 mmol) were added. The reaction mixture was stirred for 60 min at RT.

The reaction mixture was diluted with 800 mL of DCM and washed with 400 mL of 0.1 N H₂SO₄ (2 x), brine (1 x), 0.1 M NaOH (2 x), and 1/1 (v/v) brine/water (4 x). Aqueous layers were reextracted with 800 mL of DCM. Organic phases were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to give crude product **1f** as colorless oil.

Product was dissolved in DCM and precipitated with cooled (– 18 °C) diethylther. This step was repeated twice and the precipitate was dried in vacuo.

Yield 4.72 g (82%) colourless glassy product **1f** which was used in the next step without further purification.

MS: m/z 1505.3 = [M+8H]⁸⁺ (calculated = 1505.4).

Backbone reagent **1g** was obtained by stirring a solution of compound **1f** (MW ca 12035 g/mol, 4.72 g, 0.39 mmol) in 20 mL of methanol and 40 mL of 4 N HCl in dioxane at RT for 30 min. Volatiles were removed in vacuo.

Yield 3.91 g (100 %), glassy product backbone reagent **1g**.

MS: m/z 977.2 = [M+9H]⁹⁺ (calculated = 977.4).

Alternative synthetic route for **1g**

For synthesis of compound **1b**, to a suspension of 4-Arm-PEG5000 tetraamine (**1a**) (50.0 g, 10.0 mmol) in 250 mL of *i*PrOH (anhydrous), boc-Lys(boc)-OSu (26.6 g, 60.0 mmol) and DIEA (20.9 mL, 120 mmol) were added at 45 °C and the mixture was stirred for 30 min.

Subsequently, *n*-propylamine (2.48 mL, 30.0 mmol) was added. After 5 min the solution was diluted with 1000 mL of MTBE and stored overnight at –20 °C without stirring. Approximately 500 mL of the supernatant were decanted off and discarded. 300 mL of cold MTBE were added and after 1 min shaking the product was collected by filtration through a glass filter and washed with 500 mL of cold MTBE. The product was dried *in vacuo* for 16 h.

Yield: 65.6 g (74%) **1b** as a white lumpy solid

MS: m/z 937.4 = [M+7H]⁷⁺ (calculated = 937.6).

Compound **1c** was obtained by stirring of compound **1b** from the previous step (48.8 g, 7.44 mmol) in 156 mL of 2-propanol at 40 °C. A mixture of 196 mL of 2-propanol and 78.3 mL of acetylchloride was added under stirring within 1–2 min. The solution was stirred at 40 °C for 30 min and cooled to –30 °C overnight without stirring. 100 mL of cold MTBE were added, the suspension was shaken for

1 min and cooled for 1 h at -30 °C. The product was collected by filtration through a glass filter and washed with 200 mL of cold MTBE. The product was dried *in vacuo* for 16 h.

Yield: 38.9 g (86%) **1c** as a white powder

MS: m/z 960.1 = $[M+6H]^{6+}$ (calculated = 960.2).

For synthesis of compound **1d**, to a suspension of **1c** from the previous step (19.0 g, 3.14 mmol) in 80 ml 2-propanol boc-Lys(boc)-OSu (16.7 g, 37.7 mmol) and DIEA (13.1 mL, 75.4 mmol) were added at 45 °C and the mixture was stirred for 30 min at 45 °C. Subsequently, *n*-propylamine (1.56 mL, 18.9 mmol) was added. After 5 min the solution was precipitated with 600 mL of cold MTBE and centrifuged (3000 min⁻¹, 1 min) The precipitate was dried *in vacuo* for 1 h and dissolved in 400 mL THF. 200 mL of diethyl ether were added and the product was cooled to -30 °C for 16 h without stirring. The suspension was filtered through a glass filter and washed with 300 mL cold MTBE. The product was dried *in vacuo* for 16 h.

Yield: 21.0 g (80%) **1d** as a white solid

MS: m/z 1405.4 = $[M+6H]^{6+}$ (calculated = 1405.4).

Compound **1e** was obtained by dissolving compound **1d** from the previous step (15.6 g, 1.86 mmol) in in 3 N HCl in methanol (81 mL, 243 mmol) and stirring for 90 min at 40 °C. 200 mL of MeOH and 700 mL of iPrOH were added and the mixture was stored for 2 h at -30 °C. For completeness of crystallization, 100 mL of MTBE were added and the suspension was stored at -30 °C overnight. 250 mL of cold MTBE were added, the suspension was shaken for 1 min and filtered through a glass filter and washed with 100 mL of cold MTBE. The product was dried *in vacuo*.

Yield: 13.2 g (96%) **1e** as a white powder

MS: m/z 679.1 = $[M+10H]^{10+}$ (calculated = 679.1).

For the synthesis of compound **1f**, to a suspension of **1e** from the previous step, (8.22 g, 1.12 mmol) in 165 ml 2-propanol boc-Lys(boc)-OSu (11.9 g, 26.8 mmol) and DIEA (9.34 mL, 53.6 mmol) were added at 45 °C and the mixture was stirred for 30 min. Subsequently, *n*-propylamine (1.47 mL, 17.9 mmol) was added. After 5 min the solution was cooled to -18 °C for 2 h, then 165 mL of cold MTBE were added, the suspension was shaken for 1 min and filtered through a glass filter. Subsequently, the filter cake was washed with 4x 200 mL of cold MTBE/iPrOH 4:1 and 1x 200 mL of cold MTBE. The product was dried *in vacuo* for 16 h.

Yield: 12.8 g, MW (90 %) **1f** as a pale yellow lumpy solid

MS: m/z 1505.3 = $[M+8H]^{8+}$ (calculated = 1505.4).

Backbone reagent **1g** was obtained by dissolving 4ArmPEG5kDa(-LysLys₂Lys₄(boc)₈)₄ (**1f**) (15.5 g, 1.29 mmol) in 30 mL of MeOH and cooling to 0 °C. 4 N HCl in dioxane (120 mL, 480 mmol, cooled to 0 °C) was added within 3 min and the ice bath was removed. After 20 min, 3 N HCl in methanol (200 mL, 600 mmol, cooled to 0 °C) was added within 15 min and the solution was stirred for 10 min at room temperature. The product solution was precipitated with 480 mL of cold MTBE and centrifuged at 3000 rpm for 1 min. The precipitate was dried *in vacuo* for 1 h and redissolved in 90 mL of MeOH, precipitated with 240 mL of cold MTBE and the suspension was centrifuged at 3000 rpm for 1 min. The product **1g** was dried *in vacuo*

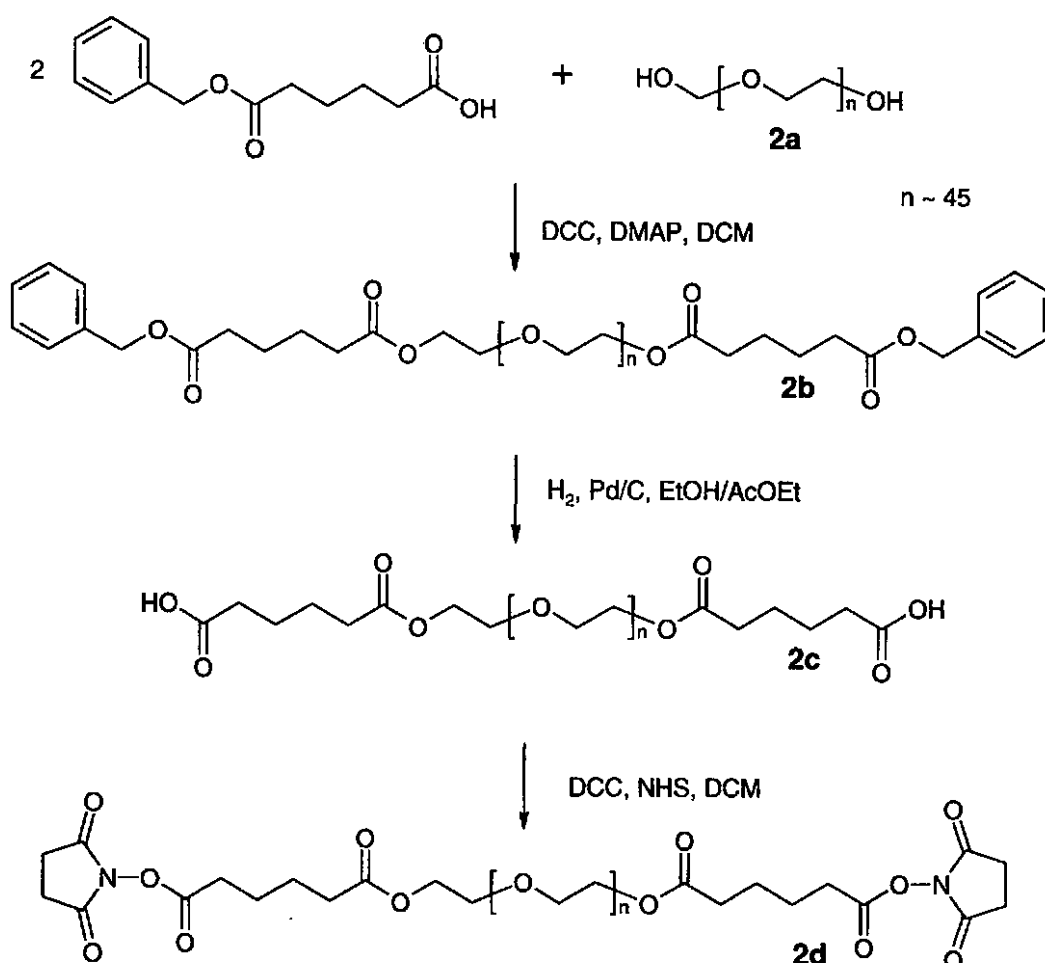
Yield: 11.5 g (89 %) as pale yellow flakes.

MS: m/z 1104.9 = $[M+8H]^{8+}$ (calculated = 1104.9).

Example 2

Synthesis of crosslinker reagent **2d**

Crosslinker reagent **2d** was prepared from adipic acid mono benzyl ester (English, Arthur R. et al., *Journal of Medicinal Chemistry*, 1990, 33(1), 344-347) and PEG2000 according to the following scheme:



A solution of PEG 2000 (**2a**) (11.0 g, 5.5 mmol) and benzyl adipate half-ester (4.8 g, 20.6 mmol) in dichloromethane (90.0 mL) was cooled to 0°C. Dicyclohexylcarbodiimide (4.47 g, 21.7 mmol) was added followed by a catalytic amount of DMAP (5 mg) and the solution was stirred and allowed to reach room temperature overnight (12 h). The flask was stored at +4°C for 5 h. The solid was filtered and the solvent completely removed by distillation in vacuo. The residue was dissolved in 1000 mL 1/1(v/v) diethyl ether/ethyl acetate and stored at RT for 2 hours while a small amount of a flaky solid was formed. The solid was removed by filtration through a pad of Celite®. The solution was stored in a tightly closed flask at -30°C in the freezer for 12 h until crystallisation was complete. The crystalline product was filtered through a glass frit and washed with cooled diethyl ether (-30°C). The filter cake was dried in vacuo. Yield: 11.6 g (86 %) **2b** as a colorless solid. The product was used without further purification in the next step.

MS: m/z 813.1 = $[M+3H]^{3+}$ (calculated = 813.3)

In a 500 mL glass autoclave PEG2000-bis-adipic acid-bis-benzyl ester **2b** (13.3 g, 5.5 mmol) was dissolved in ethyl acetate (180 mL) and 10% Palladium on charcoal (0.4 g) was added. The solution was hydrogenated at 6 bar, 40°C until consumption of hydrogen had ceased (5-12 h). Catalyst was

removed by filtration through a pad of Celite® and the solvent was evaporated in vacuo. Yield: 12.3 g (quantitative) **2c** as yellowish oil. The product was used without further purification in the next step.

MS: m/z 753.1 = $[M+3H]^{3+}$ (calculated = 753.2)

A solution of PEG2000-bis-adipic acid half ester **2c** (9.43 g, 4.18 mmol), *N*-hydroxysuccinimide (1.92 g, 16.7 mmol) and dicyclohexylcarbodiimide (3.44 g, 16.7 mmol) in 75 mL of DCM (anhydrous) was stirred over night at room temperature. The reaction mixture was cooled to 0 °C and precipitate was filtered off. DCM was evaporated and the residue was recrystallized from THF.

Yield: 8.73 g (85%) crosslinker reagent **2d** as colorless solid.

MS: m/z 817.8 = $[M+3H]^{3+}$ (calculated = 817.9 g/mol).

Example 3

Preparation of hydrogel beads (**3**) and (**3a**) containing free amino groups

A solution of 275 mg **1g** and 866 mg **2d** in 14 mL DMSO was added to a solution of 100 mg Arlacel P135 (Croda International Plc) in 60 mL heptane. The mixture was stirred at 700 rpm with a custom metal stirrer for 10 min at 25 °C to form a suspension. 1.0 mL *N,N,N',N'*-tetramethyl-ethylene-diamine was added to effect polymerization. After 2 h, the stirrer speed was reduced to 400 rpm and the mixture was stirred for additional 16 h. 1.5 mL of acetic acid were added and then after 10 min 50 mL of water were added. After 5 min, the stirrer was stopped and the aqueous phase was drained.

For bead size fractionation, the water-hydrogel suspension was wet-sieved on 75, 50, 40, 32 and 20 µm mesh steel sieves. Bead fractions that were retained on the 32, 40, and 50 µm sieves were pooled and washed 3 times with water, 10 times with ethanol and dried for 16 h at 0.1 mbar to give **3** as a white powder.

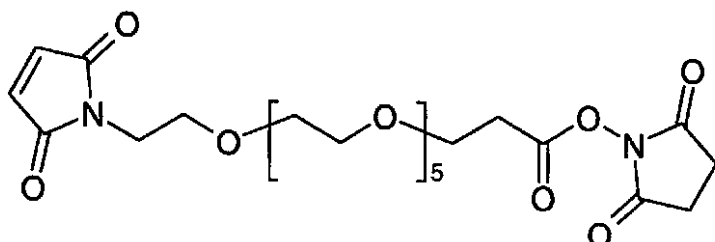
3a was prepared as described for **3** except for the use of 1200 mg **1g**, 3840 mg **2d**, 28.6 ml DMSO, 425 mg Arlacel P135, 100 mL heptane and 4.3 ml TMEDA. For workup, 6.6 ml acetic acid were added and then after 10 min 50 mL of water and 50 mL of saturated aqueous sodium chloride solution were added.

Amino group content of hydrogel was determined by conjugation of a fmoc-amino acid to the free amino groups on the hydrogel and subsequent fmoc-determination as described by Gude, M., J. Ryf, et al. (2002) Letters in Peptide Science 9(4): 203-206.

The amino group content of **3** and **3a** was determined to be between 0.11 and 0.16 mmol/g.

Example 4

Preparation of maleimide functionalized hydrogel beads (4) and (4a) and (4aa) and determination of maleimide substitution



Mal-PEG6-NHS

A solution of 600 mg Mal-PEG6-NHS (1.0 mmol) in 4.5 mL 2/1 (v/v) acetonitrile/water was added to 200 mg dry hydrogel beads **3**. 500 μ L sodium phosphate buffer (pH 7.4, 0.5 M) was added and the suspension was agitated for 30 min at room temperature. Beads **4** were washed five times each with 2/1 (v/v) acetonitrile/water, methanol and 1/1/0.001 (v/v/v) acetonitrile/water/TFA.

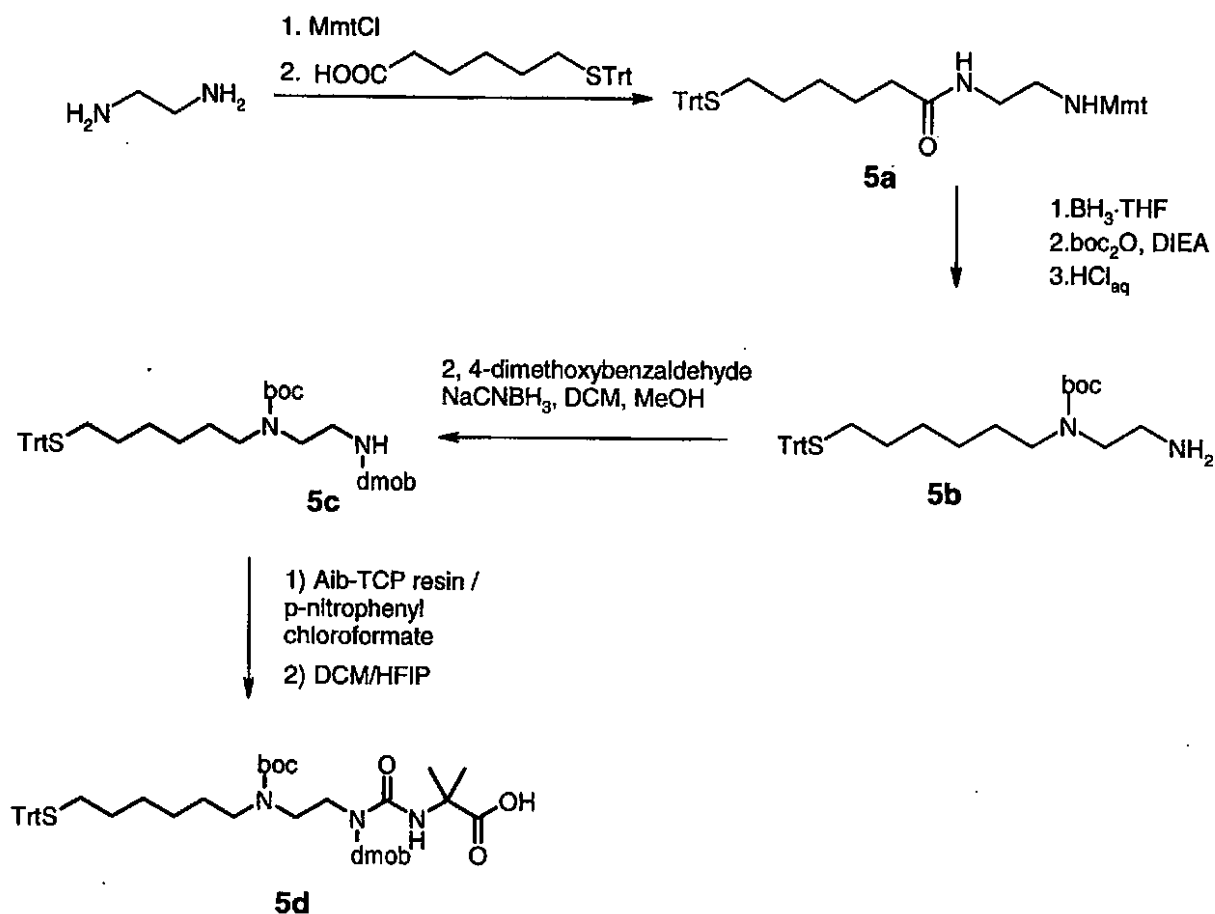
4a was synthesized as described above except for the use of **3a** instead of **3**.

Alternatively, hydrogel beads **3a** were pre-washed with 99/1 (v/v) DMSO/DIEA, washed with DMSO and incubated for 45 min with a solution of Mal-PEG6-NHS (2.0 eq relative to theoretical amount of amino groups on hydrogel) in DMSO. Beads **4aa** were washed two times with DMSO and three times with pH 3.0 succinate (20 mM, 1 mM EDTA, 0.01 % Tween-20). The sample was incubated in pH 6.0 sodium phosphate (50 mM, 50 mM ethanolamine, 0.01 % Tween-20) for 1 h at RT and washed five times with pH 3.0 sodium succinate (20 mM, 1 mM EDTA, 0.01 % Tween-20).

For determination of maleimide content, an aliquot of hydrogel beads **4**, **4a**, or **4aa**, respectively, was lyophilized and weighed out. Another aliquot of hydrogel beads **4**, **4a** or **4aa**, respectively, was reacted with excess mercaptoethanol (in 50 mM sodium phosphate buffer, 30 min at RT), and mercaptoethanol consumption was detected by Ellman test (Ellman, G. L. et al., *Biochem. Pharmacol.*, **1961**, 7, 88-95). Maleimide content was determined to be between 0.11 and 0.13 mmol/g dry hydrogel.

Example 5**Synthesis of linker reagent 5d**

Linker reagent **5d** was synthesized according to the following scheme:



Synthesis of linker reagent intermediate 5a:

4-Methoxytrityl chloride (3 g, 9.71 mmol) was dissolved in DCM (20 mL) and added dropwise to a solution of ethylenediamine (6.5 mL, 97.1 mmol) in DCM (20 mL). After two hours the solution was poured into diethyl ether (300 mL) and washed three times with 30/1 (v/v) brine/0.1 M NaOH solution (50 mL each) and once with brine (50 mL). The organic phase was dried over Na_2SO_4 and volatiles were removed under reduced pressure to obtain the Mmt-protected intermediate (3.18 g, 9.56 mmol).

The Mmt-protected intermediate (3.18 g, 9.56 mmol) was dissolved in anhydrous DCM (30 mL). 6-(Tritylmercapto)-hexanoic acid (4.48 g, 11.47 mmol), PyBOP (5.67 g, 11.47 mmol) and DIEA (5.0 mL, 28.68 mmol) were added and the mixture was agitated for 30 min at RT. The solution was diluted with diethyl ether (250 mL) and washed three times with 30/1 (v/v) brine/0.1 M NaOH solution (50 mL each) and once with brine (50 mL). The organic phase was dried over Na_2SO_4 and volatiles were removed under reduced pressure. **5a** was purified by flash chromatography.

Yield: 5.69 g (8.09 mmol).

MS: m/z 705.4 = $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calculated = 705.0).

Synthesis of linker reagent intermediate 5b:

To a solution of **5a** (3.19 g, 4.53 mmol) in anhydrous THF (50 mL) was added $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$ (1 M solution, 8.5 mL, 8.5 mmol) and the solution was stirred for 16 hours at RT. Further $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$ (1 M solution, 14 mL, 14 mmol) was added and stirred for 16 hours at RT. The reaction was quenched by addition of methanol (8.5 mL), *N,N*-dimethyl-ethylenediamine (3 mL, 27.2 mmol) was added and the solution was heated to reflux and stirred for three hours. The mixture was diluted with ethyl acetate (300 mL) at RT, washed with saturated, aqueous Na_2CO_3 solution (2 x 100 mL) and saturated, aqueous NaHCO_3 solution (2 x 100 mL). The organic phase was dried over Na_2SO_4 and volatiles were evaporated at reduced pressure to obtain the crude amine intermediate (3.22 g).

The amine intermediate was dissolved in DCM (5 mL), Boc_2O (2.97 g, 13.69 mmol) dissolved in DCM (5 mL) and DIEA (3.95 mL, 22.65 mmol) were added and the mixture was agitated at RT for 30 min. The mixture was purified by flash chromatography to obtain the crude Boc- and Mmt-protected intermediate (3 g).

MS: m/z 791.4 = $[\text{M}+\text{H}]^+$, 519.3 = $[\text{M}-\text{Mmt}+\text{H}]^+$ (calculated = 791.1).

0.4 M aqueous HCl (48 mL) was added to a solution of the Boc- and Mmt-protected intermediate in acetonitrile (45 mL). The mixture was diluted with acetonitrile (10 mL) and stirred for one hour at RT. Subsequently, the pH value of the reaction mixture was adjusted to 5.5 by addition of 5 M NaOH solution, acetonitrile was removed under reduced pressure and the aqueous solution was extracted with DCM (4 x 100 mL). The combined organic phases were dried over Na_2SO_4 and volatiles were removed under reduced pressure. Crude **5b** was used without further purification.

Yield: 2.52 g (3.19 mmol).

MS: m/z 519.3 = $[\text{M}+\text{H}]^+$ (MW calculated = 518.8 g/mol).

Synthesis of linker reagent intermediate 5c:

5b (780 mg, 0.98 mmol, ~65% purity) and NaCNBH_3 (128 mg, 1.97 mmol) were dissolved in anhydrous methanol (13 mL). A solution of 2,4-dimethoxybenzaldehyde (195 mg, 1.17 mmol) in DCM (2 mL) was added, and the mixture was stirred for 2 h at RT. The solvents were evaporated under reduced pressure, and the crude product was dissolved in DCM and washed with saturated NaCO_3 solution. The aqueous phase was extracted three times with DCM, and the combined organic phases were washed with brine, dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure. **5c** was purified by flash chromatography using DCM and MeOH as eluents.

Yield: 343 mg (0.512 mmol).

MS: m/z 669.37 = $[\text{M}+\text{H}]^+$, (calculated = 669.95).

Synthesis of linker reagent 5d:

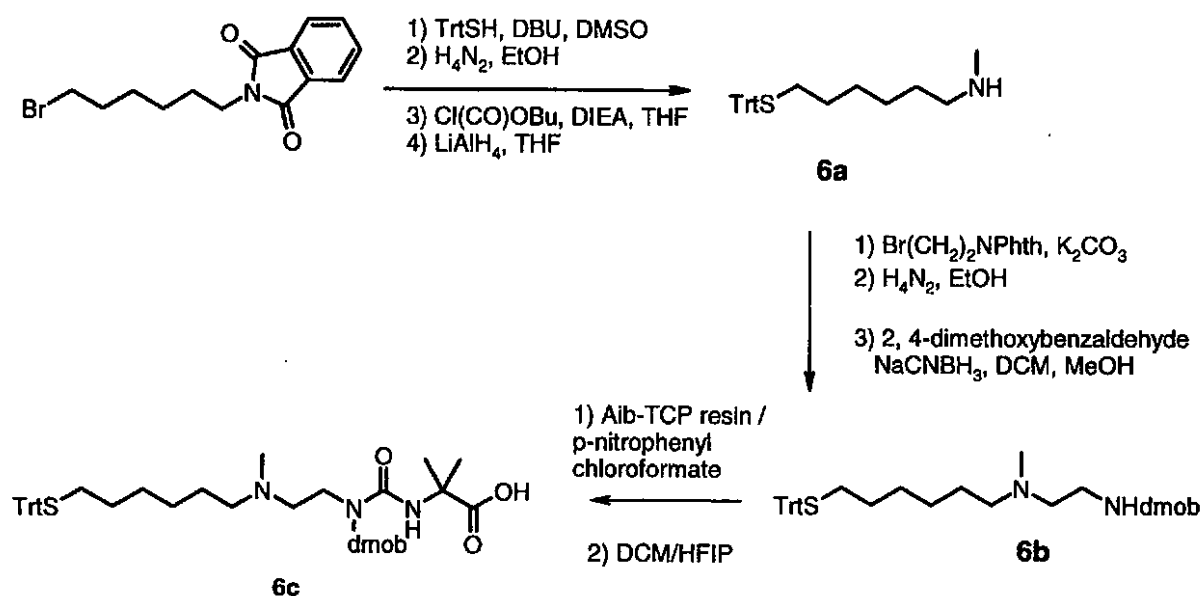
Fmoc-Aib-loaded TCP resin (980 mg, ~0.9 mmol) was deprotected with DMF/piperidine, washed with DMF (5 times) and DCM (6 times) and dried *in vacuo*. The resin was treated with a solution of *p*-nitrophenyl chloroformate (364 mg, 1.81 mmol) and collidine (398 μ L, 3.0 mmol) in anhydrous THF (6 mL) and shaken for 30 min. The reagent solution was removed by filtration and the resin was washed with THF (5 times) before a solution of amine 5c (490 mg, 0.7 mmol) and DIEA (1.23 mL, 7.1 mmol) in anhydrous THF (6 mL) was added. After shaking for 18 h at RT, the reagent solution was removed by filtration and the resin was washed with DCM (5 times). The linker reagent was cleaved from the resin and purified by RP-HPLC. Product fractions were brought to pH 6 by addition of sat. aq. NaHCO_3 and concentrated under reduced pressure. The resulting slurry was partitioned between saturated aqueous NaCl and DCM, and the aqueous layer was extracted with DCM. The combined organic fractions were concentrated to dryness to afford linker reagent 5d.

Yield: 230 mg, (0.29 mmol).

MS m/z 798.41 = $[\text{M}+\text{H}]^+$, (calculated = 798.1).

Example 6**Synthesis of linker reagent 6c**

Linker reagent 6c was synthesized according to the following scheme:

**Synthesis of amine 6a:**

Triphenylmethanethiol (11.90 g, 43.08 mmol) was suspended in DMSO (40 mL). DBU (7.41 mL, 49.55 mmol) and 6-bromohexylphthalimide (13.32 g, 42.94 mmol) were added, and the mixture was allowed to react for approximately 15 min. The reaction mixture was partitioned between ethyl acetate (700 mL) and 0.1 M HCl (200 mL). The aqueous phase was extracted with ethyl acetate

(3 x 50 mL), and the combined organic fractions were washed with NaHCO_3 sat. (80 mL) and brine (80 mL), dried over MgSO_4 , filtered and concentrated. The crude yellow oil was recrystallized from *n*-heptane/ethyl acetate. The intermediate 6-(*S*-Trityl-)mercaptohexylphthalimide was obtained as a white solid (13.3 g, 26.4 mmol, 62%).

6-(*S*-Trityl-)mercaptohexylphthalimide (14.27 g, 28.2 mmol) was suspended in ethanol (250 mL). Hydrazine hydrate (3.45 mL, 70.5 mmol) was added, and the mixture was heated to reflux for 2 h. The mixture was filtered and the filtrate was concentrated *in vacuo*. Chloroform (180 mL) was added to the residual oil and the resulting suspension was stirred at room temperature for 1.5 h. The mixture was filtered, and the filtrate was extracted with water (60 mL) and brine (60 mL), dried over MgSO_4 and concentrated to yield crude 6-(tritylmercapto)-hexylamine (10.10 g, 26.87 mmol, 95%). MS: m/z 376.22 = $[\text{M}+\text{H}]^+$, (calculated = 376.20).

DIEA (1.41 mL, 8.11 mmol) and *n*-butyl chloroformate (908 μL , 7.14 mmol, in 1 mL THF) were added to a cooled (0 °C) solution of 6-(tritylmercapto)-hexylamine (2.44 g, 6.49 mmol) in THF (50 mL). LiAlH_4 (1 M in THF, 9.74 mL, 9.47 mmol) was added after 30 min, and the mixture was heated to reflux for 90 min. Addition of water, 3.75 M aq. NaOH and water led to the formation of a precipitate which was removed from the mixture by filtration. The filtrate was concentrated *in vacuo* to obtain **6a**. Yield: 2.41 g (6.20 mmol). MS: m/z 390.22 = $[\text{M}+\text{H}]^+$, (calculated = 390.22).

Synthesis of linker reagent intermediate **6b**:

To a solution of **6a** (2.1 g, 5.31 mmol) was added 2-bromoethylphthalimide (1.96 g, 7.7 mmol) and K_2CO_3 (1.09 g, 7.9 mmol) and the mixture was heated to reflux for 6 h. After filtration and concentration, the crude mixture was partitioned between ethyl acetate and saturated aqueous NaHCO_3 . The crude intermediate (2-(*N*-methyl-*N*-(6-tritylmercaptohexyl)-amino)-ethyl)phthalimide was purified by flash chromatography.

Yield: 1.23 g (2.18 mmol).

MS: m/z : 563.27 = $[\text{M}+\text{H}]^+$, (calculated = 563.27).

To a solution of (2-(*N*-methyl-*N*-(6-tritylmercaptohexyl)-amino)-ethyl)phthalimide (672 mg, 1.19 mmol) in ethanol (12 mL) was added hydrazine monohydrate (208 μL , 4.17 mmol), and the mixture was heated to reflux for 1 h. The reaction mixture was filtered, concentrated and *N*-(2-aminoethyl)-*N*-methyl-*N*-(6-tritylmercaptohexyl)-amine purified by RP-HPLC.

Yield: 624 mg (0.944 mmol).

MS: m/z 433.27 = $[M+H]^+$, (calculated = 433.26).

To a solution of *N*-(2-aminoethyl)-*N*-methyl-*N*-(6-tritylmercaptohexyl)-amine (151 mg, 0.229 mmol) and $NaCNBH_3$ (30 mg, 0.463 mmol) in anhydrous MeOH (6 mL) was added a solution of 2,4-dimethoxybenzaldehyde in anhydrous CH_2Cl_2 (0.6 μ L). After stirring for 1 h at RT, the reaction mixture was concentrated, redissolved in 2 mL water/acetonitrile 1/9 (v/v) and **6b** purified by RP-HPLC.

Yield: 177 mg (0.219 mmol).

MS: m/z 583.33 = $[M+H]^+$, (calculated = 583.33).

Synthesis of linker reagent **6c**

Linker reagent **6c** was prepared from Fmoc-Aib-loaded resin (704 mg, ~0.6 mmol) as described for **5d**, except for the use of amine **6b** (as TFA salt, 430 mg, 0.53 mmol) instead of **5c**.

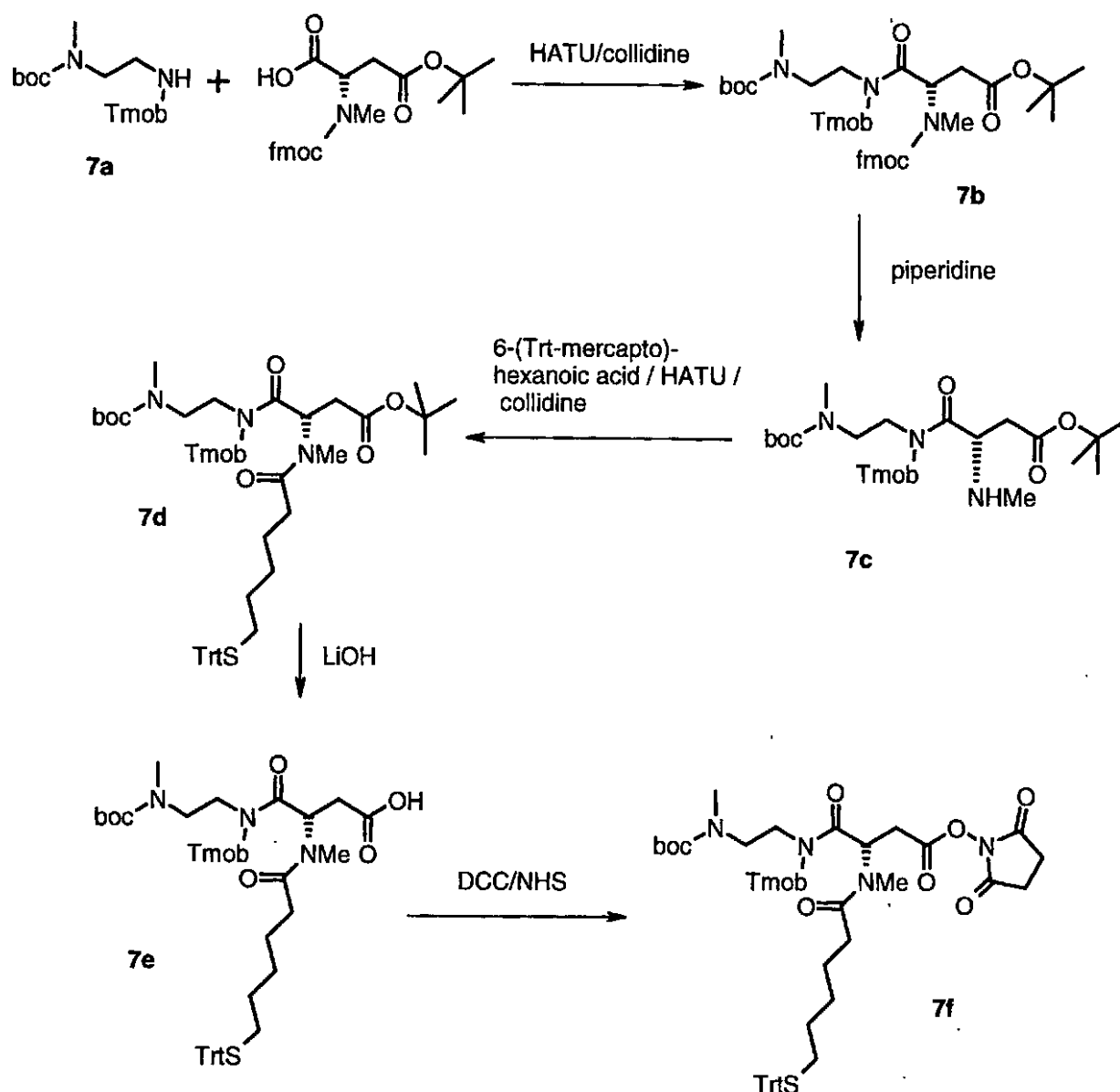
Yield: 285 mg, (0.330 mmol).

MS: m/z 712.37 = $[M+H]^+$, (calculated = 712.37).

Example 7

Synthesis of linker reagent **7f**

Linker reagent **7f** was synthesized according to the following scheme:



To a cooled (0 °C) solution of *N*-Methyl-*N*-boc-ethylendiamine (0.5 mL, 2.79 mmol) and NaCNBH₃ (140 mg, 2.23 mmol) in MeOH (10 mL) and acetic acid (0.5 mL) was added a solution of 2,4,6-trimethoxybenzaldehyde (0.547 mg, 2.79 mmol) in EtOH (10 mL). The mixture was stirred at RT for 2 h, acidified with 2 M HCl (1 mL) and neutralized with saturated aqueous Na₂CO₃ (50 mL). Evaporation of all volatiles, DCM extraction of the resulting aqueous slurry and concentration of the organic fractions yielded *N*-Methyl-*N*-boc-*N'*-tmob-ethylendiamine (**7a**) as a crude oil which was purified by RP-HPLC.

Yield: 593 mg (1.52 mmol)

MS: m/z 377.35 = [M+Na]⁺, (calculated = 377.14).

N-Fmoc-*N*-Me-Asp(OtBu)-OH (225 mg, 0.529 mmol) was dissolved in DMF (3 mL) and **7a** (300 mg, 0.847 mmol), HATU (201 mg, 0.529 mmol), and collidine (0.48 mL, 3.70 mmol) were added. The

mixture was stirred at RT for 2 h to yield **7b**. For fmoc deprotection, piperidine (0.22 mL, 2.16 mmol) was added and stirring was continued for 1 h. Acetic acid (1 mL) was added, and **7c** was purified by RP-HPLC.

Yield: 285 mg (0.436 mmol as TFA salt)

MS: m/z 562.54 = $[M+Na]^+$, (calculated = 562.67).

6-Tritylmercaptohexanoic acid (0.847 g, 2.17 mmol) was dissolved in anhydrous DMF (7 mL). HATU (0.825 g, 2.17 mmol), and collidine (0.8 mL, 6.1 mmol) and **7c** (0.78 g, 1.44 mmol) were added. The reaction mixture was stirred for 60 min at RT, acidified with AcOH (1 mL) and purified by RP-HPLC. Product fractions were neutralized with saturated aqueous $NaHCO_3$ and concentrated. The remaining aqueous phase was extracted with DCM and **7d** was isolated upon evaporation of the solvent.

Yield: 1.4 g (94%)

MS: m/z 934.7 = $[M+Na]^+$, (calculated = 934.5).

To a solution of **7d** (1.40 mg, 1.53 mmol) in MeOH (12 mL) and H_2O (2 mL) was added LiOH (250 mg, 10.4 mmol) and the reaction mixture was stirred for 14 h at 70 °C. The mixture was acidified with AcOH (0.8 mL) and **7e** was purified by RP-HPLC. Product fractions were neutralized with saturated aqueous $NaHCO_3$ and concentrated. The aqueous phase was extracted with DCM and **7e** was isolated upon evaporation of the solvent.

Yield: 780 mg (60 %)

MS: m/z 878.8 = $[M+Na]^+$, (calculated = 878.40).

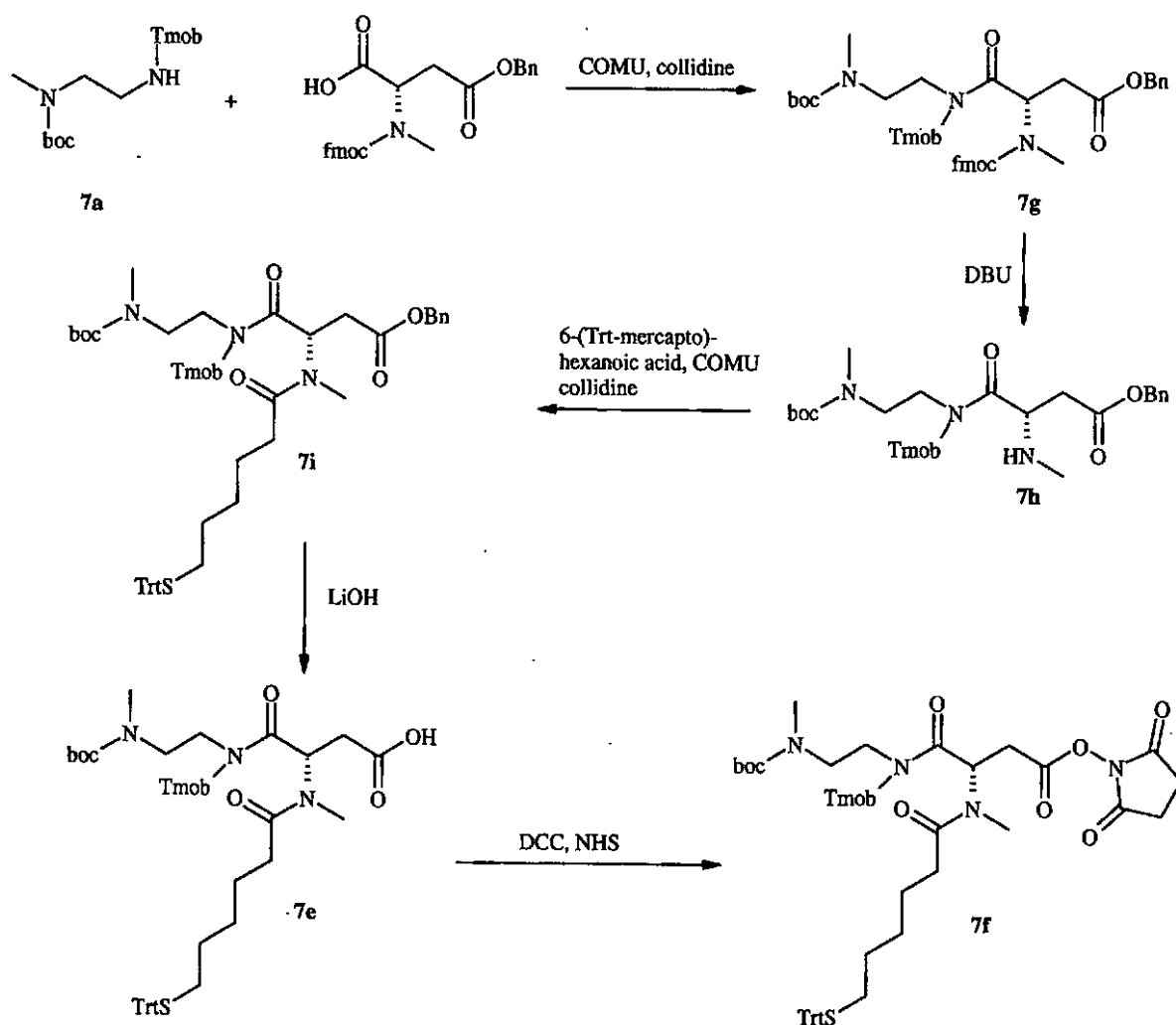
To a solution of **7e** (170 mg, 0.198 mmol) in anhydrous DCM (4 mL) were added DCC (123 mg, 0.59 mmol) and *N*-hydroxy-succinimide (114 mg, 0.99 mmol), and the reaction mixture was stirred at RT for 1 h. The mixture was filtered, and the filtrate was acidified with 0.5 mL AcOH and **7f** purified by RP-HPLC. Product fractions were neutralized with saturated aqueous $NaHCO_3$ and concentrated. The remaining aqueous phase was extracted with DCM and **7f** was isolated upon evaporation of the solvent.

Yield: 154 mg (0.161 mmol)

MS: m/z 953.4 = $[M+H]^+$, (calculated = 953.43).

Alternatively, linker reagent **7f** was synthesized according to the following procedure:

Alternative reaction scheme:



To a solution of *N*-Methyl-*N*-*boc*-ethylenediamine (2 g, 11.48 mmol) and NaCNBH_3 (819 mg, 12.63 mmol) in MeOH (20 mL) was added 2,4,6-trimethoxybenzaldehyde (2.08 mg, 10.61 mmol) portion wise. The mixture was stirred at RT for 90 min, acidified with 3 M HCl (4 mL) and stirred further 15 min. The reaction mixture was added to saturated NaHCO_3 solution (200 mL) and extracted 5 x with CH_2Cl_2 . The combined organic phases were dried over Na_2SO_4 and the solvents were evaporated in vacuo. The resulting *N*-Methyl-*N*-*boc*-*N'*-tmob-ethylenediamine (7a) was completely dried in high vacuum and used in the next reaction step without further purification.

Yield: 3.76 g (11.48 mmol, 89 % purity, 7a : double Tmob protected product = 8 :1)

MS: m/z 355.22 = $[\text{M}+\text{H}]^+$, (calculated = 354.21).

To a solution of 7a (2 g, 5.65 mmol) in CH_2Cl_2 (24 mL) COMU (4.84 g, 11.3 mmol), *N*-Fmoc-*N*-Me-Asp(OBn)-OH (2.08 g, 4.52 mmol) and collidine (2.65 mL, 20.34 mmol) were added. The reaction mixture was stirred for 3 h at RT, diluted with CH_2Cl_2 (250 mL) and washed 3 x with 0.1 M H_2SO_4 (100 mL) and 3 x with brine (100 mL). The aqueous phases were re extracted with CH_2Cl_2 (100 mL). The

combined organic phases were dried over Na_2SO_4 , filtrated and the residue concentrated to a volume of 24 mL. **7g** was purified using flash chromatography.

Yield: 5.31 g (148 %, 6.66 mmol)

MS: m/z 796.38 = $[\text{M}+\text{H}]^+$, (calculated = 795.37).

To a solution of **7g** [5.31 g, max. 4.51 mmol ref. to *N*-Fmoc-*N*-Me-Asp(OBn)-OH] in THF (60 mL) DBU (1.8 mL, 3 % v/v) was added. The solution was stirred for 12 min at RT, diluted with CH_2Cl_2 (400 mL) and washed 3 x with 0.1 M H_2SO_4 (150 mL) and 3 x with brine (150 mL). The aqueous phases were re extracted with CH_2Cl_2 (100 mL). The combined organic phases were dried over Na_2SO_4 and filtrated. **7h** was isolated upon evaporation of the solvent and used in the next reaction without further purification.

MS: m/z 574.31 = $[\text{M}+\text{H}]^+$, (calculated = 573.30).

7h (5.31 g, 4.51 mmol, crude) was dissolved in acetonitrile (26 mL) and COMU (3.87 g, 9.04 mmol), 6-Tritylmercaptohexanoic acid (2.12 g, 5.42 mmol) and collidine (2.35 mL, 18.08 mmol) were added. The reaction mixture was stirred for 4 h at RT, diluted with CH_2Cl_2 (400 mL) and washed 3 x with 0.1 M H_2SO_4 (100 mL) and 3 x with brine (100 mL). The aqueous phases were re extracted with CH_2Cl_2 (100 mL). The combined organic phases were dried over Na_2SO_4 , filtrated and **7i** was isolated upon evaporation of the solvent. Product **7i** was purified using flash chromatography.

Yield: 2.63 g (62 %, 94 % purity)

MS: m/z 856.41 = $[\text{M}+\text{H}]^+$, (calculated = 855.41).

To a solution of **7i** (2.63 g, 2.78 mmol) in *i*-PrOH (33 mL) and H_2O (11 mL) was added LiOH (267 mg, 11.12 mmol) and the reaction mixture was stirred for 70 min at RT. The mixture was diluted with CH_2Cl_2 (200 mL) and washed 3 x with 0.1 M H_2SO_4 (50 mL) and 3 x with brine (50 mL). The aqueous phases were re-extracted with CH_2Cl_2 (100 mL). The combined organic phases were dried over Na_2SO_4 , filtrated and **7e** was isolated upon evaporation of the solvent. **7j** was purified using flash chromatography.

Yield: 2.1 g (88 %)

MS: m/z 878.4 = $[\text{M}+\text{Na}]^+$, (calculated = 878.40).

To a solution of **7e** (170 mg, 0.198 mmol) in anhydrous DCM (4 mL) were added DCC (123 mg, 0.59 mmol), and a catalytic amount of DMAP. After 5 min *N*-hydroxy-succinimide (114 mg, 0.99 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at RT for 1 h. The reaction mixture was filtered, the solvent was removed *in vacuo* and the residue was taken up in 90 % acetonitrile plus 0.1 % TFA (3.4

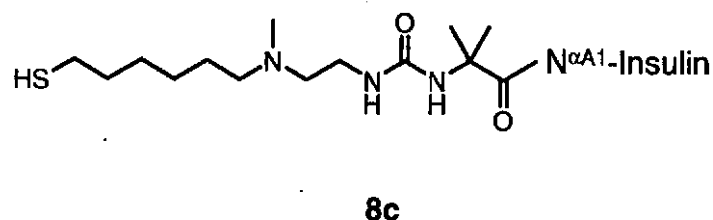
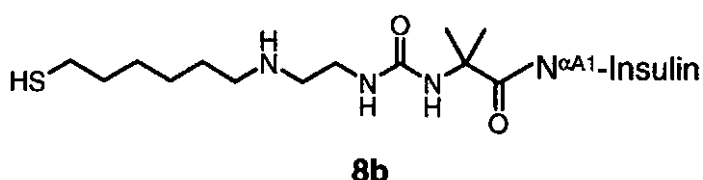
ml). The crude mixture was purified by RP-HPLC. Product fractions were neutralized with 0.5 M pH 7.4 phosphate buffer and concentrated. The remaining aqueous phase was extracted with DCM and **7f** was isolated upon evaporation of the solvent.

Yield: 154 mg (81%)

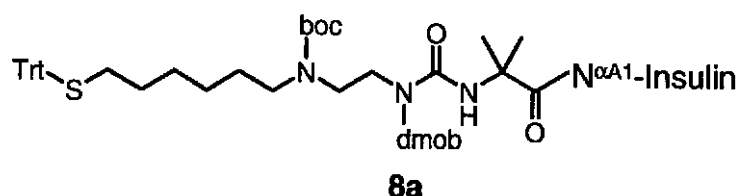
MS: m/z 953.4 = $[M+H]^+$, (calculated = 953.43).

Example 8

Synthesis of $N^{\alpha A1}$ -insulin-linker conjugates **8b** and **8c**



Synthesis of protected insulin linker conjugate **8a**



Linker reagent **5d** was dissolved in DCM (20 mg/mL) and activated with N-cyclohexyl-carbodiimide-N'-methyl polystyrene-resin (1.9 mmol/g, 10 eq.) for 1h. The solution of the activated linker reagent was added to a solution of insulin (1.2 eq.) and DIEA (3.5 eq.) in DMSO (100 mg insulin/mL), and the mixture was shaken at RT for 45 min. The solution was acidified with acetic acid, the DCM was evaporated under reduced pressure, and $N^{\alpha A1}$ -conjugated protected insulin-linker conjugate **8a** was purified by RP-HPLC.

Lyophilized **8a** was treated with a mixture of 90/10/2/2 (v/v/v/v) HFIP/TFA/water/triethylsilane (2 mL/100 mg of **8a**) for 45 min at RT. The reaction mixture was diluted with water, and all volatiles were removed under a stream of nitrogen. $N^{\alpha A1}$ -conjugated insulin-linker conjugate **8b** was purified by RP-HPLC.

8b:

Yield: 139 mg (0.023 mmol) from 62 mg (0.078 mmol) linker 5d

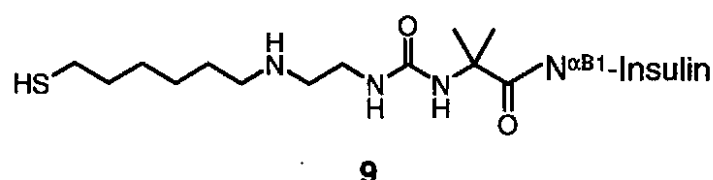
MS: m/z 1524.45 = $[M+4H]^{4+}$ (calculated = 1524.75).

$N^{\alpha A1}$ -conjugated insulin-linker conjugate 8c was synthesized as described for 8b except for the use of 6c (72 mg, 0.101 mmol) instead of 5d.

8c:

Yield: 237 mg (0.039 mmol)

MS: m/z 1528.23 = $[M+4H]^{4+}$ (calculated = 1528.28).

Example 9**Synthesis of $N^{\alpha B1}$ -insulin-linker conjugate 9**

Double-protected N^{α} -boc-Gly^{A1}- N^{ϵ} -boc-Lys^{B29}-insulin was prepared as described previously (J. Markussen, J. Halstrøm, F. C. Wiberg, L. Schäffer, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 18814-18818).

Linker reagent 5d (0.04 mmol) was dissolved in DCM (0.5 mL) and activated with N-cyclohexylcarbodiimide- N' -methyl polystyrene resin (0.205 mmol) at RT for 2h. The resulting solution of the activated linker reagent was added to a solution of bis-boc-protected insulin (24 mg, 0.004mmol) and DIEA (5 μ L, 0.0229 mmol) and shaken at RT for 1 h. The reaction mixture was acidified with 100 μ L of acetic acid and protected insulin-linker conjugate was purified by RP-HPLC.

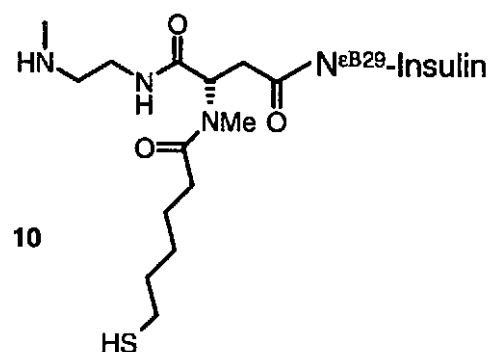
Yield: 5 mg (0.00075 mmol).

MS: m/z 1660.27 = $[M+4H]^{4+}$ (calculated = 1660.43).

Lyophilized protected insulin-linker conjugate was treated with 1 mL 90/10/2/2 (v/v/v/v) HFIP/TFA/water/TES at RT for 45 min. The reaction mixture was diluted with 0.5 mL of water and all volatiles were removed under a stream of nitrogen. $N^{\alpha B1}$ -conjugated insulin-linker conjugate 9 was purified by RP-HPLC.

Yield: 4 mg (0.0007 mmol)

MS: m/z 1524.46 = $[M+4H]^{4+}$ (calculated = 1524.75).

Example 10**Synthesis of N^{εB29}-insulin linker conjugate 10**

Insulin (644 mg, 0.111 mmol) was dissolved in 6.5 mL of DMSO. 3 mL of cooled (4 °C) 0.5 M sodium borate buffer (pH 8.5) and **7f** (70 mg, 0.073 mmol) in 2.5 mL of DMSO were added and mixture was stirred for 5 min at RT. 400 μ L AcOH were added and protected insulin conjugate was purified by RP HPLC.

Yield: 172 mg (0.025 mmol).

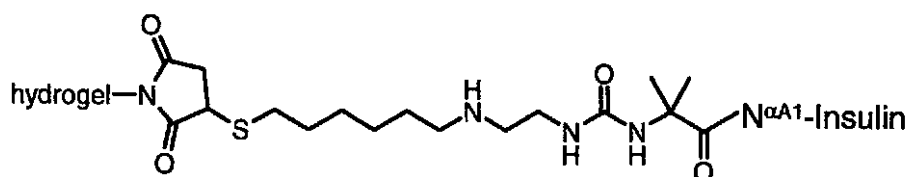
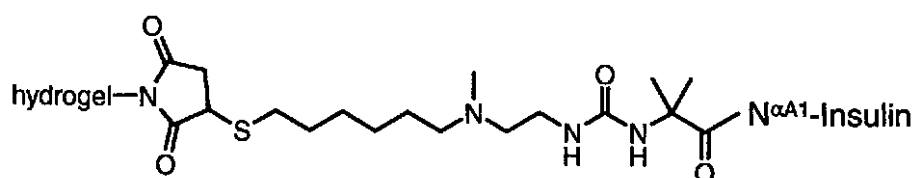
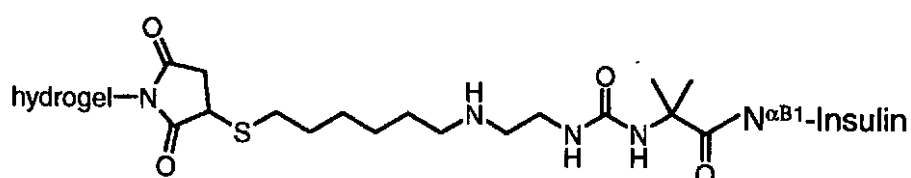
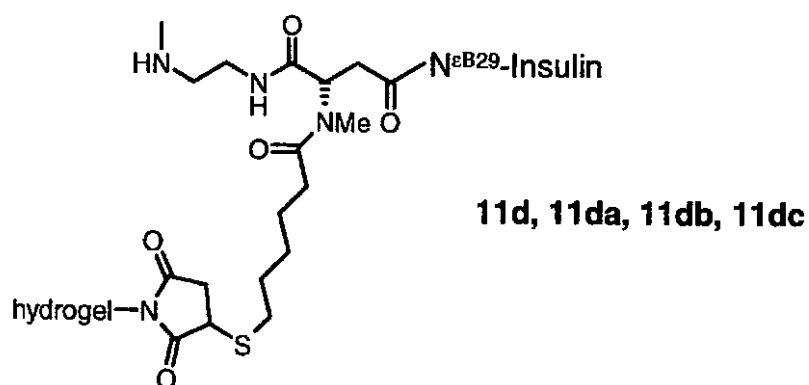
MS: m/z 1662.27 = $[M+4H]^{4+}$ (calculated = 1662.48).

Removal of protecting groups was affected by treatment of lyophilized product fractions with 6 mL of 90/10/2/2 (v/v/v/v) HFIP/TFA/TES/water for 1h at RT. N^{εB29}-conjugated insulin-linker conjugate **10** was purified by RP HPLC.

Yield: 143 mg (0.023 mmol).

MS: m/z 1531.46 = $[M+4H]^{4+}$ (calculated = 1531.71).

Example 11**Preparation of insulin-linker-hydrogel 11a, 11b, 11c, 11d, 11da, 11db, and 11dc**

**11a****11b****11c****11d, 11da, 11db, 11dc**

Dry maleimide functionalized hydrogel **4** (82 mg, 10.3 μmol maleimido groups) was filled into a syringe equipped with a filter frit. A solution of insulin-linker-thiol **8b** (27.8 mg, 4.6 μmol) in 1.0 mL acetonitrile/water/TFA 1/1/0.001 (v/v/v) was added and the suspension was incubated for 5 min at RT. Acetate buffer (0.4 mL, pH 4.8, 1.0 M) was added and the sample was incubated at RT for 1 h. Consumption of thiol was monitored by Ellman test. Hydrogel was washed 10 times with 1/0.43/0.001 (v/v/v) acetonitrile/water/TFA and 2 times with 1/1/0.2/0.25 (v/v/v/v) 1.0 M sarcosine pH 7.4/acetonitrile/0.5 M phosphate buffer pH 7.4/water. Finally, the hydrogel was suspended in the sarcosine solution and incubated for 2 h at RT.

Insulin-linker-hydrogel **11a** was washed 10 times with acetonitrile/water/TFA 1/1/0.001 (v/v/v) and stored at 4°C.

Insulin content was determined by total hydrolysis of an aliquot of insulin-linker-hydrogel under reductive conditions at pH 12 and subsequent insulin A-chain and insulin B-chain quantification by RP-HPLC.

Insulin loading of **11a**: 175 mg insulin/g insulin-linker-hydrogel

Insulin amount in a **11a** suspension in 10 mM sodium acetate buffer pH 5, 135 mM sodium chloride: 12 mg insulin per 1 ml **11a** suspension.

11b, **11c**, and **11d** were prepared as described above except for the use of **8c**, **9**, and **10**, respectively, instead of **8b**.

11da was prepared as described above except for the use of **10** and **4a** instead of **8b** and **4**.

11db was prepared as follows: A suspension of maleimide functionalized hydrogel **4a** in pH 2.5 HCl, 0.01 % Tween-20 (5.0 mL, 119 µmol maleimido groups) was filled into a syringe equipped with a filter. A solution of insulin-linker-thiol **10** (166 mg, 24.4 µmol) in 8.0 mL HCl pH 2.5, 0.01 % Tween-20 was added and the suspension was incubated for 5 min at RT. Sodium succinate buffer (3.9 mL, pH 4.0, 150 mM; 1 mM EDTA, 0.01 % Tween-20) was added to yield pH 3.6 and the sample was incubated at RT for 90 min. Consumption of thiol was monitored by Ellman test. Hydrogel was washed 10 times with sodium succinate buffer (pH 3.0, 50 mM; 1 mM EDTA, 0.01 % Tween-20) and 3 times with sodium succinate buffer (pH 3.0, 50 mM; 1 mM EDTA, 0.01 % Tween-20) containing 200 mM acetyl cysteine. Finally, the hydrogel was suspended in the acetyl cysteine containing buffer and incubated for 1 h at RT.

Insulin-linker-hydrogel **11db** was washed 10 times with succinate buffer (pH 3.0, 50 mM; 1 mM EDTA, 0.01 % Tween-20) and 8 times with sodium acetate buffer (pH 5.0, 10 mM; 130 mM NaCl, 0.01 % Tween-20).

Insulin loading of **11db**: 6.12 mg insulin per mL insulin-linker-hydrogel suspension

11dc was prepared as follows: A suspension of maleimide functionalized hydrogel **4a** in pH 2.5 HCl, 0.01 % Tween-20 (58.3 mL, 958 µmol maleimido groups) was added to a solid phase synthesis reactor. A solution of insulin-linker-thiol **10** (117 mL, 460 µmol) in 2.5 HCl, 0.01 % Tween-20 was

added to **4a**. The suspension was incubated at RT for 5 min. Succinate buffer (4.8 mL, pH 4.0, 150 mM; 1 mM EDTA, 0.01 % Tween-20) was added to yield a pH of 3.6 and the suspension was incubated at RT for 90 min.

Consumption of thiol was monitored by Ellman test. Hydrogel was washed 10 times with succinate buffer (pH 3.0, 50 mM; 1 mM EDTA, 0.01 % Tween-20) and 2 times with succinate buffer (pH 3.0, 50 mM; 1 mM EDTA, 0.01 % Tween-20) containing 10 mM mercaptoethanol. Finally, the hydrogel was suspended in the mercaptoethanol containing buffer and incubated for 3 h at RT.

Insulin-linker-hydrogel **11dc** was washed 10 times with succinate buffer (pH 3.0, 50 mM; 1 mM EDTA, 0.01 % Tween-20) and 6 times with succinate/Tris buffer (pH 5.0, 10 mM; 85 g/L trehalose, 0.01 % Tween-20).

Insulin loading of **11dc**: 18.7 mg insulin per mL insulin-linker-hydrogel suspension

Alternatively, maleimide derivatized hydrogel microparticles **4aa** can be used instead of **4a**.

Example 12

Release kinetics in vitro

Insulin-linker-hydrogel **11a**, **11b**, **11c** and **11d**, respectively, (insulin-linker-hydrogel containing ca. 1 mg insulin) were suspended in 2 ml 60 mM sodium phosphate, 3 mM EDTA, 0.01% Tween-20, pH 7.4, and incubated at 37 °C. Suspensions were centrifuged at time intervals and supernatant was analyzed by RP-HPLC at 215 nm and ESI-MS. UV-signals correlating to liberated insulin were integrated and plotted against incubation time.

Curve-fitting software was applied to estimate the corresponding halftime of release.

In vitro half-lives of 16 d, 10 d, 30 d, and 14 d were determined for **11a**, **11b**, **11c** and **11d**, respectively.

Alternatively, insulin-linker-hydrogel **11db** was transferred to syringes equipped with filters, suspended in 6 ml 60 mM sodium phosphate, 3 mM EDTA, 0.01% Tween-20, pH 7.4, and incubated at 37 °C. At defined time points the supernatant was exchanged and liberated insulin was quantified by RP-HPLC at 215 nm. The amount of released insulin was plotted against incubation time. Curve-fitting software was applied and an in vitro halftime of 15 d was determined for **11db**.

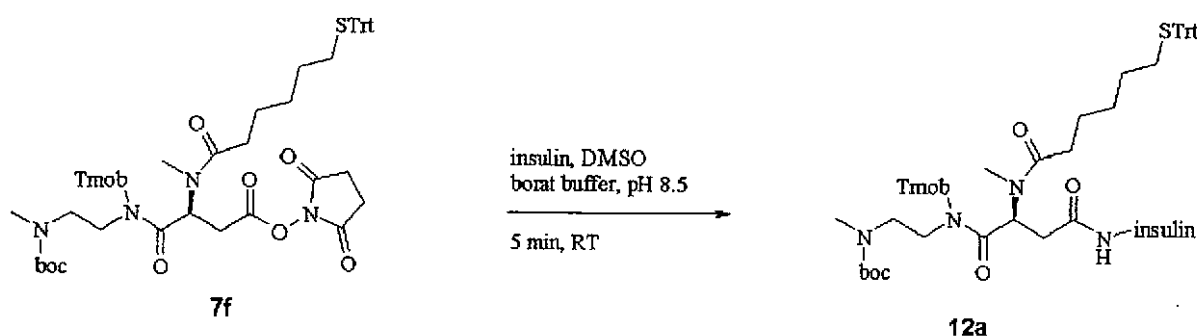
Alternatively, insulin-linker-hydrogel **11db** was filled in a chromatography column and placed in a temperature controlled incubator (37°C). Sodium phosphate (pH 7.4, 60 mM; 3 mM EDTA, 0.01 % Tween-20) was pumped through the column with a constant flow of 0.25 mL/h (nominal) and collected outside the incubator. At defined time points the solution was analyzed by RP-HPLC at

215 nm. The amount of released insulin was plotted against incubation time. Curve-fitting software was applied and an in vitro halftime of 13 d was determined for **11db**.

Example 13

Synthesis of a LysB29-linker conjugate of insulin (12a) and a LysB28-linker conjugate of insulin lispro (12b):

Synthesis of LysB29-linker conjugate of insulin (12a)



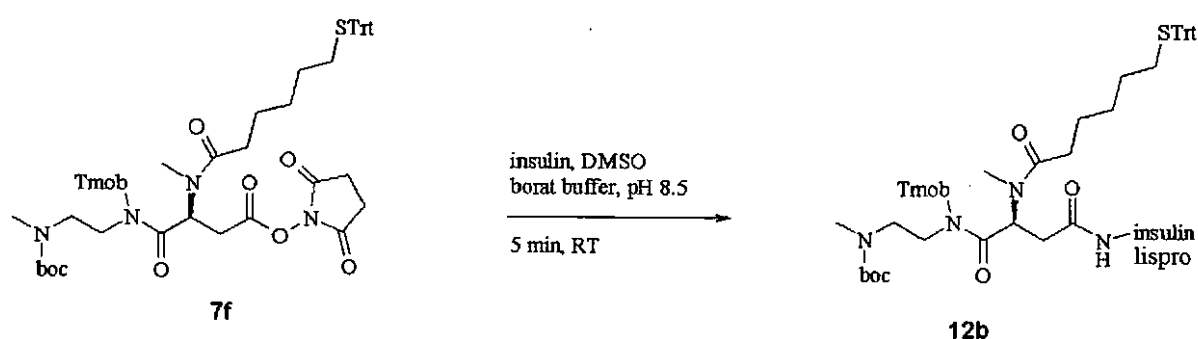
1.2 g (0.206 mmol, 0.85 eq) of insulin were dissolved in DMSO at RT. After 30 min the solution was cooled to 0 °C while borate buffer (0.5 M, pH 8.5, 21.6 ml) was added over a period of 4.40 min. The temperature of the solution was kept between 25 and 28 °C. A solution of 228 mg (0.239 mmol, 1 eq) **7f** was dissolved in 40 ml DMSO was added time-invariant over a period of 3 min. The ice bath was removed and the reaction mixture was stirred for 5 min at RT. The reaction was quenched by addition of 70 ml of MeCN/H₂O (1:1, 0.1 % TFA) and 400 µl AcOH. **12a** was purified by RP HPLC (solvent A: H₂O with 0.1 % TFA, solvent B: MeCN with 0.1 % TFA, gradient: 30-80 % B over 14 min, flow: 40 ml/min).

Regio-selectivity according to UPLC analysis (before RP HPLC purification): 0.70 % **7f** attached to GlyA1 of insulin and 76.2 % **7f** attached to LysB29 of insulin (see Fig. 1a).

Yield: 862 mg (TFA-salt, 60 %).

MS [M+H]⁺_{1/4} = 1662.25 g/mol ((MW+H)_{1/4} calculated = 1662.35 g/mol).

Synthesis of LysB28-linker conjugate of insulin lispro (12b)



0.347 g (0.059 mmol, 0.85 eq) of insulin lispro were dissolved in 6 ml DMSO at RT. After 30 min the solution was cooled to 0 °C while borate buffer (0.5 M, pH 8.5, 5.64 ml) was added over a period of 1.40 min. The temperature of the solution was kept between 25 and 30 °C. A solution of 67 mg (0.070 mmol, 1 eq) **7f** dissolved in 8 ml DMSO was added time-invariant over a period of 2 min. The ice bath was removed and the reaction mixture was stirred for 5 min at RT. The reaction was quenched by addition of 20 ml of MeCN/H₂O (1:1, 0.1 % TFA) and 1 ml AcOH. **12b** was purified by RP HPLC (solvent A: H₂O with 0.1 % TFA, solvent B: MeCN with 0.1 % TFA, gradient: 30-80 % B over 14 min, flow: 40 ml/min).

Regio-selectivity according to UPLC analysis (before RP HPLC purification): 1.3 % of the product was **7f** attached to GlyA1 of insulin lispro, 76.7 % of the product was **7f** attached to LysB28 of insulin lispro (see Fig. 1b).

Yield: 305 mg (TFA-salt, 72 %).

MS $[M+H]_{1/4}^+ = 1662.25 \text{ g/mol}$ ($(MW+H)_{1/4}$ calculated = 1662.35 g/mol).

Example 14

Pharmacokinetics study in rat

The pharmacokinetics of **11a** were determined by measuring the plasma insulin concentration after subcutaneous application of a single dose into rats.

One group consisting of 10 male Wistar rats (200-250 g) was used to study the plasma insulin levels over a period of 14 days. Each of the animals received a single subcutaneous injection of 500 µL **11a** suspension in acetate buffer pH 5, containing 6 mg insulin (12 mg insulin/ml). Per animal and time point 200 µL of blood was withdrawn sublingually to obtain 100 µL Li-Heparin plasma. Samples were collected before application and after 4h, 1, 2, 3, 4, 7, 9, 11 and 14 days post injection. Plasma samples were frozen within 15 min after blood withdrawal and stored at -80°C until assayed.

Plasma insulin concentrations were measured using an ultrasensitive Insulin ELISA kit (Mercodia) by following the manufacturer's protocol. Plasma samples were diluted in ELISA buffer (1:5 and 1:10 with calibrator 0) prior to measurement. Insulin concentrations were calculated from a calibration curve which was generated by measuring insulin standards in duplicate and fitting the values using

linear regression. The insulin concentration was defined as the mean from two independent dilution series corrected by the respective dilution factor and plotted against time. Averaged plasma insulin concentrations for each time point were obtained by calculating the mean of all animals used as shown in Figure 2.

A bursless and sustained release of insulin over 14 days was observed.

Example 15:

Pharmacokinetics study in rat

The pharmacokinetics of **11da** were determined by measuring plasma insulin concentrations over a period of 13 days in healthy rats.

8 Wistar rats (appr. 250g body weight) received a single subcutaneous injection of 500 μ L of test item **11da** in acetate buffer pH 5, containing 3 mg insulin (approx. 12 mg/kg). Per animal and time point 200 μ L of blood was withdrawn from the tail vein to obtain about 100 μ L Li-Heparin plasma. Samples were collected 1 day before and 4h, 1d, 2d, 3d, 6d, 7d, 8d, 10d and 13d after test item administration. Plasma samples were frozen and stored at -80°C until assayed. The insulin content of the plasma samples was measured using a human insulin ultrasensitive ELISA Kit (DRG Instruments GmbH, Germany) following the manufacturer's instructions. Blanks (calibrator 0) were included in the calibration curve and were subtracted from the sample values and the calibration curve was fitted using a 3rd order polynomic equation. Before analysis plasma samples were vortexed and diluted in reaction tubes (1:5 and 1:10 with calibrator 0). For analysis OD at 450 nm was measured with a microtiter plate reader (Tecan Ultra) without reference wavelength correction. Results of plasma insulin content up to day 13 for all animals being investigated are shown in Figure 3.

After a single subcutaneous injection of 500 μ L **11d** that contained 3 mg insulin the average plasma insulin level rose to a maximum of about 500 pM on day 1. As expected the plasma insulin concentration subsequently decreased continuously within 2 weeks. The peak to trough ratio of plasma insulin levels within the first week of the study was approximately 1.7

Example 16:

Pharmacokinetics and pharmacodynamics study in rats

The amount and the bioactivity of the released insulin was investigated by analyzing the plasma insulin concentration and the blood glucose lowering effect in an exploratory pharmacokinetic/pharmacodynamic study using diabetic Sprague-Dawley (SD) rats.

For this purpose diabetes was induced in 8 rats with streptozotocin (STZ) and all animals with blood glucose levels above 350 mg/dL on day 0 were included in this study. 7 out of 8 SD rats became

diabetic and received a single subcutaneous injection of 500 μ L test item **11da** in acetate buffer pH 5, containing 6.4 mg insulin. Per animal and time point 200 μ L of blood was withdrawn from the tail vein to obtain about 100 μ L Li-Heparin plasma. Samples were collected 4 days before and 2h, 1d, 2d, 3d, 6d, 7d, 8d, 10d and 13d after test item administration. Plasma samples were frozen and stored at -80°C until assayed. Blood glucose was measured with an AccuChek Comfort device from the tail vein 3 times before injection and 2h, 1d, 2d, 3d, 6d, 7d, 8d, 10d, 13d, 15d, 17d, 20d, 22d and 24d after test item administration. The insulin content of the plasma samples was measured using a human insulin ELISA Kit (DRG Instruments GmbH, Germany) following the manufacturer's instructions. Blanks (calibrator 0) were included in the calibration curve and were subtracted from the sample values and the calibration curve was fitted using a 3rd order polynomic equation. Before analysis plasma samples were vortexed and diluted in reaction tubes (1:5 and 1:10 with calibrator 0). For analysis OD at 450 nm was measured with a microtiter plate reader (Tecan Ultra) without reference wavelength correction. The plasma insulin level was monitored over 2 weeks and blood glucose level over a 3 week period as shown in Figure 4.

After a single subcutaneous injection of insulin hydrogel **11da** the blood glucose level was effectively lowered over a period of 10 days with values below 100 mg/dL without any symptoms for hypoglycemia. Due to the higher dosage of 6.4 mg insulin per animal, the maximal plasma insulin concentration was approx. 800 pM on day 1 and decreased continuously within 2 weeks to approx. 300 pM. Simultaneously the blood glucose values began to rise after 10 days and reached predose levels after 3 weeks.

Example 17:

Pharmacokinetics study over 24 hours (burst study) in rats

In order to prove that insulin is released from insulin-linker-hydrogel without a burst the plasma insulin concentration was monitored over a period of 24 hours in healthy rats.

8 Sprague-Dawley rats (200-250g body weight) were divided into 2 groups and received a single subcutaneous injection of 2 mL of test item **11db** in acetate buffer pH 5 per kg body weight. The test item had a concentration of 4 mg/mL insulin so that each animal received 8 mg insulin per kg body weight. Per animal and time point 200 μ L of blood was withdrawn from the tail vein to obtain about 100 μ L Li-Heparin plasma. Group A samples were collected predose and 5min, 30min, 2h, 4h and 8h after application of test item and for group B predose and 15min, 1h, 3h, 6h and 24h after test item administration. Plasma samples were frozen and stored at -80°C until assayed. The insulin content of the plasma samples was measured using a human insulin ultrasensitive ELISA Kit (DRG Instruments GmbH, Germany) following the manufacturer's instructions. Blanks (calibrator 0) were included in the calibration curve and were subtracted from the sample values and the calibration curve was

fitted using a 3rd order polynomic equation. Before analysis plasma samples were vortexed and diluted in reaction tubes (1:5 and 1:10 with calibrator 0). For analysis OD at 450 nm was measured with a microtiter plate reader (Tecan Ultra) without reference wavelength correction. The result is shown in Figure 5 and clearly indicates that insulin is released without any burst.

Example 18:**Pharmacokinetics and pharmacodynamics multiple dose study in rats**

The pharmacokinetics and pharmacodynamics after 3 weekly doses of **11da** were determined by measuring plasma insulin concentrations and blood glucose levels over a period of 4 weeks in diabetic rats.

8 Sprague-Dawley rats were used with a mean body weight of 239g. Diabetes was induced with streptozotocin (STZ) and all animals with blood glucose levels above 350 mg/dL on day 0 (test item injection day) were included in the study. 8 of 8 animals which received STZ treatment became diabetic and received 3 weekly subcutaneous injections on day 0, 7 and 14 of 2mL test item **11da** in acetate buffer pH 5 per kg body weight. With a test item insulin concentration of 4 mg/mL the applied dose was 8 mg insulin per kg body weight. Per animal and time point 200µL of blood was withdrawn from the tail vein to obtain about 100µL Li-Heparin plasma. Samples were collected 3 days before and up to 28 days after test item administration. Plasma samples were frozen and stored at -80°C until assayed. Blood glucose was measured with an AccuChek Comfort device from the tail vein 3 times before injection and up to 30 days post injection. The insulin content of the plasma samples was measured using a human insulin ELISA Kit (DRG Instruments GmbH, Germany) following the manufacturer's instructions. Blanks (calibrator 0) were included in the calibration curve and were subtracted from the sample values and the calibration curve was fitted using a 3rd order polynomic equation. Before analysis plasma samples were vortexed and diluted in reaction tubes (1:5 and 1:10 with calibrator 0). For analysis OD at 450 nm was measured with a microtiter plate reader (Tecan Ultra) without reference wavelength correction. The plasma insulin level and the blood glucose level were monitored over a 4 week period and are both shown in Figure 6.

The shape of the curves indicate that the released insulin was bioactive by steadily lowering the blood glucose level to values about 100mg/dL post 3rd injection which remained low for about a week. At the same time the maximal insulin concentration increased steadily starting from 200 pM after the first and 300 pM after the second dose to 400 pM following the third dose and subsequently decreased again within 2 weeks to values below 100 pM.

Example 19:**Pharmacokinetics study in rat**

The pharmacokinetics of **11dc** were determined by measuring plasma insulin concentrations over a period of 13 days in healthy rats.

8 Wistar rats (appr. 230g body weight) received a single subcutaneous injection of 2 ml/kg of test item **11dc** in succinate buffer pH 5 (10 mM succinate/tris, 85 g/l trehalose, 0.01% Tween-20, pH 5.0), containing 3 mg insulin (12 mg/kg dose). Per animal and time point 200µL of blood was withdrawn from the tail vein to obtain about 100µL Li-Heparin plasma. Samples were collected 4 days before and 0.3h (4 animals), 1h (4 animals), 2h (4 animals), 4h (4 animals), 1d, 2d, 3d, 6d, 8d, 10d and 13d after test item administration. Plasma samples were frozen and stored at -80°C until assayed. The insulin content of the plasma samples was measured using a human insulin ultrasensitive ELISA Kit (DRG Instruments GmbH, Germany) following the manufacturer's instructions. Blanks (calibrator 0) were included in the calibration curve and were subtracted from the sample values and the calibration curve was fitted using a 3rd order polynomic equation. Before analysis plasma samples were vortexed and diluted in reaction tubes (1:5 and 1:10 with calibrator 0). For analysis OD at 450 nm was measured with a microtiter plate reader (Tecan Ultra) without reference wavelength correction. Results of plasma insulin content up to day 13 for all animals being investigated are shown in Figure 7.

After a single subcutaneous injection of 12 mg/kg **11dc** the average plasma insulin level rose to a maximum of about 500 pM on day 1. As expected the plasma insulin concentration subsequently decreased continuously within 2 weeks. The peak to trough ratio of plasma insulin within the first week was approximately 1.4.

Example 20**Real-time insulin release and hydrogel degradation at pH 7.4**

Insulin-linker hydrogel **11a** (730 µL, containing 3.19 mg insulin) in pH 5.0 acetate buffer (10 mM, 130 mM NaCl, 0.01 % (w/v) tween-20) was filled in a sample preparation tube, washed 3x with pH 7.4 release buffer (60 mM sodium phosphate, 3 mM EDTA, 0.01 % (w/v) Tween-20) and filled-up to 1.00 mL. An Aliquot of the suspension (0.5 mL, 1.59 mg insulin) was filled in a chromatography column and placed in a temperature controlled incubator (37°C). Release buffer (pH 7.4) was pumped through the column with a constant flow of 0.25 mL/h (nominal) and collected outside the incubator. At defined time points the solution was analyzed by RP-HPLC (215 nm). The amount of released insulin was plotted against incubation time and curve-fitting software was applied to estimate the corresponding halftime of release. A halftime of 9.4 d for the insulin release was determined.

After 39 d incubation at 37°C the hydrogel suspension was transferred to a sample preparation tube, residual hydrogel was washed out of the column with pH 7.4 release buffer and the sample was filled-up to 1.00 mL. Two aliquots (300 µL each) were transferred to sterile sample preparation tubes, filled-up to 1.5 mL, and incubated at 37°C. Samples were taken at time intervals and analyzed by size exclusion chromatography. UV-signals corresponding to hydrogel released water-soluble degradation products comprising one or more backbone moieties (corresponding to reactive functional groups) were integrated and plotted against incubation time, see Fig 8.

Example 21

Injectability of insulin-linker-hydrogel prodrug

5 mL insulin-linker-hydrogel prodrug **11dc** (bead size distribution from 32–75 µm, 18 mg insulin/ml) in pH 5.0 succinic acid/tris (10 mM, 40 g/L mannitol; 10 g/L trehalose dihydrate; 0.05% TWEEN-20) was used. The insulin-linker-hydrogel prodrug suspension was filled into a 1 mL syringe (length 57 mm) via a 20 G needle. The 20 G needle was replaced by a 30 G needle and placed into the syringe mounting (Aqua Computer GmbH&Co. KG) and the measurement was started with a piston velocity of 172 mm/min (equals 50 µL/s) (Force test stand: Multitest 1-d, Data recording software: EvaluatEmperor Lite, Version 1.16-015, Forge Gauge: BFG 200 N (all Mecmesin Ltd., UK). Experiments with increasing piston velocities shown in the table below were carried out with a new insulin-linker-hydrogel prodrug sample. The experiments with water and ethylene glycol were carried out accordingly. For all of the experiments the same 30 G needle was used. Force versus flow using a 30 G needle is shown in Fig. 9.

Flow / (sec/mL)	Flow / (µL/sec)	Velocity of piston / (mm/min)	Force / N (water)	Force / N 11dc	Force / N (ethylene glycol)
6	167	573	13	36	83
8	125	430	10	29	62
10	100	344	7	24	51
15	67	229	4	22	35
20	50	172	3	17	27

Abbreviations:

AcOH	acetic acid
AcOEt	ethyl acetate
Aib	2-Aminoisobutyric acid
Bn	benzyl
Boc	t-butyloxycarbonyl
COMU	(1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)dimethylamino-morpholino-carbenium hexafluorophosphate
DBU	1,3-diazabicyclo[5.4.0]undecene
DCC	<i>N,N</i> ,-dicyclohexylcarbodiimid
DCM	dichloromethane
DIEA	diisopropylethylamine
DMAP	dimethylamino-pyridine
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
Dmob	2,4-dimethoxybenzyl
DMSO	dimethylsulfoxide
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
eq	stoichiometric equivalent
ESI-MS	electrospray ionization mass spectrometry
EtOH	ethanol
Fmoc	9-fluorenylmethoxycarbonyl
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium hexafluorophosphate
HFIP	hexafluoroisopropanol
HPLC	high performance liquid chromatography
HOBt	<i>N</i> -hydroxybenzotriazole
iPrOH	2-propanol
LCMS	mass spectrometry-coupled liquid chromatography
Mal	3-maleimido propyl
Mal-PEG6-NHS	<i>N</i> -(3-maleimidopropyl)-21-amino-4,7,10,13,16,19-hexaoxa-heneicosanoic acid NHS ester
Me	methyl
MeCN	acetonitrile

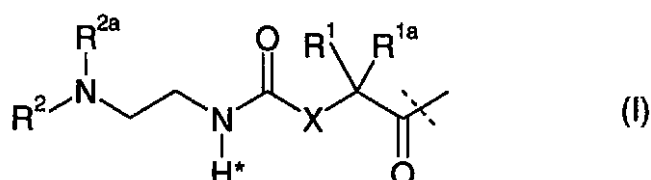
MeOH	methanol
Mmt	4-methoxytrityl
MS	mass spectrum / mass spectrometry
MTBE	methyl <i>tert.</i> -butyl ether
MW	molecular mass
n.d.	not determined
NHS	N-hydroxy succinimide
OD	optical density
OBu	butyloxy
OtBu	<i>tert.</i> -butyloxy
PEG	poly(ethylene glycol)
Phth	phthal-
PyBOP	benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate
RP-HPLC	reversed-phase high performance liquid chromatography
rpm	rounds per minute
RT	room temperature
SEC	size exclusion chromatography
Su	succinimidyl
TCP	2-chlorotrityl chloride resin
TES	triethylsilane
TFA	trifluoroacetic acid
THF	tetrahydrofuran
TMEDA	N,N,N'-tetramethylethylene diamine
Tmob	2,4,6-trimethoxybenzyl
Trt	triphenylmethyl, trityl
UPLC	ultra performance liquid chromatography
UV	ultraviolet
VIS	visual

Claims

1. A prodrug or a pharmaceutically acceptable salt thereof comprising an insulin linker conjugate D-L, wherein

D represents the insulin moiety; and

-L is a non-biologically active linker moiety -L¹ represented by formula (I),



wherein the dashed line indicates the attachment to one of the amino groups of the insulin by forming an amide bond;

X is C(R³R^{3a}); or N(R³);

R^{1a}, R^{3a} are independently selected from the group consisting H, NH(R^{2b}), N(R^{2b})C(O)R⁴ and C₁₋₄ alkyl;

R¹, R², R^{2a}, R^{2b}, R³, R⁴ are independently selected from the group consisting of H and C₁₋₄ alkyl,

wherein L¹ is substituted with one L²-Z and optionally further substituted, provided that the hydrogen marked with the asterisk in formula (I) is not replaced by a substituent and wherein

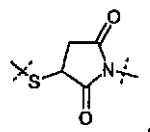
L² is a single chemical bond or a spacer; and

Z is a hydrogel.

2. Prodrug of claim 1, wherein in formula (I) R² is replaced by L²-Z.
3. Prodrug of claim 1, wherein in formula (I) R¹ is replaced by L²-Z.

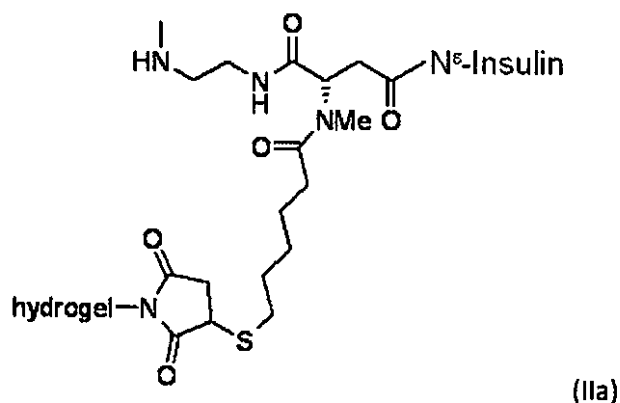
4. Prodrug of any of claims 1 to 3, wherein in formula (I) X is $N(R^3)$.
5. Prodrug of any of claims 1 to 3, wherein in formula (I) X is $C(R^3R^{3a})$ and R^{3a} is $N(R^{2b})C(O)R^4$.
6. Prodrug of claim 1, wherein X is $C(R^3R^{3a})$ and R^{3a} is replaced by L^2-Z .
7. Prodrug of claim 1, wherein X is $C(R^3R^{3a})$, R^{3a} is $N(R^{2b})-L^2-Z$.
8. Prodrug of any of claims 1 to 7, wherein L^1 is not further substituted.
9. Prodrug of any of claims 1 to 8, wherein the insulin moiety is attached to L^1 through the nitrogen N^{aA1} .
10. Prodrug of any of claims 1 to 9, wherein insulin is recombinant human insulin.
11. Prodrug of claim 10, wherein the recombinant human insulin is attached to L^1 through the nitrogen of a lysine side chain of the insulin moiety.
12. Prodrug of any of claims 1 to 11, wherein the hydrogel Z is a biodegradable poly(ethylene glycol) (PEG) based water-insoluble hydrogel.
13. Prodrug of any of claims 1 to 12, wherein the hydrogel is composed of backbone moieties interconnected by hydrolytically degradable bonds.
14. Prodrug of claim 13, wherein the backbone moieties have a molecular weight in the range of from 1 kDa to 20 kDa.
15. Prodrug of claim 13 or 14, wherein backbone moieties are linked together through crosslinker moieties, each crosslinker moiety being terminated by at least two of the hydrolytically degradable bonds.
16. Prodrug of claim 15, wherein the crosslinker moieties have a molecular weight in the range of from 0.5 kDa to 5 kDa.
17. Prodrug of claim 13 to 16, wherein L^2 is connected to a backbone moiety.

18. The prodrug of any of claims 1 to 17, wherein L^2 is attached to Z via a terminal group having the following structure



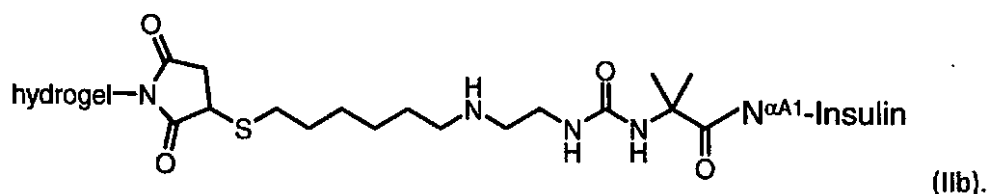
wherein the dashed lines indicate the attachment to L^2 and Z, respectively.

19. Prodrug of claim 1, of formula (IIa)

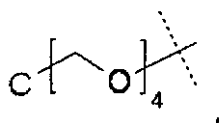


wherein N^ϵ -Insulin refers to insulin connected via one lysine side chain.

20. Prodrug of claim 1 or 2, of formula (IIb)

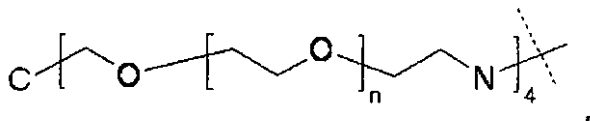


21. The prodrug of claim 19 or 20, wherein the hydrogel is a biodegradable polyethylene glycol (PEG) based water-insoluble hydrogel.
22. The prodrug of any of claims 19 to 21, wherein the hydrogel is composed of backbone moieties interconnected by hydrolytically degradable bonds.
23. The prodrug of any of claims 13 to 18, 22, wherein the backbone moieties comprise a branching core of the following formula:



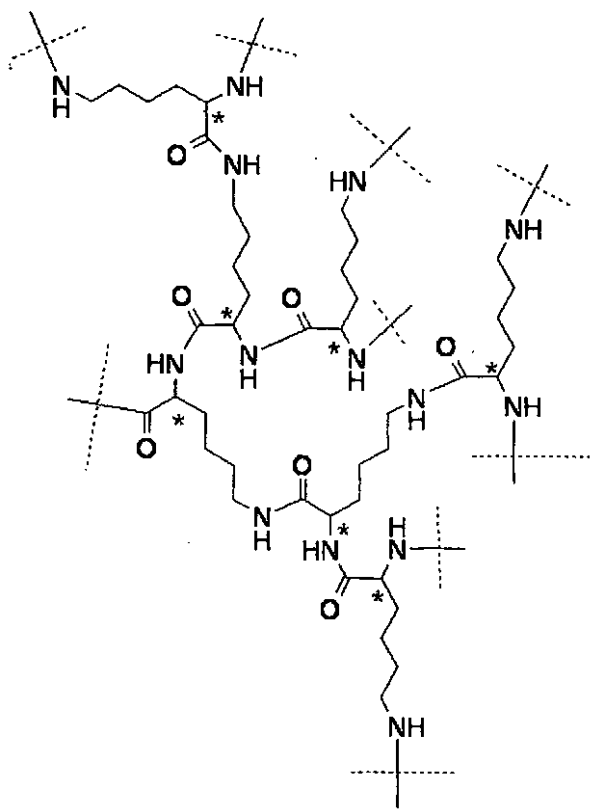
wherein the dashed line indicates attachment to the remainder of the backbone moiety.

24. The prodrug of any of claims 13 to 18, 22, 23 wherein the backbone moieties comprise a structure of the following formula:



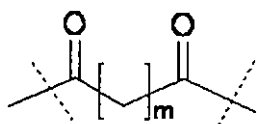
wherein n is an integer of from 5 to 50 and the dashed line indicates attachment to the rest of the molecule.

25. The prodrug of any of claims 13 to 24, wherein the backbone moiety comprises a hyperbranched moiety Hyp.
26. The prodrug of claim 25, wherein the backbone moiety comprises a hyperbranched moiety Hyp of the following formula:



wherein the dashed lines indicate attachment to the rest of the molecule and carbon atoms marked with asterisks indicate S-configuration.

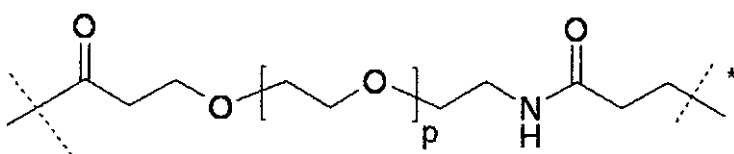
27. The prodrug of any of claims 22 to 26, wherein the backbone moieties are attached to at least one spacer of the following formula:



wherein one of the dashed lines indicates attachment to the hyperbranched moiety Hyp and the second dashed line indicates attachment to the rest of the molecule; and

wherein m is an integer of from 2 to 4.

28. The prodrug of any of claims 22 or 27, wherein the backbone moieties are attached to at least one spacer of the following formula:

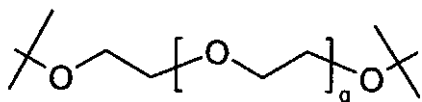


wherein the dashed line marked with the asterisk indicates the bond between the hydrogel and the N of the thiosuccinimide group of claim 18,

wherein the other dashed line indicates attachment to Hyp, and

wherein p is an integer of from 0 to 10.

29. The prodrug of any of claims 15 to 28, wherein the backbone moieties are linked together through crosslinker moieties comprising the following structure

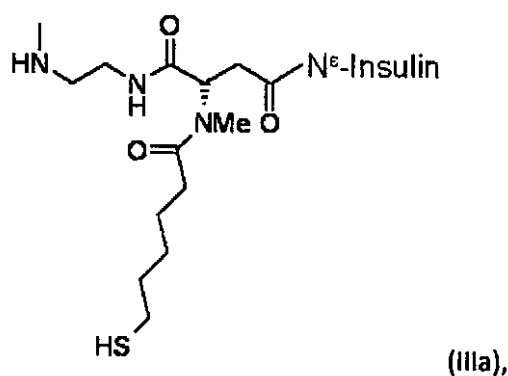


wherein

q is an integer from 3 to 100.

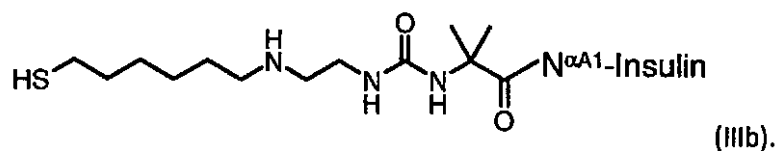
30. The prodrug of any of claims 1 to 29 in the form of microparticles.
31. The prodrug of claim 30, wherein the microparticles have a diameter of between 20 and 100 micrometer
32. The prodrug of claim 30, wherein the microparticles can be administered by injection through a needle smaller than 0.6 mm inner diameter.

33. The prodrug of claims 30, wherein the microparticles can be administered by injection through a needle smaller than 0.3 mm inner diameter.
34. The prodrug of claim 30, wherein the microparticles can be administered by injection through a needle smaller than 0.2 mm inner diameter.
35. An insulin-linker conjugate of formula (IIIa)



wherein N^ε-Insulin refers to insulin connected via one lysine side chain.

36. An insulin-linker conjugate of formula (IIIb)



37. A pharmaceutical composition comprising a prodrug of any of claims 1 to 34 or a pharmaceutically acceptable salt thereof together with a pharmaceutically acceptable excipient.
38. A pharmaceutical composition according to claim 37, wherein the pharmaceutical composition is dry.
39. A pharmaceutical composition according to claim 38, wherein the pharmaceutical composition is dried by lyophilization.

40. A composition according to any of claims 37 to 39, wherein the insulin hydrogel prodrug is sufficiently dosed in the composition to provide a therapeutically effective amount of insulin for at least three days in one application.
41. A composition according to any of claims 37 to 40, wherein it is a single dose composition.
42. A composition according to any of claims 37 to 40, wherein it is a multiple dose composition.
43. A composition according to any of claims 37 to 42, wherein it contains one or more additional biologically active agents, either in their free form; as prodrugs, especially as hydrogel prodrugs; and wherein the one or more additional biologically active agents are selected from the group consisting of sulfonylureas, such as, for example, chlorpropamide, tolazamide, tolbutamide, glyburide, glipizide, glimepiride, and the like; meglitinides, such as, for example, repaglinide; glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and its mimetics, glucose-insulinotropic peptide (GIP) and its mimetics, exendin and its mimetics, and dipeptyl protease inhibitors (DPPIV); biguanides, such as, for example, metformin; thiazolidinediones, such as, for example, rosiglitazone, pioglitazone, troglitazone, isaglitazone (known as MCC-555), 2-[2-[(2R)-4-hexyl-3,4-dihydro-3-oxo-2H-1,4-benzoxazin-2-yl]ethoxy]-benzene acetic acid, and the like; GW2570, and the like; retinoid-X receptor (RXR) modulators, such as, for example, targretin, 9-cis-retinoic acid, and the like; other insulin sensitizing agents, such as, for example, INS-1, PTP-1B inhibitors, GSK3 inhibitors, glycogen phosphorylase a inhibitors, fructose-1,6-bisphosphatase inhibitors, and the like; insulins, including regular or short-acting, intermediate-acting, and long-acting insulins, inhaled insulin and insulin analogues, such as insulin molecules with minor differences in the natural amino acid sequence; small molecule mimics of insulin, including, but not limited to L-783281, TE-17411, and the like; Na-glucose co-transporter inhibitors, such as T-1095, T-1095A, phlorizin, and the like; amylin agonists which include, but are not limited to pramlintide, and the like; glucagon antagonists such as AY-279955, and the like; anti-obesity agents such as orlistat, a pancreatic lipase inhibitor; sibutramine; norepinephrine and dopamine; growth hormone, IGF-1, growth hormone releasing factor; oxyntomodulin and ghrelin modulators; appetite-suppressants such as benzphetamine, phenmetrazine, phentermine, diethylpropion, mazindol, sibutramine, phenylpropanolamine or, ephedrine; appetite-suppressants such as quipazine, fluoxetine, sertraline, fenfluramine, or dexfenfluramine; appetite-suppressant agents such as apomorphine; appetite-suppressant such as histamine mimetics, H3 receptor modulators; enhancers of energy expenditure such as beta-3 adrenergic agonists and stimulators of

uncoupling protein function; leptin and leptin mimetics (eg, metreleptin); neuropeptide Y antagonists; melanocortin-1, 3 and 4 receptor modulators; cholecystokinin agonists; glucagon-like peptide-1 mimetics and analogues like for example exendin; androgens such as dehydroepiandrosterone and derivatives such as etiocholandione; testosterone; anabolic steroids such as oxandrolone, and steroidal hormones; galanin receptor antagonists; cytokine agents such as ciliary neurotrophic factor; amylase inhibitors.

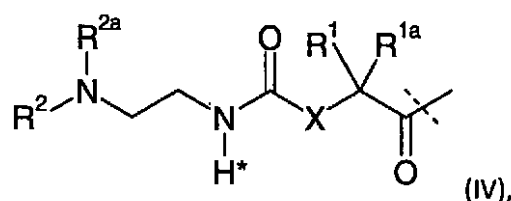
44. A container comprising the pharmaceutical composition according to claims 37 to 43.
45. A container according to claim 44, wherein the container is a dual-chamber syringe.
46. A suspension comprising the pharmaceutical composition according to claims 37 and 40 to 43.
47. A method of preparing a suspension according to claim 46, comprising the steps of reconstituting the dry pharmaceutical composition according to claims 38 or 39 by adding reconstitution solution.
48. A kit of parts comprising a needle and a container containing reconstitution solution and the dry composition according to claim 38 or 39 for use with the needle.
49. A kit of parts according to claim 48, wherein the container is a dual-chamber syringe and wherein one of the two-chambers of the dual-chamber syringe contains the dry pharmaceutical composition and the second chamber of said dual-chamber syringe contains the reconstitution solution.
50. A prodrug of any of claims 1 to 34 or a pharmaceutical composition of any of claims 37 to 43 for use as a medicament.
51. A prodrug of any of claims 1 to 34 or a pharmaceutical composition of any of claims 37 to 43 for use in a method of treating or preventing diseases or disorders which can be treated by insulin.
52. A process for acylating the ϵ -amino group of insulin or an insulin analog, having one or more free α -amino groups and the free ϵ -amino group with an acylating agent containing one or

more protected functional groups, which comprises reacting the insulin or insulin analog with a soluble acylating agent containing one or more protected functional groups at a pH of 8.0 to below 9.0 in a polar solvent.

53. The process of claim 52, wherein the pH is from 8.0 to 8.9.
54. An insulin compound characterized by having an acyl group linked to the ϵ -nitrogen of insulin or an insulin analog and wherein such acyl group has one or more protected functional groups.
55. An insulin-linker reagent D-L*, wherein

D represents an insulin moiety; and

L* is a non-biologically active linker reagent represented by formula (IV),



wherein the dashed line indicates the attachment to one of the amino groups of the insulin by forming an amide bond;

X is C(R³R^{3a}); or N(R³);

R^{1a}, R^{3a} are independently selected from the group consisting of H, NH(R^{2b}), N(R^{2b})C(O)R⁴ and C₁₋₄ alkyl;

R¹, R², R^{2a}, R^{2b}, R³, R⁴ are independently selected from the group consisting of H and C₁₋₄ alkyl,

wherein L* is substituted with one L^{2*} and optionally further substituted, provided that the hydrogen marked with the asterisk in formula (IV) is not replaced by a substituent and wherein

L^{2*} is a spacer connected to L^* and comprising a chemical functional group intended for conjugation to a reactive biodegradable hydrogel;

56. The insulin-linker reagent of claim 55, wherein in formula (IV) R^2 is replaced by L^{2*} .
57. The insulin-linker reagent of claim 56, wherein in formula (IV) R^1 is replaced by L^{2*} .
58. The insulin-linker reagent of any of claims 55 to 57, wherein in formula (IV) X is $N(R^3)$.
59. The insulin-linker reagent of any of claims 55 to 57, wherein in formula (IV) X is $C(R^3R^{3a})$ and R^{3a} is $N(R^{2b})C(O)R^4$.
60. The insulin-linker reagent of claim 55, wherein X is $C(R^3R^{3a})$ and R^{3a} is replaced by L^{2*} .
61. The insulin-linker reagent of claim 55, wherein X is $C(R^3R^{3a})$, R^{3a} is $N(R^{2b})-L^{2*}$.
62. The insulin-linker reagent of any of claims 55 to 61, wherein L^* is not further substituted.
63. The insulin-linker reagent of any of claims 55 to 62, wherein L^{2*} comprises a thiol group.
64. The insulin-linker reagent of any of claims 55 to 62, wherein L^{2*} comprises a maleimide group.
65. A process for the preparation of a prodrug of any of claims 1 to 34 and 55, 51 comprising the steps of
 - (a) contacting an aqueous suspension comprising maleimide-functionalized hydrogel microparticles with a solution comprising the insulin-linker reagent of claim 63 at temperatures between room temperature and 4°C in a buffered aqueous solution of pH 2-5, resulting in an insulin-linker-hydrogel conjugate;
 - (b) optionally, treating the insulin-linker-hydrogel conjugate from step (a) with a thiol-containing compound of 34 Da to 500 Da at temperatures between room temperature and 4°C in a buffered aqueous solution of pH 2-5.
66. A process for the preparation of a prodrug of any of claims 1 to 34 and 55, 51 comprising the steps of

- (a) contacting an aqueous suspension comprising thiol-functionalized hydrogel microparticles with a solution comprising the insulin-linker reagent of 64 at temperatures between room temperature and 4°C in a buffered aqueous solution of pH 2-5, resulting in an insulin-linker-hydrogel conjugate;
 - (b) optionally, treating the insulin-linker-hydrogel conjugate from step (a) with a maleimide-containing compound of 100 to 300 Da at temperatures between room temperature and 4°C in a buffered aqueous solution of pH 2-5.
67. A process for preparing a needle injectable prodrug comprising the step of
- (a) preparing a prodrug of claim 30 in the form of microparticles;
 - (b) sieving the microparticles
 - (c) selecting a fraction with a prodrug bead diameter of between 25 and 80 μm .
 - (d) suspending the bead fraction of step (c) in an aqueous buffer solution suitable for injection.
68. Needle injectable prodrug obtainable from the process of claim 67.
69. Prodrug of claim claim 68, injectable through a needle with an inner diameter of less than 300 μm .
70. Prodrug of claim 68, injectable through a needle with an inner diameter of less than 225 μm .
71. Prodrug of claim 68, injectable through a needle with an inner diameter of less than 175 μm .

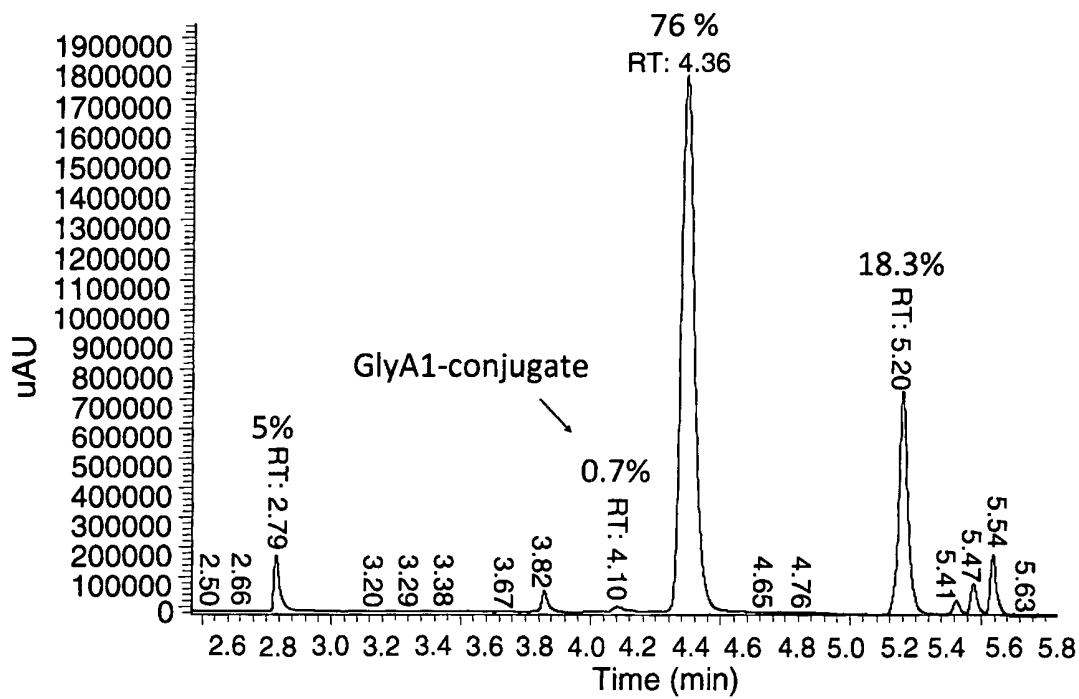


Fig. 1a

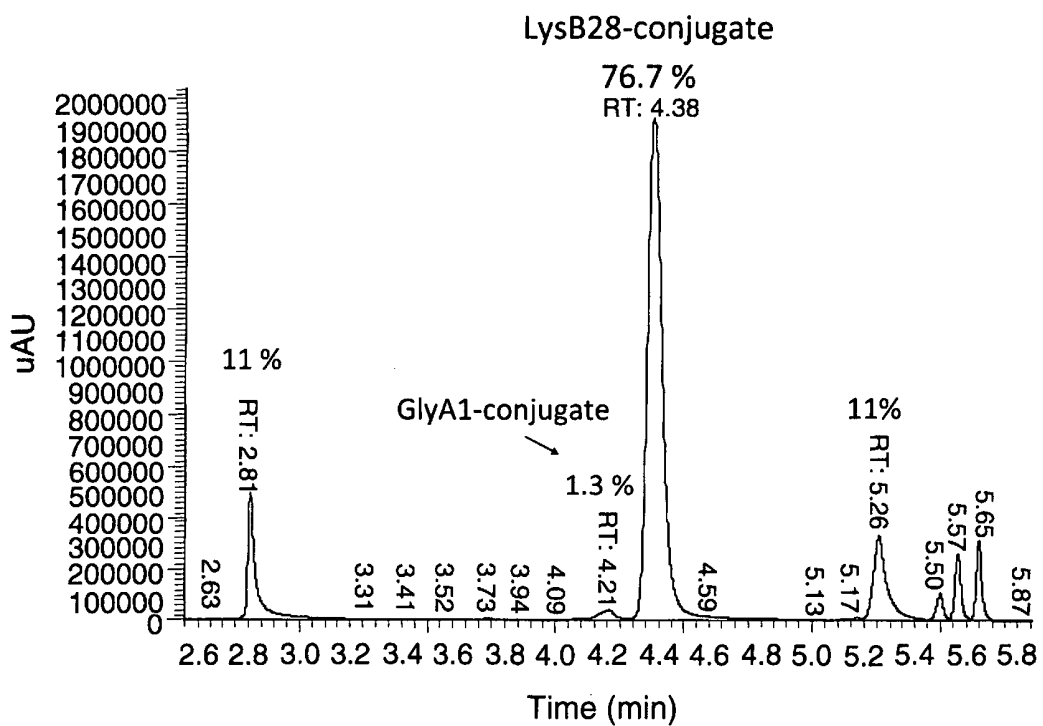


Fig. 1b

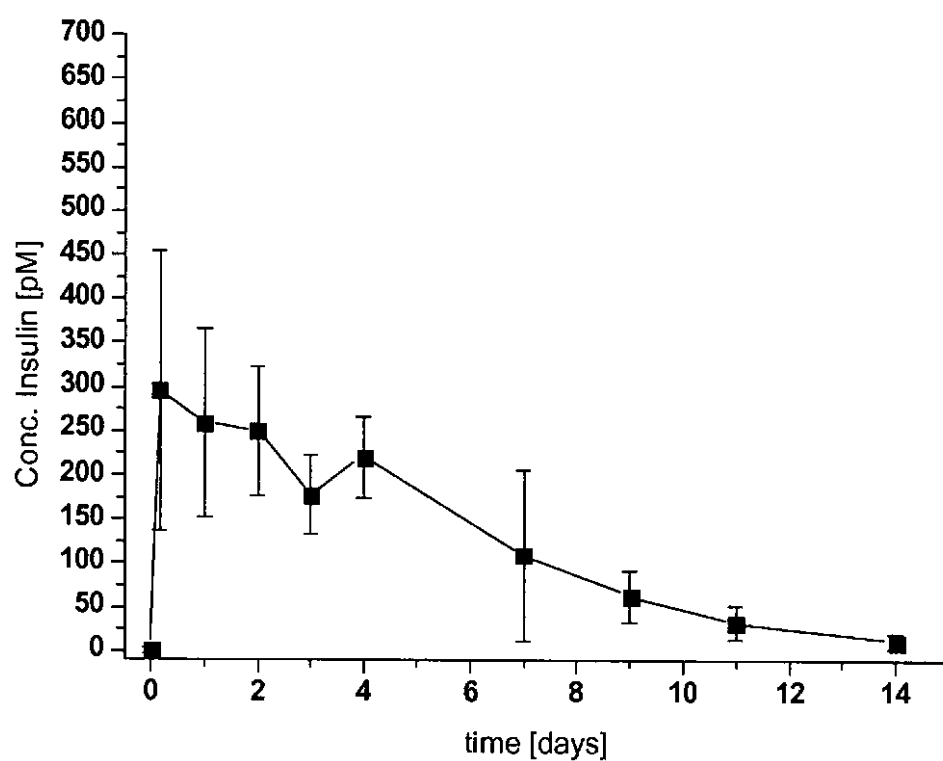


Fig. 2

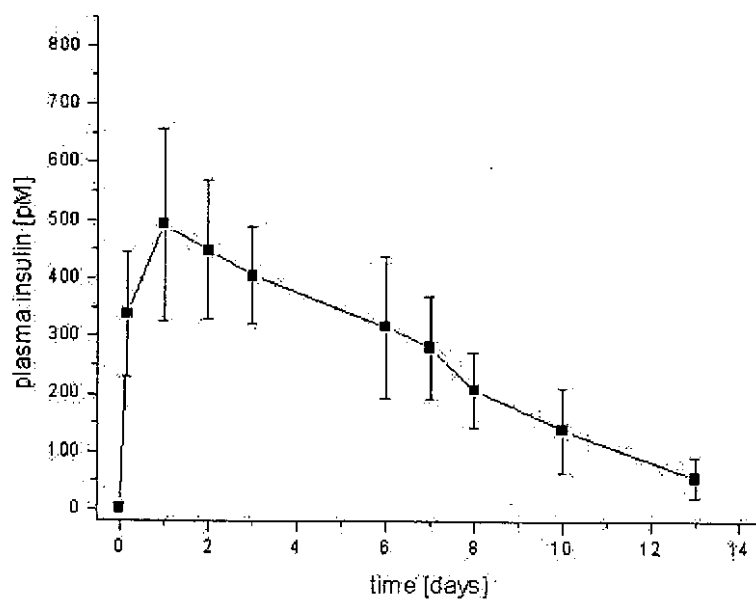


Fig. 3

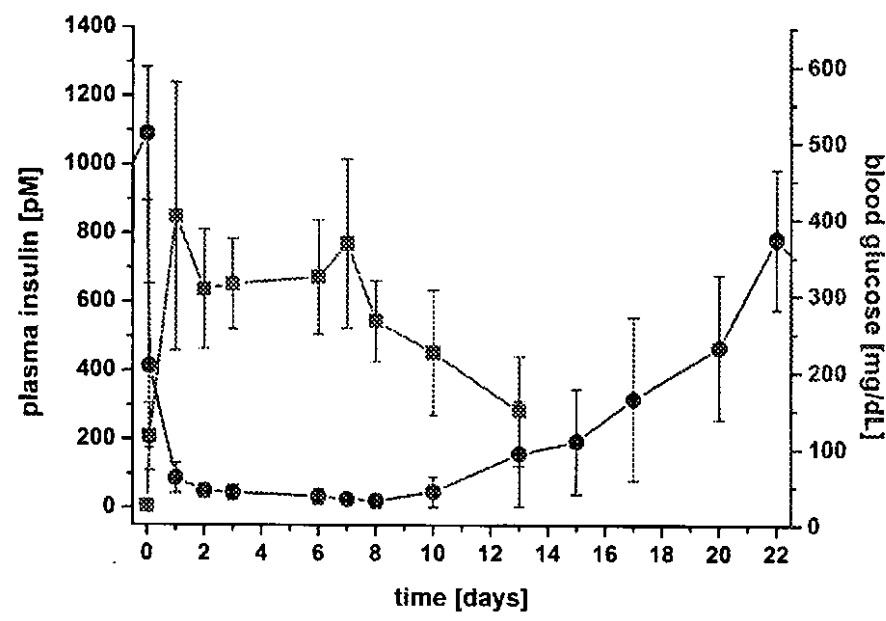


Fig. 4

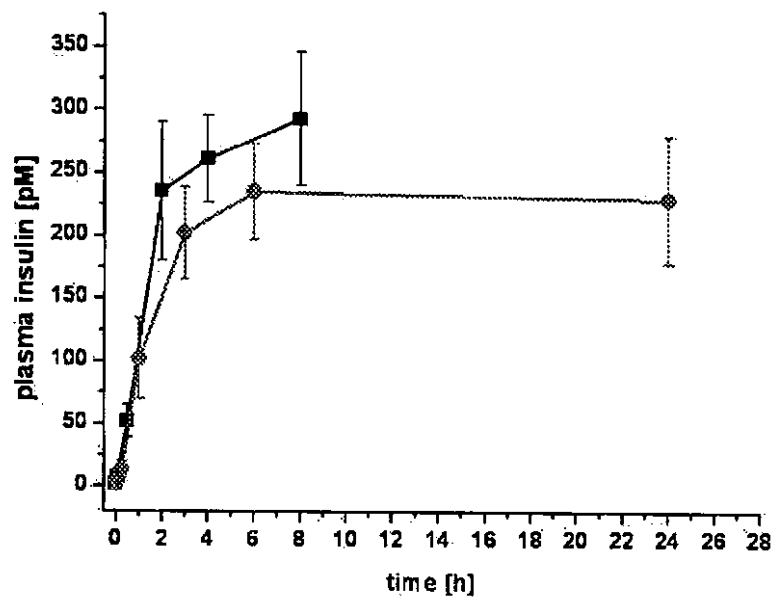


Fig. 5

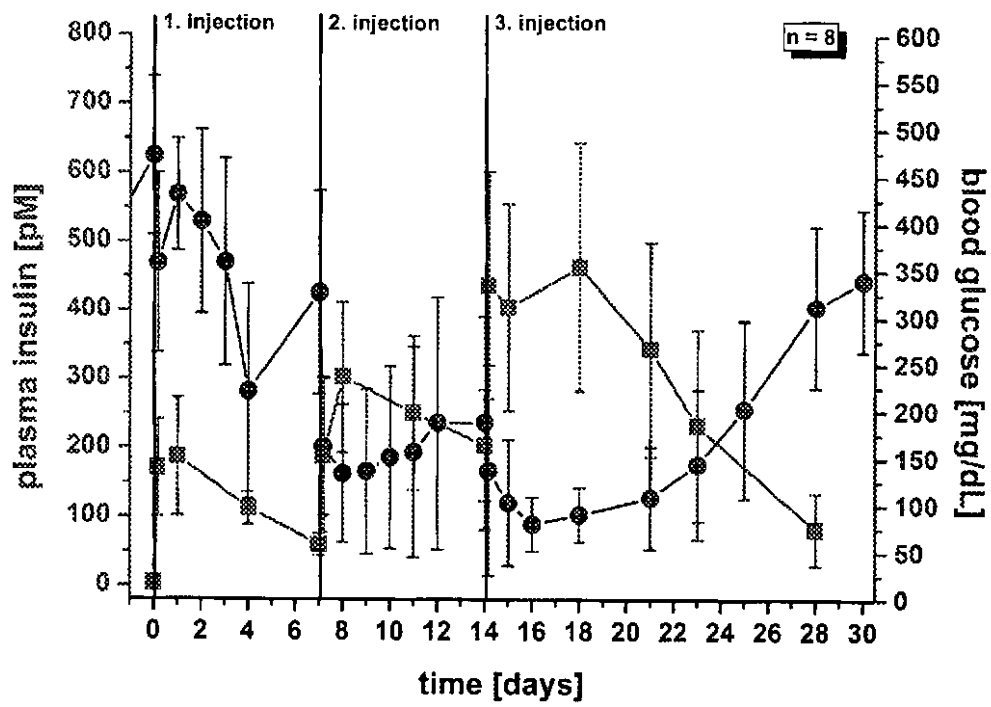


Fig. 6

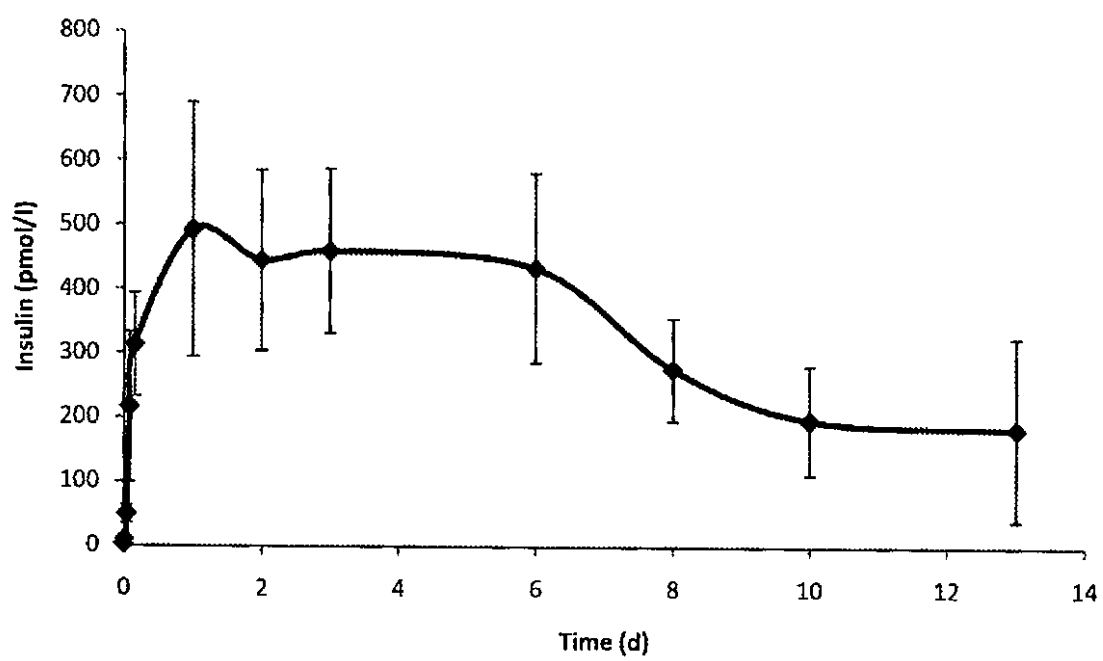


Fig. 7

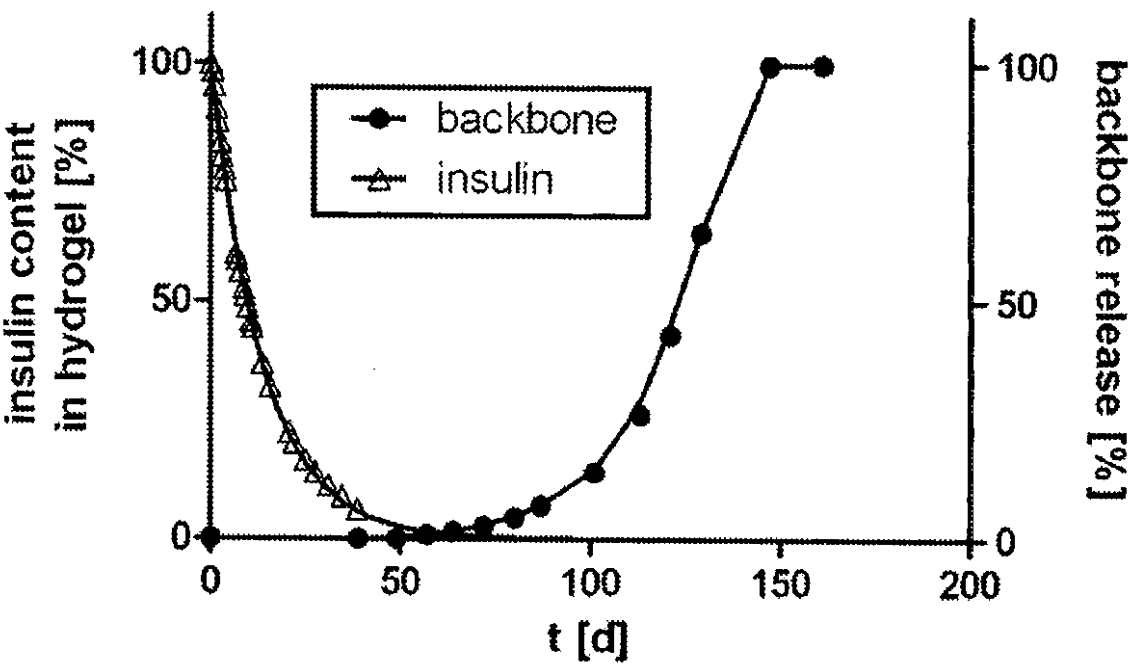


Fig. 8

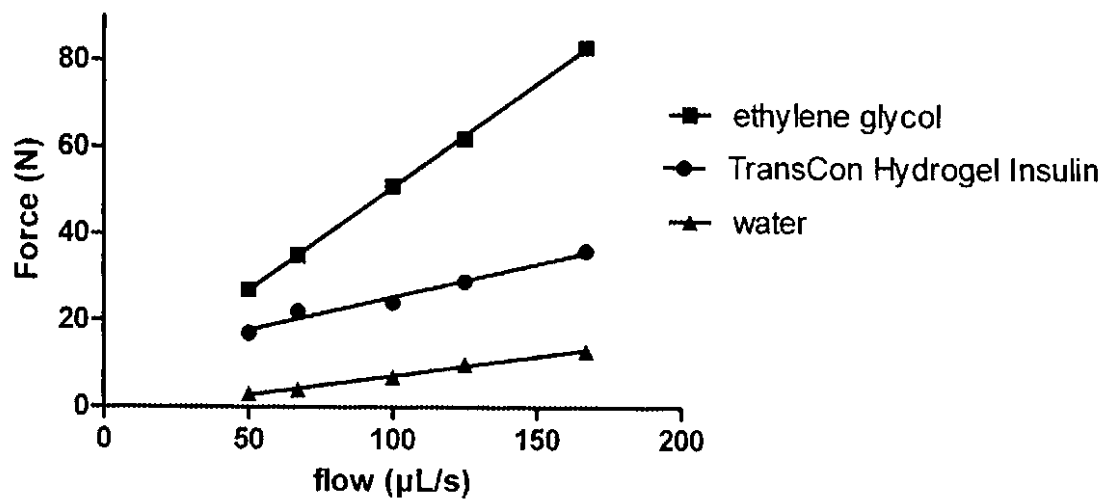


Fig. 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/061159

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. A61K47/48	A61P3/10	A61K38/28 C07K14/62
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) A61K A61P C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BEILSTEIN Data, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2009/010428 A (NOVO NORDISK AS [DK]; MADSEN PETER [DK]; HOEG-JENSEN THOMAS [DK]; KJEL) 22 January 2009 (2009-01-22) page 33, lines 16-20,32-34 page 34, lines 10-16,27,28	1-71
Y	EP 2 017 288 A (NOVO NORDISK AS [DK]) 21 January 2009 (2009-01-21) page 12, lines 37-40,46,47 page 13, lines 9-14,24,25	1-71
Y	WO 2008/015099 A (NOVO NORDISK AS [DK]; MADSEN PETER [DK]; KJELSEN THOMAS BOERGLUM [DK]) 7 February 2008 (2008-02-07) page 27, lines 33-37 page 28, lines 11-13,27-33 page 29, lines 5,6	1-71
-/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* 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 document 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
17 September 2010		17/11/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bliem, Barbara

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/061159

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2008/148839 A (ASCENDIS PHARMA AS [DK]; RAU HARALD [DK]) 11 December 2008 (2008-12-11) paragraph [0001] page 25, line 30 - page 27, line 18	1-71
A	HINDS K D ET AL: "Effects of PEG conjugation of insulin properties" ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, ELSEVIER BV, AMSTERDAM, NL, vol. 54, 1 January 2002 (2002-01-01), pages 505-530, XP003004966 ISSN: 0169-409X abstract page 509	1-71
A	EP 1 625 856 A1 (COMPLEX BIOSYSTEMS GMBH [DE]) 15 February 2006 (2006-02-15)	1-71
A	WO 2005/099768 A2 (COMPLEX BIOSYSTEMS GMBH [DE]; HERSEL ULRICH [DE]; RAU HARALD [DE]; SCH) 27 October 2005 (2005-10-27)	1-71

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2010/061159

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.:
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:

see additional sheet

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 an 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.:

1-51, 55-71(completely); 52-54(partially)

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.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-51, 55-71(completely); 52-54(partially)

Insulin linker conjugates D-L wherein L is a linker moiety LI represented by formula (I), their intermediates, use and process of preparation.

2. claims: 52-54(partially)

Insulin compound characterized by having an acyl group linked to the epsilon nitrogen of insulin or an insulin analog and process for acylating the epsilon amino group of insulin or an insulin analog, as far as not comprised in invention 1.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2010/061159

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009010428	A	22-01-2009	CN 101743252 A EP 2170945 A1 US 2010216691 A1	16-06-2010 07-04-2010 26-08-2010
EP 2017288	A	21-01-2009	NONE	
WO 2008015099	A	07-02-2008	EP 2049149 A2 JP 2009545550 T US 2009306337 A1	22-04-2009 24-12-2009 10-12-2009
WO 2008148839	A	11-12-2008	AU 2008258548 A1 CA 2689909 A1 EP 2164519 A2	11-12-2008 11-12-2008 24-03-2010
EP 1625856	A1	15-02-2006	NONE	
WO 2005099768	A2	27-10-2005	AU 2005232371 A1 AU 2010212335 A1 BR PI0507875 A CA 2602705 A1 EP 1732607 A2 EP 2087910 A2 JP 2007530485 T US 2008241102 A1	27-10-2005 09-09-2010 24-07-2007 27-10-2005 20-12-2006 12-08-2009 01-11-2007 02-10-2008

Profármacos que comprenden un conjugado de insulina-conector

La presente invención se refiere a profármacos, a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos profármacos así como a su uso como un medicamento para
5 tratar o prevenir enfermedades o trastornos que se pueden tratar mediante la insulina.

La terapia con insulina se caracteriza por una alta velocidad para mantener la liberación del fármaco de insulina dentro de niveles muy estrictos, ya que la ventana terapéutica es angosta, y los efectos adversos de la hiperinsulinemia pueden ser potencialmente mortales. Se han comercializado numerosas preparaciones de insulina
10 con diferentes perfiles de acción para satisfacer las necesidades específicas de la población diabética. Los análogos de insulina de acción rápida se administran justo antes de las comidas, con el fin de controlar el pico en la glucosa en plasma tras la ingesta de alimentos, mientras que los análogos de insulina de acción prolongada típicamente se administran una o dos veces al día para proveer un nivel de insulina
15 basal estable.

Por lo tanto, existe una clara necesidad de nuevas preparaciones de insulina de acción prolongada, que liberen insulina continuamente durante todo el periodo entre las administraciones.

El documento WO-A 2006/003014 describe un hidrogel capaz de liberar
20 insulina con la posibilidad de una frecuencia de administración reducida en comparación con las inyecciones de insulina basales diarias estándar. No obstante, la insulina se libera a un índice demasiado rápido para asegurar el estricto control insulínico durante periodos que se extienden a dos días. De hecho, la insulina se libera con una semivida de aproximadamente 30 horas, lo que significa que debe
25 administrarse por lo menos cada 30 horas con el fin de que la relación valle-pico esté debajo de 2 en estado estable.

El concepto de preparar un conjugado de profármaco polimérico reversible de insulina ha sido explorado por Shechter et al. y descrito en artículos científicos y solicitudes de patentes (p. ej., European Journal of Pharmaceutics and
30 Biopharmaceutics 2008(70), 19–28 y WO-A 2004/089280). La insulina se conjuga con un polímero PEG de 40 kDa a través de un conector de fluorenilo. La hidrólisis de dicha molécula conectora libera insulina con una semivida de aproximadamente 30 horas, lo que significa que el profármaco debe administrarse por lo menos cada 30 horas con el fin de que la relación valle-pico esté debajo de 2 en estado estable.

Se han hecho otros intentos de reducir la frecuencia de administración de insulina. Hinds et al., *Journal of Controlled Release*, 2005 (104), 447-460, describen un método para producir una insulina una vez por semana, PEGilando primero permanentemente la molécula de insulina y posteriormente microencapsulando la insulina PEGilada en micropartículas de PLGA. En este caso, la insulina se sometió a modificación estructural importante a través de la modificación permanente por una entidad polimérica de alto peso molecular. Dichas insulinas modificadas de alto peso molecular pueden exhibir menor eficacia por la unión disminuida del receptor, y pueden también exhibir reacciones en el sitio de inyección, tales como lipoatrofia debida a la presencia extendida de altas concentraciones de la insulina de alto peso molecular en el tejido subcutáneo. Además, dichas insulinas PEGiladas exhibirán un volumen de distribución inferior, que es una desventaja particular en el tratamiento de la diabetes.

No obstante, la PEGilación de insulina aparentemente sirve para proteger el péptido del deterioro en la formulación del polímero PLGA. El efecto de la PEGilación de proteger péptidos contra acilación en una formulación de PLGA degradante se demostró para octreótido por D. H. Na et al., *AAPS PharmSciTech* 2003, 4 (4) Artículo 72.

Se ha demostrado que la encapsulación de PLGA de proteínas causa reacciones colaterales de los ésteres poliméricos con grupos amino de péptidos o proteínas. Se han observado productos de acilación de ácido láctico después de la exposición de las formulaciones a soluciones tamponadas a pH neutro (G. Zhu et al., *Nature Biotechnology* 18 (2000) 52-57; A. J. Domb et al., *Pharm. Res.* 11 (1994) 865-868; A. Lucke et al., *Pharm. Res.* 19 (2002) 175-181).

Específicamente para insulina, los efectos perjudiciales de las formulaciones poliméricas han sido demostrados por P. G. Shao et al., *Pharm. Dev. Technol.* 4 (1999) 633-642 (véase también P. G. Shao et al., *Pharm. Dev. Technol.* 5 (2000) 1-9).

A su vez, se sabe que la insulina se somete fácilmente a reacciones colaterales que se relacionan con la presencia de tres puentes disulfuro en la molécula. Por ejemplo, la insulina puede dividirse en cadenas A y B por escisión del enlace disulfuro, o pueden formarse dímeros u oligómeros debido a reacciones de intercambio de disulfuro. Dicho reordenamiento del disulfuro es particularmente probable, si las moléculas de insulina son forzadas hacia contacto cercano en forma aleatoria. Esta labilidad intrínseca de la molécula de insulina ha impedido significativamente el progreso en el desarrollo de medicamentos de liberación prolongada, y evitó el uso de

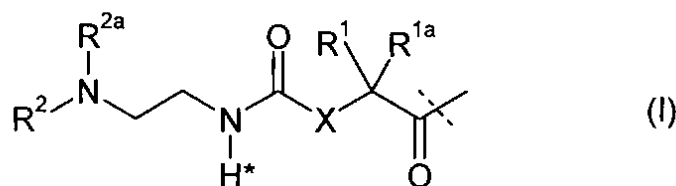
otras formulaciones poliméricas donde la insulina se encapsula en un modo similar a un precipitado amorfo que es conocido por dar origen a diversos productos de degradación que surgen de un amplio intercambio de disulfuro.

Por lo tanto, permanece el desafío de desarrollar insulina de acción prolongada sin comprometer la farmacodinámica de la insulina por unión permanente de una entidad de alto peso molecular o por daño estructural a la molécula durante su presencia en la formulación de liberación prolongada.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proveer un profármaco que contenga insulina, que satisfaga por lo menos parcialmente los requerimientos anteriormente mencionados.

El objeto se logra con un profármaco o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, que comprende un conjugado de insulina-conector D-L, en el que D representa el resto de insulina; y

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



en la que la línea de trazos indica la unión a uno de los grupos amino de la insulina formando un enlace amida;

X es C(R³R^{3a}); o N(R³);

R^{1a}, R^{3a} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, NH(R^{2b}), N(R^{2b})C(O)R⁴ y alquilo C₁₋₄;

R¹, R², R^{2a}, R^{2b}, R³, R⁴ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H y alquilo C₁₋₄,

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

L² es un enlace químico sencillo o un espaciador; y

Z es un hidrogel.

Sorprendentemente, se ha descubierto ahora que un profármaco de la presente invención puede proveer liberación de insulina desde un medicamento de liberación

prolongada en forma estructuralmente intacta durante periodos de tiempo de por lo menos 2 días entre las administraciones. Como ventaja adicional, la integridad estructural de la insulina liberada se puede proporcionar mediante una matriz polimérica bien hidratada que minimiza el contacto intermolecular de las moléculas de insulina, y la liberación sostenida se puede posibilitar mediante un conector de profármaco que se autoescinde, entre la insulina y la matriz polimérica.

Por lo tanto, sería posible administrar insulina en forma de un profármaco de la presente invención con menos frecuencia que las insulinas de acción prolongada actuales. Otras ventajas deberían ser una pequeña relación valle-pico, que reduciría en gran medida el riesgo de episodios hipoglucémicos. Esto podría ayudar a los pacientes a reducir la frecuencia de las inyecciones, a la vez de ser capaces de mantener el control óptimo de los niveles plasmáticos de insulina y, en consecuencia, de glucosa en sangre.

"Insulina" de acuerdo con la presente invención significa insulina recombinante humana, lantus, insulina glargina, insulina detemir, insulina glulisina, insulina aspart, insulina lispro, insulina conjugada a PEG de bajo peso molecular. PEG de bajo peso molecular tiene un peso molecular más pequeño que 10 kDa.

La insulina unida a un conector que no es biológicamente activo se denomina "resto de insulina".

Por "análogo de insulina", tal como se emplea en la presente memoria, se entiende un polipéptido que tiene una estructura molecular que formalmente puede derivar de la estructura de una insulina natural, por ejemplo aquella de insulina humana, eliminando y/o intercambiando por lo menos un residuo de aminoácido que ocurre en la insulina natural y/o añadiendo por lo menos un residuo de aminoácido. Los residuos de aminoácidos añadidos y/o intercambiados pueden o bien ser residuos de aminoácidos codificables u otros residuos naturales o residuos de aminoácidos puramente sintéticos.

Los análogos de insulina pueden ser tales que la posición 28 de la cadena B puede modificarse a partir del residuo natural Pro a uno de Asp, Lys o Ile. En otro aspecto, Lys en la posición B29 se modifica a Pro. Además, Asn en la posición A21 puede modificarse a Ala, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, en particular a Gly, Ala, Ser, o Thr y preferiblemente a Gly. Asimismo, Asn en la posición B3 puede modificarse a Lys o Asp. Otros ejemplos de análogos de insulina son insulina humana des(B30); análogos de insulina humana des(B30); análogos de insulina donde PheB1 ha sido eliminado; análogos de insulina en los que la cadena A

y/o la cadena B tiene una extensión N-terminal y análogos de insulina en los que la cadena A y/o la cadena B tienen una extensión C-terminal. Por lo tanto, se pueden añadir 1 o 2 Arg en la posición B1.

Por "insulina desB30", "insulina humana desB30" se entiende una insulina natural o su análogo que carece del residuo de aminoácidos B30. De manera similar, "insulina desB29desB30" o "insulina humana desB29desB30" significa una insulina natural o su análogo que carece de los residuos de aminoácidos B29 y B30.

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

Un "conector que no es biológicamente activo" significa un conector que no presenta efectos farmacológicos del fármaco derivado del agente biológicamente activo.

"Grupos protectores" se refiere a un resto que protege temporalmente un grupo funcional químico de una molécula durante la síntesis para obtener quimioselectividad en las posteriores reacciones químicas. Los grupos protectores para alcoholes son, por ejemplo, grupos protectores bencilo y tritilo, los grupos protectores para aminas son, por ejemplo, terc-butiloxicarbonilo, 9-fluorenilmetiloxicarbonilo y bencilo, y para los tioles, los ejemplos de grupos protectores son 2,4,6-trimetoxibencilo, feniltiometilo, acetamidometilo, p-metoxibenciloxicarbonilo, terc-butiltio, trifenilmetilo, 3-nitro-2-piridiltio, 4-metiltritilo.

"Grupos funcionales protegidos" significa un grupo funcional químico protegido por un grupo protector.

"Agente acilante" significa un resto de estructura $R-(C=O)-$, que proporciona el grupo acilo en una reacción de acilación, opcionalmente conectado a un grupo saliente, tal como cloruro de ácido, N-hidroxi-succinimida, pentafluorofenol y para-nitrofenol.

"Alquilo" significa una cadena de carbono de cadena lineal o ramificada. Cada hidrógeno de un carbono alquílico se puede sustituir por un sustituyente.

"Ariilo" se refiere a cualquier sustituyente derivado de un anillo aromático monocíclico o policíclico o fusionado, incluyendo anillos heterocíclicos, p. ej., fenilo, tiofeno, indolilo, naftilo, piridilo, que puede estar además opcionalmente sustituido.

"Acilo" significa un grupo funcional químico de estructura $R-(C=O)-$, en la que R es un alquilo o arilo.

"Alquilo C_{1-4} " significa una cadena de alquilo que tiene 1-4 átomos de carbono, p. ej., si está presente en el extremo de una molécula: metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, o p. ej. $-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH(C_2H_5)-$, $-C(CH_3)_2-$, cuando dos restos de una molécula están unidos por el grupo alquilo. Cada hidrógeno de un carbono de alquilo C_{1-4} se puede sustituir por un sustituyente.

"Alquilo C_{1-6} " significa una cadena de alquilo que tiene 1-6 átomos de carbono, p. ej., si está presente en el extremo de una molécula: alquilo C_{1-4} , metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, n-hexilo, o p. ej. $-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-$, $-CH(CH_3)-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH(C_2H_5)-$, $-C(CH_3)_2-$, cuando los dos restos de una molécula están unidos por el grupo alquilo. Cada hidrógeno de un carbono de alquilo C_{1-6} se puede sustituir por un sustituyente.

Por consiguiente, "alquilo C_{1-18} " significa una cadena de alquilo que tiene de 1 a 18 átomos de carbono y "alquilo C_{8-18} " significa una cadena de alquilo que tiene de 8 a 18 átomos de carbono. Por consiguiente, "alquilo C_{1-50} " significa una cadena de alquilo que tiene de 1 a 50 átomos de carbono.

"Alquenilo C_{2-50} " significa una cadena de alquenilo lineal o ramificada que tiene de 2 a 50 átomos de carbono, p. ej. si está presente en el extremo de una molécula: $-CH=CH_2$, $-CH=CH-CH_3$, $-CH_2-CH=CH_2$, $-CH=CH-CH_2-CH_3$, $-CH=CH-CH=CH_2$, o p. ej. $-CH=CH-$, cuando dos restos de una molécula están unidos por el grupo alquenilo. Cada hidrógeno de un carbono del alquenilo C_{2-50} se puede sustituir por un sustituyente como se especifica con más detalle. Por consiguiente, el término "alquenilo" se refiere a una cadena de carbonos con al menos un doble enlace carbono-carbono. Opcionalmente, puede haber dos o más triples enlaces.

"Alquinilo C_{2-50} " significa una cadena de alquinilo lineal o ramificada que tiene de 2 a 50 átomos de carbono, p. ej. si está presente en el extremo de una molécula: $-C\equiv CH$, $-CH_2-C\equiv CH$, $CH_2-CH_2-C\equiv CH$, $CH_2-C\equiv C-CH_3$, o p. ej. $-C\equiv C-$ cuando dos restos de una molécula están unidos por el grupo alquinilo. Cada hidrógeno de un carbono del alquinilo C_{2-50} se puede sustituir por un sustituyente como se especifica con más detalle. Por consiguiente, el término "alquinilo" se refiere a una cadena de carbonos con al menos un triple enlace carbono-carbono. Opcionalmente, puede haber dos o más dobles enlaces.

"Cicloalquilo C_{3-7} " o "anillo de cicloalquilo C_{3-7} " significa una cadena de alquilo cíclica que tiene de 3 a 7 átomos de carbono, que puede tener dobles enlaces carbono-carbono, estando al menos parcialmente saturada, p. ej. ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo. Cada hidrógeno de un carbono cicloalquílico se puede sustituir por un sustituyente. La expresión "cicloalquilo C_{3-7} " o "anillo de cicloalquilo C_{3-7} " también incluye biciclos con puente tales como norbornano o norborneno. Por consiguiente, "cicloalquilo C_{3-5} " significa un cicloalquilo que tiene de 3 a 5 átomos de carbono.

Por consiguiente, "cicloalquilo C_{3-10} " significa un alquilo cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, p. ej. cicloalquilo C_{3-7} ; ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclonoñilo, ciclodecilo. El término "cicloalquilo C_{3-10} " también incluye monociclos y biciclos de carbono al menos parcialmente saturados.

"Halógeno" significa flúor, cloro, bromo o yodo. En general se prefiere que el halógeno sea flúor o cloro.

"Heterociclilo de 4 a 7 miembros" o "heterociclo de 4 a 7 miembros" significa un anillo con 4, 5, 6 ó 7 átomos en el anillo, que puede contener hasta el número máximo de dobles enlaces (anillo aromático o no aromático que está completamente, parcialmente saturado o no está saturado) en el que al menos un átomo del anillo y hasta 4 átomos del anillo se sustituyen por un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en azufre (incluyendo $-S(O)-$, $-S(O)_2-$), oxígeno y nitrógeno (incluyendo $=N(O)-$) y en el que el anillo está unido al resto de la molécula por un átomo de carbono o nitrógeno. Los ejemplos de un heterociclo de 4 a 7 miembros son azetidina, oxetano, tietano, furano, tiofeno, pirrol, pirrolina, imidazol, imidazolina, pirazol, pirazolina, oxazol, oxazolina, isoxazol, isoxazolina, tiazol, tiazolina, isotiazol, isotiazolina, tiadiazol, tiadiazolina, tetrahidrofurano, tetrahidrotiofeno, pirrolidina, imidazolidina, pirazolidina, oxazolidina, isoxazolidina, tiazolidina, isotiazolidina, tiadiazolidina, sulfolano, pirano, dihidropirano, tetrahidropirano, imidazolidina, piridina, piridazina, pirazina, pirimidina, piperazina, piperidina, morfolina, tetrazol, triazol, triazolidina, tetrazolidina, diazepán, azepina u homopiperazina.

"Heterobiciclilo de 9 a 11 miembros" o "heterobiciclo de 9 a 11 miembros" significa un sistema heterocíclico de dos anillos con 9 a 11 átomos en el anillo, en el que al menos un átomo del anillo es compartido por ambos anillos y que puede contener hasta el número máximo de dobles enlaces (anillo aromático o no aromático que está completamente, parcialmente saturado o insaturado) en el que al menos un

átomo del anillo y hasta 6 átomos del anillo se sustituyen por un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en azufre (incluyendo -S(O)-, -S(O)₂-), oxígeno y nitrógeno (incluyendo =N(O)-) y en el que el anillo está unido al resto de la molécula por un átomo de carbono o nitrógeno. Los ejemplos de heterobiciclo de 9 a 11 miembros son indol, indolina, benzofurano, benzotiofeno, benzoxazol, bencisoxazol, benzotiazol, benzisotiazol, bencimidazol, bencimidazolina, quinolina, quinazolina, dihidroquinazolina, quinolina, dihidroquinolina, tetrahidroquinolina, decahidroquinolina, isoquinolina, decahidroisoquinolina, tetrahidroisoquinolina, dihidroisoquinolina, benzazepina, purina o pteridina. La expresión heterobiciclo de 9 a 11 miembros también incluye estructuras de tipo espiro de dos anillos como 1,4-dioxa-8-azaespiro[4.5]decano o heterociclos con puente como 8-aza-biciclo[3.2.1]octano.

En el caso de los profármacos de insulina que comprendan los compuestos según la fórmula (I) contengan uno o más grupos ácidos o básicos, la invención también incluye sus correspondientes sales farmacéutica o toxicológicamente aceptables, en particular sus sales farmacéuticamente utilizables. Por tanto, los profármacos de insulina que comprenden los compuestos de la fórmula (I) que contienen grupos ácidos pueden estar presentes en estos grupos y se pueden utilizar según la invención, por ejemplo, en forma de sales de metal alcalino, sales de metal alcalinotérreo o sales de amonio. Los ejemplos más precisos de dichas sales incluyen las sales de sodio, sales de potasio, sales de calcio, sales de magnesio o sales con amoniaco o aminas orgánicas, tales como, por ejemplo, etilamina, etanolamina, trietanolamina o aminoácidos. Los profármacos de insulina que comprenden los compuestos de fórmula (I) que contienen uno o más grupos básicos, es decir grupos que pueden estar protonados, pueden estar presentes y pueden usarse según la invención en forma de sus sales de adición con ácidos inorgánicos u orgánicos. Los ejemplos de ácidos adecuados incluyen cloruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftalenodisulfónico, ácido oxálico, ácido acético, ácido tartárico, ácido láctico, ácido salicílico, ácido benzoico, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido píválico, ácido dietilacético, ácido malónico, ácido succínico, ácido pimélico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido málico, ácido sulfamínico, ácido fenilpropiónico, ácido glucónico, ácido ascórbico, ácido isonicotínico, ácido cítrico, ácido adípico y otros ácidos conocidos para los expertos en la técnica. Si los profármacos de insulina que comprenden los compuestos de fórmula (I) contienen simultáneamente grupos ácidos y básicos en la molécula, la invención también incluye, además de las formas

salinas mencionadas, las sales internas o betaínas (iones híbridos). Las respectivas sales de acuerdo con los profármacos de insulina que comprenden la fórmula (I) pueden obtenerse mediante métodos habituales que son conocidos por los expertos en la técnica como, por ejemplo, poniendo en contacto a éstas con un ácido o base orgánico o inorgánico en un disolvente o dispersante, o mediante intercambio aniónico o catiónico con otras sales. La presente invención también incluye todas las sales de los profármacos de insulina que comprenden los compuestos de fórmula (I) que, debido a una baja compatibilidad fisiológica, no son directamente adecuadas para su uso en productos farmacéuticos pero que se pueden emplear, por ejemplo, como compuestos intermedios para reacciones químicas o para la preparación de sales farmacéuticamente aceptables.

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

Los conectores usados en dichos profármacos ligados a vehículo son transitorios, lo que significa que son degradables (escindibles) por hidrólisis no enzimática en condiciones fisiológicas (tampón acuoso a pH 7,4, 37°C), con semividas en el intervalo, por ejemplo, de 1 hora a 3 meses.

Los vehículos adecuados son polímeros y pueden estar directamente conjugados con el conector o mediante un espaciador no escindible. La expresión "profármaco de insulina-hidrogel" se refiere a profármacos de insulina ligados a vehículo, en los que el vehículo es un hidrogel. Las expresiones "profármaco de hidrogel" y "profármaco ligado a hidrogel" se refieren a profármacos de agentes biológicamente activos, unidos transitoriamente a un hidrogel, y se usan como sinónimas.

Un "hidrogel" se puede definir como una red polimérica tridimensional, hidrófila o anfifílica, capaz de absorber grandes cantidades de agua. Las redes están compuestas de homopolímeros o copolímeros, son insolubles debido a la presencia de

reticulaciones físicas o químicas covalentes. Las reticulaciones proporcionan la estructura de red y la integridad física. Los hidrogeles presentan una compatibilidad termodinámica con agua que les permite hincharse en medios acuosos. Las cadenas de la red están conectadas de forma que existen poros y que una fracción sustancial de estos poros tienen un tamaño entre 1 nm y 1000 nm.

"Forma libre" de un fármaco se refiere al fármaco en su forma farmacológicamente activa no modificada, tal como después de ser liberada de un conjugado polimérico.

Los términos y expresiones "profármaco", "molécula biológicamente activa", "resto biológicamente activo", "agente biológicamente activo", "agente activo" y similares significan cualquier sustancia que puede afectar cualquier propiedad físico-química de un organismo biológico, incluyendo sin limitación, virus, bacterias, hongos, plantas, animales y seres humanos. En particular, como se emplea en esta memoria, moléculas biológicamente activas incluye cualquier sustancia que tenga como fin el diagnóstico, la cura, mitigación, tratamiento o prevención de enfermedad en seres humanos u otros animales, o que potencie de alguna manera el bienestar físico o mental de seres humanos o animales. Específicamente, los términos y expresiones "fármaco", "molécula biológicamente activa", "resto biológicamente activo", "agente biológicamente activo", "agente activo" y similares se refieren a insulina.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de insulina como se usa en la presente memoria significa una cantidad suficiente para curar, aliviar o detener parcialmente las manifestaciones clínicas de una enfermedad dada y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "cantidad terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para cada propósito dependerán de la gravedad de la enfermedad o lesión, así como del peso y el estado general del sujeto. Se entenderá que la determinación de una dosificación adecuada se puede lograr usando experimentación rutinaria, construyendo una matriz de valores y ensayando diferentes puntos de la matriz, lo cual lo cual se basa en la experiencia del médico experto en la materia.

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

La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora tal como la EMEA (Europa) y/o la FDA (EE.UU.) y/o cualquier otra

agencia reguladora nacional para usar en animales, preferiblemente en seres humanos.

"Composición farmacéutica" o "composición" significa uno o más ingredientes activos, y uno o más ingredientes inertes, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de la combinación, complejación o agregación de cualesquiera dos o más de los ingredientes, o de la disociación de uno o más de los ingredientes, o de otros tipos de reacciones o interacciones de uno o más de los ingredientes. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención abarcan cualquier composición hecha mezclando un compuesto de la presente invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable (vehículo farmacéuticamente aceptable).

"Composición seca" significa que la composición del profármaco de insulina-hidrogel se proporciona en una forma seca en un envase. Los métodos adecuados para el secado son el secado por atomización y la liofilización (congelación-secado). Dicha composición seca del profármaco de insulina-hidrogel tiene un contenido de agua residual como máximo de 10%, preferiblemente menos de 5% y más preferiblemente menos de 2% (determinado de acuerdo con el método de Karl Fischer). El método preferido de secado es la liofilización. "Composición liofilizada" significa que la composición del profármaco de insulina-hidrogel primero se congeló y posteriormente se sometió a la reducción de agua mediante presión reducida. Esta terminología no excluye etapas de secado adicionales que se producen en un procedimiento de fabricación antes de introducir la composición en el envase final.

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

"Reconstitución" significa la adición de un líquido para restituir la forma original de una composición.

"Disolución de reconstitución" se refiere al líquido usado para reconstituir la composición seca de un profármaco de insulina-hidrogel, antes de la administración a un paciente que lo necesite.

"Envase" significa cualquier envase en el que esté comprendida la composición del profármaco de insulina-hidrogel y se pueda almacenar hasta reconstitución.

“Tampón” o “agente de tamponamiento” se refiere a compuestos químicos que mantienen el pH en un intervalo deseado. Los tampones fisiológicamente tolerables son, por ejemplo, fosfato, succinato, histidina, bicarbonato, citrato, acetato, sulfato, nitrato, cloruro, piruvato sódicos. También se pueden usar antiácidos tales como

5 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ o ZnCO_3 . La capacidad de tamponamiento se puede ajustar para que se corresponda con las condiciones más sensibles a la estabilidad del pH.

“Excipientes” se refiere a compuestos administrados junto con el agente terapéutico, por ejemplo, agentes de tamponamiento, modificadores de la isotonicidad, conservantes, estabilizantes, agentes antiadsorción, agentes de protección frente a la

10 oxidación u otros agentes auxiliares. Sin embargo, en algunos casos, un excipiente puede tener función doble o triple.

Un “lioprotector” es una molécula que, cuando se combina con una proteína de interés, previene o reduce significativamente la inestabilidad química y/o física de la proteína durante el secado en general, y en especial durante la liofilización y el

15 posterior almacenamiento. Los lioprotectores de ejemplo incluyen azúcares, tales como sacarosa o trealosa; aminoácidos tales como arginina, glicina, glutamato o histidina; metilaminas tales como betaína; sales liotrópicas tales como sulfato magnésico; polioles tales como polioles trihídricos o superiores, p. ej. glicerina, eritritol, glicerol, arabitol, xilitol, sorbitol, y manitol; etilenglicol; propilenglicol polietilenglicol;

20 plurónicos; almidones hidroxialquílicos, p. ej. almidón hidroxietílico (HES), y combinaciones de los mismos.

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

“Modificadores de la isotonicidad” se refiere a compuestos que minimizan el

25 dolor que puede resultar del daño celular debido a diferentes presiones osmóticas en el depósito de inyección.

El término “estabilizantes” se refiere a compuestos usados para estabilizar el profármaco polimérico. La estabilización se logra fortaleciendo las fuerzas de estabilización de la proteína, desestabilizando el estado desnaturalizado, o mediante la

30 unión directa de excipientes a la proteína.

“Agentes anti-adsorción” se refiere a tensioactivos principalmente iónico o no iónicos u otras proteínas o polímeros solubles, usados para revestir o adsorberse de forma competitiva en la superficie interior del envase de la composición. La concentración y tipo de excipiente elegido depende del efecto que se va a evitar, pero

normalmente se forma una monocapa de tensioactivo en la interfase justo por encima del valor de CMC.

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

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

“Sellar un envase” significa que el envase se cierra de forma que es hermético, no permite el intercambio de gases entre el exterior y el interior y mantiene el contenido estéril.

Los términos “reactivo” o “precursor” se refieren a un material intermedio o de partida usado para el procedimiento de ensamblaje que conduce a un profármaco de la presente invención.

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

Si un grupo funcional químico se acopla con otro grupo funcional químico, la estructura química resultante se denomina un “enlace”. Por ejemplo, la reacción de un grupo amina con un grupo carboxilo produce un enlace amida.

“Grupos funcionales reactivos” son grupos funcionales químicos del resto de la cadena principal, que están conectados al resto hiperramificado.

“Grupo funcional” es la expresión colectiva usada para “grupo funcional reactivo”, “grupo funcional interconectado degradable”, o “grupo funcional conjugado”.

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

funcional interconectado biodegradable", "grupo funcional biodegradable interconectado" y "grupo funcional interconectado" se usan como sinónimas.

Las expresiones "grupo bloqueante" o "grupo de remate" se usan de forma sinónima y se refieren a restos que están conectados de forma irreversible a grupos
5 funcionales reactivos para hacer que no sean capaces de reaccionar, por ejemplo, con grupos funcionales químicos.

Las expresiones "grupo que protege" o "grupo protector" se refieren a un resto que está conectado de forma reversible a grupos funcionales reactivos para hacer que sean incapaces de reaccionar, por ejemplo, con otros grupos funcionales químicos.

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

La expresión "grupo funcional polimerizable" se refiere a grupos funcionales químicos, que participan en una reacción de polimerización de tipo ligadura y son parte
15 del reactivo de reticulación y el reactivo de la cadena principal.

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

El término "derivados" se refiere a grupos funcionales químicos sustituidos de
20 forma adecuada, con grupos protectores y/o activantes, o a formas activadas de un grupo funcional químico correspondiente, que son conocidos para el experto en la materia. Por ejemplo, las formas activadas de grupos carboxilo incluyen, pero sin limitar, ésteres activos, tales como éster de succinimidilo, éster de benzotriazilo, éster de nitrofenilo, éster de pentafluorofenilo, éster de azabenzotriazilo, halogenuros de
25 acilo, anhídridos mixtos o simétricos, acil-imidazol.

La expresión "conector no escindible por enzimas" se refiere a conectores que son degradables por hidrólisis en condiciones fisiológicas sin actividad enzimática.

"Conector que no es biológicamente activo" significa un conector que no presenta efectos farmacológicos del fármaco (D-H) derivado del resto biológicamente
30 activo.

Las expresiones "espaciador", "grupo espaciador", "molécula espaciadora", y "resto espaciador" se usan de forma intercambiable y si se usan para describir un resto presente en el vehículo de hidrogel de la invención, se refieren a cualquier resto adecuado para conectar dos restos, tal como alquilo C₁₋₅₀, alquenilo C₂₋₅₀ o alquinilo C₂₋₅₀, cuyo fragmento está opcionalmente interrumpido por uno o más grupos
35

seleccionados de -NH-, -N(alquilo C₁₋₄)-, -O-, -S-, -C(O)-, -C(O)NH-, -C(O)N(alquilo C₁₋₄)-, -O-C(O)-, -S(O)-, -S(O)₂-, heterociclilo de 4 a 7 miembros, fenilo o naftilo.

Los términos "terminal", "extremo" o "extremo distal" se refieren a la posición de un grupo funcional o enlace dentro de una molécula o resto, de modo que dicho grupo
5 funcional puede ser un grupo funcional químico y el enlace puede ser un enlace degradable o permanente, caracterizado por estar localizado adyacente o en un enlace entre dos restos o en el extremo de una cadena oligomérica o polimérica.

Las frases "en forma unida" o "resto" se refieren a subestructuras que son parte de una molécula mayor. La frase "en forma unida" se usa para simplificar la referencia
10 a restos nombrar o listar reactivos, materiales de partida o materiales de partida hipotéticos conocidos en la materia, y por la cual "en forma unida" significa que, por ejemplo, uno o más radicales hidrógeno (-H), o uno o más grupos activantes o protectores presentes en los reactivos o materiales de partida, no están presentes en el resto.

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

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

La expresión "cadena polimérica basada en polietilenglicol" o "cadena basada
25 en PEG" se refiere a una cadena molecular oligo o polimérica.

Preferiblemente, dicha cadena polimérica basada en polietilenglicol está conectada a un núcleo de ramificación, es una cadena de polietilenglicol lineal de la cual un extremo está conectado al núcleo de ramificación y el otro a un resto
30 dendrítico hiperramificado. Se entiende que una cadena basada en PEG se puede terminar o estar interrumpida por grupos alquilo o arilo opcionalmente sustituidos con heteroátomos y grupos funcionales químicos.

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

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

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

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

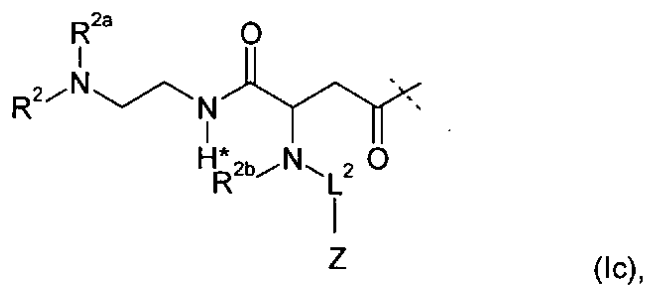
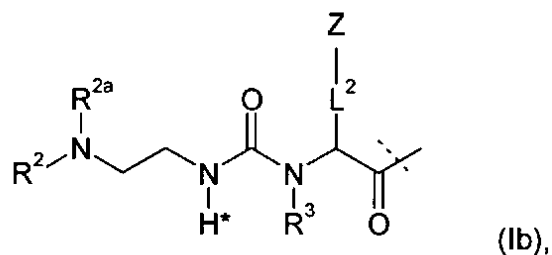
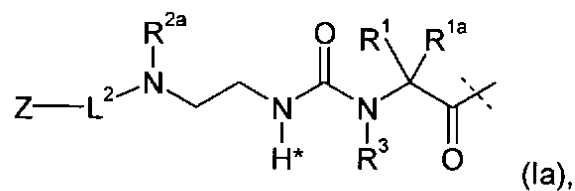
Preferiblemente, en la fórmula (I) X es $C(R^3R^{3a})$ y R^{3a} es $N(R^{2b})C(O)R^4$.

5 Preferiblemente, en la fórmula (I) X es $C(R^3R^{3a})$ y R^{3a} se reemplaza por L^2-Z .

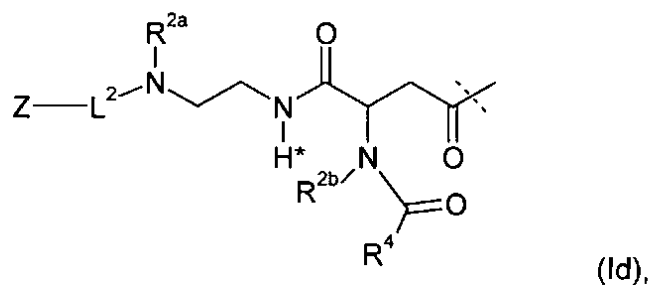
Preferiblemente, X es $C(R^3R^{3a})$, R^{3a} es $N(R^{2b})-L^2-Z$.

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

10



15



donde R^1 , R^{1a} , R^2 , R^{2a} , R^{2b} , R^3 , R^4 , L^2 , Z tienen el significado indicado en la presente memoria y donde L^1 se sustituye opcionalmente, siempre que el hidrógeno marcado con el asterisco en la fórmula (Ia) a (Id) no se reemplace con un sustituyente.

Preferiblemente, L^1 no se sustituye adicionalmente (aparte del sustituyente obligatorio L^2 -Z).

Preferiblemente, el resto de insulina está unido a L^1 por el nitrógeno N^{aA1} o por el nitrógeno de una cadena lateral de lisina del resto de insulina.

Preferiblemente, el resto de insulina es insulina humana recombinante.

Como se muestra por ejemplo en las fórmulas (Ia) a (Id), un hidrógeno se reemplaza con el grupo L^2 -Z.

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

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

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

R^9 , R^{9a} , R^{9b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H ; T ; y alquilo C_{1-50} ; alqueno C_{2-50} ; o alquino C_{2-50} , en los que T ; alquilo C_{1-50} ; alqueno C_{2-50} ; y alquino C_{2-50} están opcionalmente sustituidos con uno o más R^{10} , que son iguales o diferentes y en los que el alquilo C_{1-50} ; alqueno C_{2-50} ; y alquino C_{2-50} están opcionalmente interrumpidos por uno o más grupos seleccionados del grupo que consiste en T , $-C(O)O-$; $-O-$; $-C(O)-$; $-C(O)N(R^{11})-$; $-S(O)_2N(R^{11})-$; $-S(O)N(R^{11})-$; $-S(O)_2-$;

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

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

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

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

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

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

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

R⁹, R^{9a}, R^{9b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; Z; T; y alquilo C₁₋₅₀; alquenilo C₂₋₅₀; o alquinilo C₂₋₅₀, en los que T; alquilo C₁₋₅₀; alquenilo C₂₋₅₀; y alquinilo C₂₋₅₀ están opcionalmente sustituidos con uno o más R¹⁰, que son iguales o

diferentes y en los que el alquilo C_{1-50} ; alqueno C_{2-50} ; y alquino C_{2-50} están opcionalmente interrumpidos por uno o más grupos seleccionados del grupo que consiste en T, $-C(O)O-$; $-O-$; $-C(O)-$; $-C(O)N(R^{11})-$; $-S(O)_2N(R^{11})-$; $-S(O)N(R^{11})-$; $-S(O)_2-$; $-S(O)-$; $-N(R^{11})S(O)_2N(R^{11a})-$; $-S-$; $-N(R^{11})-$; $-OC(O)R^{11}$; $-N(R^{11})C(O)-$; $-N(R^{11})S(O)_2-$; $-N(R^{11})S(O)-$; $-N(R^{11})C(O)O-$; $-N(R^{11})C(O)N(R^{11a})-$; y $-OC(O)N(R^{11}R^{11a})-$;

T se selecciona del grupo que consiste en fenilo; naftilo; indenilo; indanilo; tetralinilo; cicloalquilo C_{3-10} ; heterociclilo de 4 a 7 miembros; o heterobiciclilo de 9 a 11 miembros, en el que T está opcionalmente sustituido con uno o más R^{10} , que son iguales o diferentes;

- 10 R^{10} es Z; halógeno; CN; oxo ($=O$); $COOR^{12}$; OR^{12} ; $C(O)R^{12}$; $C(O)N(R^{12}R^{12a})$; $S(O)_2N(R^{12}R^{12a})$; $S(O)N(R^{12}R^{12a})$; $S(O)_2R^{12}$; $S(O)R^{12}$; $N(R^{12})S(O)_2N(R^{12a}R^{12b})$; SR^{12} ; $N(R^{12}R^{12a})$; NO_2 ; $OC(O)R^{12}$; $N(R^{12})C(O)R^{12a}$; $N(R^{12})S(O)_2R^{12a}$; $N(R^{12})S(O)R^{12a}$; $N(R^{12})C(O)OR^{12a}$; $N(R^{12})C(O)N(R^{12a}R^{12b})$; $OC(O)N(R^{12}R^{12a})$; o alquilo C_{1-6} , en el que el alquilo C_{1-6} está opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, que son iguales o diferentes;

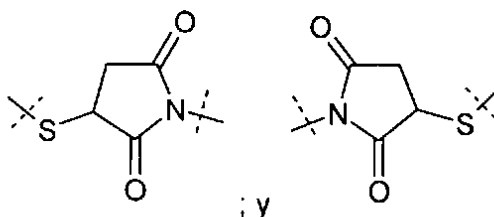
R^{11} , R^{11a} , R^{12} , R^{12a} , R^{12b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; Z; o alquilo C_{1-6} , en el que el alquilo C_{1-6} está opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, que son iguales o diferentes;

con la condición de que solo uno de R^9 , R^{9a} , R^{9b} , R^{10} , R^{11} , R^{11a} , R^{12} , R^{12a} , R^{12b} sea Z.

- 20 Más preferiblemente, L^2 es una cadena de alquilo C_{1-20} , que está opcionalmente interrumpida con uno o más grupos independientemente seleccionados de $-O-$; y $C(O)N(R^{3aa})$; opcionalmente sustituida con uno o más grupos independientemente seleccionados de OH; y $C(O)N(R^{3aa}R^{3aaa})$; y en el que R^{3aa} , R^{3aaa} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; y alquilo C_{1-4} .

- 25 Preferiblemente, L^2 tiene un peso molecular en el intervalo de 14 g/mol a 750 g/mol.

Preferiblemente, L^2 está unido a Z por un grupo terminal seleccionado de



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

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

Preferiblemente, el hidrogel Z es un hidrogel insoluble en agua, basado en polietilenglicol PEG, biodegradable. La expresión "basado en PEG" como se entiende en la presente memoria significa que la proporción en masa de cadenas de PEG en el hidrogel es al menos 10% en peso, preferiblemente al menos 25% en peso, basado en el peso total del hidrogel. El resto puede estar compuesto de otros espaciadores y/u oligómeros o polímeros, tales como oligo- o polisilanos.

Además, la expresión "insoluble en agua" se refiere a una red molecular reticulada tridimensional hinchable que forma el hidrogel. Si el hidrogel está suspendido en un gran exceso de agua o tampón acuoso de osmolalidad fisiológica, puede absorber una cantidad sustancial de agua, p. ej., hasta 10 veces en una base de porcentaje en peso, y por lo tanto se puede hinchar, pero después de eliminar el exceso de agua retiene todavía la estabilidad física de un gel y la forma. Dicha forma puede ser de cualquier geometría y se entiende que dicho objeto de hidrogel individual se debe considerar como una sola molécula que consiste en componentes, en la que cada componente está conectado a otro componente por enlaces químicos.

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

Preferiblemente, L^2 está conectado a un resto de cadena principal.

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

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

Preferiblemente, la suma de los grupos funcionales interconectados y conjugados de hidrogel-fármaco conectado-conector y grupos de remate de un resto de cadena principal, se divide por igual entre el número de cadenas poliméricas basadas en PEG que se extienden desde el núcleo de ramificación. Por ejemplo, si
5 hay 32 grupos funcionales interconectados y conjugados de hidrogel-fármaco conectado-conector y grupos de remate, 8 grupos los pueden proporcionar cada uno de las cuatro cadenas poliméricas basadas en PEG que se extienden desde el núcleo, preferiblemente mediante restos dendríticos unidos al extremo de cada cadena polimérica basada en PEG. Alternativamente, 4 grupos pueden proporcionar cada uno
10 de las 8 cadenas poliméricas basadas en PEG que se extienden desde el núcleo, o 2 grupos cada una de las 16 cadenas poliméricas basadas en PEG. Si el número de cadenas poliméricas basadas en PEG que se extienden desde el núcleo de ramificación no permite una distribución igualitaria, se prefiere que la desviación del número medio de la suma de los grupos funcionales interconectados y conjugados de
15 hidrogel-fármaco conectado-conector y grupos de remate se mantenga en un mínimo.

En dichos profármacos ligados a vehículo de acuerdo con la invención, es conveniente que prácticamente toda la liberación de fármaco (>90%) se produzca antes de que se haya producido una cantidad significativa de liberación de los restos de cadena principal (<10%). Esto se puede lograr ajustando la semivida del
20 profármaco ligado a vehículo frente a la cinética de degradación del hidrogel de acuerdo con la invención.

Preferiblemente, un resto de cadena principal se caracteriza por tener un núcleo de ramificación, a partir del cual se extienden al menos 3 cadenas poliméricas basadas en PEG. Por consiguiente, en un aspecto preferido de la presente invención,
25 el reactivo de la cadena principal comprende un núcleo de ramificación, a partir del cual se extienden al menos 3 cadenas poliméricas basadas en PEG. Dichos núcleos de ramificación pueden estar compuestos de poli u oligoalcoholes en forma unida, preferiblemente pentaeritritol, tripentaeritritol, hexaglicerina, sacarosa, sorbitol, fructosa, manitol, glucosa, celulosa, amilosas, almidones, almidones hidroxialquílicos,
30 poli(alcoholes vinílicos), dextranos, hialuronanos, o los núcleos de ramificación pueden estar compuestos de poli- u oligoaminas tales como ornitina, ácido diaminobutírico, trilisina, tetralisina, pentalisina, hexalisina, heptalisina, octalisina, nonalisina, decalisina, undecalisina, dodecalisina, tridecalisina, tetradecalisina, pentadecalisina u oligolisinas, polietileniminas, polivinilaminas en forma unida.

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

Preferiblemente, una cadena polimérica basada en PEG es un derivado de polietilenglicol sustituido de forma adecuada basado en PEG.

Las estructuras preferidas para las correspondientes cadenas poliméricas basadas en PEG que se extienden desde un núcleo de ramificación contenido en un resto de cadena principal son derivados de PEG de múltiples brazos, como por ejemplo, los detallados en la lista de productos de JenKem Technology, EE.UU. (acceso mediante descarga en www.jenkemusa.com el 28 de julio, 2009), derivados de PEG de 4 brazos (núcleo de pentaeritritol), derivados de PEG de 8 brazos (núcleo de hexaglicerina) y derivados de PEG de 8 brazos (núcleo de tripentaeritritol). Los más preferidos son PEG-amina de 4 brazos (núcleo de pentaeritritol) y PEG-Carboxilo de 4 brazos (núcleo de pentaeritritol), PEG-amina de 8 brazos (núcleo de hexaglicerina), PEG-Carboxilo de 8 brazos (núcleo de hexaglicerina), PEG-amina de 8 brazos (núcleo de tripentaeritritol) y PEG-Carboxilo de 8 brazos (núcleo de tripentaeritritol). Los pesos moleculares preferidos para dichos derivados de PEG de múltiples brazos en un resto de cadena principal son de 1 kDa a 20 kDa, más preferiblemente de 1 kDa a 15 kDa e incluso más preferiblemente de 1 kDa a 10 kDa. Se entiende que los grupos amina terminales de las moléculas de múltiples brazos mencionadas antes, están presentes en forma unida en el resto de cadena principal para proporcionar más grupos funcionales interconectados y grupos funcionales reactivos de un resto de cadena principal.

Se prefiere que la suma de grupos funcionales interconectados y grupos funcionales reactivos de un resto de cadena principal se divida por igual entre el número de cadenas poliméricas basadas en PEG que se extienden desde el núcleo de

ramificación. Si el número de cadenas poliméricas basadas en PEG que se extienden desde el núcleo de ramificación no permite una distribución igualitaria, se prefiere que la desviación del número medio de la suma de los grupos funcionales interconectados y reactivos por cadena polimérica basada en PEG se mantenga en un mínimo.

- 5 Más preferiblemente, la suma de grupos funcionales interconectados y reactivos de un resto de cadena principal se divide por igual entre el número de cadenas poliméricas basadas en PEG que se extienden desde el núcleo de ramificación. Por ejemplo, si hay 32 grupos funcionales interconectados y grupos funcionales reactivos, 8 grupos los pueden proporcionar cada uno de las cuatro
- 10 cadenas poliméricas basadas en PEG que se extienden desde el núcleo, preferiblemente mediante restos dendríticos unidos al extremo de cada cadena polimérica basada en PEG. Alternativamente, 4 grupos los pueden proporcionar cada uno de las 8 cadenas poliméricas basadas en PEG que se extienden desde el núcleo, o 2 grupos cada una de las 16 cadenas poliméricas basadas en PEG.
- 15 Dichos grupos funcionales adicionales los pueden proporcionar restos dendríticos. Preferiblemente, cada resto dendrítico tiene un peso molecular en el intervalo de 0,4 kDa a 4 kDa, más preferiblemente de 0,4 kDa a 2 kDa. Preferiblemente, cada resto dendrítico tiene al menos 3 ramificaciones y al menos 4 grupos funcionales reactivos, y como máximo 63 ramificaciones y 64 grupos
- 20 funcionales reactivos, se prefieren 7 ramificaciones y al menos 8 grupos funcionales reactivos y como máximo 31 ramificaciones y 32 grupos funcionales reactivos.

Los ejemplos de dichos restos dendríticos comprenden trilisina, tetralisina, pentalisina, hexalisina, heptalisina, octalisina, nonalisina, decalisina, undecalisina, dodecalisina, tridecalisina, tetradecalisina, pentadecalisina, hexadecalisina,

25 heptadecalisina, octadecalisina, nonadecalisina en forma unida. Los ejemplos de dichos restos dendríticos preferidos comprenden oftrilisina, tetralisina, pentalisina, hexalisina, heptalisina en forma unida, los más preferidos trilisina, pentalisina o heptalisina, ornitina, ácido diaminobutírico en forma unida.

Lo más preferiblemente, el vehículo de hidrogel de la presente invención se

30 caracteriza porque el resto de cadena principal tiene un carbono cuaternario de fórmula $C(A-Hyp)_4$, en la que A es independientemente una cadena polimérica basada en polietilenglicol unida por el extremo al carbono cuaternario por un enlace covalente permanente y el extremo distal de la cadena polimérica basada en PEG está unida covalentemente a

35 un resto dendrítico Hyp, teniendo cada resto dendrítico Hyp al menos 4 grupos

funcionales que representan los grupos funcionales interconectados y grupos funcionales reactivos.

Preferiblemente, cada A se selecciona independientemente de la fórmula -
(CH₂)_{n1}(OCH₂CH₂)_nX-, en la que n1 es 1 ó 2; n es un número entero en el intervalo de
5 5 a 50; y X es un grupo funcional químico que une covalentemente A e Hyp.

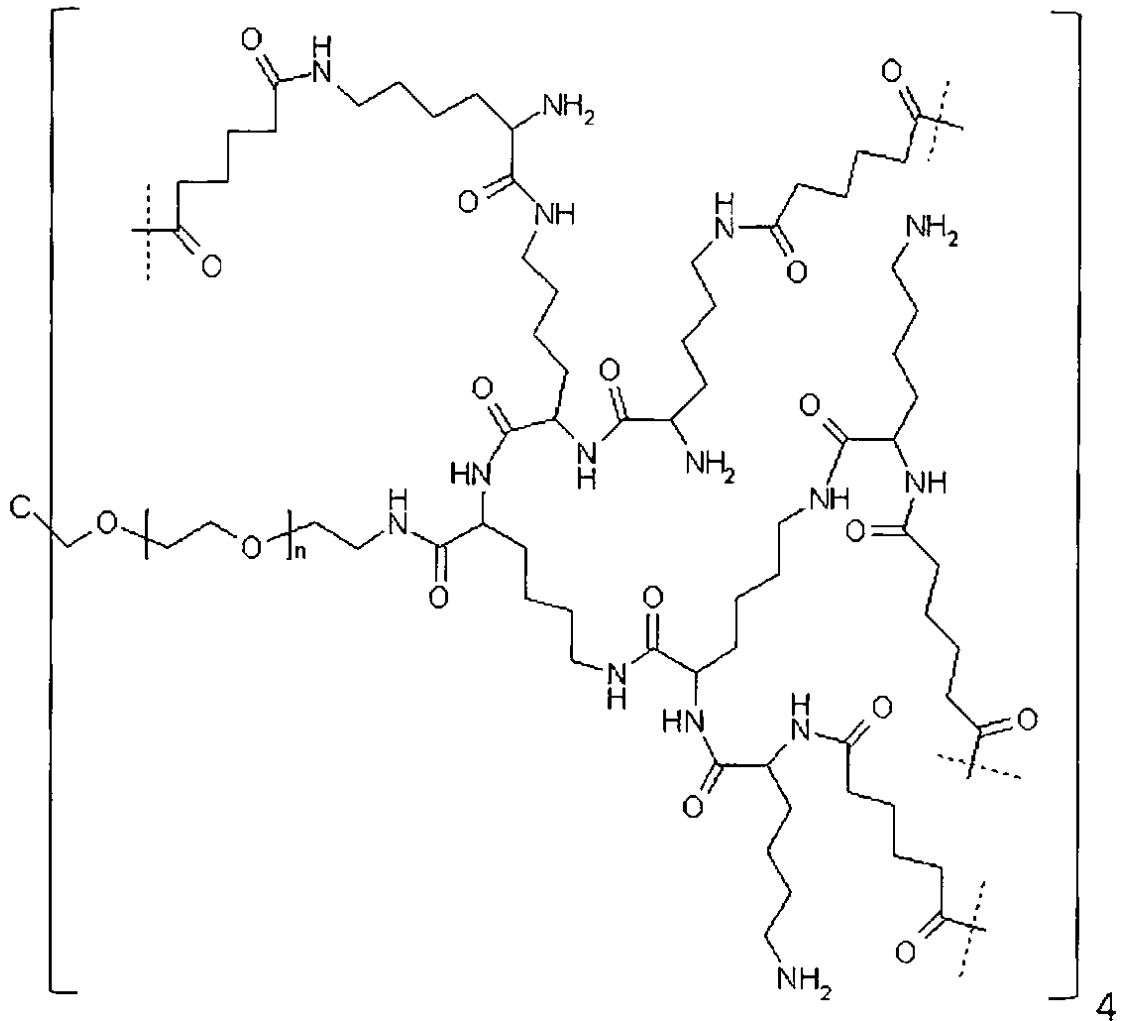
Preferiblemente, A e Hyp están covalentemente unidos por un enlace amida.

Preferiblemente, el resto dendrítico Hyp es un polipéptido hiperramificado.
Preferiblemente, el polipéptido hiperramificado comprende lisina en forma unida.
Preferiblemente, cada resto dendrítico Hyp tiene un peso molecular en el intervalo de
10 0,4 kDa a 4 kDa. Se entiende que un resto de cadena principal C(A-Hyp)₄ puede
constar de restos dendríticos Hyp iguales o diferentes y que se puede elegir
independientemente cada Hyp. Cada resto Hyp consta de entre 5 y 32 lisinas,
preferiblemente de al menos 7 lisinas, es decir cada resto Hyp está compuesto de
entre 5 y 32 lisinas en forma unida, preferiblemente de al menos 7 lisinas en forma
15 unida. Lo más preferiblemente, Hyp está compuesto por heptalisinilo-

La reacción de grupos funcionales polimerizables y reactivo de la cadena
principal, más específicamente de Hyp con los grupos funcionales polimerizables de
los reactivos de reticulación basados en polietilenglicol produce un enlace amida
permanente.

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

A continuación se muestra un resto de cadena principal preferido, las líneas de
trazos indican enlaces biodegradables de interconexión con los restos de reticulación y
25 n es un número entero de 5 a 50.



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

- 5 Las expresiones "degradable por hidrólisis", "biodegradable" o "escindible por hidrólisis", "autoescindible", o "autoescisión", "autoescindible", "transitorio" o "temporal" se refieren en el contexto de la presente invención, a enlaces y uniones que son degradables o escindibles por hidrólisis no enzimática en condiciones fisiológicas (tampón acuoso a pH 7,4, 37°C) con semividas en el intervalo de 1 hora a 3 meses,
- 10 incluyendo, pero sin limitar, aconitilos, acetales, amidas, anhídridos carboxílicos, ésteres, iminas, hidrazonas, amidas del ácido maleámico, ortoésteres, fosfamidas, fosfoésteres, ésteres de fosfosililo, ésteres de sililo, ésteres sulfónicos, carbamatos aromáticos, combinaciones de los mismos, y similares.

- Si están presentes en un hidrogel de acuerdo con la invención como grupo
- 15 funcional interconectado degradable, los enlaces biodegradables preferidos son

ésteres carboxílicos, carbonatos, fosfoésteres y ésteres de ácidos sulfónicos y los más preferidos son ésteres carboxílicos o carbonatos.

Los enlaces permanentes son degradables por hidrólisis no enzimática en condiciones fisiológicas (tampón acuoso a pH 7,4, 37°C) con semividas de 6 meses o
5 más, tal como, por ejemplo, los amídicos.

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

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

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

Preferiblemente, el vehículo de hidrogel biodegradable está compuesto de restos de cadenas principales interconectados por enlaces degradables por hidrólisis y los restos de cadenas principales están unidos entre sí por restos de reticulación.

El vehículo de hidrogel biodegradable puede contener uno o más tipos
30 diferentes de restos de reticulación, preferiblemente uno. El resto de reticulación puede ser una molécula lineal o ramificada y preferiblemente es una molécula lineal. En una realización preferida de la invención, el resto de reticulación está conectado a los restos de cadenas principales por al menos dos enlaces biodegradables.

Preferiblemente, los restos de reticulación tienen un peso molecular en el
35 intervalo de 60 Da a 5 kDa, más preferiblemente, de 0,5 kDa a 4 kDa, incluso más

preferiblemente de 1 kDa a 4 kDa, incluso más preferiblemente de 1 kDa a 3 kDa. En una realización, un resto de reticulación consiste en un polímero.

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

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

Si se usa en referencia a un resto de reticulación o una cadena polimérica basada en PEG conectada a un núcleo de ramificación, la expresión "basado en PEG" se refiere a un resto de reticulación o cadena polimérica basada en PEG que comprende al menos 20% en peso de restos de etilenglicol.

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

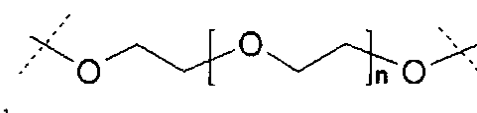
Preferiblemente, los restos de reticulación se basan en PEG, preferiblemente representados por solo una cadena molecular basada en PEG. Preferiblemente, los restos de reticulación basados en polietilenglicol son cadenas hidrocarbonadas que comprenden unidades de etilenglicol, que comprenden opcionalmente otros grupos funcionales químicos, en los que los restos de reticulación basados en polietilenglicol comprenden al menos cada uno m unidades de etilenglicol, en los que m es un número entero en el intervalo de 3 a 100, preferiblemente de 10 a 70. Preferiblemente, los restos de reticulación basados en polietilenglicol tienen un peso molecular en el intervalo de 0,5 kDa a 5 kDa.

En una realización preferida de la presente invención, el resto de reticulación consiste en PEG, que está conectado de forma simétrica por enlaces éster a dos espaciadores alfa,omega-dicarboxílicos alifáticos proporcionados por los restos de cadenas principales conectados al resto dendrítico hiperramificado por enlaces amida permanentes.

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

Preferiblemente, hay un enlace amida permanente entre el resto dendrítico hiperramificado y el resto espaciador conectado a un resto de cadena principal y en el otro lado está conectado a un resto de reticulación.

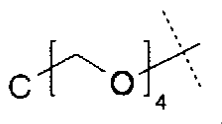
Un resto de reticulación preferido se muestra a continuación; las líneas de trazos indican enlaces biodegradables de interconexión a los restos de cadenas principales:



en el que n es un número entero de 5 a 50.

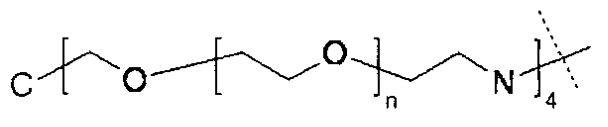
Preferiblemente, el vehículo de hidrogel está compuesto de restos de cadenas principales interconectados por enlaces degradables por hidrólisis.

Más preferiblemente, los restos de cadenas principales comprenden un núcleo de ramificación de la siguiente fórmula:



en la que la línea de trazos indica la unión al resto de cadena principal restante.

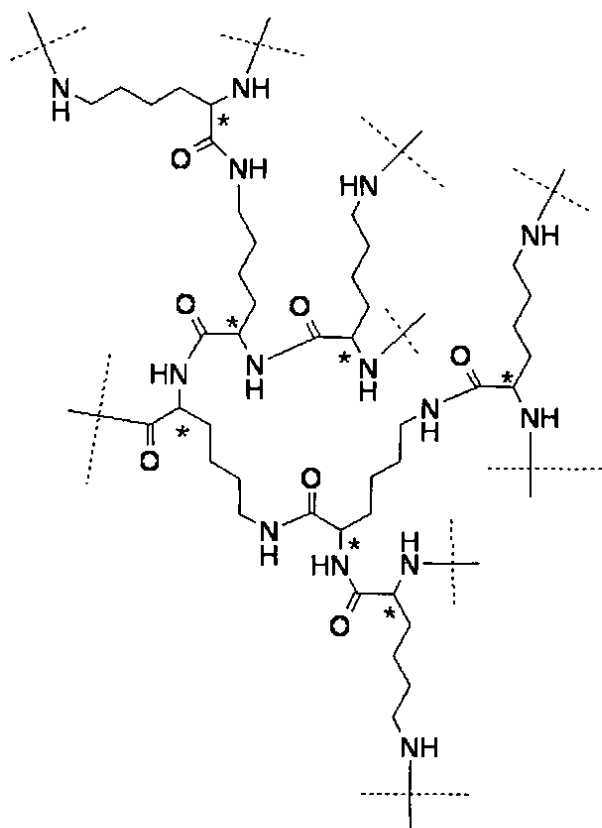
Más preferiblemente, los restos de cadenas principales comprenden una estructura de la siguiente fórmula:



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

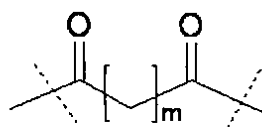
Preferiblemente, el resto de cadena principal comprende un resto
5 hiperramificado Hyp.

Más preferiblemente, el resto de cadena principal comprende un resto hiperramificado Hyp de la siguiente fórmula:



en la que las líneas de trazos indican la unión al resto de la molécula y los átomos de
10 carbono marcados con asteriscos indican la configuración S.

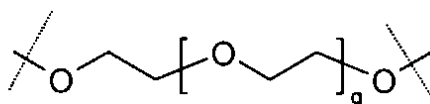
Preferiblemente, los restos de cadena principal están unidos a al menos un espaciador de la siguiente fórmula:



15 en la que una de las líneas de trazos indica la unión al resto hiperramificado Hyp y la segunda línea de trazos indica la unión al resto de la molécula; y

en el que m es un número entero de 2 a 4.

Preferiblemente, los restos de cadenas principales están unidos entre sí por restos de reticulación que tienen la siguiente estructura



5 en la que

q es un número entero de 3 a 100, preferiblemente de 5 a 50.

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

Preferiblemente, L^2 está unido a Z por un grupo tiosuccinimida que a su vez
15 está unido al resto de cadena principal del hidrogel por un espaciador, tal como una cadena de oligoetilenglicol. Preferiblemente, la unión de esta cadena espaciadora al resto de cadena principal es un enlace permanente, preferiblemente un enlace amida.

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

20 Para los grupos funcionales interconectados, la expresión "degradable por hidrólisis" se refiere en el contexto de la presente invención, a enlaces y uniones que son degradables por hidrólisis no enzimática en condiciones fisiológicas (tampón acuoso a pH 7,4, 37°C) con semividas en el intervalo de 1 hora a 3 meses, incluyendo, pero sin limitar, aconitilos, acetales, anhídridos carboxílicos, ésteres, iminas, hidrazonas, amidas del ácido maleámico, ortoésteres, fosfamidas, fosfoésteres,
25 ésteres de fosfosililo, ésteres de sililo, ésteres sulfónicos, carbamatos aromáticos, combinaciones de los mismos, y similares. Los enlaces biodegradables preferidos son ácidos carboxílicos, carbonatos, fosfoésteres y ésteres de ácidos sulfónicos y los más preferidos son los ésteres carboxílicos o carbonatos. Se entiende que para estudios *in vitro* se pueden usar condiciones aceleradas, tales como por ejemplo pH 9, 37°C,
30 tampón acuoso, con propósitos prácticos.

Los enlaces permanentes son degradables por hidrólisis no enzimática en condiciones fisiológicas (tampón acuoso a pH 7,4, 37°C) con semividas de 6 meses o más, tal como, por ejemplo, los amídicos.

La degradación del vehículo de hidrogel biodegradable de acuerdo con la invención es una reacción de múltiples etapas en la que se escinde una multitud de enlaces degradables dando como resultado productos de degradación que pueden ser solubles en agua o insolubles en agua. Sin embargo, los productos de degradación insolubles en agua pueden comprender además enlaces degradables, de modo que se pueden escindir para dar productos de degradación solubles en agua. Estos productos de degradación solubles en agua pueden comprender uno o más restos de cadenas principales. Se entiende que los restos de cadenas principales liberados pueden, por ejemplo, estar conjugados de forma permanente a grupos espaciadores o de bloqueo o conectores o grupos de afinidad y/o productos de degradación del conector del profármaco, y que estos productos de degradación solubles en agua pueden comprender enlaces degradables.

Las estructuras del núcleo de ramificación, cadenas poliméricas basadas en PEG, restos dendríticos hiperramificados y restos unidos a los restos dendríticos hiperramificados se pueden inferir de las correspondientes descripciones proporcionadas en las secciones que cubren los vehículos de hidrogel de la presente invención. Se entiende que la estructura de un degradante depende del tipo de hidrogel de acuerdo con la invención que sufre la degradación.

La cantidad total de restos de cadenas principales se puede medir en disolución después de la degradación completa del hidrogel de acuerdo con la invención, y durante la degradación se pueden separar fracciones de productos de degradación de la cadena principal solubles del hidrogel insoluble de acuerdo con la invención y se pueden cuantificar sin interferencia de los otros productos de degradación solubles liberados del hidrogel de acuerdo con la invención. Un hidrogel objeto de acuerdo con la invención se puede separar del exceso de agua o tampón de osmolalidad fisiológica por sedimentación o centrifugación. La centrifugación se puede realizar de forma que el líquido sobrenadante proporcione al menos 10% en volumen del hidrogel hinchado de acuerdo con la invención. Los productos de degradación del hidrogel solubles permanecen en el líquido sobrenadante acuoso después de dicha etapa de sedimentación o centrifugación, y los productos de degradación solubles en agua que comprenden uno o más restos de cadenas principales se pueden detectar sometiendo partes alícuotas de dicho líquido sobrenadante a separación adecuada y/o a métodos analíticos.

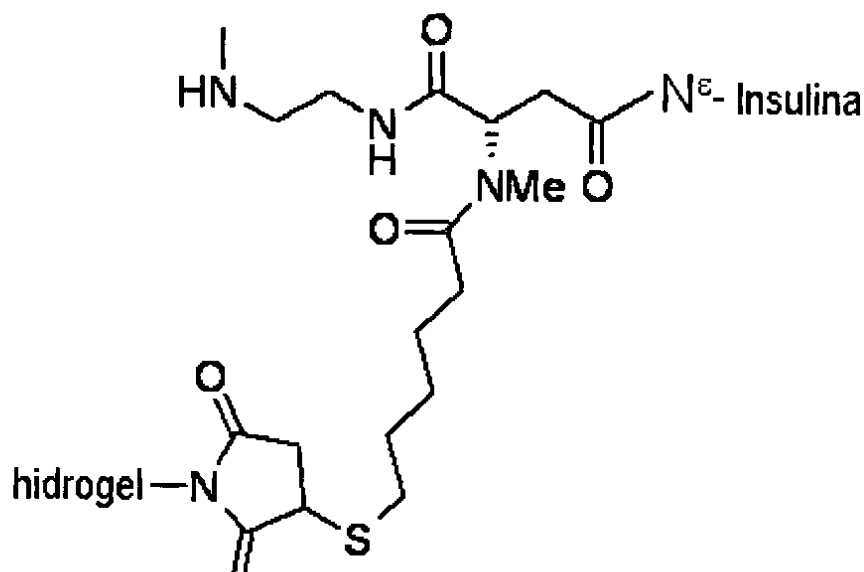
Preferiblemente, los productos de degradación solubles en agua se pueden separar de los productos de degradación insolubles en agua por filtración a través de

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

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

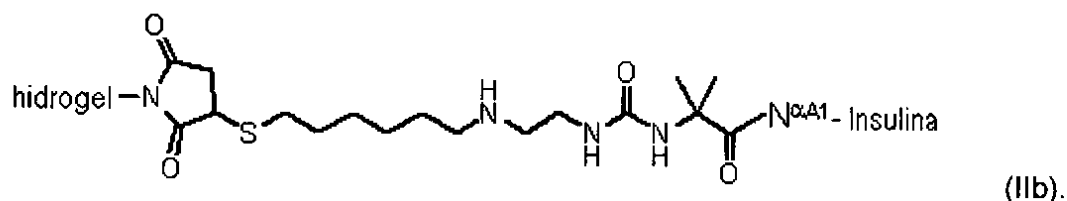
En dichos profármacos de insulina ligados a hidrogel de acuerdo con la invención, es conveniente que prácticamente toda la liberación de insulina (>90%) se produzca antes de que se haya producido una cantidad significativa de liberación de
15 los productos de degradación de la cadena principal (<10%). Esto se puede lograr ajustando la semivida del profármaco de insulina ligado a hidrogel frente a la cinética de degradación del hidrogel.

Preferiblemente son profármacos de insulina que tienen la estructura de fórmula (IIa) o (IIb)



(IIa),

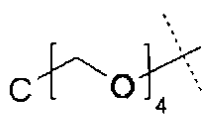
donde N $^{\epsilon}$ -Insulina se refiere a insulina conectada mediante una cadena lateral de lisina; o



Preferiblemente, el hidrogel en (IIa) o (IIb) es un hidrogel insoluble en agua basado en polietilenglicol (PEG) biodegradable.

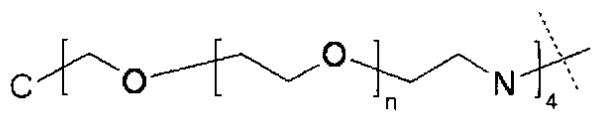
- 5 Preferiblemente, el hidrogel en (IIa) o (IIb) está compuesto de restos de cadenas principales interconectados por enlaces degradables por hidrólisis.

Más preferiblemente, los restos de cadenas principales comprenden un núcleo de ramificación de la siguiente fórmula:



- 10 en la que la línea de trazos indica la unión al resto de cadena principal restante.

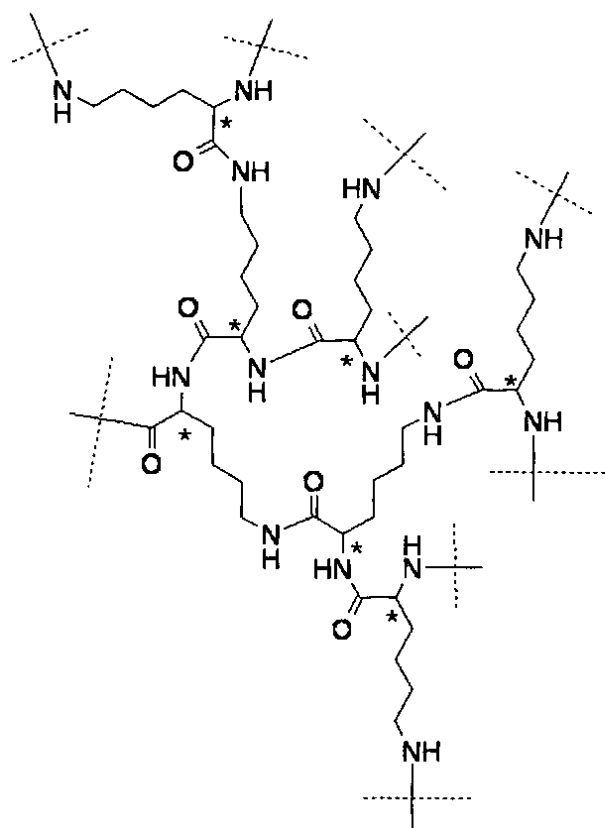
Más preferiblemente, los restos de cadenas principales comprenden una estructura de la siguiente fórmula:



- 15 en la que n es un número entero de 5 a 50 y la línea de trazos indica la unión al resto de la molécula.

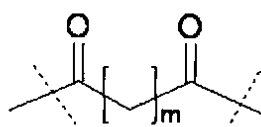
Preferiblemente, el resto de cadena principal comprende un resto hiperramificado Hyp.

Más preferiblemente, el resto de cadena principal comprende un resto hiperramificado Hyp de la siguiente fórmula:



en la que las líneas de trazos indican la unión al resto de la molécula y los átomos de carbono marcados con asteriscos indican la configuración S.

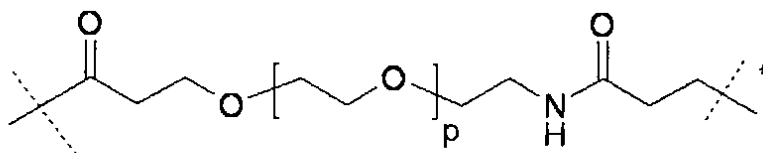
Preferiblemente, los restos de cadena principal están unidos a al menos un
5 espaciador de la siguiente fórmula:



en la que una de las líneas de trazos indica la unión al resto hiperramificado Hyp y la
segunda línea de trazos indica la unión al resto de la molécula; y

10 en el que m es un número entero de 2 a 4.

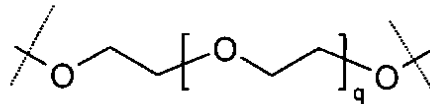
Preferiblemente, los restos de cadenas principales están unidos a al menos un
espaciador de la siguiente fórmula:



en la que la línea de trazos marcada con el asterisco indica el enlace entre el hidrogel
15 y el N del grupo tiosuccinimida;

en la que la otra línea de trazos indica la unión a Hyp; y
 en la que p es un número entero de 0 a 10.

Preferiblemente, los restos de cadenas principales están unidos entre sí por restos de reticulación que tienen la siguiente estructura



5

en la que

q es un número entero de 3 a 100;

La velocidad de hidrólisis de los enlaces biodegradables entre los restos de cadenas principales y de reticulación está determinada por el número y tipo de átomos conectados adyacentes al grupo éster carboxi de PEG. Por ejemplo, seleccionado de ácido succínico, adípico o glutárico para la formación de éster de PEG, se pueden variar las semividas de degradación del resto de reticulación.

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

En un método preferido de preparación, el hidrogel se genera por reacciones de ligamiento químicas. El hidrogel se puede formar a partir de dos productos macromoleculares con funcionalidades complementarias que dan una reacción tal como una condensación o una adición. Uno de dichos materiales de partida es un reactivo de reticulación con al menos dos grupos funcionales idénticos y el otro material de partida es un reactivo de cadena principal homomultifuncional. Los grupos funcionales adecuados presentes en el reactivo de reticulación incluyen amino, ácido carboxílico y derivados, maleimida y otros aceptores de Michael alfa,beta-insaturados tales como vinilsulfona, tiol, grupos hidroxilo. Los grupos funcionales adecuados presentes en el reactivo de la cadena principal incluyen, pero sin limitar, amino, ácido carboxílico y derivados, maleimida y otros aceptores de Michael alfa,beta-insaturados tales como vinilsulfona, tiol, grupos hidroxilo.

Si los grupos funcionales reactivos del reactivo de reticulación se usan en una cantidad por debajo de la estequiométrica con respecto a los grupos funcionales

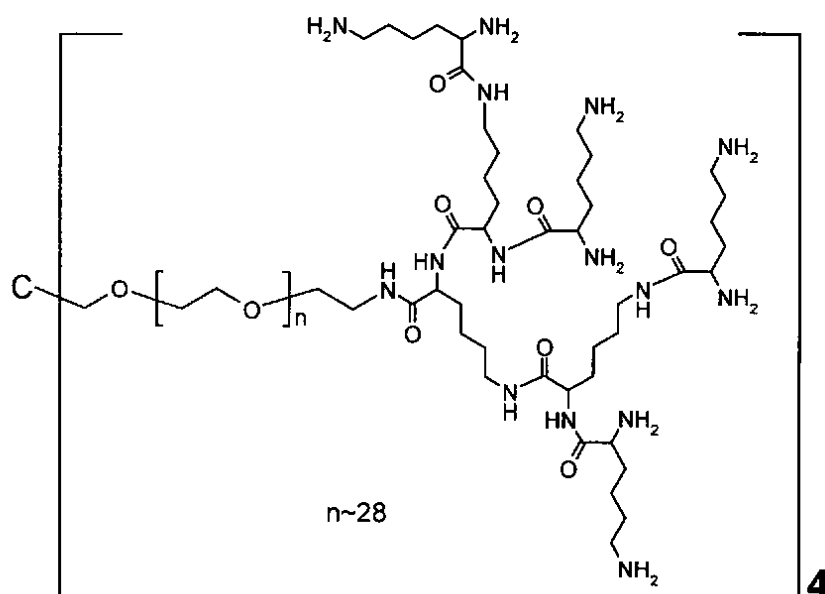
reactivos de la cadena principal, el hidrogel resultante será un hidrogel reactivo con grupos funcionales reactivos libres unidos a la estructura de la cadena principal.

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

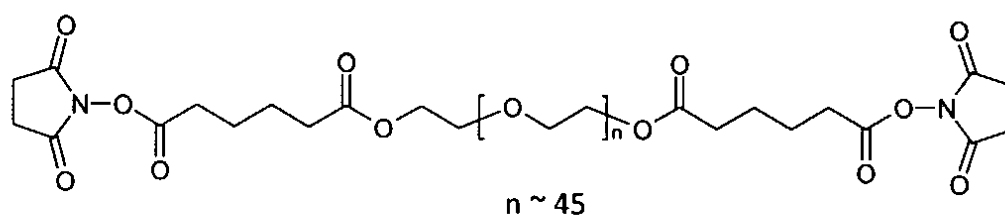
Un procedimiento preferido para preparar un profármaco de acuerdo con la presente invención es como sigue:

Un material de partida preferido para la síntesis del reactivo de la cadena principal es un PEG-tetraamina de 4 brazos o PEG-octaamina de 8 brazos, teniendo el reactivo de PEG un peso molecular en el intervalo de 2000 a 10000 Dalton, más preferiblemente de 2000 a 5000 Da. A dichos derivados de PEG con múltiples brazos, se acoplan restos de lisina de forma secuencial para formar el reactivo de la cadena principal hiperramificado. Se entiende que las lisinas pueden estar parcial o totalmente protegidas por grupos protectores durante las etapas de acoplamiento y que el reactivo de cadena principal final también puede contener grupos protectores. Una unidad estructura preferida es una bis-Boc-lisina. Alternativamente, en lugar de adiciones secuenciales de restos de lisina, se puede ensamblar primero un resto de polilisina dendrítico y posteriormente acoplarlo al PEG-tetraamina de 4 brazos o PEG-octaamina de 8 brazos. Es conveniente obtener el reactivo de cadena principal que lleva 32 grupos amino, por consiguiente se unirán 7 lisinas a cada brazo de un PEG de 4 brazos, o se unirán 5 lisinas a cada brazo de un PEG de 8 brazos. En otra realización, el derivado de PEG de múltiples brazos es un PEG-tetra u octa-carboxi. En este caso, los restos dendríticos se pueden generar a partir de ácido glutámico o aspártico, y el reactivo de cadena principal resultante llevaría 32 grupos carboxi. Se entiende que todos o una fracción de los grupos funcionales del reactivo de la cadena principal, pueden estar presentes en forma libre, como sales o conjugados con grupos protectores. Debe entenderse que debido a razones prácticas el número de lisinas del reactivo de la cadena principal por brazo de PEG será entre 6 y 7, más preferiblemente aproximadamente 7.

A continuación se muestra un reactivo de cadena principal preferido:



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



15

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

En una realización alternativa, el reactivo de la cadena principal lleva grupos carboxi y el correspondiente reactivo de reticulación se seleccionará de las cadenas de PEG terminadas en amino que contienen éster.

El reactivo de la cadena principal y el reactivo de reticulación se pueden
5 polimerizar para formar el hidrogel de acuerdo con la invención usando polimerización en emulsión inversa. Después de seleccionar la estequiometría deseada entre los grupos funcionales de la cadena principal y el reticulante, la cadena principal y el reticulante se disuelven en DMSO y se usa un emulgente adecuado con un valor de HLB seleccionado de forma adecuada, preferiblemente Arlace! P135, para formar una
10 emulsión inversa usando un agitador mecánico y controlando la velocidad de agitación. La polimerización se inicia por la adición de una base adecuada, preferiblemente por N,N,N',N'-tetrametiletildiamina. Después de agitar durante una cantidad de tiempo adecuada, la reacción se inactiva por la adición de un ácido, tal como ácido acético y agua. Las perlas se recogen, se lavan y se fraccionan de
15 acuerdo con el tamaño de partículas mediante cribado mecánico. Opcionalmente, los grupos protectores se pueden eliminar en esta etapa.

Además, dicho hidrogel de acuerdo con la invención se puede funcionalizar con un espaciador que lleve un grupo funcional reactivo diferente al proporcionado por el hidrogel. Por ejemplo, los grupos funcionales reactivos de maleimida se pueden
20 introducir en el hidrogel mediante acoplamiento de un espaciador heterobifuncional adecuado tal como Mal-PEG6-NHS al hidrogel. Dicho hidrogel funcionalizado se puede conjugar además con los reactivos de insulina-conector, llevando un grupo tiol reactivo en el resto del conector para formar profármacos de insulina ligado a hidrogel de acuerdo con la presente invención.

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

En una realización preferida de la invención, un conjugado de insulina-conector
30 que lleva un tiol libre se conecta con el resto conector, se hace reaccionar con un hidrogel funcionalizado con maleimida a temperaturas entre temperatura ambiente y 4°C, más preferido a temperatura ambiente, en una disolución acuosa tamponada, pH 2-5, preferiblemente pH 2,5-4,5, más preferiblemente pH3,0-4,0. Posteriormente, el correspondiente conjugado insulina-conector-hidrogel resultante se trata con
35 mercaptoetanol a temperaturas entre temperatura ambiente y 4°C, más

preferiblemente a temperatura ambiente, en una disolución acuosa tamponada de pH 2-5, preferiblemente pH 2,5-4,0, más preferiblemente pH 2,5-3,5.

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

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

- (a) contactar una suspensión acuosa que comprende micropartículas de hidrogel funcionalizado con maleimida con una disolución que comprende un reactivo de insulina-conector que porta grupos tiol a temperaturas entre temperatura ambiente y 4°C en una disolución acuosa tamponada de pH 2-5, produciendo un conjugado de
20 insulina-conector-hidrogel;
- (b) opcionalmente, tratar el conjugado de insulina-conector-hidrogel de la etapa (a) con un compuesto que contiene tiol de 34 Da a 500 Da a temperaturas entre temperatura ambiente y 4°C en una disolución acuosa tamponada de pH 2-5.

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

- (a) contactar una suspensión acuosa que comprende micropartículas de hidrogel funcionalizado con tiol con una disolución que comprende un reactivo de insulina-conector que porta grupos maleimida a temperaturas entre temperatura ambiente y 4°C en una disolución acuosa tamponada de pH 2-5, produciendo un conjugado de
30 insulina-conector-hidrogel;
- (b) opcionalmente, tratar el conjugado de insulina-conector-hidrogel de la etapa (a) con un compuesto que contiene maleimida de 100 Da a 300 Da a temperaturas entre temperatura ambiente y 4°C en una disolución acuosa tamponada de pH 2-5.

Un método particularmente preferido para preparar un profármaco de la
35 presente invención comprende las etapas de

- (a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula $C(A'-X^1)_4$, en la que $A'-X^1$ representa A antes de su unión a Hyp o un precursor de Hyp y X^1 es un grupo funcional adecuado, con un compuesto de fórmula $Hyp'-X^2$, donde $Hyp'-X^2$ representa Hyp antes de su unión a A o un precursor de Hyp, y X^2 es un grupo funcional adecuado para reaccionar con X^1 ;
- (b) opcionalmente, hacer reaccionar el compuesto resultante de la etapa (a) en una o más etapas adicionales para dar un compuesto de fórmula $C(A-Hyp)_4$ que tiene al menos cuatro grupos funcionales;
- (c) hacer reaccionar los al menos cuatro grupos funcionales del compuesto resultante de la etapa (b) con un precursor de reticulación basado en polietilenglicol, en el que los grupos éster activos del precursor de reticulación se usan en una cantidad por debajo de la estequiométrica comparado con el número total de grupos funcionales reactivos de $CA-Hyp_4$ para dar un hidrogel;
- (d) hacer reaccionar los grupos funcionales que no han reaccionado (que representan los grupos funcionales reactivos de la cadena principal comprendida en el hidrogel) en la cadena principal del hidrogel de la etapa (c) con un conjugado covalente de resto biológicamente activo y un conector de profármaco transitorio, o primero hacer reaccionar los grupos funcionales que no han reaccionado con el conector de profármaco transitorio y posteriormente con el resto biológicamente activo;
- (e) opcionalmente rematar el resto de grupos funcionales que no han reaccionado para dar un profármaco de la presente invención.

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

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

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

- Para realizar la polimerización, se añade N,N,N',N' -tertrametilendiamina (TMEDA) del 2 al 10% (vol.) a la disolución de DMSO que contiene el reactivo de la cadena principal y el reactivo de reticulación y la mezcla se agita durante 1 a 20 s y se deja reposar. La mezcla solidifica en menos de 1 min. Dicho hidrogel de acuerdo con la invención preferiblemente se pulveriza mediante

procedimientos mecánicos tales como agitación, aplastamiento, cizalla o molienda, y opcionalmente se criba.

Para la polimerización en emulsión, la mezcla de reacción está compuesta de la fase dispersa y una fase continua.

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

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

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

20 El emulsionante tiene un valor de HLB de 3 a 8. Preferiblemente, el emulsionante es un triéster de sorbitol y un ácido graso o un conjugado de poli(hidroxi-ácido graso)-polietilenglicol. Más preferiblemente, el emulsionante es un conjugado de poli(hidroxi-ácido graso)-polietilenglicol, con un polietilenglicol lineal de peso molecular en el intervalo de 0,5 kDa a 5 kDa y unidades de poli(hidroxi-ácido graso) de peso
25 molecular en el intervalo de 0,5 kDa a 3 kDa en cada extremo de la cadena. Lo más preferiblemente, el emulsionante es polietilenglicol-dipoli(hidroxi)estearato, Cithrol DPHS (Cithrol DPHS, antes Arlacel P135, Croda International Plc).

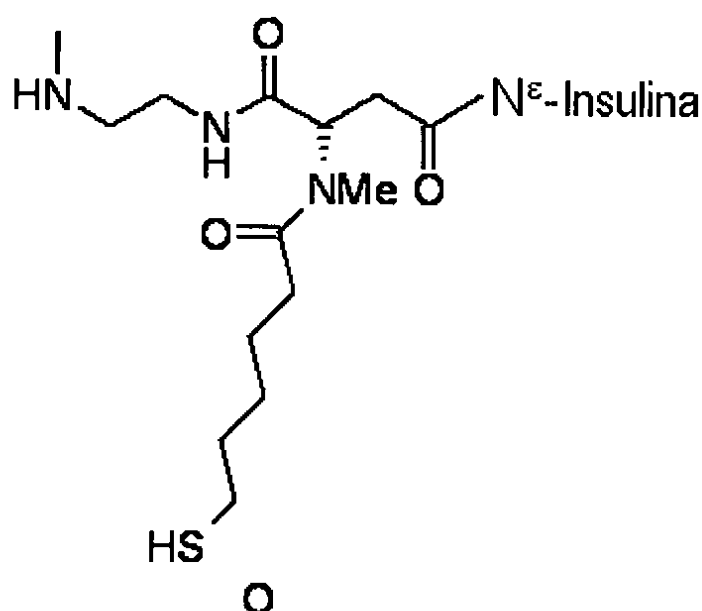
Se generan gotas de la fase dispersa mediante agitación con un impulsor de flujo axial con una geometría similar a los agitadores tales como Isojet, Intermig,
30 Propeller (EKATO Rühr- und Mischtechnik GmbH, Alemania)), lo más preferiblemente similar a Isojet con un diámetro de 50 a 90% del diámetro del reactor. Preferiblemente, la agitación se inicia antes de la adición de la fase dispersa. La velocidad del agitador se ajusta de 0,6 a 1,7 m/s. La fase dispersa se añade a temperatura ambiente, y la concentración de la fase dispersa es de 2% a 70%, preferiblemente de 5 a 50%, más
35 preferiblemente de 10 a 40%, y lo más preferiblemente de 20 a 35% del volumen total

de la reacción. La mezcla de la fase dispersa, el emulsionante y la fase continua se agita durante 5 a 60 min antes de añadir la base para realizar la polimerización.

Se añaden de 5 a 10 equivalentes (referido a cada enlace amida que se va a formar) de una base a la mezcla de la fase dispersa y continua. La base es aprótica, no nucleófila y soluble en la fase dispersa. Preferiblemente, la base es aprótica, no nucleófila, soluble tanto en la fase dispersa como en DMSO. Más preferiblemente, la base es aprótica, no nucleófila, soluble tanto en la fase dispersa como en DMSO, una base amínica y no tóxica. Lo más preferiblemente, la base es N,N,N',N'-tertrametiletilendiamina (TMEDA). La agitación en presencia de la base se continúa durante 1 a 16 h.

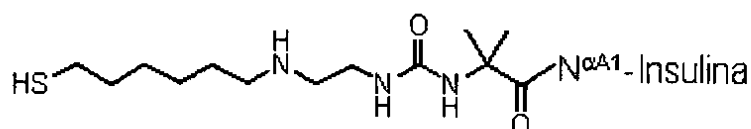
Durante la agitación, las gotas de fase dispersa se endurecen para convertirse en perlas de hidrogel reticulado de acuerdo con la invención, que se pueden recoger y se lleva a cabo el fraccionamiento de acuerdo con el tamaño en una máquina de cribado continuo vibratorio con una plataforma de 75 μm y de 32 μm para dar micropartículas de hidrogel de acuerdo con la invención.

Otro aspecto de la presente invención son conjugados de insulina-conector de fórmulas (IIIa) y (IIIb)



(IIIa),

donde N $^{\epsilon}$ -Insulina se refiere a insulina conectada mediante una cadena lateral de lisina; y



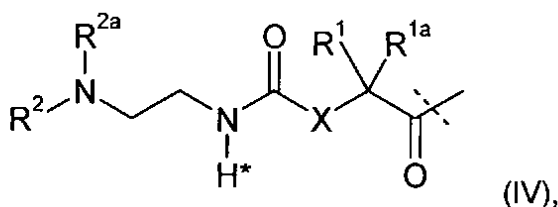
(IIIb).

Otro aspecto de la presente invención son los reactivos de insulina-conector D-
L*,

5 donde

D representa un resto de insulina; y

L* es un reactivo de conector que no es biológicamente activo, representado por la
fórmula (IV),



(IV),

10

en la que la línea de trazos indica la unión a uno de los grupos amino de la insulina
formando un enlace amida;

X es C(R³R^{3a}); o N(R³);

R^{1a}, R^{3a} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, NH(R^{2b}),

15 N(R^{2b})C(O)R⁴ y alquilo C₁₋₄;

R¹, R², R^{2a}, R^{2b}, R³, R⁴ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H
y alquilo C₁₋₄,

donde L* está sustituido con un L^{2*} y opcionalmente sustituido adicionalmente, con la
condición de que el hidrógeno marcado con el asterisco en la fórmula (IV) no se

20 sustituya por un sustituyente, y donde

L^{2*} es un espaciador conectado a L* y que comprende un grupo funcional químico
destinado a la conjugación con un hidrogel biodegradable reactivo.

Preferiblemente, R² en la fórmula (IV) se sustituye por L^{2*}.

Preferiblemente, R¹ en la fórmula (IV) se sustituye por L^{2*}.

25 Preferiblemente, X en la fórmula (IV) es N(R³).

Más preferiblemente, X en la fórmula (IV) es C(R³R^{3a}) y R^{3a} es N(R^{2b})C(O)R⁴.

Más preferiblemente, X en la fórmula (IV) es C(R³R^{3a}) y R^{3a} se reemplaza por
L^{2*}.

Incluso más preferiblemente, X en la fórmula (IV) es $C(R^3R^{3a})$, R^{3a} es $N(R^{2b})-L^{2*}$.

Preferiblemente, L^* en la fórmula (IV) no está más sustituido.

Preferiblemente, L^{2*} en la fórmula (IV) comprende un grupo tiol.

5 Preferiblemente, L^{2*} en la fórmula (IV) comprende un grupo maleimida.

El hidrogel para el profármaco de la presente invención puede obtenerse a partir de los métodos de preparación en la forma de micropartículas. En una realización preferida de la invención, el hidrogel reactivo es un artículo con forma, tal como una malla o un stent. Lo más preferiblemente, el hidrogel se forma en perlas de micropartículas que se pueden administrar en forma de inyección subcutánea o intramuscular mediante una jeringa estándar. Dichas perlas blandas pueden tener un diámetro entre 1 y 500 micrómetros.

Preferiblemente, las micropartículas tienen un diámetro entre 10 y 100 micrómetros si están suspendidas en un tampón de formulación acuosa isotónica, lo más preferiblemente un diámetro entre 20 y 100 micrómetros, lo más preferiblemente un diámetro entre 25 y 80 micrómetros.

Preferiblemente, las micropartículas se pueden administrar por inyección por una aguja inferior a 0,6 mm de diámetro interno, preferiblemente por una aguja inferior a 0,3 mm de diámetro interno, más preferiblemente por una aguja inferior a 0,225 mm de diámetro interno, incluso más preferiblemente por una aguja inferior a 0,175 mm de diámetro interno, y lo más preferiblemente por una aguja inferior a 0,16 mm de diámetro interno.

Se entiende que las expresiones "se puede administrar por inyección", "inyectable" o "capacidad de inyección" se refieren a una combinación de factores tales como una determinada fuerza aplicada a un émbolo de una jeringa que contiene el hidrogel biodegradable de acuerdo con la invención hinchado en un líquido en una determinada concentración (p/v), a una determinada temperatura, una aguja de un diámetro interno dado conectada a la salida de dicha jeringa, y el tiempo necesario para extruir un determinado volumen del hidrogel biodegradable de acuerdo con la invención, de la jeringa a través de la aguja.

Con el fin de proporcionar capacidad de inyección, se puede extruir un volumen de 1 ml de profármacos de insulina de acuerdo con la invención hinchados en agua en una concentración de al menos 5% (p/v) y contenido en una jeringa provista de un émbolo con un diámetro de 4,7 mm, a temperatura ambiente, en 10 segundos aplicando una fuerza menor de 50 Newton.

Preferiblemente, la capacidad de inyección se logra para un profármaco de insulina de acuerdo con la invención hinchado en agua, en una concentración de aproximadamente 10% (p/v).

Además, se provee un procedimiento de una etapa para acilar selectivamente
5 grupos ϵ -amino libres individuales encontrados en la cadena B de insulina y su análogo con un agente de acilación que contiene tiol protegido u otro grupo funcional. Para insulina humana recombinante, el sitio de acilación de insulina glargina e insulina aspartat es el grupo ϵ -amino de LysB29, en el caso de insulina Lispro, el sitio de
10 acilación es el grupo ϵ -amino de LysB28, y en el caso de insulina glulisina, el sitio de acilación es el grupo ϵ -amino de LysB3. Se ha de entender que este procedimiento no se limita a la insulina anteriormente mencionada y al análogo de insulina, pero puede aplicarse a otros análogos de insulina siempre y cuando contengan los grupos ϵ -amino, y la persona con experiencia en la técnica será capaz de identificar el correspondiente residuo lisina adecuado para acilación.

15 Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención es un procedimiento para acilar el grupo ϵ -amino de insulina o un análogo de insulina, que tiene uno o más grupos α -amino libres y el grupo ϵ -amino libre con un agente de acilación que contiene uno o más grupos funcionales protegidos, que comprende hacer reaccionar la insulina o el análogo de insulina con un agente de acilación soluble que contiene uno o más
20 grupos funcionales protegidos a un pH de 8,0 hasta debajo de 9,0 en un disolvente polar. Se entiende que se han de utilizar solamente dichos grupos protectores que sean estables en las condiciones anteriormente mencionadas.

La reacción se lleva a cabo haciendo reaccionar un grupo acilante, como un reactivo conector, que contiene uno o más grupos funcionales protegidos, con el grupo
25 ϵ -amino de la insulina o el análogo de insulina bajo condiciones básicas con un pH en el intervalo de aproximadamente 8,00 hasta debajo de 9,0, preferiblemente entre 8,0 y 8,9, más preferiblemente entre 8,3 y 8,7 en un disolvente polar, tal como mezclas acuosas de, por ejemplo, metanol, etanol, propanol, isopropanol, DMSO, DMF, NMP, dimetilacetamida, acetonitrilo.

30 Otro aspecto de la presente invención es un compuesto de insulina caracterizado por tener un grupo acilo unido al ϵ -nitrógeno o un análogo de insulina, y donde dicho grupo acilo tiene uno o más grupos funcionales protegidos.

Otro aspecto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende un profármaco de la presente invención o una sal del mismo

farmacéuticamente aceptable con un excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica se describe con más detalle en los siguientes párrafos.

La composición del profármaco de insulina-hidrogel se puede proporcionar en forma de una composición en suspensión o en forma de una composición seca.

- 5 Preferiblemente, la composición farmacéutica del profármaco de insulina-hidrogel es una composición seca. Los métodos adecuados para el secado son, por ejemplo, el secado por atomización y la liofilización (congelación-secado). Preferiblemente, la composición farmacéutica del profármaco de insulina-hidrogel se seca por liofilización.

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

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

- 15 Los excipientes usados en las composiciones parenterales se pueden clasificar como agentes de tamponamiento, modificadores de la isotonicidad, conservantes, estabilizantes, agentes antiadsorción, agentes protectores frente a la oxidación, agentes potenciadores de la viscosidad/viscosificantes, u otros agentes auxiliares. En algunos casos, estos ingredientes pueden tener función doble o triple. Las composiciones de profármacos de insulina-hidrogel de acuerdo con la presente invención contienen uno o más de un excipiente, seleccionado de los grupos que consisten en:

- 20 (i) Agentes de tamponamiento: tampones fisiológicamente tolerados para mantener el pH en un intervalo deseado, tales como fosfato sódico, bicarbonato, succinato, histidina, citrato y acetato, sulfato, nitrato, cloruro, piruvato. También se pueden usar antiácidos tales como $Mg(OH)_2$ o $ZnCO_3$. La capacidad de tamponamiento se puede ajustar para que se corresponda con las condiciones más sensibles a la estabilidad del pH.

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

- 35 (iii) Conservantes y/o antimicrobianos: las preparaciones parenterales de múltiples dosis requieren la adición de conservantes en una concentración suficiente para

minimizar el riesgo de infección de los pacientes tras inyección y se han establecido los correspondientes requisitos reguladores. Los conservantes típicos incluyen m-cresol, fenol, metilparabén, etilparabén, propilparabén, butilparabén, clorobutanol, alcohol bencílico, nitrato fenilmercúrico, timerosol, ácido sórbico, sorbato potásico, ácido benzoico, clorocresol, y cloruro de benzalconio

(iv) Estabilizantes: La estabilización se logra fortaleciendo las fuerzas de estabilización de la proteína, desestabilizando el estado desnaturalizado, o mediante la unión directa de excipientes a la proteína. Los estabilizantes pueden ser aminoácidos tales como alanina, arginina, ácido aspártico, glicina, histidina, lisina, prolina, azúcares tales como glucosa, sacarosa, trealosa, polioles tales como glicerol, manitol, sorbitol, sales tales como fosfato potásico, sulfato sódico, agentes quelantes tales como EDTA, hexafosfato, ligandos tales como iones metálicos divalentes (cinc, calcio, etc.), otras sales o moléculas orgánicas tales como derivados fenólicos. Además, se pueden usar oligómeros o polímeros tales como ciclodextrinas, dextrano, dendrímeros, PEG o PVP o protamina o HSA

(v) Agentes antiadsorción: Se usan principalmente tensioactivos iónicos y no iónicos u otras proteínas o polímeros solubles para revestir o para adsorber de forma competitiva, la superficie interior del envase de la composición. P. ej., poloxámero (Pluronic F-68), PEG-éter dodecílico (Brij 35), polisorbato 20 y 80, dextrano, polietilenglicol, PEG-polihistidina, BSA y HSA y gelatinas. La concentración y tipo de excipiente elegido depende del efecto que se va a evitar, pero normalmente se forma una monocapa de tensioactivo en la interfase justo por encima del valor de CMC.

(vi) Lio- y/o crioprotectores: Durante la liofilización o el secado por atomización, los excipientes pueden contrarrestar los efectos desestabilizantes causados por la rotura de enlaces de hidrógeno y la eliminación de agua. Para este propósito se pueden usar azúcares y polioles, pero los correspondientes efectos positivos también se han observado para tensioactivos, aminoácidos, disolventes no acuosos y otros péptidos. La trealosa es particularmente eficaz para reducir la agregación inducida por humedad y también mejora la estabilidad térmica causada potencialmente por la exposición al agua de los grupos hidrófobos de la proteína. También se pueden usar manitol y sacarosa, como lio/crioprotector único o en combinación entre sí, donde se sabe que las relaciones mayores de manitol/sacarosa potencian la estabilidad física de una torta liofilizada. El manitol también se puede combinar con trealosa. La trealosa también se puede combinar con sorbitol o se puede usar sorbitol como el único protector. También se pueden usar almidón o derivados de almidón.

- (vii) Agentes de protección frente a la oxidación: antioxidantes tales como ácido ascórbico, ectoína, metionina, glutatión, monotioglicerol, morina, polietilenimina (PEI), galato de propilo, vitamina E, agentes quelantes tales como ácido cítrico, EDTA, hexafosfato, ácido tioglicólico
- 5 (viii) Viscosificantes o potenciadores de la viscosidad: para retrasar la sedimentación de las partículas en el vial y la jeringa y se usan con el fin de facilitar la mezcla y la resuspensión de las partículas y hacer que la suspensión sea más fácil de inyectar (es decir, poca fuerza en el émbolo de la jeringa). Los viscosificantes o potenciadores de la viscosidad adecuados son, por ejemplo, viscosificantes de tipo
- 10 carbomer como Carbopol 940, Carbopol Ultrez 10, derivados de celulosa como hidroxipropilmetilcelulosa (hipromelosa, HPMC) o dietilaminoetilcelulosa (DEAE o DEAE-C), silicato de magnesio coloidal (Veegum) o silicato sódico, gel de hidroxiapatito, gel de fosfato tricálcico, xantanos, carragenanos como goma Satia UTC 30, poli(hidroxiácidos) alifáticos, tales como poli(ácido D,L- o L-láctico) (PLA) y
- 15 poli(ácido glicólico) (PGA) y sus copolímeros (PLGA), terpolímeros de D,L-lactida, glicólido y caprolactona, poloxámeros, bloques de poli(oxietileno) hidrófilos y bloques de poli(oxipropileno) hidrófobos para formar un tribloque de poli(oxietileno)-poli(oxipropileno)-poli(oxietileno) (p. ej. Pluronic®), copolímero de poliéster, tal como un copolímero de poli(tereftalato de etilenglicol)/poli(tereftalato de butilenglicol),
- 20 acetato isobutirato de sacarosa (SAIB), dextrano o derivados del mismo, combinaciones de dextranos y PEG, polidimetilsiloxano, colágeno, chitosán, poli(alcohol vinílico) (PVA) y derivados, polialquilimidaz, poli(acrilamida-co-dialildimetilamonio (DADMA)), polivinilpirrolidona (PVP), glicosaminoglicanos (GAG) tales como sulfato de dermatán, sulfato de condroitina, sulfato de queratán, heparina,
- 25 sulfato de heparán, hialuronano, tribloque ABA o copolímeros de bloques AB compuestos de bloques A hidrófobos, tales como polilactida (PLA) o poli(lactida-co-glicólido) (PLGA), y bloques B hidrófilos, tales como polietilenglicol (PEG) o polivinilpirrolidona. Dichos copolímeros de bloques así como los poloxámeros mencionados anteriormente pueden presentar un comportamiento de gelificación
- 30 térmica inversa (estado fluido a temperatura ambiente para facilitar la administración y estado de gel por encima de la temperatura de transición de sol-gel a la temperatura corporal después de inyección).
- (ix) Agente de extensión o difusión: modifican la permeabilidad del tejido conjuntivo mediante la hidrólisis de componentes de la matriz extracelular en el espacio
- 35 intersticial, tal como, pero sin limitar, ácido hialurónico, un polisacárido que se

encuentra en el espacio intercelular del tejido conjuntivo. Un agente de extensión, tal como, pero sin limitar, la hialuronidasa, disminuye temporalmente la viscosidad de la matriz extracelular y promueve la difusión de los fármacos inyectados.

- (x) Otros agentes auxiliares: tales como agentes humectantes, modificadores de la viscosidad, antibióticos, hialuronidasa. Ácidos y bases tales como el ácido hidroc্লórico y el hidróxido sódico son agentes auxiliares necesarios para ajustar el pH durante la fabricación.

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

- El término "excipiente" se refiere preferiblemente a un diluyente, adyuvante o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Dicho excipiente farmacéutico puede ser líquidos estériles tales como agua y aceites, incluyendo los procedentes de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, incluyendo pero sin limitar, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un excipiente preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía oral. La disolución salina y dextrosa acuosa son los excipientes preferidos cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las disoluciones salinas y la dextrosa acuosa y disoluciones de glicerol se usan preferiblemente como excipientes líquidos para disoluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, carbonato cálcico, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada deshidratada, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de disoluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y excipientes tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir excipientes habituales tales como las calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato magnésico, sacarina sódica, celulosa, carbonato magnésico, etc. Los ejemplos de excipientes farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences", de E.W. Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del producto terapéutico, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de excipiente

para proporcionar la forma para la administración apropiada al paciente. La formulación debe adecuarse al modo de administración.

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

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

Por lo tanto, en otro aspecto de la presente invención la composición se
10 proporciona en forma de una composición de una sola dosis.

Preferiblemente, la composición en suspensión es una composición de múltiples dosis, que significa que contiene más de una dosis terapéutica. Preferiblemente, una composición de múltiples dosis contiene al menos 2 dosis. Dicha
15 composición de múltiples dosis de insulina-hidrogel se puede usar para diferentes pacientes que la necesiten o está destinada a usar en un paciente, en la que las dosis restantes se almacenan después de la aplicación de la primera dosis hasta que se necesiten.

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

Antes de aplicar la composición seca del profármaco de insulina-hidrogel a un paciente que lo necesite, la composición seca se reconstituye. La reconstitución puede
25 tener lugar en el envase en el que se proporciona la composición seca del profármaco de insulina-hidrogel, tal como en un vial, jeringa, jeringa de doble cámara, ampolla y cartucho. La reconstitución se hace añadiendo una cantidad previamente definida de disolución de reconstitución a la composición seca. Las disoluciones de reconstitución son líquidos estériles, tales como agua o tampón, que pueden contener aditivos, tales
30 como conservantes y/o antimicrobianos. Si la composición del profármaco de insulina-hidrogel se proporciona como una sola dosis, la disolución de reconstitución puede contener uno o más conservantes y/o antimicrobianos. Preferiblemente, la disolución de reconstitución es agua estéril. Si la composición del profármaco de insulina-hidrogel es una composición de múltiples dosis, se prefiere que la disolución de reconstitución

contenga uno o más conservantes y/o antimicrobianos, tales como, por ejemplo, alcohol bencílico y cresol.

Un aspecto adicional de la presente invención, se refiere a un método de administración de la composición del profármaco de insulina-hidrogel reconstituida. La
5 composición del profármaco de insulina-hidrogel se puede administrar por métodos de inyección o infusión, que incluyen la administración intradérmica, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraosea, e intraperitoneal.

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

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

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

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

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

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

Otro aspecto es un kit de piezas. Cuando el dispositivo de administración es
30 sencillamente una jeringa hipodérmica, entonces el kit puede comprender la jeringa, una aguja y un envase que comprende la composición de profármaco de insulina-hidrogel para usar con la jeringa, y un segundo envase que comprende la disolución de reconstitución. En realizaciones más preferidas, el dispositivo de inyección es distinto de una simple jeringa hipodérmica y por lo tanto el envase separado con el
35 profármaco de insulina-hidrogel reconstituido se adapta para encajar con el dispositivo

de inyección, de modo que cuando se usa, la composición líquida en el envase está en conexión fluida con la salida del dispositivo de inyección. Los ejemplos de dispositivos de inyección incluyen, pero sin limitar, jeringas hipodérmicas y dispositivos inyectoros de tipo bolígrafo. Los dispositivos de inyección particularmente preferidos son los
5 inyectoros de tipo bolígrafo, en cuyo caso el envase es un cartucho, preferiblemente un cartucho desechable.

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

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

15 En una realización de la presente invención, la composición en suspensión del profármaco de insulina-hidrogel no comprende solo el profármaco de insulina-hidrogel y uno o varios excipiente, sino también otros agentes biológicamente activos, en su forma libre o en forma de profármacos. Preferiblemente, dichos uno o más agentes biológicamente activos consisten en un profármaco, más preferiblemente un
20 profármaco de hidrogel. Dichos agentes biológicamente activos incluyen, pero sin limitar, compuestos de las siguientes clases:

- (i) Sulfonilureas, tales como por ejemplo, clorpropamida, tolazamida, tolbutamida, gliburida, glipizida, glimepirida y similares.
- (ii) Meglitinidas, tales como por ejemplo, repaglinida,
- 25 (iii) Péptido-1 análogo a glucagón (GLP-1) y sus compuestos miméticos, péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) y sus compuestos miméticos, exendina y sus compuestos miméticos, e inhibidores de la dipeptil proteasa (DPPIV).
- (iv) Biguanidas, tales como por ejemplo, metformina,
- (v) Tiazolidinadionas, tales como, por ejemplo, rosiglitazona, pioglitazona,
30 troglitazona, isaglitazona (conocida como MCC-555), ácido 2-[2-[(2R)-4-hexil-3,4-dihidro-3-oxo-2H-1,4-benzoxazin-2-il]etoxi]-benceno acético, y similares
- (vi) GW2570, y similares,
- (vii) Moduladores del receptor de retinoide-X (RXR), tales como por ejemplo, targretina, ácido 9-cis-retinoico, y similares,

- (viii) Otros agentes sensibilizadores de insulina, tales como por ejemplo, INS-1, inhibidores de PTP-1B, inhibidores de GSK3, inhibidores de glicógeno fosforilasa, inhibidores de fructosa-1,6-bisfosfatasa, y similares,
- (ix) Insulinas, incluyendo insulinas normales o de acción rápida, acción intermedia,
5 y acción prolongada, insulina inhalada y análogos de insulina, tales como moléculas con diferencias poco importantes en la secuencia natural de aminoácidos
- (x) Moléculas pequeñas que imitan a la insulina, incluyendo, pero sin limitar, L-783281, TE-17411, y similares,
- (xi) Transportador de Na-glucosa, como T-1095, T-1095A, phlorizen y similares,Co-
10 t
- (xii) Agonistas de amilina que incluyen, pero sin limitar, pramlintida, y similares,
- (xiii) Antagonistas del glucagón, tales como AY-279955, y similares.

Además de los agentes antidiabéticos, los compuestos bioactivos pueden ser agentes antiobesidad tal como orlistat, un inhibidor de la lipasa pancreática, que evita
15 la rotura y absorción de la grasa; o sibutramina, un supresor del apetito e inhibidor de la recaptación de serotonina, norepinefrina y dopamina en el cerebro, factores de crecimiento que aumentan la movilización de grasa (p. ej., hormona del crecimiento, IGF-1, factor de liberación de la hormona del crecimiento), moduladores de oxintomodulina y grelina. Otros agentes antiobesidad bioactivos potenciales incluyen,
20 pero sin limitar, supresores del apetito que actúan por mecanismos adrenérgicos, tales como benzphetamine, fenmetrazina, fentermina, dietilpropion, mazindol, sibutramina, fenilpropanolamina o efedrina; agentes supresores del apetito que actúan por mecanismos serotoninérgicos, tales como quipazina, fluoxetina, sertralina, fenfluramina o dexfenfluramina; agentes supresores del apetito que actúan por mecanismos de la
25 dopamina, p. ej., apomorfina; agentes supresores del apetito que actúan por mecanismos histaminérgicos (p. ej., compuestos miméticos de histamina, moduladores del receptor H3); potenciadores del gasto energético tales como agonistas beta-3 adrenérgicos y estimuladores de la función de desacoplamiento de proteína; leptina y compuestos miméticos de leptina (p. ej., metreleptina); agonistas del neuropéptido Y;
30 moduladores del receptor de melanocortina-1, 3 y 4; agonistas de colecistoquinina; compuestos miméticos del péptido-1 análogo al glucagón (GLP-1) y análogos (p. ej., exendina); andrógenos (p. ej., deshidroepiandrosterona y derivados tales como eticolandiona), testosterona, esteroides anabólicos (p. ej., oxandrolona), y hormonas esteroídicas; antagonistas del receptor de galanina; agentes citoquinínicos tales como el
35 factor neurotrófico ciliar; inhibidores de amilasa; agonistas/compuestos miméticos de

enterostatina; antagonistas de orexina/hipocretina; antagonistas de urocortina; agonistas de bombesina; moduladores de la proteína quinasa A; compuestos miméticos del factor de liberación de corticotropina; compuestos miméticos de transcritos regulados por cocaína y anfetamina; peptidomiméticos relacionados con el
5 gen de la calcitonina; e inhibidores de la ácido graso sintasa.

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

Otro aspecto más de la presente invención es un profármaco de la presente invención o una composición farmacéutica de la presente invención para usar como un
15 medicamento.

Otro aspecto más de la presente invención es un profármaco de la presente invención o una composición farmacéutica de la presente invención para usar en un método para tratar o prevenir enfermedades o trastornos que se pueden tratar mediante la insulina.

20 Dichas enfermedades o trastornos son, p. ej., hiperglucemia, pre-diabetes, intolerancia a la glucosa, diabetes de tipo I, diabetes de tipo II, síndrome X, obesidad, hipertensión.

Los pacientes que necesitan el tratamiento con las composiciones de insulina de acción prolongada descritas en la presente invención, tienen un riesgo alto de
25 desarrollar morbilidad asociada. Por consiguiente, la combinación de la insulina de acción prolongada de la presente memoria con compuestos bioactivos adecuados, se puede usar, p. ej., para prevenir, retrasar el avance o tratar enfermedades y trastornos seleccionados del grupo que consiste en hipertensión (incluyendo, pero sin limitar, hipertensión sistólica aislada e hipertensión dislipidémica familiar), insuficiencia
30 cardíaca congestiva, hipertrofia ventricular izquierda, enfermedad arterial periférica, retinopatía diabética, degeneración macular, cataratas, nefropatía diabética, glomeruloesclerosis, insuficiencia renal crónica, neuropatía diabética, síndrome X, síndrome premenstrual, enfermedad cardíaca coronaria, angina de pecho, trombosis, aterosclerosis, infarto de miocardio, ataque isquémico transitorio, accidente
35 cerebrovascular, reestenosis vascular, hiperglucemia, hiperinsulinemia, hiperlipidemia,

hipertrigliceridemia, resistencia a la insulina, metabolismo de la glucosa alterado, afecciones de la tolerancia a la glucosa alterada, afecciones de glucosa plasmática en ayunas alterada, obesidad, disfunción eréctil, trastornos de la piel y el tejido conjuntivo, ulceraciones del pie y colitis ulcerativa, disfunción endotelial y distensibilidad vascular alterada.

La prevención, retraso del avance o tratamiento de enfermedades y trastornos seleccionados del grupo anterior, se puede lograr mediante la combinación de la composición de insulina de acción prolongada de la presente invención, con al menos un compuesto bioactivo seleccionado de las clases de fármacos usadas para tratar dichas afecciones, incluyendo antagonistas del receptor AT_1 ; inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE); inhibidores de renina; bloqueantes del receptor beta adrenérgico; bloqueantes del receptor alfa adrenérgico; bloqueantes de canales de calcio; inhibidores de la aldosterona sintasa; antagonistas del receptor de aldosterona; inhibidores de endopeptidasa neutra (NEP); inhibidores dobles de la enzima convertidora de angiotensina/endopeptidasa neutra (ACE/NEP); antagonistas del receptor de endotelina; diuréticos; estatinas; nitratos; agentes anticoagulantes; péptidos natriuréticos; compuestos de digitalis; moduladores del PPAR.

En el caso de agentes biológicamente activos; profármacos, en especial profármacos de hidrogel que contienen uno o más grupos ácidos o básicos, la invención también abarca sus correspondientes sales farmacéutica o toxicológicamente aceptables, en particular sus sales farmacéuticamente utilizables. Por lo tanto, los profármacos que contienen grupos ácidos se pueden usar de acuerdo con la invención, por ejemplo, en forma de sales de metales alcalinos, sales de metales alcalinotérreos o como sales de amonio. Los ejemplos más precisos de dichas sales incluyen las sales de sodio, sales de potasio, sales de calcio, sales de magnesio o sales con amoniaco o aminas orgánicas, tales como, por ejemplo, etilamina, etanolamina, trietanolamina o aminoácidos. Los profármacos que contienen uno o más grupos básicos, es decir grupos que pueden estar protonados, pueden estar presentes y se pueden usar de acuerdo con la invención en forma de sus sales de adición con ácidos inorgánicos u orgánicos. Los ejemplos de ácidos adecuados incluyen cloruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftalenodisulfónico, ácido oxálico, ácido acético, ácido tartárico, ácido láctico, ácido salicílico, ácido benzoico, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido piválico, ácido dietilacético, ácido malónico, ácido succínico, ácido pimélico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido málico, ácido

sulfamínico, ácido fenilpropiónico, ácido glucónico, ácido ascórbico, ácido isonicotínico, ácido cítrico, ácido adípico y otros ácidos conocidos para los expertos en la técnica. Si los profármacos contienen simultáneamente grupos ácidos y básicos en la molécula, la invención también incluye, además de las formas salinas mencionadas, las sales internas o betáinas (iones híbridos). Las respectivas sales se pueden obtener mediante métodos habituales que son conocidos por los expertos en la técnica como, por ejemplo, poniendo en contacto éstas con un ácido o base orgánico o inorgánico en un disolvente o dispersante, o mediante intercambio aniónico o catiónico con otras sales. La presente invención también incluye todas las sales de los profármacos que, debido a la compatibilidad fisiológica, no son directamente adecuadas para uso en productos farmacéuticos pero que se pueden usar, por ejemplo, como productos intermedios para reacciones químicas o para la preparación de sales farmacéuticamente aceptables.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora tal como la EMEA (Europa) y/o la FDA (EE.UU.) y/o cualquier otra agencia reguladora nacional para usar en animales, preferiblemente en seres humanos.

Otro aspecto más de la presente invención es un método para tratar, controlar, retrasar o prevenir en un paciente mamífero, preferiblemente en un ser humano que necesite el tratamiento, una o más afecciones, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un profármaco de la presente invención o una composición de la presente invención o una de sus sales farmacéuticamente aceptable.

Fig.1a: cromatograma de UPLC del conjugado insulina-conector 12a

Fig.1b: cromatograma de UPLC del conjugado insulina-conector 12b

La Figura 2 muestra la concentración de insulina plasmática promedio del animal 1-10 después de una dosis subcutánea individual del artículo de ensayo 11a que contiene 6 mg de insulina en ratas sanas durante un periodo de 2 semanas. (se exponen las barras de error como desviación estándar $\pm$ según lo derivado de 10 animales, los valores t_0 se tomaron 3 días antes de la dosis).

Figura 3: Insulina plasmática promedio del animal 1-8 después de una dosis subcutánea individual del artículo de ensayo 11da que contiene 3 mg de insulina en ratas sanas durante un periodo de 13 días. (se exponen las barras de error como desviación estándar $\pm$ según lo derivado de 8 animales, los valores t_0 se tomaron 1 día antes de la dosis).

Figura 4: Concentración de insulina plasmática (cuadrados grises) y nivel de glucosa en sangre (círculos negros) después de una dosis subcutánea individual del artículo de ensayo 11da que contiene 6,4 mg de insulina en ratas diabéticas (n=7). (se exponen las barras de error como desviación estándar $\pm$ según lo derivado de 7 animales, los valores t_0 se tomaron 4 días antes de la dosis).

Figura 5: Nivel de insulina plasmática promedio después de una dosis subcutánea individual de 8mg/kg del artículo de ensayo 11db en ratas sanas durante las primeras 24 horas después de la dosis (análisis de absorción rápida). Se dividieron 8 ratas en 2 grupos, y se tomaron muestras de sangre para farmacocinética alternando entre ambos grupos. En ninguno de los grupos se percibió un efecto de absorción rápida. (se exponen las barras de error como desviación estándar $\pm$ según lo derivado de todos los animales por grupo, los valores t_0 se tomaron 1 día antes de la dosis).

Figura 6: Concentración de insulina plasmática (cuadrados grises) y nivel de glucosa en sangre (círculos negros) durante un periodo de 4 semanas después de 3 dosis subcutáneas semanales de 8 mg del artículo de ensayo 11da en ratas diabéticas (n=8). (se exponen las barras de error como desviación estándar $\pm$ según lo derivado de 8 animales, los valores t_0 se tomaron 3 días antes de la dosis).

Figura 7: Concentración de insulina plasmática promedio del animal 1-8 (animal 1-4 y animal 5-8 para el valor 0,3, 1h, 2 y 4h, respectivamente) después de una inyección subcutánea individual de 12 mg/kg de insulina formulada en el artículo de ensayo 11dc en ratas sanas durante un periodo de 13 días. (se exponen las barras de error como desviación estándar según lo derivado de los 8 animales, los valores t_0 se tomaron 4 días antes de la dosis).

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

La Figura 9 muestra un gráfico que traza fuerza versus flujo, usando una aguja 30 G. Puntos de datos: cuadrados negros = etilenglicol; triángulos negros = agua; puntos negros profármaco de hidrogel e insulina.

EJEMPLOS

Materiales y métodos

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

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

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

5 La resina de cloruro de 2-clorotritilo, HATU, N-ciclohexil-carbodiimida-N'-metil poliestireno y los aminoácidos fueron de Merck Biosciences GmbH, Schwalbach/Ts, Alemania, si no se especifica otra cosa. Fmoc(NMe)-Asp(OtBu)-OH se obtuvo de Bachem AG, Bubendorf, Suiza. El ácido S-tritil-6-mercaptohexanoico se adquirió de Polypeptide, Strasbourg, Francia. Los aminoácidos usados tenían la configuración L si
10 no se establece lo contrario.

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

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

La carga del primer aminoácido a las resinas se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Desprotección de Fmoc:

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

Desprotección Fmoc de resinas cargadas con Fmoc-Aib

La desprotección Fmoc de Fmoc-Aib-OH inmovilizados se realizó agitando la resina en DMF/piperidina 4/1 (v/v) a 50 °C durante 20 min (2 veces).

25 Protocolo de escisión para resina de cloruro de 2-clorotritilo:

Tras completar la síntesis, la resina se lavó con DCM, se secó a vacío y se trató dos veces durante 30 minutos con 6/4 (v/v) DCM/HFIP. Los eluatos se combinaron, los volátiles se eliminaron bajo una corriente de nitrógeno y el producto
bruto resultante se purificó por RP-HPLC. Se reunieron las fracciones de HPLC que
30 contenían producto y se liofilizaron.

Los productos que contenían amina obtenidos como sales de TFA se convirtieron a las sales HCl correspondientes, usando resina de intercambio iónico (Discovery DSC-SAX, Supelco, EE. UU.). Esta etapa se llevó a cabo en caso de que se esperara que el TFA interfiriera con, por ejemplo, una reacción de acoplamiento
35 subsiguiente.

Purificación por RP-HPLC:

La RP-HPLC se hizo en una columna de 100x20 mm o 100x40 mm C18 ReproSil-Pur 300 ODS-3 de 5 μm (Dr. Maisch, Ammerbuch, Alemania) conectada a un sistema de HPLC Waters 600 y un detector de absorbancia Waters 2487. Se usaron
5 gradientes lineales de disolución A (TFA al 0,1% en H_2O) y disolución B (TFA al 0,1% en acetonitrilo). Las fracciones de HPLC que contenían el producto se liofilizaron.

Cromatografía ultrarrápida:

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

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

Métodos analíticos

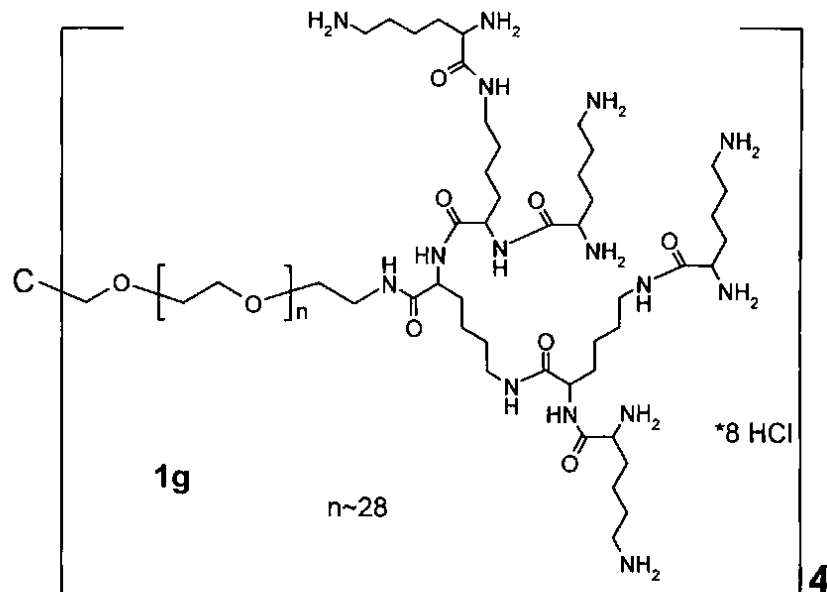
La cromatografía de líquidos de ultrapresión (UPLC) analítica se llevó a cabo
15 en un sistema de Waters Acquity equipado con una columna Waters BEH300 C18 (2,1 x 50 mm, tamaño de partículas de 1,7 μm) acoplada con un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap Discovery de Thermo Scientific.

La MS de los productos de PEG mostraron una serie de restos $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ debido a la polidispersidad de los materiales de partida del PEG. Para una
20 interpretación más sencilla en los ejemplos solo se da una señal m/z representativa. Las MS de conjugados de insulina se indican para isótopos representativos y se refieren a los aductos de cuatro protones $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$.

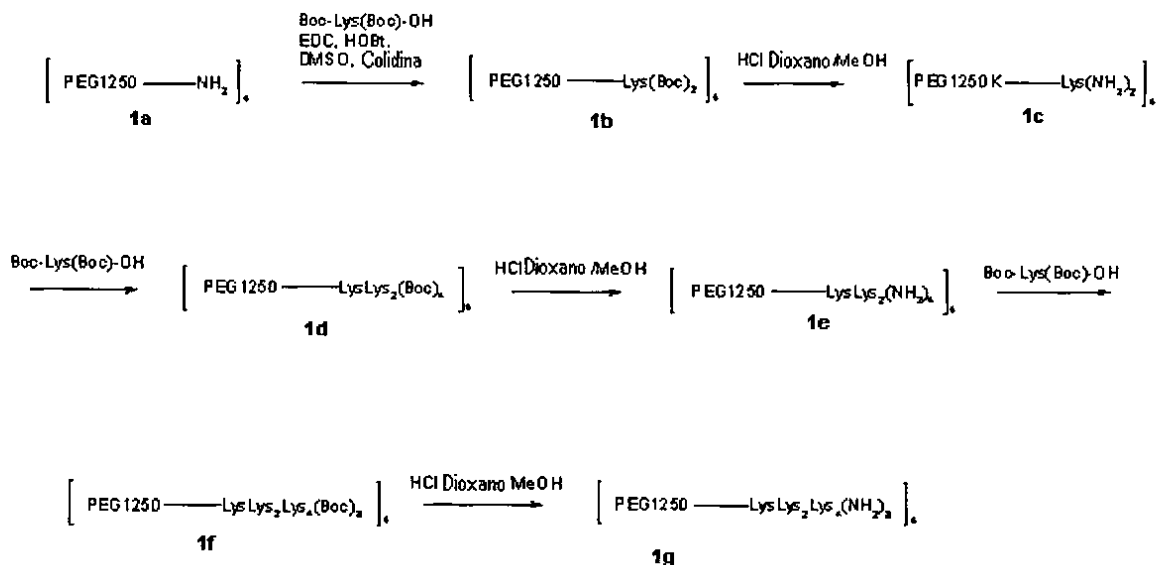
Se realizó la cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) usando un sistema Amersham Bioscience AEKTAbasic equipado con una columna Superdex200 5/150
25 GL (Amersham Bioscience/GE Healthcare) equipada con un filtro de entrada de 0,45 μm , si no se indica otra cosa. Se utilizó fosfato sódico 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, como la fase móvil.

Ejemplo 1

Síntesis del reactivo de la cadena principal 1g



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



5

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

La mezcla de reacción se diluyó con 1200 ml de diclorometano y se lavó con 600 ml de H₂SO₄ 0,1 N (2 x), salmuera (1 x), NaOH 0,1 M (2 x), y salmuera/agua 1/1 (v/v) (4 x). Las capas acuosas se volvieron a extraer con 500 ml de DCM. Las fases orgánicas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se evaporaron para dar 6,3 g del

producto bruto 1b en forma de aceite incoloro. El compuesto 1b se purificó por RP-HPLC.

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

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

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

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

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

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

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

Rendimiento: 4,01 g (89%) de producto vítreo incoloro 1d, que se usó en la siguiente etapa sin más purificación.

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

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

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

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

- 35 La mezcla de reacción se diluyó con 800 ml de DCM y se lavó con 400 ml de H₂SO₄ 0,1 N (2 x), salmuera (1 x), NaOH 0,1 M (2 x), y salmuera/agua 1/1 (v/v) (4 x).

Las capas acuosas se volvieron a extraer con 800 ml de DCM. Las fases orgánicas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se evaporaron para dar el producto bruto 1f en forma de aceite incoloro.

5 El producto se disolvió en DCM y precipitó con éter dietílico frío ($-18\text{ }^\circ\text{C}$). Esta etapa se repitió dos veces y el precipitado se secó a vacío.

Rendimiento 4,72 g (82%) de producto vítreo incoloro 1f, que se usó en la siguiente etapa sin más purificación.

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

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

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

MS: m/z 977,2 = $[\text{M}+9\text{H}]^{9+}$ (calculado = 977,4).

15 Ruta sintética alternativa para el compuesto 1g

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

20 Posteriormente, se añadió *n*-propilamina (2,48 ml, 30,0 mmol). Después de 5 min la disolución se diluyó con 1000 ml de MTBE y se almacenó durante la noche a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ sin agitación. Se decantaron y descartaron aproximadamente 500 ml del líquido sobrenadante. Se añadieron 300 ml de MTBE frío y después de 1 min de agitación, el producto se recogió por filtración y se lavó con 500 ml de MTBE frío. El producto se
25 secó a vacío durante 16 h.

Rendimiento: 65,6 g (74%) de 1b en forma de un sólido blanco grumoso.

MS: m/z 937,4 = $[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$ (calculado = 937,6).

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

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

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

Para la síntesis del compuesto 1d, a una suspensión de 1c de la etapa anterior (19,0 g, 3,14 mmol) en 80 ml de se le añadieron 2-propanol boc-Lys(boc)-OSu (16,7 g, 37,7 mmol) y DIEA (13,1 mL, 75,4 mmol) a 45 °C, y la mezcla se agitó durante 30 min a 45 °C. Posteriormente, se añadió *n*-propilamina (1,56 ml, 18,9 mmol). Después de 5 min la disolución precipitó con 600 ml de MTBE frío y se centrifugó (3000 min⁻¹, 1 min) El precipitado se secó a vacío durante 1 h y se disolvió en 400 ml de THF. Se añadieron 200 ml de éter dietílico y el producto se enfrió a -30 °C durante 16 h sin agitación. La suspensión se filtró a través de un filtro de vidrio y se lavó con 300 ml de MTBE frío. El producto se secó a vacío durante 16 h.

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

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

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

Rendimiento: 13,2 g (96%) de compuesto 1e en forma de un polvo blanco

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

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

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

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

El reactivo de la cadena principal 1g se obtuvo disolviendo PEG(4 brazos 5kDa)-(-LysLys₂Lys₄(boc)₈)₄ (1f) (15,5 g, 1,29 mmol) en 30 ml de MeOH y enfriando a 0 °C. Se añadió HCl 4 N en dioxano (120 ml, 480 mmol, enfriado a 0 °C) en 3 min y se

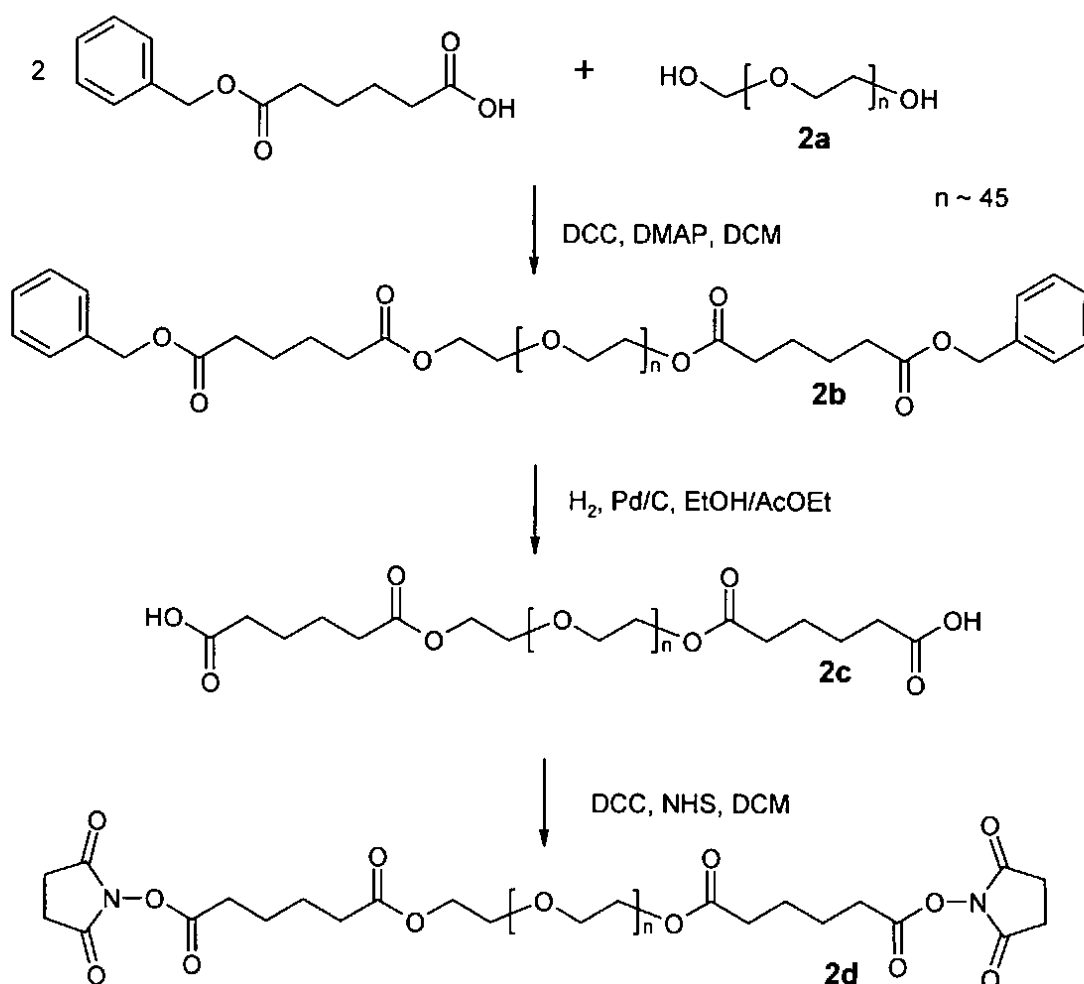
quitó el baño de hielo. Después de 20 min, se añadió HCl 3 N en metanol (200 ml, 600 mmol, enfriado a 0 °C) en 15 min y la disolución se agitó durante 10 min a temperatura ambiente. La disolución del producto precipitó con 480 ml de MTBE frío y se centrifugó a 3000 rpm durante 1 min. El precipitado se secó a vacío durante 1 h y se volvió a disolver en 90 ml de MeOH, precipitó con 240 ml de MTBE frío y la suspensión se centrifugó a 3000 rpm durante 1 min. El producto 1g se secó a vacío. Rendimiento: 11,5 g (89 %) en forma de copos amarillo pálido.

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

Ejemplo 2

10 Síntesis del reactivo de reticulación 2d

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



15

Una disolución de PEG 2000 (2a) (11,0 g, 5,5 mmol) y semiéster adipato de bencilo (4,8 g, 20,6 mmol) en diclorometano (90,0 ml) se enfrió a 0°C. Se añadió

diciclohexilcarbodiimida (4,47 g, 21,7 mmol) seguido de una cantidad catalítica de DMAP (5 mg) y la disolución se agitó y se dejó que alcanzara la temperatura ambiente durante la noche (12 h). El matraz se almacenó a +4°C durante 5 h. El sólido se filtró y el disolvente se separó completamente por destilación a vacío. El residuo se disolvió en 1000 ml de éter dietílico/acetato de etilo 1/1(v/v) y se conservó a TA durante 2 horas mientras se formaba una pequeña cantidad de un sólido en escamas. El sólido se separó por filtración a través de una almohadilla de Celite®. La disolución se almacenó en un matraz herméticamente cerrado a -30°C en el refrigerador durante 12 h hasta completarse la cristalización. El producto cristalino se filtró a través de una frita de vidrio y se lavó con éter dietílico frío (-30°C). La torta de filtración se secó a vacío. Rendimiento: 11,6 g (86 %) de compuesto 2b en forma de un sólido incoloro. El producto se usó en la siguiente etapa sin más purificación.

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

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

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

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

Rendimiento: 8,73 g (85%) de reactivo de reticulación 2d en forma de sólido incoloro.

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

Ejemplo 3

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

Una disolución de 275 mg del compuesto 1g y 866 mg del compuesto 2d en 14 ml de DMSO se añadió a una disolución de 100 mg de Arlacel P135 (Croda International Plc) en 60 ml de heptano. La mezcla se agitó a 700 rpm con un agitador de metal convencional durante 10 min a 25 °C para formar una suspensión. Se añadió 1,0 mL de *N,N,N',N'*-tetrametil-etilen-diamina para efectuar la polimerización. Después

5 Para el fraccionamiento del tamaño de las perlas, la suspensión de agua-hidrogel se cribó en húmedo en tamices de acero de malla de 75, 50, 40, 32 y 20 μm . Se reunieron las fracciones de perlas que se retuvieron en los tamices de 32, 40, y 50 μm y se lavaron 3 veces con agua, 10 veces con etanol y se secaron durante 16 h a 0,1 mbar para dar el compuesto 3 en forma de un polvo blanco.

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

20 Ejemplo 4

O=C1C=CC(=O)N(CCO[CH2CH2O]5[CH2CH2OC(=O)ON2C(=O)CCC2=O])C1=O

25

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

Se sintetizó 4a como se describió anteriormente, excepto por el uso de 3a en lugar de 3.

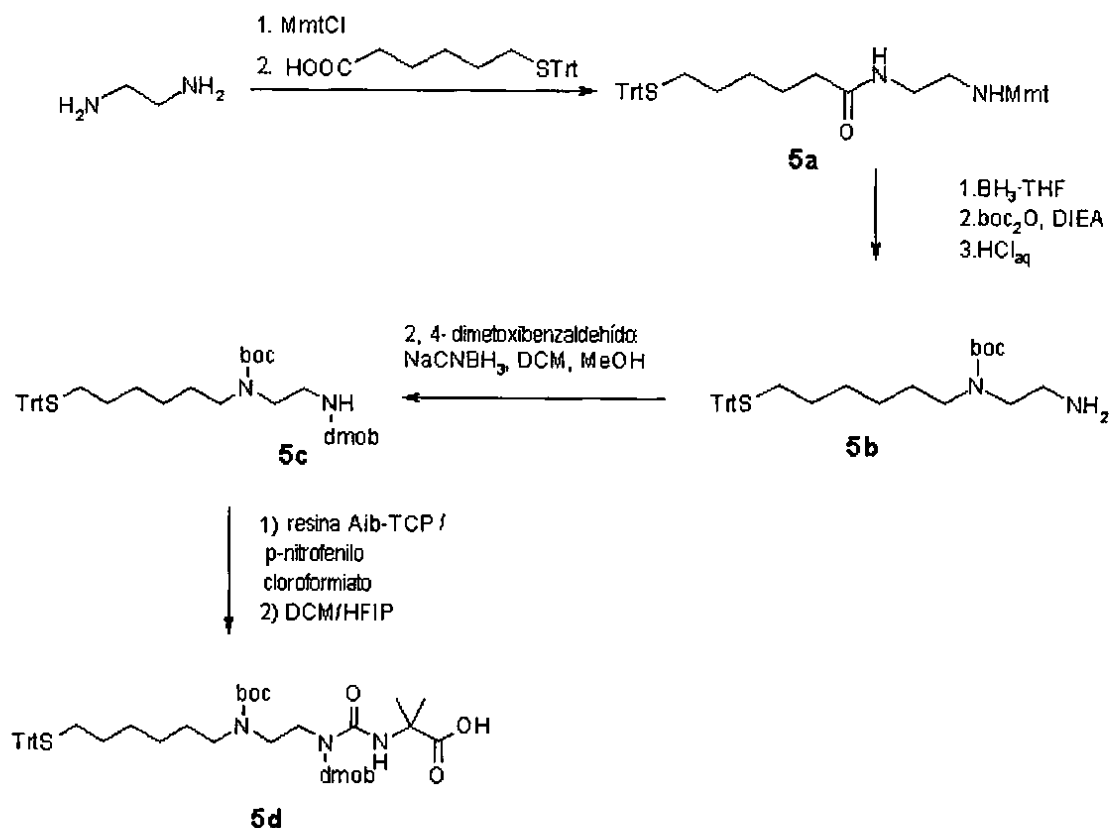
Alternativamente, las perlas de hidrogel 3a se lavaron previamente con DMSO/DIEA 99/1 (v/v), se lavaron con DMSO y se incubaron durante 45 min con una
5 disolución de Mal-PEG6-NHS (2,0 eq con respecto a la cantidad teórica de grupos amino en el hidrogel) en DMSO. Las perlas 4aa se lavaron dos veces con DMSO y tres veces con succinato a pH 3,0 (20 mM, EDTA 1 mM, Tween-20 al 0,01%). La muestra se incubó a pH 6,0 en fosfato sódico (50 mM, etanolamina 50 mM, Tween-20 al 0,01%) durante 1 h a TA y se lavó cinco veces con succinato sódico a pH 3,0
10 (20 mM, EDTA 1 mM, Tween-20 al 0,01%).

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

Ejemplo 5

Síntesis del reactivo conector 5d

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



Síntesis del compuesto intermedio del reactivo conector 5a:

Se disolvió cloruro de 4-metoxitritilo (3 g, 9,71 mmol) en DCM (20 ml) y se añadió gota a gota a una disolución de etilendiamina (6,5 ml, 97,1 mmol) en DCM (20 ml). Después de 2 horas, la disolución se vertió en éter dietílico (300 ml) y se lavó 3 veces con salmuera/disolución de NaOH 0,1 M 30/1 (v/v) (50 ml cada vez) y una vez con salmuera (50 ml). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y los volátiles se eliminaron a presión reducida para obtener el intermedio protegido con Mmt (3,18 g, 9,56 mmol).

El compuesto intermedio protegido con Mmt (3,18 g, 9,56 mmol) se disolvió en DCM anhidro (30 ml). Se añadieron ácido 6-(S-tritilmercapto)hexanoico (4,48 g, 11,47 mmol), PyBOP (5,67 g, 11,47 mmol) y DIEA (5,0 ml, 28,68 mmol) y la mezcla se agitó durante 30 min a TA. La disolución se diluyó con éter dietílico (250 ml) y se lavó 3 veces con salmuera/disolución de NaOH 0,1 M 30/1 (v/v) (50 ml cada vez) y una vez con salmuera (50 ml). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y los componentes volátiles se separaron a presión reducida. El componente 5a se purificó por cromatografía ultrarrápida.

Rendimiento: 5,69 g (8,09 mmol).

MS: m/z 705,4 = $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calculado = 705,0).

Síntesis del compuesto intermedio del reactivo conector 5b:

A una disolución del compuesto 5a (3,19 g, 4,53 mmol) en THF anhidro (50 ml) se añadió $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$ (disolución 1 M, 8,5 ml, 8,5 mmol) y la disolución se agitó durante 16 horas a TA. Se añadió $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$ adicional (disolución 1 M, 14 ml, 14 mmol) y se agitó durante 16 horas a TA. La reacción se inactivó por adición de metanol (8,5 mL), se
5 añadió *N,N*-dimetil-etilendiamina (3 mL, 27,2 mmol) y la disolución se calentó hasta reflujo y se agitó durante tres horas. La mezcla se diluyó con acetato de etilo (300 mL) a TA, se lavó con disolución saturada, acuosa de Na_2CO_3 (2 x 100 mL) y disolución saturada, acuosa de NaHCO_3 (2 x 100 mL). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y los componentes volátiles se evaporaron a presión reducida para obtener la amina
10 intermedia bruta (3,22 g).

La amina intermedia se disolvió en DCM (5 mL), se añadieron Boc_2O (2,97 g, 13,69 mmol) disuelto en DCM (5 mL) y DIEA (3,95 mL, 22,65 mmol), y la mezcla se agitó a TA durante 30 min. La mezcla se purificó por cromatografía ultrarrápida para obtener el compuesto intermedio protegido con Boc- y Mmt- bruto (3 g).

15 MS: m/z 791,4 = $[\text{M}+\text{H}]^+$, 519,3 = $[\text{M}-\text{Mmt}+\text{H}]^+$ (calculado = 791,1).

Se añadió HCl acuoso 0,4 M (48 ml) a una disolución del compuesto intermedio protegido con Boc- y Mmt en acetonitrilo (45 ml). La mezcla se diluyó con acetonitrilo (10 ml) y se agitó durante una hora a TA. Posteriormente, el valor de pH de la mezcla de reacción se ajustó hasta 5,5 por adición de 5 M de disolución de NaOH, se eliminó
20 el acetonitrilo a presión reducida y la disolución acuosa se extrajo con DCM (4 x 100 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 y los compuestos volátiles se separaron a presión reducida. El material bruto 5b se utilizó sin purificación adicional.

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

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

Síntesis del compuesto intermedio del reactivo conector 5c:

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

Rendimiento: 343 mg (0,512 mmol)

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

Síntesis del reactivo conector 5d

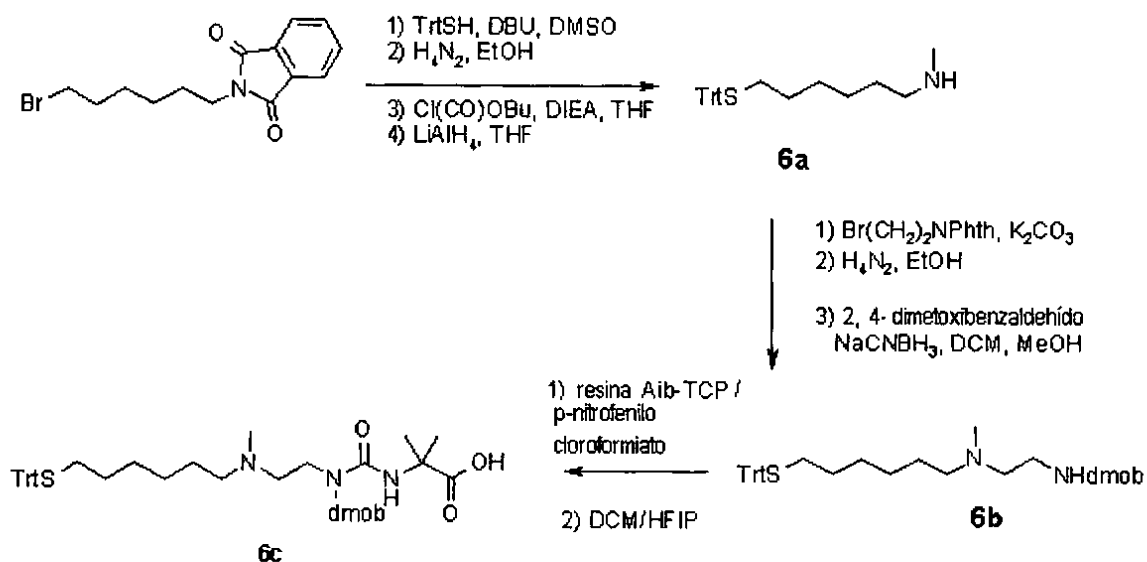
Se desprotegió la resina TCP cargada con Fmoc-Aib (980 mg, ~0,9 mmol) con
 5 DMF/piperidina, se lavó con DMF (5 veces) y DCM (6 veces) y se secó a vacío. La
 resina se trató con una disolución de cloroformato de *p*-nitrofenilo (364 mg,
 1,81 mmol) y colidina (398 μ L, 3,0 mmol) en THF anhidro (6 mL) y se agitó durante
 30 min. La disolución de reactivo se eliminó por filtración, y la resina se lavó con THF
 (5 veces) antes de añadir una disolución de amina 5c (490 mg, 0,7 mmol) y DIEA
 10 (1,23 mL, 7,1 mmol) en THF anhidro (6 mL). Después de agitar durante 18 h a TA, la
 disolución de reactivo se eliminó por filtración, y la resina se lavó con DCM (5 veces).
 El reactivo conector se escindió de la resina y se purificó por RP-HPLC. Las fracciones
 del producto se llevaron a pH 6 por adición de NaHCO_3 saturado acuoso y se
 concentraron a presión reducida. La suspensión resultante se repartió entre NaCl
 15 saturado acuoso y DCM, y la capa acuosa se extrajo con DCM. Las fracciones
 orgánicas reunidas se concentraron a sequedad para proveer el reactivo conector 5d.
 Rendimiento: 230 mg, (0,29 mmol).

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

Ejemplo 6

20 Síntesis del reactivo conector 6c

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



Síntesis de la amina 6a:

Se suspendió trifenilmetanotiol (11,90 g; 43,08 mmol) en DMSO (40 ml). Se añadieron DBU (7,41 mL, 49,55 mmol) y 6-bromohexilftalimida (13,32 g, 42,94 mmol), y la mezcla se dejó reaccionar durante aproximadamente 15 min. La mezcla de reacción se repartió entre acetato de etilo (700 ml) y HCl 0,1 M (200 ml). La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 mL), y las fracciones orgánicas reunidas se lavaron con NaHCO₃ sat. (80 mL) y salmuera (80 mL), se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron. El aceite amarillo bruto se recristalizó a partir de *n*-heptano/acetato de etilo. El intermedio 6-(*S*-Tritil-)mercaptohexilftalamida se obtuvo como un sólido blanco (13,3 g, 26,4 mmol, 62%).

Se suspendió 6-(*S*-tritol-)mercaptohexilftalamida (14,27 g, 28,2 mmol) en etanol (250 mL). Se añadió hidrato de hidrazina (3,45 ml, 70,5 mmol, equiv.) y la mezcla se calentó a temperatura de reflujo durante 2h. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró a vacío. Se añadió cloroformo (180 mL) al aceite residual, y la suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. La mezcla se filtró y el filtrado se extrajo con agua (60 mL) y salmuera (60 mL), se secó sobre MgSO₄ y se concentró para proveer 6-(tritolmercapto)-hexilamina bruta (10,10 g, 26,87 mmol, 95%). MS: m/z 376,22 = [M+H]⁺, (calculado = 376,20).

Se añadieron DIEA (1,41 mL, 8,11 mmol) y cloroformiato de *n*-butilo (908 μ L, 7,14 mmol, en 1 mL de THF) a una disolución enfriada (0°C) de 6-(tritolmercapto)-hexilamina (2,44 g, 6,49 mmol) en THF (50 mL). Se añadió LiAlH₄ (1 M en THF, 9,74 mL, 9,47 mmol) después de 30 min, y la mezcla se calentó hasta reflujo durante 90 min. La adición de agua, NaOH acuoso 3,75 M condujo a la formación de un precipitado que se eliminó de la mezcla por filtración. El filtrado se concentró a vacío para obtener 6a.

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

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

Síntesis del compuesto intermedio del reactivo conector 6b:

A una disolución de 6a (2,1 g, 5,31 mmol) se le añadió 2-bromoetilftalamida (1,96 g, 7,7 mmol) y K₂CO₃ (1,09 g, 7,9 mmol), y la mezcla se calentó hasta reflujo durante 6 h. Después de la filtración y concentración, la mezcla bruta se repartió entre acetato de etilo y NaHCO₃ saturado, acuoso. El intermedio bruto (2-(*N*-metil-*N*-(6-tritolmercaptohexil-)amino-)etil)ftalamida se purificó por cromatografía ultrarrápida.

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

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

A una disolución de (2-(*N*-metil-*N*-(6-tritilmercaptohexil-)amino-)etil)ftalamida (672 mg, 1,19 mmol) en etanol (12 mL) se le añadió monohidrato de hidrazina (208 μ L, 4,17 mmol), y la mezcla se calentó hasta reflujo durante 1 h. La mezcla de reacción se filtró, se concentró y se purificó *N*-(2-aminoetil)-*N*-metil-*N*-(6-tritilmercaptohexil-)amina por RP-HPLC.

Rendimiento: 624 mg (0,944 mmol)

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

A una disolución de *N*-(2-aminoetil)-*N*-metil-*N*-(6-tritilmercaptohexil-)amina (151 mg, 0,229 mmol) y NaCNBH₃ (30 mg, 0,463 mmol) en MeOH anhidro (6 mL) se le añadió una disolución de 2,4-dimetoxibenzaldehído en CH₂Cl₂ anhidro (0,6 μ L). Después de agitar durante 1 h a TA, la mezcla de reacción se concentró, se redisolvió en 2 mL de agua/acetonitrilo 1/9 (v/v) y se purificó 6b por RP-HPLC.

Rendimiento: 177 mg (0,219 mmol).

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

15 Síntesis del reactivo conector 6c

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

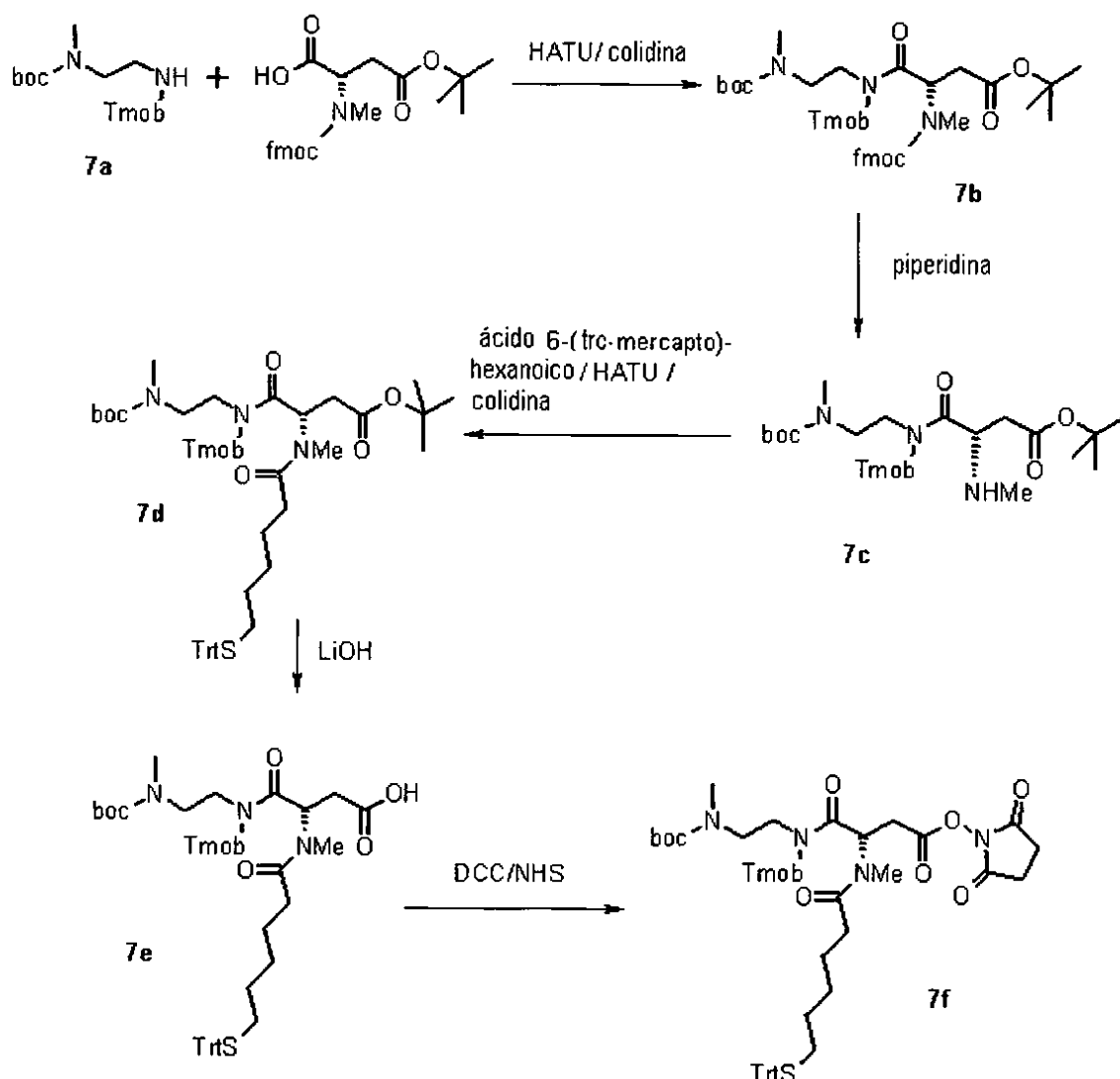
Rendimiento: 285 mg, (0,330 mmol).

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

Ejemplo 7

Síntesis del reactivo conector 7f

El reactivo conector 7f se sintetizó de acuerdo con el siguiente esquema:



A una disolución enfriada (0 °C) de *N*-Metil-*N*-boc-etilendiamina (0,5 mL, 2,79 mmol) y NaCNBH_3 (140 mg, 2,23 mmol) en MeOH (10 mL) y ácido acético (0,5 mL) se le añadió una disolución de 2,4,6-trimetoxibenzaldehído (0,547 mg, 2,79 mmol) en EtOH (10 mL). La mezcla se agitó a TA durante 2 h, se acidificó con HCl 2 M (1 mL) y se neutralizó con Na_2CO_3 saturado, acuoso (50 mL). La evaporación de todos los volátiles, la extracción de DCM de la suspensión acuosa resultante y la concentración de las fracciones orgánicas proporcionaron *N*-Metil-*N*-boc-*N'*-trob-etilendiamina (7a) como un aceite bruto que se purificó por RP-HPLC.

5 Rendimiento: 593 mg (1,52 mmol)

MS: m/z 377,35 = $[\text{M}+\text{Na}]^+$, (calculado = 377,14).

Se disolvió *N*-Fmoc-*N*-Me-Asp(OtBu)-OH (225 mg, 0,529 mmol) en DMF (3 mL) y 7a (300 mg, 0,847 mmol), se añadieron HATU (201 mg, 0,529 mmol) y colidina (0,48 mL, 3,70 mmol). La mezcla se agitó a TA durante 2 horas para proveer 7b. Para

desprotección de fmoc, se añadió piperidina (0,22 mL, 2,16 mmol) y se siguió agitando durante 1 h. Se añadió ácido acético (1 mL), y se purificó 7c por RP-HPLC.

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

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

- 5 Se disolvió ácido 6-tritilmercaptohexanoico (0,847 g, 2,17 mmol) en DMF anhidra (7 mL). Se añadieron HATU (0,825 g, 2,17 mmol) y colidina (0,8 mL, 6,1 mmol) y 7c (0,78 g, 1,44 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 60 min a TA, se acidificó con AcOH (1 mL) y se purificó por RP-HPLC. Las fracciones de producto se neutralizaron con $NaHCO_3$ saturado acuoso y se concentraron. La fase acuosa
- 10 restante se extrajo con DCM y se aisló 7d tras la evaporación del disolvente.

Rendimiento: 1,4 g (94%)

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

- A una disolución de 7d (1,40 mg, 1,53 mmol) en MeOH (12 mL) y H_2O (2 mL) se le añadió LiOH (250 mg, 10,4 mmol), y la mezcla de reacción se agitó durante 14 h
- 15 a 70 °C. La mezcla se acidificó con AcOH (0,8 mL) y se purificó 7e por RP-HPLC. Las fracciones de producto se neutralizaron con $NaHCO_3$ saturado acuoso y se concentraron. La fase acuosa se extrajo con DCM y se aisló 7e tras la evaporación del disolvente.

Rendimiento: 780 mg (60%)

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

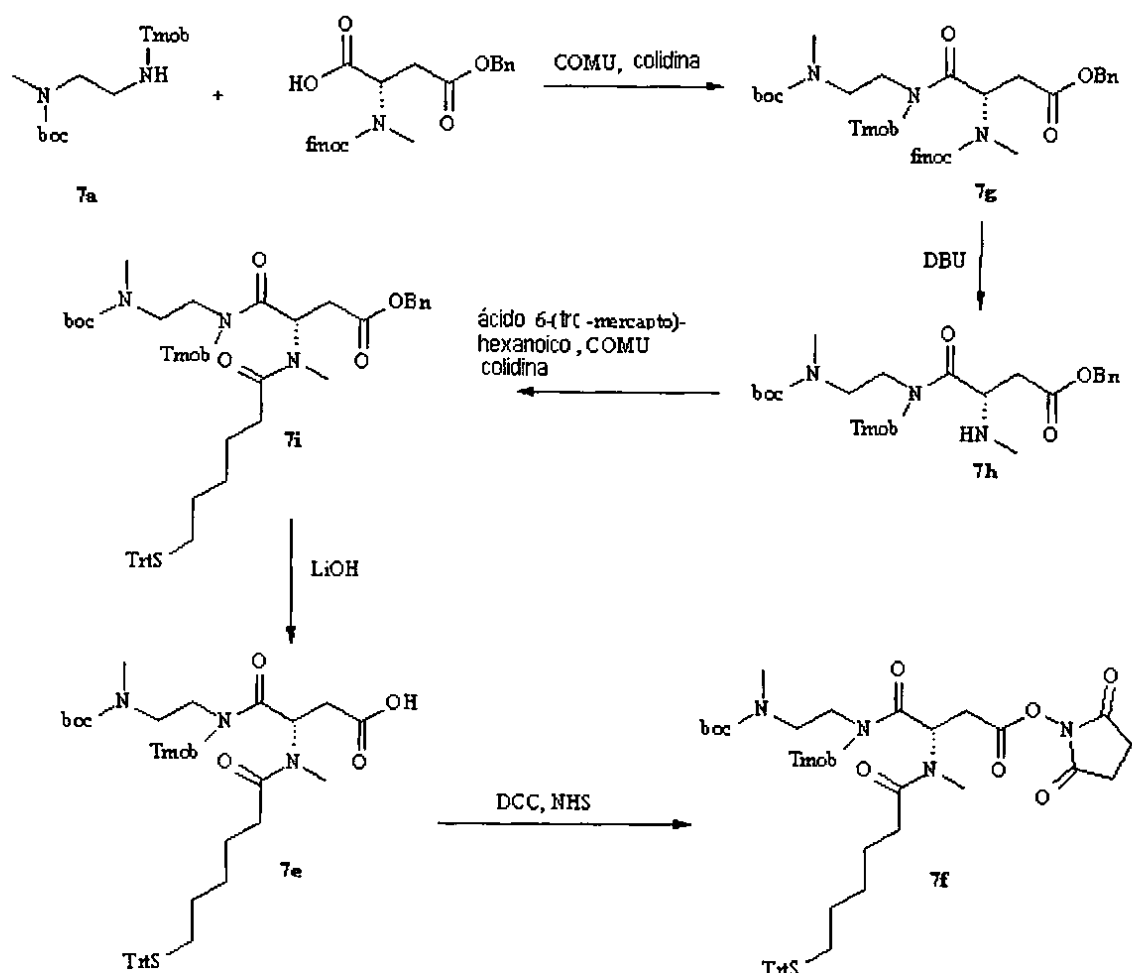
- A una disolución de 7e (170 mg, 0,198 mmol) en DCM anhidro (4 mL) se le añadieron DCC (123 mg, 0,59 mmol) y N-hidroxi-succinimida (114 mg, 0,99 mmol), y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h. La mezcla se filtró, y el filtrado se acidificó con 0,5 mL de AcOH, y 7f se purificó por RP-HPLC. Las fracciones de
- 25 producto se neutralizaron con $NaHCO_3$ saturado acuoso y se concentraron. La fase acuosa restante se extrajo con DCM y se aisló 7f tras la evaporación del disolvente.

Rendimiento: 154 mg (0,161 mmol)

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

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

Esquema de reacción alternativo:



A una disolución de *N*-Metil-*N*-boc-etilendiamina (2 g, 11,48 mmol) y NaCNBH_3 (819 mg, 12,63 mmol) en MeOH (20 mL) se le añadió 2,4,6-trimetoxibenzaldehído (2,08mg, 10,61 mmol) en porciones. La mezcla se agitó a TA durante 90 min, se acidificó con HCl 3 M (4 mL) y se agitó durante otros 15 min. La mezcla de reacción se añadió a disolución saturada de NaHCO_3 (200 mL) y se extrajo 5 x con CH_2Cl_2 . Las fases orgánicas reunidas se secaron sobre Na_2SO_4 y los disolventes se evaporaron a vacío. La *N*-Metil-*N*-boc-*N'*-tmob-etilendiamina (7a) resultante se secó completamente en alto vacío y se usó en la etapa de reacción siguiente sin purificación adicional.

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

MS: m/z 355,22 = $[\text{M}+\text{H}]^+$, (calculado = 354,21).

A una disolución de 7a (2 g, 5,65 mmol) en CH_2Cl_2 (24 ml) se añadieron COMU (4,84 g, 11,3 mmol), *N*-Fmoc-*N*-Me-Asp(OBn)-OH (2,08 g, 4,52 mmol) y colidina (2,65 mL, 20,34 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 3 h a TA, se diluyó con CH_2Cl_2 (250 mL) y se lavó 3 x con H_2SO_4 0,1 M (100 ml) y 3 x con salmuera (100 ml).

Las fases acuosas se re-extrajeron con CH_2Cl_2 (100 ml). Las fases orgánicas reunidas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron, y el residuo se concentró hasta un volumen de 24 mL. Se purificó 7g usando cromatografía ultrarrápida.

Rendimiento: 5,31 g (148%, 6.66 mmol).

5 MS: m/z 796,38 = $[\text{M}+\text{H}]^+$, (calculado = 795,37).

A una disolución de 7g [5,31 g, máx. 4,51 mmol ref. a *N*-Fmoc-*N*-Me-Asp(OBn)-OH] en THF (60 mL) se le añadió DBU (1,8 mL, 3 % v/v). La disolución se agitó durante 12 min a TA, se diluyó con CH_2Cl_2 (400 ml) y se lavó 3 x con H_2SO_4 0,1 M (150 ml) y 3 x con salmuera (150 ml). Las fases acuosas se re-extrajeron con CH_2Cl_2 (100 ml). Las fases orgánicas reunidas se secaron sobre Na_2SO_4 y se filtraron. Se aisló 7h tras la evaporación del disolvente y se usó en la reacción siguiente sin purificación adicional.

MS: m/z 574,31 = $[\text{M}+\text{H}]^+$, (calculado = 573,30).

Se disolvió 7h (5,31 g, 4,51 mmol, bruto) en acetonitrilo (26 mL) y se añadieron COMU (3,87 g, 9,04 mmol), ácido 6-tritilmercaptohexanoico (2,12 g, 5,42 mmol) y colidina (2,35 mL, 18,08 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 4 h a TA, se diluyó con CH_2Cl_2 (400 mL) y se lavó 3 x con H_2SO_4 0,1 M (100 ml) y 3 x con salmuera (100 ml). Las fases acuosas se re-extrajeron con CH_2Cl_2 (100 ml). Las fases orgánicas reunidas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron, y se aisló 7i tras la evaporación del disolvente. El producto 7i se purificó usando cromatografía ultrarrápida.

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

MS: m/z 856,41 = $[\text{M}+\text{H}]^+$, (calculado = 855,41).

A una disolución de 7i (2,63 g, 2,78 mmol) en *i*-PrOH (33 mL) y H_2O (11 mL) se le añadió LiOH (267 mg, 11,12 mmol), y la mezcla de reacción se agitó durante 70 min a TA. La mezcla se diluyó con CH_2Cl_2 (200 ml) y se lavó 3 x con H_2SO_4 0,1 M (50 ml) y 3 x con salmuera (50 ml). Las fases acuosas se re-extrajeron con CH_2Cl_2 (100 ml). Las fases orgánicas reunidas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron, y se aisló 7e tras la evaporación del disolvente. Se purificó 7j usando cromatografía ultrarrápida.

Rendimiento: 2,1 g (88%)

30 MS: m/z 878,4 = $[\text{M}+\text{Na}]^+$, (calculado = 878,40).

A una disolución de 7e (170 mg, 0,198 mmol) en DCM anhidro (4 mL) se le añadieron DCC (123 mg, 0,59 mmol) y una cantidad catalítica de DMAP. Después de 5 min se añadió *N*-hidroxi-succinimida (114 mg, 0,99 mmol) y se agitó la mezcla de reacción durante 1 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró, el disolvente se eliminó a vacío, y el residuo se recogió en 90 % de acetonitrilo más 0,1

35

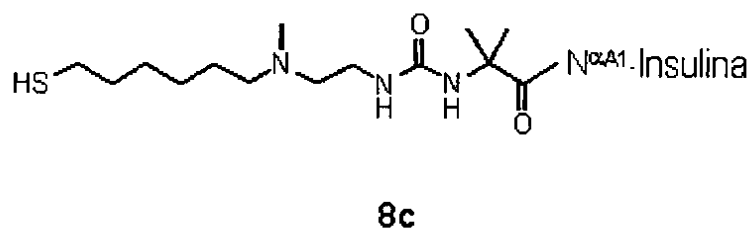
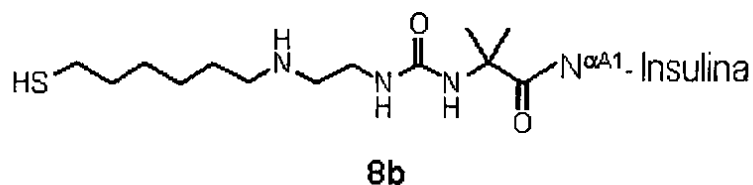
% de TFA (3,4 ml). La mezcla bruta se purificó por RP-HPLC. Las fracciones de producto se neutralizaron con 0,5 M pH 7,4 tampón de fosfato, y se concentraron. La fase acuosa restante se extrajo con DCM y se aisló 7f tras la evaporación del disolvente.

5 Rendimiento: 154 mg (81%)

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

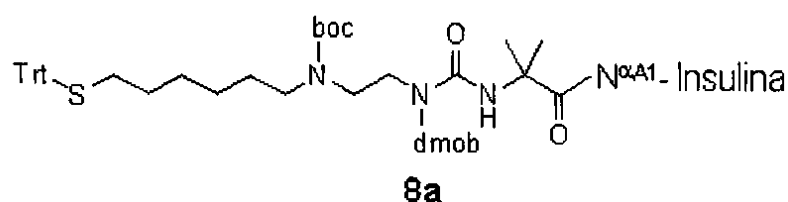
Ejemplo 8

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



10

Síntesis del conjugado insulina-conector protegido 8a



15 El reactivo conector 5d se disolvió en DCM (20 mg/mL) y se activó con resina de N-ciclohexil-carbodiimida-N'-metil poliestireno (1,9 mmol/g, 10 eq.) durante 1h. La disolución del reactivo conector activado se añadió a una disolución de insulina (1,2 eq.) y DIEA (3,5 eq.) en DMSO (100 mg insulina/mL), y la mezcla se agitó a TA durante 45 min. La disolución se acidificó con ácido acético, el DCM se evaporó a presión reducida, y el conjugado de insulina protegida-conector 8a se purificó por RP-HPLC.

20

Se trató 8a liofilizado con una mezcla de 90/10/2/2 (v/v/v/v) HFIP/TFA/agua/trietilsilano (2 mL/100 mg de 8a) durante 45 min a TA. La mezcla de

reacción se diluyó con agua, y todos los volátiles se eliminaron bajo una corriente de nitrógeno. Se purificó el conjugado de N^{αA1}-insulina conjugada-conector 8b por RP-HPLC.

8b:

- 5 Rendimiento: 139 mg (0,023 mmol) a partir de 62 mg (0,078 mmol) del conector 5d
MS: m/z 1524,45 = [M+4H]⁴⁺ (calculado = 1524,75).

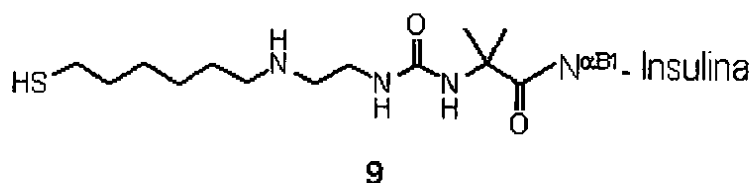
El conjugado de N^{αA1}-insulina conjugada-conector 8c se sintetizó como se describió para 8b excepto por el uso de 6c (72 mg, 0,101 mmol) en lugar de 5d.

8c:

- 10 Rendimiento: 237 mg (0,039 mmol)
MS: m/z 1528,23 = [M+4H]⁴⁺ (calculado = 1528,28).

Ejemplo 9

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



15

Se preparó N^α-boc-Gly^{A1}-N^ε-boc-Lys^{B29}-insulina doblemente protegida como se describió previamente (J. Markussen, J. Halstrøm, F. C. Wiberg, L. Schäffer, *J. Biol. Chem.* 1991, 266, 18814-18818).

- 20 El reactivo conector 5d (0,04 mmol) se disolvió en DCM (0.5 mL) y se activó con resina de N-ciclohexil-carbodiimida-N'-metil poliestireno (0,205 mmol) a TA durante 2h. La disolución resultante del reactivo conector activado se añadió a una disolución de insulina bis-boc-protégida (24 mg, 0,004mmol) y DIEA (5 µL, 0,0229 mmol) y se agitó a TA durante 1 h. La mezcla de reacción se acidificó con
25 100 µL de ácido acético y el conjugado de insulina protegida-conector se purificó por RP-HPLC.

Rendimiento: 5 mg (0,00075 mmol).

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

- 30 Se trató conjugado de insulina-conector protegido y liofilizado con 1 mL de 90/10/2/2 (v/v/v/v) HFIP/TFA/agua/TES a TA durante 45 min. La mezcla de reacción se diluyó con 0,5 ml de agua, y todos los volátiles se eliminaron bajo una corriente de

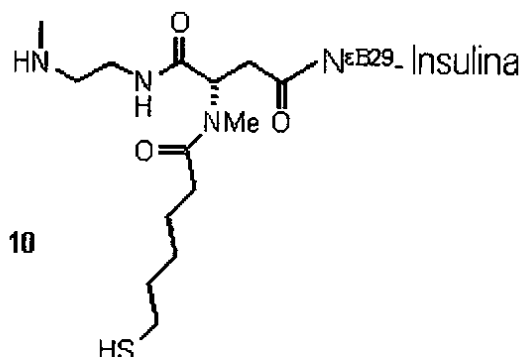
nitrógeno. Se purificó el conjugado de sN^{DB1}-insulina conjugada-conector 9 por RP-HPLC.

Rendimiento: 4 mg (0,0007 mmol)

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

5 Ejemplo 10

Síntesis del conjugado N^{DB29}-insulina-conector 10



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

Rendimiento: 172 mg (0,025 mmol).

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

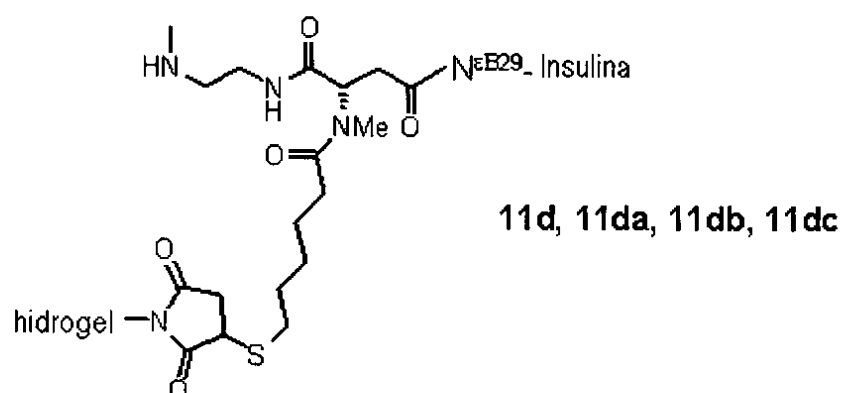
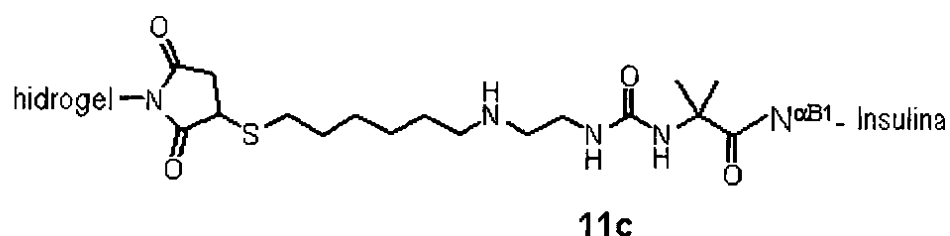
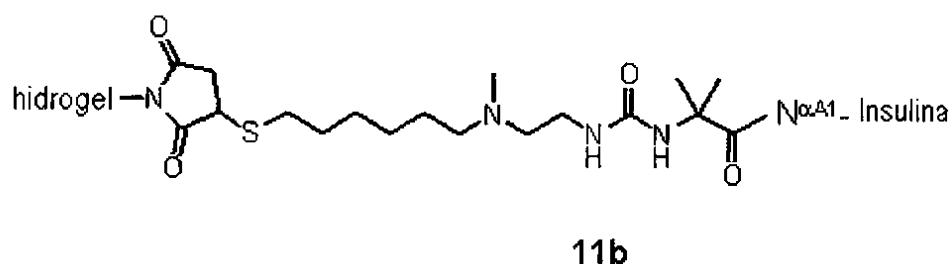
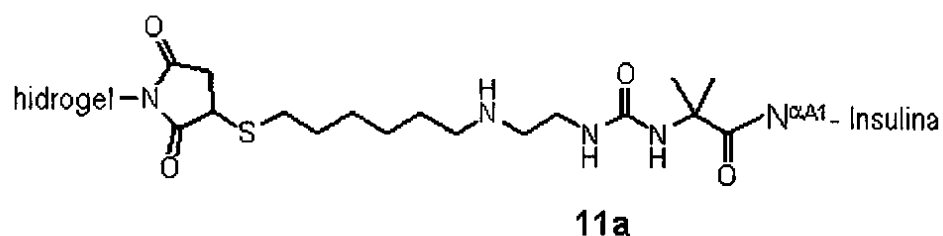
15 La eliminación de los grupos protectores se efectuó por tratamiento de las fracciones del producto liofilizadas con 6 mL de 90/10/2/2 (v/v/v/v) HFIP/TFA/TES/agua durante 1h a TA. Se purificó el conjugado de N^{DB29}-insulina conjugada-conector 10 por RP-HPLC.

Rendimiento: 143 mg (0,023 mmol).

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

Ejemplo 11

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



Se rellenó con hidrogel funcionalizado con maleimida seca 4 (82 mg, 10,3 μmol grupos maleimido) una jeringa equipada con una frita de filtro. Se añadió una
 5 disolución de insulina-conector-tiol 8b (27,8 mg, 4,6 μmol) en 1,0 mL acetonitrilo/agua/TFA 1/1/0,001 (v/v/v) la suspensión se incubó durante 5 min a TA. Se añadió tampón de acetato (0,4 mL, pH 4,8, 1,0 M) y la muestra se incubó a TA durante 1 h. El consumo de tiol se monitoreó mediante el ensayo de Ellman. Se lavó el hidrogel

10 veces con 1/0.43/0,001 (v/v/v) acetonitrilo/agua/TFA y 2 veces con 1/1/0,2/0,25 (v/v/v/v) sarcosina 1,0 M pH 7,4/acetonitrilo/tampón de fosfato 0,5 M, pH 7,4/agua. Finalmente, se suspendió el hidrogel en la disolución de sarcosina y se incubó durante 2 h a TA.

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

Se determinó el contenido de insulina por hidrólisis total de una alícuota de insulina-conector-hidrogel bajo condiciones de reducción a pH 12 y posterior cuantificación de cadena A de insulina y cadena B de insulina por RP-HPLC.

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

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

Se prepararon 11b, 11c y 11d como se describió anteriormente, excepto por el uso de 8c, 9 y 10, respectivamente, en lugar de 8b.

- 15 Se preparó 11da como se describió anteriormente, excepto por el uso de 10 y 4a en lugar de 8b y 4.

- 20 Se preparó 11b de la siguiente manera: Una suspensión de hidrogel funcionalizado con maleimida 4a en pH 2,5 HCl, 0,01 % Tween-20 (5,0 mL, 119 µmol de grupos maleimido) se cargó en una jeringa equipada con un filtro. Se añadió una disolución de insulina-conector-tiol 10 (166 mg, 24,4 µmol) en 8,0 mL HCl pH 2,5, 0,01 % Tween-20 y la suspensión se incubó durante 5 min a TA. Se añadió tampón de succinato sódico (3,9 mL, pH 4,0, 150 mM; EDTA 1 mM, 0,01 % Tween-20) para proveer pH 3,6, y la muestra se incubó a TA durante 90 min. El consumo de tiol se monitoreó mediante el ensayo de Ellman. Se lavó el hidrogel 10 veces con tampón de succinato sódico (pH 3,0, 50 mM; EDTA 1 mM, 0,01 % Tween-20) y 3 veces con tampón de succinato sódico (pH 3,0, 50 mM; EDTA 1 mM, 0,01 % Tween-20) que contenía acetil cisteína 200 mM. Finalmente, se suspendió el hidrogel en el tampón que contenía acetil cisteína y se incubó durante 1 h a TA.

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

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

- 30 Se preparó 11dc de la siguiente manera: Una suspensión de hidrogel funcionalizado con maleimida 4a en pH 2,5 HCl, 0,01 % Tween-20 (58,3 mL, 958 µmol

de grupos maleimido) se añadió a un reactor de síntesis de fase sólida. Se añadió una disolución de insulina-conector-tiol 10 (117 mL, 460 µmol) en 2,5 HCl, 0,01 % Tween-20 a 4a. La suspensión se incubó a TA durante 5 min. Se añadió tampón de succinato (4,8 mL, pH 4,0, 150 mM; EDTA 1 mM, 0,01 % Tween-20) para proveer un pH de 3,6, y la suspensión se incubó a TA durante 90 min.

El consumo de tiol se monitoreó mediante el ensayo de Ellman. Se lavó el hidrogel 10 veces con tampón de succinato (pH 3,0, 50 mM; EDTA 1 mM, 0,01 % Tween-20) y 2 veces con tampón de succinato (pH 3,0, 50 mM; EDTA 1 mM, 0,01 % Tween-20) que contenía mercaptoetanol 10 mM. Finalmente, se suspendió el hidrogel en el tampón que contenía mercaptoetanol y se incubó durante 3 h a TA.

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

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

Alternativamente, se pueden utilizar micropartículas de hidrogel derivadas de maleimida 4aa en lugar de 4a.

Ejemplo 12

Cinética de liberación *in vitro*

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

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

Se determinaron las semividas *in vitro* de 16 d, 10 d, 30 d y 14 d para 11a, 11b, 11c y 11d, respectivamente.

Alternativamente, se transfirió insulina-conector-hidrogel 11db a jeringas equipadas con filtros, se suspendió en 6 ml de fosfato sódico 60 mM, EDTA 3 mM, 0,01% Tween-20, pH 7,4, y se incubó a 37 °C. En puntos de tiempo definidos, el sobrenadante se intercambiaba y la insulina liberada se cuantificó por RP-HPLC a 215 nm. La cantidad de insulina liberada se trazó contra el tiempo de incubación. Se aplicó

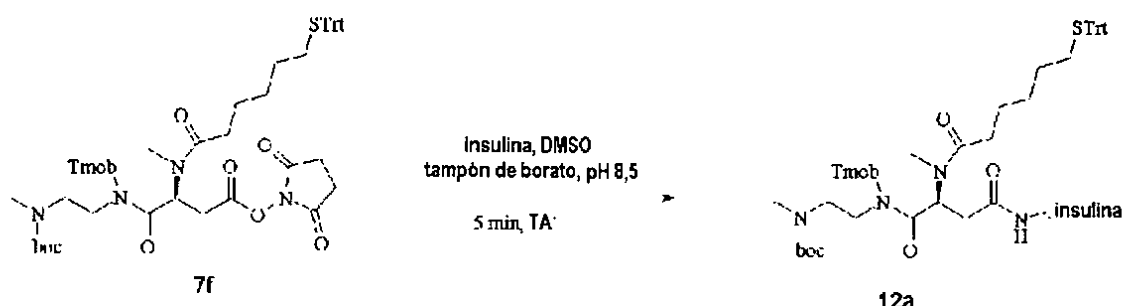
un software de ajuste de curvas y se determinó una semivida *in vitro* de 15 d para 11db.

Alternativamente, insulina-conector-hidrogel 11db se cargó en una columna de cromatografía y se dispuso en una incubadora controlada por temperatura (37°C). Se bombeó fosfato sódico (pH 7,4, 60 mM; EDTA 3 mM, 0,01 % Tween-20) a través de la columna con un flujo constante de 0,25 mL/h (nominal) y se recogió fuera de la incubadora. En puntos de tiempo definidos, se analizó la disolución por RP-HPLC a 215 nm. La cantidad de insulina liberada se trazó contra el tiempo de incubación. Se aplicó un software de ajuste de curvas y se determinó una semivida *in vitro* de 13 d para 11db.

Ejemplo 13

Síntesis de un conjugado LysB29-conector de insulina (12a) y un conjugado LysB28-conector de insulina lispro (12b):

Síntesis del conjugado LysB29-conector de insulina (12a)



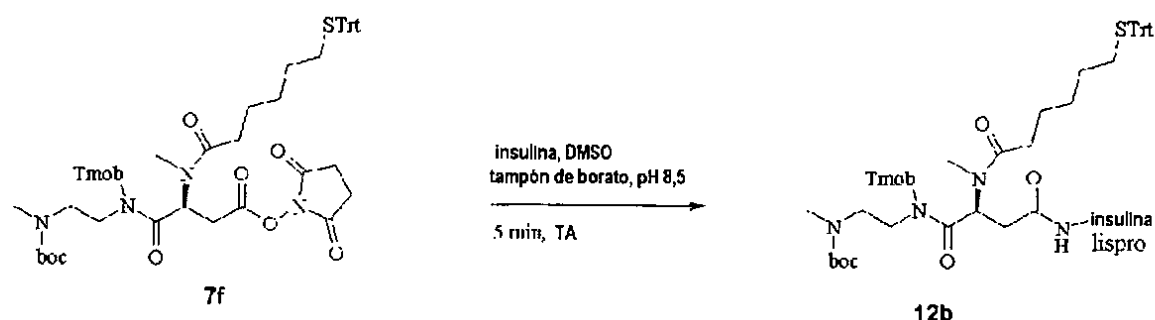
Se disolvieron 1,2 g (0,206 mmol, 0,85 eq) de insulina en DMSO a TA. Después de 30 min, la disolución se enfrió hasta 0 °C mientras se añadía tampón de borato (0,5 M, pH 8,5, 21,6 ml) durante un periodo de 4,40 min. La temperatura de la disolución se mantuvo entre 25 y 28 °C. Se disolvió una disolución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

Regioselectividad de acuerdo con el análisis UPLC (antes de la purificación por RP HPLC): 0,70% 7f unido a GlyA1 de insulina y 76,2 % 7f unido a LysB29 de insulina (véase Fig. 1a).

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

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

Síntesis del conjugado LysB28-conector de insulina lispro (12b)



Se disolvieron 0,347 g (0,059 mmol, 0,85 eq) de insulina lispro en DMSO a TA.

- 5 Después de 30 min, la disolución se enfrió hasta 0 °C mientras se añadía tampón de borato (0,5 M, pH 8,5, 5,64 ml) durante un periodo de 1,40 min. La temperatura de la disolución se mantuvo entre 25 y 30 °C. Se añadió una disolución de 67 mg (0,070 mmol, 1 eq) de 7f disuelto en 8 ml de DMSO invariable en el tiempo durante un periodo de 2 min. El baño de hielo se eliminó y la mezcla de reacción se agitó durante
- 10 5 min a TA. La reacción se inactivó por adición de 20 ml de MeCN/H₂O (1:1, 0,1 % TFA) y 1 ml de AcOH. El compuesto 12b se purificó por RP-HPLC (disolvente A: H₂O con 0,1 % TFA, disolvente B: MeCN con 0,1 % TFA, gradiente: 30-80 % de B durante 14 minutos, flujo: 40 ml/min).

- Regioselectividad de acuerdo con el análisis UPLC (antes de la purificación por RP
- 15 HPLC): 1,3 % del producto fue 7f unido a GlyA1 de insulina lispro, 76,7 % del producto fue 7f unido a LysB28 de insulina lispro (véase Fig. 1b).

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

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

Ejemplo 14

- 20 Estudio de farmacocinética en ratas

Las farmacocinéticas de 11a se determinaron midiendo la concentración de insulina en plasma después de la aplicación subcutánea de una dosis individual en ratas.

- Un grupo, que consistía en 10 ratas macho Wistar (200-250 g), se usó para estudiar
- 25 los niveles de insulina en plasma durante un periodo de 14 días. Cada uno de los animales recibió una inyección subcutánea individual de 500 µL de suspensión de 11a en tampón de acetato pH 5, que contenía 6 mg de insulina (12 mg insulina/ml). Por animal y punto de tiempo se extrajeron 200 µL de sangre sublingual para obtener 100 µL Li-Heparina en plasma. Las muestras se recogieron antes de la aplicación y

después de 4h, 1, 2, 3, 4, 7, 9, 11 y 14 días de la inyección. Las muestras de plasma se congelaron dentro de los 15 min posteriores a la extracción de sangre, y se conservaron a -80°C hasta el ensayo.

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

No se observó absorción rápida y sí una liberación sostenida de insulina durante 14 días.

Ejemplo 15:

Estudio de farmacocinética en ratas

La farmacocinética de 11da se determinó midiendo las concentraciones de insulina plasmática durante un periodo de 13 días en ratas sanas.

Ocho ratas Wistar (aprox. 250g de peso corporal) recibieron una inyección subcutánea individual de 500µL del artículo de ensayo 11da en tampón de acetato pH 5, que contenía 3 mg de insulina (aprox. 12 mg/kg). Por animal y punto de tiempo se extrajeron 200 µL de sangre de la vena del rabo para obtener aproximadamente 100 µL Li-Heparina en plasma. Las muestras se recogieron 1 día antes y 4h, 1d, 2d, 3d, 6d, 7d, 8d, 10d y 13d después de la administración del artículo de ensayo. Las muestras de plasma se congelaron y conservaron a -80°C hasta el ensayo. El contenido de insulina de las muestras de plasma se midió usando un kit ELISA ultrasensible para insulina humana (DRG Instruments GmbH, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incluyeron blancos (calibrador 0) en la curva de calibración y se restaron de los valores de muestra, y la curva de calibración se ajustó usando una ecuación polinómica de tercer orden. Antes del análisis, las muestras de plasma se agitaron en vórtex y se diluyeron en tubos de reacción (1:5 y 1:10 con calibrador 0). Para análisis, se midió OD a 450 nm con una lectora de placas de microtitulación (Tecan Ultra) sin corrección de longitud de onda de referencia. Los

resultados del contenido de insulina plasmática hasta el día 13 para todos los animales investigados se muestran en la Figura 3.

Después de una inyección subcutánea individual de 500 μ L de 11d que contenía 3 mg de insulina, los niveles de insulina en plasma alcanzaron un máximo de aproximadamente 500 pM en el día 1. Como se esperaba, la concentración de insulina en plasma disminuyó posteriormente en forma continua dentro de 2 semanas. La relación valle-pico de insulina en plasma dentro de la primera semana del estudio fue de aproximadamente 1,7

Ejemplo 16:

10 Estudio de farmacocinética y farmacodinamia en ratas

La cantidad y la bioactividad de la insulina liberada se investigaron analizando la concentración de insulina en plasma y el efecto de reducción de glucosa en sangre en un estudio exploratorio de farmacocinética/farmacodinamia usando ratas Sprague-Dawley (SD) diabéticas.

15 Para este propósito, se indujo la diabetes en 8 ratas con estreptozotocina (STZ), y todos los animales con niveles de glucosa en sangre por encima de 350 mg/dL en el día 0 se incluyeron en este estudio. Siete de ocho ratas SD se volvieron diabéticas y recibieron una inyección subcutánea individual de 500 μ L del artículo de ensayo 11da en tampón de acetato pH 5, que contenía 6,4 mg de insulina. Por animal y punto de tiempo se extrajeron 200 μ L de sangre de la vena del rabo para obtener aproximadamente 100 μ L Li-Heparina en plasma. Las muestras se recogieron 4 días antes y 2h, 1d, 2d, 3d, 6d, 7d, 8d, 10d y 13d después de la administración del artículo de ensayo. Las muestras de plasma se congelaron y conservaron a -80°C hasta el ensayo. Se midió la glucosa en sangre con un dispositivo AccuChek Comfort desde la vena del rabo 3 veces antes de la inyección, y 2h, 1d, 2d, 3d, 6d, 7d, 8d, 10d, 13d, 15d, 17d, 20d, 22d y 24d después de la administración del artículo de ensayo. El contenido de insulina de las muestras de plasma se midió usando un kit ELISA para insulina humana (DRG Instruments GmbH, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incluyeron blancos (calibrador 0) en la curva de calibración y se restaron de los valores de muestra, y la curva de calibración se ajustó usando una ecuación polinómica de tercer orden. Antes del análisis, las muestras de plasma se agitaron en vórtex y se diluyeron en tubos de reacción (1:5 y 1:10 con calibrador 0). Para análisis, se midió OD a 450 nm con una lectora de placas de microtitulación (Tecan Ultra) sin corrección de longitud de onda de referencia. El nivel de insulina en plasma se

monitoreó durante 2 semanas, y el nivel de glucosa en sangre durante un periodo de 3 semanas, como se muestra en la Figura 4.

Después de una inyección subcutánea individual de insulina e hidrogel 11da, el nivel de glucosa en sangre se redujo eficazmente por un periodo de 10 días con valores por debajo de 100 mg/dL sin ningún síntoma de hipoglucemia. Debido a la dosis superior de 6,4 mg de insulina por animal, la concentración de insulina en plasma máxima fue de aprox. 800 pM en el día 1 y disminuyó continuamente dentro de 2 semanas hasta aprox. 300 pM. Simultáneamente, los valores de glucosa en sangre comenzaron a elevarse después de 10 días y alcanzaron los niveles previos a la dosis después de 3 semanas.

Ejemplo 17:

Estudio de farmacocinética durante 24 horas (estudio de absorción rápida) en ratas

Con el fin de probar que la insulina se libera de insulina-conector-hidrogel sin una absorción rápida, se monitoreó la concentración de insulina en plasma durante un periodo de 24 horas en ratas sanas.

Se dividieron 8 ratas Sprague-Dawley (200-250g de peso corporal) en 2 grupos, y recibieron una inyección subcutánea individual de 2 mL del artículo de ensayo 11db en tampón de acetato pH 5 por kg de peso corporal. El artículo de ensayo tenía una concentración de 4 mg/mL de insulina, de modo que cada animal recibiera 8 mg de insulina por kg de peso corporal. Por animal y punto de tiempo se extrajeron 200 μ L de sangre de la vena del rabo para obtener aproximadamente 100 μ L Li-Heparina en plasma. Las muestras del grupo A se recogieron antes de la dosis y 5min, 30min, 2h, 4h y 8h después de la aplicación del artículo de ensayo, y para el grupo B antes de la dosis y 15min, 1h, 3h, 6h y 24h después de la administración del artículo de ensayo. Las muestras de plasma se congelaron y conservaron a -80°C hasta el ensayo. El contenido de insulina de las muestras de plasma se midió usando un kit ELISA ultrasensible para insulina humana (DRG Instruments GmbH, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incluyeron blancos (calibrador 0) en la curva de calibración y se restaron de los valores de muestra, y la curva de calibración se ajustó usando una ecuación polinómica de tercer orden. Antes del análisis, las muestras de plasma se agitaron en vórtex y se diluyeron en tubos de reacción (1:5 y 1:10 con calibrador 0). Para análisis, se midió OD a 450 nm con una lectora de placas de microtitulación (Tecan Ultra) sin corrección de longitud de onda de referencia. El

resultado se muestra en la Figura 5 e indica claramente que la insulina se libera sin absorción rápida.

Ejemplo 18:

Estudio de múltiples dosis de farmacocinética y farmacodinamia en ratas

5 Se determinaron la farmacocinética y farmacodinamia después de 3 dosis semanales de 11da midiendo las concentraciones de insulina en plasma y los niveles de glucosa en sangre durante un periodo de 4 semanas en ratas diabéticas.

Se emplearon 8 ratas Sprague-Dawley con un peso corporal promedio de 239g. Se indujo la diabetes con estreptozotocina (STZ), y todos los animales con
10 niveles de glucosa en sangre por encima de 350 mg/dL en el día 0 (día de inyección del artículo de ensayo) se incluyeron en este estudio. Ocho de ocho animales que recibieron tratamiento de STZ se volvieron diabéticos y recibieron 3 inyecciones subcutáneas semanales en el día 0, 7 y 14 de 2mL del artículo de ensayo 11da en tampón de acetato pH 5 por kg de peso corporal. Con un artículo de ensayo la
15 concentración de insulina de 4 mg/mL, la dosis aplicada fue de 8 mg de insulina por kg de peso corporal. Por animal y punto de tiempo se extrajeron 200 μ L de sangre de la vena del rabo para obtener aproximadamente 100 μ L Li-Heparina en plasma. Las muestras se recogieron 3 días antes y hasta 28 días después de la administración del artículo de ensayo. Las muestras de plasma se congelaron y conservaron a -80°C
20 hasta el ensayo. La glucosa en sangre se midió con un dispositivo AccuChek Comfort desde la vena del rabo, 3 veces antes de la inyección y hasta 30 días después de la inyección. El contenido de insulina de las muestras de plasma se midió usando un kit ELISA para insulina humana (DRG Instruments GmbH, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incluyeron blancos (calibrador 0) en la curva de
25 calibración y se restaron de los valores de muestra, y la curva de calibración se ajustó usando una ecuación polinómica de tercer orden. Antes del análisis, las muestras de plasma se agitaron en vórtex y se diluyeron en tubos de reacción (1:5 y 1:10 con calibrador 0). Para análisis, se midió OD a 450 nm con una lectora de placas de microtitulación (Tecan Ultra) sin corrección de longitud de onda de referencia. El nivel
30 de insulina en plasma y el nivel de glucosa en sangre se monitorearon durante un periodo de 4 semanas, y ambos se muestran en la Figura 6.

La forma de las curvas indica que la insulina liberada fue bioactiva, reduciendo en forma estable el nivel de glucosa en sangre hasta valores de aproximadamente 100mg/dL después de la tercera inyección, que permanecieron bajos durante
35 aproximadamente una semana. Al mismo tiempo, la concentración de insulina máxima

aumentó establemente, comenzando por 200 pM después de la primera y 300 pM después de la segunda dosis hasta 400 pM tras la tercera dosis, y posteriormente disminuyó nuevamente dentro de 2 semanas a valores por debajo de 100 pM.

Ejemplo 19:

5 Estudio de farmacocinética en ratas

La farmacocinética de 11dc se determinó midiendo las concentraciones de insulina plasmática durante un periodo de 13 días en ratas sanas.

Ocho ratas Wistar (aprox. 230g de peso corporal) recibieron una inyección subcutánea individual de 2 ml/kg del artículo de ensayo 11dc en tampón de succinato pH 5 (10 mM succinato/tris, 85 g/l trehalosa, 0,01% Tween[®] 20, pH 5,0), que contenía 3 mg de insulina (12 mg/kg dosis). Por animal y punto de tiempo se extrajeron 200 μ L de sangre de la vena del rabo para obtener aproximadamente 100 μ L Li-Heparina en plasma. Las muestras se recogieron 4 días antes y 0,3h (4 animales), 1h (4 animales), 2h (4 animales), 4h (4 animales), 1d, 2d, 3d, 6d, 8d, 10d y 13d después de la administración del artículo de ensayo. Las muestras de plasma se congelaron y conservaron a -80°C hasta el ensayo. El contenido de insulina de las muestras de plasma se midió usando un kit ELISA ultrasensible para insulina humana (DRG Instruments GmbH, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incluyeron blancos (calibrador 0) en la curva de calibración y se restaron de los valores de muestra, y la curva de calibración se ajustó usando una ecuación polinómica de tercer orden. Antes del análisis, las muestras de plasma se agitaron en vórtex y se diluyeron en tubos de reacción (1:5 y 1:10 con calibrador 0). Para análisis, se midió OD a 450 nm con una lectora de placas de microtitulación (Tecan Ultra) sin corrección de longitud de onda de referencia. Los resultados del contenido de insulina plasmática hasta el día 13 para todos los animales investigados se muestran en la Figura 7.

Después de una inyección subcutánea individual de 12mg/kg de 11c, los niveles de insulina en plasma alcanzaron un máximo de aproximadamente 500 pM en el día 1. Como se esperaba, la concentración de insulina en plasma disminuyó posteriormente en forma continua dentro de 2 semanas. La relación valle-pico de insulina en plasma dentro de la primera semana fue de aproximadamente 1,4.

Ejemplo 20

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

Se cargó Insulina-conector hidrogel 11a (730 μ L, que contenía 3,19 mg de insulina) en pH 5,0 tampón de acetato (10 mM, NaCl 130 mM, 0,01 % (w/v) tween-20) en un tubo de preparación de muestras, se lavó 3x con pH 7,4 tampón de liberación

(fosfato sódico 60 mM, EDTA 3 mM, 0,01 % (p/v) Tween-20) y se llenó hasta 1,00 mL. Una alícuota de la suspensión (0,5 ml, 1,59 mg de insulina) se cargó en una columna de cromatografía y se dispuso en una incubadora controlada por temperatura (37°C). El tampón de liberación (pH 7,4) se bombeó a través de la columna con un flujo
5 constante de 0,25 mL/h (nominal) y se recogió fuera de la incubadora. En puntos de tiempo definidos, se analizó la disolución por RP-HPLC (215 nm). La cantidad de insulina de liberación se trazó contra el tiempo de incubación y se aplicó un software de ajuste de curvas para estimar la semivida correspondiente de liberación. Se determinó una semivida de 9,4 d para la liberación de insulina.

10 Después 39 d de incubación a 37°C, la suspensión de hidrogel se transfirió a un tubo de preparación de muestras, se eliminó el hidrogel residual de la columna con pH 7,4 tampón de liberación, y la muestra se llenó hasta 1,00 mL. Se transfirieron dos alícuotas (300 µL cada una) a tubos de preparación de muestras estériles, se llenaron hasta 1,5 mL y se incubaron a 37°C. Las muestras se tomaron en intervalos de tiempo
15 y se analizaron por cromatografía de exclusión de tamaño. Las señales de UV correspondientes a los productos de degradación solubles en agua liberados por hidrogel que comprenden uno o más restos de cadenas principales (correspondientes a grupos funcionales reactivos) se integraron y trazaron contra el tiempo de incubación, véase Fig 8.

20 Ejemplo 21

Capacidad de inyección del profármaco de insulina-conector-hidrogel

Se usaron 5 mL del profármaco de insulina-conector-hidrogel 11dc (distribución de tamaño de perla de 32–75 µm, 18 mg insulina/ml) en pH 5,0 ácido succínico/tris (10 mM, 40 g/L manitol; 10 g/L dihidrato de trehalosa; 0,05% TWEEN-20). La suspensión
25 del profármaco de insulina-conector-hidrogel se cargó en una jeringa de 1 mL (longitud 57 mm) vía una aguja de 20 G. La aguja de 20 G se reemplazó con una aguja de 30 G y se dispuso en el montaje de la jeringa (Aqua Computer GmbH&Co. KG), y se inició la medición con una velocidad de pistón de 172 mm/min (equivale a 50 µL/s) (Ensayo de fuerza: Multitest 1-d, Software de registro de datos: EvaluatEmperor Lite, Versión 1,16-
30 015, Forge Gauge: BFG 200 N (all Mecmesin Ltd., Reino Unido). Los experimentos con velocidades de pistón en aumento que se muestran en la tabla siguiente se llevaron a cabo con una muestra del nuevo profármaco de insulina-conector-hidrogel. Los experimentos con agua y etilenglicol se llevaron a cabo de manera acorde. Para todos los experimentos, se usó la misma aguja de 30 G. La fuerza frente al flujo, con el
35 uso de una aguja de 30 G, se muestra en la Fig. 9.

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

Abreviaturas:

	AcOH	ácido acético
	AcOEt	acetato de etilo
5	Aib	ácido 2-aminoisobutírico
	Bn	bencilo
	Boc	t-butiloxicarbonilo
	COMU	hexafluorofosfato de (1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminoxidi)dimetilamino-morfolino-carbenio
10	DBU	1,3-diazabicyclo[5,4,0]undeceno
	DCC	N,N-diciclohexilcarbodiimida
	DCM	diclorometano
	DIEA	diisopropiletilamina
	DMAP	dimetilamino-piridina
15	DMF	N,N-dimetilformamida
	Dmob	2,4-dimetoxibencilo
	DMSO	dimetilsulfóxido
	EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
	EDTA	ácido etilendiaminatetraacético
20	eq	equivalente estequiométrico
	ESI-MS	espectrometría de masas de ionización por electropulverización
	EtOH	etanol
	Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo
	HATU	hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio
25	HFIP	hexafluoroisopropanol
	HPLC	cromatografía líquida de alta resolución

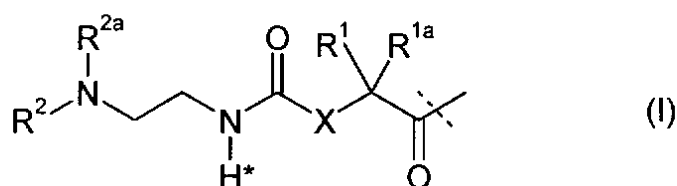
	HOBt	N-hidroxibenzotriazol
	iPrOH	2-propanol
	LCMS	espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida
	Mal	3-maleimido-propilo
5	Mal-PEG6-NHS	éster de NHS del ácido N-(3-maleimidopropil)-21-amino-4,7,10,13,16,19-hexaoxa-heneicosanoico
	Me	metilo
	MeCN	acetonitrilo
	MeOH	metanol
10	Mmt	4-metoxitritilo
	MS	espectro de masas / espectrometría de masas
	MTBE	éter de metilo y <i>terc</i> -butilo
	PM	peso molecular
	n.d.	no determinado
15	NHS	N-hidroxi-succinimida
	OD	densidad óptica
	OBu	butiloxi
	OtBu	<i>terc</i> .-butiloxi
	PEG	polietilenglicol
20	Phth	phthal-
	PyBOP	hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitris-pirrolidino-fosfonio
	RP-HPLC	cromatografía de líquidos de alto rendimiento de fase inversa
	rpm	revoluciones por minuto
	TA	temperatura ambiente
25	SEC	cromatografía por exclusión de tamaños
	Su	succinimidilo
	TCP	resina de cloruro de 2-clorotritilo
	TES	triethylsilano
	TFA	ácido trifluoroacético
30	THF	tetrahidrofurano
	TMEDA	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
	Tmob	2,4,6-trimetoxibencilo
	Trt	trifenilmetilo, tritilo
	UPLC	cromatografía líquida de ultrapresión
35	UV	ultravioleta

VIS

visual

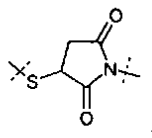
REIVINDICACIONES

1. Un profármaco o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable que comprende un conjugado de insulina-conector D-L, en el que D representa el resto de insulina; y
- 5 -L es un resto conector que no es biológicamente activo -L¹ representado por la fórmula (I),



- 10 en la que la línea de trazos indica la unión a uno de los grupos amino de la insulina formando un enlace amida;
X es C(R³R^{3a}); o N(R³);
R^{1a}, R^{3a} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, NH(R^{2b}), N(R^{2b})C(O)R⁴ y alquilo C₁₋₄;
- 15 R¹, R², R^{2a}, R^{2b}, R³, R⁴ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H y alquilo C₁₋₄,
donde L¹ está sustituido con un L²-Z y opcionalmente sustituido adicionalmente, con la condición de que el hidrógeno marcado con el asterisco en la fórmula (I) no se sustituya por un sustituyente, y donde
- 20 L² es un enlace químico sencillo o un espaciador; y
Z es un hidrogel.
2. Profármaco según la reivindicación 1, en el que en la fórmula (I) R² se reemplaza con L²-Z.
3. Profármaco según la reivindicación 1, en el que en la fórmula (I) R¹ se reemplaza con L²-Z.
- 25 4. Profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que en la fórmula (I) X es N(R³).
5. Profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que en la fórmula (I) X es C(R³R^{3a}) y R^{3a} es N(R^{2b})C(O)R⁴.
- 30 6. Profármaco según la reivindicación 1, en el que X es C(R³R^{3a}) y R^{3a} se reemplaza con L²-Z.

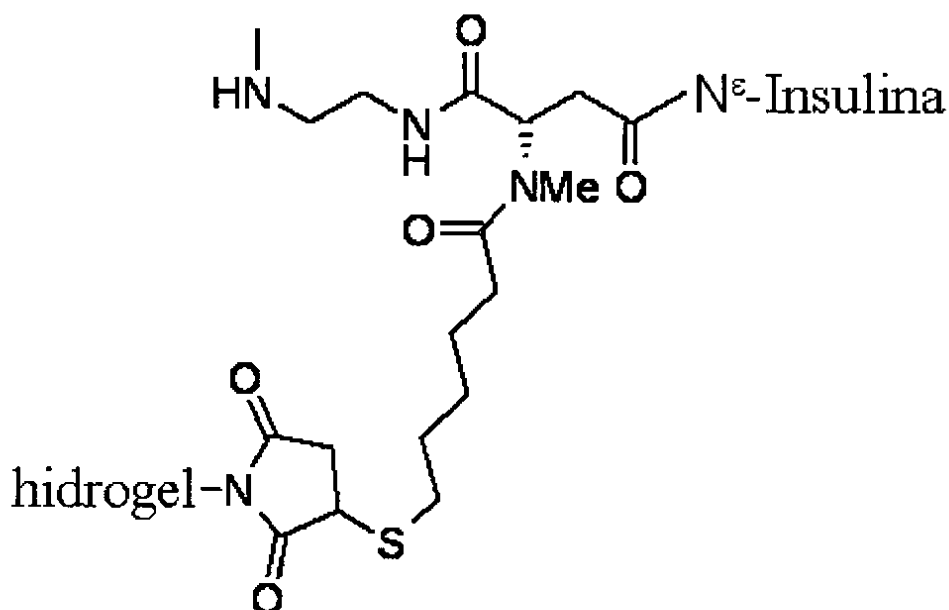
7. Profármaco según la reivindicación 1, en el que X es $C(R^3R^{3a})$ y R^{3a} es $N(R^{2b})-L^2-Z$.
8. Profármaco según las reivindicaciones 1 a 7, en el que L^1 no se sustituye adicionalmente.
- 5 9. Profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el resto de insulina se une a L^1 a través del nitrógeno N^{OA1} .
10. Profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la insulina es insulina humana recombinante.
11. Profármaco según la reivindicación 10, en el que la insulina humana recombinante se une a L^1 a través del nitrógeno de una cadena lateral de lisina en el resto de insulina.
12. Profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el hidrogel Z es un hidrogel insoluble en agua basado en poli(etilenglicol) (PEG) biodegradable.
- 15 13. Profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el hidrogel está compuesto por restos de cadenas principales interconectados por enlaces hidrolíticamente degradables.
14. Profármaco según la reivindicación 13, en el que los restos de cadenas principales tienen un peso molecular en el intervalo de 1 kDa a 20 kDa.
- 20 15. Profármaco según la reivindicación 13 o 14, en el que los restos de cadenas principales están unidos entre sí a través de restos de reticulación, donde cada resto de reticulación finaliza con por lo menos dos de los enlaces hidrolíticamente degradables.
16. Profármaco según la reivindicación 15, en el que los restos de reticulación tienen un peso molecular en el intervalo de 0,5 kDa a 5 kDa.
- 25 17. Profármaco según la reivindicación 13 a 16, en el que L^2 está conectado a un resto de cadena principal.
18. El profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que L^2 está unido a Z por un grupo terminal que tiene la siguiente estructura



30

donde las líneas de trazos indican la unión a L^2 y Z, respectivamente.

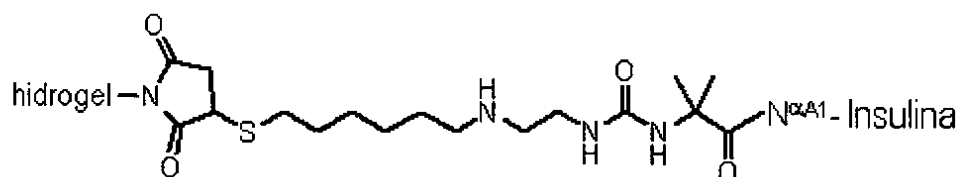
19. Profármaco según la reivindicación 1, de fórmula (IIa)



(IIa),

donde N ϵ -Insulina se refiere a insulina conectada mediante una cadena lateral de lisina.

20. Profármaco según la reivindicación 1 o 2, de fórmula (IIb)

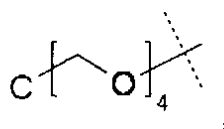


(IIb).

21. El profármaco según la reivindicación 19 o 20, en el que el hidrogel es un hidrogel insoluble en agua basado en polietilenglicol(PEG) biodegradable.

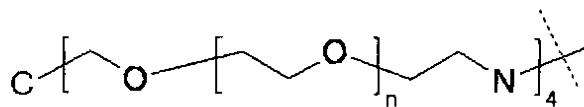
22. El profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en el que el hidrogel está compuesto por restos de cadenas principales interconectados por enlaces hidrolíticamente degradables.

23. El profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, 22, en el que los restos de cadenas principales comprenden un núcleo de ramificación de la siguiente fórmula:



en la que la línea de trazos indica la unión al resto de cadena principal restante.

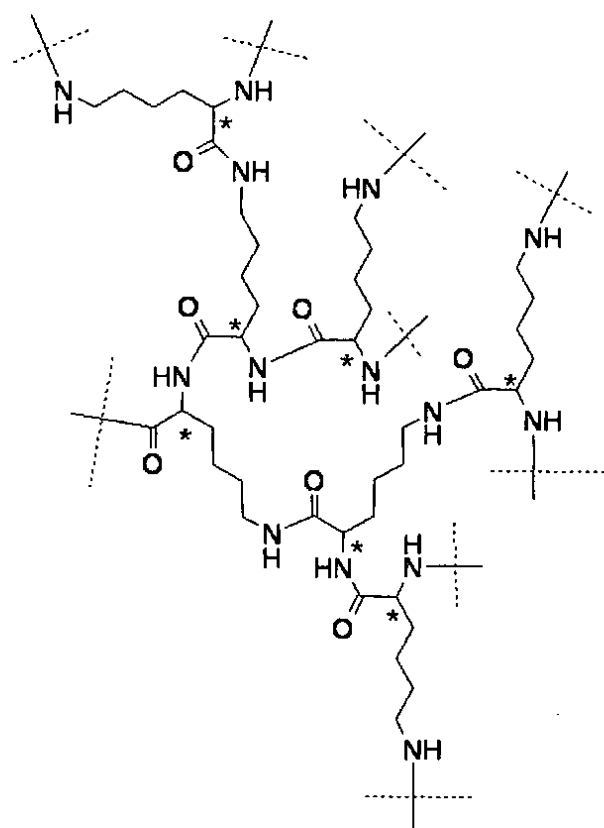
24. El profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, 22, 23, en el que los restos de cadenas principales comprenden una estructura de la siguiente fórmula:



en la que n es un número entero de 5 a 50 y la línea de trazos indica la unión al resto de la molécula.

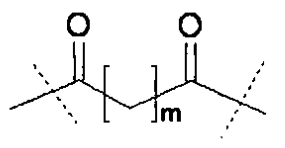
25. El profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 24, en el que el resto de cadena principal comprende un resto hiperramificado Hyp.

26. El profármaco según la reivindicación 25, en el que el resto de cadena principal comprende un resto hiperramificado Hyp de la siguiente fórmula:



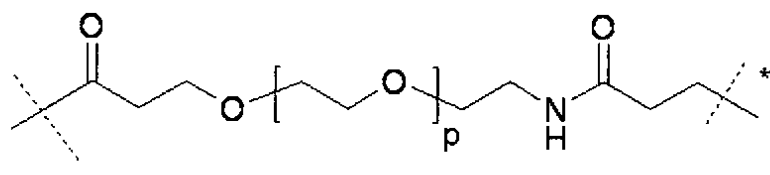
en la que las líneas de trazos indican la unión al resto de la molécula y los átomos de carbono marcados con asteriscos indican la configuración S.

27. El profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 26, en el que los restos de cadenas principales están unidos a al menos un espaciador de la siguiente fórmula:



en la que una de las líneas de trazos indica la unión al resto hiperramificado Hyp y la segunda línea de trazos indica la unión al resto de la molécula; y donde m es un número entero de 2 a 4.

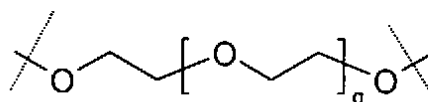
28. El profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 22 o 27, en el que los restos de cadenas principales están unidos a al menos un espaciador de la siguiente fórmula:



en la que la línea de trazos marcada con el asterisco indica el enlace entre el hidrogel y el N del grupo tiosuccinimida de la reivindicación 18;

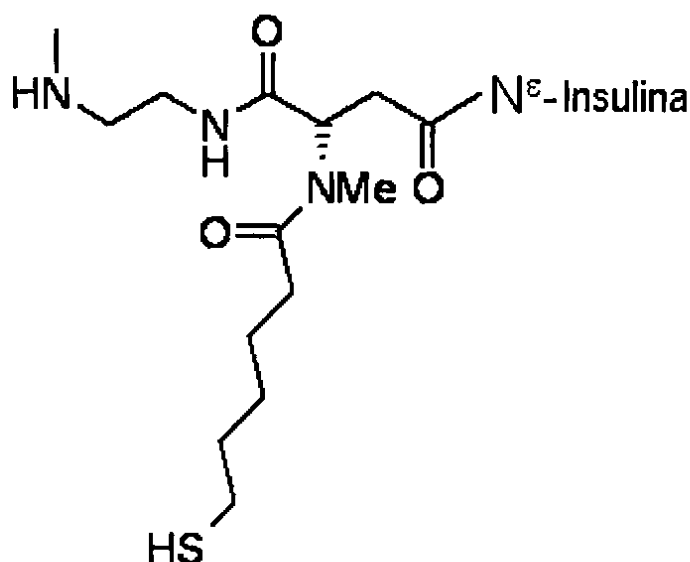
- en la que la otra línea de trazos indica la unión a Hyp; y en la que p es un número entero de 0 a 10.

29. El profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 28, en el que los restos de cadenas principales están unidos entre sí por restos de reticulación que comprenden la siguiente estructura



- donde q es un número entero de 3 a 100.

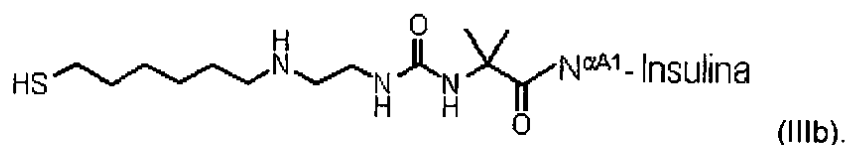
30. El profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 en la forma de micropartículas.
31. El profármaco según la reivindicación 30, en el que las micropartículas tienen un diámetro entre 20 y 100 micrómetros.
32. El profármaco según la reivindicación 30, en el que las micropartículas pueden administrarse por inyección a través de una aguja más pequeña que un diámetro interno de 0,6 mm.
33. El profármaco según la reivindicación 30, en el que las micropartículas pueden administrarse por inyección a través de una aguja más pequeña que un diámetro interno de 0,3 mm.
34. El profármaco según la reivindicación 30, en el que las micropartículas pueden administrarse por inyección a través de una aguja más pequeña que un diámetro interno de 0,2 mm.
35. Un conjugado de insulina-conector de fórmula (IIIa)



(IIIa),

donde N^ε-Insulina se refiere a insulina conectada mediante una cadena lateral de lisina.

- 5 36. Un conjugado de insulina-conector de fórmula (IIIb)



(IIIb).

37. Una composición farmacéutica que comprende un profármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10 38. Una composición farmacéutica según la reivindicación 37, en la que la composición farmacéutica es seca.
39. Una composición farmacéutica según la reivindicación 38, en la que la composición farmacéutica se seca por liofilización.
- 15 40. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 37 a 39, en la que el profármaco de insulina e hidrogel se dosifica lo suficiente en la composición como para proveer una cantidad terapéuticamente eficaz de insulina durante por lo menos tres días en una aplicación.
41. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 37 a 40, que es una
- 20 composición de una sola dosis.
42. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 37 a 40, que es una composición de múltiples dosis.

43. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 37 a 42, que contiene uno o más agentes biológicos adicionales, o bien en su forma libre; como profármacos, especialmente como profármacos de hidrogel; y donde el agente o agentes biológicamente activos se seleccionan del grupo que consiste en sulfonilureas
- 5 tales como, por ejemplo, clorpropamida, tolazamida, tolbutamida, glibúrido, glipizida, glimepirida y similares; meglitinidas, tales como por ejemplo, repaglinidaM péptido-1 análogo a glucagón (GLP-1) y sus compuestos miméticos, péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) y sus compuestos miméticos, exendina y sus compuestos miméticos, e inhibidores de la dipeptil proteasa (DPP-IV); biguanidas, tales
- 10 como por ejemplo, metformina,tiazolidinadionas, tales como, por ejemplo, rosiglitazona, pioglitazona, troglitazona, isaglitazona (conocida como MCC-555), ácido 2-[2-[(2R)-4-hexil-3,4-dihidro-3-oxo-2H-1,4-benzoxazin-2-il]etoxi]-benceno acético, y similares;GW2570, y similares; moduladores del receptor de retinoide-X (RXR), tales como por ejemplo, targeatina, ácido 9-cis-retinoico, y similares; otros agentes
- 15 sensibilizadores de insulina, tales como por ejemplo, INS-1, inhibidores de PTP-1B, inhibidores de GSK3, inhibidores de glicógeno fosforilasa, inhibidores de fructosa-1,6-bisfosfatasa, y similares; insulinas, incluyendo insulinas normales o de acción rápida, acción intermedia, y acción prolongada, insulina inhalada y análogos de insulina, tales como moléculas con diferencias poco importantes en la secuencia natural de
- 20 aminoácidos; moléculas pequeñas que imitan a la insulina, incluyendo, pero sin limitar, L-783281, TE-17411, y similares;transportador de Na-glucosa, como T-1095, T-1095A, phlorizina y similares;;agonistas de amilina que incluyen, pero sin limitar, pramlintida, y similares;antagonistas del glucagón, tales como AY-279955, y similares;agentes antiobesidad tales como orlistat, un inhibidor de lipasa pancreática; sibutramina;
- 25 norepinefrina y dopamina; hormona del crecimiento, IGF-1, factor liberador de la hormona del crecimiento; oxintomodulina y moduladores de grelina; supresores del apetito tales con benzfetamina, fenmetrazina, fentermina, dietilpropión, mazindol, sibutramina, fenilpropanolamina o efedrina; supresores del apetito tales como quipazina, fluoxetina, sertralina, fenfluramina o dexfenfluramina; agentes supresores
- 30 del apetito tales como apomorfina; supresores del apetito como miméticos de histamina, moduladores del receptor de H3; potenciadores del gasto energético tales como agonistas beta-3 adrenérgicos y estimuladores de la función de desacoplamiento de proteína; leptina y compuestos miméticos de leptina (p. ej., metreleptina); agonistas del neuropéptido Y; moduladores del receptor de melanocortina-1, 3 y 4; agonistas de
- 35 colecistoquinina; compuestos miméticos del péptido-1 análogo al glucagón y análogos,

como p. ej., exendina; andrógenos tales como deshidroepiandrosterona y derivados tales como eticolandiona; testosterona; esteroides anabólicos tales como oxandrolona, y hormonas esteroideas; antagonistas del receptor de galanina; agentes citoquínicos tales como el factor neurotrófico ciliar; inhibidores de amilasa.

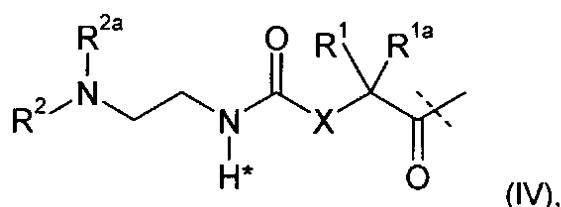
- 5 44. Un envase que comprende la composición farmacéutica según las reivindicaciones 37 a 43.
45. Un envase según la reivindicación 44, en el que el envase es una jeringa de doble cámara.
46. Una suspensión que comprende la composición farmacéutica según las
10 reivindicaciones 37 y 40 a 43.
47. Un método para preparar una suspensión según la reivindicación 46, que comprende las etapas de reconstituir la composición farmacéutica seca según las reivindicaciones 38 o 39 añadiendo la disolución de reconstitución.
48. Un kit de partes que comprende una aguja y un envase que contiene disolución
15 para reconstitución y la composición seca según la reivindicación 38 o 39 para uso con la aguja.
49. Un kit de partes según la reivindicación 48, en el que el envase es una jeringa de doble cámara y en el que una de las dos cámaras de la jeringa de doble cámara contiene la composición farmacéutica, y la segunda cámara de dicha jeringa de doble
20 cámara contiene la disolución para reconstitución.
50. Un profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34 o una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 37 a 43, para usar como un medicamento.
51. Un profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34 o una
25 composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 37 a 43, para usar en un método para tratar o prevenir enfermedades o trastornos que se pueden tratar con la insulina.
52. Un procedimiento para acilar el grupo ϵ -amino de insulina o un análogo de insulina, que tiene uno o más grupos amino α -amino libres y el grupo ϵ -amino libre con
30 un agente de acilación que contiene uno o más grupos funcionales protegidos, que comprende hacer reaccionar la insulina o el análogo de insulina con un agente de acilación soluble que contiene uno o más grupos funcionales protegidos a un pH de 8,0 hasta debajo de 9,0 en un disolvente polar.
53. El procedimiento según la reivindicación 52, en el que el pH oscila entre 8,0 y
35 8,9.

54. Un compuesto de insulina caracterizado por tener un grupo acilo unido al ϵ -nitrógeno o un análogo de insulina, y donde dicho grupo acilo tiene uno o más grupos funcionales protegidos.

55. Un reactivo insulina-conector D-L*, en el que

5 D representa un resto de insulina; y

L* es un reactivo de conector que no es biológicamente activo, representado por la fórmula (IV),



10 en la que la línea de trazos indica la unión a uno de los grupos amino de la insulina formando un enlace amida;

X es C(R³R^{3a}); o N(R³);

R^{1a}, R^{3a} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, NH(R^{2b}), N(R^{2b})C(O)R⁴ y alquilo C₁₋₄;

15 R¹, R², R^{2a}, R^{2b}, R³, R⁴ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H y alquilo C₁₋₄,

donde L* está sustituido con un L^{2*} y opcionalmente sustituido adicionalmente, con la condición de que el hidrógeno marcado con el asterisco en la fórmula (IV) no se sustituya por un sustituyente, y donde

20 L^{2*} es un espaciador conectado a L* y que comprende un grupo funcional químico destinado a la conjugación con un hidrogel biodegradable reactivo.

56. El reactivo de insulina-conector según la reivindicación 55, en el que en la fórmula (IV) R² se reemplaza con L^{2*}.

57. El reactivo de insulina-conector según la reivindicación 56, en el que en la 25 fórmula (IV) R¹ se reemplaza con L^{2*}.

58. El reactivo de insulina-conector según cualquiera de las reivindicaciones 55 a 57, en el que en la fórmula (IV) X es N(R³).

59. El reactivo de insulina-conector según cualquiera de las reivindicaciones 55 a 57, en el que en la fórmula (IV) X es C(R³R^{3a}) y R^{3a} es N(R^{2b})C(O)R⁴.

30 60. El reactivo de insulina-conector según la reivindicación 55, en el que X es C(R³R^{3a}) y R^{3a} se reemplaza con L^{2*}.

61. El reactivo de insulina-conector según la reivindicación 55, en el que X es $C(R^3R^{3a})$, R^{3a} es $N(R^{2b})-L^{2*}$.
62. El reactivo de insulina-conector según cualquiera de las reivindicaciones 55 a 61, en el que L^* no se sustituye adicionalmente.
- 5 63. El reactivo de insulina-conector según cualquiera de las reivindicaciones 55 a 62, en el que L^{2*} comprende un grupo tiol.
64. El reactivo de insulina-conector según cualquiera de las reivindicaciones 55 a 62, en el que L^{2*} comprende un grupo maleimida.
65. Un procedimiento para preparar un profármaco según cualquiera de las
10 reivindicaciones 1 a 34 y 55, 51, que comprende las etapas de
- (a) contactar una suspensión acuosa que comprende micropartículas de hidrogel funcionalizado con maleimida con una disolución que comprende el reactivo de insulina-conector según la reivindicación 63 a temperaturas entre temperatura ambiente y 4°C en una disolución acuosa tamponada de pH 2-5, produciendo un
15 conjugado de insulina-conector-hidrogel;
- (b) opcionalmente, tratar el conjugado de insulina-conector-hidrogel de la etapa (a) con un compuesto que contiene tiol de 34 Da a 500 Da a temperaturas entre temperatura ambiente y 4°C en una disolución acuosa tamponada de pH 2-5.
66. Un procedimiento para preparar un profármaco según cualquiera de las
20 reivindicaciones 1 a 34 y 55, 51, que comprende las etapas de
- (a) contactar una suspensión acuosa que comprende micropartículas de hidrogel funcionalizado con tiol con una disolución que comprende el reactivo de insulina-conector según la reivindicación 64 a temperaturas entre temperatura ambiente y 4°C en una disolución acuosa tamponada de pH 2-5, produciendo un conjugado de
25 insulina-conector-hidrogel;
- (b) opcionalmente, tratar el conjugado de insulina-conector-hidrogel de la etapa (a) con un compuesto que contiene maleimida de 100 Da a 300 Da a temperaturas entre temperatura ambiente y 4°C en una disolución acuosa tamponada de pH 2-5.
67. Un procedimiento para preparar un profármaco inyectable con aguja, que
30 comprende las etapas de
- (a) preparar un profármaco según la reivindicación 30 en la forma de micropartículas;
- (b) cribar las micropartículas
- (c) seleccionar una fracción con un diámetro de las perlas del profármaco entre 25
35 y 80 μm .

(d) suspender la fracción de perlas de la etapa (c) en una disolución tampón acuosa adecuada para inyección.

68. Profármaco inyectable con aguja obtenible a partir del procedimiento según la reivindicación 67.

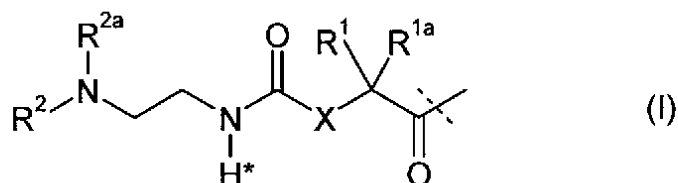
5 69. Profármaco según la reivindicación 68, inyectable a través de una aguja con un diámetro interno de menos de 300 μm .

70. Profármaco según la reivindicación 68, inyectable a través de una aguja con un diámetro interno de menos de 225 μm .

71. Profármaco según la reivindicación 68, inyectable a través de una aguja con un
10 diámetro interno de menos de 175 μm .

Resumen

La presente invención se refiere a un profármaco o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, que comprende un conjugado de insulina-conector D-L, en el que D representa un resto de insulina; y -L es un resto conector que no es biológicamente activo -L¹ representado por la fórmula (I),



en la que la línea de trazos indica la unión a uno de los grupos amino de la insulina formando un enlace amida. La invención se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos profármacos así como a su uso como un medicamento para tratar o prevenir enfermedades o trastornos que se pueden tratar mediante la insulina.

1/10

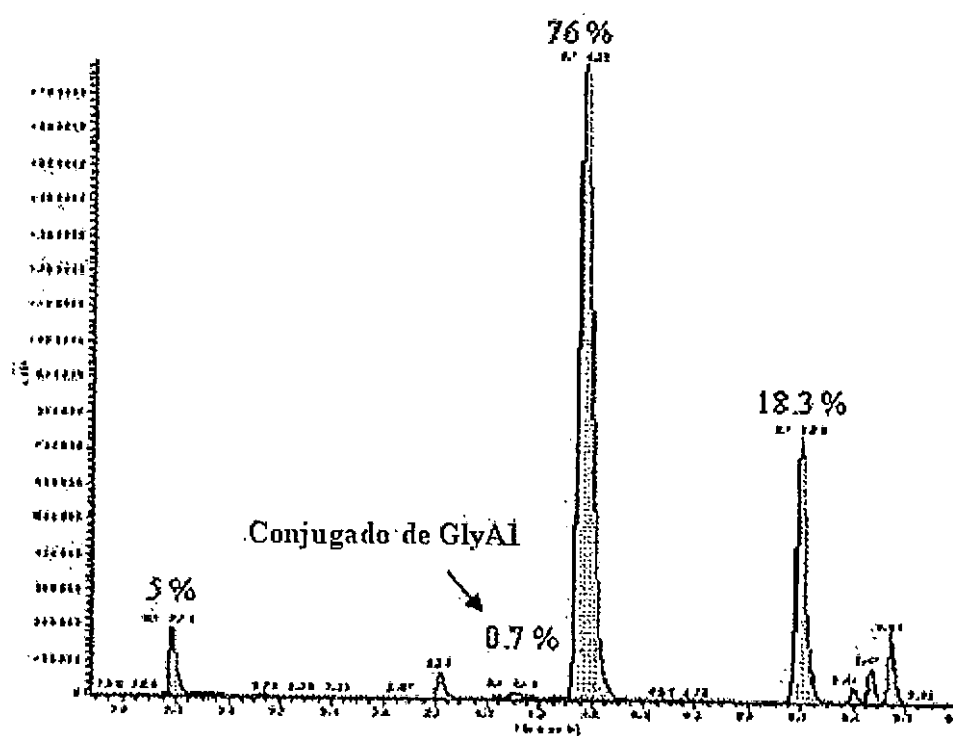


Fig. 1a

2/10

Conjugado de LysB28

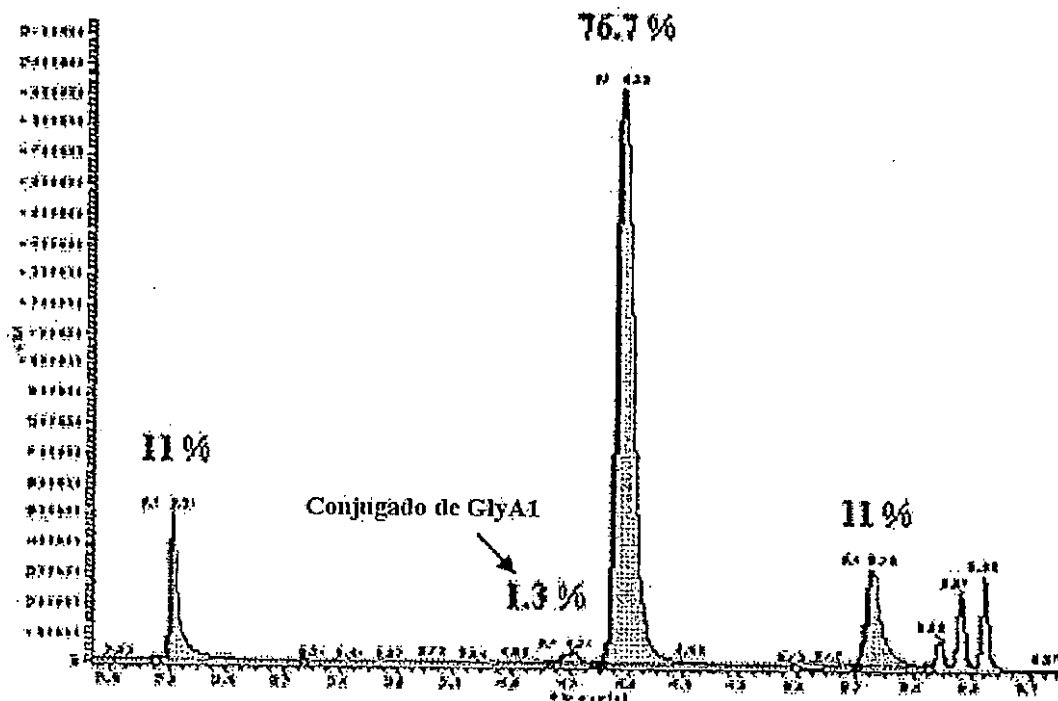


Fig. 1b

3/10

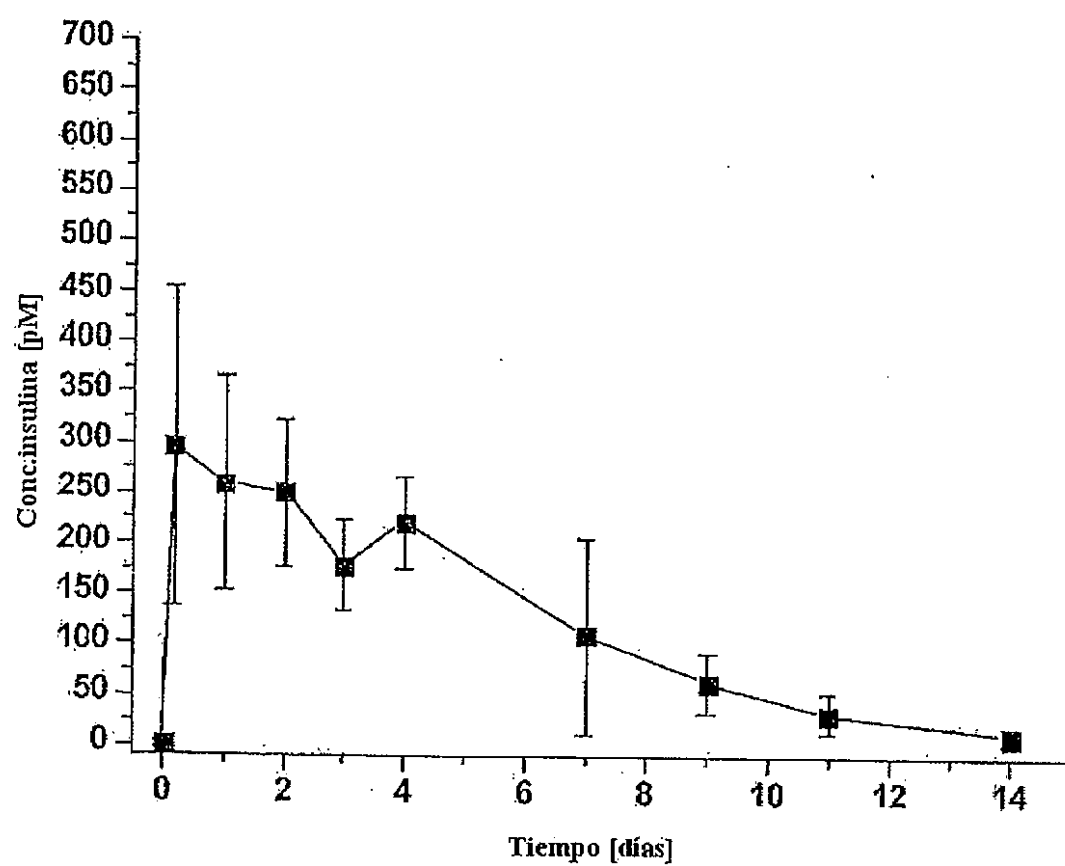


Fig. 2

4/10

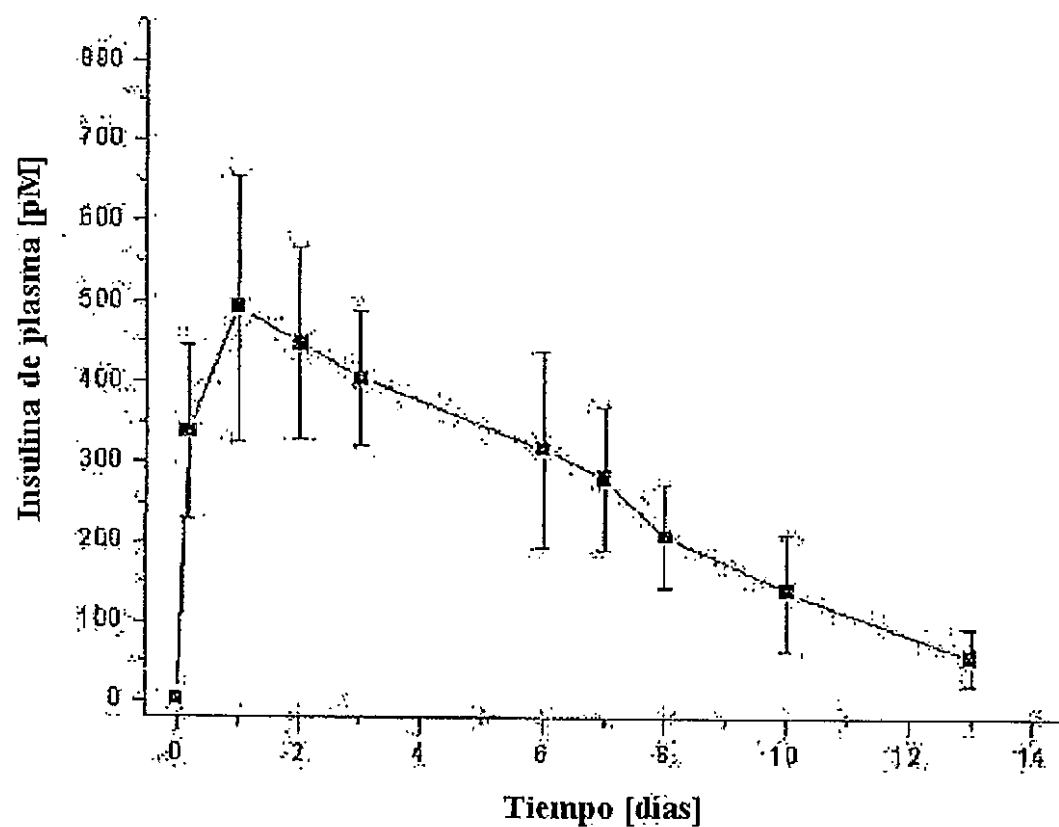


Fig. 3

5/10

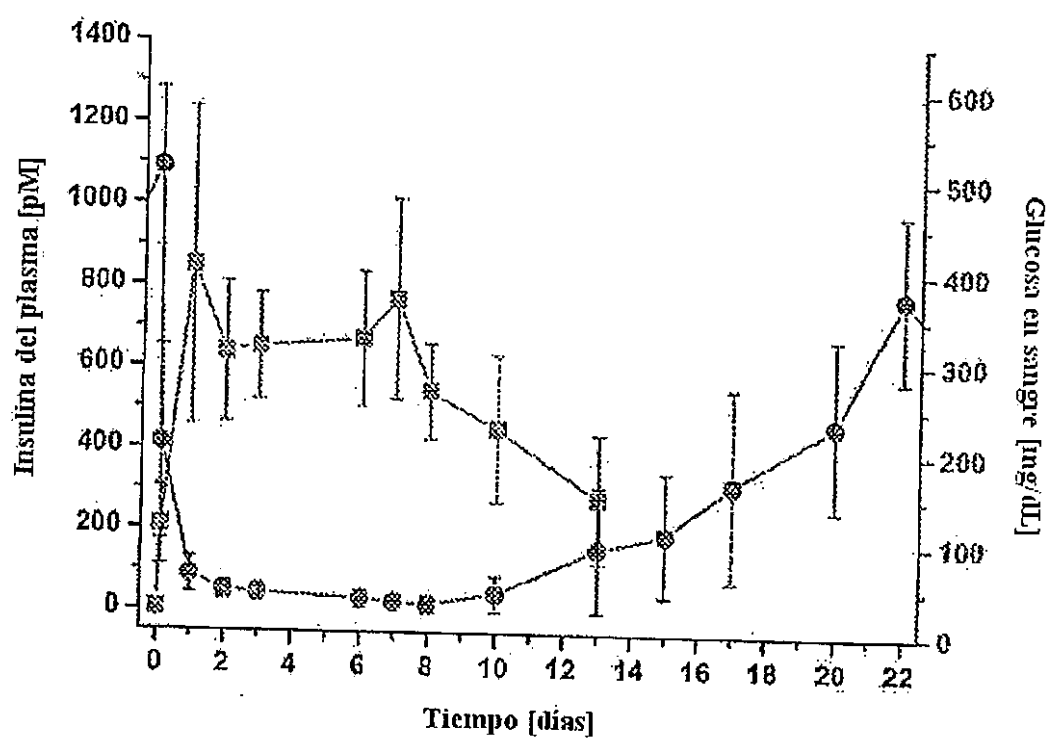


Fig. 4

6/10

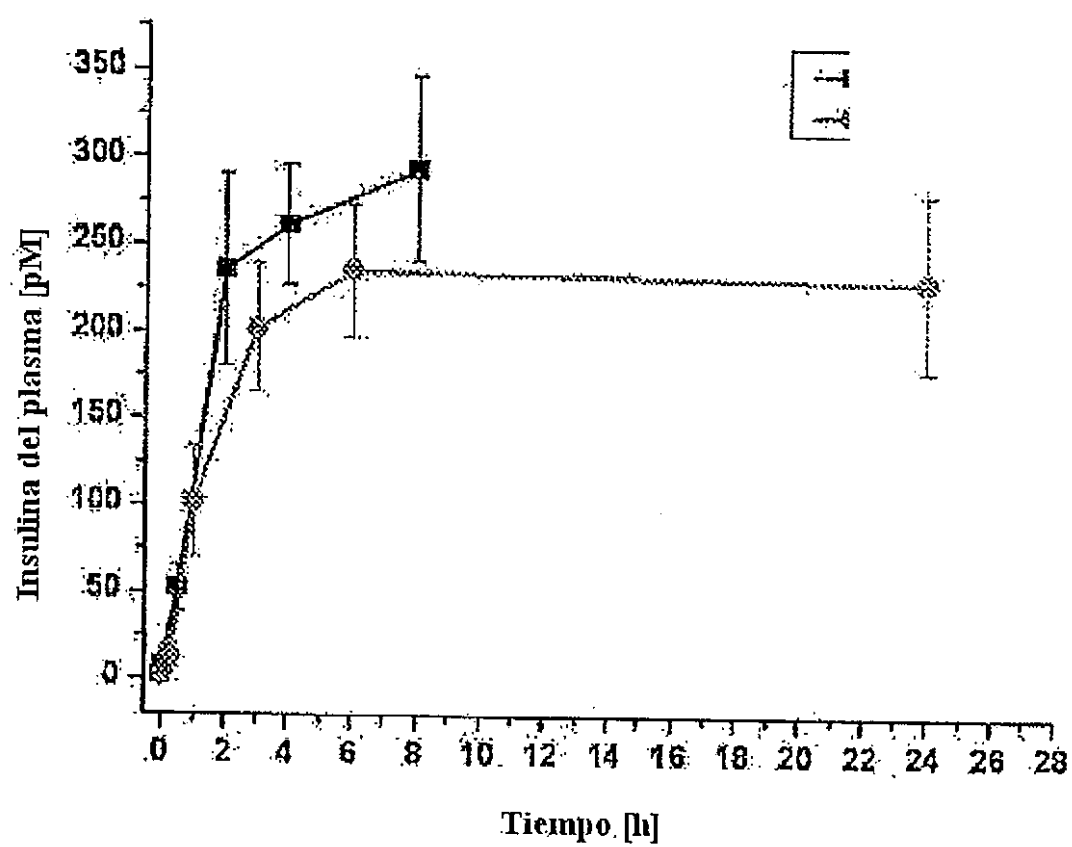


Fig. 5

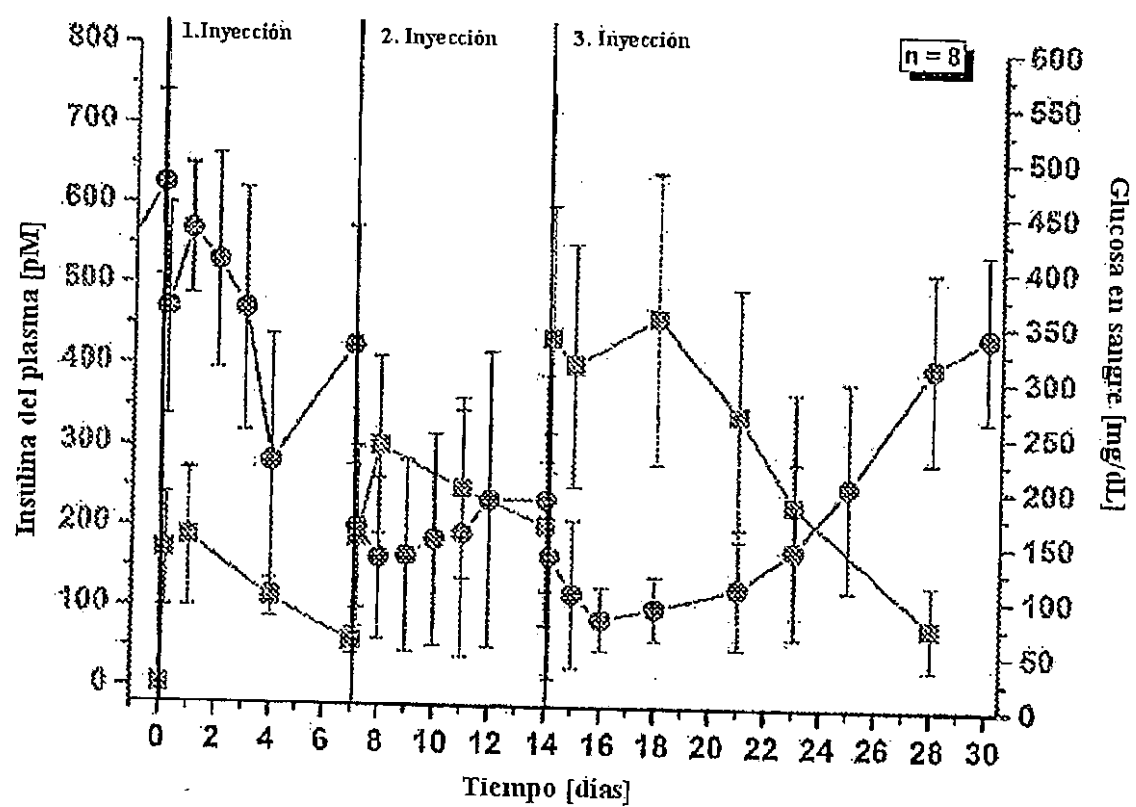


Fig. 6

8/10

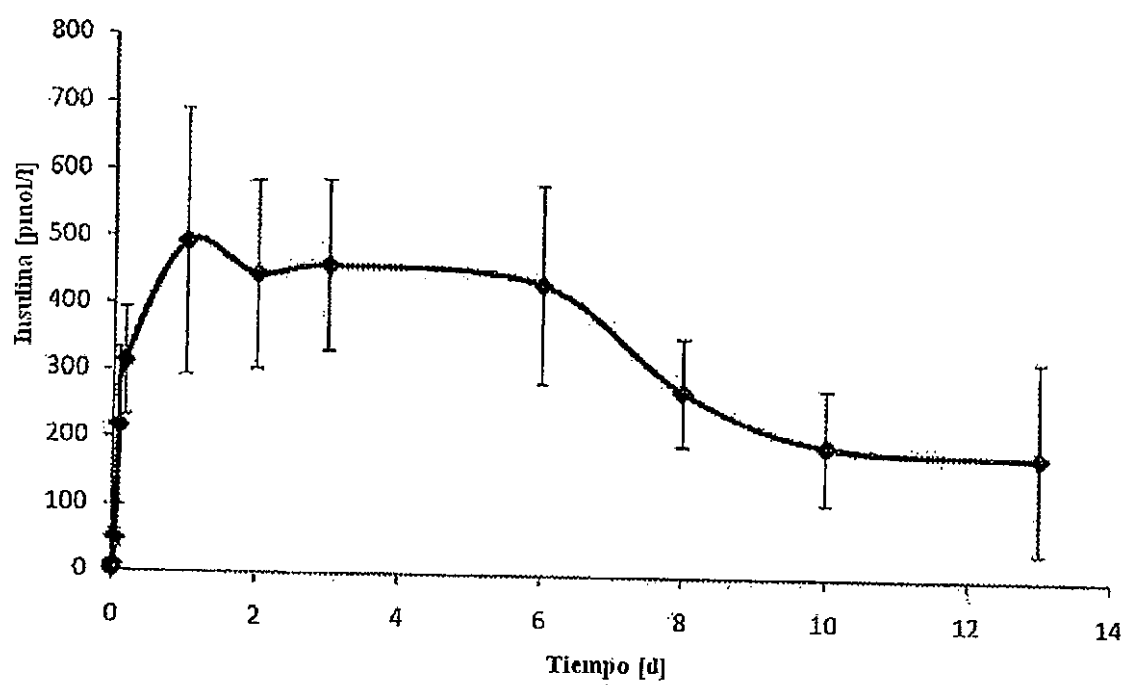


Fig.7

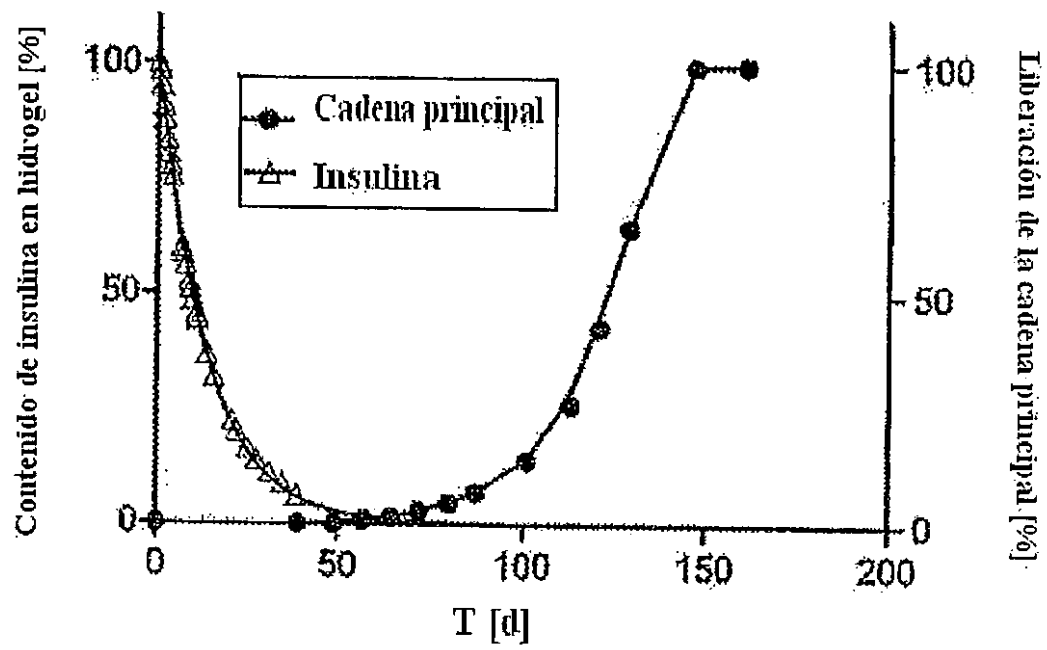


Fig. 8

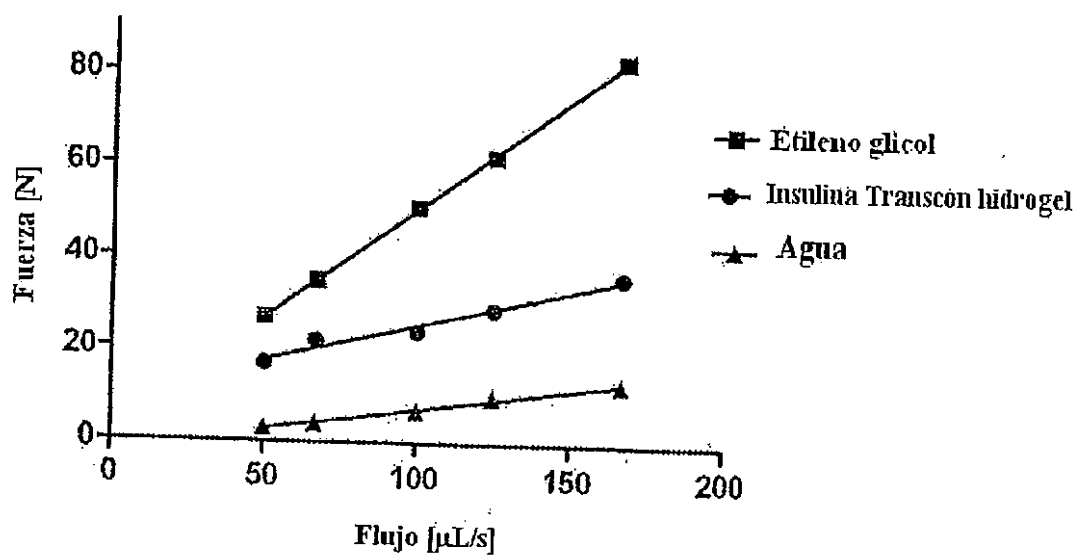


Fig. 9

000246

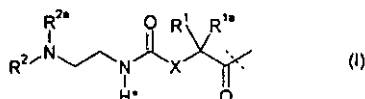
~~000286~~

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS				
		PATENTE DE INVENCION ____ PCT <u>X</u> MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____				
(21) N° de solicitud:		(22) Fecha de solicitud:				
(51) Clasificación Internacional :						
(71) Solicitante(s)		SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH				
(72) Inventor(es)		HARALD RAU, FELIX GLEEMANN, ULRICH HERSEL, SILVIA KADEN-VAGT, TORBEN LESSMANN, THOMAS WEGGE				
(74) Apoderado:		DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO				
(30) Prioridad	(31)	No. Prioridad	(32)	Fecha	(33)	País
		09167027.3		31/07/2009		EP
		09174525.7		29/10/2009		EP
		09179336.4		15/12/2009		EP
		09179818.1		18/12/2009		EP
(5) Fecha inicio fase nacional:				(87) Publicación internacional		
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT				Fecha: 03/02/2011		
Fecha de presentación de la solicitud: 30/07/2010				N° publicación: WO 2011/012718 A1		
No. de solicitud PCT/EP2010/061159						
(54) Título: PROFARMACOS QUE COMPRENDEN UN CONJUGADO DE INSULINA-CONECTOR						

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT																																				
(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud: <table border="1"> <thead> <tr> <th>(30) Prioridad</th> <th>(31)</th> <th>N° Prioridad</th> <th>(32)</th> <th>Fecha</th> <th>(33)</th> <th>Pais</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td>09167027.3</td> <td></td> <td>31/07/2009</td> <td></td> <td>EP</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>09174525.7</td> <td></td> <td>29/10/2009</td> <td></td> <td>EP</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>09179336.4</td> <td></td> <td>15/12/2009</td> <td></td> <td>EP</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>09179818.1</td> <td></td> <td>18/12/2009</td> <td></td> <td>EP</td> </tr> </tbody> </table>		(30) Prioridad	(31)	N° Prioridad	(32)	Fecha	(33)	Pais			09167027.3		31/07/2009		EP			09174525.7		29/10/2009		EP			09179336.4		15/12/2009		EP			09179818.1		18/12/2009		EP	(51) int. Cl.: (71) Solicitante(s) SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH (72) Inventor(es) HARALD RAU FELIX CLEEMANN ULRICH HERSEL Y OTROS (74) Apoderado: MARGARITA CASTELLANOS A.	
(30) Prioridad	(31)	N° Prioridad	(32)	Fecha	(33)	Pais																																
		09167027.3		31/07/2009		EP																																
		09174525.7		29/10/2009		EP																																
		09179336.4		15/12/2009		EP																																
		09179818.1		18/12/2009		EP																																
(85) Fecha limite inicio fase nacional: (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 30/07/2010 N° de solicitud PCT/EP2010/061159		(87) Publicación internacional Fecha: 03/02/2011 N° publicación: WO 2011/012718 A1																																				
(54) Titulo: PROFARMACOS QUE COMPRENDEN UN CONJUGADO DE INSULINA-CONECTOR																																						

Reivindicación(es):

1. Un profármaco o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable que comprende un conjugado de insulina-conector D-L, en el que
D representa el resto de insulina; y
-L es un resto conector que no es biológicamente activo -L¹ representado por la fórmula (I),



en la que la línea de trazos indica la unión a uno de los grupos amino de la insulina formando un enlace amida;
X es C(R³R^{3a}); o N(R³);

R^{1a}, R^{3a} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, NH(R^{2b}), N(R^{2b})C(O)R⁴ y alquilo C₁₋₄;
R¹, R² R^{2a}, R^{2b}, R³, R⁴ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H y alquilo C₁₋₄,
donde L¹ está sustituido con un L²-Z y opcionalmente sustituido adicionalmente, con la condición de que el hidrógeno marcado con el asterisco en la fórmula (I) no se sustituya por un sustituyente, y donde
L² es un enlace químico sencillo o un espaciador; y
Z es un hidrogel.

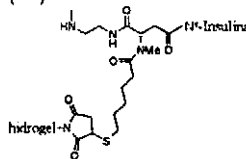
2. Profármaco según la reivindicación 1, en el que en la fórmula (I) R² se reemplaza con L²-Z.
3. Profármaco según la reivindicación 1, en el que en la fórmula (I) R¹ se reemplaza con L²-Z.
4. Profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que en la fórmula (I) X es N(R³).
5. Profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que en la fórmula (I) X es C(R³R^{3a}) y R^{3a} es N(R^{2b})C(O)R⁴.
6. Profármaco según la reivindicación 1, en el que X es C(R³R^{3a}) y R^{3a} se reemplaza con L²-Z.
7. Profármaco según la reivindicación 1, en el que X es C(R³R^{3a}) y R^{3a} es N(R^{2b})-L²-Z.
8. Profármaco según las reivindicaciones 1 a 7, en el que L¹ no se sustituye adicionalmente.
9. Profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el resto de insulina se une a L¹ a través del nitrógeno N^oA1.

10. Profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la insulina es insulina humana recombinante.
11. Profármaco según la reivindicación 10, en el que la insulina humana recombinante se une a L¹ a través del nitrógeno de una cadena lateral de lisina en el resto de insulina.
12. Profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el hidrogel Z es un hidrogel insoluble en agua basado en poli(etilenglicol) (PEG) biodegradable.
13. Profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el hidrogel está compuesto por restos de cadenas principales interconectados por enlaces hidrolíticamente degradables.
14. Profármaco según la reivindicación 13, en el que los restos de cadenas principales tienen un peso molecular en el intervalo de 1 kDa a 20 kDa.
15. Profármaco según la reivindicación 13 o 14, en el que los restos de cadenas principales están unidos entre sí a través de restos de reticulación, donde cada resto de reticulación finaliza con por lo menos dos de los enlaces hidrolíticamente degradables.
16. Profármaco según la reivindicación 15, en el que los restos de reticulación tienen un peso molecular en el intervalo de 0,5 kDa a 5 kDa.
17. Profármaco según la reivindicación 13 a 16, en el que L² está conectado a un resto de cadena principal.
18. El profármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que L² está unido a Z por un grupo terminal que tiene la siguiente estructura



donde las líneas de trazos indican la unión a L² y Z, respectivamente.

19. Profármaco según la reivindicación 1, de fórmula (IIa)



(IIa).