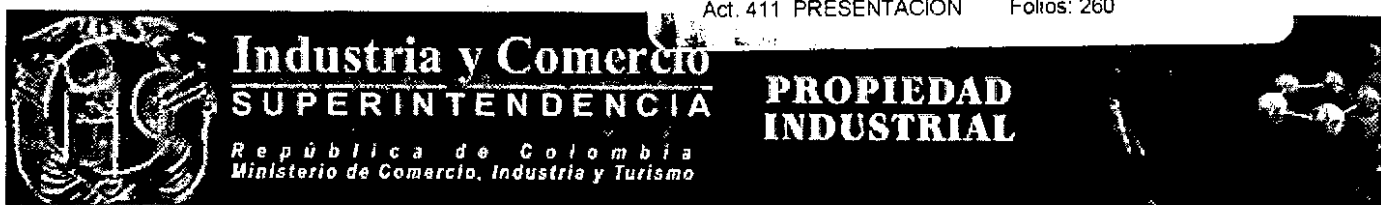




No. 12-011796- -00000-0000

Fecha: 2012-01-26 14:16:55 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 260



Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD DE

**PATENTE DE INVENCION
PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL**

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TITULO: COMPOSICION DE INSULINA DE ACCION PROLONGADA

52. CLASIFICACION INTERNACIONAL: A61K 9/06, A61K 47/48,
A61K 9/00

71. SOLICITANTE: SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH

DOMICILIO: Brüningstrasse 50, D-65929 Frankfurt -
ALEMANIA

74. APODERADO: DRA. MARGARITA CASTELLANOS A.

22. BOGOTA, D.C., _____



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-011796- -00000-0000

Fecha: 2012-01-26 14:16:55 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 260

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: **Brüningstrasse 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 ☐
Número Cual

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 ☐
Número **39'779.654** TPA **70.819**

④ INVENTOR (ES) (72)

VER ANEXO # 1

⑤ PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2010/061160 Fecha 30/07/2010

Publicación Internacional No. WO 2011/012719 A1 Fecha 03/02/2011

⑥ Título (54) COMPOSICION DE INSULINA DE ACCION PROLONGADA

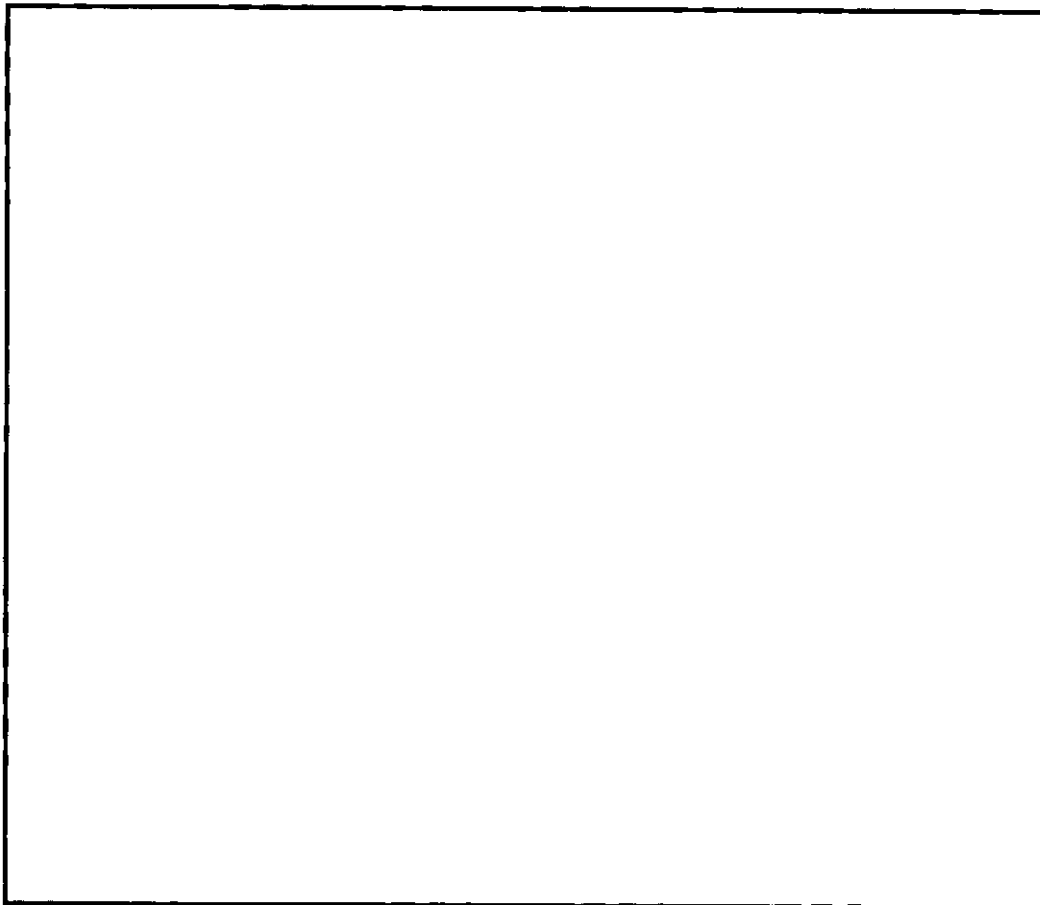
⑦ Clasificación Internacional (51) A61K 9/06, A61K 47/48, A61K 9/00

⑧ Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	EP	31/07/2009	09167017,4
	EP	15/12/2009	09179337,2
	EP	18/12/2009	09179827,2

⑨ Comprobantes de pago Nos. 12-001789 y 12-001792 Fecha Enero 06 de 2012

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.
23 JUL 2012

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página. - MCA/gcb - P2390

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. **KENNETT SPROGØE**
1982 West Bayshore Road # 327
94303 Palo Alto, CA
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
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. **HARALD RAU**
Schwarzwaldstr. 51/2
69124 Heidelberg
ALEMANIA
7. **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 - 001789	
				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. 12-011796- -00000-0000 Fecha: 2012-01-26 14:16:55 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 260		
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) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240 Enero 6 de 2012 - 14:00:54					

000005

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 001792

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 ***

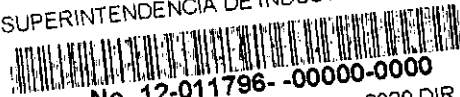
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNITARIO	Vr. CONCEPTO
22	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	660.000.00
				<u>\$660.000.00</u>

SON: **SEISCIENTOS SESENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-011796-00000-0000

Fecha: 2012-01-26 14:16:55

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 260

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) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 6 de 2012 - 14:00:54

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 Frankfurt

el 18-08-11

VOLLMACHT

Der die Unterzeichnenden (n)

Sanofi-Aventis Deutschland GmbH

Wohnhaft in

Brüningstraße 50, 65929 Frankfurt
Alemania

hiermit bevollmachtet (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

CASTELLANOS & Co.

ABOGADOS EN PROPIEDAD INTELECTUAL

CALLE 94 A No. 7 A - 09 / P.O. BOX 8348

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

BOGOTÁ D.C. COLOMBIA

info@castellanosyco.com

Como Notario Veintiseis del Circuito de Bogotá, hago constar que esta copia coincide con original que se ha presentado Bogotá, D.C. - Colombia.

24 ENE 2012

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS

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.

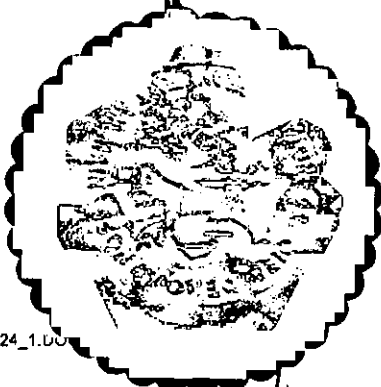
To document the power of representation regarding Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, (formerly: Aventis Pharma Deutschland GmbH), Frankfurt am Main, a certified copy of an instrument dated July 18, 2005 granting "Handlungsvollmacht" to Dr. Dieter Breuer for Sanofi-Aventis Deutschland GmbH is attached; 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.

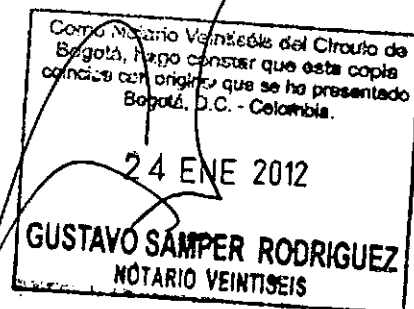
The Notary has informed the persons appearing about the provision of Section 3, Subsection 1, No. 7 of the Recording Act (Beurkundungsgesetz). The persons appearing thereupon have stated that the Notary is not prevented from recording under such provision.

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
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.

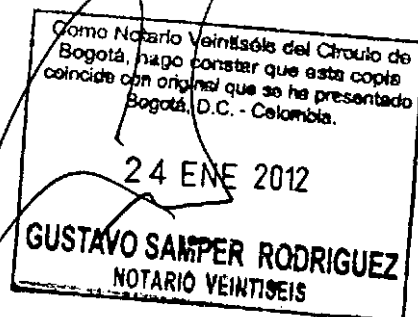
Sie sind ermächtigt, innerhalb Ihres Aufgabengebietes im Rahmen der jeweils gültigen Unterschriftenrichtlinie von Aventis Pharma Deutschland GmbH zu zeichnen. Hierbei ist nach § 57 HGB der Zusatz „i.V.“ vor Ihrem Namen zu verwenden.

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 West, Dr. Jean-Yves Wessely
Sitz der Gesellschaft: Frankfurt am Main · Handelsregister: Frankfurt am Main, Abl. 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. Labermeyer



Come Notario Veintiseis del Circuito de
Bogotá, hago constar que esta copia
coincide con original que se ha presentado
Bogotá, D.C. - Colombia.

24 ENE 2012

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS

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

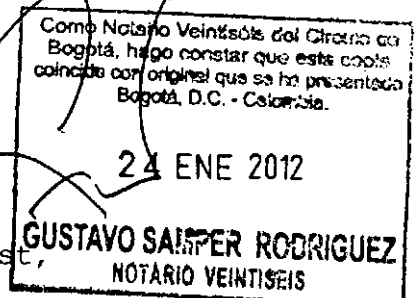
el Dr. Michael Bankmann
fecha de nacimiento: 29 de Septiembre de 1959,
con domicilio comercial en: Industriepark Höchst,
Edificio K 801, 65926 Frankfurt am Main, Alemania,
quien es conocido personalmente por el suscrito Notario,

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.

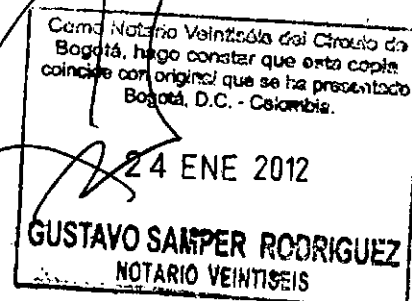
Certifico además que, con base en la revisión que yo llevé a cabo personalmente, el Registro Comercial Electrónico que es llevado por el Juzgado Municipal de Frankfurt am Main muestra bajo la minuta Número HRB 40661 el registro de la compañía Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, domiciliada en Frankfurt 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)



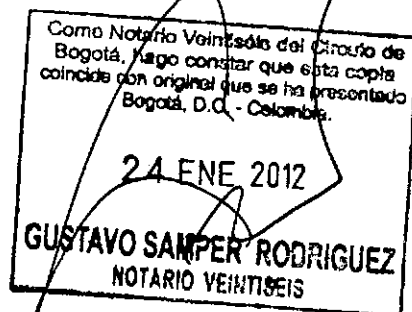
----- (continúa en la 3ª página) -----

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

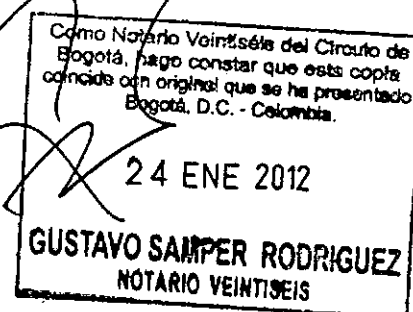
Personal/Confidencial

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.

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)

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

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES
20 SET 2011
DELEGACIONES
BOGOTÁ, D.C.

MINISTERIO DE
JUSTICIA
BOGOTÁ, D.C.

Como Notario Veintiseis del Circulo de Bogotá, hago constar que esta copia coincide con original que se ha presentado Bogotá, D.C. - Colombia.
24 ENE 2012
GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS

ADOLF WATZKE
Traductor Oficial
Res. 2433 Minjusticia

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/EP2010/061160

PE2009/2305

FE

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 3)

To:

SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH
Patents Germany
Industriepark Höchst
Geb. K 801
65926 Frankfurt am Main
HEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 14 March 2011 (14.03.2011)	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH Patentabteilung K 801 Vorg. 28. März 2011	Important Notification
Applicant's or agent's file reference CPX66579PC	Eng. 28. März 2011	
International application No. PCT/EP2010/061160	☐ WV ☐ ablegen ☐ Veri. wie Vorg. / angegeben	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 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 Höchst Geb. K 801 65926 Frankfurt am Main Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No. +49 69 305 7072	
	Facsimile No. +49 69 357175	
	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 Rochaix Thomas e-mail pt06.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 06
---	--

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/EP2010/061160

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION 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)	
Applicant's or agent's file reference CPX66579PC	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP2010/061160	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	Authorized officer Rochaix Thomas e-mail pt06.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 06
---	--

Facsimile No. +41 22 338 89 70

Form PCT/IB/306 (January 2009)

1/EQ4TAFZ60

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/EP2010/061160

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 Wichmann LLP
Eastsite One
Seckenheimer Landstrasse 4
68163 Mannheim
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 15 October 2010 (15.10.2010)	
Applicant's or agent's file reference CPX66579PC	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP2010/061160	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 SPROGØE, Kennett Vejledalen 354 DK-2635 Ishøj 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 SPROGØE, Kennett 1982 West Bayshore Road #327 94303 Palo Alto, CA United States of America	State of Nationality DK	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☐ the International 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	Authorized officer Buloz Isabel e-mail pt06.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 06
---	--

Facsimile No. +41 22 338 89 70

(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)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2011/012719 A1

- (51) International Patent Classification:
A61K 9/06 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/EP2010/061160
- (22) International Filing Date:
30 July 2010 (30.07.2010)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
09167017.4 31 July 2009 (31.07.2009) EP
09179337.2 15 December 2009 (15.12.2009) EP
09179827.2 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): SPROGØE, Ken-
nett [DK/US]; 1982 West Bayshore Road #327, 94303
Palo Alto, CA (US). CLEEMANN, Felix [DE/DE];
Turnerstrasse 114, 69126 Heidelberg (DE). HERSEL,
Ulrich [DE/DE]; Fritz-Frey-Strasse 2, 69121 Heidelberg
(DE). KADEN-VAGT, Silvia [DE/DE]; Langgewann
79-81, 69121 Heidelberg (DE). LEBMANN, Torben
[DE/DE]; Schimperstrasse 2, 68167 Mannheim (DE).
RAU, Harald [DE/DE]; Schwarzwaldstr. 51/2, 69124
Heidelberg (DE). WEGGE, Thomas [DE/DE]; Kurfürs-
tenanlage 43, 69115 Heidelberg (DE).
- (74) Agent: BÜCHEL, Edwin; Isenbruck Bösl Hörschler
LLP, Eastside One, Seckenheimer Landstrasse 4, 68163
Mannheim (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: LONG ACTING INSULIN COMPOSITION

(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition comprising an insulin compound in a concentration that is sufficient to maintain a therapeutically effective level of the insulin compound in blood plasma for at least 3 days characterized by having a pharmacokinetic profile in vivo with substantially no burst of the insulin compound. The present invention further relates to the use of an insulin compound for preparing said pharmaceutical composition as well as a kit of parts comprising said pharmaceutical composition.

Long acting insulin composition

Field of the invention

The present invention relates to a pharmaceutical composition comprising an insulin compound, use of the composition, a method of treatment, a kit of parts, as well as combination treatment with a GLP-1 compound, such as a GLP-1 agonist. The pharmaceutical composition can be administered less frequent than current long acting insulins and is characterized by the release of structurally intact insulin over the full time period between administrations with substantially no burst of the insulin compound. This treatment can help patients reduce the frequency of injections, while being able to maintain optimal control of the plasma levels of insulin and consequently blood glucose.

10 Background

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.

Recent developments have also included oral insulin and inhaled insulin. However, because insulin is a protein, when taken orally it is easily digested by the stomach and gastrointestinal system. Alternatively, inhalable insulin delivered through an inhaler into the lungs was commercially available for a limited period (Exubera®, Pfizer discontinued in 2007). This formulation provided insulin for a period of hours, still requiring patients to continue injecting a long-acting basal insulin. Further disadvantages of the inhalable insulin included manufacturing difficulties resulting in a cost-prohibitive delivery system. As a result, all commercially available insulin formulations must be administered either by subcutaneous or intravenous injection.

The plasma profile of the various available insulins are characterized by having different plasma profiles. Said plasma profiles can be described by having a maximum and a minimum plasma concentration which is dependent on the formulation and type of insulin used. It is of high importance to obtain a plasma profile which is as reproducible from patient to patient and within

patients in order to be able to predict the plasma glucose lowering effect of the administered insulin. Additionally, in the case of multiple administrations of basal insulin, it is desirable to have as little difference between the maximum plasma concentration and the minimum plasma concentration as possible. This will lead to a more constant plasma concentration of insulin, and therefore a more uniform glucose lowering effect over the entire dosing interval.

Current standard basal insulin therapy consists of daily or twice daily administrations of long acting basal insulins such as NPH insulin, insulin glargine or insulin detemir. Though development of newer insulin analogs has aimed to reduced the variability of insulinotropic effects, the glucose lowering effect of these long acting formulations are still characterized by large inter- and intra-subject variations as described by Heise et al. (Diabetes, 2004 (53), 1614-1620). In this study insulin detemir displayed the least pharmacokinetic variation, with a coefficient of variation of 15 as compared to CV of NPH insulin and insulin glargine of 26 and 34, respectively. This rather large variability is a major obstacle to obtaining optimal glucose control, as it is difficult to predict the exposure to the insulin molecules.

The same study investigated the pharmacodynamic variation as assessed by glucose infusion rates (GIR). This evaluation also demonstrated that insulin detemir had lower within-subject variability than both NPH insulin and insulin glargine with respect to the pharmacodynamic marker GIR. Furthermore, this study demonstrated that the insulin effect on glucose infusion rates did not last throughout the full dosing period of 24 hours, clearly demonstrating the need for a long acting insulin, that offer full glucose lowering action for the full duration between doses. To circumvent the problem of current daily basal insulins not lasting a full 24 hours, some patients split their basal insulin dosage into two daily injections, in order to obtain better glucose control throughout the day.

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

In addition, even if patients can manage their blood glucose with daily injections of basal insulin, initiation of insulin therapy meets reluctance due to the daily injection regime. This is undesirable, as the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD) recognize insulin as first line treatment after oral metformin as offering the best treatment outcome. (DM Nathan et al., Diabetologica (2008) 51:8-11).

If the injection frequency of insulin treatment could be reduced, it is likely that the psychological barrier to initiation of insulin therapy would be reduced, hence allowing patients to start insulin therapy at an earlier stage, greatly improving their health status.

5 A challenge in developing long-acting basal insulin formulations lies in the narrow therapeutic range for insulin, and large peak-to-trough variations in insulin pharmacokinetics as well as burst effects should be avoided under all circumstances.

10 Several approaches to reducing the frequency of administration, while still retaining the insulin release within narrow limits have been proposed, but have failed to extend the duration of glucose lowering effects beyond a couple of days, while still being characterized by having a small ratio between the maximum plasma concentration and the minimum plasma concentration.

WO 06003014 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 insulinotropic 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
15 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 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 2004/089280). The insulin is
20 conjugated to a 40 kDa PEG polymer through a 9-hydroxymethyl-7-(amino-3-maleimidopropionate)-fluorene-N-hydroxysuccinimide spacer molecule. Hydrolysis of said spacer 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.

25 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. PLGA encapsulation of proteins has been shown to cause side reactions of the polymer esters with peptide or protein amino groups. Lactic acid
30 acylation products have been observed after exposure of the formulations to buffered solutions at

neutral pH. (Nat. Biotechnol. 18 (2000) 52-57; Pharm. Res. 11 (1994) 865-868; Pharm. Res. 19 (2002) 175-181).

Specifically for insulin, detrimental effects of polymer formulations have been demonstrated (Pharm. Dev. Technol. 4 (1999) 633-642; Pharm. Dev. Technol. 5 (2000) 1-9).

- 5 In the abovementioned case, the insulin has undergone substantial structural modification through permanent modification by a high molecular weight polymer entity as PEGylation of insulin apparently serves to protect the peptide from deterioration in the PLGA polymer formulation.

Unfortunately, such high molecular weight modified insulins may exhibit reduced efficacy by diminished receptor binding and may also exhibit injection site reactions such as lipodystrophy due
10 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.

In addition, the pharmacokinetic profile of the released insulin conjugate is characterized by an initial burst-like release immediately following administration, which is followed by a drop in
15 insulin conjugate plasma concentration, followed by an increase in insulin conjugate plasma concentration over the following days. This pharmacokinetic profile is typical of microencapsulated drug formulations and can lead to an unpredictable glucose response in subjects treated with such formulation.

Therefore the challenge remains to develop long-acting insulin without compromising the insulin
20 pharmacodynamics effects by permanent attachment of a high molecular weight entity.

The situation is further complicated by the fact that 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
25 insulin molecules are forced into close contact in a random way ("Stability of insulin: studies on the physical and chemical stability of insulin in pharmaceutical formulation", Jens Brange, Springer, 1994). 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.

The rate of side reactions is further influenced by the concentration of insulin, with the rate being higher when insulin is present in high concentration. It is therefore challenging to formulate high concentration long acting insulin formulations, in which insulin does not undergo undesirable side reactions.

Therefore, there is a clear need for novel long acting preparations of insulin that continuously release structurally intact insulin throughout the entire period between administrations, which at the same time retains a small ratio between the highest and lowest insulin plasma concentration in order to avoid too high or too low insulin concentrations, that can be potentially harmful for a patient.

The insulin requirement for diabetics is highly individual, with the dose depending on several physiological factors, including pancreatic beta cell function, insulin sensitivity, body weight and dietary intake. It is not uncommon for patients to require 40 IU of insulin or more per day. This is equivalent 280 IU/week which corresponds to 12.6 mg human insulin per week. In order to minimize the discomfort for the patient, this should be formulated in a small volume, for example one milliliter. It is therefore an object of the current invention, to provide an insulin formulation, in which the concentration of insulin is at least 10 mg/mL, while still releasing structurally intact insulin and displaying a substantially burstless pharmacokinetic profile. Furthermore, as a consequence, it is an object of the current invention that a single dose of the long acting insulin can be administered as a single injection of the formulation, containing at least 10 mg insulin compound.

US2007/0207210 A1 describes a method of preparing amorphous microparticles of high molecular weight proteins, and in particular antibodies. Insulin is mentioned in an example as being formulated in up to 400 mg/ml according to the disclosure. However, the object of the invention is to provide a formulation with similar pharmacokinetic profile to native protein, hence not to provide a sustained release. US2007/0207210 A1 therefore does not offer a solution to reducing the dosing frequency of insulin.

Definitions

Some relevant definitions for understanding the present invention are explained herein below.

As used herein the term “substantially no burst” or “substantially burstless” (both terms are used interchangeably in the present description) is intended to mean that upon administration of an insulin compound, which may be a prodrug or an active insulin compound, the ratio of the peak concentration of a detectable insulin compound in blood plasma during the first 48 hours after administration, such as subcutaneous or intramuscular, to the lowest concentration of a detectable insulin compound in blood plasma after the peak concentration during the first 48 hours after administration is less than 2 (substantially no burst detectable), preferred less than 1.5 (no burst detectable).

As used herein the term “burst” is intended to mean that upon administration of an insulin compound, which may be a prodrug or an active insulin compound, the ratio of the peak concentration of a detectable insulin compound in blood plasma during the first 48 hours after administration, such as subcutaneous or intramuscular, to the lowest concentration of a detectable insulin compound in blood plasma after the peak concentration during the first 48 hours after administration is 2 or higher.

In respect of detecting an insulin compound in blood plasma, such insulin compound may be the structural intact form of the administered insulin compound or in case the insulin compound is a prodrug, the detectable insulin compound will be the intact insulin compound released from the prodrug, such as human insulin, insulin analogs, insulin derivatives, and fragments thereof.

As used herein the term “a GLP-1 compound” is intended to mean any GLP-1 compound, such as GLP-1(7-37), GLP-1(7-36)NH₂, a GLP-1 analog, incl. a GLP-1 agonist. Examples of GLP-1 agonists as used herein are GLP-1, exendin-3 or exendin-4 agonists including but not limited to:

(i) exendin-4 analogues and amidated exendin-4 analogues, in which sequences one or more amino acid residues have been replaced by different amino acid residues including N-terminal modifications,

(ii) truncated exendin-4 and truncated forms that are amidated,

(iii) truncated exendin-4 and truncated forms that are amidated, in which sequences one or more amino acid residues have been replaced by different amino acid residues,

(iv) GLP-1 and amidated GLP-1,

(v) GLP-1-analogues and amidated GLP-1 analogues, in which sequences one or more amino acid residues have been replaced by different amino acid residues including N-terminal modifications,

(vi) truncated GLP-1 and truncated forms that are amidated,

5 (vii) truncated GLP-1 and truncated forms that are amidated, in which sequences one or more amino acid residues have been replaced by different amino acid residues,

(viii) the already known substances AVE-0010(ZP-10) (Sanofi-Aventis Zealand Pharma), BAY-73-7977 (Bayer), TH-0318, BIM-51077 (Ipsen, Tejin, Roche), NN-2211 (Novo Nordisk), LY315902.

10 GLP-1 agonists mimics the activities of native GLP-1 by binding the receptor(s) at which GLP-1 exerts its actions which are beneficial as insulinotropic and in the treatment of diabetes mellitus or by mimicking the effects of exendin on urine flow, slowing gastric emptying, inducing satiety, increasing urinary sodium excretion and/or decreasing urinary potassium concentration, by binding to the receptor(s) where exendin cause these effects.

15 As used herein the term "peak to trough ratio" is intended to mean the ratio between the highest plasma concentration and the lowest plasma concentration of an insulin compound, such as human insulin, within a given period between administrations.

20 As used herein the term "structurally intact insulin compound" is intended to mean intact insulin consisting of two peptides called A- and B-chain which are connected by two disulfide-bridges. In addition, the A-chain contains an intramolecular disulfide-bridge. Loss of the intra- or intermolecular disulfide bridges or rearrangements of the two chains, like A-A or B-B homodimers cause insulin inactivation. Structural integrity is measured by digesting the insulin with a suitable endoprotease, like, for example endo-gluC, and analyzing the resulting fragments by mass spectrometry. Absence of signals resulting from single insulin chains indicate intact insulin. As used herein, the term "prodrug" is intended to mean an insulin compound that undergoes
25 biotransformation before exhibiting its pharmacological effects. Prodrugs can thus be viewed as biologically active moieties containing specialized non-toxic protective groups used in a transient manner to alter or to eliminate undesirable properties in the parent molecule. For instance, the prodrug may be a biohydrolyzable amide and biohydrolyzable ester and also encompasses a) compounds in which the biohydrolyzable functionality in such a prodrug is encompassed in the
30 compound, and b) compounds which may be oxidized or reduced biologically at a given functional

group. Typical prodrugs may be a carrier-linked 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; a cascade prodrug for which the cleavage of the carrier group becomes effective only after unmasking an activating group.

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. "Insulin-hydrogel prodrug" refers to a prodrug, in which the insulin is transiently linked to a hydrogel carrier. The terms "hydrogel prodrug" and "hydrogel-linked prodrug" refer to prodrugs of biologically active agents transiently linked to a hydrogel and are used synonymously.

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.

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.

As used herein, the term "biohydrolyzable ester" is an ester of a compound which either a) does not interfere with the biological activity of the parent substance but confers on that substance advantageous properties *in vivo* such as duration of action, onset of action, and the like, or b) is biologically inactive but is readily converted *in vivo* by the subject to the biologically active principle.

As used herein, the term "biohydrolyzable amide" is an amide of a compound which either a) does not interfere with the biological activity of the parent substance but confers on that substance advantageous properties *in vivo* such as duration of action, onset of action, and the like, or b) is biologically inactive but is readily converted *in vivo* by the subject to the biologically active principle.

As used herein the term "a hydrogel" is intended to mean 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.

The term "gel" refers to a non-crosslinked, jelly-like polymer solution.

As used herein the term "a depot" is intended to mean a drug delivery system, typically injected as a subcutaneous or intramuscular injection, of an insulin compound, capable of consistently releasing the active compound over an extended period of time.

- 5 As used herein the term "a peak concentration" is intended to mean the highest concentration obtained after administration of an insulin compound.

As used herein the term "an insulin compound" is intended to mean any insulin of mammalian origin, such as human insulin, porcine insulin or bovine insulin with disulfide bridges between CysA7 and CysB7 and between CysA20 and CysB19 and an internal disulfide bridge between
10 CysA6 and CysA11, recombinant mammalian insulin, such as recombinant human insulin, insulin analogs, insulin derivatives, and fragments thereof, typical examples are rh insulin, insulin glargine, insulin detemir, insulin glulisine, insulin aspart, insulin lispro, insulin conjugated to low-molecular-weight PEG, wherein low-molecular-weight PEG has a molecular weight smaller than 10 kDa. The insulin compound may be in the form of a prodrug, in which case the compound to be
15 released in plasma is the active insulin which forms after administration of the prodrug.

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
20 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
25 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
5 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
10 position may also be denoted as e.g. PheB1 which means that the amino acid residue at position B1 is a phenylalanine residue.

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

15 As used herein the term "Alkyl" means a straight-chain or branched carbon chain. Each hydrogen of an alkyl carbon may be replaced by a substituent.

As used herein the term "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,
20 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 C₁₋₄ alkyl carbon may be replaced by a substituent.

As used herein the term "C₁₋₆ alkyl" means an alkyl chain having 1 - 6 carbon atoms, e.g. if present
25 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.

- 5 As used herein the term "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.

- As used herein the term "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.
- 15 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.

- As used herein the term "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.

- 25 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.

- 30 As used herein the term "Halogen" means fluoro, chloro, bromo or iodo. It is generally preferred that halogen is fluoro or chloro.

As used herein the term "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, pyrrolidine, 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.

As used herein the term "9 to 11 membered heterobicycyl" 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.

As used herein the term 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.

As used herein the term "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).

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

"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.

5 A "therapeutically effective amount" of an insulin compound 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
10 values and testing different points in the matrix, which is all within the ordinary skills of a trained physician or veterinary.

"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,
15 bicarbonate, citrate and acetate, sulphate, nitrate, chloride, pyruvate. Antacids such as $Mg(OH)_2$ 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,
20 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
25 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 monosodium 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;
30 ethylene glycol; propylene glycol; polyethylen 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.

5

The term "stabilizers" refers to compounds used to stabilize the polymeric 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.

10 "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.

15 "Oxidation protection agents" refers to 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.

20 "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.

25 "Pharmaceutically acceptable" is meant to encompass any excipient and/or additive, which does not interfere with the effectiveness of the biological activity of the active ingredient and that, is not toxic to the host to which it is administered.

30 The term "reagent" 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
5 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.

10 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.

15

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

20 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.

25 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.

- 5 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.

- 10 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.

- 15 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, malcamic 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.

- 25 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, 5 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.

10

"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.

15 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.

20

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 25 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.

- 5 As used herein the term “a”, “an”, and “the” and similar referents are to be construed to cover both the singular and the plural, unless otherwise indicated herein or clearly contradicted by context.

Description

- 10 The present invention relates to long acting insulin preparation for basal insulin coverage. Basal insulins are long acting formulations of insulin or analogs of insulin designed to mimic the basal insulin output of the pancreatic beta cells. Optimally the blood glucose is hereby effectively controlled in a sustained manner during the entire dosing interval.

- 15 The present inventors have discovered that an insulin compound can be released from an injectable depot, such as subcutaneous, continuously in structurally intact form between administrations without seeing any burst effect. Structural integrity of the released insulin compound is provided by a well-hydrated polymer matrix minimizing intermolecular contact of insulin molecules. Furthermore, by avoiding a burst of insulin the risk of harmful side-effects in a patient is reduced.

- 20 The present invention reduces the risk of hypoglycemia following administration due to lack of burst-like insulin release, reduces the risk of hyperglycemia at the end of the dosing period, reduces the injection frequency, and provides predictable insulin levels in blood plasma in a patient.

It is a further object of the current invention to provide a novel basal insulin that requires less frequent injection than current daily basal insulin regimens and provides a high level of safety by releasing structurally intact insulin over the full time interval between injections and typically, with a peak to trough ratio less than 2.

- 25 Further advantages will be apparent when reading the present description.

In a first aspect the present invention relates to a pharmaceutical composition comprising an insulin compound in a concentration that is sufficient to maintain a therapeutically effective level of the

insulin compound in blood plasma for at least 3 days, typically at least 80 hours, e.g. a week or more characterized by having a pharmacokinetic profile in vivo with substantially no burst of the insulin compound.

5 Such a concentration will vary from subject to subject and depend on the therapeutic window in an individual subject, but in order for a therapeutic effect to be present during at least 3 days, e.g. a week (i.e. about 7 days) the concentration is typically at least about 10 mg/ml, e.g. more than 10 mg/ml.

10 Accordingly, in a further aspect the present invention relates to a pharmaceutical composition comprising an insulin compound of a concentration of at least 10 mg/ml characterized by having a pharmacokinetic profile in vivo with substantially no burst of the insulin compound.

In a further aspect the present invention relates to a pharmaceutical composition comprising an insulin compound in a concentration of at least 11 mg/mL to be administered in a single dose of at least 10 mg of the insulin compound.

15 As used herein a single insulin compound dose is given in mg and concentration of an insulin compound in a pharmaceutical composition is given in mg/mL. If the insulin compound is a prodrug, the concentration is based on quantitative release of free insulin from prodrug. By methods well-known in the art, aliquots of a composition are subjected to insulin-releasing conditions (aqueous buffer pH 7.4, 37°C, or accelerated conditions at elevated pH), until no significant increase in insulin concentration is observed and the total amount of released insulin is determined.

20 It is understood that in the case of soluble carriers, quantitative release is synonymous to quantitative hydrolysis.

In one embodiment of the present invention the concentration of the insulin compound is at least 11 mg/ml, such as from 11 mg/ml to 35 mg/ml, more preferred 15 mg/ml to 25 mg/ml, even more preferred around 20 mg/ml, and even more preferred around 24 mg/ml.

25 The volume to be administered in order to administer an effective dose, for example by a syringe, to a subject, such as a human, is preferably less than 1.5 ml, typically 1.0 ml or less.

In a further embodiment single dose of the insulin compound is at least 5 mg, such as from 5 mg to 100 mg, more preferred 5 mg to 50 mg, and more preferred 5 mg to 25 mg

In a further embodiment the ratio of the peak concentration of the insulin compound in blood plasma during the first 48 hours after administration, such as subcutaneous or intramuscular injection, to the lowest concentration of the insulin compound in blood plasma after the peak concentration during the first 48 hours after administration is less than 2, typically less than 1.5.

- 5 The above embodiments as well as the embodiments to be described hereunder should be seen as referring to any one of the aspects described herein as well as any one of the embodiments described herein unless it is specified that an embodiment relates to a certain aspect or aspects of the present invention.

- 10 The pharmaceutical composition is typically a controlled delivery system comprising an insulin compound and characterized by delivering the insulin compound to the mammalian blood plasma in such a way that essentially no burst is experienced.

In a still further embodiment the pharmacokinetic profile is measured in mammalian blood plasma, such as human blood plasma. Plasma insulin concentrations can be measured with commercially available ELISA kits by relating the results to a calibration curve obtained from an insulin standard.

- 15 For statistical significance the experiment is run with a suitable number of biological and technical replicates and the mean and median values are calculated to adjust for biological and technical variability.

In a further embodiment the composition is characterized by exhibiting a peak to trough ratio of less than 2, typically less than 1.75, preferably less than 1.5, or even less than 1.25.

- 20 In a still further embodiment the composition is characterized by a continuous release of a structurally intact insulin compound over the full time period between administrations.

“Continuous release” refers to an uninterrupted release of insulin.

In a further embodiment the full time period between administrations is at least about 80 hours, such as about 110 hours, typically at least a week, such as 1-2 weeks or even longer.

- 25 In a still further embodiment the insulin compound is a prodrug.

In a further embodiment the insulin compound is a carrier-linked prodrug.

In a still further embodiment the insulin compound is a cascade prodrug.

The prodrug may be administered as a liquid, such as a solution or gel, or may be contained in a depot, or even be integrated in a depot, so that the depot is functioning as a prodrug.

In a further embodiment the insulin compound is fully contained in a depot.

5 The term "fully contained" refers to a depot, in which less than 10% of the drug, i.e. insulin, is present in the water-fraction after adding 1 ml of water to 1 ml of depot, mixing, and separating the depot from the water.

In a still further embodiment the depot is a polymer gel, such as a hydrogel.

In a further embodiment the depot is a well hydrated polymer matrix.

10 The insulin compound may be contained in the depot in several ways, for instance the insulin compound can be bound in a non-covalent manner or the insulin compound is covalently linked to the depot, which depot without limitation is selected from a polymer gel, a hydrogel, or a well hydrated polymer matrix. Non-limiting examples for suitable polymers are polymers that are capable of forming quasi-infinite three dimensional well-hydrated molecular networks. Such hydrogels are chemically or physically crosslinked functionalized or non-functionalized
15 polyalkyloxy-based polymers like poly(propylene glycol) or poly(ethylene glycol), dextran, chitosan, hyaluronic acid and derivatives, alginate, xylan, mannan, carrageenan, agarose, cellulose, starch, hydroxyethyl starch (HES) and other carbohydrate-based polymers, poly(vinyl alcohols), poly(oxazolines), poly(anhydrides), poly(ortho esters), poly(carbonates), poly(urethanes), poly(acrylic acids), poly(acrylamides) such as poly(hydroxypropylmethacrylamide) (HMPA),
20 poly(acrylates), poly(methacrylates) like poly(hydroxyethylmethacrylate), poly(organophosphazenes), poly(siloxanes), poly(vinylpyrrolidone), poly(cyanoacrylates), poly(esters) such as poly(lactic acid) or poly(glycolic acids), poly(iminocarbonates), poly(amino acids) such as poly(glutamic acid) or poly lysine, collagen, gelatin, copolymers, grafted copolymers, cross-linked polymers, hydrogels, and block copolymers from the above listed
25 polymers. These polymers may serve as backbone moieties or cross-linking moieties and combination of different polymers as copolymers are possible, provided a high level of hydration of the molecular network. In addition to oligomeric or polymeric cross-linking moieties of the polymer types listed above, low-molecular cross-linking moieties may be used, especially when hydrophilic high-molecular weight backbone moieties are used for the formation of hydrogel prodrug carriers.

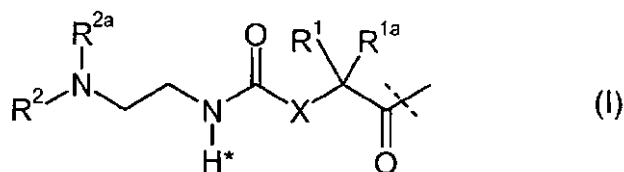
One way to minimize inter-insulin contact on the molecular level is by spacing insulin molecules homogeneously in the well-hydrated polymer matrix. Homogeneous spacing may be achieved by covalent linkage of insulin to the polymer and by using linkers that cleave in aqueous environment at neutral pH, a slow release of structurally intact insulin is ensured.

- 5 Preferred is a polymer-linked insulin prodrug that has essentially no bioactivity, said property causing all insulintropic activity to be attributable to released insulin. Thus, by engineering of the release properties of the prodrug, a high degree of control over the plasma levels of insulin can be achieved.

- 10 Insulin can be linked through all relevant functionalities provided by the molecule, and such preferred functionalities provided by the biogenic amino acids are typically selected from guanidino, imidazole, indole, carboxy, carboxamide, primary and secondary hydroxyl, phenol, and primary amino. For instance, human insulin has the following relevant functionalities: carboxy, carboxyamide, primary and secondary hydroxy, phenol, imidazole, and primary amino.

- 15 In a further embodiment the insulin compound is linked to the prodrug carrier either by covalent attachment to either of the lysine moieties either/or the N-terminus of either/or the A-chain or the B-chain of the insulin compound.

- 20 In a particular embodiment the prodrug or a pharmaceutically acceptable salt thereof comprises 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 $C(R^3R^{3a})$; or $N(R^3)$;

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

5

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^1 is substituted with one L^2-Z and optionally further substituted, provided that the hydrogen marked with the asterisk in formula (I) is not replaced by a substituent and wherein

10

L^2 is a single chemical bond or a spacer; and

Z is a hydrogel.

- 15 In case 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 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
- 20 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. 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,
- 25 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
- 30 other acids known to the person skilled in the art. If 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 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 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.

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

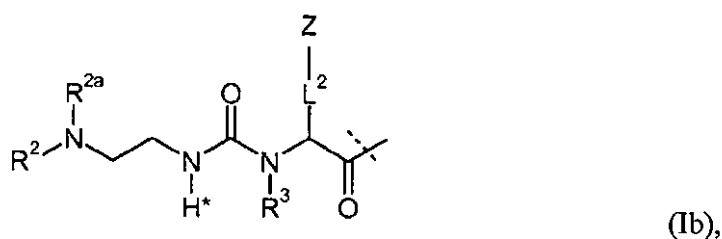
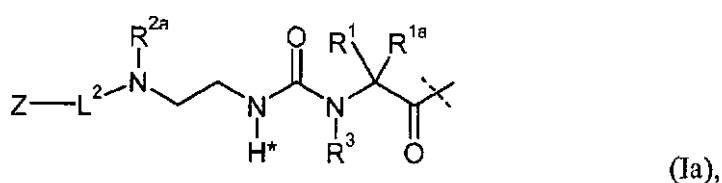
Preferably, in formula (I) R^1 is replaced by L^2-Z .

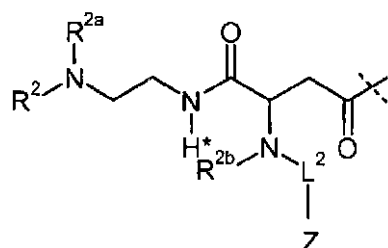
Preferably, in formula (I) X is $N(R^3)$.

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

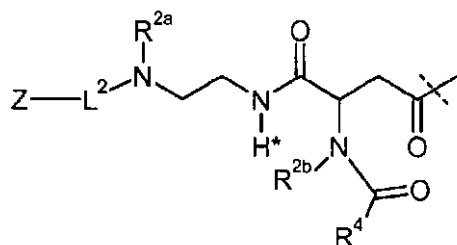
Preferably, X is $C(R^3R^{3a})$, R^{3a} is $N(R^{2b})-L^2-Z$.

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





(Ic),



(Id),

- 5 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).

10

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 .

15

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.

- 20 Preferably, one or more further optional substituents are independently selected from the group consisting of halogen; CN; $COOR^9$; OR^9 ; $C(O)R^9$; $C(O)N(R^9R^{9a})$; $S(O)_2N(R^9R^{9a})$; $S(O)N(R^9R^{9a})$; $S(O)_2R^9$; $S(O)R^9$; $N(R^9)S(O)_2N(R^{9a}R^{9b})$; 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; 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 heterobicycyl, 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 ; $C(O)R^9$;
 5 $C(O)N(R^9R^{9a})$; $S(O)_2N(R^9R^{9a})$; $S(O)N(R^9R^{9a})$; $S(O)_2R^9$; $S(O)R^9$; $N(R^9)S(O)_2N(R^{9a}R^{9b})$; 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
 10 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($R^{11}R^{11a}$);

15 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)₂N(R^{11})-; -S(O)N(R^{11})-; -S(O)₂-; -S(O)-;
 20 -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
 25 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 ; $OC(O)R^{12}$;
 $N(R^{12})C(O)R^{12a}$; $N(R^{12})S(O)_2R^{12a}$; $N(R^{12})S(O)R^{12a}$; $N(R^{12})C(O)OR^{12a}$; $N(R^{12})C(O)N(R^{12a}R^{12b})$;
 30 $OC(O)N(R^{12}R^{12a})$; or C_{1-6} alkyl, wherein C_{1-6} alkyl is optionally substituted with one or more
 halogen, which are the same or different;

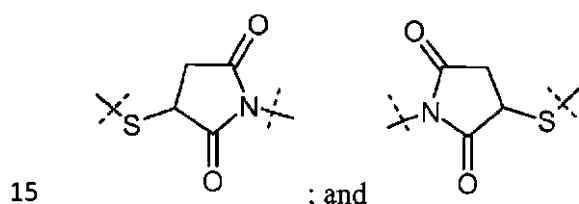
R^{11} , R^{11a} , R^{12} , R^{12a} , R^{12b} are independently selected from the group consisting of H; Z; or C_{1-6} alkyl, wherein C_{1-6} alkyl is optionally substituted with one or more halogen, which are the same or different;

- 5 provided that 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
 10 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.

- 20 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
 25 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
5 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.

10

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.

15 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
20 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
25 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-
30 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.

- 5 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.
- 10 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,
- 15 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.
- 20 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
- 25 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.
- 30 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.jcnkemusa.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.

30

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.

5

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.

10

Most preferably, the hydrogel carrier of the present invention is characterized in that the 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.

15

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.

20

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

25

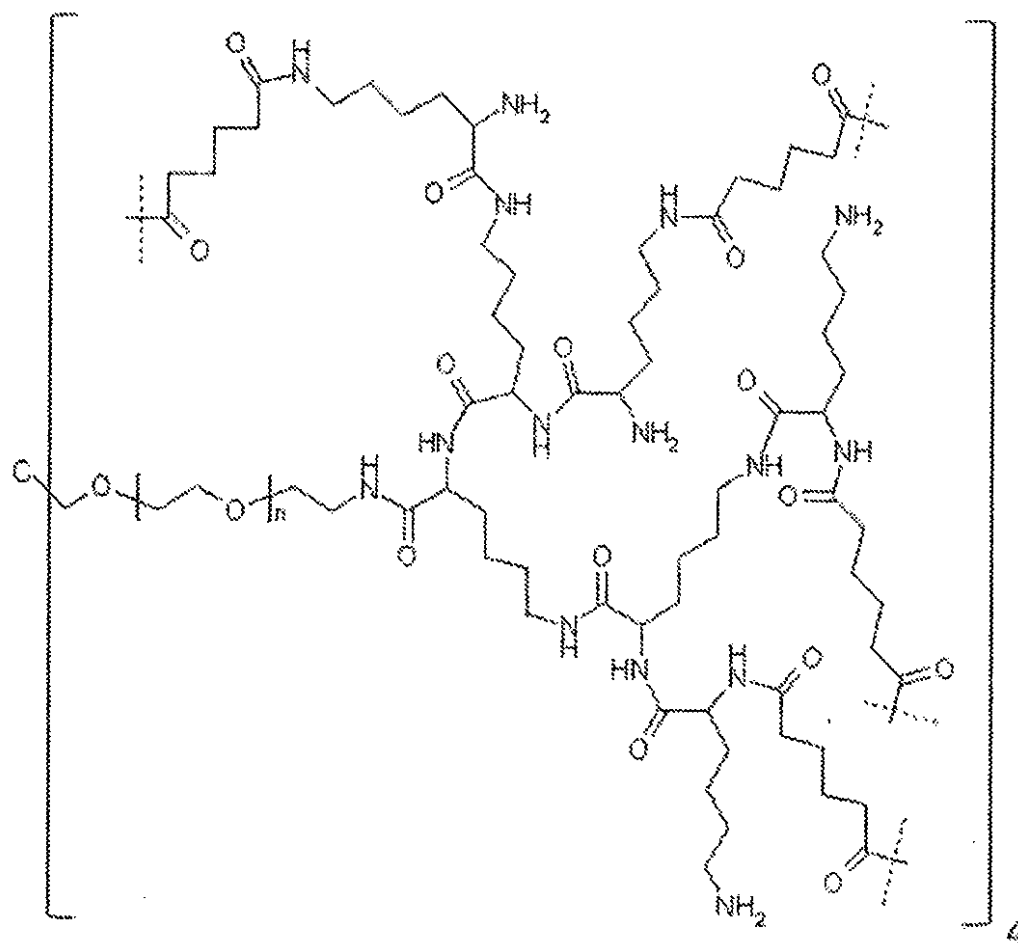
Preferably, the dendritic moiety Hyp is a hyperbranched polypeptide. Preferably, the hyperbranched polypeptide comprises lysine in bound form. Preferably, each dendritic moiety Hyp has a molecular weight in the range of from 0.4 kDa to 4 kDa. It is understood that a backbone moiety $C(A-Hyp)_4$ can consist 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 heptalysine.

30

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.

- 5 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.
- 10 If present in a hydrogel according to the invention as degradable interconnected functional group, preferred biodegradable linkages are esters, carbonates, phosphoesters and sulfonic acid esters and most preferred are esters or carbonates.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 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.

5

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.

- 10 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.

15

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.

20

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.

- 25 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
30 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.

- 5 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.

- 15 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.

20

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

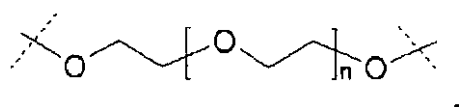
25

- 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.

30

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.

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

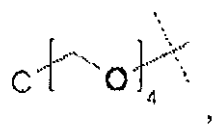


wherein n is an integer of from 5 to 50.

10

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:



15

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:

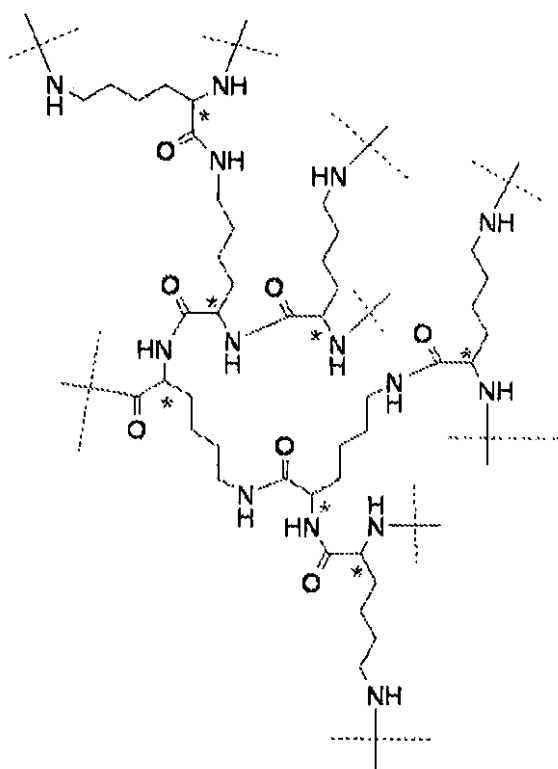


20

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

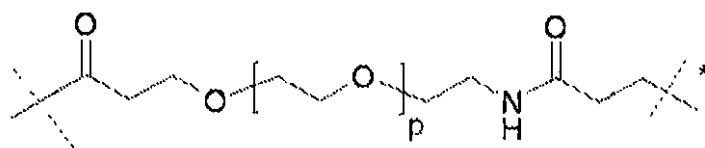
Preferably, backbone moiety comprises a hyperbranched moiety Hyp.

- 25 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.

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

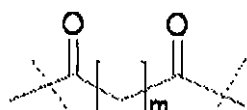


wherein the dashed line marked with the asterisk indicates the bond between the hydrogel and the N of the thiosuccinimide group,

wherein the other dashed line indicates attachment to Hyp, and

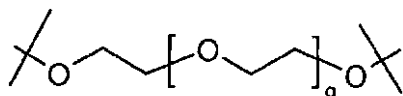
- 10 wherein p is an integer of from 0 to 10.

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.

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



wherein

q is an integer from 3 to 100;

10

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.

15

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 of 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.

20

25

30

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.

5

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.

10

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.

15

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, i.e. insulin, 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, i.e. insulin, in part or as whole.

20

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

25

30

acid and derivatives, maleimide and other alpha,beta unsaturated Michael acceptors like vinylsulfone, thiol, hydroxyl groups.

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

10 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.

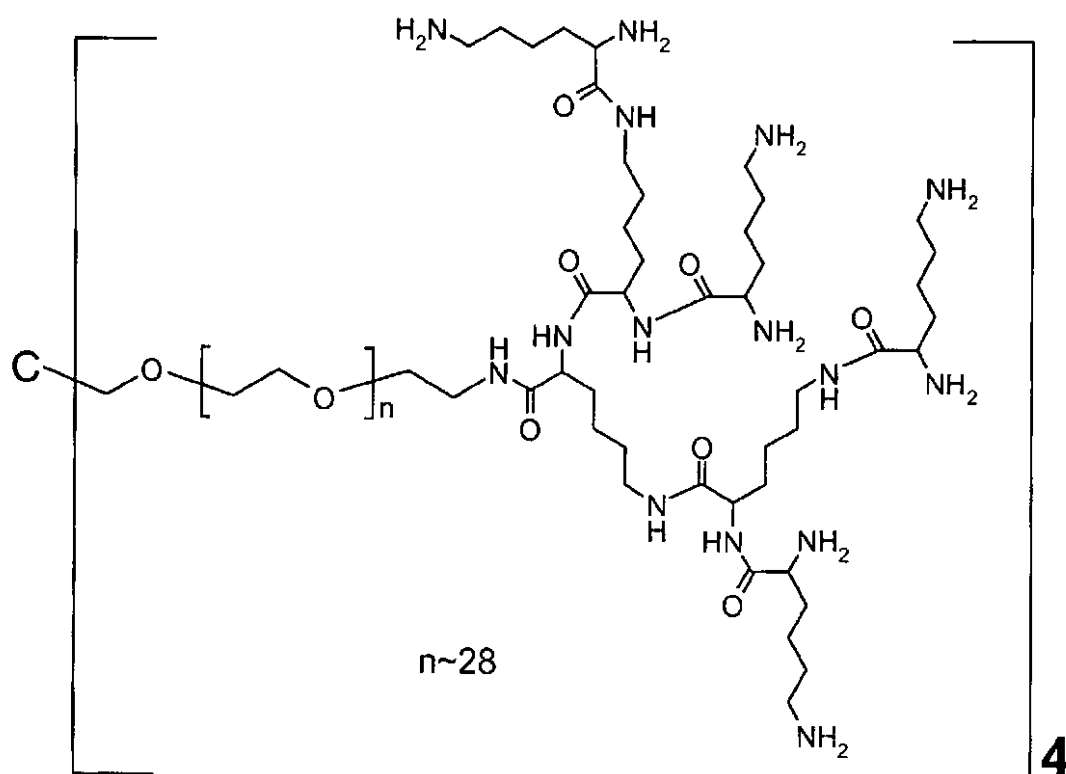
15 A preferred process for the preparation of a prodrug according to the present invention is as follows:

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
20 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
25 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
30 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

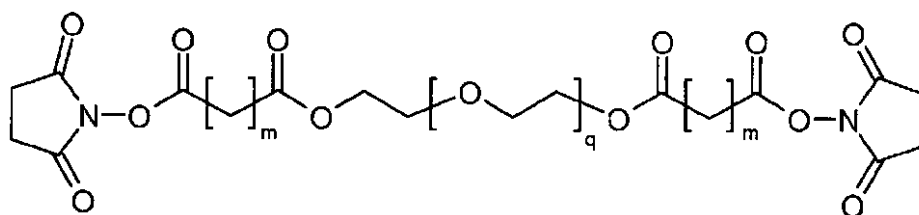
reagent's number of lysines per PEG-arm will be between six and seven, more preferably approximately seven.

A preferred backbone reagent is shown below:

5

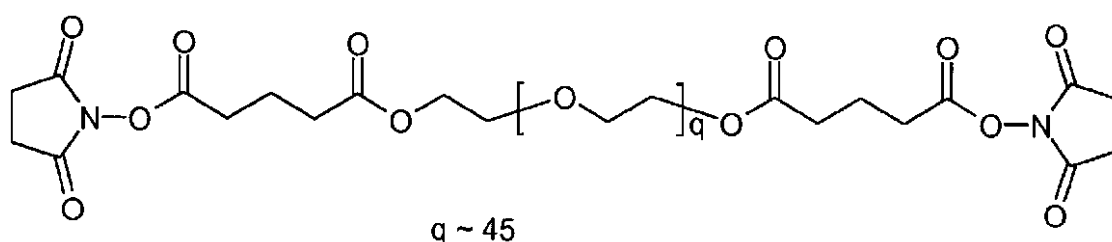


- 10 Synthesis of the crosslinker reagent starts from a linear PEG chain with a molecular weight ranging from 0.2 to 5 kDa, more preferably from 0.6 to 2 kDa, which is esterified with a half ester of a dicarboxylic acid, most adipic acid or glutaric acid. Preferred protecting group for half ester formation 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
- 15 or N-hydroxysuccinimide esters, most preferred N-hydroxysuccinimide esters, of which preferred selected structure is shown below.



wherein each m independently is an integer ranging from 2 to 4, and q is an integer of from 3 to 100.

- 5 More preferred is the following structure:



- 10 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 carboxyl groups and the corresponding crosslinker reagent would be selected from ester-containing amino-terminated PEG-chains.

15

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 polymerizable groups, backbone and crosslinker are dissolved in DMSO and a suitable emulgator with an appropriately selected HLB value, preferably Arlacel
 20 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' -tetramethylethylenediamine. 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,
 25 protecting groups may be removed at this stage.

In an alternative embodiment of this invention, multi-functional moieties are coupled to the reactive functional groups of the polymerized reactive hydrogel to increase the number of functional groups which allows to increase the drug load of the hydrogel. Such multi-functional moieties may be provided by suitably substituted derivatives of lysine, dilysine, trilysine, tetralysine, pentalysine, 5 hexalysine, heptalysine, or oligolysine, low-molecular weight PEI. Preferably, the multi-functional moiety is lysine.

Further, such hydrogel according to the invention may be functionalized with a spacer carrying the same functional group, for instance, amino groups may be introduced into the hydrogel by coupling 10 a heterobifunctional spacer, such as suitably activated COOH-(EG)₆-NH-fmoc (EG=ethylene glycol), and removing the fmoc-protecting group.

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 15 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 20 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 25 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 30 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

- 5 (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.

10 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;
- 15 (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.

20 A particularly preferred method for the preparation of an insulin prodrug of the present invention comprises the steps of

- 25 (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 reagent, wherein the reactive groups of the crosslinker reagent 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 of the present invention) in the hydrogel backbone of step (c) with a covalent conjugate of insulin and transient prodrug linker or first reacting the un-reacted functional groups with the transient prodrug linker and subsequently with insulin;
- (e) optionally capping remaining un-reacted functional groups to yield a prodrug of the present invention.

Specifically, hydrogels for the insulin prodrug 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 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.

- 5 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.

10

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.

15

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, f o r m e r Arlacel P135, Croda International Plc)

20

25

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.

30

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.

The hydrogel for the insulin 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 smaller 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).

In a further embodiment the composition is characterized by being a liquid composition which upon injection forms a depot.

In a further embodiment the composition is characterized by being administered by injection, such as subcutaneous or intramuscular.

In a further embodiment the composition is for use in the treatment or prevention of a disease or disorder associated with insulin deficiency in which treatment or prevention with an insulin compound is beneficial, such as hyperglycemia, pre-diabetes, impaired glucose tolerance, diabetes type I, diabetes type II, syndrome X. Typically, such disease or disorder is diabetes type II.

In a further embodiment the insulin compound is selected from human or nonhuman insulin or insulin analogs and derivatives or conjugates thereof. More preferred is human insulin and insulin analogs, such as for example insulin glargine, insulin detemir, insulin lispro, insulin aspart, insulin glulisine. When administering the insulin compound a maximum peak concentration is typically reached within the first 48 hours. In a further embodiment the peak concentration is reached within the first 24 hours of administration, such as within the first 12 hours of administration, e.g. within the first 6 hours of administration.

In a further aspect the pharmaceutical composition of the present invention further comprises a GLP-1 compound, typically a GLP-1 agonist.

Such a GLP-1 compound is typically selected from any one of

[Seq ID No:1] Exendin-4

5 HEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS-NH2

[Seq ID No:2] Exendin-3

HSDGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS-NH2

[Seq ID No:3]

HEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG P

10 [Seq ID No:4]

HEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG Y

[Seq ID No:5]

HEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG

[Seq ID No:6]

15 HEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG-NH2

[Seq ID No:7]

HEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKN-NH2

[Seq ID No:8]

HEGTFTSDL SKQLEEEAVR LFIEFLKNGG PSSGAPPPS-NH2

20 [Seq ID No:9]

HEGTFTSDL SKQLEEEAVR LFIEFLKN-NH2

[Seq ID No:10]

HGEGTFTSDL SKQLEEEAVR LAIEFLKN-NH2

[Seq ID No:11]

HGEGTFTSDL SKQLEEEAVR LFIEWLKNNG PSSGAPPPS-NH2

[Seq ID No:12]

5 HGDGTFTSDL SKQMEEEA VR LFIEWLKNNG PSSGAPPPS-NH2

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

HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLVKGR-NH2

[Seq ID No 14]

HSEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLVKGR-NH2

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

HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLVKGRG

[Seq ID No 16]

HAXaaGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLVKGR-NH2

Wherein Xaa is selected from P, F, Y.

15 [Seq ID No 17]

HXaaEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLVKGR-NH2

Wherein Xaa is selected from T, a-aminobutyric acid, D-Ala, V, Gly.

[Seq ID No 18]

HaEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLVKGG

20 [Seq ID No 19]

R-HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLVKGR-NH2

Wherein R is selected from acetyl, pyroglutamyl, N-2-hydroxybenzoyl, N-trans-3-hexenoyl.

[Seq ID No 20]

HXaaAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLVKGR-NH2

Wherein Xaa is 6-amino-hexanoyl.

In a further aspect the present invention relates to use of an insulin compound for preparing a pharmaceutical composition comprising the insulin compound in a concentration that is sufficient to maintain a therapeutically effective level of the insulin compound in blood plasma for at least 3 days, typically at least 80 hours, e.g. a week or more characterized by having a pharmacokinetic profile in vivo with substantially no burst of the insulin compound, for treatment or prevention of a disease or disorder associated with insulin deficiency in which treatment or prevention with an insulin compound is beneficial.

Such a concentration will vary from subject to subject and depend on the therapeutic window in an individual subject, but in order for a therapeutic effect to be present during at least 3 days, e.g. a week (i.e. about 7 days) the concentration is typically at least about 10 mg/ml, e.g. more than 10 mg/ml.

A preferred composition of an insulin-hydrogel prodrug is given 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.

5

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.

10
15

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.

20

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

25

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

Another aspect is a reconstituted composition comprising a therapeutically effective amount of a 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.

30

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,
- 5 (iii) drying the composition in said container, and
- (iv) sealing the container.

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

- 10 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
- 15 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.

20

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.

- 25 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
- 30 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:

- 5 (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,
- 10 (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
15 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,
- 20 (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,
- 25 (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 etiocholandione), 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.

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 etiocholandione), 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.

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.

- 5 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 AT₁-receptor antagonists; angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors; renin inhibitors; beta adrenergic receptor blockers; alpha adrenergic receptor blockers; calcium
- 10 channel blockers; aldosterone synthase inhibitors; aldosterone receptor antagonists; neutral endopeptidase (NEP) inhibitors; dual angiotensin converting enzyme/neutral endopeptidase (ACE/NEP) inhibitors; an endothelin receptor antagonists; diuretics; statins; nitrates; anti clotting agents; natriuretic peptides; digitalis compounds; PPAR modulators.
- 15 Accordingly, in a further aspect the present invention relates to use of an insulin compound for preparing a pharmaceutical composition comprising the insulin compound of a concentration of at least 10 mg/ml characterized by having a pharmacokinetic profile with substantially no burst of the insulin compound, for treatment or prevention of a disease or disorder associated with insulin deficiency in which treatment or prevention with an insulin compound is beneficial.
- 20 In one embodiment of the present invention the concentration of the insulin compound is at least 11 mg/ml, such as from 11 mg/ml to 35 mg/ml, more preferred 15 mg/ml to 25 mg/ml, even more preferred around 20 mg/ml, and even more preferred around 24 mg/ml.

The volume to be administered, such as by a syringe, to a subject, such as a human, is preferably less than 1.5 ml, typically 1.0 ml or less.

- 25 In a further embodiment the disease or disorder associated with insulin deficiency in which treatment or prevention with an insulin compound is beneficial is selected from hyperglycemia, pre-diabetes, impaired glucose tolerance, diabetes type I, diabetes type II, syndrome X. Typically, such disease or disorder is diabetes type II.

A still further embodiment concerns the treatment or prevention of hyperglycemia, pre-diabetes, impaired glucose tolerance, diabetes type I, diabetes type II, syndrome X, in a mammal subject, such as a human subject.

5 In a further embodiment the human subject has been diagnosed with pre-diabetes, impaired glucose tolerance, obesity, hypertension, diabetes type I, diabetes type II, syndrome X.

In a still further embodiment the pharmacokinetic profile is measured in mammalian blood plasma, such as human blood plasma.

In a further embodiment the composition is characterized by exhibiting a peak to trough ratio of less than 2, such as less than 1.75, less than 1.5, or less than 1.25.

10 In a still further embodiment the composition is characterized by a continuous release of a structurally intact insulin compound over the full time period between administrations.

In a further embodiment the full time period between administrations is at least about 80 hours, such as about 110 hours, typically a week.

15 In a still further embodiment the insulin compound is a prodrug. Such a prodrug may typically be selected from such described above represented by formula D-L.

In a further embodiment the insulin compound is fully contained in a depot, typically a polymer gel, such as a hydrogel, e.g. a well hydrated polymer matrix. Typically, a well-hydrated polymer matrix is minimizing intermolecular contact of insulin molecules.

20 In a still further embodiment the insulin compound is covalently linked in the depot, typically the polymer gel, such as the hydrogel, e.g. the well hydrated polymer matrix.

In a further embodiment the composition is characterized by being a liquid composition which upon injection forms a depot.

In a still further embodiment the composition is administered by injection, such as subcutaneous or intramuscular.

25 In a further embodiment the insulin compound is selected from human or nonhuman insulin or insulin analogs and derivatives or conjugates thereof. More preferred is human insulin and insulin

analogues, such as for example insulin glargine, insulin detemir, insulin lispro, insulin aspart, insulin glulisine.

In a still further embodiment the peak concentration is reached within the first 24 hours of administration, such as within the first 12 hours of administration, e.g. within the first 6 hours of administration.

In a further embodiment the composition further comprises a GLP-1 compound.

A still further embodiment is in combination with a GLP-1 compound. Typically, the insulin compound may be administered first or vice versa, and the insulin compound and the GLP-1 compound may be administered simultaneously or sequentially.

10 In a further aspect the present invention relates to a method for treatment or prevention of a disease or disorder associated with insulin deficiency in which treatment or prevention with an insulin compound is beneficial, such as hyperglycemia, pre-diabetes, impaired glucose tolerance, diabetes type I, diabetes type II, syndrome X, in a mammal subject in need of such a treatment or prevention by administration of a therapeutically effective amount of an insulin compound in a concentration
15 that is sufficient to maintain a therapeutically effective level of the insulin compound in blood plasma for at least 3 days, typically at least 80 hours, e.g. a week or more characterized by having a pharmacokinetic profile in vivo with substantially no burst of the insulin compound.

In a further aspect the present invention relates to a method for treatment or prevention of a disease or disorder associated with insulin deficiency in which treatment or prevention with an insulin
20 compound is beneficial, such as hyperglycemia, pre-diabetes, impaired glucose tolerance, diabetes type I, diabetes type II, syndrome X, in a mammal subject in need of such a treatment or prevention by administration of a therapeutically effective amount of an insulin compound in a concentration of at least 10 mg/ml characterized by having a pharmacokinetic profile with substantially no burst of the insulin compound.

25 An embodiment relates to treatment or prevention of hyperglycemia, pre-diabetes, impaired glucose tolerance, diabetes type I, diabetes type II, syndrome X, in a mammal subject, such as a human subject. Typically, the human subject has been diagnosed with pre-diabetes, impaired glucose tolerance, obesity, hypertension, diabetes type I, diabetes type II, syndrome X.

In a further embodiment the concentration of the insulin compound is at least 11 mg/ml, such as from 11 mg/ml to 35 mg/ml.

In a still further embodiment the pharmacokinetic profile is measured in mammalian blood plasma, such as human blood plasma.

- 5 In a further embodiment the composition is characterized by exhibiting a peak to trough ratio of less than 2, such as less than 1.75, less than 1.5, or less than 1.25.

In a still further embodiment the composition is characterized by a continuous release of a structurally intact insulin compound over the full time period between administrations.

- 10 In a further embodiment the full time period between administrations is at least about 80 hours, such as about 110 hours, typically a week.

In a still further embodiment the insulin compound is a prodrug, such as any one of the prodrugs described herein.

In a further embodiment the insulin compound is fully contained in a depot, typically a polymer gel, such as a hydrogel, e.g. a well hydrated polymer matrix.

- 15 In a still further embodiment the insulin compound is covalently linked in the depot, typically the polymer gel, such as the hydrogel, e.g. the well hydrated polymer matrix.

In a further embodiment the composition is characterized by being a liquid composition which upon injection forms a depot.

- 20 In a still further embodiment the composition is administered by injection, such as subcutaneous or intramuscular.

- In a further embodiment the insulin compound is selected from human or nonhuman insulin or insulin analogs and derivatives or conjugates thereof. More preferred is human insulin and insulin analogs, such as for example insulin glargine, insulin detemir, insulin lispro, insulin aspart, insulin glulisine. In a still further embodiment the peak concentration is reached within the first 24 hours of administration, such as within the first 12 hours of administration, e.g. within the first 6 hours of administration.
- 25

In a further embodiment the composition further comprises a GLP-1 compound.

A still further embodiment is in combination with a GLP-1 compound. Typically, the insulin compound may be administered first or vice versa, and the insulin compound and the GLP-1 compound may be administered simultaneously or sequentially.

In a further aspect the present invention relates to a kit of parts comprising a pharmaceutical composition of any one of the embodiments as described herein and a container for administration of the composition. Typically, the container is a syringe.

An embodiment of the kit further comprises a GLP-1 compound.

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.

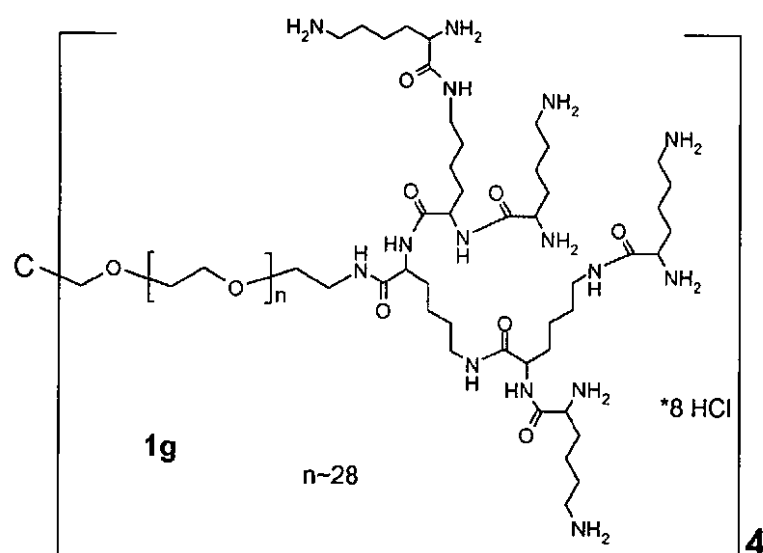
MS of PEG products showed a series of (CH₂CH₂O)_n moieties due to polydispersity of PEG starting materials. For easier interpretation only one single representative *m/z* signal is given in the examples. MS of insulin conjugates are reported for representative isotopes and refer to the four-proton adducts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

5 mobile phase.

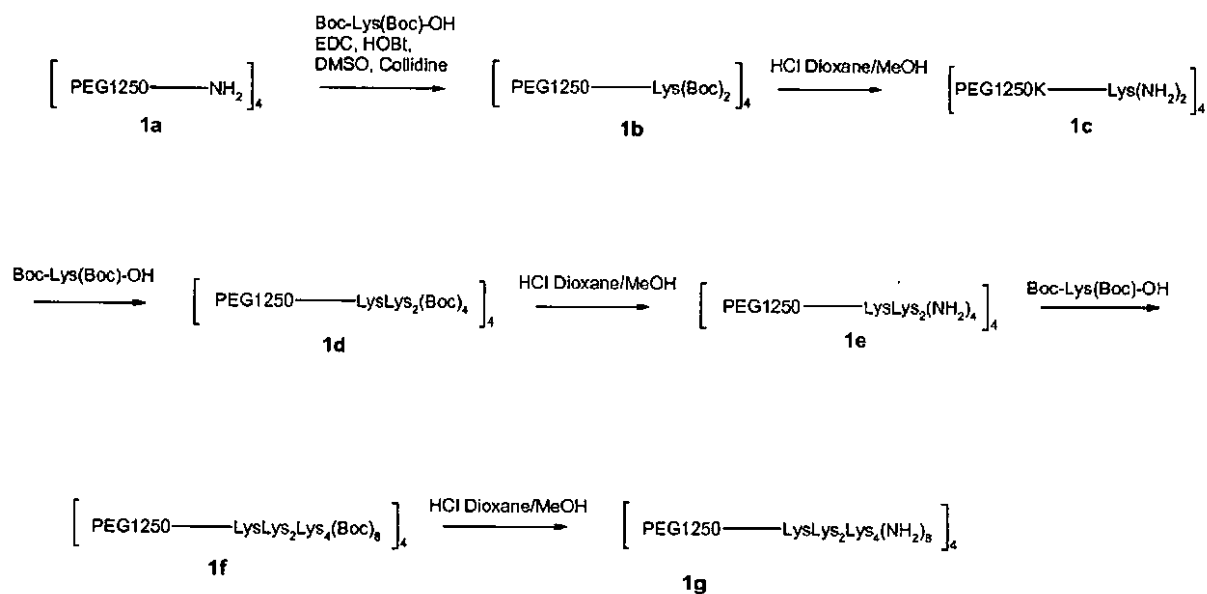
Example 1

Synthesis of backbone reagent 1g



10

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.

- 5 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**.

- 10 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.

- 15 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
20 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.

- 25 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).

- 30 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.

5

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.

10 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).

15 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).

20

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
25 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
30 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*

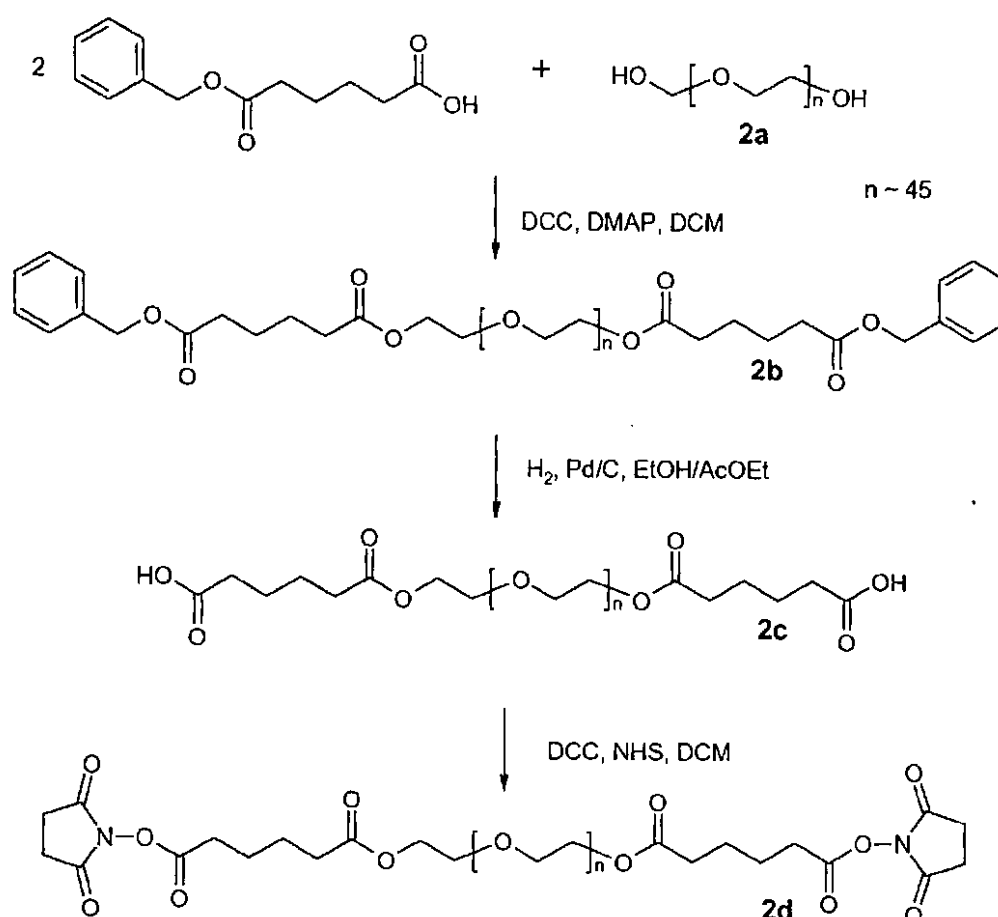
Yield: 11.5 g (89 %) as pale yellow flakes.

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)

5

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.

10 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

15 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
20 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.

25

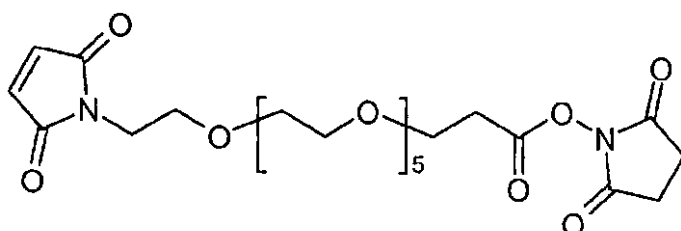
3a was prepared as described for **3** except for the use of 1200 mg **1g**, 3840 mg **2d**, 28.6 mL DMSO, 425 mg Arlacel P135, 100 mL heptane and 4.3 mL TMEDA. For workup, 6.6 mL acetic acid were added and then after 10 min 50 mL of water and 50 mL of saturated aqueous sodium chloride solution were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

Amino group content of hydrogel was determined by conjugation of a fmoc-amino acid to the free amino
30 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.

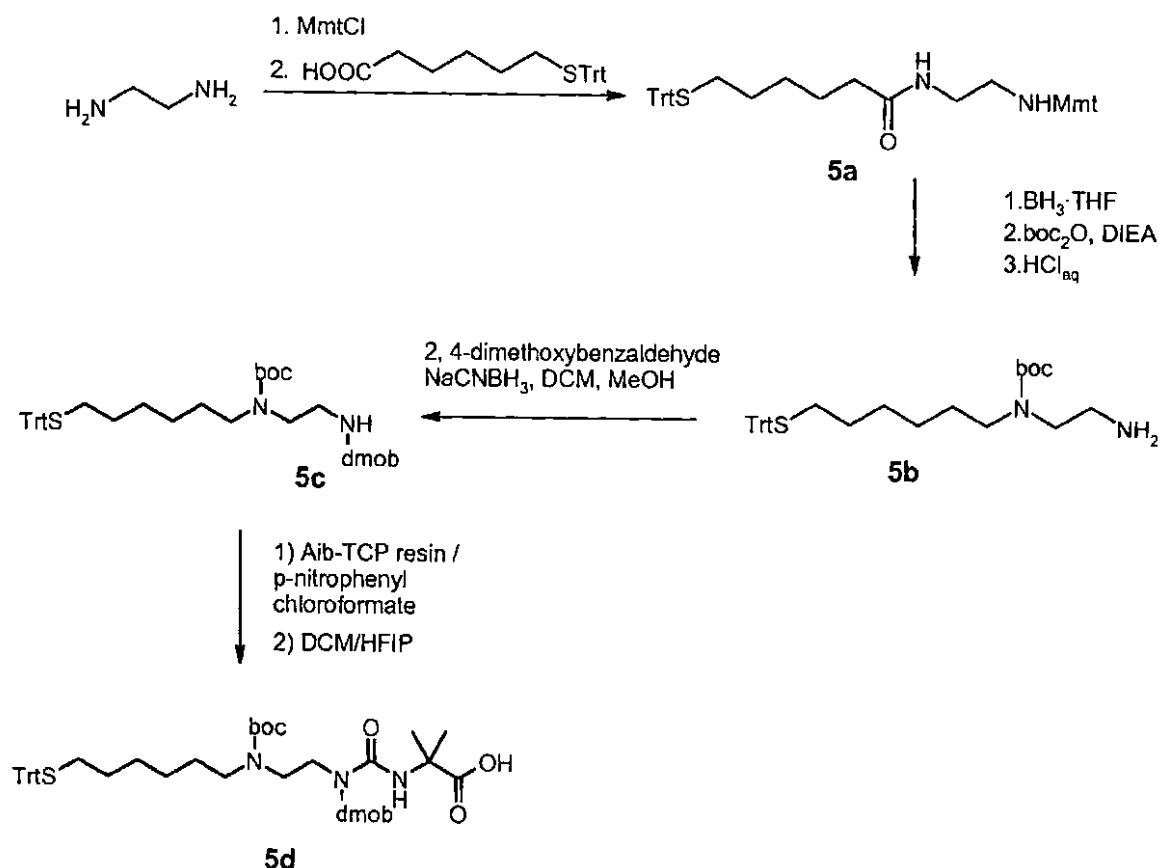
4a was synthesized as described above except for the use of **3a** instead of **3**.

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:



5

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 Na₂SO₄ 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).

5

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).

15

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).

20

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.

25

Yield: 2.52 g (3.19 mmol).

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

30

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.

5 Yield: 343 mg (0.512 mmol).

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

Synthesis of linker reagent **5d**:

10 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 μL , 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
15 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**.

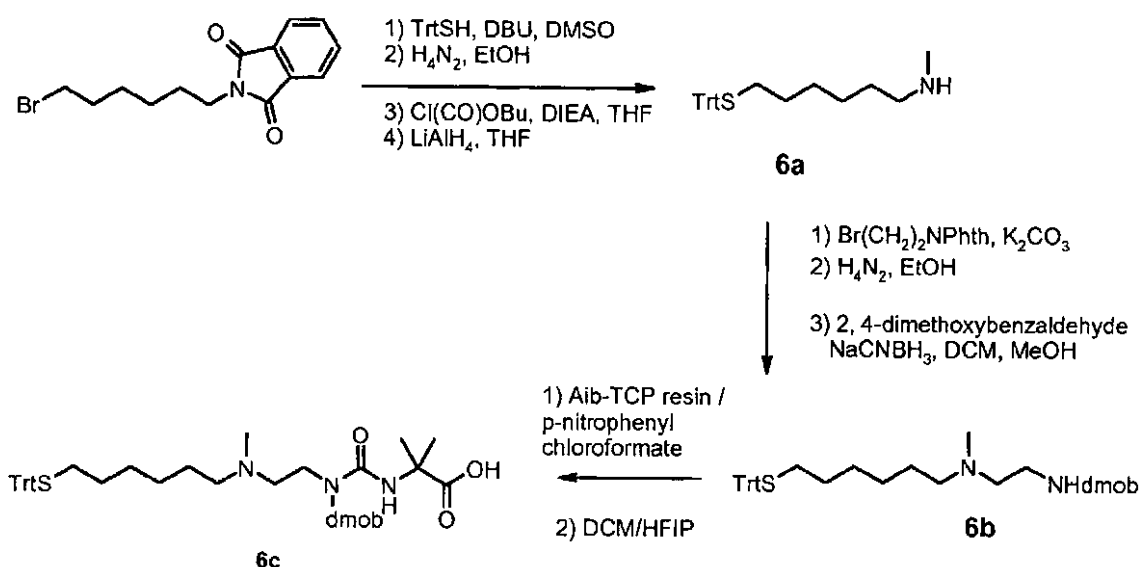
20 Yield: 230 mg, (0.29 mmol).

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

Example 6

Synthesis of linker reagent **6c**

25 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 NaHCO₃ sat. (80 mL) and brine (80 mL), dried over MgSO₄, 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 MgSO₄ and concentrated to yield crude 6-(tritylmercapto)-hexylamine (10.10 g, 26.87 mmol, 95%).

MS: m/z 376.22 = [M+H]⁺, (calculated = 376.20).

DIEA (1.41 mL, 8.11 mmol) and *n*-butyl chloroformate (908 μ L, 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). LiAlH₄ (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 = $[M+H]^+$, (calculated = 390.22).

5

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.

10

Yield: 1.23 g (2.18 mmol).

MS: m/z 563.27 = $[M+H]^+$, (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 μ L, 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.

15

Yield: 624 mg (0.944 mmol).

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

20

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.

25

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**.

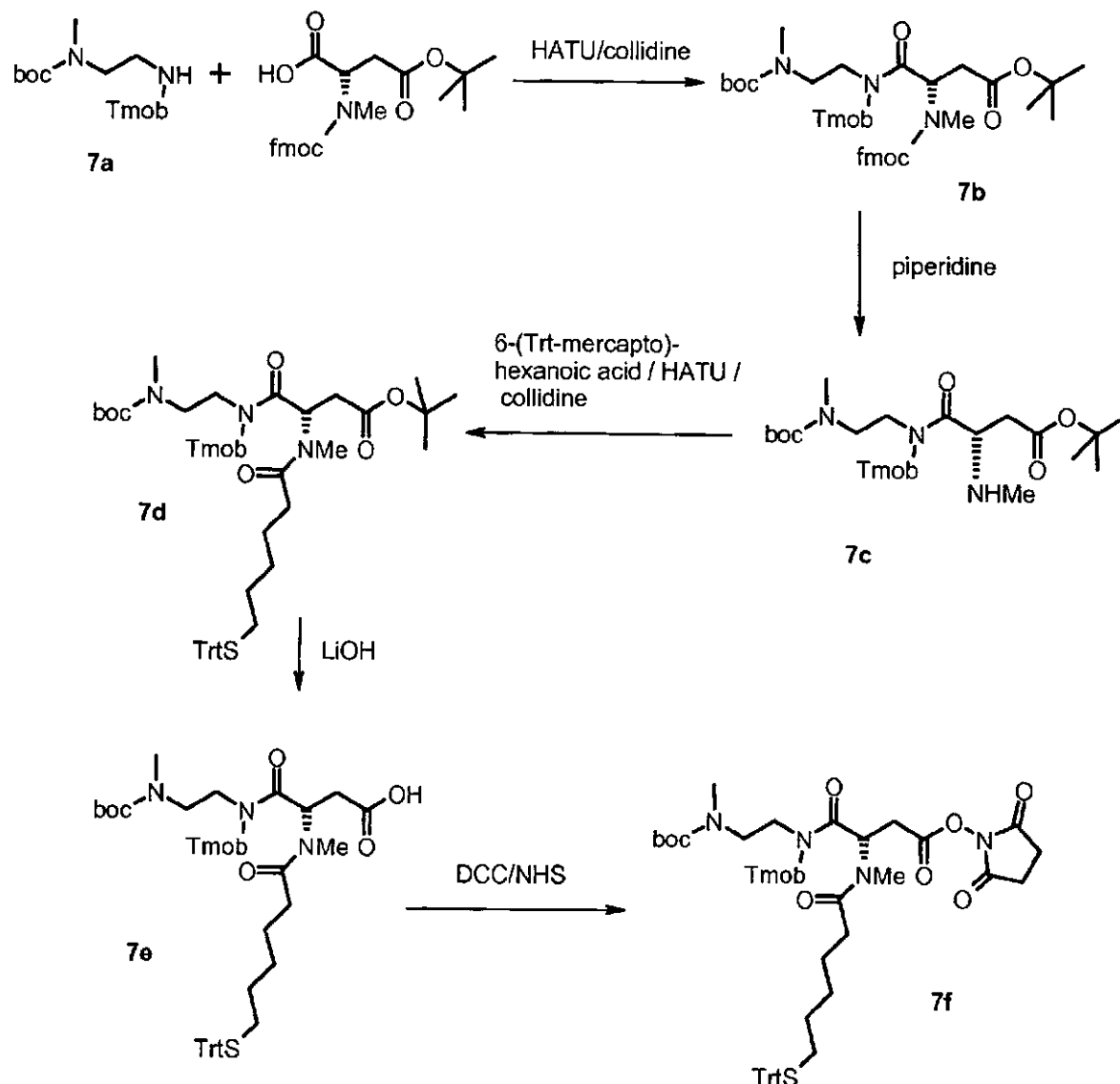
30

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:



5

To a cooled (0 °C) solution of *N*-Methyl-*N*-*tert*-butoxycarbonyl-*N'*-2,4,6-trimethoxybenzyl-ethylendiamine (**7a**) (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*-*tert*-boc-*N'*-tmob-ethylendiamine (**7a**) as a crude oil which was purified by RP-HPLC.

10

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).

25

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.

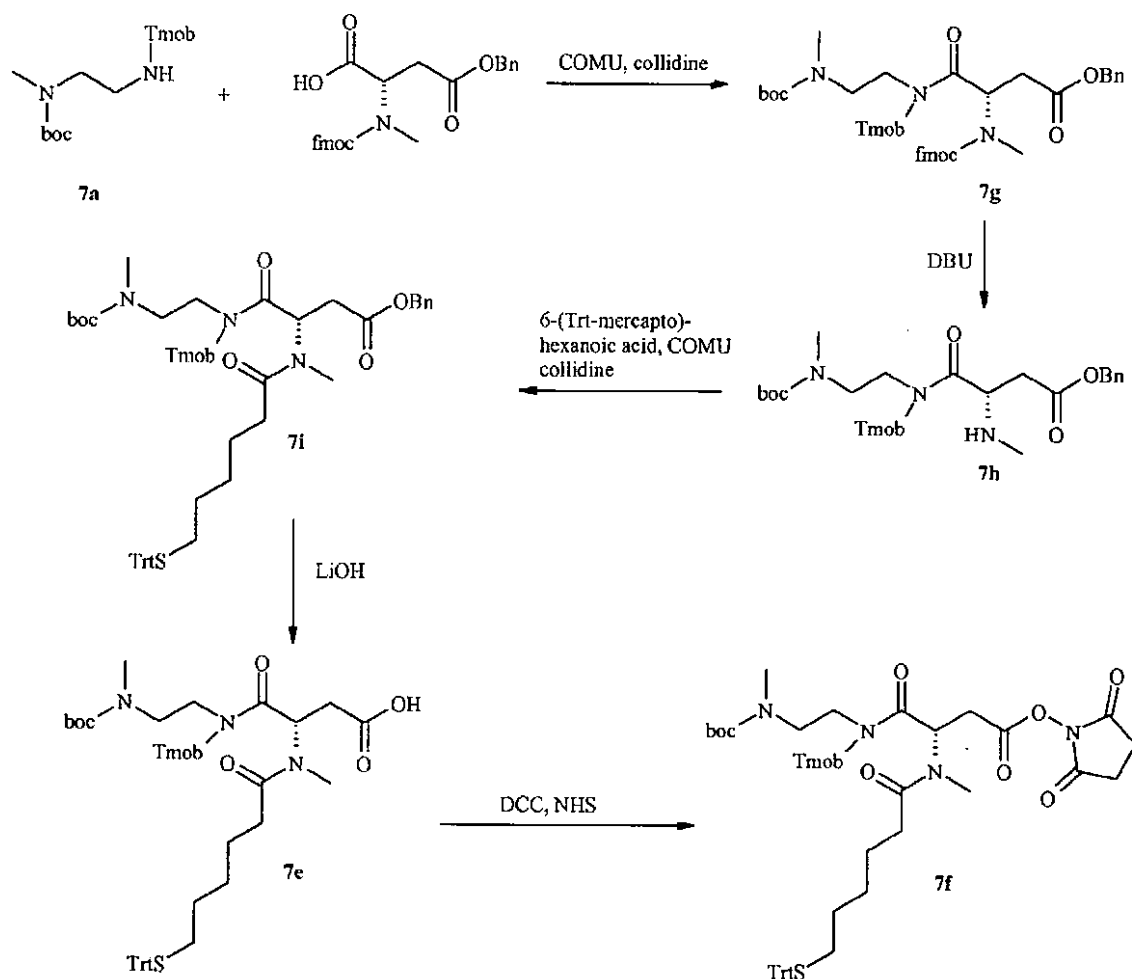
30

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:



5

To a solution of *N*-Methyl-*N*-boc-ethylenediamine (2 g, 11.48 mmol) and NaCNBH₃ (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 NaHCO₃ solution (200 mL) and extracted 5 x with CH₂Cl₂. The combined organic phases were dried over Na₂SO₄ 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 = [M+H]⁺, (calculated = 354.21).

15

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

5 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.

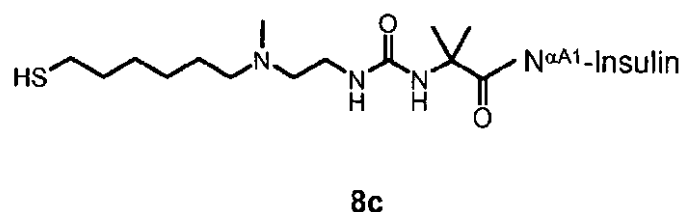
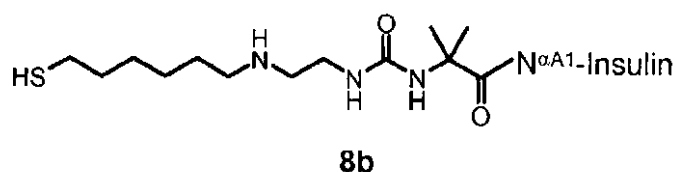
Yield: 154 mg (81%)

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

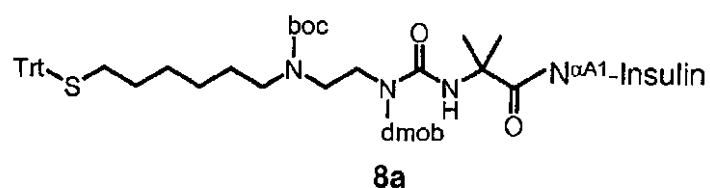
10

Example 8

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



15 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

20 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^{αA1}-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^{αA1}-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^{αA1}-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**.

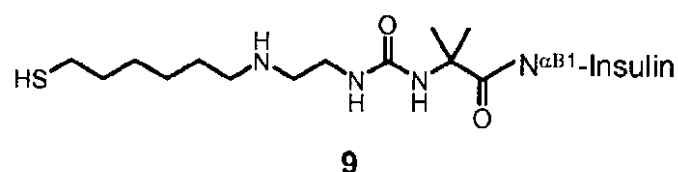
8c:

Yield: 237 mg (0.039 mmol)

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

Example 9

Synthesis of N^{αB1}-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 μL, 0.0229 mmol) and shaken at RT for 1 h. The reaction mixture was acidified with 100 μL of acetic acid and protected insulin-linker conjugate was purified by RP-HPLC.

Yield: 5 mg (0.00075 mmol).

000109

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

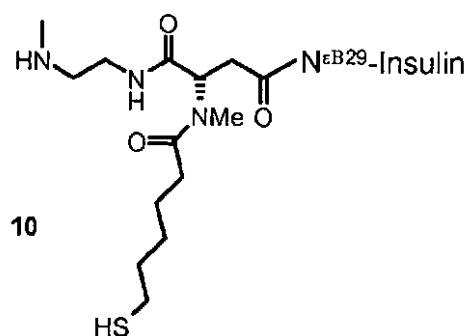
Lyophilized protected insulin-linker conjugate was treated with 1 mL 90/10/2/2 (v/v/v/v) HFIP/TFA/water/TES at RT for 45 min. The reaction mixture was diluted with 0.5 mL of water and all
 5 volatiles were removed under a stream of nitrogen. N^{εB29}-conjugated insulin-linker conjugate **9** was purified by RP-HPLC.

Yield: 4 mg (0.0007 mmol)

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

10 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
 15 5 min at RT. 400 μL 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
 20 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.

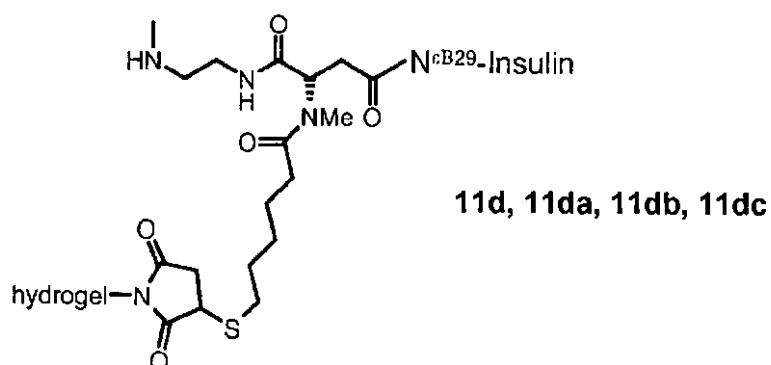
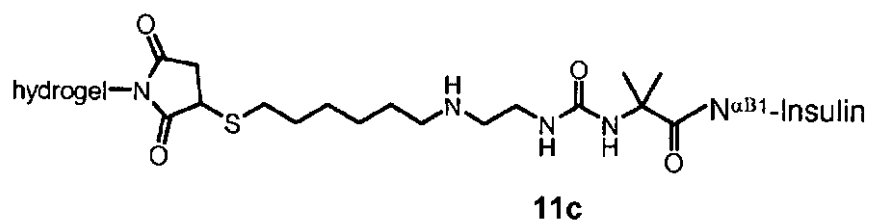
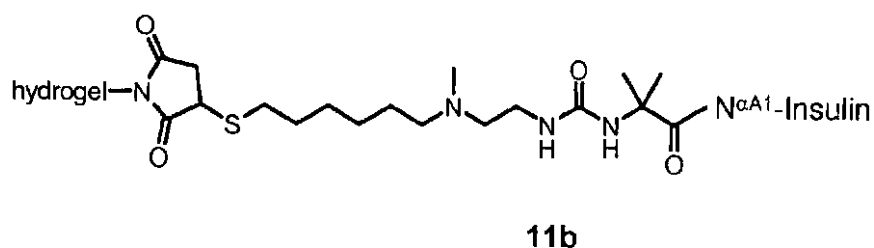
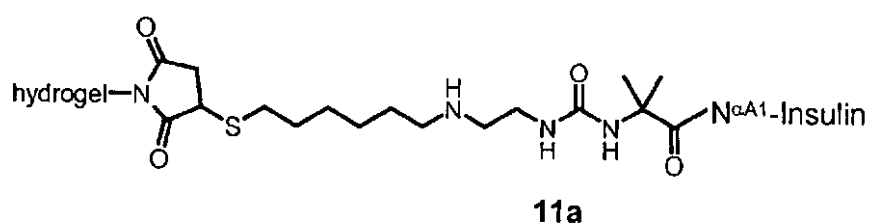
Yield: 143 mg (0.023 mmol).

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

25 Example 11

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

000110



Dry maleimide functionalized hydrogel **4** (82 mg, 10.3 μ mol maleimido groups) was filled into a syringe equipped with a filter frit. A solution of insulin-linker-thiol **8b** (27.8 mg, 4.6 μ mol) 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.

5

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

10 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**.

15

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.

20

25

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).

30

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 μ mol) 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**.

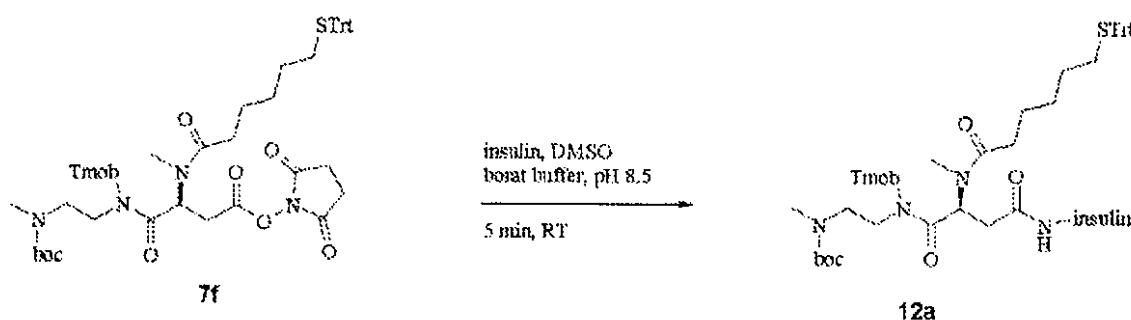
Alternatively, insulin-linker-hydrogel **11db** was filled in a chromatography column and placed in a temperature controlled incubator (37°C). Sodium phosphate (pH 7.4, 60 mM; 3 mM EDTA, 0.01 % Tween-20) was pumped through the column with a constant flow of 0.25 mL/h (nominal) and collected outside the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

5 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**)



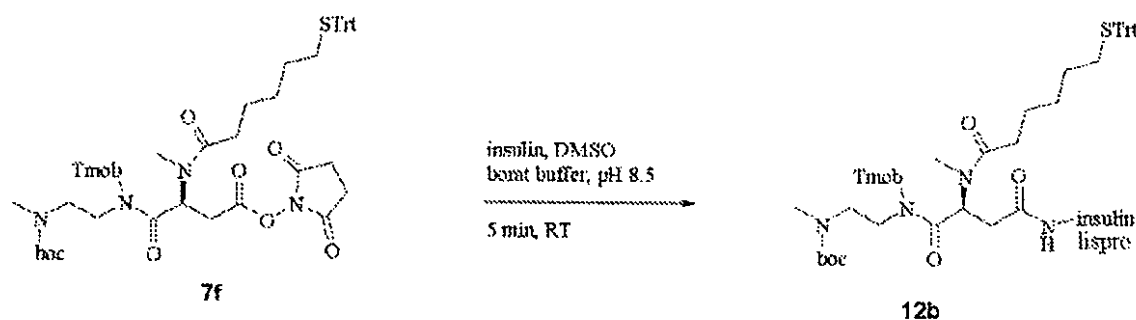
- 10 1.2 g (0.206 mmol, 0.85 eq) of insulin were dissolved in DMSO at RT. After 30 min the solution was cooled to 0 °C while borate buffer (0.5 M, pH 8.5, 21.6 ml) was added over a period of 4.40 min. The temperature of the solution was kept between 25 and 28 °C. A solution of 228 mg (0.239 mmol, 1 eq) **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).

15 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).

- 20 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.

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

Example 15:

Pharmacokinetics study in rat

- 10 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 500µL of test item **11da** in acetate buffer pH 5, containing 3 mg insulin (approx. 12 mg/kg). Per animal and time point 200µL of blood was withdrawn from the tail vein to obtain about 100µL 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.

- 20 After a single subcutaneous injection of 500µL **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:

- 30 **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.

- 5 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 polynomial equation. Before analysis plasma samples were vortexed and diluted in reaction tubes (1:5 and 15 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 20 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**

- 25 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 30 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
5	Aib	2-Aminoisobutyric acid
	Bn	benzyl
	Boc	t-butyloxycarbonyl
	COMU	(1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)dimethylamino-morpholino-carbenium hexafluorophosphate
10	DBU	1,3-diazabicyclo[5.4.0]undecene
	DCC	<i>N,N</i> , -dicyclohexylcarbodiimid
	DCM	dichloromethane
	DIEA	diisopropylethylamine
	DMAP	dimethylamino-pyridine
15	DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
	Dmob	2,4-dimethoxybenzyl
	DMSO	dimethylsulfoxide
	EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
	EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
20	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
25		hexafluorophosphate
	HFIP	hexafluoroisopropanol
	HPLC	high performance liquid chromatography
	HOBt	<i>N</i> -hydroxybenzotriazole
	iPrOH	2-propanol
30	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
5	MS	mass spectrum / mass spectrometry
	MTBE	methyl <i>tert.</i> -butyl ether
	MW	molecular mass
	n.d.	not determined
	NHS	N-hydroxy succinimide
10	OD	optical density
	OBu	butyloxy
	OtBu	<i>tert.</i> -butyloxy
	PEG	poly(ethylene glycol)
	Phth	phthal-
15	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
20	Su	succinimidyl
	TCP	2-chlorotrityl chloride resin
	T E S	triethylsilane
	TFA	trifluoroacetic acid
	THF	tetrahydrofuran
25	TMEDA	N,N,N'-tetramethylethylene diamine
	Tmob	2,4,6-trimethoxybenzyl
	Trt	triphenylmethyl, trityl
	UPLC	ultra performance liquid chromatography
	UV	ultraviolet
30	VIS	visual

We claim:

1. A pharmaceutical composition comprising an insulin compound in a concentration that is sufficient to maintain a therapeutically effective level of the insulin compound in blood plasma for at least 3 days characterized by having a pharmacokinetic profile in vivo with substantially no burst
5 of the insulin compound.
2. A pharmaceutical composition comprising an insulin compound in a concentration of at least 10 mg/ml characterized by having a pharmacokinetic profile in vivo with substantially no burst of the insulin compound.
3. A pharmaceutical composition comprising an insulin compound in a concentration of at least 11
10 mg/mL to be administered in a single dose of at least 10 mg of the insulin compound.
4. The composition of any one of claims 1-3 wherein the concentration of the insulin compound is at least 11 mg/ml, such as from 11 mg/ml to 35mg/ml.
5. The composition of any one of claims 1-4 characterized by exhibiting a peak to trough ratio of less than 2, such as less than 1.75, less than 1.5, or less than 1.25.
- 15 6. The composition of any one of claims 1-5 characterized by a continuous release of a structurally intact insulin compound over the full time period between administrations.
7. The composition of claim 6 wherein the full time period between administrations is at least about 80 hours, such as at least about 110 hours, typically at least a week.
8. The composition of any one of claims 1-7 wherein the insulin compound is a prodrug.
- 20 9. The composition of any one of claims 1-8 wherein the insulin compound is fully contained in a depot, typically a polymer gel, such as a hydrogel, e.g. a well hydrated polymer matrix.
10. The composition of claim 9 wherein the insulin compound is covalently linked in the depot, typically the polymer gel, such as the hydrogel, e.g. the well hydrated polymer matrix.
11. The composition of any one of claims 1-10 characterized by being administered by injection,
25 such as subcutaneous or intramuscular.

12. The composition of any one of claims 1-11 wherein the insulin compound is selected from human insulin, insulin glargine, insulin detemir, insulin lispro, insulin aspart, insulin glulisine or a prodrug thereof.

13. The composition of any one of claims 1-12 wherein the peak concentration is reached within the first 24 hours of administration, such as within the first 12 hours of administration, e.g. within the first 6 hours of administration.

14. The composition of any one of claims 1-13 further comprising a GLP-1 compound.

15. Use of an insulin compound for preparing a pharmaceutical composition of any one of claims 1-14 for treatment or prevention of a disease or disorder associated with insulin deficiency in which treatment or prevention with an insulin compound is beneficial, such as hyperglycemia, pre-diabetes, impaired glucose tolerance, diabetes type I, diabetes type II, syndrome X.

16. A pharmaceutical composition according to any of claims 1-14, wherein the pharmaceutical composition is dry.

17. A pharmaceutical composition according to claim 16, wherein the pharmaceutical composition is dried by lyophilization.

18. A composition according to claim 16 or 17, 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.

19. A composition according to any of claims 1-14, 16-18, wherein it is a single dose composition.

20. A composition according to any of claims 1-14, 16-18, wherein it is a multiple dose composition.

21. A composition according to any of claims 1-14, 16-20, characterized in that it contains one or more additional biologically active agents, either in its free form; as a prodrug, especially a hydrogel prodrug; 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 (DPP-IV); 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 etiocholanolone; testosterone; anabolic steroids such as oxandrolone, and steroidal hormones; galanin receptor antagonists; cytokine agents such as ciliary neurotrophic factor; amylase inhibitors.

22. A container comprising the pharmaceutical composition according to any of claims 1-14, 16-21.

23. A container according to claim 22, wherein the container is a dual-chamber syringe.

24. A suspension comprising the pharmaceutical composition according to any of claims 1-14, 18-21.

25. A method of preparing a suspension according to claim 24, comprising the steps of reconstituting the dry pharmaceutical composition according to claims 16 or 17 by adding reconstitution solution.

26. A kit of parts comprising a pharmaceutical composition of any one of claims 1-14, 16-21 and a container for administration of the composition.

27. A kit of parts, comprising a needle and a container containing reconstitution solution, and the dry composition according to claim 16 or 17 for use with the needle.

28. A kit of parts according to claim 27, wherein the container is a dual-chamber syringe and wherein one of the two-chambers of the dual-chamber syringe contains the reconstitution solution.

29. A kit of parts according to any of claims 26 to 28, where the composition is injectable through a needle.

30. A kit of parts of claim 29, wherein the needle has an inner diameter of less than 300 μm .

31. A kit of parts of claim 29, wherein the needle has an inner diameter of less than 225 μm .

32. A kit of parts of claim 29, wherein the needle has an inner diameter of less than 175 μm .

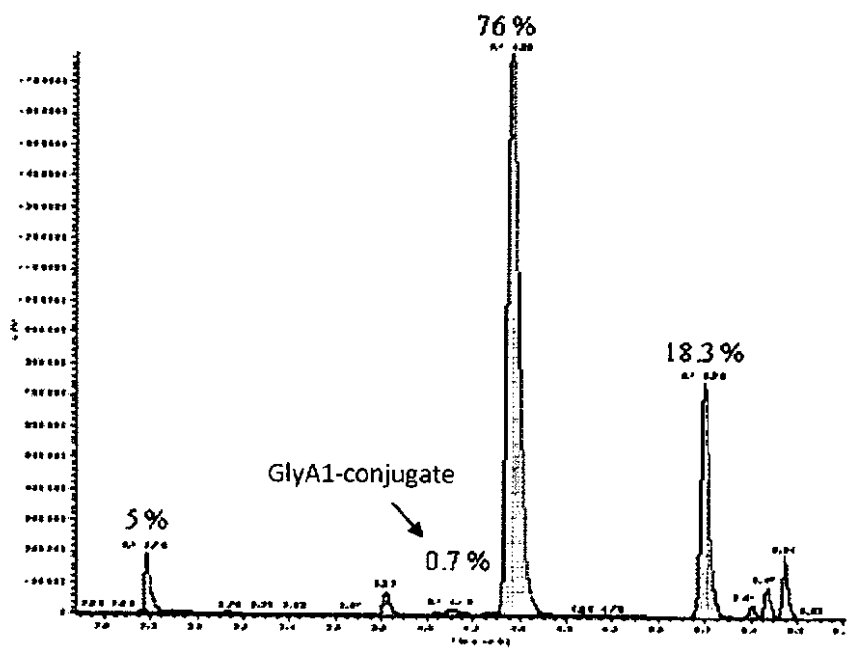


Fig. 1a

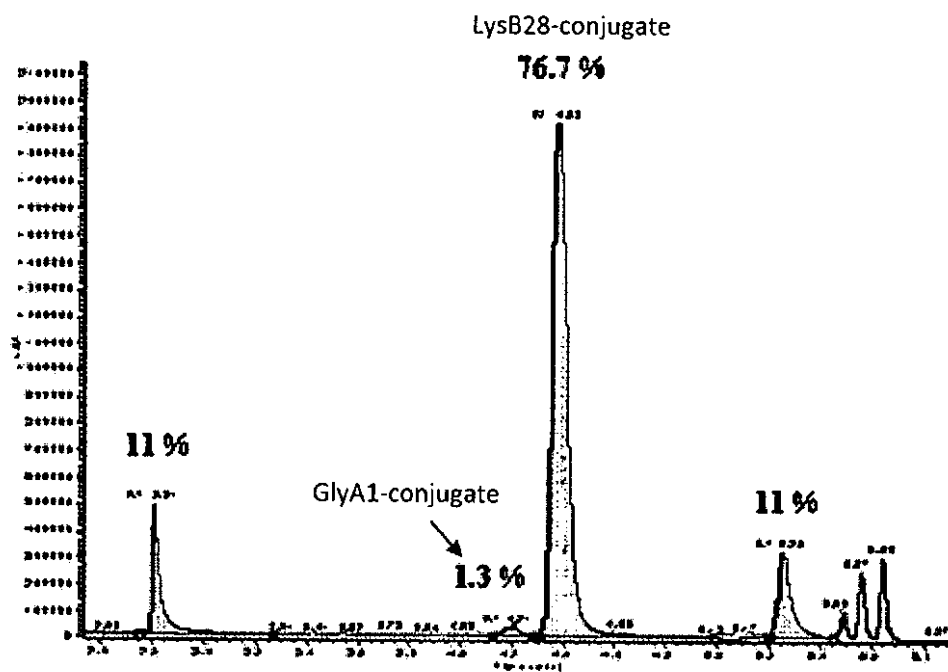


Fig. 1b

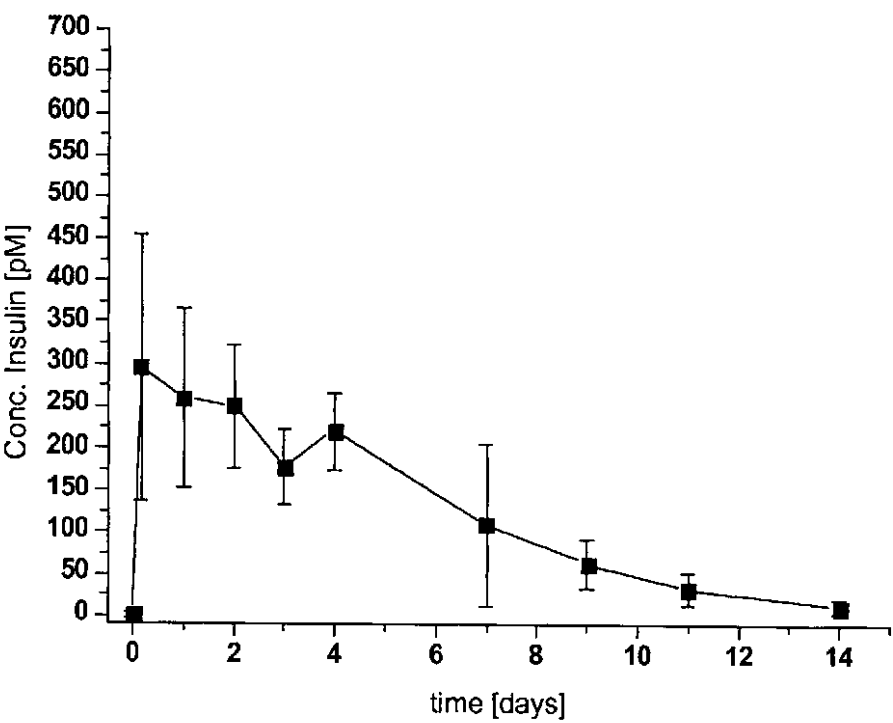


Fig. 2

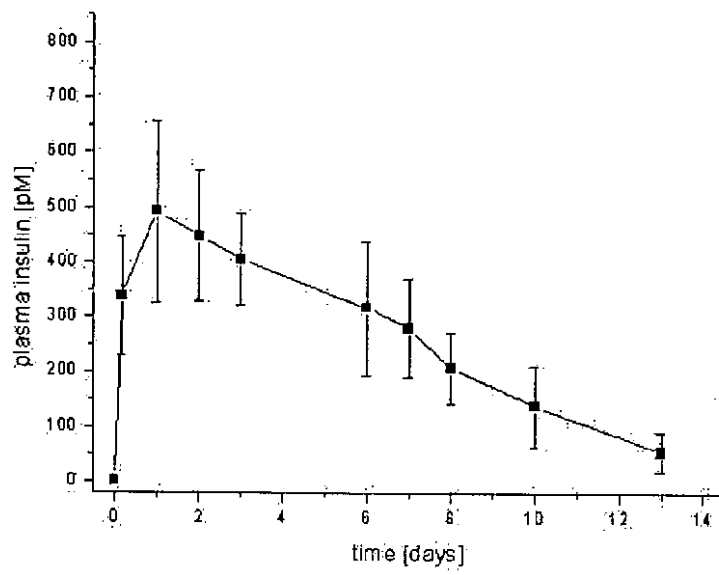


Fig. 3

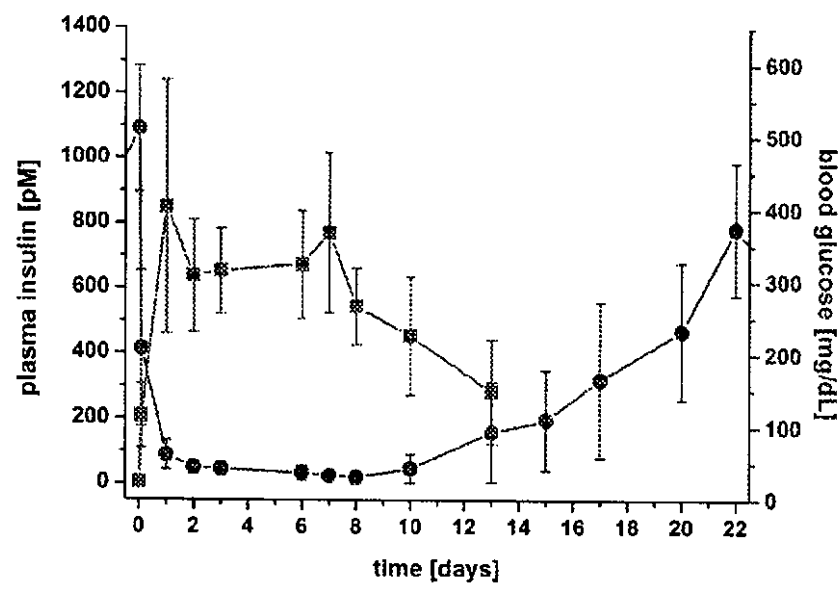


Fig. 4

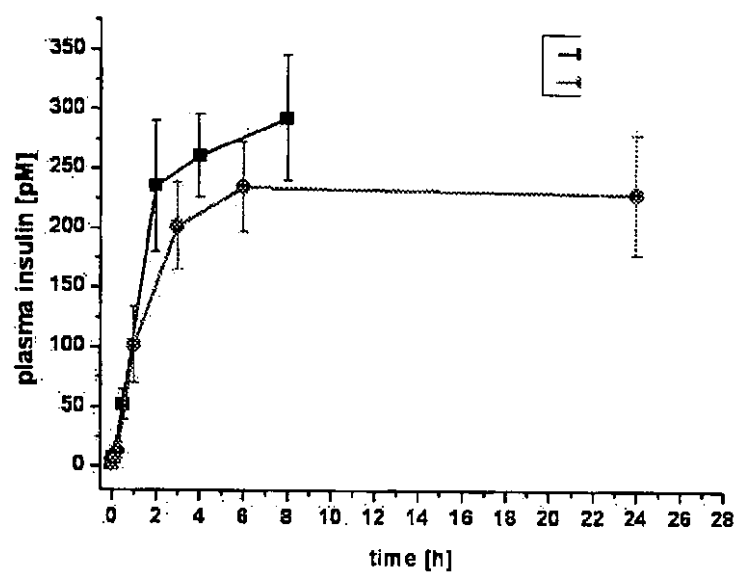


Fig. 5

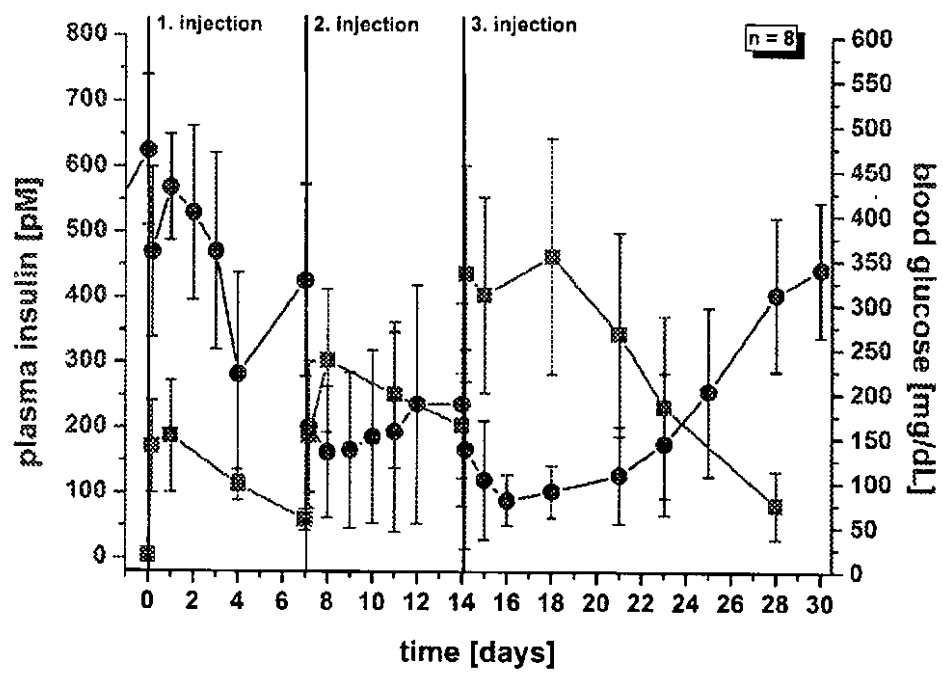


Fig. 6

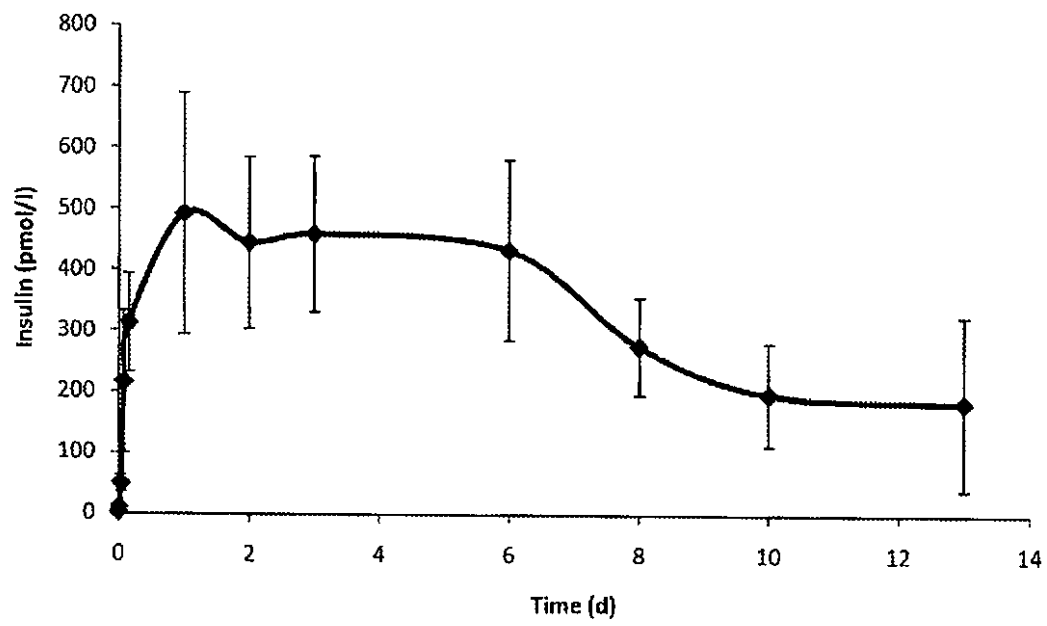


Fig.7

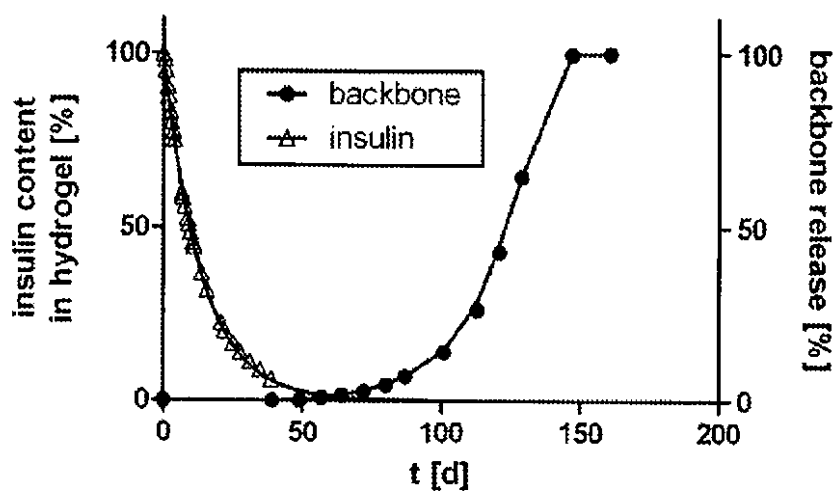


Fig. 8

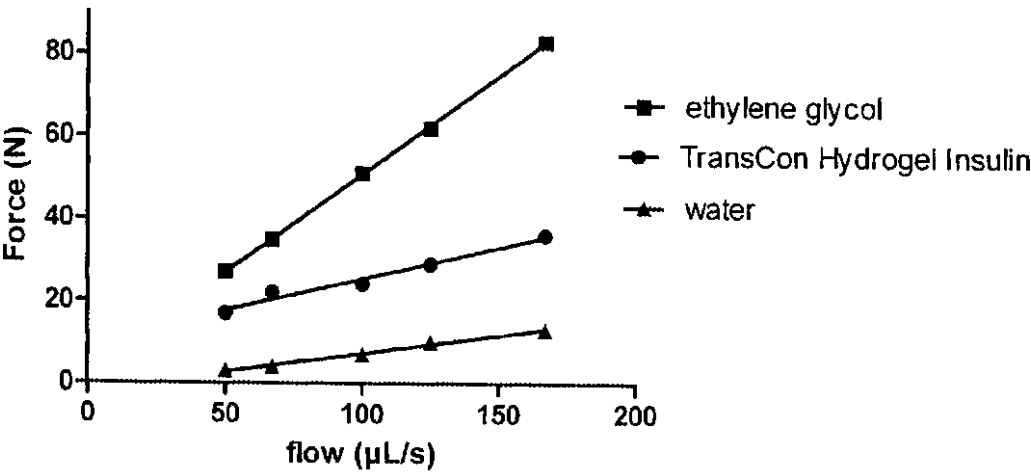


Fig. 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/EP2010/061160

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

 INV. A61K9/06 A61K47/48 A61K9/00
 ADD.

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

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, WPI Data, BIOSIS, FSTA, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/010428 A1 (NOVO NORDISK AS [DK]; MADSEN PETER [DK]; HOEG-JENSEN THOMAS [DK]; KJEL) 22 January 2009 (2009-01-22)	1,5-13, 15-22, 24,26, 29-32 1-32
Y	page 33, line 16 - line 20 page 33, line 32 - line 34 page 34, line 10 - line 16 claims 1-14 figures 1,2	
X	WO 2006/136586 A2 (COMPLEX BIOSYSTEMS GMBH [DE]; VETTER DIRK [DE]; RAU HARALD [DE]; WEGGE) 28 December 2006 (2006-12-28)	1,5-13, 15-22, 24-26, 29-32 1-32
Y	page 1, line 16 - page 2, line 17 page 12, line 8 page 34, line 16 - page 35, line 16 claims 1-28	

☒ 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

9 November 2010

Date of mailing of the international search report

16/11/2010

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

Schüle, Stefanie

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/061160

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97/04796 A1 (PROTEIN DELIVERY INC [US]) 13 February 1997 (1997-02-13)	1,5-13, 15-22, 24,26, 29-32
Y	claims 1-36 example I	1-32
X	WO 02/094200 A2 (INHALE THERAPEUTIC SYST [US]; SHEARWATER CORP [US]; PATTON JOHN S [US]) 28 November 2002 (2002-11-28) claims 1-37 examples table 15	1-13,15, 16
X	HUYNH D P ET AL: "Controlled release of insulin from pH/temperature-sensitive injectable pentablock copolymer hydrogel", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 137, no. 1, 1 July 2009 (2009-07-01), pages 20-24, XP026161193, ISSN: 0168-3659 [retrieved on 2009-03-12]	1,5-13, 15-22, 24,26, 29-32
Y	the whole document	1-32
Y	WO 2008/148839 A2 (ASCENDIS PHARMA AS [DK]; RAU HARALD [DK]) 11 December 2008 (2008-12-11) page 25, line 30 - page 27, line 28 claims 1-23	1-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2010/061160

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009010428 A1	22-01-2009	CN 101743252 A EP 2170945 A1 US 2010216691 A1	16-06-2010 07-04-2010 26-08-2010
WO 2006136586 A2	28-12-2006	AU 2006260914 A1 CA 2613208 A1 CN 101242859 A EP 1909845 A2 GB 2427360 A JP 2008543916 T	28-12-2006 28-12-2006 13-08-2008 16-04-2008 27-12-2006 04-12-2008
WO 9704796 A1	13-02-1997	AU 698944 B2 AU 6640996 A CA 2227891 A1 CN 1192690 A EP 0841936 A1 JP 11511131 T	12-11-1998 26-02-1997 13-02-1997 09-09-1998 20-05-1998 28-09-1999
WO 02094200 A2	28-11-2002	AP 1763 A AR 033903 A1 BG 108494 A BR 0209896 A CA 2447236 A1 CN 1582171 A CN 101045166 A CO 5540371 A1 CZ 20033182 A3 EC SP034855 A EP 1395294 A2 HR 20030949 A2 HU 0400442 A2 IL 158862 A IS 7043 A JP 2004535401 T LT 2003107 A LV 13197 B MA 26185 A1 MX PA03010649 A NZ 529572 A PL 366911 A1 SK 15532003 A3 TR 200400295 T2 YU 98503 A ZA 200309085 A	31-08-2007 07-01-2004 30-07-2004 17-08-2004 28-11-2002 16-02-2005 03-10-2007 29-07-2005 15-09-2004 23-03-2004 10-03-2004 30-04-2005 29-03-2005 08-07-2008 19-11-2003 25-11-2004 25-05-2004 20-10-2004 01-07-2004 05-10-2005 24-02-2006 07-02-2005 08-06-2004 21-04-2005 25-05-2006 22-11-2004
WO 2008148839 A2	11-12-2008	AU 2008258548 A1	11-12-2008
WO 2008148839 A2		CA 2689909 A1 EP 2164519 A2	11-12-2008 24-03-2010

Composición de insulina de acción prolongada

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de insulina, al uso de la composición, a un método de tratamiento, a un kit de partes, como también al tratamiento de combinación con un compuesto GLP-1, tal como un agonista de GLP-1. La composición farmacéutica se puede administrar menos frecuentemente que las insulinas de acción prolongada actuales y se caracteriza por la liberación de insulina estructuralmente intacta durante todo el periodo de tiempo entre las administraciones prácticamente sin absorción rápida del compuesto de insulina. Este tratamiento puede ayudar a los pacientes a reducir la frecuencia de las inyecciones, mientras que se puede mantener el control óptimo de los niveles plasmáticos de insulina y por consiguiente de la glucosa en la sangre.

Antecedentes

La terapia de insulina se caracteriza por una gran necesidad de mantener la liberación del fármaco de insulina dentro de niveles muy estrictos, ya que la ventana terapéutica es estrecha, y los efectos adversos de la hiperinsulinemia pueden ser potencialmente mortales. Se han comercializado numerosas preparaciones de insulina, con diferentes perfiles de acción para satisfacer 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 plasmática que sigue a 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 basal estable.

Los últimos desarrollos también han incluido insulina oral e insulina inhalada. No obstante, debido a que la insulina es una proteína, cuando se toma oralmente es digerida fácilmente por el estómago y el sistema gastrointestinal. Alternativamente, la insulina inhalable suministrada a través de un inhalador a los pulmones se comercializó durante un periodo de tiempo limitado (Exubera®, Pfizer, se discontinuó en 2007). Esta formulación proporcionaba insulina por un periodo de horas, requiriendo incluso que los pacientes continuaran inyectándose una insulina basal de acción prolongada. Otras desventajas de la insulina inhalable incluían las dificultades de fabricación que resultaban en un sistema de administración prohibitivo desde el punto de vista del coste. Como consecuencia, todas las formulaciones de

insulina comercialmente disponibles deben administrarse o bien por inyección subcutánea o intravenosa.

El perfil en plasma de las diversas insulinas disponibles se caracteriza por tener diferentes perfiles en plasma. Dichos perfiles en plasma se pueden describir por tener una concentración plasmática máxima y una mínima que depende de la formulación y el tipo de insulina utilizada.

Es de gran importancia obtener un perfil en plasma que sea tan reproducible de un paciente a otro y dentro de pacientes con el fin de poder predecir el efecto de reducción de la glucosa plasmática de la administración de insulina. Además, en el caso de múltiples administraciones de insulina basal, es conveniente tener la menor diferencia posible entre la concentración plasmática máxima y la concentración plasmática mínima. Esto llevará a una concentración de insulina plasmática más constante, y por lo tanto a un efecto de reducción de la glucosa más uniforme durante todo el intervalo de dosificación.

La terapia de insulina basal convencional, actual consiste en administraciones una o dos veces al día de insulinas basales de acción prolongada tales como insulina NPH, insulina glargina o insulina detemir. A través del desarrollo de análogos de insulina más nuevos se ha intentado reducir la variabilidad de los efectos insulíntricos, el efecto de reducción de glucosa de estas formulaciones de acción prolongada todavía se caracteriza por grandes variaciones entre e intra-sujetos, como lo describen Heise et al. (Diabetes, 2004 (53), 1614-1620). En este estudio, la insulina detemir exhibió la menor variación de farmacocinética, con un coeficiente de variación de 15 según lo comparado con CV de insulina NPH e insulina glargina de 26 y 34, respectivamente. Esta variabilidad bastante grande es un obstáculo importante para obtener un control de la glucosa óptimo, ya que es difícil predecir la exposición a las moléculas de insulina.

El mismo estudio investigó la variación farmacodinámica según lo evaluado por índices de infusión de glucosa (GIR). Esta evaluación también demostró que la insulina detemir tenía una variabilidad dentro del sujeto inferior que la insulina NPH y la insulina glargina con respecto al marcador de farmacodinámica GIR. Además, este estudio demostró que el efecto de la insulina sobre los índices de infusión de glucosa no duró todo el periodo de dosificación de 24 horas, demostrando claramente la necesidad de una insulina de acción prolongada, que ofrezca una acción total de reducción de la glucosa durante toda la duración entre las dosis. Para superar el problema de las insulinas basales diarias, actuales de que no duran 24 horas

completas, algunos pacientes dividen sus dosis de insulina basales en dos inyecciones diarias, con el fin de obtener un mejor control de la glucosa durante todo el día.

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

Además, incluso si los pacientes pueden manejar su glucosa en sangre con inyecciones diarias de insulina basal, el inicio de la terapia de insulina ofrece resistencia debido al régimen de inyecciones diarias. Esto resulta inconveniente, ya que la Asociación Estadounidense de Diabetes (American Diabetes Association o ADA) y la Asociación Europea para el Estudio de la Diabetes (European Association for the Study of Diabetes o EASD) reconocen la insulina como el tratamiento de primera línea después de la metformina oral, ya que ofrece el mejor resultado de tratamiento. (DM Nathan et al., Diabetológica (2008) 51:8-11).

Si fuese posible reducir la frecuencia de las inyecciones del tratamiento con insulina, probablemente la barrera fisiológica al inicio de la terapia con insulina se reduciría y en consecuencia haría posible que los pacientes comenzaran la terapia de insulina en una etapa anterior, mejorando en gran medida su estado de salud.

Un desafío en el desarrollo de formulaciones de insulina basales de acción prolongada reside en el estrecho intervalo terapéutico para la insulina, y deben evitarse grandes variaciones en la relación valle-pico en la farmacocinética de la insulina, como también los efectos de absorción rápida bajo cualquier circunstancia.

Se han propuesto varios planteamientos para reducir la frecuencia de administración y a la vez retener la liberación de insulina dentro de límites estrechos, pero han fracasado en extender la duración de los efectos de reducción de la glucosa más allá de un par de días, y todavía se caracterizan por tener una pequeña relación entre la concentración en plasma básica y la concentración en plasma mínima.

El documento WO 06003014 describe un hidrogel capaz de liberar insulina con la posibilidad de una frecuencia de dosis reducida según lo comparado con las inyecciones de insulina diarias basales. No obstante, la insulina se libera a un índice demasiado rápido para asegurar el control insulínico estricto por periodos que se extienden 2 días. De hecho, la insulina se libera 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 por debajo de 2 en estado estable.

El concepto de preparar un conjugado de polímero reversible de insulina ha sido explorado por Shechter et al. y descrito en artículos científicos y en solicitudes de patentes (p. ej., (European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2008(70), 19–28) y el documento WO 2004/089280). La insulina se conjuga a un polímero PEG de 40 kDa a través de una molécula espaciadora de 9-hidroximetil-7-(amino-3-maleimidopropionato)-fluoreno-N-hidroxisuccinimida. La hidrólisis de dicha molécula espaciadora 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 por 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 insulina una vez por semana, PEGilando primero permanentemente la molécula de insulina y luego microencapsulando la insulina PEGilada en micropartículas de PLGA. Se ha demostrado que la encapsulación 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 disoluciones tamponadas a pH neutro. (Nat. Biotechnol. 18 (2000) 52-57; Pharm. Res. 11 (1994) 865-868; Pharm. Res. 19 (2002) 175-181).

Se han demostrado específicamente para insulina, los efectos perjudiciales de las formulaciones poliméricas (Pharm. Dev. Technol. 4 (1999) 633-642; Pharm. Dev. Technol. 5 (2000) 1-9).

En el caso anteriormente mencionado, la insulina se ha sometido a modificación estructural sustancial a través de la modificación permanente por una entidad polimérica de alto peso molecular, ya que la PEGilación de insulina aparentemente sirve para proteger al péptido contra deterioro en la formulación polimérica PLGA.

Desafortunadamente, dichas insulinas modificadas de alto peso molecular pueden exhibir menor eficacia por disminución de unión al receptor, y pueden también exhibir reacciones en el sitio de inyección tales como lipodistrofia debida a la presencia extendida de altas concentraciones de la insulina de alto peso molecular en el tejido subcutáneo. Asimismo, dichas insulinas PEGiladas exhibirán un volumen de distribución inferior, que representa una desventaja particular en el tratamiento de la diabetes.

A su vez, el perfil de farmacocinética del conjugado de insulina liberado se caracteriza por una liberación inicial de tipo absorción rápida inmediatamente después de la administración, que es seguida por una caída en la concentración plasmática del conjugado de insulina, seguida por un incremento en la concentración plasmática del conjugado de insulina durante los días posteriores. Este perfil de farmacocinética es típico de formulaciones de fármacos microencapsulados y puede conducir a una respuesta de la glucosa impredecible en sujetos tratados con dicha formulación.

Por consiguiente, permanece el desafío de desarrollar insulina de acción prolongada sin comprometer los efectos de farmacodinámica de la insulina por unión permanente de una entidad de alto peso molecular.

La situación se complica incluso más por el hecho de que se sabe que la insulina se somete fácilmente a reacciones colaterales asociadas con la presencia de tres puentes disulfuro en la molécula. Por ejemplo, la insulina puede dividirse en cadenas A y B por escisión de enlace disulfuro, o pueden formarse dímeros u oligómeros debido a las reacciones de intercambio de disulfuro. Dicho reordenamiento del disulfuro es particularmente probable si las moléculas de insulina son forzadas al contacto estrecho en un modo aleatorio ("Stability of insulin: studies on the physical and chemical stability of insulin in pharmaceutical formulation", Jens Brange, Springer, 1994). Esta labilidad intrínseca de la molécula de insulina ha obstaculizado en gran medida el avance en el desarrollo de medicamentos de liberación lenta y previno el uso de otras formulaciones poliméricas en las que la insulina se encapsula en un modo similar a un precipitado amorfo que se conoce que da origen a diversos productos de degradación a partir del amplio intercambio de disulfuro.

El índice de reacciones colaterales es también influenciado por la concentración de insulina, donde el índice es mayor cuando la insulina está presente en alta concentración. Es por lo tanto un desafío formular formulaciones de acción prolongada y alta concentración, en las que la insulina no se someta a reacciones colaterales indeseadas.

Por ende, existe una clara necesidad de nuevas preparaciones de insulina de acción prolongada que liberen continuamente insulina estructuralmente intacta durante todo el periodo entre las administraciones, que al mismo tiempo retenga una pequeña relación entre la concentración plasmática de insulina más alta y la más baja con el fin de evitar concentraciones de insulina demasiado bajas o demasiado altas, que podrían ser perjudiciales para el paciente.

El requerimiento de insulina para diabéticos es altamente individual, donde la dosis depende de diversos factores fisiológicos, incluyendo la función de las células beta pancreáticas, la sensibilidad a la insulina, el peso corporal y la ingesta dietaria. No es infrecuente que los pacientes requieran 40 IU de insulina o más por día.

5 Esto equivale a 280 IU/semana, lo que corresponde a 12,6 mg de insulina humana por semana. Con el fin de minimizar el malestar para el paciente, esto debería formularse en un volumen pequeño, por ejemplo un mililitro. Es por lo tanto un objeto de la presente invención proveer una formulación de insulina en la que la concentración de insulina sea por lo menos 10 mg/mL, y que a la vez libere insulina estructuralmente
10 intacta y que exhiba un perfil de farmacocinética prácticamente sin absorción rápida.

Asimismo, como consecuencia, es un objeto de la presente invención que una sola dosis de la insulina de acción prolongada se pueda administrar como una sola inyección de la formulación, que contenga por lo menos 10 mg del compuesto de insulina.

15 El documento US2007/0207210 A1 describe un método para preparar micropartículas amorfas de proteínas de alto peso molecular, y en particular anticuerpos. La insulina se menciona en un ejemplo como formulada en hasta 400 mg/ml según la descripción. No obstante, el objeto de la invención es proveer una formulación con un perfil de farmacocinética similar a la proteína nativa, en
20 consecuencia no proveer una liberación sostenida. El documento US2007/0207210 A1 no ofrece por lo tanto una disolución para reducir la frecuencia de administración de insulina.

Definiciones

Algunas definiciones relevantes para entender la presente invención se
25 explican a continuación.

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "prácticamente sin absorción rápida" o "sustancialmente sin absorción rápida" (ambas expresiones se utilizan de manera intercambiable en la presente descripción) significa que tras la administración de un compuesto de insulina, que puede ser un profármaco o un
30 compuesto de insulina activa, la relación de la concentración pico de un compuesto de insulina detectable en plasma sanguíneo durante las primeras 48 horas después de la administración, tal como subcutánea o intramuscular, a la concentración más baja de un compuesto de insulina detectable en plasma sanguíneo después de la concentración pico durante las primeras 48 horas después de la administración es

inferior a 2 (sustancialmente sin absorción rápida detectable), preferiblemente menos de 1,5 (sin absorción rápida detectable).

Tal como se emplea en esta memoria, la expresión "absorción rápida" significa que tras la administración de un compuesto de insulina, que puede ser un profármaco o un compuesto de insulina activa, la relación de la concentración pico de un compuesto de insulina detectable en plasma sanguíneo durante las primeras 48 horas después de la administración, tal como subcutánea o intramuscular, a la concentración más baja de un compuesto de insulina detectable en plasma sanguíneo después de la concentración pico durante las primeras 48 horas después de la administración es 2 o más.

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

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "un compuesto GLP-1" significa cualquier compuesto de GLP-1, tal como GLP-1(7-37), GLP-1(7-36)NH₂, un análogo de GLP-1, incl. un agonista de GLP-1. Los ejemplos de agonistas de GLP-1a como se usa en la presente memoria, son los agonistas de GLP-1, exendina-3 o exendina-4 que incluyen pero sin limitar:

- (i) análogos de exendina-4 y análogos de exendina-4 amidada, en cuyas secuencias uno o más restos de aminoácidos se han sustituido por diferentes restos de aminoácidos, incluyendo modificaciones N-terminales;
- (ii) formas de exendina-4 truncadas y formas truncadas que están amidadas,
- (iii) exendina-4 truncado y formas truncadas que están amidadas, en cuyas secuencias uno o más restos de aminoácidos se han sustituido por diferentes restos de aminoácidos,
- (iv) GLP-1 y GLP-1 amidado,
- (v) análogos de GLP-1 y análogos de GLP-1 amidados, en cuyas secuencias uno o más restos de aminoácidos se han sustituido por diferentes restos de aminoácidos, incluyendo modificaciones N-terminales,
- (vi) formas de GLP-1 truncadas y formas truncadas que están amidadas,

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

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

Los agonistas de GLP-1 imitan las actividades de GLP-1 nativo mediante la unión al o a los receptores en los que el GLP-1 ejerce sus acciones que son beneficiosas como insulínótropicos en el tratamiento de la diabetes mellitus, o
10 mediante la imitación de los efectos de la exendina en el flujo de orina, ralentizando el vaciado gástrico, induciendo saciedad, aumentando la excreción urinaria de sodio y/o disminuyendo la concentración urinaria de potasio, mediante la unión al o a los receptores en los que la exendina causa estos efectos.

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "relación valle-
15 pico" significa la relación entre la concentración en plasma más alta y la concentración en plasma más baja de un compuesto de insulina, tal como insulina humana, dentro de un periodo determinado entre las administraciones.

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "compuesto de insulina estructuralmente intacto" se refiere a insulina intacta que consiste en dos
20 péptidos llamados cadena A y cadena B, conectados por dos puentes disulfuro. Además, la cadena A contiene un puente disulfuro intramolecular. La pérdida de puentes disulfuro intra- o intermoleculares, o las disposiciones de dos cadenas, como homodímeros A-A o B-B causan la activación de la insulina. La integridad estructural se mide digiriendo la insulina con una endoproteasa adecuada, como por
25 ejemplo endo-gluC, y analizando los fragmentos resultantes por espectrometría de masas. La ausencia de señales provenientes de cadenas individuales de insulina indica insulina intacta. Tal como se emplea en la presente memoria, el término "profármaco" significa un compuesto de insulina que se somete a biotransformación antes de exhibir sus efectos farmacológicos. Los profármacos pueden visualizarse
30 como restos biológicamente activos que contienen grupos protectores no tóxicos especializados utilizados en un modo transitorio para alterar o eliminar propiedades no deseadas en la molécula madre. Por ejemplo, el profármaco puede ser una amida biohidrolizable y un éster biohidrolizable y también abarca a) compuestos en los que la funcionalidad biohidrolizable en dicho profármaco es abarcada en el compuesto, y b)
35 compuestos que pueden oxidarse o reducirse biológicamente en un grupo funcional

determinado. Los profármacos típicos pueden ser un profármaco unido a un vehículo que contiene un enlace temporario de una sustancia activa determinada con un grupo portador transitorio que produce propiedades físico-químicas o farmacocinéticas y puede eliminarse fácilmente *in vivo*, usualmente por una escisión hidrolítica; un
5 profármaco en cascada para el cual la escisión del grupo portador se torna eficaz solamente después de desenmascarar un grupo de activación.

Para potenciar las propiedades físico-químicas 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
10 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
15 físico-químicas 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
20 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. "Profármaco de insulina-hidrogel" se refiere a un profármaco, en el que la insulina se une transitoriamente a un vehículo de hidrogel. Las expresiones "profármaco de hidrogel" y
25 "profármaco ligado a hidrogel" se refieren a profármacos de agentes biológicamente activos, unidos transitoriamente a un hidrogel, y se usan como sinónimas.

Las expresiones "fármaco", "molécula biológicamente activa", "resto biológicamente activo", "agente biológicamente activo", "agente activo" y similares significan cualquier sustancia que puede afectar cualquier propiedad físico-química de
30 un organismo biológico, incluyendo, aunque sin limitarse a ello, virus, bacterias, hongos, plantas, animales y seres humanos. En particular, tal como se emplea en la presente memoria, moléculas biológicamente activas incluye cualquier sustancia que tenga como fin el diagnóstico, la cura, alivio, tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos u otros animales, o que de alguna otra manera
35 potencie el bienestar físico o mental de seres humanos o animales.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de insulina como se usa en la presente memoria significa una cantidad suficiente para curar, aliviar o detener parcialmente las manifestaciones 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 considerada estable, la composición contiene menos de 5% del fármaco en su forma libre.

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "éster biohidrolizable" es un éster de un compuesto que o bien a) no interfiere con la actividad biológica de la sustancia madre pero confiere a esa sustancia propiedades ventajosas *in vivo* tales como duración de la acción, inicio de la acción y similares, o b) es biológicamente inactiva pero es convertida *in vivo* por el sujeto al principio biológicamente activo.

Tal como se emplea en la presente memoria, el término "amida" es una amida de un compuesto que o bien a) no interfiere con la actividad biológica de la sustancia madre pero confiere a esa sustancia propiedades ventajosas *in vivo* tales como duración de la acción, inicio de la acción y similares, o b) es biológicamente inactiva pero es convertida *in vivo* por el sujeto al principio biológicamente activo.

Tal como se emplea en la presente memoria, el término "hidrogel" significa una red polimérica hidrófila o anfifílica tridimensional, 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 una tamaño entre 1 nm y 1000 nm.

El término "gel" se refiere a una disolución polimérica de tipo jalea no reticulada.

Tal como se emplea en la presente memoria, "un medicamento de absorción lenta" significa un sistema de administración de fármacos, típicamente inyectado como
5 inyección subcutánea o intramuscular, de un compuesto de insulina, capaz de liberar consistentemente el compuesto activo durante un periodo de tiempo extenso.

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "una concentración pico" significa la concentración más alta obtenida después de la administración de un compuesto de insulina.

10 Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "un compuesto de insulina" significa cualquier insulina de origen mamífero, como insulina humana, insulina porcina o insulina bovina con puentes disulfuro entre CysA7 y CysB7 y entre CysA20 y CysB19 y un puente disulfuro interno entre CysA6 y CysA11, insulina
15 mamífera recombinante, como insulina humana recombinante, análogos de insulina, derivados de insulina y sus fragmentos, los ejemplos típicos son insulina rh, insulina glargina, insulina detemir, insulina glulisina, insulina asparto, insulina lispro, insulina conjugada a PEG de bajo peso molecular, donde PEG de bajo peso molecular tiene un peso molecular menor que 10 kDa. El compuesto de insulina puede ser en la forma de un profármaco, en cuyo caso el compuesto que se ha de liberar en el plasma es la
20 insulina activa que se forma después de la administración del profármaco.

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
25 ocurre en la insulina natural y/o añadiendo por lo menos un residuo de aminoácido. Los residuos de aminoácidos añadidos y/o intercambiados pueden ser o bien residuos de aminoácidos codificables u otros residuos naturales o residuos de aminoácidos puramente sintéticos.

Los análogos de insulina pueden ser aquellos en los que la posición 28
30 de la cadena B puede modificarse a partir del residuo Pro natural a un 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
35 son insulina des(B30) humana; análogos de insulina humana des(B30); análogos de

insulina en los que se ha eliminado PheB1; análogos de insulina en los que la cadena A y/o la cadena B tienen 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 ó 2 Arg en la posición B1.

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

- 10 Por "B1 ", "A1" etc. se entiende el residuo de aminoácidos en la posición 1 en la cadena B de insulina (contado a partir del 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.

- 15 Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "conector no activo" significa un conector que no presenta efectos farmacológicos del fármaco derivado del agente biológicamente activo.

- 20 Tal como se emplea en la presente memoria, el término "Alquilo" significa una cadena de carbono lineal o ramificada. Cada hidrógeno de un carbono alquílico se puede sustituir por un sustituyente.

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

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

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

5 Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "alquenilo C₂₋₅₀" 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=CH₂, -CH=CH-CH₃, -CH₂-CH=CH₂, -CH=CH-CH₂-CH₃, -CH=CH-CH=CH₂, o p. ej. -CH=CH-, cuando dos restos de una molécula está unidas por el grupo alquenilo. Cada hidrógeno de un
10 carbono del alquenilo C₂₋₅₀ 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.

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "alquinilo C₂₋₅₀"
15 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≡CH, -CH₂-C≡CH, CH₂-CH₂-C≡CH, CH₂-C≡C-CH₃, o p. ej. -C≡C- cuando dos restos de una molécula están unidos por el grupo alquinilo. Cada hidrógeno de un carbono del alquinilo C₂₋₅₀ se puede sustituir por un sustituyente como se especifica con más detalle. Por
20 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.

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "cicloalquilo C₃₋₇" o "anillo de cicloalquilo C₃₋₇" significa una cadena de alquilo cíclica que tiene de 3
25 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 C₃₋₇" o "anillo de cicloalquilo C₃₋₇" también incluye biciclos con puente tales como norbornano o norborneno. Por
30 consiguiente, "cicloalquilo C₃₋₅" significa un cicloalquilo que tiene de 3 a 5 átomos de carbono.

Por consiguiente, "cicloalquilo C₃₋₁₀" significa un alquilo cíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono, p. ej. cicloalquilo C₃₋₇; ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclonoilo, ciclodecilo. El

término "cicloalquilo C₃₋₁₀" también incluye monociclos y biciclos de carbono al menos parcialmente saturados.

Tal como se usa en esta memoria, el término "halógeno" significa cloro, flúor, bromo o yodo. En general se prefiere que el halógeno sea flúor o cloro.

- 5 Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "heterociclilo de 4 a 7 miembros" o "heterociclo de 4 a 7 miembros" significa un anillo con 4, 5, 6 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
- 10 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,
- 15 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 o
- 20 homopiperazina.

- Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "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
- 25 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
- 30 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,
- 35 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.

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

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "composición farmacéutica" o "composición" significa uno o más ingredientes activos, y uno o más ingredientes inertes, así como cualquier producto que 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).

"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.

"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 un compuesto.

"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.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto de insulina como se usa en la presente memoria significa una cantidad suficiente para curar, aliviar o detener parcialmente las manifestaciones clínicas de una enfermedad dada y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "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 o el veterinario experto en la materia.

"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 y acetato, piruvato sódicos, 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.

"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 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 posterior almacenamiento. Los lioprotectores de ejemplo incluyen azúcares, tales como sacarosa o trealosa; aminoácidos tales como glutamato monosódico 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; 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 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 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.

"Farmacéuticamente aceptable" abarca cualquier excipiente y/o aditivo, que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no es tóxico para el hospedante al cual se administra.

El término "reactivo" se refiere 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, vinyl-sulfona, vinylcetona, 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 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.

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 del reactivo de reticulación y el reactivo de la cadena principal.

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, aconítiles, acetales, 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. 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, tampón acuoso, con propósitos prácticos.

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 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 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 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 C_{2-50} , cuyo fragmento está opcionalmente interrumpido por uno o más grupos seleccionados de -NH-, -N(alquilo C_{1-4})-, -O-, -S-, -C(O)-, -C(O)NH-, -C(O)N(alquilo C_{1-4})-, -O-C(O)-, -S(O)-, -S(O)₂-, heterociclilo de 4 a 7 miembros, fenilo o naftilo.

5 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 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.

10 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 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
15 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 poliméricos, se refieren a entidades macromoleculares que se sabe que presentan variabilidades con respecto al peso molecular, longitudes de cadena o grado de
20 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, 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
25 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 en PEG" se refiere a una cadena molecular oligo o polimérica.

Preferiblemente, dicha cadena polimérica basada en polietilenglicol está
30 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 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 que comprende al menos 20% en peso de restos de etilenglicol.

5 Tal como se emplea en la presente memoria, se interpretará que los términos "un", "una", y "el/la" y referentes similares cubren tanto el singular como el plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Descripción

10 La presente invención se refiere a una preparación de insulina de acción prolongada para cobertura de insulina basal. Las insulinas basales son formulaciones de insulina o análogos de insulina de acción prolongada diseñadas para imitar la acción de la insulina basal en las células beta pancreáticas. De manera óptima, la glucosa sanguínea se controla aquí eficazmente en un modo sostenido durante todo el intervalo de administración.

15 Los presentes inventores descubrieron que un compuesto de insulina puede liberarse desde un medicamento de liberación lenta inyectable, tal como una forma estructuralmente intacta entre las administraciones sin ver ningún efecto de absorción rápida. La integridad estructural del compuesto de insulina liberado se provee con una matriz polimérica bien hidratada que minimiza el contacto intermolecular de las moléculas de insulina. A su vez, evitando la absorción rápida de insulina, se reduce el riesgo de efectos secundarios perjudiciales en un paciente.

20 La presente invención reduce el riesgo de hipoglucemia tras la administración, ya que carece de liberación de insulina de absorción rápida, reduce el riesgo de hiperglucemia al final del periodo de dosificación, reduce la frecuencia de las inyecciones y provee niveles de insulina en plasma sanguíneo que son predecibles en un paciente.

25 Es otro objeto de la presente invención proveer una nueva insulina basal que requiera inyecciones menos frecuentes que los regímenes de insulina basales actuales y que proporcione un alto nivel de seguridad, liberando insulina estructuralmente intacta durante todo el intervalo de tiempo entre las inyecciones y típicamente con una relación valle-pico inferior a 2.

30 Otras ventajas serán obvias al leer la presente descripción.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de insulina en una concentración que es suficiente para mantener un nivel terapéuticamente eficaz del compuesto de insulina en el plasma sanguíneo durante por lo menos 3 días, típicamente por lo menos 80

horas, p. ej., una semana o más, caracterizada por tener un perfil de farmacocinética *in vivo* prácticamente sin absorción rápida del compuesto de insulina.

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

Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de insulina de una
10 concentración de por lo menos 10 mg/ml, caracterizada por tener un perfil de farmacocinética *in vivo* que prácticamente no exhibe absorción rápida del compuesto de insulina.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de insulina de una concentración de por lo menos 11 mg/ml
15 que se han de administrar en una sola dosis de por lo menos 10 mg del compuesto de insulina.

Tal como se emplea en la presente memoria, una dosis del compuesto de insulina única se administra en mg, y una concentración de un compuesto de insulina en una composición farmacéutica se administra en mg/mL. Si el compuesto de
20 insulina es un profármaco, la concentración se basa en la liberación cuantitativa de insulina libre desde el profármaco. Por métodos conocidos en la técnica, alícuotas de la composición se someten a condiciones de liberación de insulina (tampón acuoso, pH 7,4, 37°C, o condiciones aceleradas a pH elevado), hasta que no se observa ningún incremento significativo en insulina, y se determina la cantidad total de insulina
25 liberada. Se ha de entender que en el caso de vehículos solubles, la liberación cuantitativa es sinónimo de hidrólisis cuantitativa.

En una realización de la presente invención, la concentración del compuesto de insulina es de por lo menos 11 mg/ml, como entre 11 mg/ml y 35 mg/ml, más preferiblemente entre 15 mg/ml y 25 mg/ml, incluso más preferiblemente
30 alrededor de 20 mg/ml e incluso más preferiblemente alrededor de 24 mg/ml.

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

En otra realización, la dosis única del compuesto de insulina es de por lo menos 5 mg, tal como entre 5 mg y 100 mg, más preferiblemente entre 5 mg y 50 mg y más preferiblemente entre 5 mg y 25 mg

En otra realización, la relación de la concentración pico del compuesto de insulina en el plasma sanguíneo durante las primeras 48 horas después de la administración, como inyección subcutánea o intramuscular, a la concentración más baja del compuesto de insulina en el plasma sanguíneo después de la concentración pico durante las primeras 48 horas después de la administración es menos que 2, típicamente menos de 1,5.

Debe observarse que las realizaciones anteriormente mencionadas, como también las realizaciones que se describirán a continuación, se refieren a cualquiera de los aspectos descritos en la presente memoria, como también a cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria, a menos que se especifique que una realización se refiere a uno o más aspectos determinados de la presente invención.

La composición farmacéutica es típicamente un sistema de administración controlada que comprende un compuesto de insulina y se caracteriza por administrar el compuesto de insulina al plasma sanguíneo de un mamífero prácticamente sin experimentar absorción rápida.

Incluso en otra realización, el perfil de farmacocinética se mide en el plasma sanguíneo de un mamífero, tal como el plasma sanguíneo humano. Las concentraciones de insulina en el plasma se pueden medir con kits ELISA comerciales, relacionando los resultados con una curva de calibración obtenida de un estándar de insulina. Para significación estadística, el experimento se lleva a cabo con un número adecuado de replicados biológicos y técnicos, y se calculan los valores de la mediana y la media para ajustar la variabilidad biológica y técnica.

En otra realización, la composición se caracteriza por exhibir una relación valle-pico inferior a 2, típicamente inferior a 1,75, preferiblemente inferior a 1,5, o incluso a 1,25.

Incluso en otra realización, la composición se caracteriza por una liberación continua de un compuesto de insulina estructuralmente intacto durante todo el periodo de tiempo entre las administraciones.

"Liberación continua" se refiere a una liberación ininterrumpida de insulina.

En otra realización, el periodo de tiempo total entre las administraciones es por lo menos aproximadamente 80 horas, como aproximadamente 110 horas, típicamente por lo menos una semana, como 1-2 semanas o incluso más.

Incluso en otra realización, el compuesto de insulina es un profármaco.

- 5 Incluso en otra realización, el compuesto de insulina es un profármaco de tipo vehículo.

Incluso en otra realización, el compuesto de insulina es un profármaco en cascada.

- 10 El profármaco puede administrarse como un líquido, tal como una disolución o gel, o puede contenerse en un medicamento de liberación lenta, o incluso integrarse en un medicamento de liberación lenta, de modo que el medicamento funcione como un profármaco.

Incluso en otra realización, el compuesto de insulina es un compuesto que está totalmente contenido en un medicamento de liberación lenta.

- 15 La expresión "totalmente contenido" se refiere a un medicamento de absorción lenta, en el que menos de 10% del fármaco, es decir, insulina, está presente en la fracción de agua después de añadir 1 ml de agua a 1 ml de medicamento de absorción lenta, mezclar y separar el medicamento del agua.

Incluso en otra realización, el medicamento de absorción lenta es un gel polimérico, tal como un hidrogel.

- 20 Incluso en otra realización, el medicamento de absorción lenta es una matriz polimérica bien hidratada.

- El compuesto de insulina puede estar contenido en el medicamento de liberación lenta en varias formas, por ejemplo el compuesto de insulina puede unirse en un modo no covalente o el compuesto de insulina puede unirse covalentemente al medicamento de absorción lenta, donde el medicamento de absorción lenta se selecciona, sin limitación, a partir de un gel polimérico, un hidrogel o una matriz polimérica bien hidratada. Los ejemplos no limitativos para polímeros adecuados son polímeros capaces de formar redes moleculares tridimensionales bien y cuasi-infinitas. Dichos hidrogeles son polímeros química o físicamente reticulados, funcionalizados o no funcionalizados basados en polialquiloxi, como poli(propilenglicol) o poli(etilenglicol), dextrano, quitosano, ácido hialurónico y derivados, alginatoalginate, xylan, mannan, carragenina, agarosa, celulosa, almidón, almidón de hidroxietilo (HES) y otros polímeros basados en carbohidratos, alcoholes de poli(vinilo), poli(oxazolininas), poli(anhidruros), poli(orto ésteres), poli(carbonatos), poli(uretanos), poli(ácidos acrílicos), poli(acrilamidas) tales como poli(hidroxipropilmetacrilamida) (HMPA),
- 25
30
35

poli(acrilatos), poli(metacrilatos) como poli(hidroxietilmetacrilato), poli(organofosfazenos), poli(siloxanos), poli(vinilpirrolidona), poli(cianoacrilatos), poli(ésteres) tales como poli(ácido láctico) o poli(ácidos glicólicos), poli(iminocarbonatos), poli(aminoácidos) tales como poli(ácido glutámico) o polilisina, colágeno, gelatina, copolímeros, copolímeros injertados, polímeros reticulados, hidrogeles y copolímeros en bloque de los polímeros anteriormente mencionados. Estos polímeros pueden servir como restos de estructuras principales o restos de reticulación, y son posibles las combinaciones de distintos polímeros como copolímeros, siempre que se provea un alto nivel de hidratación de la red molecular. Además de los restos de reticulación oligoméricos o poliméricos de los tipos de polímeros anteriormente mencionados, se pueden usar restos de reticulación de bajo peso molecular, en especial cuando se usan restos de cadenas principales hidrófilas de alto peso molecular para la formación de vehículos de profármacos de hidrogel.

Una forma de minimizar el contacto inter-insulina en el nivel molecular es espaciando las moléculas de insulina en forma homogénea en la matriz polimérica bien hidratada. El espaciado homogéneo se puede lograr por unión covalente de la insulina al polímero, y usando conectores que se escinden en el entorno acuoso a pH neutro, se asegura la liberación lenta de la insulina estructuralmente intacta.

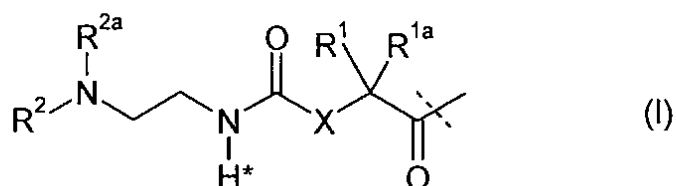
Se prefiere un profármaco de insulina conectado a polímero que esencialmente no tenga bioactividad, donde dicha propiedad causa que toda la actividad insulínica se atribuya a la insulina liberada. Por lo tanto, modificando las propiedades de liberación del fármaco, se puede lograr un alto nivel de control de los niveles en plasma de insulina.

La insulina se puede conectar a través de todas las funcionalidades relevantes provistas por la molécula, y dichas funcionalidades preferidas provistas por los aminoácidos biogénicos se seleccionan típicamente de guanidino, imidazol, indol, carboxi, carboxamida, hidroxilo primario y secundario, fenol y amino primario. Por ejemplo, la insulina humana tiene las siguientes funcionalidades relevantes: carboxi, carboxiamida, hidroxilo primario y secundario, fenol, imidazol y amino primario.

En otra realización, el compuesto de insulina está unido al vehículo de profármaco o bien por unión covalente a alguno de los restos lisina, alguno/o el término N de alguno/o la cadena A o la cadena B del compuesto de insulina.

En una realización particular, el profármaco o su sal farmacéuticamente aceptable comprende un conjugado 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),



5

donde 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}),

10

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

15

sustituya por un sustituyente, y en el que

L² es un enlace químico sencillo o un espaciador; y

Z es un hidrogel.

En el caso en que los compuestos según la fórmula (I) contengan uno o más grupos ácidos o básicos, la invención también incluye sus correspondientes sales farmacéuticas o toxicológicamente aceptables, en particular sus sales farmacéuticamente utilizables. Por tanto, 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 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 pivalico, 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 adipico y otros ácidos conocidos para los expertos en la técnica. Si los compuestos de fórmula (I) contienen simultáneamente grupos ácidos y básicos en la molécula, la invención también incluye, además de las formas salinas mencionadas, las sales internas o betainas (iones bipolares). Las respectivas sales según la fórmula (I) pueden obtenerse mediante métodos acostumbrados 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 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 intermedios para reacciones químicas o para la preparación de sales farmacéuticamente aceptables.

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

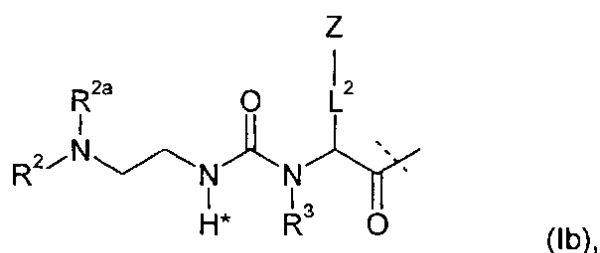
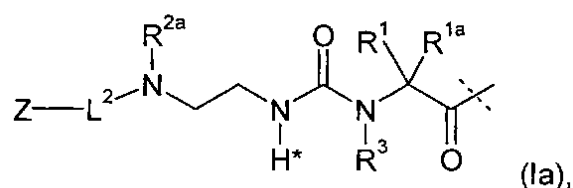
Preferiblemente, en la fórmula (I) R^1 se sustituye por L^2-Z .

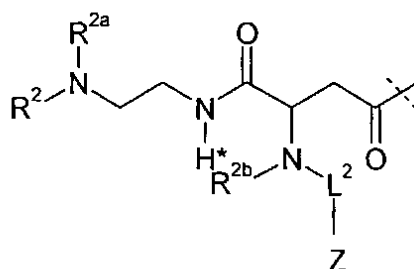
Preferiblemente, en la fórmula (I) X es $N(R^3)$.

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

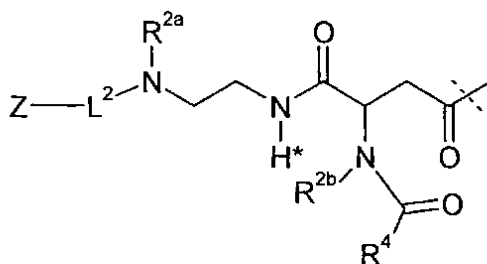
Preferiblemente, X es $C(R^3R^{3a})$, R^{3a} es $N(R^{2b})-L^2-Z$.

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





(Ic),



(Id),

5

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 además 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).

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 aparte del reemplazo 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

Asimismo, L^1 puede sustituirse opcionalmente. 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} ; alquenilo C_{2-50} ; o alquinilo C_{2-50} , en los que T ; alquilo C_{1-50} ; alquenilo C_{2-50} ; y alquinilo C_{2-50} están opcionalmente sustituidos con uno o más R^{10} , que son iguales o diferentes

- y en los que el alquilo C_{1-50} ; alquenoilo C_{2-50} ; y alquinoilo 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(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; T; y alquilo C_{1-50} ; alquenoilo C_{2-50} ; o alquinoilo C_{2-50} , en los que T; alquilo C_{1-50} ; alquenoilo C_{2-50} ; y alquinoilo C_{2-50} están opcionalmente sustituidos con uno o más R¹⁰, que son iguales o diferentes y en los que el alquilo C_{1-50} ; alquenoilo C_{2-50} ; y alquinoilo 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(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});
- 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 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 C_{1-6} , en el que el alquilo C_{1-6} 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 C_{1-6} , en el que el alquilo C_{1-6} 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 C_{1-50} ;

alquenilo C_{2-50} ; o alquinilo C_{2-50} , en los que T; alquilo C_{1-50} ; alquenilo C_{2-50} ; y alquinilo C_{2-50} están opcionalmente sustituidos con uno o más R^{10} , que son iguales o diferentes y en los que el alquilo C_{1-50} ; alquenilo C_{2-50} ; y alquinilo C_{2-50} están opcionalmente interrumpidos por uno o más grupos seleccionados del grupo que consiste en -T-, -
 5 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});

R^9 , R^{9a} , R^{9b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; Z; T; y alquilo C_{1-50} ; alquenilo C_{2-50} ; o alquinilo C_{2-50} , en los que T; alquilo C_{1-50} ; alquenilo C_{2-50} ; y alquinilo C_{2-50} están opcionalmente sustituidos con uno o más R^{10} , que son iguales o
 10 diferentes y en los que el alquilo C_{1-50} ; alquenilo C_{2-50} ; y alquinilo 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(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});

T se selecciona del grupo que consiste en fenilo; naftilo; indenilo; indanilo; tetralinilo; cicloalquilo C_{3-10} ; heterociclilo de 4 a 7 miembros; o heterobicyclilo de 9 a 11 miembros, en el que T está opcionalmente sustituido con uno o más R^{10} , que son iguales o
 diferentes;

R^{10} es Z; halógeno; CN; oxo (=O); COOR¹²; OR¹²; C(O)R¹²; C(O)N(R¹²R^{12a}); S(O)₂N(R¹²R^{12a}); S(O)N(R¹²R^{12a}); S(O)₂R¹²; S(O)R¹²; N(R¹²)S(O)₂N(R^{12a}R^{12b}); SR¹²; N(R¹²R^{12a}); NO₂; OC(O)R¹²; N(R¹²)C(O)R^{12a}; N(R¹²)S(O)₂R^{12a}; N(R¹²)S(O)R^{12a}; N(R¹²)C(O)OR^{12a}; N(R¹²)C(O)N(R^{12a}R^{12b}); OC(O)N(R¹²R^{12a}); o alquilo C_{1-6} , en el que el alquilo C_{1-6} está opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, que son iguales o
 25 diferentes;

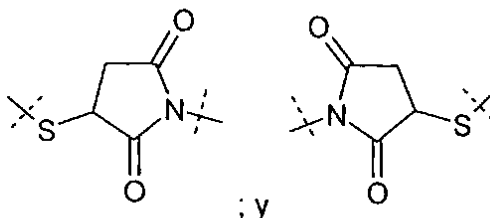
R^{11} , R^{11a} , R^{12} , R^{12a} , R^{12b} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H; Z; o alquilo C_{1-6} , en el que el alquilo C_{1-6} está opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, que son iguales o diferentes;

con la condición de que uno de R^9 , R^{9a} , R^{9b} , R^{10} , R^{11} , R^{11a} , R^{12} , R^{12a} , R^{12b} sea Z.

30 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} .

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



5

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, 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.

30

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 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 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. 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 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 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

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, 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.

5 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
10 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
15 y reactivos por cadena polimérica basada en PEG se mantenga en un mínimo.

 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
20 funcionales reactivos, 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 los pueden proporcionar cada uno de las 8
25 cadenas poliméricas basadas en PEG que se extienden desde el núcleo, o 2 grupos cada una de las 16 cadenas poliméricas basadas en PEG.

 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.
30 Preferiblemente, cada resto dendrítico tiene al menos 3 ramificaciones y al menos 4 grupos funcionales reactivos, y como máximo 63 ramificaciones y 64 grupos 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,
35 tetralisina, pentalisina, hexalisina, heptalisina, octalisina, nonalisina, decalisina,

undecalisina, dodecalisina, tridecalisina, tetradecalisina, pentadecalisina, hexadecalisina, heptadecalisina, octadecalisina, nonadecalisina en forma unida. Los ejemplos de dichos restos dendríticos preferidos comprenden oftrilisina, tetralisina, pentalisina, hexalisina, heptalisina en forma unida, los más preferidos trilisina, 5 pentalisina o heptalisina, ornitina, ácido diaminobutírico en forma unida.

Lo más preferiblemente, el vehículo de hidrogel de la presente invención se caracteriza porque el resto de cadena principal tiene un carbono cuaternario de fórmula $C(A-Hyp)_4$, en la que A es independientemente una cadena polimérica basada en polietilenglicol unida por el extremo al carbono cuaternario por un enlace covalente 10 permanente y el extremo distal de la cadena polimérica basada en PEG está unida covalentemente a 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 15 $-(CH_2)_{n1}(OCH_2CH_2)_nX-$, en la que $n1$ es 1 ó 2; n es un número entero en el intervalo de 5 a 50; y X es un grupo funcional químico que une covalentemente A e Hyp.

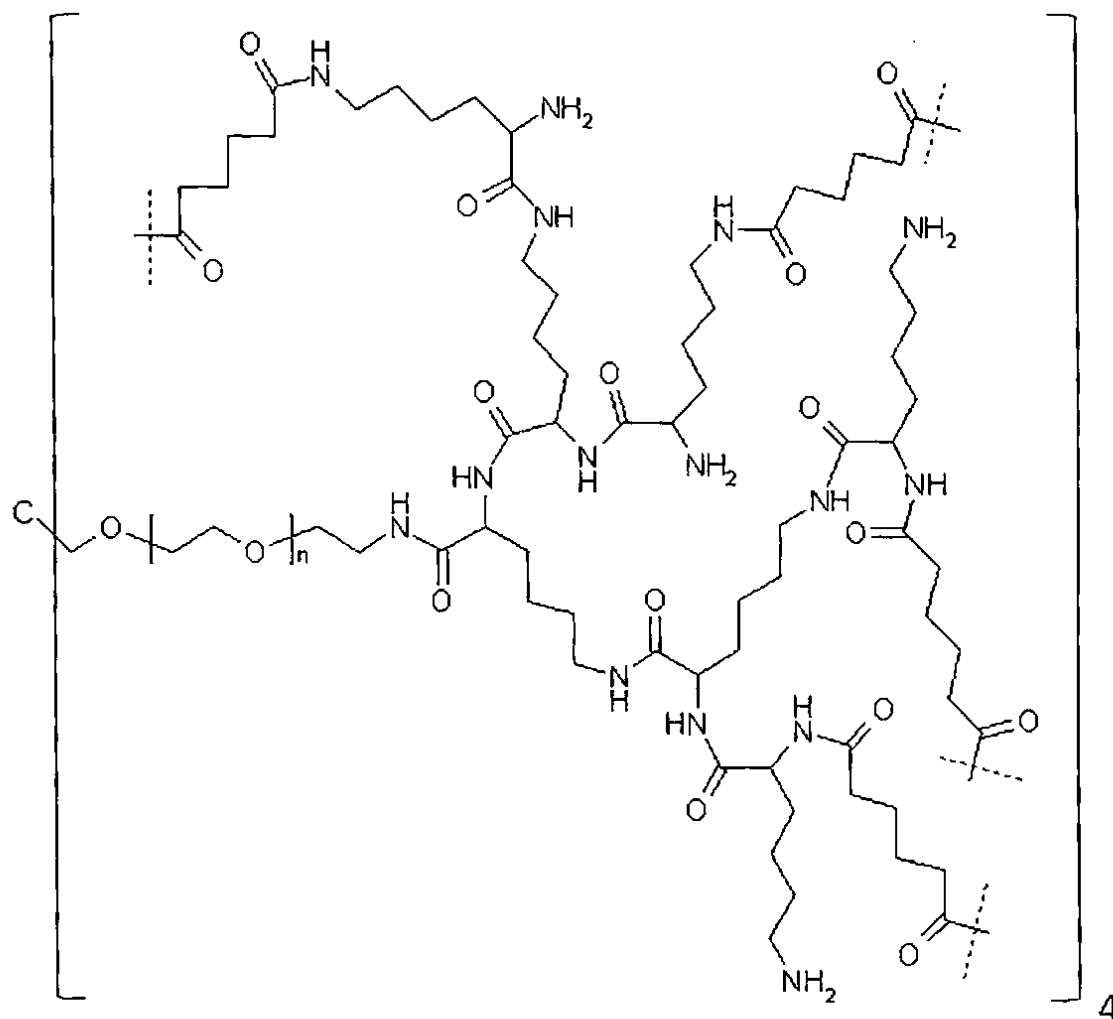
Preferiblemente, A e Hyp están covalentemente unidos por un enlace amida.

Preferiblemente, el resto dendrítico Hyp es un polipéptido 20 hiperramificado. Preferiblemente, el polipéptido hiperramificado comprende lisina en forma unida. Preferiblemente, cada resto dendrítico Hyp tiene un peso molecular en el intervalo de 0,4 kDa a 4 kDa. Se entiende que un resto de cadena principal $C(A-Hyp)_4$ puede 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, 25 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 unida. Lo más preferiblemente, Hyp está comprendido 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 30 reactivos de reticulación basados en polietilenglicol produce un enlace amida permanente.

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 n es un número entero de 5 a 50.



5

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

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, incluyendo, pero sin limitar, aconitilos, acetales, amidas, anhídridos carboxílicos, ésteres, iminas, hidrazonas, amidas del ácido maleámico, ortoésteres, fosfamidatos, 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 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.

5 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.

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

En una realización, los restos de cadena principal del vehículo de hidrogel 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
15 grupo funcional interconectado que conecta los dos restos dendríticos hiperramificados. Alternativamente, dos restos dendríticos hiperramificados de dos 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.

20 Alternativamente, los restos de cadenas principales pueden estar unidos entre sí por restos de reticulación, y cada resto de reticulación está terminado por al menos 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
25 a un resto de cadena principal comprende un enlace degradable por hidrólisis, y pueden estar presentes opcionalmente enlaces biodegradables adicionales en el resto de reticulación.

Preferiblemente, el vehículo de hidrogel biodegradable está compuesto de restos de cadenas principales interconectados por enlaces degradables por
30 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 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 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 peso molecular, en especial cuando se usan restos de cadenas principales hidrófilas de alto 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

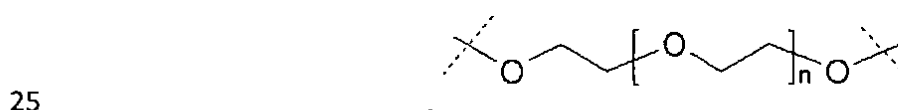
basados en polietilenglicol comprenden al menos cada uno m unidades de etilenglicol, en los que m es un número entero en el intervalo de 3 a 100, preferiblemente de 10 a 70. Preferiblemente, los restos de reticulación basados en polietilenglicol tienen un peso molecular en el intervalo de 0,5 kDa a 5 kDa.

5 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.

10 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
15 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.
20

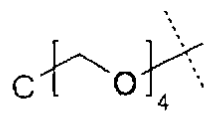
Un resto de reticulación preferido se muestra a continuación; las líneas de trazos indican enlaces biodegradables de interconexión a los restos de cadenas principales:



donde n es un número entero de 5 a 50.

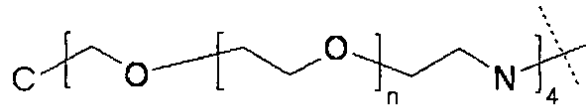
Preferiblemente, el vehículo de hidrogel está compuesto de restos de cadenas principales interconectados por enlaces degradables por hidrólisis.

Más preferiblemente, los restos de cadenas principales comprenden un
30 núcleo de ramificación de la siguiente fórmula:



en la que la línea de trazos indica la unión al resto de cadena principal restante.

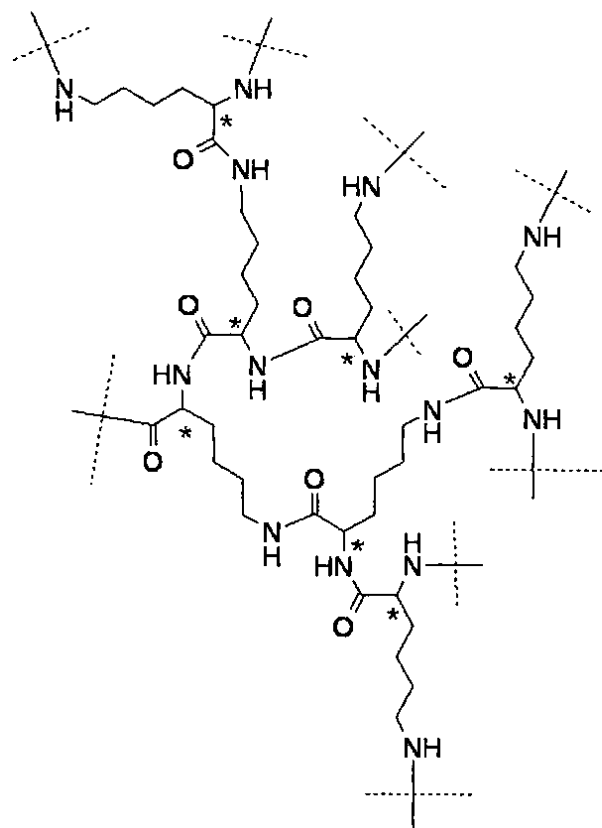
Más preferiblemente, los restos de cadenas principales comprenden una estructura de la siguiente fórmula:



5 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 hiperramificado Hyp.

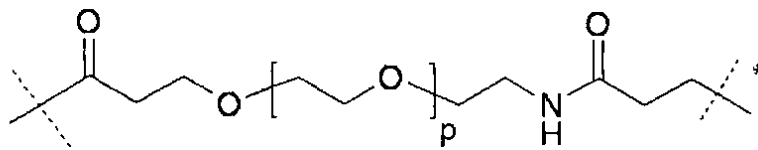
Más preferiblemente, el resto de cadena principal comprende un resto hiperramificado Hyp de la siguiente fórmula:



10

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 cadenas principales están unidos a al menos un espaciador de la siguiente fórmula:



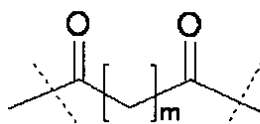
15

en la que la línea de trazos marcada con el asterisco indica el enlace entre el hidrogel 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.

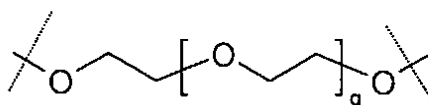
- 5 Preferiblemente, los restos de cadenas principales están unidos a al menos un espaciador de la siguiente fórmula:



- 10 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 la 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



- 15 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 influenciada por el número y tipo de átomos conectados adyacentes al grupo éster carboxi de PEG. Por ejemplo, seleccionando de

- 20 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.

- 25 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
- 30 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.

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 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 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.

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, p. ej., insulina, 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, es decir, insulina, 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 polimerizables reactivos del reactivo de reticulación se usan en una cantidad por debajo de la estequiométrica con respecto a los grupos polimerizables de la cadena principal, el hidrogel resultante será un hidrogel reactivo con grupos funcionales reactivos libres unidos a la estructura de la cadena principal.

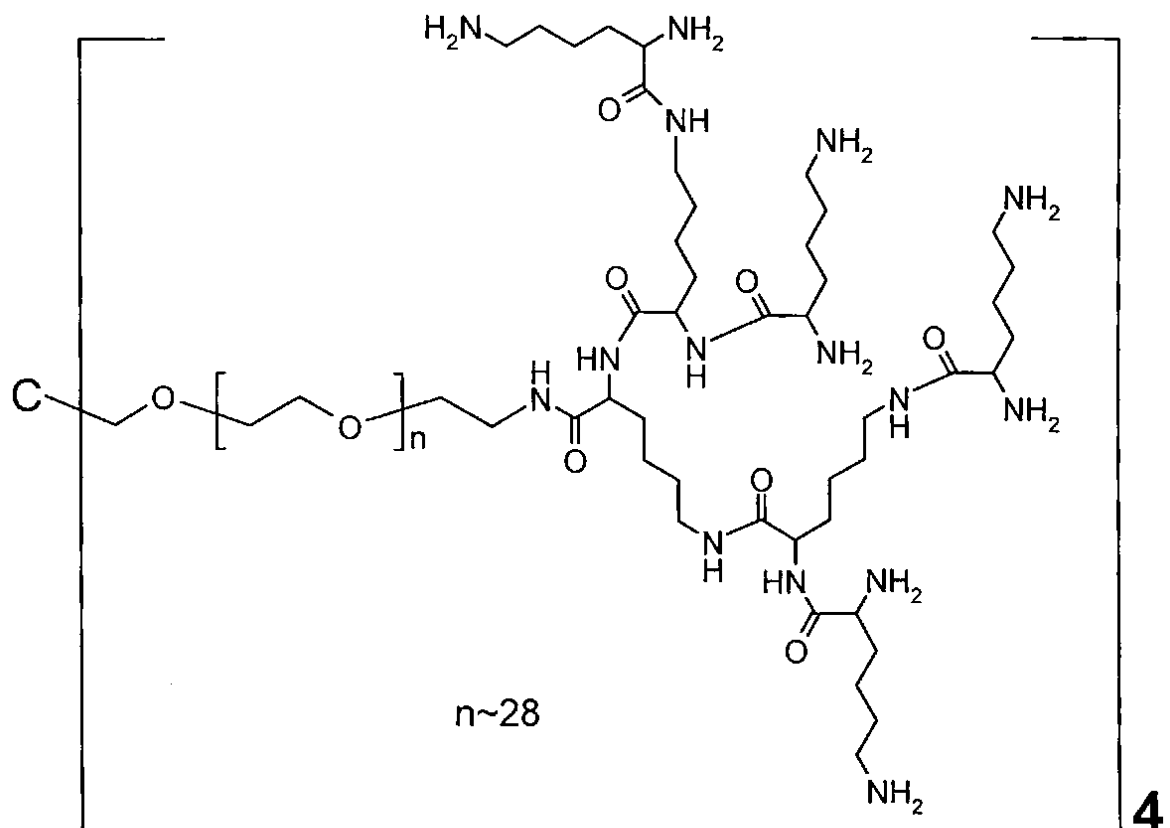
Opcionalmente, el conector del profármaco se puede conjugar primero a la insulina y el conjugado de insulina-conector del profármaco resultante después se puede hacer reaccionar con los grupos funcionales reactivos del hidrogel. Alternativamente, después de la activación de uno de los grupos funcionales 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 estructural 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

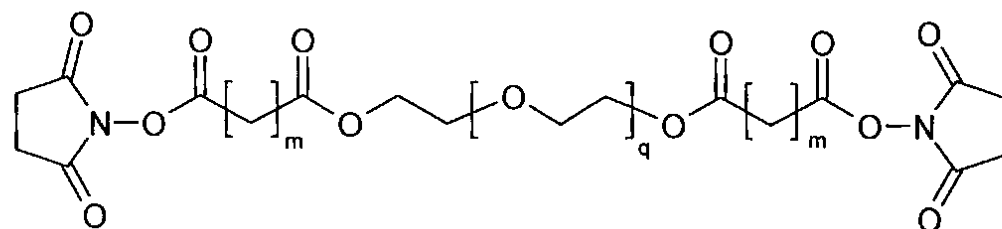
4 brazos, o se unirán 5 lisinas a cada brazo de un PEG de 8 brazos. En otra realización, el derivado de PEG de múltiples brazos es un PEG-tetra u octa-carboxi. En este caso, los restos dendríticos se pueden generar a partir de ácido glutárico o aspártico, y el reactivo de cadena principal resultante 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.

10 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, tal como ácido adípico 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

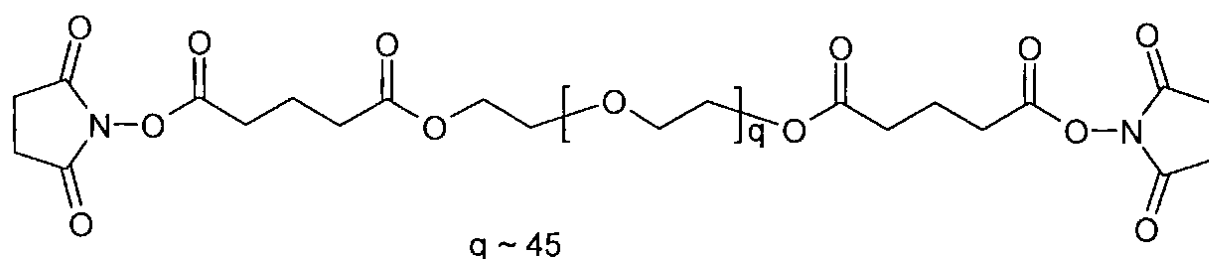
preferidos los ésteres de N-hidroxisuccinimida, de los cuales la estructura seleccionada preferida se muestra a continuación.



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

5 q es un número entero de 3 a 100.

Se prefiere más especialmente la siguiente estructura:



10 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 carboxilo 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 polimerizar para formar el hidrogel de acuerdo con la invención usando polimerización en emulsión inversa. Después de seleccionar la estequiometría deseada entre los grupos polimerizables 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 Arlacel P135, para formar una emulsión inversa usando un agitador mecánico y controlando la velocidad de agitación. La polimerización se inicia por la adición de una base adecuada, preferiblemente por N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina. 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

acuerdo con el tamaño de partículas mediante cribado mecánico. Opcionalmente, los grupos protectores se pueden eliminar en esta etapa.

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

Además, dicho hidrogel de acuerdo con la invención puede funcionalizarse con un espaciador que porta el mismo grupo funcional, por ejemplo, los grupos amino pueden introducirse en el hidrogel acoplando un espaciador heterobifuncional, como un $\text{COOH}-(\text{EG})_6\text{-NH-fmoc}$ (EG=etilenglicol) adecuadamente activado, y eliminando el grupo protector de fmoc.

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 que lleva un grupo 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 pH 3,0-4,0. Posteriormente, el correspondiente conjugado insulina-conector-hidrogel resultante se trata con 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 grupo maleimida se conecta con el resto conector, se hace reaccionar con un hidrogel funcionalizado con tiol a temperaturas entre temperatura ambiente y 4°C , más preferido a temperatura ambiente, en una 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, preferiblemente con un compuesto que contiene maleimida de 100a 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 etapas de

5 de
(a) contactar una suspensión acuosa que comprende micropartículas de hidrogel funcionalizado con maleimida a una disolución que comprende un reactivo insulina-conector que porta grupos tiol a temperaturas entre temperatura ambiente y 4°C en una disolución acuosa tamponada de pH 2-5, que resulta en un conjugado de
10 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
15 comprende las etapas de

(a) contactar una suspensión acuosa que comprende micropartículas de hidrogel funcionalizado con tiol a una disolución que comprende un reactivo insulina-conector que porta grupos maleimida a temperaturas entre temperatura ambiente y 4°C en una disolución acuosa tamponada de pH 2-5, que resulta en 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 maleimida de 100 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
25 insulina de la 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 $Hyp'-X^2$, en la que $Hyp'-X^2$ representa Hyp antes de su unión a A o un precursor de Hyp, y X^2 es un grupo
30 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
35 resultante de la etapa (b) con un reactivo basado en polietilenglicol, en el que los

grupos reactivos del reactivo de reticulación se usan en una cantidad por debajo de la estequiométrica comparado con el número total de grupos funcionales reactivos de C(A-Hyp)₄ para dar un hidrogel;

- (d) hacer reaccionar los grupos funcionales que no han reaccionado (que
5 representan los grupos funcionales reactivos de la cadena principal comprendida en el hidrogel de la presente invención) en la cadena principal del hidrogel de la etapa (c) con un conjugado covalente de insulina 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 insulina;
- 10 (e) opcionalmente rematar el resto de grupos funcionales que no han reaccionado para dar un profármaco de la presente invención.

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

- Para la polimerización en masa, el reactivo de la cadena principal y el
15 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
20 g por 100 ml.

Para realizar la polimerización, se añade N,N,N',N'-terrametiletilendiamina (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.

- 25 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.

- 30 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.

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
5 disolvente es un hidrocarburo lineal o ramificado saturado, con 5 a 10 átomos de carbono. Más preferiblemente, el disolvente es n-heptano.

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

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
15 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 molecular en el intervalo de 0,5 kDa a 3 kDa en cada extremo de la cadena. Lo más preferiblemente, el emulsionante es poli(etilenglicol) dipolidroxi estearato, Cithrol DPHS (Cithrol DPHS, antes Arlacel P135, Croda International Plc)

Se generan gotitas de la fase dispersa agitando con un propulsor de flujo axial con una geometría similar a los agitadores tales como Isojet, Intermig, Propeller (EKATO Rühr- und Mischtechnik GmbH, Alemania)), lo más preferiblemente similares 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
20 ajusta de 0,6 a 1,7 m/s. La fase dispersa se añade a temperatura ambiente, y la concentración de la fase dispersa es de 2% a 70%, preferiblemente de 5 a 50%, más preferiblemente de 10 a 40%, y lo más preferiblemente de 20 a 35% del volumen total de 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
30 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.

5 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.

10 El hidrogel para el profármaco de insulina de la presente invención se puede obtener a partir de métodos de separación 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.

15 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.

20 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.

25 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.

35 Con el fin de proporcionar capacidad de inyección, se puede extruir un volumen de 1 ml de profármaco 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
5 aproximadamente 10% (p/v).

En otra realización, la composición se caracteriza por ser una composición líquida que tras la inyección forma un medicamento de absorción lenta.

En otra realización, la composición se caracteriza por ser administrada por inyección, como subcutánea o intramuscular.

10 En otra realización, la composición es para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno asociado con deficiencia de insulina, donde el tratamiento o la prevención con un compuesto de insulina es beneficioso, como hiperglucemia, pre-diabetes, intolerancia a la glucosa, diabetes de tipo I, diabetes de tipo II, síndrome X. Típicamente, dicha enfermedad o trastorno es diabetes de tipo II.

15 En otra realización, el compuesto de insulina se selecciona de insulina humana o no humana, o análogos de insulina y sus derivados o conjugados. Se prefiere más particularmente la insulina humana o los análogos de insulina, como por ejemplo insulina glargina, insulina detemir, insulina lispro, insulina aspart, insulina glulisina. Cuando se administra el compuesto de insulina, se alcanza típicamente una
20 concentración pico máxima dentro de las primeras 48 horas. En otra realización, la concentración pico se alcanza dentro de las primeras 24 horas de administración, tal como dentro de las primeras 12 horas de administración, p. ej., dentro de las primeras 6 horas de administración.

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

Dicho compuesto GLP-1 típicamente se selecciona entre uno cualquiera de

[Sec ID No:1] exendina-4

HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS-NH2

30 [Sec ID No:2] exendina-3

HSDGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS-NH2

[Sec ID No:3]

HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG P

[Sec ID No:4]

35 HGEGTFTSDL SKQMEEEEAVR LFIEWLKNGG Y

[Sec ID No:5]

HGEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG

[Sec ID No:6]

HGEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG-NH2

5 [Sec ID No:7]

HGEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKN-NH2

[Sec ID No:8]

HGEGTFTSDL SKQLEEEAVR LFIEFLKNGG PSSGAPPPS-NH2

[Sec ID No:9]

10 HGEGTFTSDL SKQLEEEAVR LFIEFLKN-NH2

[Sec ID No:10]

HGEGTFTSDL SKQLEEEAVR LAIEFLKN-NH2

[Sec ID No:11]

HGEGTFTSDL SKQLEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS-NH2

15 [Sec ID No:12]

HGDGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS-NH2

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

HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLVKGR-NH2

[Sec ID No: 14]

20 HSEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLVKGR-NH2

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

HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLVKGRG

[Sec ID No: 16]

HAXaaGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLVKGR-NH2

25 donde Xaa se selecciona entre P, F, Y.

[Sec ID No: 17]

HXaaEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLVKGR-NH2

Donde Xaa se selecciona entre T, ácido a-aminobutírico, D-Ala, V, Gly.

[Sec ID No: 18]

30 HaEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLVKGG

[Sec ID No: 19]

R-HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLVKGR-NH2

Donde R se selecciona entre acetilo, piroglutamilo, N-2-hidroxibenzoílo, N-trans-3-hexenoílo.

35 [Sec ID No: 20]

HXaaAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLVKGR-NH2

Donde Xaa es 6-amino-hexanoilo.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de insulina para preparar una composición farmacéutica que comprende el compuesto de insulina en una concentración suficiente para mantener un nivel terapéuticamente eficaz del compuesto de insulina en el plasma sanguíneo durante por lo menos 3 días, típicamente por lo menos 80 horas, p. ej., una semana o más, caracterizado porque tiene un perfil de farmacocinética *in vivo* que prácticamente no exhibe absorción rápida del compuesto de insulina, para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno asociado con deficiencia de insulina, donde la prevención o el tratamiento con un compuesto de insulina resulta beneficioso.

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

Una composición preferida de un profármaco insulina-hidrogel se expone 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. 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.

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.

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:

- 5 (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
10 sensibles a la estabilidad del pH.
- (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
15 mOsmol/kg para el suero
- (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
20 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
25 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
30 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
35 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.

5 (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
10 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
15 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
20 ácido ascórbico, ectoína, metionina, glutatión, monotioglicerol, morina, polietilenimina (PEI), galato de propilo, vitamina E, agentes quelantes tales como ácido cítrico, EDTA, hexafosfato, ácido tioglicólico

(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
25 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 carbomer como Carbopol 940, Carbopol Ultrez 10, derivados de celulosa como hidroxipropilmetilcelulosa (hipromelosa, HPMC) o dietilaminoetilcelulosa (DEAE o
30 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 poli(ácido glicólico) (PGA) y sus copolímeros (PLGA), terpolímeros de D,L-lactida, glicólido y caprolactona, poloxámeros, bloques de poli(oxietileno) hidrófilos y bloques
35 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), acetato isobutirato de sacarosa (SAIB), dextrano o derivados del mismo, combinaciones de dextranos y PEG, polidimetilsiloxano, colágeno, chitosán, poli(alcohol vinílico) (PVA) y derivados, polialquilimidas, poli(acrilamida-co-dialildimetilamonio (DADMA)), polivinilpirrolidona (PVP), glicosaminoglicanos (GAG) tales como sulfato de dermatán, sulfato de condroitina, sulfato de queratán, heparina, 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 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 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 hidrocórico 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 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 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 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 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 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 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 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 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.

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 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,
- 5 (ii) transferencia de cantidades equivalentes a una sola dosis o múltiples dosis, a un envase adecuado,
- (iii) secado de la composición en dicho envase, y
- (iv) sellado del envase.

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

Otro aspecto es un kit de piezas. Cuando el dispositivo de administración es 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
15 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 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.

20 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 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
25 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. 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
30 antecede, para usar con un inyector de bolígrafo. El cartucho puede contener una sola dosis o múltiples dosis de insulina.

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
35 activos, en su forma libre o en forma de profármacos. Preferiblemente, dichos uno o

más agentes biológicamente activos son un profármaco, más preferiblemente es un 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,
 - (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, 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, 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) Inhibidores del co-transportador de Na-glucosa, tales como T-1095, T-1095A, phlorizen y similares,
 - (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 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, pero sin limitar, supresores del apetito que actúan por mecanismos adrenérgicos, tales como benzfetamina, fenmetrazina, fentermina, dietilpropion, mazindol, sibutramina, fenilpropanolamina o efedrina; agentes supresores del apetito
5 que actúan por mecanismos serotoninérgicos, tales como quipazina, fluoxetina, sertralina, fenfluramina o dexfenfluramina; agentes supresores del apetito que actúan por mecanismos de la dopamina, p. ej., apomorfina; agentes supresores del apetito que actúan por mecanismos histaminérgicos (p. ej., compuestos miméticos de histamina, moduladores del receptor H3); potenciadores del gasto energético tales
10 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 colecitoquinina; compuestos miméticos del péptido-1 análogo al glucagón (GLP-1) y análogos (p. ej., exendina); andrógenos (p. ej., deshidroepiandrosterona y derivados
15 tales como eticolandiona), testosterona, esteroides anabólicos (p. ej., oxandrolona), y hormonas esteroídicas; antagonistas del receptor de galanina; agentes citoquínicos tales como el 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;
20 compuestos miméticos del factor de liberación de corticotropina; compuestos miméticos de transcritos regulados por cocaína y anfetamina; peptidomiméticos relacionados con el 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
25 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 segundo compuesto. Alternativamente la composición de insulina-hidrogel se administra al paciente que lo necesite después de haber administrado otro compuesto al mismo paciente.

30 Además de los agentes antidiabéticos, los compuestos bioactivos pueden ser agentes antiobesidad tal como orlistat, un inhibidor de la lipasa pancreática, que evita 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
35 crecimiento, IGF-1, factor de liberación de la hormona del crecimiento), moduladores

de oxintomodulina y grelina. Otros agentes antiobesidad bioactivos potenciales incluyen, pero sin limitar, supresores del apetito que actúan por mecanismos adrenérgicos, tales como benzphetamina, fenmetrazina, fentermina, dietilpropion, mazindol, sibutramina, fenilpropanolamina o efedrina; agentes supresores del apetito
5 que actúan por mecanismos serotoninérgicos, tales como quipazina, fluoxetina, sertralina, fenfluramina o dexfenfluramina; agentes supresores del apetito que actúan por mecanismos de la dopamina, p. ej., apomorfina; agentes supresores del apetito que actúan por mecanismos histaminérgicos (p. ej., compuestos miméticos de histamina, moduladores del receptor H3); potenciadores del gasto energético tales
10 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 colecitoquinina; compuestos miméticos del péptido-1 análogo al glucagón (GLP-1) y análogos (p. ej., exendina); andrógenos (p. ej., deshidroepiandrosterona y derivados
15 tales como eticolandiona), testosterona, esteroides anabólicos (p. ej., oxandrolona), y hormonas esteroídicas; antagonistas del receptor de galanina; agentes citoquínicos tales como el 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;
20 compuestos miméticos del factor de liberación de corticotropina; compuestos miméticos de transcritos regulados por cocaína y anfetamina; peptidomiméticos relacionados con el 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
25 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 segundo compuesto. Alternativamente la composición de insulina-hidrogel se administra al paciente que lo necesite después de haber administrado otro compuesto al mismo paciente.

30 Los pacientes que necesitan el tratamiento con las composiciones de insulina de acción prolongada descritas en la presente invención, tienen un riesgo alto de 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
35 seleccionados del grupo que consiste en hipertensión (incluyendo, pero sin limitar,

hipertensión sistólica aislada e hipertensión dislipidémica familiar), insuficiencia cardíaca congestiva, hipertrofia ventricular izquierda, enfermedad arterial periférica, retinopatía diabética, degeneración macular, cataratas, nefropatía diabética, glomeruloesclerosis, insuficiencia renal crónica, neuropatía diabética, síndrome X, 5 síndrome premenstrual, enfermedad cardíaca coronaria, angina de pecho, trombosis, aterosclerosis, infarto de miocardio, ataque isquémico transitorio, accidente 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 10 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 15 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 20 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.

25 Por consiguiente, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de insulina para preparar una composición farmacéutica que comprende el compuesto de insulina de una concentración de por lo menos 10 mg/ml, caracterizado porque tiene un perfil de farmacocinética que prácticamente no exhibe absorción rápida del compuesto de insulina, para el tratamiento o la prevención de una 30 enfermedad o trastorno asociado con deficiencia de insulina, donde la prevención o el tratamiento con un compuesto de insulina resulta beneficioso.

En una realización de la presente invención, la concentración del compuesto de insulina es de por lo menos 11 mg/ml, como entre 11 mg/ml y 35 mg/ml, más preferiblemente entre 15 mg/ml y 25 mg/ml, incluso más preferiblemente 35 alrededor de 20 mg/ml e incluso más preferiblemente alrededor de 24 mg/ml.

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

5 En otra realización, la enfermedad o el trastorno asociado con deficiencia de insulina, donde la prevención o el tratamiento con un compuesto de insulina resulta beneficioso, se selecciona entre hiperglucemia, pre-diabetes, intolerancia a la glucosa, diabetes de tipo I, diabetes de tipo II, síndrome X. Típicamente, dicha enfermedad o trastorno es diabetes de tipo II.

10 Incluso otra realización se refiere al tratamiento o la prevención de hiperglucemia, pre-diabetes, intolerancia a la glucosa, diabetes de tipo I, diabetes de tipo II, síndrome X, en un mamífero, tal como un sujeto humano.

En otra realización, al sujeto humano le han diagnosticado pre-diabetes, intolerancia a la glucosa, obesidad, hipertensión, diabetes de tipo I, diabetes de tipo II, síndrome X.

15 Incluso en otra realización, el perfil de farmacocinética se mide en el plasma sanguíneo de un mamífero, tal como el plasma sanguíneo humano.

En otra realización, la composición se caracteriza por exhibir una relación valle-pico inferior a 2, tal como inferior a 1,75, inferior a 1,5 o inferior a 1,25.

20 Incluso en otra realización, la composición se caracteriza por una liberación continua de un compuesto de insulina estructuralmente intacto durante todo el periodo entre las administraciones.

En otra realización, el periodo total entre las administraciones es de por lo menos aproximadamente 80 horas, tal como aproximadamente 110 horas, típicamente una semana.

25 Incluso en otra realización, el compuesto de insulina es un profármaco. Dicho profármaco puede seleccionarse típicamente entre aquellos anteriormente descritos representados por las fórmulas D-L.

30 En otra realización, el compuesto de insulina está totalmente contenido en un medicamento de absorción lenta, típicamente un gel polimérico, tal como un hidrogel, por ejemplo, una matriz polimérica bien hidratada.

Típicamente, una matriz polimérica bien hidratada minimiza el contacto intermolecular de las moléculas de insulina.

35 Incluso en otra realización, el compuesto de insulina está covalentemente unido en el medicamento de absorción lenta, típicamente el gel polimérico, tal como el hidrogel, por ejemplo, la matriz polimérica bien hidratada.

En otra realización, la composición se caracteriza por ser una composición líquida que tras la inyección forma un medicamento de absorción lenta.

Incluso en otra realización, la composición se administra por inyección, como subcutánea o intramuscular.

5 En otra realización, el compuesto de insulina se selecciona de insulina humana o no humana, o análogos de insulina y sus derivados o conjugados. Se prefiere más particularmente la insulina humana o los análogos de insulina, como por ejemplo insulina glargina, insulina detemir, insulina lispro, insulina aspart, insulina glulisina.

10 Incluso en otra realización, la concentración pico se alcanza dentro de las primeras 24 horas de administración, tal como dentro de las primeras 12 horas de administración, p. ej., dentro de las primeras 6 horas de administración.

En otra realización, la composición comprende además un compuesto GLP-1.

15 Incluso otra realización se combina con un compuesto GLP-1. Típicamente, el compuesto de insulina se puede administrar primero o viceversa, y el compuesto de insulina y el compuesto GLP-1 se pueden administrar simultánea o secuencialmente.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para tratar
20 o prevenir una enfermedad o trastorno asociado con deficiencia de insulina, donde el tratamiento o la prevención con un compuesto de insulina es beneficioso, tal como hiperglucemia, pre-diabetes, intolerancia a la glucosa, diabetes de tipo I, diabetes de tipo II, síndrome X, en un mamífero que necesita dicho tratamiento o prevención por administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de insulina
25 en una concentración suficiente para mantener un nivel terapéuticamente eficaz del compuesto de insulina en el plasma sanguíneo durante por lo menos 3 días, típicamente por lo menos 80 horas, p. ej., una semana o más, caracterizado porque tiene un perfil de farmacocinética *in vivo* que prácticamente no exhibe absorción rápida del compuesto de insulina.

30 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno asociado con deficiencia de insulina, donde la prevención o el tratamiento con un compuesto de insulina resulta beneficioso, tal como hiperglucemia, pre-diabetes, intolerancia a la glucosa, diabetes de tipo I, diabetes de tipo II, síndrome X, en un mamífero que necesita dicho
35 tratamiento o prevención, por administración de una cantidad terapéuticamente eficaz

de un compuesto de insulina en una concentración de por lo menos 10 mg/ml, caracterizado porque tiene un perfil de farmacocinética que prácticamente no exhibe absorción rápida del compuesto de insulina.

Una realización se refiere al tratamiento o la prevención de
5 hiperglucemia, pre-diabetes, intolerancia a la glucosa, diabetes de tipo I, diabetes de tipo II, síndrome X, en un mamífero, tal como un sujeto humano. Típicamente, al sujeto humano le han diagnosticado pre-diabetes, intolerancia a la glucosa, obesidad, hipertensión, diabetes de tipo I, diabetes de tipo II, síndrome X.

En otra realización, la concentración del compuesto de insulina es de por
10 lo menos 11 mg/ml, tal como entre 11 mg/ml y 35 mg/ml.

Incluso en otra realización, el perfil de farmacocinética se mide en el plasma sanguíneo de un mamífero, tal como el plasma sanguíneo humano.

En otra realización, la composición se caracteriza por exhibir una relación valle-pico inferior a 2, tal como inferior a 1,75, inferior a 1,5 o inferior a 1,25.

15 Incluso en otra realización, la composición se caracteriza por una liberación continua de un compuesto de insulina estructuralmente intacto durante todo el periodo entre las administraciones.

En otra realización, el periodo total entre las administraciones es de por lo menos aproximadamente 80 horas, tal como aproximadamente 110 horas,
20 típicamente una semana.

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

En otra realización, el compuesto de insulina está totalmente contenido en un medicamento de absorción lenta, típicamente un gel polimérico, tal como un
25 hidrogel, por ejemplo, una matriz polimérica bien hidratada.

Incluso en otra realización, el compuesto de insulina está covalentemente unido en el medicamento de absorción lenta, típicamente el gel polimérico, tal como el hidrogel, por ejemplo, la matriz polimérica bien hidratada.

En otra realización, la composición se caracteriza por ser una
30 composición líquida que tras la inyección forma un medicamento de absorción lenta.

Incluso en otra realización, la composición se administra por inyección, como subcutánea o intramuscular.

En otra realización, el compuesto de insulina se selecciona de insulina humana o no humana, o análogos de insulina y sus derivados o conjugados. Se
35 prefiere más particularmente la insulina humana o los análogos de insulina, como por

ejemplo insulina glargina, insulina detemir, insulina lispro, insulina aspart, insulina glulisina. Incluso en otra realización, la concentración pico se alcanza dentro de las primeras 24 horas de administración, tal como dentro de las primeras 12 horas de administración, p. ej., dentro de las primeras 6 horas de administración.

5 En otra realización, la composición comprende además un compuesto GLP-1.

Incluso otra realización se combina con un compuesto GLP-1. Típicamente, el compuesto de insulina se puede administrar primero o viceversa, y el compuesto de insulina y el compuesto GLP-1 se pueden administrar simultánea o
10 secuencialmente.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit de partes que comprende una composición farmacéutica de cualquiera de las realizaciones descritas en esta memoria, y un envase para administración de la composición. Típicamente, el envase es una jeringa.

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

Fig.1a: Cromatograma UPLC de conjugado de insulina-conector 12a

Fig.1b: Cromatograma UPLC de conjugado de insulina-conector 12b

La Figura 2 muestra la concentración de insulina en plasma promedio de los animales 1-10 después de una sola dosis subcutánea del artículo de prueba 11a que contiene 6 mg de insulina en ratas sanas durante un periodo de 2 semanas. (las
20 barras de error se exponen como desviación estándar $\pm$ según lo derivado de los 10 animales, los valores t_0 se tomaron 3 días antes de la dosis).

Figura 3: La Figura 2 muestra la concentración de insulina en plasma promedio de los animales 1-8 después de una sola dosis subcutánea del artículo de prueba 11da que contiene 3 mg de insulina en ratas sanas durante un periodo de 13
25 días. (las barras de error se exponen como desviación estándar $\pm$ según lo derivado de los 8 animales, los valores t_0 se tomaron 1 día antes de la dosis).

Figura 4: Concentración de insulina en plasma (cuadrados grises) y el de glucosa en sangre (círculos negros) después de una sola dosis del artículo de ensayo
30 11da que contiene 6,4 mg de insulina en ratas diabéticas (n=7). (las barras de error se exponen como desviación estándar $\pm$ según lo derivado de los 7 animales, los valores t_0 se tomaron 4 días antes de la dosis).

Figura 5: Nivel de insulina en plasma promedio después de una sola dosis de 8mg/kg del artículo de ensayo 11db en ratas sanas durante las primeras 24
35 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. (las barras de error se exponen 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).

5 Figura 6: Concentración de insulina en plasma (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/kg del artículo de ensayo 11da en ratas diabéticas (n=8). (las barras de error se exponen como desviación estándar $\pm$ según lo derivado de los 8 animales, los valores t_0 se tomaron 3 días antes de la dosis).

10 Figura 7: Concentración de insulina en plasma promedio de los animales 1-8 (animal 1-4 y animal 5-8 para el valor 0,3, 1h, 2 y 4h, respectivamente) después de una única inyección subcutánea de 12 mg/kg de insulina formulada en el artículo de ensayo 11dc en ratas sanas durante un periodo de 13 días. (las barras de error se exponen como desviación estándar $\pm$ según lo derivado de los 8 animales, los valores t_0 se tomaron 4 días antes de la dosis).

15 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 registra contra el tiempo de incubación.

20 La Figura 9 muestra un gráfico que traza fuerza versus flujo usando una aguja de 30 G. Puntos de datos: cuadrados negros = etilenglicol; triángulos negros = agua; puntos negros = profármaco de hidrogel e insulina.

EJEMPLOS

25 Materiales y métodos

La insulina recombinante humana 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.

30 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.

La resina de 2-clorotritilo, HATU, N-ciclohexil-carbodiimida-N'-metil poliestireno y los aminoácidos se obtuvieron de Merck Biosciences GmbH, Schwalbach/Ts, Alemania, si no se indica otra cosa. Fmoc(NMe)-Asp(OtBu)-OH se
35 obtuvo de Bachem AG, Bubendorf, Suiza. El ácido S-tritil-6-mercaptophexanoico se

adquirió en Polypeptide, Strasbourg, Francia. Los aminoácidos usados tenían la configuración L, si no se establece lo contrario.

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

- 5 La síntesis de fase sólida se realizó sobre resina de cloruro de 2-clorotritilo (TCP) con una carga de 1,3 mmol/g. Las jeringas equipadas con fritas de polipropileno se usaron como recipientes de reacción.

La carga del primer aminoácido a las resinas se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- 10 Desprotección de Fmoc:

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

Desprotección de Fmoc y resinas cargadas con Fmoc-Aib

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

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

- 20 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. Se combinaron los eluatos, se eliminaron los elementos volátiles bajo una corriente de nitrógeno, y el producto bruto resultante se purificó por RP-HPLC. Se reunieron las fracciones de HPLC que contenían producto y se liofilizaron.

- 25 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 el caso que se esperaba que el TFA residual interfiriera, p. ej., con una reacción de acoplamiento subsiguiente.

Purificación por RP-HPLC:

- 30 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 gradientes lineales de disolución A (TFA al 0,1% en H₂O) y disolución B (TFA al 0,1% en acetonitrilo). Las fracciones que contenían HPLC 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*-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 como recipientes de reacción o para las etapas de lavado.

Métodos analíticos

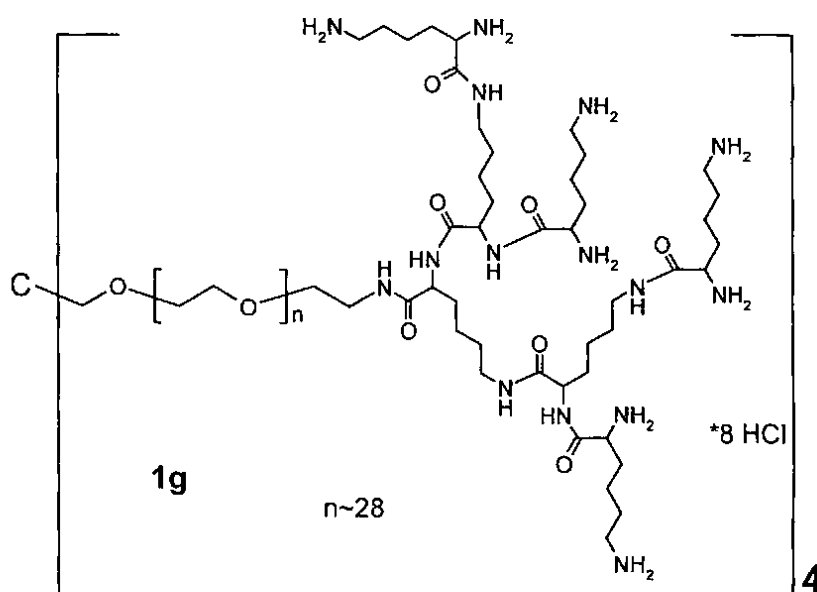
La cromatografía de líquidos de ultrapresión (UPLC) analítica se llevó a cabo en un sistema de Waters Acquity equipado con una columna Waters BEH300 C18 (2,1 x 50 mm, tamaño de partículas de 1,7 μm) acoplada con un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap Discovery de Thermo Scientific.

Las 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 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 $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$.

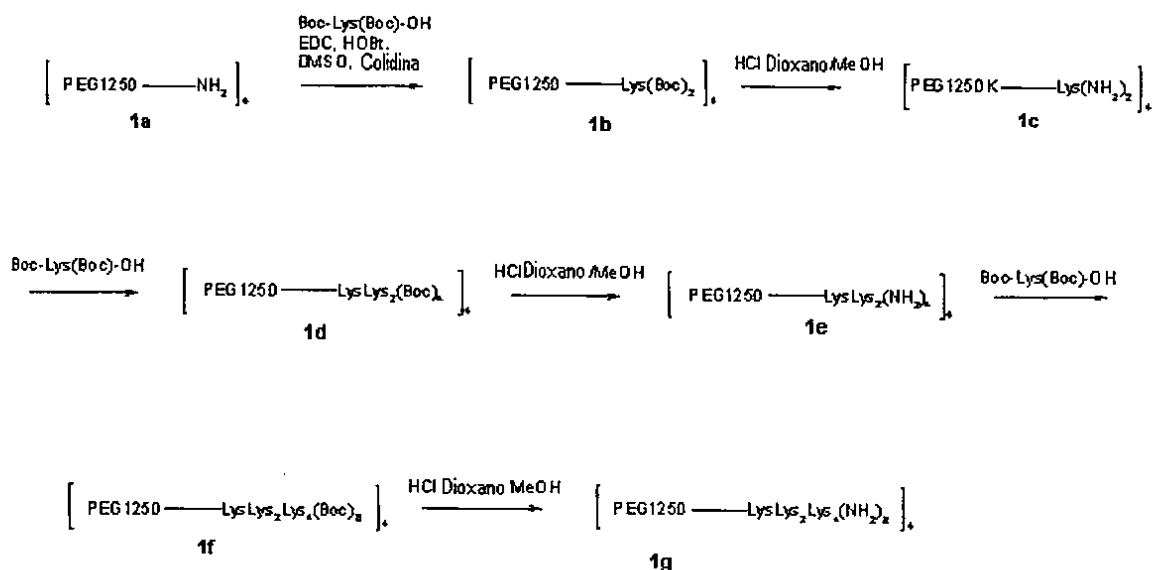
Se realizó cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) usando un sistema Amersham Bioscience AEKTAbasic equipado con una columna Superdex200 5/150 GL (Amersham Bioscience/GE Healthcare) equipada con un filtro de entrada de 0,45 μm , si no se indica lo contrario. Se usaron fosfato sódico 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, como fase móvil.

Ejemplo 1

Síntesis del reactivo de la cadena principal 1g



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



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).

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).

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.

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
5 capas acuosas se volvieron a extraer con 800 ml de DCM. Las fases orgánicas se secaron con Na₂SO₄, se filtraron y se evaporaron para dar un producto bruto vítreo.

El producto se disolvió en DCM y precipitó con éter dietílico 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
10 etapa sin más purificación.

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

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
15 usó en la siguiente etapa sin más purificación.

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

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
20 g, 14,4 mmol), y 10,0 ml de colidina (76,8 mmol). La mezcla se agitó durante 60 min a TA.

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
25 orgánicas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se evaporaron para dar el producto bruto 1f en forma de aceite incoloro.

El producto se disolvió en DCM y precipitó con éter dietílico frío (– 18 °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
30 etapa sin más purificación.

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

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
35 separaron a vacío.

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

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

Ruta sintética alternativa para el compuesto 1g

5 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 °C, y la mezcla se agitó durante 30 min.

10 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°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 secó a vacío durante 16 h.

Rendimiento: 65,6 g (74%) de 1b en forma de un sólido blanco grumoso.

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

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

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

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

25 Para la síntesis del compuesto 1d, a una suspensión de 1c de la etapa anterior (19,0 g, 3,14 mmol) se le añadió en 80 ml de 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

35 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

10 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

20 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.

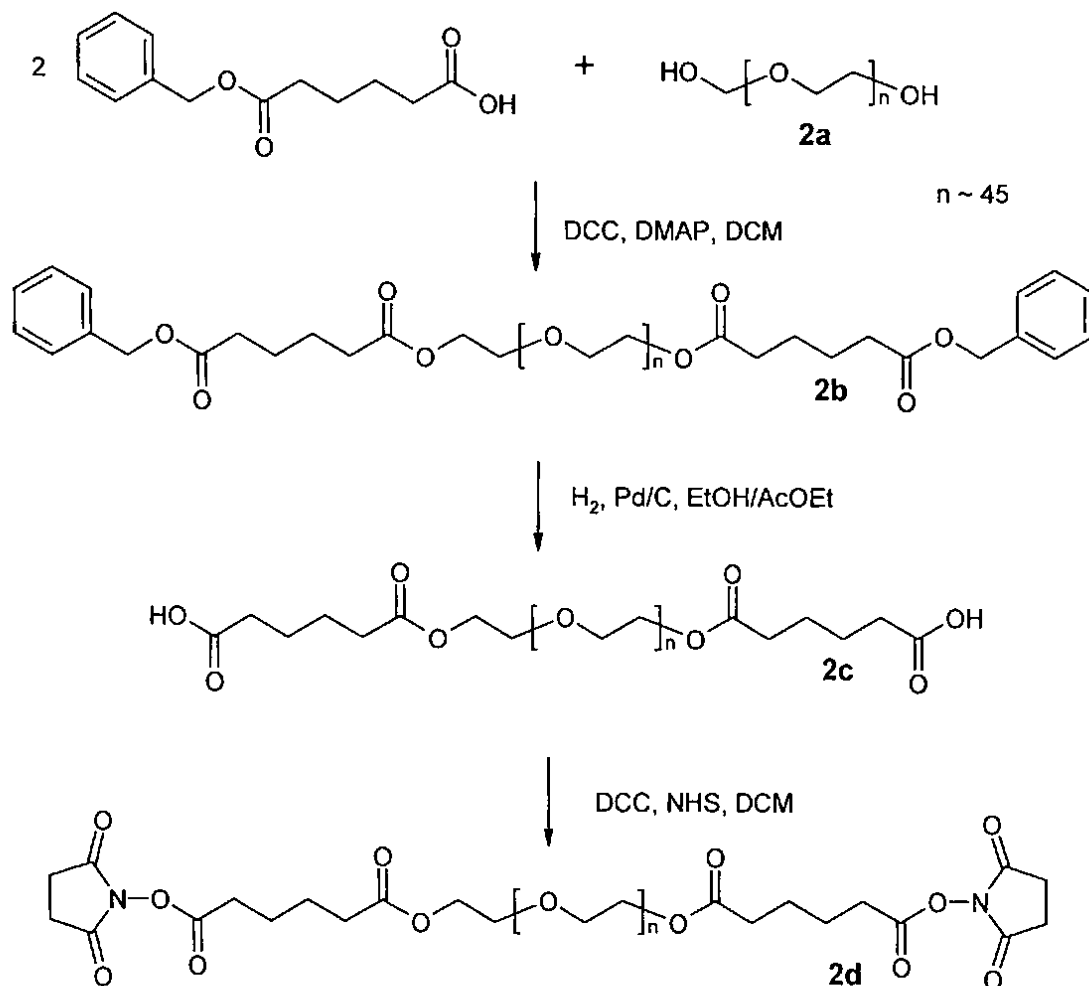
Rendimiento: 11,5 g (89 %) en forma de copos amarillo pálido.

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

Ejemplo 2

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:



5

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 dicitohexilcarbodiimida (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

10

15

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 = $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ (calculado = 813,3).

5 En un autoclave de vidrio de 500 ml se disolvió PEG2000-bis-(ácido adipico)-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.

10 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 = $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ (calculado = 753,2).

Una disolución del semiéster del PEG2000-bis-(ácido adipico) 2c (9,43 g, 4,18 mmol), *N*-hidroxisuccinimida (1,92 g, 16,7 mmol) y dicitohexilcarbodiimida (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 a partir de THF.

Rendimiento: 8,73 g (85%) de reactivo de reticulación 2d en forma de sólido incoloro.

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

20 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 de 2 h, la velocidad del agitador se redujo a 400 rpm y la mezcla se agitó durante 16 h adicionales. Se añadieron 1,5 mL de ácido acético y luego, después de 10 min, se añadieron 50 mL de agua. Después de 5 min, se paró el agitador y se drenó la fase acuosa.

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 $20\text{ }\mu\text{m}$. Se reunieron las fracciones de perlas que se retuvieron en los tamices de 32, 40, y $50\text{ }\mu\text{m}$

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.

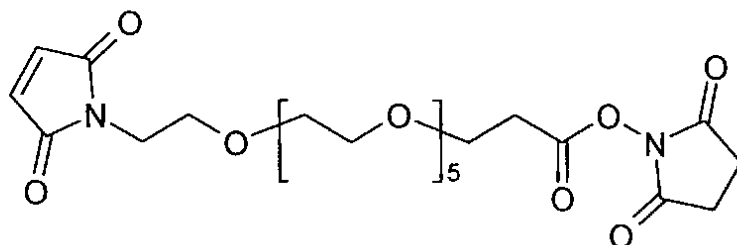
Se preparó 3a como se describió para 3 excepto por el uso de 1200 mg de 1g, 3840 mg de 2d, 28,6 ml de DMSO, 425 mg de Arlacel P135, 100 mL de heptano y 4,3 ml de TMEDA. Para el tratamiento, se añadieron 6,6 ml de ácido acético y después, tras 10 min, se añadieron 50 ml de agua y 50 ml de disolución acuosa saturada de cloruro sódico.

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

Se determinó que el contenido de grupos amino del compuesto 3 y 3a era entre 0,11 y 0,16 mmol/g.

Ejemplo 4

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



Mal-PEG6-NHS

20

Se añadió una disolución de 600 mg de Mal-PEG6-NHS (1,0 mmol) en 4,5 mL 2/1 (v/v) de acetonitrilo/agua a 200 mg de perlas de hidrogel secas 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. Se lavaron perlas 4 cinco veces cada una con 2/1 (v/v) acetonitrilo/agua, metanol y 1/1/0,001 (v/v/v) acetonitrilo/agua/TFA.

25

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 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

30

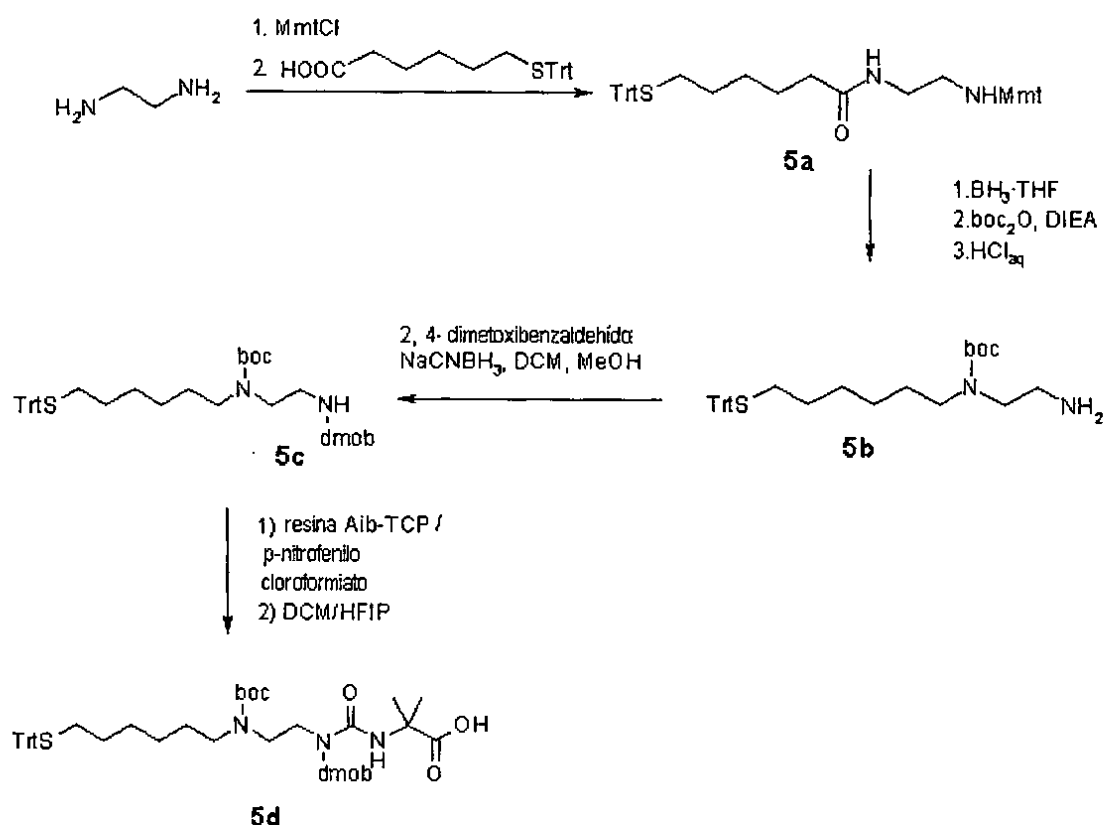
tres veces con succinato a pH 3,0 (20 mM, EDTA 1 mM, Tween-20 al 0,01%). La muestra se incubó en pH 6,0 fosfato sódico (50 mM, 50 mM etanolamina, 0,01 % Tween-20) durante una hora a TA, y se lavó cinco veces con pH 3,0 succinato sódico (20 mM, EDTA 1 mM, 0,01 % Tween-20).

- 5 Para determinación del contenido de maleimida, se liofilizó y pesó una alícuota de perlas de hidrogel 4, 4a, o 4aa, respectivamente. 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 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

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



15

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

20

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). Se secó la fase orgánica sobre Na₂SO₄, y los volátiles se eliminaron a presión reducida para obtener el intermedio protegido con Mmt (3,18 g, 9,56 mmol).

- 5 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)
- 10 y una vez con salmuera (50 ml). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ 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 = [M+H]⁺ (calculado = 705,0).

- 15 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 BH₃·THF (disolución 1 M, 8,5 ml, 8,5 mmol) y la disolución se agitó durante 16 horas a TA. Se añadió BH₃·THF adicional (disolución 1 M, , 14 ml, 14 mmol) y se agitó durante 16 horas a TA. La reacción se inactivó por adición de
- 20 metanol (8,5 mL), se 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 Na₂CO₃ (2 x 100 mL) y disolución saturada acuosa de NaHCO₃ (2 x 100 mL). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y los componentes volátiles se evaporaron a presión reducida
- 25 para obtener la amina intermedia bruta (3,22 g).

- La amina intermedia se disolvió en DCM (5 mL), se añadieron Boc₂O (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
- 30 g).

MS: m/z 791,4 = [M+H]⁺, 519,3 = [M-Mmt+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
- 35 la mezcla de reacción se ajustó hasta 5,5 por adición de 5 M de disolución de NaOH,

se eliminó el acetonitrilo a presión reducida, y la disolución acuosa se extrajo con DCM (4 x 100 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ y los compuestos volátiles se separaron a presión reducida. El material bruto 5b se utilizó sin purificación adicional.

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

MS: m/z 519,3 = [M+H]⁺ (PM calculado = 518,8 g/mol).

Síntesis del compuesto intermedio del reactivo conector 5c:

El compuesto intermedio 5b (780 mg, 0,98 mmol, ~65% pureza) y NaCNBH₃ (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 a TA durante 2 h. Los disolventes se evaporaron a presión reducida, y el producto bruto se disolvió en DCM y se lavó con disolución saturada de NaCO₃.

La fase acuosa se extrajo tres veces con diclorometano y las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄, y se concentraron a presión reducida. Se purificó 5c por cromatografía ultrarrápida usando DCM y MeOH como eluyentes.

Rendimiento: 343 mg (0,512 mmol)

MS: m/z 669,37 = [M+H]⁺, (calculado = 669,95).

Síntesis del reactivo conector 5d:

Se desprotegió resina TCP cargada con Fmoc-Aib (980 mg, ~0,9 mmol) con 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 cloroformiato de *p*-nitrofenilo (364 mg, 1,81 mmol) y colidina (398 µL, 3,0 mmol) en THF anhidro (6 mL) y se agitó durante 30 min. La 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 (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 de producto se llevaron a pH 6 por adición de NaHCO₃ saturado acuoso, y se concentraron a presión reducida. La suspensión resultante se repartió entre NaCl saturado, acuoso y DCM, y la capa acuosa se extrajo con DCM. Las fracciones orgánicas combinadas se concentraron a sequedad para proveer el reactivo conector 5d.

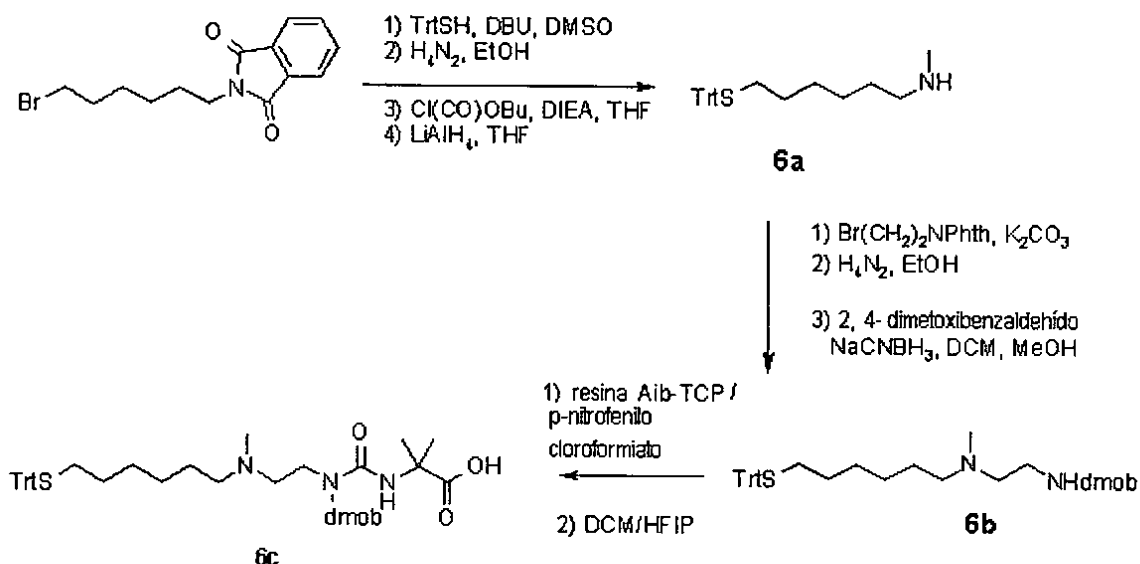
Rendimiento: 230 mg, (0,29 mmol).

35 MS 798,41 = [M+H]⁺, (calculado = 798,1).

Ejemplo 6

Síntesis del reactivo conector 6c

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



5 Síntesis de amina 6a:

Se suspendió trifenilmetanotiol (11,90 g; 43,08 mmoles) 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 por aproximadamente 15 min. La mezcla de reacción se repartió entre acetato de etilo (700 ml) 0.1 y HCl 0,1 M (200 ml). La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 mL), y las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con $NaHCO_3$ sat. (80 mL) y salmuera (80 mL), se secaron sobre $MgSO_4$, se filtraron y se concentraron. El aceite amarillo bruto recristalizó a partir de *n*-heptano/acetato de etilo. Se obtuvo el intermedio 6-(*S*-Tritil-)mercaptohexilftalimida como un sólido blanco (13,3 g, 26,4 mmol, 62%).

15 Se suspendió 6-(*S*-tritol-)mercaptohexilftalimida (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 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 $MgSO_4$ 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).

25 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 $LiAlH_4$ (1 M

en THF, 9,74 mL, 9,47 mmol) después de 30 min, y la mezcla se calentó a reflujo durante 90 min. La adición de agua, NaOH 3,75 M ac y agua condujeron a la formación de un precipitado que se eliminó de la mezcla por filtración. El filtrado se concentró a vacío para obtener 6a.

5 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:

10 A una disolución de 6a (2.1 g, 5,31 mmol) se le añadieron 2-bromoetilftalimida (1,96 g, 7,7 mmol) y K_2CO_3 (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 $NaHCO_3$ saturado, acuoso. El intermedio bruto (2-(*N*-metil-*N*-(6-tritilmercaptohexil)-amino)-etil)ftalimida se purificó por cromatografía rápida.

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

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

A una disolución de (2-(*N*-metil-*N*-(6-tritilmercaptohexil)-amino)-etil)ftalimida (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 añadió *N*-(2-aminoetil)-*N*-metil-*N*-(6-tritilmercaptohexil)-amina purificada por RP-HPLC.

20 Rendimiento: 624 mg (0.944 mmol).

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

25 A una disolución de *N*-(2-aminoetil)-*N*-metil-*N*-(6-tritilmercaptohexil)-amina (151 mg, 0,229 mmol) y $NaCNBH_3$ (30 mg, 0,463 mmol) en MeOH anhidro (6 mL) se le añadió una disolución de 2,4-dimetoxibenzaldehído en CH_2Cl_2 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 6b purificado por RP-HPLC.

Rendimiento: 177 mg (0,219 mmol).

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

30 Síntesis del reactivo conector 6c

Se preparó el reactivo conector 6c a partir de resina cargada con Fmoc-Aib (704 mg, ~0,6 mmol) como se describió para 5d, excepto por el uso de amina 6b (como sal de TFA, 430 mg, 0,53 mmol) en lugar de 5c.

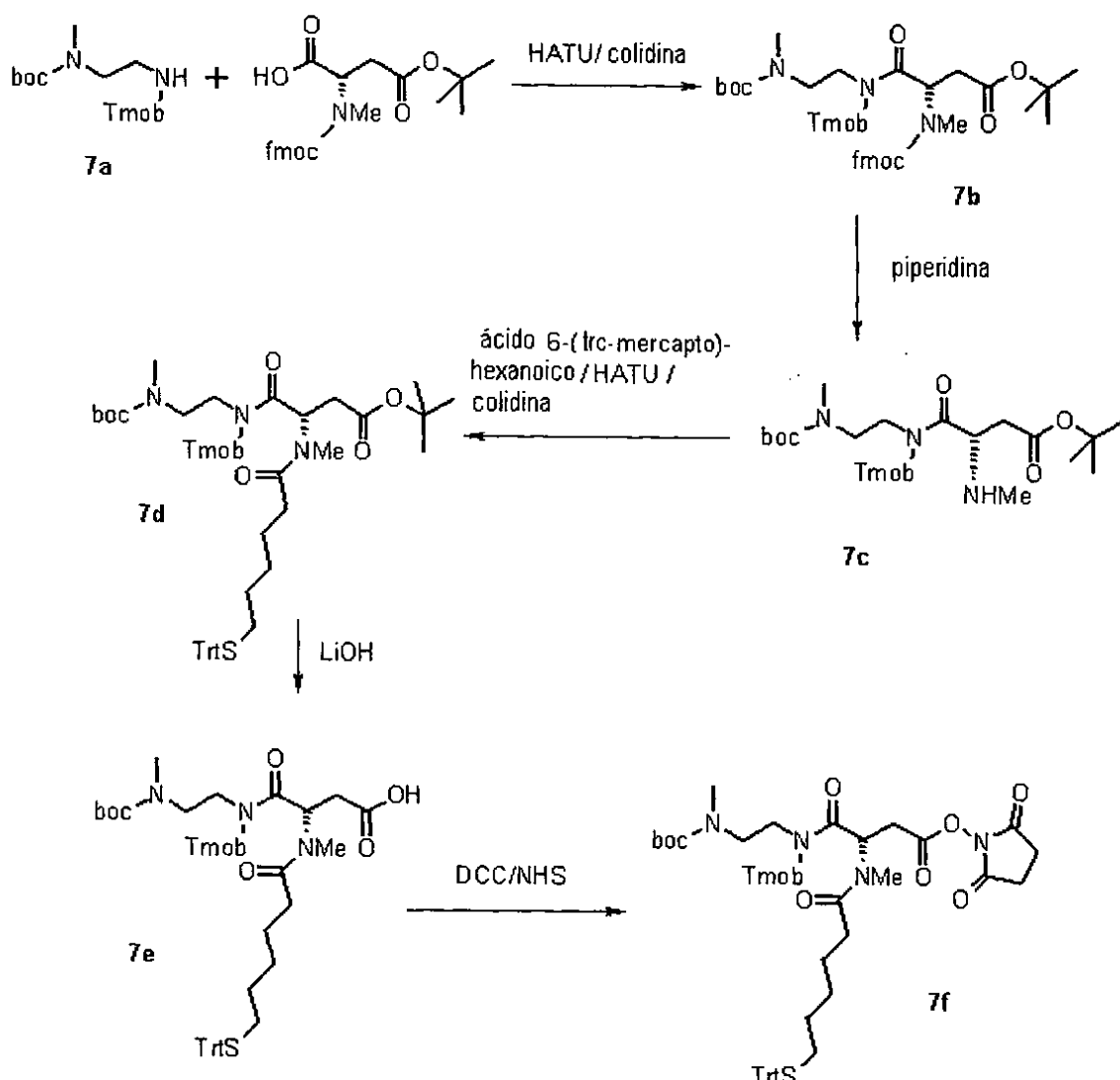
Rendimiento: 285 mg, (0,330 mmol).

35 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:



- 5 A una disolución enfriada (0 °C) de *N*-Metil-*N*-boc-etilendiamina (0,5 mL, 2,79 mmol) y NaCNBH₃ (140 mg, 2,23 mmol) en MeOH (10 mL) y ácido acético (0,5 mL) se 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 Na₂CO₃ saturado acuoso (50 mL). La evaporación de todos
- 10 los elementos 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) en forma de un aceite bruto que se purificó por RP-HPLC.

Rendimiento: 593 mg (1,52 mmol)

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

Se disolvió *N*-Fmoc-*N*-Me-Asp(O*t*Bu)-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 la 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).

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 se neutralizaron con NaHCO₃ saturado, acuoso y se concentraron. El resto de la fase acuosa 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 H₂O (2 mL) se le añadió LiOH (250 mg, 10,4 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 14 h a 70 °C. La mezcla se acidificó con AcOH (0,8 mL) y 7e se purificó por RP-HPLC. Las fracciones se neutralizaron con NaHCO₃ 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%)

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

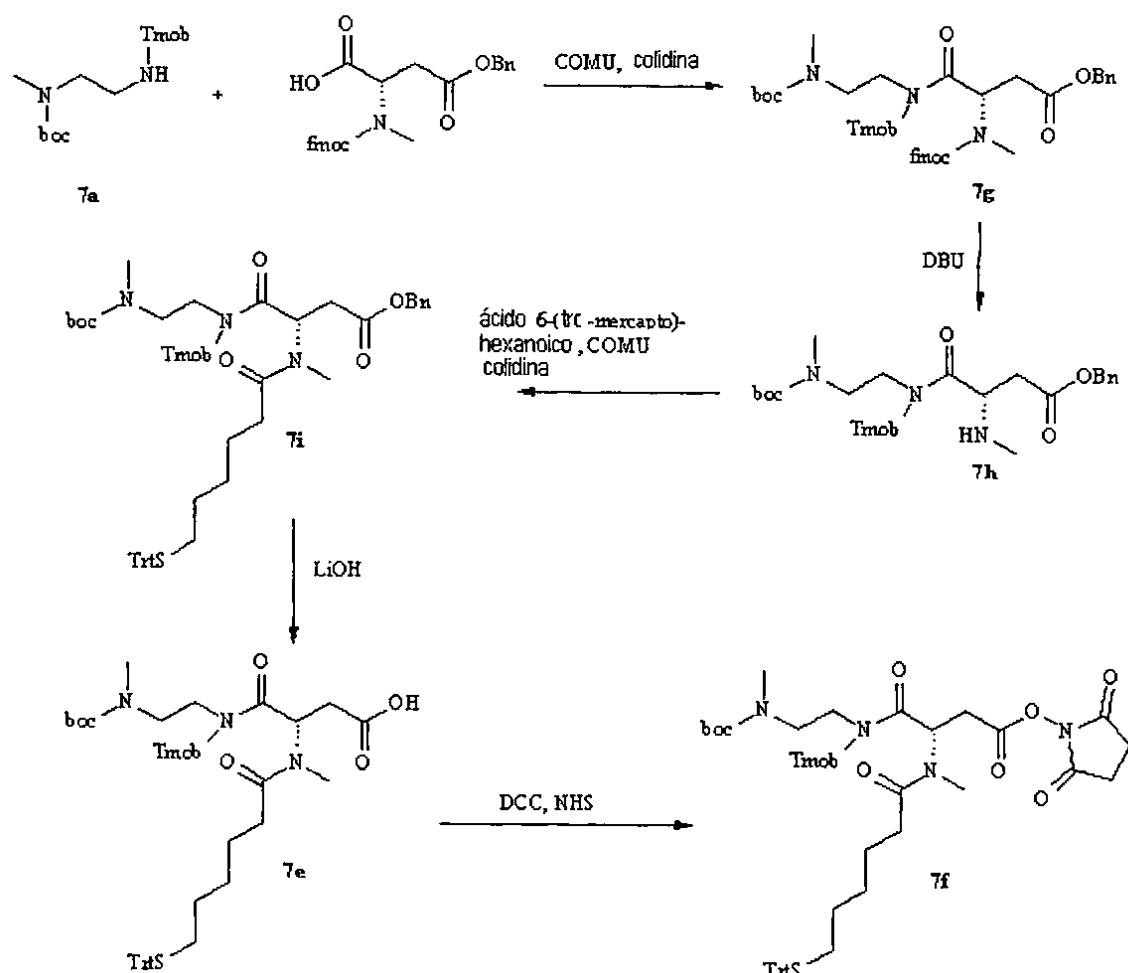
A una disolución de 7e (170 mg, 0,198 mmol) en DCM anhidro (4 mL) se le añadieron DCC (123 mg, 0,59 mmol) y *N*-hidroxi-succinimida (114 mg, 0,99 mmol), y la mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 hora. La mezcla se filtró, y el filtrado se acidificó con 0,5 mL de AcOH, y 7f se purificó por RP-HPLC. Las fracciones se neutralizaron con NaHCO₃ saturado, acuoso y se concentraron. El resto de la fase acuosa 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 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 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 combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 y los disolventes se evaporaron a vacío. La *N*-Metil-*N*-boc-*N'*-tmboc-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 % pureza, 7a : producto doblemente protegido con Tmob = 8 :1)

MS: m/z 355,22 = $[\text{M}+\text{H}]^+$, (calculado = 354,21).

15 A una disolución de 7a (2 g, 5,65 mmol) en CH_2Cl_2 (24 mL) COMU (4,84 g, 11,3 mmol), se le añadieron *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 combinadas 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.

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

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 minutos 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 combinadas 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).

15 Se disolvió 7h (5,31 g, 4,51 mmol, bruto) en acetonitrilo (26 mL) y COMU (3,87 g, 9,04 mmol), se añadieron 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 combinadas 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% pureza)

MS: m/z 856,41 = $[\text{M}+\text{H}]^+$, (calculado = 855,41).

A una disolución de 7i (2,63 mg, 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 minutos 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 combinadas 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%)

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 % acetonitrilo más 0,1 % TFA (3,4 ml). La mezcla bruta se purificó por RP-HPLC. Las fracciones del producto se neutralizaron con 0,5 M pH 7,4 tampón de fosfato, y se concentraron. El resto de la

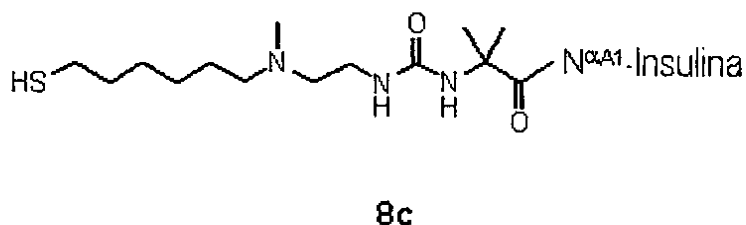
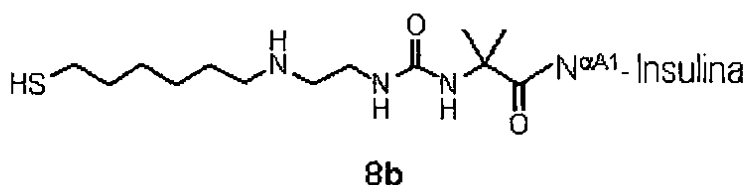
5 fase acuosa se extrajo con DCM, y se aisló 7f tras la evaporación del disolvente.

Rendimiento: 154 mg (81%)

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

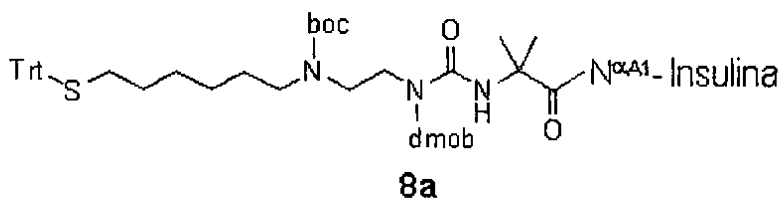
Ejemplo 8

Síntesis de los conjugados $N^{\alpha A1}$ -insulina-conector 8b y 8c



10

Síntesis del conjugado insulina-conector protegido 8a



15

Se disolvió el reactivo conector 5d en DCM (20 mg/mL) y se activó con resina de N-ciclohexil-carbodiimida- N' -metilpoliestireno (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

20 presión reducida, y el conjugado insulina-conector protegido conjugado a $N^{\alpha A1}$ 8a se purificó por RP-HPLC.

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 elementos volátiles se eliminaron bajo una corriente de nitrógeno. Se purificó el conjugado insulina-conector conjugado a N^{DA1} 8b por RP-HPLC.

8b:

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

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

El conjugado insulina-conector conjugado a N^{DA1} 8c se sintetizó como se describió para 8b excepto por el uso de 6c (72 mg, 0,101 mmol) en lugar de 5d.

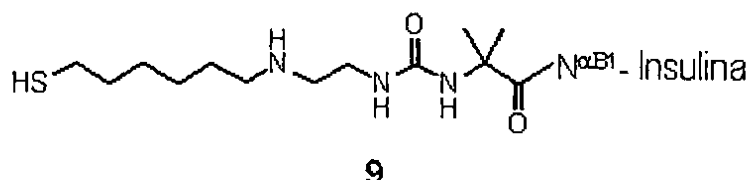
8c:

Rendimiento: 237 mg (0,039 mmol)

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

Ejemplo 9

Síntesis del conjugado N^{DB1}-insulina-conector 9



Se preparó N^A-boc-Gly^{A1}-N^F-boc-Lys^{B29}-insulina doblemente protegido como se describió previamente (J. Markussen, J. Halstrøm, F. C. Wiberg, L. Schäffer, *J. Biol. Chem.* 1991, 266, 18814-18818).

Se disolvió el reactivo conector 5d (0,04 mmol) en DCM (0,5 ml) y se activó con resina de N-ciclohexil-carbodiimida-N'-metilpoliestireno (0,205 mmol) a TA durante 2h. La disolución resultante del reactivo conector activado se añadió a una disolución de insulina protegida con bis-boc (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 100 µL de ácido acético, y el conjugado de insulina-conector protegido se purificó por RP-HPLC.

Rendimiento: 5 mg (0,00075 mmol).

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

Se trató conjugado de insulina-conector 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 elementos volátiles se eliminaron bajo una corriente de nitrógeno. Se purificó el conjugado insulina-conector conjugado a N^{DB1} 9 por RP-HPLC.

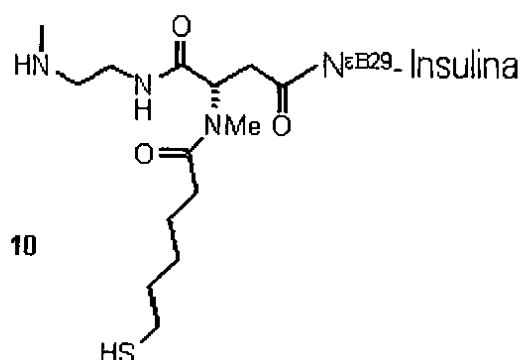
Rendimiento: 4 mg (0,0007 mmol)

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

Ejemplo 10

Síntesis del conjugado N^{B29}-insulina-conector 10

5



Se disolvió insulina (644 mg, 0,111 mmol) en 6,5 mL de DMSO. Se añadieron 3 mL de tampón de borato de sodio enfriado (4 °C) 0,5 M (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 μ L de AcOH y el conjugado de insulina protegido se purificó por RP HPLC.

Rendimiento: 172 mg (0,025 mmol).

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

La eliminación de los grupos protectores se efectuó por el tratamiento de las fracciones de 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 insulina-conector conjugado a N^{B29} 10 por RP-HPLC.

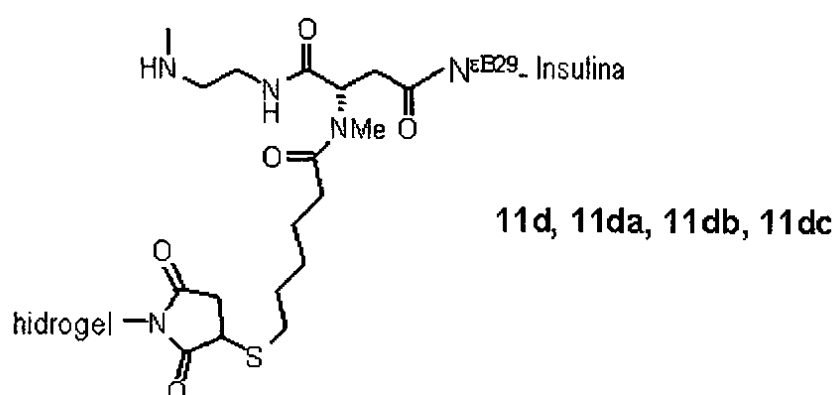
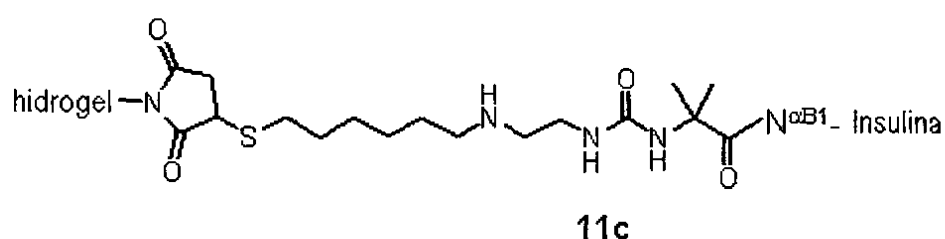
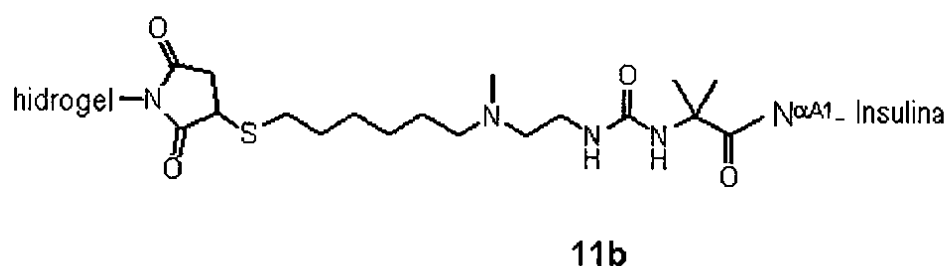
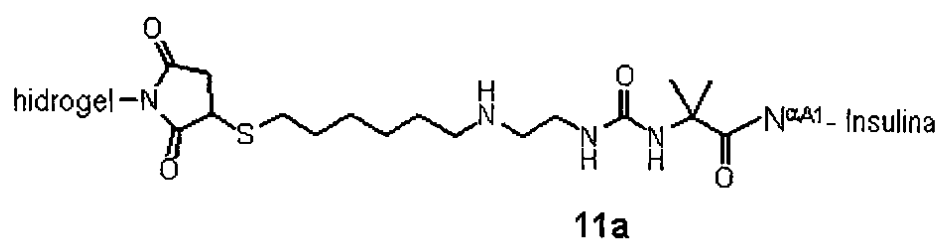
Rendimiento: 143 mg (0,023 mmol).

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

20

Ejemplo 11

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



Se cargó hidrogel 4 funcionalizado con maleimida seca (82 mg, 10,3 μmol grupos maleimido) a 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 de acetonitrilo/agua/TFA 1/1/0,001 (v/v/v), y 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 la prueba de Ellman. Se lavó

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, el hidrogel se suspendió en la disolución de sarcosina y se incubó durante 2 h a TA.

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

El contenido de insulina se determinó por hidrólisis total de una alícuota de insulina-conector-hidrogel bajo condiciones de reducción a pH 12 y posterior cuantificación de insulina de cadena A y cadena B por RP-HPLC.

10 Carga de insulina de 11a: 175 mg de insulina/g insulina-conector-hidrogel
Cantidad de insulina en una suspensión de 11a en tampón de acetato de sodio 10 mM, 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
15 por el uso de 8c, 9 y 10, respectivamente, en lugar de 8b.

Se preparó 11da como se describió anteriormente, excepto por el uso de 10 y 4a en lugar de 8b y 4.

Se preparó 11db 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
20 grupos maleimido) se cargó a una jeringa equipada con un filtro. Se añadió una disolución de insulina-conector-tiol 10 (166 mg, 24,4 µmol) en 8,0 mL de HCl pH 2,5. Se añadió 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
25 se monitoreó mediante la prueba 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, el hidrogel se suspendió en tampón que contenía acetil cisteína, se incubó durante 1 h a TA.

30 Se lavó el conjugado 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

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 μ mol grupos maleimido) se añadió a un reactor de síntesis de fase sólida. Se añadió una disolución de insulina-conector-tiol 10 (117 mL, 460 μ mol) en HCl 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 la prueba 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, el hidrogel se suspendió en tampón que contenía mercaptoetanol, se incubó durante 3 h a TA.

Se lavó el conjugado 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 trealosa, 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 usar micropartículas de hidrogel derivadas de maleimida 4aa en lugar de 4a.

Ejemplo 12

Cinética de liberación *in vitro*

Insulina-conector-hidrogel 11a, 11b, 11c y 11d, respectivamente, (insulina-conector-hidrogel que contenían aprox. 1 mg de insulina) se suspendieron en 2 ml de fosfato sódico 60 mM, EDTA 3 mM, 0,01% Tween-20, pH 7,4, y se incubaron 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, insulina-conector-hidrogel 11db se transfirió 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

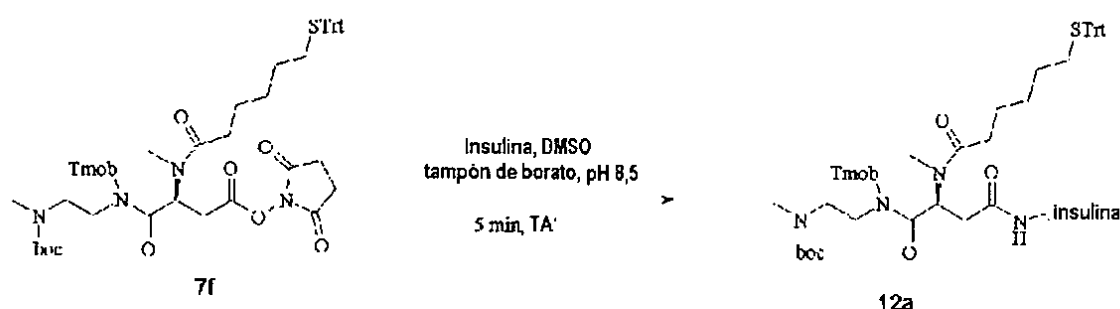
sobrenadante se intercambi6, y la insulina liberada se cuantific6 por RP-HPLC a 215 nm. La cantidad de insulina liberada se traz6 contra el tiempo de incubaci6n. Se aplic6 el software de ajuste de la curva y se determin6 una semivida *in vitro* de 15 d para 11db.

- 5 Alternativamente, insulina-conector-hidrogel 11db se carg6 a una columna de cromatograf6a y se dispuso en una incubadora controlada por temperatura (37°C). Se bombe6 fosfato s6dico (pH 7,4, 60 mM; EDTA 3 mM, 0,01 % Tween-20) a trav6s de la columna, con un flujo constante de 0,25 mL/h (nominal), y se recogi6 fuera de la incubadora. En puntos de tiempo definidos, la disoluci6n se analiz6 por RP-HPLC a 215 nm. La cantidad de insulina liberada se traz6 contra el tiempo de incubaci6n. Se aplic6 el software de ajuste de la curva y se determin6 una semivida *in vitro* de 13 d para 11db.

Ejemplo 13

- 15 S6ntesis de un conjugado de LysB29-conector de insulina (12a) y un conjugado de LysB28-conector de insulina lispro (12b):

S6ntesis del conjugado de LysB29-conector de insulina (12a)



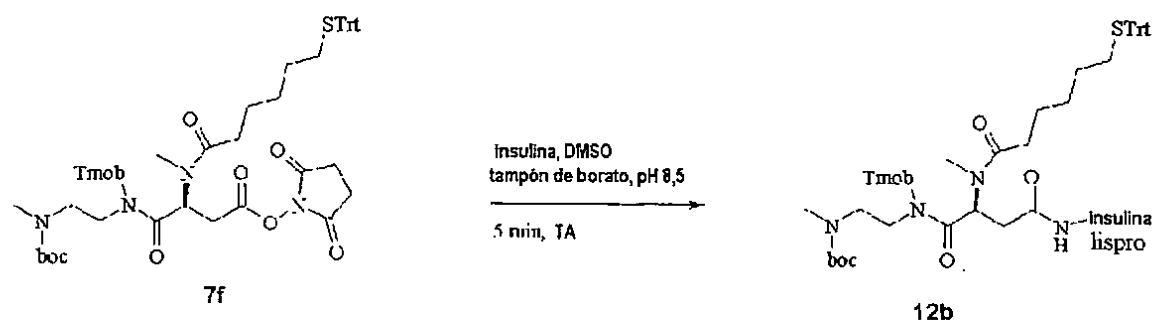
- 20 Se disolvieron 1,2 g (0,206 mmol, 0,85 eq) de insulina en DMSO a TA. Despu6s de 30 min, la disoluci6n se enfri6 hasta 0 °C mientras se a6aadia tamp6n de borato (0,5 M, pH 8,5, 21,6 ml) durante un periodo de 4,40 min. La temperatura de la disoluci6n se mantuvo entre 25 y 28 °C. Se a6adi6 una disoluci6n de 228 mg (0,239 mmol, 1 eq) de 7f en 40 ml de DMSO invariable del tiempo durante un periodo de 3 min. Se elimin6 el ba6o de hielo, y la mezcla de reacci6n se agit6 durante 5 min a TA. La reacci6n se inactiv6 por adici6n de 70 ml de MeCN/H₂O (1:1, 0,1 % TFA) y 400 µl AcOH. El compuesto 12ab se purific6 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).

- 30 Regio-selectividad de acuerdo con el an6lisis UPLC (antes de la purificaci6n por RP HPLC): 0,70 % 7f unido a GlyA1 de insulina y 76,2 % 7f unido a LysB29 de insulina (v6ase Fig. 1a).

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

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

Síntesis del conjugado de LysB28-conector de insulina lispro (12b)



5

Se disolvieron 0,347 g (0,059 mmol, 0,85 eq) de insulina lispro en 6 ml de 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, 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 en 8 ml de DMSO invariable del tiempo durante un periodo de 2 min. Se eliminó el baño de hielo, y la mezcla de reacción se agitó durante 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).

Regio-selectividad de acuerdo con el análisis UPLC (antes de la purificación por RP 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 $[M+H]_{1/4}^+ = 1662,25 \text{ g/mol}$ ((PM+H) $_{1/4}$ calculado = 1662,35 g/mol).

Ejemplo 14

Estudio de farmacocinética en ratas

La farmacocinética de 11a se determinó midiendo la concentración de insulina plasmática después de la aplicación subcutánea de una sola dosis en ratas.

Un grupo, que consistía en 10 ratas macho Wistar (200-250 g), se usó para estudiar los niveles de insulina en el plasma durante un periodo de 14 días. Cada uno de los animales recibió una sola inyección subcutánea de 500 µL de suspensión 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 por vía sublingual 200 µL de sangre para obtener 100

25

μL de Li-Heparina de plasma. Las muestras se recogieron antes de la aplicación y 4h, 1, 2, 3, 4, 7, 9, 11 y 14 días después de la inyección. Las muestras de plasma se congelaron dentro de los 15 min de la extracción de sangre y se conservaron a -80°C hasta el ensayo.

- 5 Las concentraciones de insulina en el plasma se midieron usando un kit ELISA para 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 estándares de insulina por duplicado y
- 10 ajustando los valores, usando regresión lineal. La concentración de insulina se definió a partir de dos series de dilución independientes corregidas por el respectivo factor de dilución, y se trazó contra tiempo. Las concentraciones de insulina en plasma promediadas para cada punto de tiempo se obtuvieron calculando la media de todos los animales, como se muestra en la Figura 2.

- 15 Se observó una liberación de insulina sostenida, sin absorción rápida durante 14 días.

Ejemplo 15:

Estudio de farmacocinética en ratas

La farmacocinética de 11da se determinó midiendo las concentraciones de insulina en plasma durante un periodo de 13 días en ratas sanas.

- 20 Ocho ratas Wistar (aprox. 250g de peso corporal) recibieron una sola inyección subcutánea de 500 μL 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 de Li-Heparina de plasma. Las muestras se recogieron un día antes y 4h, 1d, 2d,
- 25 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
- 30 calibración, y se restaron de los valores de la 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 en plasma hasta el día 13 para todos los animales investigados se muestran en la Figura 3.

Después de una sola inyección subcutánea de 500 μ L de 11d que contenía 3 mg de insulina, el nivel de insulina en plasma promedio alcanzó un máximo de aproximadamente 500 pM en el día 1. Como se esperaba, la concentración de insulina plasmática disminuyó posteriormente en forma continua dentro de 2 semanas. La relación valle-pico de los niveles de insulina en plasma dentro de la primera semana del estudio fue aproximadamente 1,7.

Ejemplo 16:

10 Estudio de farmacocinética y farmacodinámica 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 la glucosa sanguínea en un estudio exploratorio de farmacocinética/farmacodinámica, 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 sanguínea por encima de 350 mg/dL en el día 0 se incluyeron en este estudio. Siete de ocho ratas Wistar se volvieron diabéticas y recibieron una sola inyección subcutánea 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 de Li-Heparina de 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. La glucosa sanguínea se midió 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 la 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

20
25
30
35

de glucosa sanguínea durante un periodo de 3 semanas, como se muestra en la Figura 4.

Después de una sola inyección subcutánea de insulina-hidrogel 11da, el nivel de glucosa en sangre se redujo eficazmente durante un periodo de 10 días con valores debajo de 100 mg/dL sin ningún síntoma de hipoglucemia. Debido a la dosis mayor 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 aproximadamente 300 pM. Simultáneamente, los valores de glucosa en sangre comenzaron a elevarse después de 10 días y alcanzaron 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 desde el conjugado insulina-conector-hidrogel sin absorción rápida, se monitoreó la concentración de insulina plasmática durante un periodo de 24 horas en ratas sanas.

Ocho ratas Sprague-Dawley (200-250g de peso corporal) se dividieron en 2 grupos y recibieron una sola inyección subcutánea de 2 mL del artículo de ensayo 11db en tampón de acetato 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 recibió 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 de Li-Heparina de 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 las del grupo B se recogieron 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 la 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 absorberse rápidamente.

Ejemplo 18:

Estudio de farmacocinética y farmacodinámica de múltiples dosis en

5 ratas

La farmacocinética y la farmacodinámica se determinaron después de 3 dosis semanales de 11da, midiendo las concentraciones de insulina plasmática y los niveles de glucosa sanguínea durante un periodo de 4 semanas en ratas diabéticas.

Se utilizaron ocho ratas Sprague-Dawley con un peso corporal promedio
10 de 239g. Se indujo la diabetes con estreptozotocina (STZ), y todos los animales con niveles de glucosa sanguínea por encima de 350 mg/dL en el día 0 (día de la inyección del artículo de ensayo) se incluyeron en el estudio. Ocho de ocho animales que recibieron tratamiento con STZ se tornaron diabéticos y recibieron 3 inyecciones subcutáneas semanales en los días 0, 7 y 14 de 2mL del artículo de ensayo 11da en
15 tampón de acetato, pH 5, por kg de peso corporal. Con una concentración de insulina del artículo de ensayo 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 µL de sangre de la vena del rabo para obtener aproximadamente 100 µL de Li-Heparina de plasma. Las muestras se recogieron 3 días antes y hasta 28 días después de la administración del
20 artículo de ensayo. Las muestras de plasma se congelaron y conservaron a -80°C hasta el ensayo. Se midió la glucosa sanguínea 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
25 instrucciones del fabricante. Se incluyeron blancos (calibrador 0) en la curva de calibración, y se restaron de los valores de la 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
30 de microtitulación (Tecan Ultra) sin corrección de longitud de onda de referencia. El nivel de insulina en plasma y el nivel de glucosa sanguínea 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 establemente el nivel de glucosa sanguínea hasta valores de
35 aproximadamente 100mg/dL después de la tercera inyección, que permanecieron

bajos por aproximadamente una semana. Al mismo tiempo, la concentración de insulina máxima aumentó de forma estable de 200 pM después de la primera dosis y 300 pM después de la segunda dosis, hasta 400 pM tras la tercera dosis, y posteriormente disminuyó nuevamente al cabo de 2 semanas hasta valores por debajo de 100 pM.

Ejemplo 19:

Estudio de farmacocinética en ratas

La farmacocinética de 11dc se determinó midiendo las concentraciones de insulina en plasma durante un periodo de 13 días en ratas sanas.

Ocho ratas Wistar (aprox. 230g de peso corporal) recibieron una sola inyección subcutánea de 2 ml/kg del artículo de ensayo 11dc en tampón de succinato pH 5 (succinato/tris 10 mM, 85 g/l trealosa, 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 µL de sangre de la vena del rabo para obtener aproximadamente 100 µL de Li-Heparina de 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 la 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 en plasma hasta el día 13 para todos los animales investigados se muestran en la Figura 7.

Después de una sola inyección subcutánea de 12mk/kg de 11dc, el nivel de insulina en plasma promedio alcanzó un máximo de aproximadamente 500 pM en el día 1. Como se esperaba, la concentración de insulina plasmática 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 aproximadamente 1,4.

Ejemplo 20

Liberación de insulina y degradación de hidrogel en tiempo real 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 a 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 constante de 0,25 mL/h (nominal), y se recogió fuera de la incubadora. En puntos de tiempo definidos, la disolución se analizó por RP-HPLC (215 nm). La cantidad de insulina liberada se trazó contra el tiempo de incubación, y se aplicó un software de ajuste de curvas para estimar la correspondiente semivida de liberación. Se determinó una semivida de 9,4 d para la liberación de insulina.

Después de 39 d de incubación a 37°C, la suspensión de hidrogel se transfirió a un tubo de preparación de muestras, se eliminó el hidrogel residual de la columna con pH 7,4 tampón de liberación, y la muestra se cargó hasta 1,00 mL. Se transfirieron dos alícuotas (300 μ L cada una) a tubos de preparación de muestras estériles, se cargaron hasta 1,5 mL y se incubaron a 37°C. Las muestras se tomaron en intervalos de tiempo y se analizaron por cromatografía de exclusión de tamaño. Las señales de UV correspondientes a productos de degradación solubles en agua liberados por el hidrogel, que comprendían uno o más restos de cadenas principales (correspondientes a grupos funcionales reactivos), se integraron y trazaron contra el tiempo de incubación, véase Fig 8.

Ejemplo 21

Capacidad de inyección del profármaco insulina-conector-hidrogel

Se usaron 5 mL del profármaco de insulina-conector-hidrogel 11dc (distribución del tamaño de perla de 32–75 μ m, 18 mg insulina/ml) en pH 5,0 ácido succínico/tris (10 mM, 40 g/L manitol; 10 g/L dihidrato de trealosa; 0,05% TWEEN-20). La suspensión de profármaco de insulina-conector-hidrogel se cargó a una jeringa de 1 mL (57 mm de longitud) con una aguja de 20 G. La aguja de 20 G se reemplazó por una aguja de 30 G y se dispuso en el montaje de la jeringa (Aqua Computer GmbH&Co. KG), y la medición comenzó con una velocidad de pistón de 172 mm/min (equivale a μ L/s) (prueba de fuerza: Multitest 1-d, software de registro de datos: EvaluatEmperor Lite, Versión 1.16-015, Forge Gauge: BFG 200 N (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 nueva muestra del

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, usando 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:

5	AcOH	ácido acético
	AcOEt	acetato de etilo
	Aib	ácido 2-aminoisobutírico
	Bn	bencilo
	Boc	t-butiloxicarbonilo
10	COMU	hexafluorofosfato de (1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminox)dimetilamino-morfolino-carbenio
	DBU	1,3-diazabicyclo[5,4,0]undeceno
	DCC	N,N,-diciclohexilcarbodiimida
15	DCM	diclorometano
	DIEA	diisopropiletilamina
	DMAP	dimetilamino-piridina
	DMF	N,N-dimetilformamida
	Dmob	2,4-dimetoxibencilo
20	DMSO	dimetilsulfóxido
	EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
	EDTA	ácido etilendiaminatetraacético
	eq	equivalente estequiométrico
	ESI-MS	espectrometría de masas de
25		ionización por electropulverización
	EtOH	etanol
	Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo

	HATU	hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio
	HFIP	hexafluoroisopropanol
	HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
5	HOBt	N-hidroxibenzotriazol
	iPrOH	2-propanol
	LCMS	espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida
	Mal	3-maleimido-propilo
10	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
15	MeOH	metanol
	Mmt	4-metoxitritilo
	MS	espectro de masas / espectrometría de masas
	MTBE	éter de metilo y <i>terc</i> -butilo
	PM	peso molecular
20	n.d.	no determinado
	NHS	N-hidroxi-succinimida
	OD	densidad óptica
	OBu	butiloxi
	OtBu	<i>terc</i> .-butiloxi
25	PEG	polietilenglicol
	Phth	ftal-
	PyBOP	hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitris-pirrolidino-fosfonio
30	RP-HPLC	cromatografía de líquidos de alto rendimiento de fase inversa
	rpm	revoluciones por minuto
	TA	temperatura ambiente
	SEC	cromatografía por exclusión de tamaños
	Su	succinimidilo
35	TCP	resina de cloruro de 2-clorotritilo

	TES	triethylsilano
	TFA	ácido trifluoroacético
	THF	tetrahidrofurano
	TMEDA	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
5	Tmob	2,4,6-trimetoxibencilo
	Trt	trifenilmetilo, tritilo
	UPLC	cromatografía líquida de ultrapresión
	UV	ultravioleta
	VIS	visual
10		

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de insulina en una concentración suficiente para mantener un nivel terapéuticamente eficaz del compuesto de insulina en el plasma sanguíneo durante por lo menos 3 días, caracterizada porque tiene un perfil de farmacocinética *in vivo* que prácticamente no exhibe absorción rápida del compuesto de insulina.
2. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de insulina en una concentración de por lo menos 10 mg/ml, caracterizada porque tiene un perfil de farmacocinética *in vivo* que prácticamente no exhibe absorción rápida del compuesto de insulina.
3. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de insulina en una concentración de por lo menos 11 mg/mL que se han de administrar en una sola dosis de por lo menos 10 mg del compuesto de insulina.
4. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la concentración del compuesto de insulina es de por lo menos 11 mg/ml, tal como de 11 mg/ml a 35 mg/ml.
5. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizada por exhibir una relación valle-pico inferior a 2, tal como inferior a 1,75, inferior a 1,5 o inferior a 1,25.
6. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizada por una liberación continua de un compuesto de insulina estructuralmente intacta durante todo el periodo de tiempo entre las administraciones.
7. La composición según la reivindicación 6, en la que todo el periodo de tiempo entre las administraciones es de por lo menos aproximadamente 80 horas, tal como por lo menos aproximadamente 110 horas, típicamente por lo menos una semana.

8. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el compuesto de insulina es un profármaco.

5 9. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que el compuesto de insulina está totalmente contenido en un medicamento de liberación lenta, típicamente un gel polimérico, tal como un hidrogel, por ejemplo, una matriz polimérica bien hidratada.

10 10. La composición según la reivindicación 9, en la que el compuesto de insulina está covalentemente unido en el medicamento de absorción lenta, típicamente el gel polimérico, tal como el hidrogel, por ejemplo, la matriz polimérica bien hidratada.

15 11. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, caracterizada por ser administrada por inyección, tal como subcutánea o intramuscular.

20 12. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que el compuesto de insulina se selecciona entre insulina humana, insulina glargina, insulina detemir, insulina lispro, insulina aspart, insulina glulisina o su profármaco.

25 13. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que la concentración pico se alcanza dentro de las primeras 24 horas de administración, tal como dentro de las primeras 12 horas de administración, p. ej., dentro de las primeras 6 horas de administración.

14. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a -13, que además comprende un compuesto GLP-1.

30 15. Uso de un compuesto de insulina para preparar una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno asociado con deficiencia de insulina, donde la prevención o el tratamiento con un compuesto de insulina resulta beneficioso, como hiperglucemia, pre-diabetes, intolerancia a la glucosa, diabetes de tipo I,
35 diabetes de tipo II, síndrome X.

16. Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la que la composición farmacéutica es seca.

17. Una composición farmacéutica según la reivindicación 16, en la que
5 la composición farmacéutica se seca por liofilización.

18. Una composición según la reivindicación 16 o 17, 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
10 días en una aplicación.

19. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, 16-18, que es una composición de una sola dosis.

20. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, 16-18, que es una composición de múltiples dosis.

21. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, 16-20, caracterizada porque contiene uno o más agentes biológicamente activos
20 adicionales, o bien en su forma libre; como un profármaco, especialmente un profármaco de hidrogel; y donde el agente o agentes biológicamente activos adicionales se seleccionan del grupo que consiste en sulfonilureas, tales como por ejemplo clorpropamida, tolazamida, tolbutamida, gliburida, glipizida, glimepirida y similares; meglitinidas, tales como, por ejemplo, repaglinida; péptido-1 análogo a
25 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 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-
30 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, targeptina, ácido 9-cis-retinoico, y similares; otros agentes sensibilizadores de insulina, tales como por ejemplo, INS-1, inhibidores de PTP-1B, inhibidores de GSK3, inhibidores de glicógeno fosforilasa, inhibidores de fructosa-1,6-bisfosfatasa, y
35 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 aminoácidos; moléculas pequeñas que imitan a la insulina, incluyendo, pero sin limitar, L-783281, TE-17411, y similares; Inhibidores del co-transportador de Na-glucosa, tales como T-1095, T-1095A, phlorizen 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 la lipasa pancreática; sibutramina; norepinefrina y dopamina; hormona del crecimiento, IGF-1, factor de liberación de la hormona del crecimiento; moduladores de oxintomodulina y grelina; supresores del apetito tales como benzfetamina, fenmetrazina, fentermina, dietilpropión, mazindol, sibutramina, fenilpropanolamina o efedrina; supresores del apetito tales como quipazina, fluoxetina, sertralina, fenfluramina o dexfenfluramina; agentes supresores del apetito tales como apomorfina; supresores del apetito tales como 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; moduladores del receptor de melanocortina-1, 3 y 4; agonistas de colecitoquinina; compuestos miméticos del péptido-1 análogo al glucagón como por ejemplo exendina; andrógenos tales como deshidroepiandrosterona y derivados tales como etiolandiona; 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.

22. Un envase que comprende la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, 16-21.

23. Un envase según la reivindicación 22, donde el envase es una jeringa de doble cámara.

24. Una suspensión que comprende la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, 18-21.

25. Un método para preparar una suspensión según la reivindicación 24, que comprende las etapas de reconstituir la composición farmacéutica seca según las reivindicaciones 16 o 17, añadiendo la disolución de reconstitución.

5 26. Un kit de partes que comprende una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, 16-21 y un envase para administración de la composición.

10 27. Un kit de partes, que comprende una aguja y un envase que contiene la disolución de reconstitución, y la composición seca según la reivindicación 16 o 17 para uso con la aguja.

15 28. Un kit de partes según la reivindicación 27, en el que el envase es una jeringa de doble cámara, y donde una de las dos cámaras de la jeringa de doble cámara contiene la disolución para reconstitución.

 29. Un kit de partes según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, en el que la composición se inyecta a través de una aguja.

20 30. Un kit de partes según la reivindicación 29, en el que la aguja tiene un diámetro interno de menos de 300 μm .

 31. Un kit de partes según la reivindicación 29, en el que la aguja tiene un diámetro interno de menos de 225 μm .

25 32. Un kit de partes según la reivindicación 29, en el que la aguja tiene un diámetro interno de menos de 175 μm .

Resumen

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de insulina en una concentración suficiente para mantener un nivel terapéuticamente eficaz del compuesto de insulina en el plasma sanguíneo durante por lo menos 3 días, caracterizada porque tiene un perfil de farmacocinética *in vivo* que prácticamente no exhibe absorción rápida del compuesto de insulina. La presente invención se refiere además al uso de un compuesto de insulina para preparar dicha composición farmacéutica, como también a un kit de partes que comprende dicha composición farmacéutica.

1/10

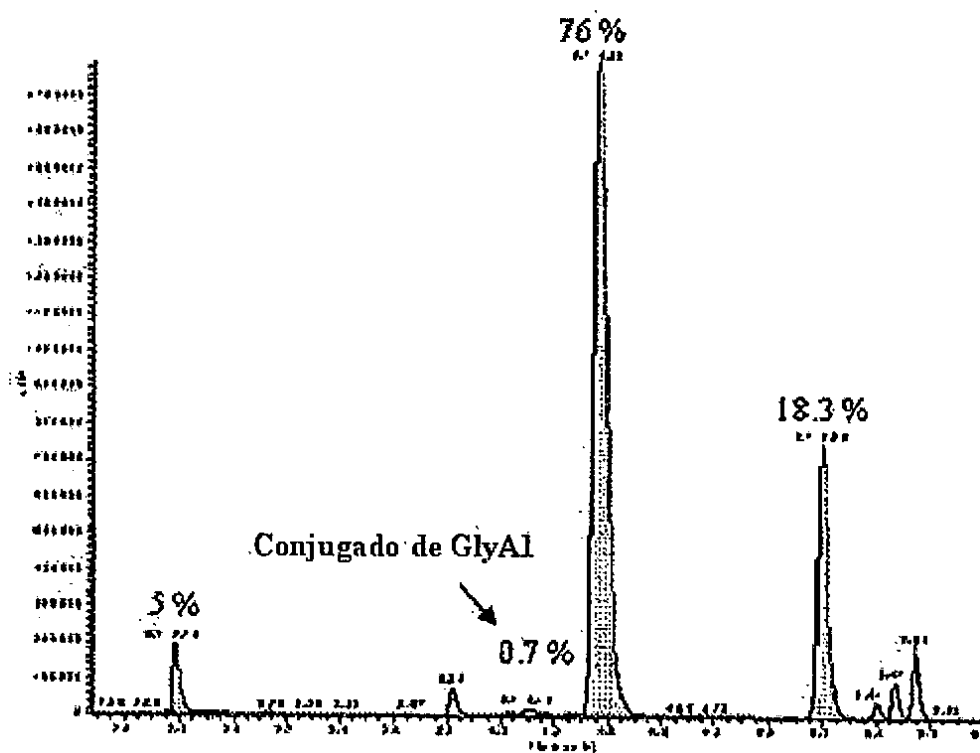


Fig. 1a

2/10

Conjugado de LysB28

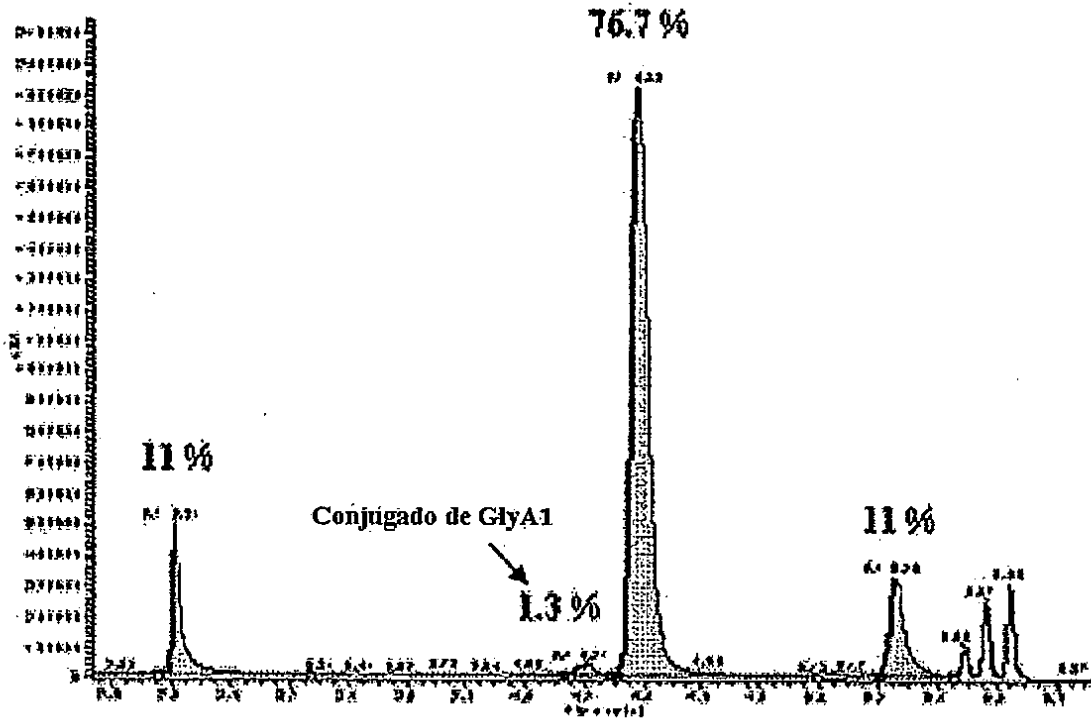


Fig. 1b

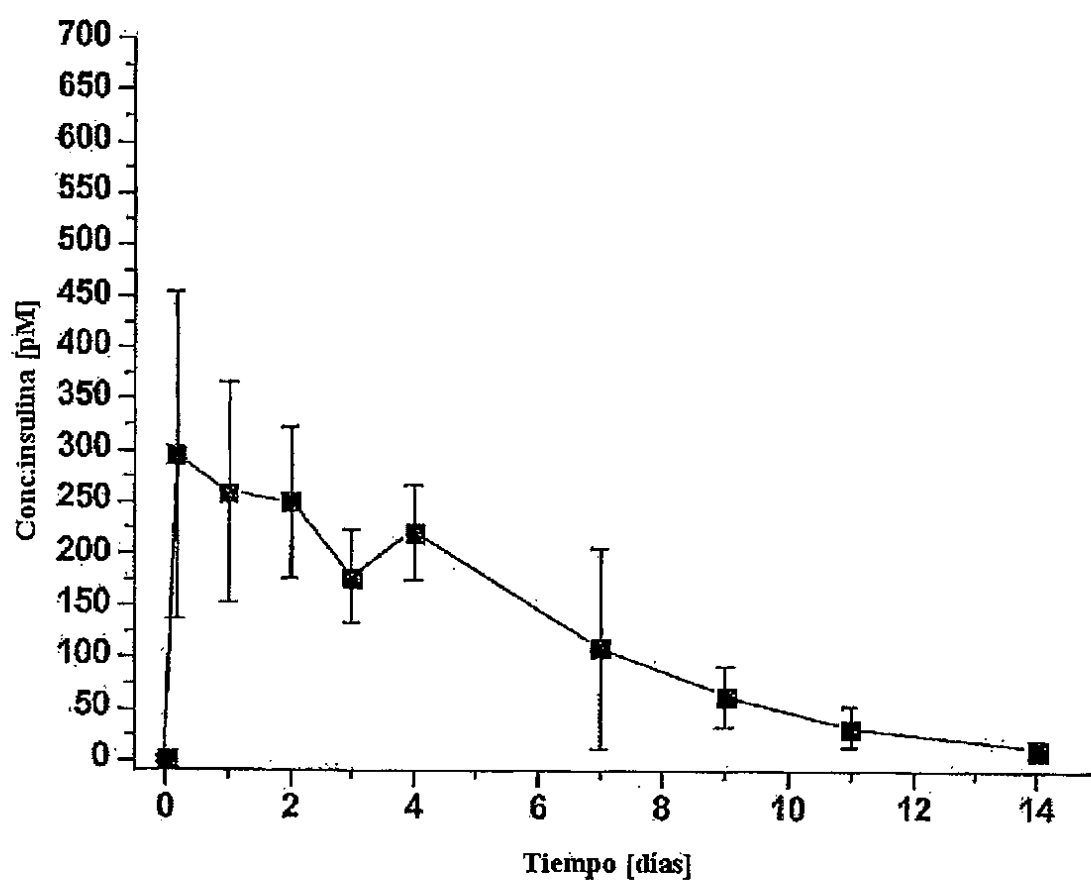


Fig. 2

4/10

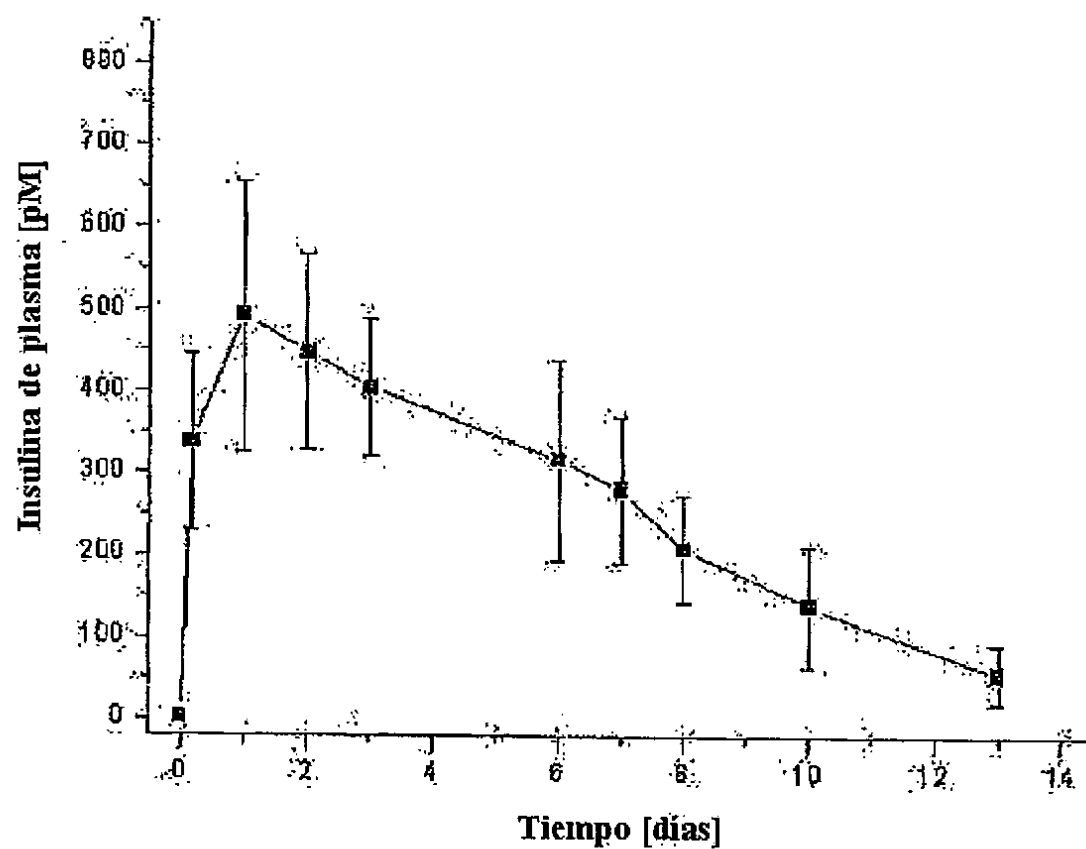


Fig. 3

5/10

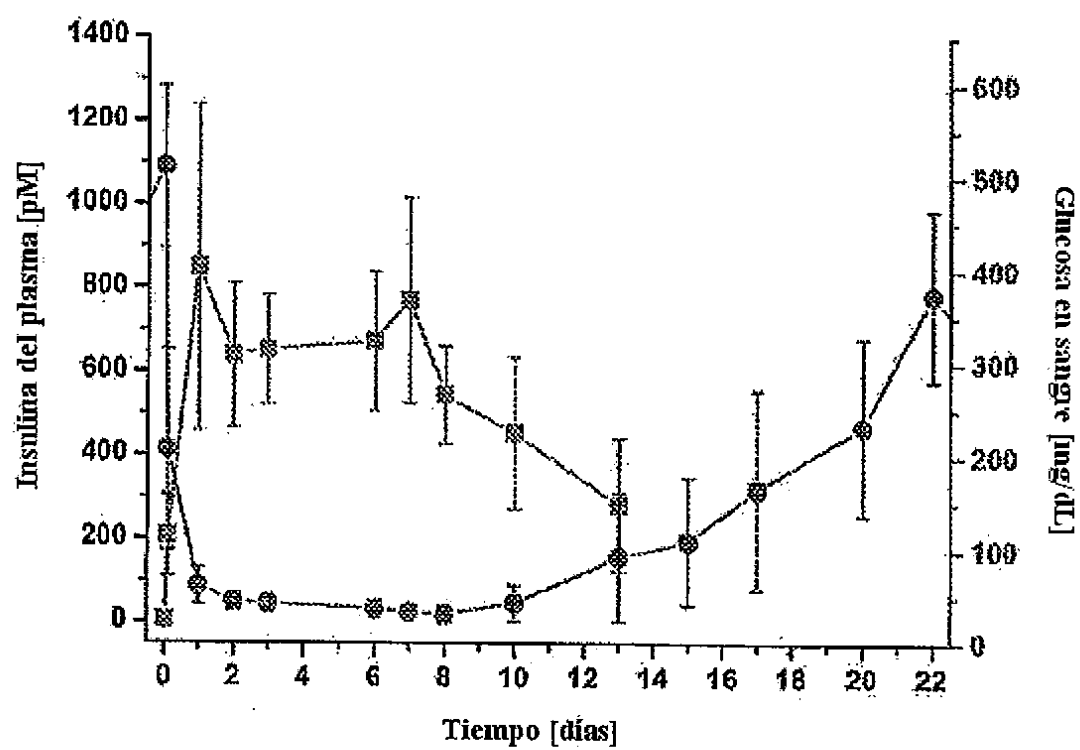


Fig. 4

6/10

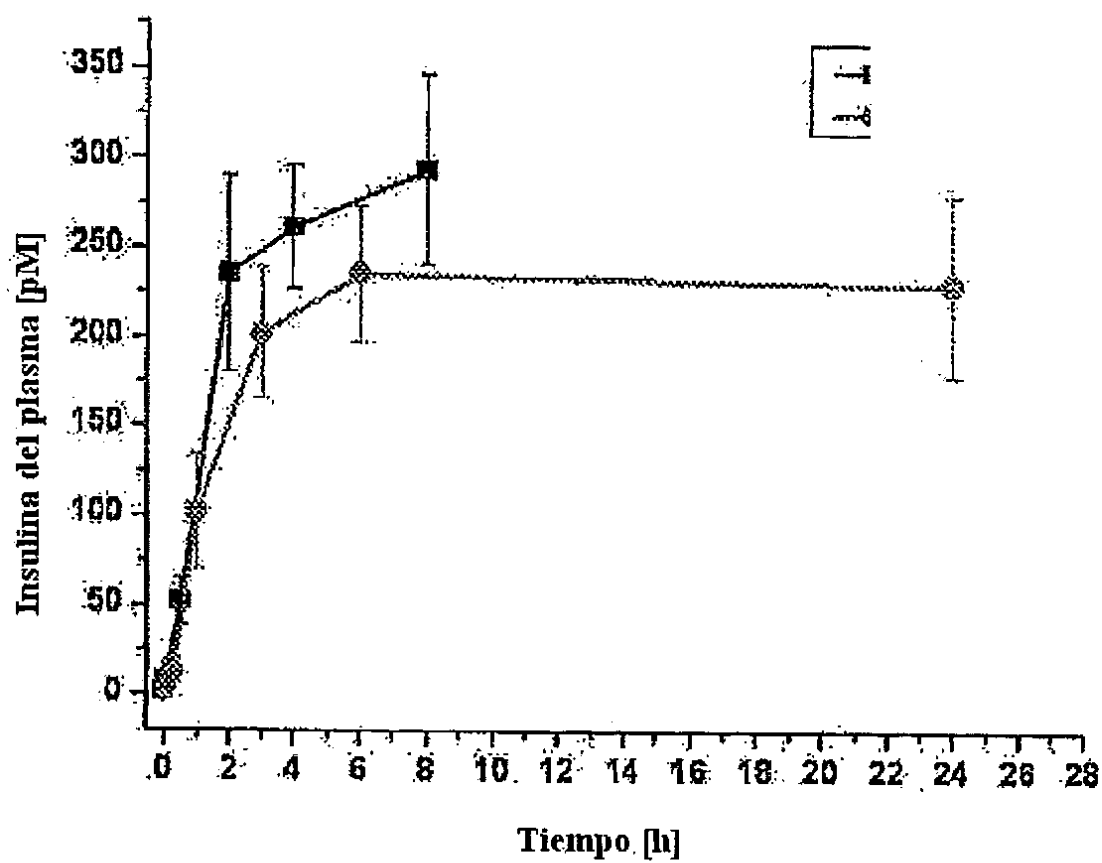


Fig. 5

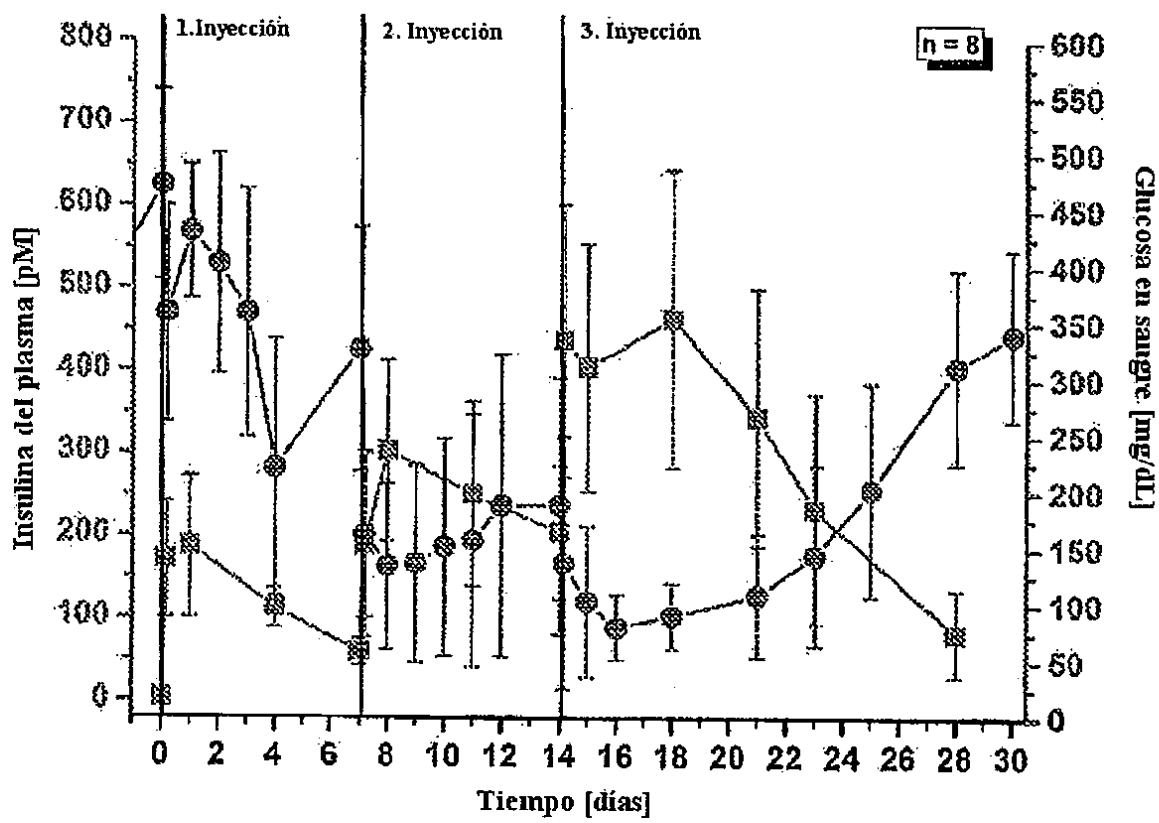


Fig. 6

8/10

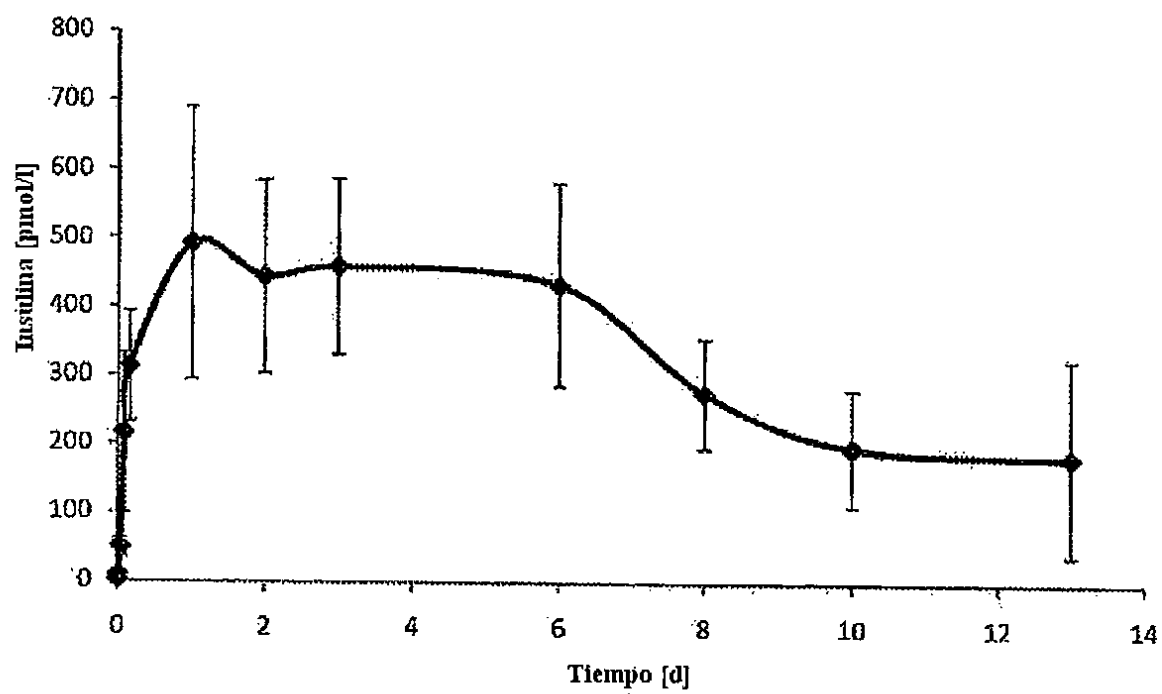


Fig.7

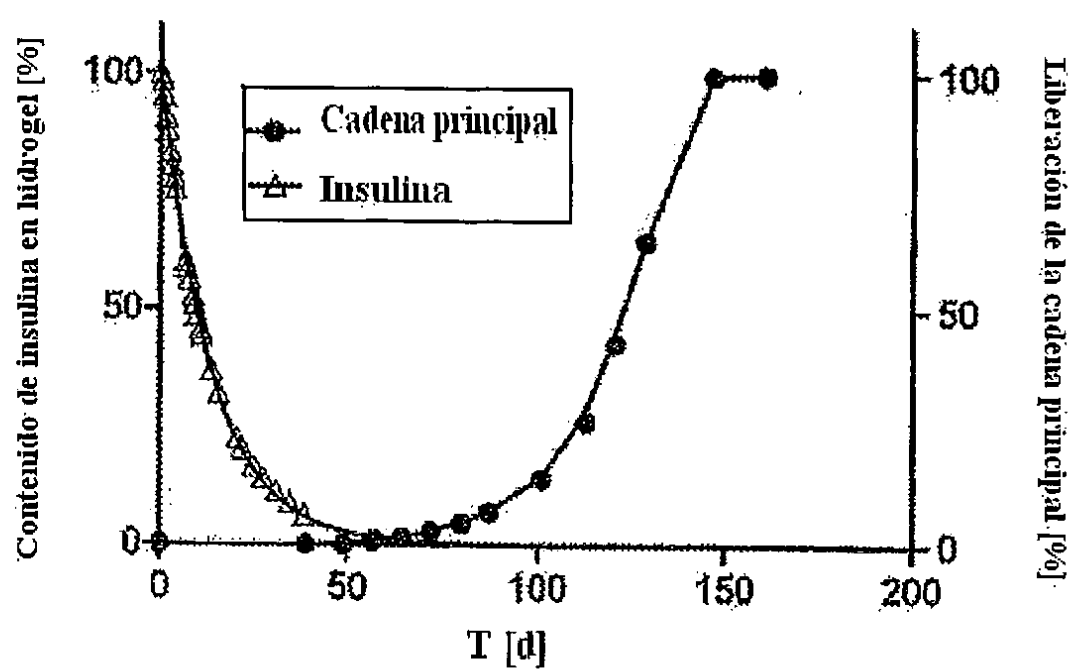


Fig. 8

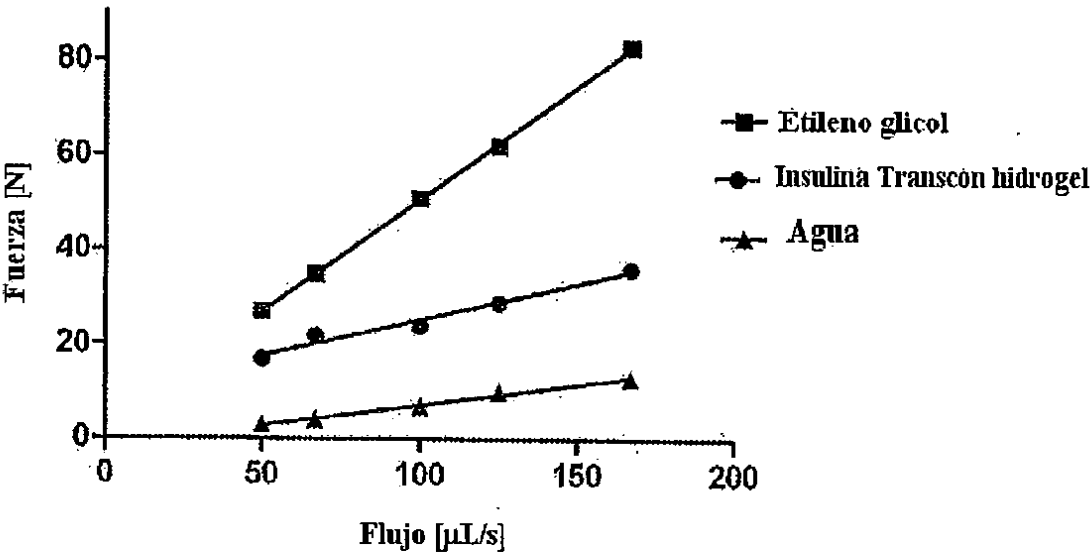


Fig. 9

 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) KENNETT SPROGØE, FELIX CLEEMANN, ULRICH HERSEL, SILVIA KADEN-VAGT, TORBEN LESSMANN, HARALD RAU, THOMAS WEGGE					
(74) Apoderado: DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO					
(30) Prioridad	(31)	No. Prioridad	(32)	Fecha	(33) País
		09167017.4		31/07/2009	EP
		09179337.2		15/12/2009	EP
		09179827.2		18/12/2009	EP
(85) Fecha inicio fase nacional:				(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 30/07/2010 No. de solicitud PCT/EP2010/061160				Fecha: 03/02/2011 N° publicación: WO 2011/012719 A1	
(54) Título: COMPOSICION DE INSULINA DE ACCION PROLONGADA					

 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>País</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td>09167017.4</td> <td></td> <td>31/07/2009</td> <td></td> <td>EP</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>09179337.2</td> <td></td> <td>15/12/2009</td> <td></td> <td>EP</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>09179827.2</td> <td></td> <td>18/12/2009</td> <td></td> <td>EP</td> </tr> </tbody> </table>		(30) Prioridad	(31)	N° Prioridad	(32)	Fecha	(33)	País			09167017.4		31/07/2009		EP			09179337.2		15/12/2009		EP			09179827.2		18/12/2009		EP	(51) int. Cl.: (71) Solicitante(s) SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH (72) Inventor(es) KENNETT SPROGØE FELIX CLEEMANN ULRICH HERSEL Y OTROS (74) Apoderado: MARGARITA CASTELLANOS A.	
(30) Prioridad	(31)	N° Prioridad	(32)	Fecha	(33)	País																									
		09167017.4		31/07/2009		EP																									
		09179337.2		15/12/2009		EP																									
		09179827.2		18/12/2009		EP																									
(85) Fecha límite 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/EP2010/061160		(87) Publicación internacional Fecha: 03/02/2011 N° publicación: WO 2011/012719 A1																													
(54) Título: COMPOSICION DE INSULINA DE ACCION PROLONGADA																															

Reivindicación(es):

- Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de insulina en una concentración suficiente para mantener un nivel terapéuticamente eficaz del compuesto de insulina en el plasma sanguíneo durante por lo menos 3 días, caracterizada porque tiene un perfil de farmacocinética *in vivo* que prácticamente no exhibe absorción rápida del compuesto de insulina.
- Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de insulina en una concentración de por lo menos 10 mg/ml, caracterizada porque tiene un perfil de farmacocinética *in vivo* que prácticamente no exhibe absorción rápida del compuesto de insulina.
- Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de insulina en una concentración de por lo menos 11 mg/mL que se han de administrar en una sola dosis de por lo menos 10 mg del compuesto de insulina.
- La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la concentración del compuesto de insulina es de por lo menos 11 mg/ml, tal como de 11 mg/ml a 35 mg/ml.
- La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizada por exhibir una relación valle-pico inferior a 2, tal como inferior a 1,75, inferior a 1,5 o inferior a 1,25.
- La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizada por una liberación continua de un compuesto de insulina estructuralmente intacta durante todo el periodo de tiempo entre las administraciones.
- La composición según la reivindicación 6, en la que todo el periodo de tiempo entre las administraciones es de por lo menos aproximadamente 80 horas, tal como por lo menos aproximadamente 110 horas, típicamente por lo menos una semana.
- La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el compuesto de insulina es un profármaco.
- La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que el compuesto de insulina está totalmente contenido en un medicamento de liberación lenta, típicamente un gel polimérico, tal como un hidrogel, por ejemplo, una matriz polimérica bien hidratada.

10. La composición según la reivindicación 9, en la que el compuesto de insulina está covalentemente unido en el medicamento de absorción lenta, típicamente el gel polimérico, tal como el hidrogel, por ejemplo, la matriz polimérica bien hidratada.

11. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, caracterizada por ser administrada por inyección, tal como subcutánea o intramuscular.

12. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que el compuesto de insulina se selecciona entre insulina humana, insulina glargina, insulina detemir, insulina lispro, insulina aspart, insulina glulisina o su profármaco.

13. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que la concentración pico se alcanza dentro de las primeras 24 horas de administración, tal como dentro de las primeras 12 horas de administración, p. ej., dentro de las primeras 6 horas de administración.

14. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a -13, que además comprende un compuesto GLP-1.

15. Uso de un compuesto de insulina para preparar una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno asociado con deficiencia de insulina, donde la prevención o el tratamiento con un compuesto de insulina resulta beneficioso, como hiperglucemia, pre-diabetes, intolerancia a la glucosa, diabetes de tipo I, diabetes de tipo II, síndrome X.

16. Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la que la composición farmacéutica es seca.

17. Una composición farmacéutica según la reivindicación 16, en la que la composición farmacéutica se seca por liofilización.

18. Una composición según la reivindicación 16 o 17, 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.

...

 SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 12-011796- -00000-0000 Fecha: 2012-01-26 14:16:55 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 260 <td> ADMIS </td>	ADMIS
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 ☐	