

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 955**

51 Int. Cl.:
C07K 14/62 (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10168840 .6**
96 Fecha de presentación: **27.02.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2256129**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2010**

54 Título: **Derivados de insulina**

30 Prioridad:
27.02.2006 EP 06110441
01.08.2006 EP 06118253

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.10.2012

73 Titular/es:
NOVO NORDISK A/S
Corporate Patents, Novo Allé
2880 Bagsvaerd, DK

72 Inventor/es:
Fynbo, Charlotte Harkjær;
Jonassen, Ib;
Kjeldsen, Thomas Berglum;
Madsen, Peter;
Garibay, Patrick William;
Kodra, Janos Tibor;
Hoeg-Jensen, Thomas y
Tagmose, Tina Møller

74 Agente/Representante:
Tomas Gil, Tesifonte Enrique

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 387 955 T3

DESCRIPCIÓN

Derivados de insulina

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a derivados de insulina humana nuevos que son solubles a valores de pH fisiológico y tienen un perfil prolongado de acción. La invención también se refiere a las composiciones farmacéuticas que los contienen, a un método de tratamiento de la diabetes e hiperglicemia usando los derivados insulínicos de la invención y al uso de tales derivados insulínicos en el tratamiento de la diabetes y la hiperglicemia.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 [0002] Habitualmente, el tratamiento de la diabetes, tanto de la diabetes de tipo 1 como la diabetes de tipo 2, se basa cada vez más en el denominado tratamiento la insulina intensivo. Según este régimen, los pacientes se tratan con múltiples inyecciones de insulina diarias comprendiendo una o dos inyecciones diarias de insulina de larga acción para cubrir el requisito de insulina basal suplementado por inyecciones de bolo de una insulina de acción rápida para cubrir el requisito de insulina relacionado con las comidas.

20 [0003] Composiciones de insulina de larga acción son conocidas en la técnica. Así, un tipo principal de composiciones de insulina de larga acción comprende suspensiones inyectables acuosas de cristales de insulina o insulina amorfa. En estas composiciones, los compuestos de insulina utilizados típicamente son insulina protamínica, insulina cíclica o insulina cíclica protamínica.

25 [0004] Inconvenientes determinados están asociados con el uso de suspensiones de insulina. Así, para asegurar una dosificación precisa, las partículas de insulina deben ser suspendidas homogéneamente por agitación suave antes de que un volumen definido de la suspensión se retire de un frasco o se expulse de un cartucho. También, para el almacenamiento de suspensiones de insulina, la temperatura debe ser mantenida dentro de límites más estrechos que para soluciones de insulina para evitar la formación de nódulos o coagulación.

30 [0005] Otro tipo de composiciones de insulina de larga actuación son soluciones con un valor de pH por debajo del pH fisiológico donde la insulina precipitará debido al aumento en el valor de pH cuando la solución es inyectada. Un inconveniente de estas soluciones es que la distribución por tamaño de partícula del precipitado formado en el tejido con la inyección, y por tanto el perfil de liberación de la medicación, depende de manera algo imprevisible del flujo sanguíneo en el sitio de inyección y de otros parámetros. Otro inconveniente es que las partículas sólidas de la insulina pueden actuar como un irritante local que causa inflamación del tejido en el sitio de inyección.

35 [0006] La insulina humana tiene tres grupos amino primarios: el grupo N-terminal de la cadena A y de la cadena B y el grupo ϵ -amino de LysB29. Diferentes derivados insulínicos que se sustituyen en uno o más de estos grupos se conocen en la técnica anterior.

40 [0007] WO 95/07931 (Novo Nordisk A/S) divulga derivados de insulina humana donde el grupo ϵ -amino de LysB29 tiene un sustituyente lipofílico. Estos derivados insulínicos tienen un perfil prolongado de acción y son solubles a valores de pH fisiológico.

45 [0008] La solicitud de patente internacional WO 96/29344 concierne a un derivado insulínico, donde una cadena lateral lipofílica se fija al grupo amino N-terminal de la cadena B o un residuo Lys en la posición B26-B29 de la molécula de insulina progenitora.

50 [0009] WO 97/31022 divulga derivados insulínicos donde el grupo α -amino del grupo N-terminal de la cadena B y/o el grupo ϵ -amino de Lys en la posición B28; B29 o B30 tiene un sustituyente de la fórmula CO-W-COOH donde W es un grupo hidrocarburo de cadena larga que tiene de 12 a 22 átomos de carbono. Estos derivados insulínicos tienen un perfil prolongado de acción y son solubles a valores de pH fisiológico.

55 [0010] WO 03/48195 divulga derivados insulínicos con un sensor de glucosa incorporado y una fracción de polioli.

[0011] WO99/65941 divulga un análogo de insulina teniendo conjugado de manera covalente 3,3'.5'-triiodotiroxina.

60 [0012] WO 96/15803 divulga un proceso para la acilación de proteínas.

[0013] WO96/29344 divulga derivados insulínicos donde un grupo lipofílico con de 12 a 40 átomos de carbono fijados al

grupo α -amino del aminoácido N-terminal en la cadena B o grupo de carboxi del aminoácido C-terminal en la cadena B.

[0014] Bhatnagar et al divulga variantes moleculares y derivados de insulina para control mejorado glucémico en la diabetes (Biophys. And Mol. Bio vol. 91, n°. 3, 2005).

[0015] Hashimoto M et al divulga una síntesis de derivados de palmitoil de insulina y sus actividades biológicas (Pharm res, vol 6, n°. 2 1989, págs 171-176)

[0016] Otro derivado insulínico se describe en la solicitud de patente internacional. La solicitud de patente internacional WO 2005/012347 describe un derivado insulínico con una cadena lateral fijada a bien el grupo α -amino del residuo aminoácido N-terminal de la cadena B o bien al ácido ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina progenitora.

[0017] Desafortunadamente, muchos diabéticos son reacios a asumir terapia intensiva debido a la incomodidad asociada a las muchas inyecciones requeridas para mantener un control minucioso de los niveles de glucosa. Este tipo de terapia puede ser tanto psicológicamente como físicamente doloroso. Tras la administración oral, la insulina es rápidamente degradada en el tracto gastrointestinal y no es absorbida en el flujo sanguíneo. Por lo tanto, muchos investigadores han estudiado vías alternativas para la administración de insulina, tales como, vías orales, rectales, transdérmicas, y nasales. Hasta aquí, no obstante, estas vías de administración no han resultado en una absorción de insulina eficaz.

[0018] El suministro pulmonar eficaz de una proteína depende de la capacidad para suministrar la proteína al epitelio alveolar del pulmón profundo. Las proteínas que se depositan en el epitelio de la vía respiratoria superior no se absorben a una extensión significativa. Esto se debe al moco suprayacente que es aproximadamente 30-40 μ m de grueso y actúa como una barrera para la absorción. Además, las proteínas depositadas en este epitelio se esclarecen por transporte mucociliar sobre las vías respiratorias y luego se eliminan por el tracto gastrointestinal. Este mecanismo también contribuye sustancialmente a la absorción baja de algunas partículas de proteína. La medida en la que las proteínas no son absorbidas y en cambio se eliminan por estas vías depende de su solubilidad, su tamaño, al igual que otras características menos entendidas.

[0019] Continúa existiendo una necesidad de insulinas con un perfil de acción más prolongado que los derivados insulínicos conocidos hasta el momento y que al mismo tiempo sean solubles a valores de pH fisiológico y que tengan una potencia comparable a aquella de la insulina humana. Además, existe la necesidad de más formulaciones de insulina que estén bien adecuadas para la aplicación pulmonar.

[0020] La presente invención se dirige y alivia los problemas de la técnica anterior.

Resumen de la invención

[0021] La presente invención se basa en el reconocimiento de que la acilación de insulina se puede realizar en un residuo Lys presente en la cadena A o en un residuo Lys en la cadena B de una insulina progenitora.

[0022] Según la invención se proporciona un derivado insulínico comprendiendo una insulina progenitora y un sustituyente, donde el sustituyente es unido bien a un grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena A de la insulina progenitora en la posición A8, A9, A10, A12, A14, A15, A17, A18, A21, A22, A23 o A24 o a un grupo ϵ -amino de un residuo de Lys en la cadena B de la insulina progenitora en la posición B1, B2, B3, B4; B20; B21 o B22 a condición de que cuando B3 es Lys, entonces B29 no es Glu, donde el sustituyente es un grupo lipofílico que contiene de 4 a 40 átomos de carbono.

Definiciones

[0023] Con "**insulina desB30**", "**insulina humana desB30**" se entiende una insulina natural o un derivado análogo que carece del residuo de aminoácido B30. De forma similar, "**insulina humana desB29desB30**" o "**insulina desB29desB30**" significa una insulina natural o un derivado análogo que carece de los residuos de aminoácido B29 y B30.

[0024] Con "**B(1-29)**" y "**cadena B**" se entiende una cadena B de insulina natural o un derivado análogo que carece del residuo de aminoácido B30. "**A(1-21)**" y "**cadena A**" significa la cadena A de insulina natural o un análogo de la misma. "A(1-24)" significa una cadena A modificada, donde la cadena A ha sido extendida en el C-terminal con 3 aminoácidos codificables.

[0025] Con, "**B1**", "**A1**" etc. se entiende el residuo de aminoácido en la posición 1 en la cadena B de insulina (contado desde el extremo N-terminal) y el residuo de aminoácido en la posición 1 en la cadena A de insulina (contado desde el extremo N-terminal), respectivamente. El residuo de aminoácido en una posición específica puede también ser denominado como por ejemplo PheB1 que significa que el residuo de aminoácido en la posición B1 es un residuo de fenilalanina.

[0026] Con "**insulina**" como se utiliza en este caso se entiende insulina humana con puentes disulfuro entre CysA7 y CysB7 y entre CysA20 y CysB19 y un puente disulfuro interno entre CysA6 y CysA11, insulina porcina e insulina bovina.

5 [0027] "**POT**" es el gen de la triosa fosfato isomerasa de *Schizosaccharomyces pombe*.

[0028] Por un "líder" se entiende una secuencia de aminoácidos que consiste en un prepéptido (el péptido señal) y un propéptido.

10 [0029] El término "péptido señal" se entiende que significa un prepéptido que está presente como una secuencia N-terminal en la forma precursora de una proteína. La función del péptido señal es la de permitir que la proteína heteróloga facilite la translocación en el retículo endoplásmico. El péptido señal es normalmente cortado durante este proceso. El péptido señal puede ser heterólogo u homólogo al organismo de levadura que produce la proteína. Varios péptidos señal que se pueden usar con el constructo de ADN de la invención incluyendo el péptido señal de la proteasa aspártica 3 (YAP3) o cualquier análogo funcional (Egel-Mitani et al. (1990) Yeast 6:127-137 y US 5,726,038) y el factor α señal del gen MF α 1 (Thomer 15 (1981) en The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Strathern et al., eds., págs. 143-180, Cold Spring Harbor Laboratory, NY y US 4,870,00.

20 [0030] El término "**propéptido**" significa una secuencia polipeptídica cuya función es la de permitir que el polipéptido expresado sea dirigido del retículo endoplásmico al aparato de Golgi y además a una vesícula secretora para secreción en el medio de cultivo (es decir, exportación del polipéptido a través de la pared celular o al menos a través de la membrana celular en el espacio periplásmico de la célula de levadura). El propéptido puede ser el propéptido factor α de levadura, véase US 4,546,082 y 4,870,008. Alternativamente, el propéptido puede ser un propéptido sintético, es de decir un propéptido no encontrado en la naturaleza. Propéptidos adecuados sintéticos son aquellos descritos en US 5,395,922, 25 5,795,746, 5,162,498 y WO 98/32867. El propéptido puede contener un sitio de procesamiento de endopeptidasa en el extremo C-terminal, tal como una secuencia Lys-Arg o cualquier análogo funcional del mismo.

[0031] Por "**precursor de insulina**" como se utiliza en este caso se entiende un único polipéptido de cadena que después de la escisión con una proteasa apropiada, por ejemplo tripsina, produce una insulina de doble cadena, análogo de insulina, 30 o derivado insulínico. Un ejemplo de tal precursor de insulina es "**B'A**", que es un precursor de insulina de cadena única donde el residuo de aminoácido C-terminal de la cadena B está directamente unido al residuo de aminoácido A1 en la cadena A. Un ejemplo específico de tal precursor de insulina de B'A es LysA9 ArgB29 desB30 B'A, donde ArgB29 está directamente conectado a GlyA1.

35 [0032] Por "**análogo de insulina**" como se utiliza en este caso se entiende un polipéptido que tiene una estructura molecular que formalmente se puede derivar de la estructura de una insulina de origen natural, por ejemplo de insulina humana, eliminando y/o substituyendo al menos un residuo de aminoácido que se origina en la insulina natural y/o añadiendo al menos un residuo de aminoácido. Los residuos de aminoácidos sustituidos y/o adicionados pueden bien ser 40 residuos de aminoácidos codificables u otros residuos de aminoácidos de origen natural o residuos de aminoácidos puramente sintéticos.

[0033] Ejemplos de análogos de insulina son análogos de insulina humana desB30; análogos de insulina donde uno o 45 ambos de B1 y B2 han sido delecionados; análogos de insulina donde la cadena A y/o la cadena B tienen una extensión N-terminal y análogos de insulina donde la cadena A y/o la cadena B tienen una extensión C-terminal. Así uno o dos Arg se pueden adicionar a la posición B1. También uno o más de B26-B30 puede haber sido delecionado.

[0034] Por "**insulina progenitora**" se entiende un análogo de insulina conteniendo sólo un residuo de Lys en la cadena A y/o la cadena B, cuyo residuo de Lys no está presente en la posición B29.

50 [0035] Ejemplos específicos de insulinas progenitoras son insulina humana LysA9 ArgB29 desB30 e insulina humana LysB22 ArgB29 desB30.

[0036] Por "**derivado insulínico**," como se utiliza aquí se entiende una insulina de origen natural o un análogo de insulina que ha sido modificado químicamente, por ejemplo introduciendo un sustituyente en una o más posiciones del esqueleto de 55 insulina o por oxidación o reducción de los grupos de los residuos de aminoácidos en la insulina o por conversión de un grupo carboxílico libre a un grupo éster o por acilación de un grupo amino libre o un grupo hidroxilo.

[0037] Los derivados de insulina de la invención son denominados según la regla siguiente: la secuencia comienza con la modificación química, continúa con la cadena A, y termina con la cadena B. Los residuos de aminoácido son denominados 60 después de sus equivalentes respectivos en la insulina humana y las mutaciones y acilaciones son explícitamente descritas mientras que los residuos de aminoácidos inalterados en las cadenas A y B no son mencionados. Por ejemplo, una insulina

que tiene las siguientes mutaciones en comparación con insulina humana LysA9; ArgB29; desB30 y se acila con miristilo en el N° de LysA9 es denominada insulina humana LysA9 ArgB29 desB30 N^{eA9}-miristilo.

5 [0038] Cuando un derivado insulínico según la invención se declara "soluble a los valores de pH fisiológico" esto significa que el derivado insulínico se puede usar para preparar composiciones de insulina que son completamente disueltas a valores de pH fisiológico. Tal solubilidad favorable puede bien deberse a las propiedades inherentes del derivado insulínico solo o un resultado de una interacción favorable entre el derivado insulínico y uno o más ingredientes contenidos en el vehículo.

10 Abreviaturas para aminoácidos:

[0039]

Aminoácido	Código de tres letras
Glicina	Gly
Prolina	Pro
Alanina	Ala
Valina	Val
Leucina	Leu
Isoleucina	Ile
Metionina	Met
Cisteína	Cys
Fenilalanina	Phe
Tirosina	Tyr
Triptófano	Trp
Histidina	His
Lisina	Lys
Arginina	Arg
Glutamina	Gln
Asparagina	Asn
Acido glutámico	Glu
Acido aspártico	Asp
Serina	Ser
Treonina	Thr

15 [0040] La expresión "**un residuo de aminoácido con un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral**" designa residuos de aminoácidos como Asp, Glu y hGlu. Los aminoácidos pueden estar bien en configuración L o D. Si no se especifica nada se entiende que el residuo de aminoácido está en la configuración L.

20 [0041] La expresión "**un residuo de aminoácido con una cadena lateral neutra**" designa residuos de aminoácido como Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro, Ser, Thr, Cys, Met, Tyr, Asn y Gln.

Abreviaturas usadas en los ejemplos:

[0042]

25

CV	Volumen de columna
EDTA	Ácido tetraacético de etilendiamina
HI	Insulina humana
HPLC	Cromatografía en fase líquida de alto rendimiento
HSA	Albúmina de suero humano
LC	Cromatografía en fase líquida
MALDI	Ionización/Desorción Láser Asistida por Matriz
MS	Espectrometría de masas
NMP	N-metil-2-pirrolidona
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro
RT	Temperatura ambiente
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño

SPA	Ensayo de proximidad de centelleo
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Vol%	Porcentaje en volumen
O.D.	Densidad óptica = absorbencia
Monómero X2	insulina humana AspB9 GluB27
hGlu	Ácido homo-glutámico
Su	N-succinimidilo

hGlu es ácido homoglutámico.

TFA: ácido trifluoracético

DMF: N,N-dimetilformamida

5 EtOAc: acetato de etilo

THF: tetrahidrofurano

TSTU: O-(N-succinimidil)-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato

DIPEA: diisopropiletilamina

α -Asp es la L-forma de $-\text{HNCH}(\text{CO}-)\text{CH}_2\text{COOH}$.

10 β -Asp es la L-forma de $-\text{HNCH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{CO}-$.

α -Glu es la L-forma de $-\text{HNCH}(\text{CO}-)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$.

γ -Glu es la L-forma de $-\text{HNCH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$.

α -hGlu es la L-forma de $-\text{HNCH}(\text{CO}-)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$.

δ -hGlu es la L-forma de $-\text{HNCH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$.

15 β -Ala es $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{COOH}$.

Sar es (N-metilglicina) sarcosina.

Descripción detallada de la invención

20 [0043] La presente invención concierne a un derivado insulínico comprendiendo una insulina progenitora y un sustituyente, donde el sustituyente es unido bien a un grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena A de la insulina progenitora en la posición A8, A9; A10; A12; A14; A15; A17; A18; A21; A22; A23 o A24 o a un grupo ϵ -amino de un residuo de Lys en la cadena B de la insulina progenitora en la posición B1, B2; B3, 84; B20; B21 o B22 a condición que cuando B3 es Lys, entonces B29 no sea Glu, donde el sustituyente es un grupo lipofílico con de 4 a 40 átomos de carbono.

25 [0044] En un aspecto el sustituyente del derivado insulínico según la invención se fija al grupo ϵ -amino del residuo de Lys presente en la posición A8 en la cadena A de la insulina progenitora.

30 [0045] En un aspecto el sustituyente del derivado insulínico se fija al grupo ϵ -amino del residuo de Lys presente en la posición A9 en la cadena A de la insulina progenitora.

[0046] En un aspecto el sustituyente del derivado insulínico se fija al grupo ϵ -amino del residuo de Lys presente en la posición A14 en la cadena A de la insulina progenitora.

35 [0047] En un aspecto el sustituyente del derivado insulínico se fija al grupo ϵ -amino del residuo de Lys presente en la posición A18 en la cadena A de la insulina progenitora.

[0048] En un aspecto el sustituyente del derivado insulínico se fija al grupo ϵ -amino del residuo de Lys presente en la posición A21 en la cadena A de la insulina progenitora.

40 [0049] En un aspecto el sustituyente del derivado insulínico se fija al grupo ϵ -amino del residuo de Lys presente en la posición A22 en la cadena A de la insulina progenitora.

45 [0050] En un aspecto el sustituyente del derivado insulínico según la invención se fija al grupo ϵ -amino del residuo de Lys presente en la posición A23 en la cadena A de la insulina progenitora.

[0051] En un aspecto el sustituyente del derivado insulínico según la invención se fija al grupo ϵ -amino del residuo de Lys presente en la posición A24 en la cadena A de la insulina progenitora.

50 [0052] El sustituyente en el residuo de lisina del derivado insulínico según la invención puede comprender un grupo lipofílico conteniendo de 6 a 40 átomos de carbono. Ejemplos de sustituyentes son grupos de acilo con de 6 a 40, por ejemplo 12 a 36, átomos de carbono.

[0053] Ejemplos de sustituyentes son grupos de acilo con de 12 a 36 átomos de carbono o sustituyentes lipofílicos en forma de grupos de acilo son los siguientes: $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n$ de Co^- , $(\text{NH}_2\text{-CO})-(\text{CH}_2)_n\text{-Co}$, $\text{HO}-(\text{CH}_2)_n$ de Co , donde $4 \leq n \leq 38$, por ejemplo donde $6 \leq n \leq 36$, $8 \leq n \leq 34$, $12 \leq n \leq 32$ o $12 \leq n \leq 28$.

5 [0054] En un aspecto de la invención el grupo de acilo es 5- α ácido litocólico o 5- β ácido litocólico.

[0055] En un aspecto el grupo de acilo es 5- α o 5- β isómeros de ácido cólico, ácido hiocólico, ácido deoxicólico, ácido quenodeoxicólico, ácido ursodesoxicólico, ácido hiodeoxicólico o ácido colánico.

10 [0056] En un aspecto el grupo de acilo es 5- α o 5- β isómeros de ácido dehidrolitocólico.

[0057] En un aspecto el grupo de acilo es ácido fusídico, un derivado de ácido fusídico o ácido glicirretínico.

15 [0058] En un aspecto el grupo de acilo se conecta a un residuo de lisina usando un enlazador de aminoácido. Según este aspecto el grupo acilo es ventajosamente conectado a un residuo de lisina por medio de un enlazador γ - o α -glutamil, o por medio de un enlazador β - o α -aspartil o por medio de un enlazador α -amido- γ -glutamil, o por medio de un enlazador α -amido- β -aspartil.

20 [0059] La fracción de insulina - en el presente texto también referida como la insulina progenitora - del derivado insulínico según la invención puede ser un análogo de insulina, que puede contener sólo un residuo de lisina, que no está presente en la posición B29 de la cadena B del análogo de insulina. Este residuo de lisina puede estar en una de las posiciones A8, A9; A10; A12; A14; A15; A17; A18; A21; A22; A23 o A24 en la cadena A de la insulina progenitora o a un grupo ϵ -amino de un residuo de Lys en la cadena B en la posición B1, B2, B3, B4; B20; B21 o B22 en la cadena B de la insulina progenitora.

25 [0060] La insulina progenitora puede por ejemplo ser insulina humana o insulina porcina, donde el residuo de Lys en posición B29 se sustituye y un residuo de Lys ha sido insertado en una posición en la cadena A o cadena B, cuya posición no es B29 de la cadena B.

30 [0061] En un aspecto el residuo de aminoácido en una de las posiciones A8, A9; A10; A12; A14; A15; A17; A18; A21; A22; A23 o A24 de la cadena A de la insulina progenitora es un residuo de Lys.

[0062] En un aspecto el residuo de aminoácido en una de las posiciones B1, B2, B3, B4; B20; B21 o B22 de la cadena B de la insulina progenitora es un residuo de Lys

35 [0063] En un grupo de análogos de insulina progenitora, el residuo de aminoácido en la posición B29 es Arg, Pro o Thr.

[0064] En un grupo de análogos de insulina progenitora, el residuo de aminoácido en la posición B1 y/o B30 ha sido deletado.

40 [0065] En un grupo de análogos de la insulina progenitora el residuo de aminoácido en la posición B29 es Arg, Pro o Thr y el residuo de aminoácido en una de las posiciones A8, A9; A10; A12; A14; A15; A17; A18; A21; A22; A23; A24, B1, B2, B3, B4; B20; B21 o B22 de la cadena A o B es Lys. Un ejemplo específico de este grupo es la insulina humana LysA17 ArgB29.

45 [0066] En un grupo de análogos de la insulina progenitora, los residuos de aminoácidos en la posición B30 han sido deletados y el residuo de aminoácidos en la posición B29 puede ser cualquier aminoácido codificable excepto Lys y el residuo de aminoácido en una de las posiciones A8, A9; A10; A12; A14; A15; A17; A18; A21 A22; A23; A24, B1, B2, B3, B4; B20; B21 o B22 de la cadena A o B es Lys, siempre que cuando Lys esté en la posición B3, entonces B29 no es Glu. Un ejemplo específico de este grupo de análogos de insulina progenitora es insulina humana LysA12 HisB29 desB30.

50 [0067] En un grupo de análogos de insulina progenitora, los residuos de aminoácidos en la posición B29 y B30 han sido deletados y el residuo de aminoácido en una de las posiciones A8, A9; A10; A12; A14; A15; A17; A18; A21; A22; A23; A24, B1, B2, B3, B4; B20; B21 o B22 de la cadena A o B es Lys. Un ejemplo específico de este grupo de análogos de insulina progenitora es insulina humana LysA8 desB29 desB30.

55 [0068] En un grupo de análogos de insulina progenitora, el residuo de aminoácido en la posición B26; B27; B28; B29 y B30 puede ser cualquier aminoácido codificable excepto Lys o una delección y el aminoácido en una de las posiciones A8, A9; A10; A12; A14; A15; A17; A18; A21; A22; A23; A24, B1, B2, B3, B4; B20; B21 o B22 de la cadena A o B es Lys, siempre que cuando Lys esté en la posición B3, entonces B29 no es Glu. Un ejemplo específico de este grupo de análogos de insulina progenitora es insulina humana LysB4 desB26 desB27 desB28 desB29 desB30

60 [0069] En un grupo de análogos de insulina progenitora, la cadena A ha sido extendida en el C-término con uno, dos o tres

residuos de aminoácidos, las posiciones de los residuos de aminoácidos extendidos estando en la posición A22; A23 o A24 de la cadena A. Cualquiera de las una o dos posiciones de aminoácido restantes en la extensión pueden ser cualquier residuo de aminoácido codificable excepto Lys. Un ejemplo específico de este grupo de análogos de insulina progenitores es insulina humana LysA22 ArgB29 desB30 o insulina humana GlyA22 LysA23 ArgB29 desB30.

5

[0070] En un aspecto de la invención el residuo de aminoácido en la posición A21 de la insulina progenitora es Gly o Asn. El residuo de aminoácido en la posición A21 de la insulina progenitora debería ser Gly, Ala o Gln cuando el residuo de aminoácido en la posición A23 o A24 de la insulina progenitora es Lys.

10

[0071] En un aspecto el residuo de aminoácido en la posición B3 de la insulina progenitora es Lys o el residuo de aminoácido en la posición B28 de la insulina progenitora es Asp.

[0072] Ejemplos de análogos de insulina progenitora son insulina humana ArgB29 o insulina humana ArgB29desB30

15

[0073] En otro aspecto ulterior el derivado insulínico es seleccionado del grupo que consiste en insulina humana N^{εA8}-miristil LysA8 ArgB29 desB30, insulina humana N^{εA9}-miristil LysA9 ArgB29 desB30, insulina humana N^{εA10}-miristil LysA10 ArgB29 desB30, insulina humana N^{εA12}-miristil LysA12 ArgB29 desB30, insulina humana N^{εA14}-miristil LysA14 ArgB29 desB30, insulina humana N^{εA15}-miristil LysA15 ArgB29 desB30, insulina humana N^{εA17}-miristil LysA17 ArgB29 desB30, insulina humana N^{εA18}-miristil LysA18 ArgB29 desB30, insulina humana N^{εA21}-miristil LysA21 ArgB29 desB30, insulina humana N^{εA22}-miristil LysA22 ArgB29 desB30, insulina humana N^{εB1}-miristil LysB1 ArgB29 desB30, insulina humana N^{εB2}-miristil Lys 82-64 LysB2 ArgB29 desB30, insulina humana N^{εB3}-miristil LysB3 ArgB29 desB30, insulina humana N^{εB4}-miristil LysB4 ArgB29 desB30, insulina humana N^{εB20}-miristil LysB20 ArgB29 desB30, insulina humana N^{εB21}-miristil LysB21 ArgB29 desB30 e insulina humana N^{εB22}-miristil LysB22 ArgB29 desB30.

25

[0074] Derivados insulínicos según la invención se pueden proporcionar en forma de compuestos esencialmente libres de zinc o en forma de complejos de zinc. Cuando se proveen complejos de zinc de un derivado insulínico según la invención, aproximadamente dos iones de zinc, aproximadamente tres iones de zinc o aproximadamente cuatro iones de zinc o incluso hasta 12 iones de zinc se pueden unir a 6 moléculas de derivado (hexámero) de insulina. Soluciones de complejos de zinc de los derivados insulínicos contendrán mezclas de tales especies.

30

[0075] El contenido de zinc en una composición farmacéutica puede ser de hasta aproximadamente 12 iones de zinc por 6 moléculas de derivado insulínico. El límite superior para el contenido de zinc es el contenido de zinc que provocaría la precipitación de la insulina y que convierte a la solución en una suspensión.

35

[0076] En un aspecto de la invención la composición farmacéutica comprende entre aproximadamente 4.3 y aproximadamente 12 iones de zinc por 6 moléculas de derivado insulínico o entre aproximadamente 4.5 y aproximadamente 12 iones de zinc por 6 moléculas de derivado insulínico. En otro aspecto de la invención la composición farmacéutica comprende entre unos 5 y aproximadamente 11.4 iones de zinc por 6 moléculas de derivado insulínico o entre aproximadamente 5.5 y aproximadamente 10 iones de zinc por 6 moléculas de derivado insulínico.

40

[0077]] La invención además comprende un método para la producción de una composición farmacéutica comprendiendo un derivado insulínico donde más de aproximadamente 4 iones de zinc por 6 moléculas de derivado insulínico se agregan a la composición.

45

[0078] En un aspecto de la invención el método comprende la adición de hasta aproximadamente 12 iones de zinc por 6 moléculas de derivado insulínico a la composición.

[0079] En un aspecto de la invención el método comprende la adición de entre aproximadamente 4.3 y aproximadamente 12 iones de zinc por 6 moléculas de derivado insulínico a la composición.

50

[0080] En otro aspecto de la invención entre aproximadamente 4.5 y aproximadamente 12 iones de zinc por 6 moléculas de derivado insulínico se agregan a la composición, por ejemplo aproximadamente 5 y aproximadamente 11.4 iones de zinc por 6 moléculas de derivado insulínico se agregan a la composición o entre aproximadamente 5.5 y aproximadamente 10 iones de zinc por 6 moléculas de derivado insulínico se agregan a la composición.

55

[0081] Un aspecto de la invención concierne un método para la producción de una composición farmacéutica. El método comprende la adición de zinc a la composición antes de la adición de un conservante. En un aspecto de la invención entre aproximadamente 4.5 y aproximadamente 12 iones de zinc por 6 moléculas de derivado insulínico se agregan a la composición antes de la adición de un conservante o por ejemplo aproximadamente 5 y aproximadamente 11.4 iones de zinc por 6 moléculas de derivado insulínico se agregan a la composición antes de la adición de un conservante o por

60

ejemplo entre aproximadamente 5.5 y aproximadamente 10 iones de zinc por 6 moléculas de derivado insulínico se agregan a la composición antes de la adición de un conservante.

5 [0082] En un aspecto de la invención el método comprende la adición de hasta aproximadamente 12 iones de zinc a la composición después de la adición de un conservante.

10 [0083] En un aspecto de la invención al menos 0.5 iones de zinc por 6 moléculas de derivado insulínico se añade a la composición después de la adición de un conservante o al menos 1 ión de zinc por 6 moléculas de derivado insulínico se añade a la composición después de la adición de un conservante.

[0084] En otro aspecto de la invención más de aproximadamente 2, 3, 4, 5, o 6 iones de zinc por 6 moléculas de derivado insulínico se agregan a la composición después de la adición de un conservante

15 [0085] En otro aspecto de la invención entre aproximadamente 4.5 y aproximadamente 12 iones de zinc por 6 moléculas de derivado insulínico se agregan a la composición después de la adición de un conservante o entre aproximadamente 5.5 y aproximadamente 10 iones de zinc por 6 moléculas de derivado insulínico se agregan a la composición después de la adición de un conservante.

20 [0086] En un aspecto de la invención el método comprende la adición de parte del zinc antes de la adición de un conservante y parte del zinc después de la adición de un conservante.

[0087] En un aspecto el método comprende la adición de al menos 1 ión de zinc por 6 moléculas de derivado insulínico antes de la adición de un conservante y la adición de al menos 1 ión de zinc por 6 moléculas de derivado insulínico después de la adición de un conservante.

25 [0088] En otro aspecto de la invención el método comprende la adición de al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 iones de zinc por 6 moléculas de derivado insulínico antes de la adición de un conservante y la adición de al menos 2, 3, 4, 5 o 6 iones de zinc por 6 moléculas de derivado insulínico después de la adición de un conservante.

30 [0089] En un aspecto de la invención el número de iones de zinc añadidos antes de la adición de un conservante es al menos 3 iones de zinc por 6 moléculas de derivado insulínico y el número de iones de zinc añadidos después de la adición de un conservante son al menos 3 iones de zinc por 6 moléculas de derivado insulínico.

35 [0090] En un aspecto de la invención el conservante añadido es fenol y/o m-cresol.

[0091] En otro aspecto la invención se refiere a una composición farmacéutica comprendiendo una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado insulínico o un complejo de zinc del derivado insulínico según la invención junto con un portador farmacéuticamente aceptable se puede proporcionar para el tratamiento de la diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 y otros estados que provocan hiperglicemia en pacientes en necesidad de tal tratamiento.

40 [0092] Un derivado insulínico o una composición farmacéutica comprendiendo el derivado insulínico o un complejo de zinc del derivado insulínico según la invención se puede usar para la producción de una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento de diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 y otros estados que provocan hiperglicemia.

45 [0093] En otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica para tratar la diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 y otros estados que provocan la hiperglicemia en un paciente en necesidad de tal tratamiento, comprendiendo una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado insulínico o un complejo de zinc del derivado insulínico según la invención en mezcla con una insulina o un análogo de insulina que tiene una aparición rápida de acción, junto con portadores aceptables farmacéuticamente y aditivos.

50 [0094] En un aspecto la invención proporciona una composición farmacéutica siendo una mezcla de un derivado insulínico o un complejo de zinc del derivado insulínico según la invención e insulina humana o un grupo seleccionado del análogo de insulina de acción rápida que consiste en insulina humana AspB28; insulina humana LysB28ProB29 e insulina humana LysB3GluB29.

55 [0095] En otro aspecto la invención se refiere a una solicitud pulmonar para tratar diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 y otros estados que provocan hiperglicemia en un paciente en necesidad de tal tratamiento, comprendiendo una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado insulínico o un complejo de zinc del derivado insulínico según la invención opcionalmente en mezcla con una insulina o un análogo de insulina que tiene una aparición rápida de acción, junto con portadores y aditivos aceptables farmacéuticamente.

60

[0096] El derivado insulínico según la invención y el análogo de insulina de acción rápida puede mezclarse en una proporción de aproximadamente 90 /10%; aproximadamente 70/30% o aproximadamente 50/50%.

5 [0097] En otro aspecto de la invención, se proporciona un método de tratamiento de diabetes tipo 1, diabetes de tipo 2 y otros estados que causan hiperglicemia en un paciente en necesidad de tal tratamiento, comprendiendo administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado insulínico según la invención junto con un portador farmacéuticamente aceptable y aditivos farmacéuticos aceptables.

10 [0098] En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para la producción de una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento de diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 y otros estados que causan hiperglicemia, la composición comprendiendo el derivado insulínico según la invención junto con un portador farmacéuticamente aceptable y aditivos farmacéuticos aceptables.

15 [0099] En otro aspecto de la invención, se proporciona un método de tratamiento de diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 y otros estados que causan hiperglicemia en un paciente en necesidad de tal tratamiento, comprendiendo la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado insulínico según la invención en mezcla con una insulina o un análogo de insulina que tiene una aparición rápida de acción, junto con un portador farmacéuticamente aceptable y aditivos farmacéuticos aceptables.

20 [0100] En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para la producción de una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento de diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 y otros estados que causan la hiperglicemia, la composición comprendiendo un derivado insulínico según la invención en mezcla con una insulina o un análogo de insulina que tiene una aparición rápida de acción, junto con unos aditivos farmacéuticos y portadores farmacéuticos aceptables.

25 [0101] En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica comprendiendo un derivado insulínico según la invención que es soluble a valores de pH fisiológico.

[0102] En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica comprendiendo un derivado insulínico según la invención que es soluble a valores de pH en el intervalo de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 8.5.

30 [0103] En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica con un perfil prolongado de acción que comprende un derivado insulínico según la invención.

35 [0104] En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que es una solución conteniendo de aproximadamente 120 nmol/ml a aproximadamente 2400 nmol/ml, de aproximadamente 400 nmol/ml a aproximadamente 2400 nmol/ml, de aproximadamente 400 nmol/ml a aproximadamente 1200 nmol/ml, de aproximadamente 600 nmol/ml a aproximadamente 2400 nmol/ml, o de aproximadamente 600 nmol/ml a aproximadamente 1200 nmol/ml de un derivado insulínico según la invención o de una mezcla del derivado insulínico según la invención con un análogo de insulina de acción rápida.

40 [0105] El producto inicial para la acilación, la insulina progenitora o análogo de insulina o un precursor de los mismos se puede producir bien por síntesis peptídica bien conocida o por producción recombinante bien conocida en microorganismos adecuados transformados. Así el producto de inicio de insulina se puede producir por un método que comprende el cultivo de una célula huésped conteniendo una secuencia de ADN que codifica el polipéptido y capaz de expresar el polipéptido en un medio nutritivo adecuado bajo condiciones permitiendo la expresión del péptido, después de lo cual el péptido resultante es recuperado del cultivo.

45 [0106] El medio usado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para hacer crecer las células huéspedes, tal como medios mínimos o complejos conteniendo suplementos apropiados. Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según recetas publicadas (p. ej. en catálogos de la Colección Americana de Cultivos Tipo). El péptido producido por las células puede luego ser recuperado del medio de cultivo por procedimientos convencionales incluyendo la separación de las células huéspedes del medio por centrifugado o filtración, precipitación de los componentes proteínicos del sobrenadante o filtrado mediante una sal, por ejemplo sulfato de amonio, purificación por una variedad de procedimientos cromatográficos, por ejemplo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad, o similar, dependiendo del tipo de péptido en cuestión.

50 [0107] La secuencia de ADN que codifica la insulina progenitora puede adecuadamente ser de origen genómico o ADNc, por ejemplo obtenida preparando una biblioteca genómica o de ADNc y seleccionando secuencias de ADN que codifican todo o parte del polipéptido por hibridación usando sondas de oligonucleótidos sintéticas conforme a técnicas estándar (véase, por ejemplo, Sambrook, J, Fritsch, EF y Maniatis, T, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989). La secuencia de ADN que codifica la insulina progenitora puede también ser preparada

sintéticamente por métodos estándares establecidos, por ejemplo el método de fosfoamidita descrito por Beaucage y Caruthers, Tetrahedron Letters 22 (1981), 1859 - 1869, o el método descrito por Matthes et al., EMBO Journal 3 (1984), 801 - 805. La secuencia de ADN puede también ser preparada por reacción en cadena de polimerasa usando cebadores específicos, por ejemplo como se describe en US 4,683,202 o Saiki et al., Science 239 (1988), 487 - 491.

5

[0108] La secuencia de ADN se puede insertar en cualquier vector que puede convenientemente ser sometido a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector frecuentemente dependerá de la célula huésped en la que debe ser introducido. Así, el vector puede ser un vector de replicación autónomo, es decir un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica con el(los) cromosoma(s) en que ha(n) sido integrado(s).

10

[0109] El vector es por ejemplo un vector de expresión en el que la secuencia de ADN que codifica la insulina progenitora está operativamente unido a segmentos adicionales requeridos para la transcripción del ADN, tal como un promotor. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestra actividad transcripcional en la célula huésped de elección y se puede derivar de genes que codifican proteínas bien heterólogas u homólogas a la célula huésped. Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción del ADN que codifica la insulina progenitora en una variedad de células huéspedes son bien conocidos en la técnica, véase por ejemplo Sambrook et al., supra.

15

[0110] La secuencia de ADN que codifica la insulina progenitora puede también, si fuera necesario, ser operativamente conectada a un terminador adecuado, señales de poliadenilación, secuencias potenciadoras transcripcionales, y secuencias potenciadoras traduccionales. El vector recombinante de la invención puede comprender además una secuencia de ADN que permita que el vector se replique en la célula huésped en cuestión.

20

[0111] El vector puede también comprender un marcador seleccionable, por ejemplo un gen cuyo producto complementa un defecto en la célula huésped o uno que confiere resistencia a un medicamento, por ejemplo ampicilina, canamicina, tetraciclina, cloranfenicol, neomicina, higromicina o metotrexato.

25

[0112] Para dirigir un péptido de la presente invención en la vía secretora de las células huéspedes, una secuencia señal secretora (también conocida como una secuencia líder, secuencia prepro o secuencia pre) se puede proporcionar en el vector recombinante. La secuencia señal secretora se une a la secuencia de ADN que codifica el péptido en el marco de lectura correcto. Secuencias señal secretoras son comúnmente situadas en 5' a la secuencia de ADN que codifica el péptido. La secuencia señal secretora puede ser aquella normalmente asociada al péptido o puede ser de un gen que codifica otra proteína segregada.

30

35

[0113] Los procedimientos usados para enlazar las secuencias de ADN que codifican para la insulina progenitora, el promotor y opcionalmente el terminador y/o secuencia señal secretora, respectivamente, y para insertarlas en vectores adecuados conteniendo la información necesaria para la replicación, son bien conocidas para personas expertas en la técnica (cf., por ejemplo, Sambrook et al., supra).

40

[0114] La célula huésped en la que la secuencia de ADN o el vector recombinante es introducido puede ser cualquier célula que es capaz de producir el presente péptido e incluye bacterias, levadura, hongos y células eucarióticas superiores. Ejemplos de células huéspedes adecuadas bien conocidas y usadas en la técnica son, sin limitación, E. coli, Saccharomyces cerevisiae, o BHK de mamífero o líneas celulares CHO.

45

[0115] La molécula de insulina progenitora es luego convertida en los derivados insulínicos de la invención por introducción de la cadena lateral pertinente en bien la posición B1 o en la posición de Lys elegida en la cadena B. La cadena lateral se puede introducir por cualquier método conveniente y muchos métodos son descritos en la técnica anterior para acilación de un grupo amino. Más detalles aparecerán de los siguientes ejemplos.

50

Composiciones farmacéuticas

[0116] Los derivados insulínicos de esta invención de la fórmula reivindicada pueden, por ejemplo, ser administrados subcutáneamente, por vía oral, o pulmonar.

55

[0117] Para la administración subcutánea, los compuestos de la fórmula se formulan análogamente con la formulación de insulinas conocidas. Además, para la administración subcutánea, los compuestos de la fórmula se administran análogamente con la administración de insulinas conocidas y, generalmente, los médicos están familiarizados con este procedimiento.

60

[0118] Los derivados insulínicos de esta invención se pueden administrar por inhalación en una manera eficaz de dosis para aumentar los niveles de insulina circulante y/o para bajar los niveles de glucosa circulante. Tal administración puede ser

eficaz para tratar trastornos tales como diabetes o hiperglicemia. El logro de dosis eficaces de insulina requiere la administración de una dosis inhalada de derivado insulínico de esta invención superior a aproximadamente 0.5 µg/kg a aproximadamente 50 µg/kg. Una cantidad terapéuticamente eficaz se puede determinar por un profesional experto, que tendrá en cuenta factores incluyendo el nivel de insulina, niveles de glucosa en sangre, la condición física del paciente, el estado pulmonar del paciente, o similares.

[0119] Según la invención, el derivado insulínico de esta invención se puede entregar por inhalación para conseguir una absorción rápida de la misma. La administración por inhalación puede resultar en farmacocinéticas comparables a la administración subcutánea de insulinas. La inhalación de un derivado insulínico de esta invención conduce a un rápido ascenso en el nivel de insulina circulante seguido de una rápida caída en los niveles de glucosa en sangre. Dispositivos de inhalación diferentes típicamente proporcionan farmacocinéticas similares cuando tamaños de partícula similares y niveles similares de deposición pulmonar son comparados.

[0120] Según la invención, un derivado insulínico de esta invención se puede entregar por cualquier variedad de dispositivos de inhalación conocidos en la técnica para la administración de un agente terapéutico por inhalación. Estos dispositivos incluyen inhaladores de dosis medida, nebulizadores, generadores de polvo seco, pulverizadores, y similares. Derivado insulínico de esta invención se entrega por un inhalador de polvo seco o un pulverizador. Hay diferentes características deseables de un dispositivo de inhalación para administrar un derivado insulínico de esta invención. Por ejemplo, la entrega por el dispositivo de inhalación es ventajosamente fiable, reproducible, y precisa. El dispositivo de inhalación debería entregar partículas pequeñas, por ejemplo, menos de aproximadamente 10 µm, por ejemplo aproximadamente 1-5 µm, para buena respirabilidad. Algunos ejemplos específicos de dispositivos de inhalación disponibles comercialmente adecuados para la práctica de esta invención son Turbohaler™ (Astra); Rotahaler® (Glaxo), Diskus® (Glaxo), inhalador Spiros™ (Dura), dispositivos comercializados por Inhale Therapeutics, AERx™ (Aradigm), el nebulizador Ultravent® (Mallinckrodt), el nebulizador Acorn II® (Marquest Medical Products), el inhalador de dosis medida Ventolin® (Glaxo), el inhalador de polvo Spinhaler® (Fisons), o similares.

[0121] Como reconocerán los expertos en la técnica, la formulación de derivado insulínico de esta invención, la cantidad de la formulación entregada, y la duración de administración de una dosis individual dependerá del tipo de dispositivo de inhalación empleado. Para algunos sistemas de entrega de aerosol, tales como nebulizadores, la frecuencia de administración y duración de tiempo para el que el sistema es activado dependerá principalmente de la concentración de conjugado de insulina en el aerosol. Por ejemplo, períodos más cortos de administración se pueden usar a concentraciones más altas de conjugado de insulina en la solución de nebulizador. Dispositivos tales como inhaladores de dosis medida pueden producir concentraciones de aerosol más altas, y se pueden accionar durante períodos más cortos para entregar la cantidad deseada de insulina conjugada. Dispositivos tales como inhaladores de polvo entregan agente activo hasta que una carga dada de agente es expulsada del dispositivo. En este tipo de inhalador, la cantidad de derivado insulínico de esta invención en una cantidad dada del polvo determina la dosis entregada en una única administración.

[0122] El tamaño de partícula de derivado insulínico de esta invención en la formulación entregada por el dispositivo de inhalación es crítico con respecto a la capacidad de la insulina para hacerlo en los pulmones, y en las vías respiratorias inferiores o alveolos. El derivado insulínico de esta invención se puede formular de modo que al menos aproximadamente el 10% del conjugado de insulina entregado se deposite en el pulmón, por ejemplo de aproximadamente 10 a aproximadamente 20%, o más. Es conocido que la eficiencia máxima de deposición pulmonar para seres humanos que respiran por la boca se obtiene con tamaños de partícula de aproximadamente 2 µm a aproximadamente 3 µm. Cuando tamaños de partícula están por encima de aproximadamente 5 µm la deposición pulmonar se reduce sustancialmente. Tamaños de partícula por debajo de aproximadamente 1 µm provocan que la deposición pulmonar se reduzca, y se vuelve difícil entregar partículas con masa suficiente para ser terapéuticamente eficaz. Así, las partículas del derivado insulínico entregadas por inhalación tienen un tamaño de partícula inferior a aproximadamente 10 µm, por ejemplo en la gama de aproximadamente 1 µm a aproximadamente 5 µm. La formulación del derivado insulínico se selecciona para producir el tamaño de partícula deseado en el dispositivo de inhalación elegido.

[0123] Ventajosamente para la administración como un polvo seco, un derivado insulínico de esta invención se prepara en una forma granulosa con un tamaño de partícula inferior a aproximadamente 10 µm, por ejemplo aproximadamente 1 a aproximadamente 5 µm. El tamaño de partícula es eficaz para la entrega a los alveolos del pulmón del paciente. El polvo seco está compuesto en gran medida por partículas producidas de modo que una mayoría de las partículas tienen un tamaño en la gama deseada. Ventajosamente, al menos aproximadamente 50% del polvo seco está hecho de partículas con un diámetro inferior a aproximadamente 10 µm. Tales formulaciones se pueden conseguir por secado por atomización, trituración, o condensación de punto crítico de una solución conteniendo insulina conjugada y otros ingredientes deseados. Otros métodos también adecuados para generar partículas útiles en la presente invención son conocidos en la técnica.

[0124] Las partículas son normalmente separadas de una formulación de polvo seco en un recipiente y luego se transportan en el pulmón de un paciente por medio de una corriente de aire portadora. Típicamente, en los inhaladores de polvo seco

actuales, la fuerza para dispersar el sólido está provista solamente por la inhalación del paciente. En otro tipo de inhalador, la corriente de aire generada por la inhalación del paciente activa un motor propulsor que desaglomera las partículas.

5 [0125] Las formulaciones de derivados insulínicos de esta invención para la administración por un inhalador de polvo seco típicamente incluyen un polvo seco finamente dividido conteniendo el derivado, pero el polvo también puede incluir un agente de carga, portador, excipiente, otro aditivo, o similares. Se pueden incluir aditivos en una formulación de polvo seco de insulina conjugada, por ejemplo, para diluir el polvo según sea necesario para la entrega desde el inhalador de polvo particular, para facilitar el procesamiento de la formulación, para proporcionar propiedades de polvo ventajosas a la formulación, para facilitar la dispersión del polvo del dispositivo de inhalación, para estabilizar la formulación (por ejemplo, antioxidantes o tampones), para proporcionar sabor a la formulación, o similares. Ventajosamente, el aditivo no afecta contrariamente a las vías respiratorias del paciente. El derivado insulínico puede mezclarse con un aditivo a un nivel molecular o la formulación sólida puede incluir partículas de la insulina conjugada mezclada con o revestida en partículas del aditivo. Aditivos típicos incluyen mono-, di-, y polisacáridos; polialcoholes y otros polioles, tales como, por ejemplo, lactosa, glucosa, rafinosa, melezitosa, lactitol, maltitol, trehalosa, sacarosa, manitol, almidón, o combinaciones de los mismos; 10 tensioactivos, tales como sorbitoles, difosfatidil colina, o lecitina; o similares. Típicamente un aditivo, tal como un agente de estabilización, está presente en una cantidad eficaz para un fin anteriormente descrito, frecuentemente a aproximadamente 50% hasta aproximadamente 90% en peso de la formulación. Agentes adicionales conocidos en la técnica para la formulación de una proteína tal como una proteína análoga de insulina pueden también ser incluidos en la formulación.

20 [0126] Un pulverizador incluyendo los derivados insulínicos de esta invención se puede producir forzando una suspensión o solución de insulina conjugada a través de una boquilla bajo presión. El tamaño de boquilla y configuración, la presión aplicada, y la velocidad de alimentación de líquido se puede elegir para conseguir el rendimiento deseado y tamaño de partícula. Un electrospray puede ser producido, por ejemplo, por un campo eléctrico en conexión con una alimentación capilar o por boquilla. Ventajosamente, partículas de conjugado de insulina entregado por un pulverizador tiene un tamaño de partícula inferior a aproximadamente 10 μm , por ejemplo en la gama de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 5 μm .

30 [0127] Formulaciones de derivados insulínicos de esta invención adecuadas para el uso con un pulverizador típicamente incluye el derivado insulínico en una solución acuosa a una concentración de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 20 mg de conjugado de insulina por ml de solución. La formulación puede incluir agentes tales como un excipiente, un tampón, un agente de isotonicidad, un conservante, un surfactante, y, por ejemplo zinc. La formulación también puede incluir un excipiente o agente para estabilización del derivado insulínico, tal como un tampón, un agente reductor, una proteína en masa, o un carbohidrato. Proteínas en masa útiles en la formulación de conjugados de insulina incluyen albúmina, 35 protamina, o similares. Carbohidratos típicos útiles en la formulación de conjugados de insulina incluyen sacarosa, manitol, lactosa, trehalosa, glucosa, o similares. La formulación derivada de insulina también puede incluir un tensioactivo, que puede reducir o prevenir la agregación inducida en la superficie del conjugado de insulina provocada por atomización de la solución en la formación de un aerosol. Varios tensioactivos convencionales pueden ser empleados, tales como ésteres de ácido graso de polioxietileno y alcoholes, y ésteres de ácido graso de sorbitol de polioxietileno. Las cantidades generalmente estarán comprendidas entre aproximadamente 0.001 y aproximadamente 4% en peso de la formulación.

40 [0128] Composiciones farmacéuticas conteniendo un derivado insulínico según la presente invención pueden también ser administradas parenteralmente a pacientes en necesidad de tal tratamiento. La administración parenteral puede ser realizada por inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular mediante una jeringa, opcionalmente una jeringa tipo pluma. Alternativamente, la administración parenteral se puede realizar mediante una bomba de infusión. Otras opciones son administrar la insulina por vía pulmonar o nasal, por ejemplo en composiciones, polvos o líquidos, específicamente 45 diseñados para el propósito.

50 [0129] Composiciones inyectables de los derivados insulínicos de la invención pueden ser preparadas usando las técnicas convencionales de la industria farmacéutica que implican disolver y mezclar los ingredientes según sea apropiado para dar el producto final deseado. Así, según un procedimiento, un derivado insulínico según la invención es disuelto en una cantidad de agua que es un tanto inferior que el volumen final de la composición que debe ser preparada. Un agente isotónico, un conservante y un tampón se añade según sea necesario y el valor de pH de la solución es ajustado - si fuera necesario - usando un ácido, por ejemplo ácido clorhídrico, o una base, por ejemplo hidróxido sódico acuoso según sea necesitado. Finalmente, el volumen de la solución se ajusta con agua para dar la concentración deseada de los 55 ingredientes.

[0130] En otro aspecto de la invención el tampón es seleccionado del grupo que consiste en acetato sódico, carbonato de sodio, citrato, glicil-glicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrógeno fosfato de sodio, hidrógeno fosfato de disodio, fosfato sódico, y tris(hidroximetil)-aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas de los mismos. Cada uno de estos tampones específicos constituye un aspecto 60 alternativo de la invención.

[0131] En otro aspecto de la invención la formulación además comprende un conservante aceptable farmacéuticamente que puede ser seleccionado del grupo que consiste en fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, metil p-hidroxibenzoato, propil p-hidroxibenzoato; 2-fenoxietanol, butil p-hidroxibenzoato, 2-feniletanol, alcohol bencílico, clorobutanol, y tiomerosal, bronopol, ácido benzoico, imidurea, clorhexidina, deshidroacetato de sodio, clorocresol, etil p-hidroxibenzoato, cloruro de bencetonio, clorfenesina, 3-(4-clorofenoxi)propano-1,2-diol o mezclas de los mismos. En otro aspecto de la invención el conservante está presente en una concentración de 0.1 mg/ml a 20 mg/ml. En otro aspecto de la invención el conservante está presente en una concentración de 0.1 mg/ml a 5 mg/ml. En otro aspecto de la invención el conservante está presente en una concentración de 5 mg/ml a 10 mg/ml. En otro aspecto de la invención el conservante está presente en una concentración de 10 mg/ml a 20 mg/ml. Cada uno de estos conservantes específicos constituye un aspecto alternativo de la invención. El uso de un conservante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por el experto en la materia. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995 .

[0132] En otro aspecto de la invención la formulación además comprende un agente isotónico que puede ser seleccionado del grupo que consiste en una sal (p. ej. cloruro sódico), un azúcar o alcohol de azúcar, un aminoácido (p. ej. L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (p. ej. glicerol (glicerina), 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol) polietilenglicol (p. ej. PEG400), o mezclas de los mismos. Cualquier azúcar tal como mono-, di-, o polisacáridos, o glucanos hidrosolubles, incluyendo por ejemplo fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, hidroxietil almidón y carboximetilcelulosa de sodio puede ser utilizado. En un aspecto el aditivo de azúcar es sacarosa. El alcohol de azúcar es definido como un hidrocarburo C4-C8 que tiene al menos un grupo OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol, y arabitol. En un aspecto el aditivo de alcohol de azúcar es manitol. Los azúcares o polialcoholes mencionados arriba pueden ser utilizados individualmente o en combinación. No hay ningún límite fijo para la cantidad usada, puesto que el azúcar o alcohol de azúcar es soluble en la preparación líquida y no afecta contrariamente a los efectos estabilizantes conseguidos usando los métodos de la invención. En un aspecto, la concentración de azúcar o de alcohol de azúcar es entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml. En otro aspecto de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/ml a 50 mg/ml. En otro aspecto de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/ml a 7 mg/ml. En otro aspecto de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de 8 mg/ml a 24 mg/ml. En otro aspecto de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de 25 mg/ml a 50 mg/ml. Cada uno de estos agentes isotónicos específicos constituye un aspecto alternativo de la invención. El uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas es bien conocido por el experto en la técnica. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995 .

[0133] Agentes típicos isotónicos son cloruro sódico, manitol, dimetil sulfona y glicerol y conservantes típicos son fenol, m-cresol, metil p-hidroxibenzoato y alcohol bencílico.

[0134] Ejemplos de tampones adecuados son acetato sódico, glicil-glicina, HEPES (ácido de 4-(2-hidroxietil)-1- piperazina etanosulfónico) y fosfato sódico.

[0135] Una composición para administración nasal de un derivado insulínico según la presente invención puede, por ejemplo, ser preparado como descrito en la patente europea n°. 272097 (a Novo Nordisk A/S).

[0136] Composiciones conteniendo derivados insulínicos de esta invención se pueden usar en el tratamiento de estados que son sensibles a la insulina. Así, se pueden usar en el tratamiento de diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 e hiperglicemia por ejemplo como se ve a veces en personas seriamente lesionadas y personas que han sufrido cirugía mayor. El nivel de dosis óptima para cualquier paciente dependerá de una variedad de factores incluyendo la eficacia del derivado insulínico específico empleado, la edad, masa corporal, actividad física, y dieta del paciente, en una combinación posible con otros fármacos, y de la gravedad del estado que debe ser tratado. Está recomendado que la dosificación diaria del derivado insulínico de esta invención sea determinada para cada paciente individual por expertos en la técnica en una vía similar como para las composiciones de insulina conocidas.

[0137] Cuando sea oportuno, los derivados insulínicos de esta invención se pueden utilizar en mezcla con otros tipos de insulina, por ejemplo análogos de insulina con una aparición más rápida de acción. Ejemplos de tales análogos de insulina son descritos por ejemplo en las solicitudes de patente europea que tienen los números de publicación EP 214826 (Novo Nordisk A/S), EP 375437 (Novo Nordisk A/S) y EP 383472 (Eli Lilly & Co.).

[0138] Esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes del objeto principal como nombrado en las reivindicaciones anexas, como permitido por la ley aplicable.

[0139] La invención será resumida en los siguientes párrafos:

1. Un derivado insulínico comprendiendo una insulina progenitora y un sustituyente, donde el sustituyente está unido bien a

- un grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena A de la insulina progenitora en la posición A8, A9, A10, A12, A14, A15, A17, A18, A21, A22, A23 o A24 o a un grupo ϵ -amino de un residuo de Lys en la cadena B de la insulina progenitora en la posición B1, B2, B3, B4, B20, B21 o B22 a condición de que cuando B3 es Lys, entonces B29 no es Glu, donde el sustituyente es un grupo lipofílico con de 4 a 40 átomos de carbono.
- 5 2. Derivado insulínico según el párrafo 1, donde el sustituyente está unido al grupo ϵ -amino del residuo de Lys presente en la posición A8 en la cadena A de la insulina progenitora.
3. Derivado insulínico según el párrafo 1, donde el sustituyente está unido al grupo ϵ -amino del residuo de Lys presente en la posición A9 en la cadena A de la insulina progenitora.
- 10 4. Derivado insulínico según el párrafo 1, donde el sustituyente está unido al grupo ϵ -amino del residuo de Lys presente en la posición A14 en la cadena A de la insulina progenitora.
5. Derivado insulínico según el párrafo 1, donde el sustituyente está unido al grupo ϵ -amino del residuo de Lys presente en la posición A18 en la cadena A de la insulina progenitora.
6. Derivado insulínico según el párrafo 1, donde el sustituyente está unido al grupo ϵ -amino del residuo de Lys presente en la posición A21 en la cadena A de la insulina progenitora.
- 15 7. Derivado insulínico según el párrafo 1, donde el sustituyente está unido al grupo ϵ -amino del residuo de Lys presente en la posición A22 en la cadena A de la insulina progenitora.
8. Derivado insulínico según el párrafo 1, donde el sustituyente está unido al grupo ϵ -amino del residuo de Lys presente en la posición A23 en la cadena A de la insulina progenitora.
- 20 9. Derivado insulínico según el párrafo 1, donde el sustituyente está unido al grupo ϵ -amino del residuo de Lys presente en la posición A24 en la cadena A de la insulina progenitora.
10. Derivado insulínico según los párrafos 1-9, donde el sustituyente comprende un grupo acilo con de 6 a 40 átomos de carbono.
11. Derivado insulínico según el párrafo 10, donde el sustituyente comprende un grupo acilo con de 12 a 36 átomos de carbono.
- 25 12. Derivado insulínico según los párrafos 1-9, donde el grupo acilo es $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-CO-}$, donde $4 \leq n \leq 38$.
13. Derivado insulínico según los párrafos 1-9, donde el grupo acilo es $\text{(NH}_2\text{-CO)-(CH}_2\text{)}_n\text{-CO-}$, donde $4 \leq n \leq 38$.
14. Derivado insulínico según los párrafos 1-9, donde el grupo acilo es $\text{HO-(CH}_2\text{)}_n\text{-CO-}$, donde $4 \leq n \leq 38$.
15. Derivado insulínico según los párrafos 12-14, donde $6 \leq n \leq 36$
16. Derivado insulínico según los párrafos 12-14, donde $8 \leq n \leq 34$
- 30 17. Derivado insulínico según los párrafos 12-14, donde $12 \leq n \leq 32$
18. Derivado insulínico según los párrafos 12-14, donde $12 \leq n \leq 28$
19. Derivado insulínico según los párrafos 1-11, donde el grupo acilo es ácido litocólico 5- α o ácido litocólico 5- β .
20. Derivado insulínico según los párrafos 1-11, donde el grupo acilo es isómeros 5- α o 5- β de ácido cólico, ácido iocólico, ácido deoxicólico, ácido quenodeoxicólico, ácido ursodesoxicólico, ácido iodeoxicólico o ácido colánico.
- 35 21. Derivado insulínico según los párrafos 1-11, donde el grupo acilo es un isómero 5- α o 5- β de ácido dehidrolitocólico.
22. Derivado insulínico según los párrafos 1-11, donde el grupo acilo es ácido fusídico, un derivado de ácido fusídico o ácido glicirretínico.
23. Derivado insulínico según cualquiera de los párrafos 1-22, donde la insulina progenitora es un análogo de insulina, que no tiene un residuo de Lys en la posición B29 de la cadena B.
- 40 24. Derivado insulínico según cualquiera de los párrafos 1-22, donde la insulina progenitora es insulina humana o insulina porcina, donde el residuo de Lys en la posición B29 está sustituido y un residuo de Lys está insertado en una posición en la cadena A o cadena B excepto la posición B29.
25. Derivado insulínico según los párrafos 1 y 23-24, donde el residuo de aminoácido en una de las posiciones A8, A9, A10, A12, A14, A15, A17, A18, A21, A22, A23 o A24 de la cadena A de la insulina progenitora es un residuo de Lys.
- 45 26. Derivado insulínico según los párrafos 1 y 23-24, donde el residuo de aminoácido en una de las posiciones posición B1, B2, B3, B4, B20, B21 o B22 de la cadena B de la insulina progenitora es un residuo de Lys.
27. Derivado insulínico según el párrafo 23-26, donde el residuo de aminoácido en la posición B30 de la insulina progenitora ha sido eliminado.
28. Derivado insulínico según el párrafo 23-27, donde el residuo de aminoácido en la posición B1 de la insulina progenitora ha sido eliminado.
- 50 29. Derivado insulínico según el párrafo 23-28, donde el residuo de aminoácido en la posición A21 de la insulina progenitora es Gly o Asn.
30. Derivado insulínico según el párrafo 23-29, donde el residuo de aminoácido en la posición B3 de la insulina progenitora es Lys.
- 55 31. Derivado insulínico según el párrafo 23-30, donde el residuo de aminoácido en la posición B28 de la insulina progenitora es Asp.
32. Derivado insulínico según cualquiera de los párrafos 23-31, donde el residuo de aminoácido en la posición B29 de la insulina progenitora es Pro o Thr.
- 60 33. Complejo de zinc de un derivado insulínico según cualquiera de los párrafos precedentes donde dos iones de zinc, tres iones de zinc, cuatro iones de zinc, cinco iones de zinc, seis iones de zinc, siete iones de zinc, ocho iones de zinc, nueve

iones de zinc, diez seis iones de zinc, once seis iones de zinc o doce seis iones de zinc están unidos por seis moléculas de derivado insulínico.

34. Composición farmacéutica para el tratamiento de diabetes en un paciente con la necesidad de tal tratamiento, comprendiendo una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado insulínico según cualquiera de los párrafos precedentes opcionalmente junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

35. Composición farmacéutica para el tratamiento de diabetes en un paciente con la necesidad de tal tratamiento, comprendiendo una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado insulínico según cualquiera de los párrafos precedentes mezclado con una insulina o un análogo de insulina que tiene una aparición de acción rápida opcionalmente junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

36. Método para la producción de una composición farmacéutica según los párrafos 34-35 o un complejo de zinc de un derivado insulínico según el párrafo 33, donde hasta aproximadamente 1,2 iones de zinc por 6 moléculas de derivado insulínico se agregan a la composición farmacéutica.

37. Método según el párrafo 36, donde hasta aproximadamente 12 iones de zinc por 6 moléculas de derivado insulínico se agregan a la composición farmacéutica después la adición de un conservante.

38. Método de tratamiento de diabetes en un paciente con la necesidad de tal tratamiento, comprendiendo la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado insulínico según cualquiera de párrafos 1-32 opcionalmente junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

39. Método de tratamiento de diabetes en un paciente con la necesidad de tal tratamiento, comprendiendo la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado insulínico según cualquiera de los párrafos 1-32 mezclado con una insulina o un análogo de insulina que tiene una aparición de acción rápida opcionalmente junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

40. Método según los párrafos 38-39 para tratamiento pulmonar de diabetes.

41. Uso de un derivado insulínico según cualquiera de los párrafos 1-32 para la producción de una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 y otros estados que causan hiperglicemia.

42. Uso de un derivado insulínico según cualquiera de los párrafos 1-32 mezclado con una insulina o un análogo de insulina que tiene una aparición de acción rápida para la producción de una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 y otros estados que causan hiperglicemia.

43. Una mezcla de un derivado insulínico según cualquiera de los párrafos 1-32 y un análogo de insulina de acción rápida seleccionado del grupo consistente en insulina humana AspB28; insulina humana LysB28ProB29 e insulina humana LysB3GluB29.

44. Derivado insulínico según el párrafo 1, donde el derivado insulínico se selecciona del grupo consistente en

insulina humana N^{CA9} miristil LysA9 ArgB29 desB30,
 insulina humana N^{CB3} miristil LysB3 ArgB29 desB30,
 insulina humana N^{CB22} miristil LysB22 ArgB29 desB30,
 insulina humana N^{CA15} miristil LYSA15 ArgB29 desB30,
 insulina humana N^{CA18} miristil LysA18 ArgB29 desB30,
 insulina humana N^{CA22}-miristil LysA22 ArgB29 desB30,

[0140] La invención será resumida con más detalle en los siguientes párrafos:

1a. Derivados insulínicos con una cadena lateral unida bien a un grupo ε-amino de un residuo de Lys presente en la cadena A en la posición A8, A9, A10, A12, A14, A15, A17, A18, A21, A22, A23 o A24 o a un grupo ε-amino de un residuo de Lys en la cadena B en la posición B1, B2, B3, B4, B20, B21 o B22 de la insulina progenitora a condición de que cuando B3 es Lys, entonces B29 no es Glu, donde la cadena lateral es un grupo lipofílico con de 6 a 40 átomos de carbono.

2a. Un derivado insulínico según el párrafo 1a, donde la cadena lateral comprende un grupo acilo con de 6 a 40, átomos de carbono, preferiblemente 12 a 36, átomos de carbono.

3a. Un derivado insulínico según el párrafo 2a, en que el grupo acilo es CH₃-(CH₂)_n-CO-, dónde 4 ≤ n ≤ 38.

4a. Un derivado insulínico según el párrafo 2a, en que el grupo acilo es (NH₂-CO)-(CH₂)_n-CO-, donde 4 ≤ n ≤ 38.

5a. Un derivado insulínico según el párrafo 2a, en que el grupo acilo es HO-(CH₂)_n-CO-, dónde 4 ≤ n ≤ 38.

6a. Un derivado insulínico según el párrafo 2a, en el que el grupo acilo es ácido litocólico 5-α o ácido litocólico 5-β.

7a. Un derivado insulínico según el párrafo 2a, en el que el grupo acilo es 5-α o 5-β isómeros de ácido cólico, ácido iocólico, ácido deoxicólico, ácido quenodeoxicólico, ácido ursodesoxicólico, ácido iodeoxicólico o ácido colánico.

8a. Un derivado insulínico según el párrafo 2a, en el que el grupo acilo es un 5-α o 5-β isómero de ácido dehidrolitocólico.

9a. Un derivado insulínico según el párrafo 2a, en el que el grupo acilo es ácido fusídico, un derivado de ácido fusídico o ácido glicirretínico.

10a. Un derivado insulínico según los párrafos 2a-9a, en el que el grupo acilo se enlaza al residuo de lisina usando un aminoácido como enlazador.

11a. Derivado insulínico según el párrafo 1a, donde el grupo lipofílico puede ser cargado negativamente.

12a. Derivado insulínico según el párrafo 11a, donde la cadena lateral comprende un residuo de aminoácido lipofílico.

13a. Derivado insulínico según el párrafo 11a, donde la cadena lateral comprende un residuo de aminoácido.

14a. Derivado insulínico según cualquiera de los párrafos precedentes, donde la insulina progenitora es insulina humana desB30, insulina humana ArgB29 o insulina humana ArgB29desB30.

15a. Un complejo de zinc de un derivado insulínico según cualquiera de los párrafos precedentes donde hasta 12 átomos de zinc están unidos por 6 derivados insulínicos.

16a. Una composición farmacéutica para el tratamiento de diabetes en un paciente con la necesidad de tal tratamiento, comprendiendo una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado insulínico según cualquiera de los párrafos 1a-14a o un complejo de zinc del derivado insulínico según el párrafo 15a junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

17a. Una composición farmacéutica para el tratamiento de diabetes en un paciente con la necesidad de tal tratamiento, comprendiendo una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado insulínico según cualquiera de los párrafos 1a-14a o un complejo de zinc del derivado insulínico según el párrafo 15a mezclado con una insulina o un análogo de insulina que tiene una aparición rápida de acción, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

18a. Una composición farmacéutica según el párrafo 16a o 17a destinado para la administración pulmonar.

19a. Una composición farmacéutica según los párrafos 16a-18a comprendiendo hasta aproximadamente 12 iones de zinc por 6 moléculas de derivado insulínico.

20a. Un método para la producción de una composición farmacéutica según párrafos los 16a-18a, donde se agregan hasta aproximadamente 12 iones de zinc por 6 moléculas de derivado insulínico a la composición farmacéutica después de la adición de un conservante.

21a. Un método de tratamiento de diabetes en un paciente con la necesidad de tal tratamiento, comprendiendo la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado insulínico según los párrafos 1a-14a o un complejo de zinc del derivado insulínico según el párrafo 15a junto con un portador farmacéutico aceptable y aditivos farmacéuticos aceptables.

22a. Un método de tratamiento de diabetes en un paciente con la necesidad de tal tratamiento, comprendiendo la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado insulínico según los párrafos 1a-14a o un complejo de zinc del derivado insulínico según el párrafo 15a mezclado con una insulina o un análogo de insulina que tiene una aparición de acción rápida, junto con un portador farmacéuticamente aceptable y aditivos farmacéuticos aceptables.

[0141] La invención se resume en los siguientes aspectos:

1 b. un derivado insulínico comprendiendo una insulina progenitora y un sustituyente, donde el sustituyente está unido bien a un grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena A de la insulina progenitora en la posición A8, A9, A10, A12, A14, A15, A17, A18, A2, A22, A23 o A24 o a un grupo ϵ -amino de un residuo de Lys en la cadena B de la insulina progenitora en la posición B1, B2, B3, B4, B20, B21 o B22 a condición de que cuando B3 es Lys, entonces B29 no es Glu donde el sustituyente es un grupo lipofílico con de 4 a 40 átomos de carbono

2b. Derivado insulínico según el aspecto 1, donde el sustituyente comprende un grupo acilo con de 6 a 40 átomos de carbono

3b. Derivado insulínico según los aspectos 1 b-2b, donde el sustituyente comprende un grupo acilo con de 12 a 36 átomos de carbono.

4b. Derivado insulínico según el aspecto 1b, donde el grupo de acilo es $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-CO-}$, dónde $4 \leq n \leq 38$.

5b. Un derivado insulínico según el aspecto 1b, donde el grupo acilo es $\text{(NH}_2\text{-CO)-(CH}_2\text{)}_n\text{-CO-}$, dónde $4 \leq n \leq 38$.

6b. Un derivado insulínico según el aspecto 1b, donde el grupo acilo es $\text{HO-(CH}_2\text{)}_n\text{-CO-}$, dónde $4 \leq n \leq 38$.

7b. Un derivado insulínico según los aspectos 1b-3b, donde el grupo acilo es 5- α ácido litocólico o 5- β ácido litocólico.

8b. Un derivado insulínico según los aspectos 1b-3b, donde el grupo acilo es 5- α o 5- β isómeros de ácido cólico, ácido iocólico, ácido deoxicólico, ácido quenodeoxicólico, ácido ursodesoxicólico, ácido iodeoxicólico o ácido colánico.

9b. Un derivado insulínico según los aspectos 1 b-3b, donde el grupo acilo es un 5- α o 5- β isómero de ácido

dehidrolitocólico.

10b. Un derivado insulínico según los aspectos 1b-3b, donde el grupo acilo es ácido fusídico, un derivado de ácido fusídico o ácido glicirretínico.

11 b. Un derivado insulínico según cualquiera de los aspectos 1b-10b, donde la insulina progenitora es un análogo de insulina.

12b. Derivado insulínico según el aspecto 11 b, donde la insulina progenitora es insulina humana ArgB29 o insulina humana ArgB29desB30.

13b. Un complejo de zinc de un derivado insulínico según cualquiera de los aspectos precedentes donde dos iones de zinc, tres iones de zinc, cuatro iones de zinc, cinco iones de zinc, seis iones de zinc, siete iones de zinc, ocho iones de zinc, nueve iones de zinc, diez seis iones de zinc, once seis iones de zinc o doce seis iones de zinc están unidos por seis moléculas de derivado insulínico.

14b. Una composición farmacéutica para el tratamiento de diabetes en un paciente con la necesidad de tal tratamiento, comprendiendo una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado insulínico según cualquiera de los aspectos precedentes opcionalmente junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

15b. Un método para la producción de una composición farmacéutica según los aspectos 1b-21 b o un complejo de zinc de un derivado insulínico según el aspecto 13b, donde se agregan hasta aproximadamente 12 iones de zinc por 6 moléculas de derivado insulínico a la composición farmacéutica.

16b. Un método de tratamiento de diabetes en un paciente con la necesidad de tal tratamiento, comprendiendo la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado insulínico según cualquiera de los aspectos 1b-12b opcionalmente junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

17b. Un método según el aspecto 16b para el tratamiento pulmonar de diabetes.

18b. Una mezcla de un derivado insulínico según cualquiera de los aspectos 1b-12b y un análogo de insulina de acción rápida seleccionado del grupo consistente en insulina humana AspB28, insulina humana LysB28ProB29 e insulina humana LysB3GluB29.

19b. Derivado insulínico según el aspecto 1b, donde el derivado insulínico es seleccionado del grupo consistente en

insulina humana N^εA⁹-miristil LysA9 ArgB29 desB30,
 insulina humana N^εB³-miristil LysB3 ArgB29 desB30,
 insulina humana N^εB²²-miristil LysB22 ArgB29 desB30,
 insulina humana N^εA¹⁵-miristil LysA15 ArgB29 desB30,
 insulina humana N^εA¹⁸-miristil LysA18 ArgB29 desB30,
 insulina humana N^εA²²-miristil LysA22 ArgB29 desB30,

Ejemplos

Procedimientos generales:

Construcción de transformación de vectores de expresión de las células de levadura, y excreción de los precursores de insulina de la invención

[0142] Todos los plásmidos de expresión son del tipo C-POT, similares a aquellos descritos en EP 171142, que se caracterizan porque contienen el gen de la triosa fosfato isomerasa de *Schyzosacaromices pombe* (POT) para el fin de la selección y estabilización del plásmido en *S. cerevisiae*. Los plásmidos también contienen el promotor y terminador de triosa fosfato isomerasa de *S. cerevisiae*. Estas secuencias son similares a las secuencias correspondientes en el plásmido pKFN1003 (descrito en WO 90/10075) como son todas las secuencias excepto la secuencia del fragmento *EcoRI-XbaI* que codifica la proteína de fusión del líder y el producto de insulina. Para expresar proteínas de fusión diferentes, el fragmento *EcoRI-XbaI* de pKFN1003 es simplemente sustituido por un fragmento *EcoRI-XbaI* que codifica la fusión de líder y la insulina de interés. Tales fragmentos *EcoRI-XbaI* pueden ser sintetizados usando oligonucleótidos sintéticos y PCR según técnicas estándares.

[0143] Transformantes de levadura fueron preparados por transformación de la cepa huésped de la cepa de *S. cerevisiae* MT663 (*MATa/MAT α pep4-3/pep4-3 HIS4/his4 tpi::LEU2/tpi::LEU2 Cir⁺*). La cepa MT663 de levadura fue depositada en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen en relación con la solicitud WO 92/11378 y se le dió el número de depósito DSM 6278.

[0144] Transformantes de levadura fueron preparados por transformación de la cepa huésped de la cepa de *S. cerevisiae* MT663 (*MATa/MAT α pep4-3/pep4-3 HIS4/his4 tpi::LEU2/tpi::LEU2 Cir⁺*). La cepa MT663 de levadura fue depositada en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen en relación con la solicitud WO 92/11378 y se le dió el número de depósito DSM 6278.

[0183] MT663 fue crecida en YPGaL (1 % de extracto de bacto-levadura, 2% de Bacto-peptona, 2% de galactosa, 1% de lactato) a una O.D. a 600 nm de 0.6. 100 ml de cultivo fueron cosechados por centrifugado, lavados con 10 ml de agua, recentrifugados y resuspendidos en 10 ml de una solución conteniendo 1.2 M de sorbitol, 25 mM de Na₂EDTA pH = 8.0 y 6.7 mg/ml de ditiotreitól. La suspensión fue incubada a 30°C durante 15 minutos, centrifugada y las células resuspendidas en 10 ml de una solución conteniendo 1.2 M de sorbitol, 10 mM de Na₂EDTA, 0.1 M de citrato sódico, pH 0 5.8, y 2 mg de Novozym®234. La suspensión fue incubada a 30°C durante 30 minutos, las células recogidas por centrifugado, lavadas en 10 ml de 1.2 M de sorbitol y 10 ml de CAS (1.2 M de sorbitol, 10 mM de CaCl₂, 10 mM de tris HCl (pH = 7.5) y resuspendida en 2 ml de CAS. Para la transformación, 1 ml de células suspendidas de CAS fue mezclado con aprox. 0.1 mg de ADN plásmido y dejado a temperatura ambiente durante 15 minutos. 1 ml de (20% de polietilenglicol 4000, 10 mM de CaCl₂, 10 mM de Tris HCl, pH = 7.5) fue añadido y la mezcla fue dejada durante otros 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla fue centrifugada y el granulado fue resuspendido en 0.1 ml de SOS (1.2 M de sorbitol, 33% v/v de YPD, 6.7 mM de CaCl₂) e incubada a 30°C durante 2 horas. La suspensión fue luego centrifugada y el granulado resuspendido en 0.5 ml de 1.2 M de sorbitol. Luego, 6 ml de agar superior (el medio SC de Sherman et al. (1982) Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory) conteniendo 1.2 M de sorbitol más 2.5% de agar) a 52°C fue añadido y la suspensión vertida encima de placas conteniendo el mismo medio solidificado de agar, conteniendo sorbitol. La cepa MT663 de *S. cerevisiae* transformada con plásmidos de expresión fue crecida en YPD durante 72 h a 30°C.

Producción, purificación y caracterización de los derivados insulínicos de la invención

[0145] Varios precursores de insulina fueron producidos como se ha descrito anteriormente y aislados del medio de cultivo y purificados. Los precursores de insulina fueron procesados y acilados como se describe en los ejemplos más abajo para producir los derivados de insulina finales. Estos derivados insulínicos fueron evaluados para actividad insulínica biológica como se midió por afinidad de enlace al receptor de insulina humana relativo a aquel de la insulina humana como se describe abajo.

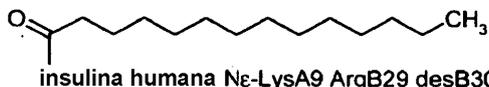
[0146] Los siguientes ejemplos se refieren a compuestos intermedios y productos finales identificados en la especificación y en los ejemplos. La preparación de los derivados insulínicos de la presente invención se describe en detalle usando los ejemplos siguientes, pero las reacciones químicas y esquemas de purificación descritos son descritos en cuanto a su aplicabilidad general a la preparación de los derivados insulínicos de la invención. Ocasionalmente, la reacción puede no ser aplicable como se describe para cada compuesto incluido en el ámbito de la invención descrito. Los compuestos para los cuales esto ocurre serán fácilmente reconocidos por aquellos expertos en la técnica. En estos casos las reacciones pueden ser exitosamente realizadas por modificaciones convencionales conocidas por los expertos en la técnica, es decir, por protección apropiada de grupos interfirientes, cambiando a otros reactivos convencionales, o por modificación de rutina de las condiciones de reacción. Alternativamente, otras reacciones descritas aquí o convencionales de otra manera serán aplicables a la preparación de los compuestos correspondientes de la invención. En todos los métodos preparatorios, todas las materias primas son conocidas o pueden fácilmente ser obtenidas a partir de materias primas conocidas. Todas las temperaturas son fijadas en grados Celsius y a menos que se indique lo contrario, todas las partes y porcentajes son en peso cuando se hace referencia a rendimientos y todas las partes son en volumen cuando se hace referencia a solventes y eluyentes.

[0147] Los derivados insulínicos de la invención pueden ser purificados utilizando uno o más de los siguientes procedimientos que son típicos dentro de la técnica. Estos procedimientos pueden - en caso de necesidad - ser modificados con respecto a gradientes, pH, sales, concentraciones, flujo, columnas, etc. Dependiendo de factores tales como perfil de impureza, solubilidad de las insulinas en cuestión etcétera, estas modificaciones pueden ser reconocidas rápidamente y hechas por un experto en la técnica.

Ejemplo 1:

Síntesis de insulina humana N^{eA9}-miristil LysA9 ArgB29 desB30

[0148]

5 Fase 1: Síntesis de éster de N-hidroxisuccinimida de ácido mirístico

[0149] La síntesis del éster de N-hidroxisuccinimida de ácido mirístico de reactivo de acilación fue realizada como se describe en B. Faroux-Corlay et al., J. Med. Chem. 2001, 44, 2188-2203.

10 Fase 2: Preparación y purificación del precursor de insulina LysA9 ArgB29 desB30 B'A

[0150] El precursor de insulina LysA9 ArgB29 desB30 B'A fue purificado como se describe en las fases A a C de purificación más abajo.

15 Fase A de Purificación: Captura

[0151] En la fase A 10.75 litros de medios de cultivo aclarados fueron diluidos por adición de 4.5 litros de 99% de etanol, para dar un volumen total de 15.25 litros conteniendo 30 vol% de etanol (conductividad 2.7 mS/cm, pH = 3.4). Una columna de SP Big Beads Sepharose de 300 ml (100-300 μm, Amersham Biosciences) fue equilibrada con 1 litro de 0.1 M de ácido cítrico pH 3.5 (flujo aprox. 20 ml/min), antes de cargar los 15.25 litros de medios de cultivo preparados durante la noche (flujo aprox. 10 ml/min). Después de la carga, la columna fue otra vez lavada con 1 litro de 0.1 M de ácido cítrico pH 3.5 seguido de 1 litro de 40 vol% de etanol (flujo aprox. 20 ml/min). El precursor de insulina LysA9 ArgB29 desB30 B'A unido fue luego eluido con 1.5 litros de 0.2 M de acetato sódico, 35 vol% de etanol, pH 5.75 (flujo: 1.5 ml/min, volumen de precursor eluido: 400 ml, cantidad de precursor: 220 mg).

25 Fase B de purificación: HPLC de fase inversa

[0152] En la fase B el eluato fue evaporado a sequedad y el granulado fue redisolto en 0.25 M de ácido acético. El pH fue bajado adicionalmente a 1.5 inmediatamente antes de la purificación por HPLC de fase inversa en una columna C18 (ODDMS C18, 20x250 mM, 200 Å, 10 μm, FeF Chemicals A/S). Antes de la aplicación a la columna la solución de precursor fue filtrada por filtro estéril (22 μm, Low Protein Binding Durapore® (PVDF), Millipore). Un gradiente de 15% de B a 50% de B excedió de la columna, donde el tampón A: 0.2 M de (NH₄)₂SO₄, 0.04 M de ácido orto-fosfórico, 10 vol% de etanol, pH 2.5 y tampón B: 70 vol% de etanol. El gradiente excedió 120 min con un flujo de 5 ml/min, temperatura de columna a 40°C. El precursor de insulina LysA9 ArgB29 desB30 B'A fue eluido a aproximadamente 35% de B y agrupado (volumen total 75 ml).

35 Fase C de purificación: Desalación por gelfiltración

[0153] En la fase C el contenido de etanol en el eluato de HPLC de fase inversa fue bajado a menos de 5 vol% usando un evaporador giratorio (nuevo volumen: 50 ml). Una columna G25 Sephadex de 1000 ml (5x55 cm, Amersham Biosciences) fue lavada en 0.5 M de ácido acético y el precursor de insulina LysA9 ArgB29 desB30 B'A fue luego aplicado a la columna y así desalado por gelfiltración en 0.5 M de ácido acético. El precursor de insulina fue seguido de detección UV a 280 nm, mientras que la sal fue seguida de medición de la conductividad. Inmediatamente después de la desalación el precursor de insulina fue liofilizado (160 mg en peso, 5759.87 m/z).

45 Fase 3: Síntesis de precursor N^εA9-miristil LysA9 ArgB29 desB30 B'A

[0154] 30 mg de precursor de insulina liofilizado LysA9 ArgB29 desB30 B'A fue disuelto en 5 ml de 50 mM de ácido bórico pH 2.6. El pH fue luego aumentado a 10.2 con unas pocas gotas de 1 M de NaOH. 4 mg del reactivo de acilación N-hidroxisuccinimida éster de ácido mirístico fue disuelto en 3.4 ml de CH₃CN bajo calentamiento atento a aproximadamente 50°C. 3.2 ml de solución de reactivo de acilación fue luego adicionado a la solución de precursor de insulina mientras se agitaba (por la presente el reactivo de acilación fue 1.75 veces en exceso). Tras la incubación con agitación durante 60 minutos a temperatura ambiente, la reacción fue detenida por adición de 2.1 ml de 0.2 M de etanolamina pH 9.0. Después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente el pH fue ajustado a 6.4, con lo que precipitó el precursor de insulina acilado N^εA9-miristil LysA9 ArgB29 desB30 B'A. El precipitado fue almacenado a 4°C durante la noche (cantidad de precipitado: 23 mg).

55 Fase 4: Producción de insulina humana N^εA9-miristil LysA9 ArgB29 desB30

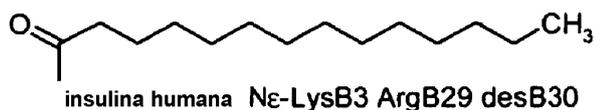
[0155] Los 23 mg de precipitado de N^εA⁹-miristil LysA9 ArgB29 desB30 B'A fue disuelta en 4.2 ml de glicina 50 mM, 20 vol% etanol pH 10.0. 3.6 mg de tripsina porcina liofilizada (Novo Nordisk A/S) fue también disuelta en 3.5 ml de glicina 50 mM, 20 vol% etanol pH 10.0. De esta solución de tripsina 0.5 ml fueron luego adicionados a la solución de precursor de insulina (por la presente el precursor de insulina fue 200 veces en exceso). La mezcla fue luego incubada a temperatura ambiente durante 15 minutos, después de lo cual la actividad de tripsina fue detenida por reducción del pH <3 (pH = 2.08 con 0.5 M de ácido acético).

[0156] El análogo de insulina acilado insulina humana N^εA⁹-miristil LysA9 ArgB29 desB30 fue luego purificado (eliminando la tripsina y cualquier molécula no acilada, doblemente acilada etc. o moléculas de insulina no divididas) por HPLC de fase inversa. Un 40% de B a 100% de gradiente B fue aplicado a una columna C4 (Jupiter C4, 5 μm, 300 Å 10x250 mm, Phenomenex), donde tampón A: 10 mM de Tris, 15 mM (NH₄)HCO₃, 10 vol% de etanol, pH 8.5 y tampón B: 70 vol% de etanol. El gradiente excedió 120 min con un flujo de 2 ml/min, temperatura de columna a 40°C, y tamaño de columna 1x25 cm. La N^εA⁹-miristil LysA9 ArgB29 desB30 insulina humana fue eluida al 70% B (volumen de análogo de eluato: 15 ml). El análogo fue precipitado por reducción del pH a aproximadamente 6, redissuelto en 2 ml de 0.5 M de ácido acético y liofilizado (cantidad de análogo en peso: 9.3 mg en peso, LCMS: 5988.04 m/z).

Ejemplo 2:

Síntesis de insulina humana N^εB³-miristil LysB3 ArgB29 desB30

[0157]

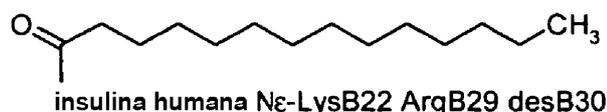


[0158] Preparación y purificación del precursor LysB3 ArgB29 desB30 B'A se describe en el Ejemplo 3. La síntesis del precursor N^εB³-miristil LysB3 ArgB29 desB30 B'A y la siguiente escisión por tripsina para producir el producto final, insulina humana N^εB³-miristil LysB3 ArgB29 desB30, fue realizada esencialmente como se describe en el ejemplo 1. LC-MS: derivado Intacto: 5959.0 m/z, cadena B de derivado reducido: 3581.3 m/z.

Ejemplo 3:

Síntesis de insulina humana N^εB²²-miristil LysB22 ArgB29 desB30

[0159]

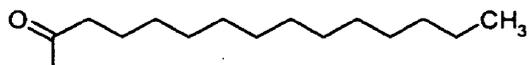


[0160] Preparación y purificación del precursor LysB22 ArgB29 desB30 B'A fue hecha esencialmente como se describe en el ejemplo 1 y 3. La síntesis del precursor N^εB²²-miristil LysB22 ArgB29 desB30 B'A y la siguiente escisión por tripsina para producir el producto final, N^εB²²-miristil LysB22 ArgB29 desB30 insulina humana, fue realizado esencialmente como se describe en el ejemplo 1. LC-MS: derivado Intacto: 5917.2 m/z, derivado reducido: 2382.60 m/z (cadena A), 3537.70 m/z (cadena B).

Ejemplo 4:

Síntesis de insulina humana N^εA¹⁵-miristil LysA15 ArgB29 desB30

[0161]

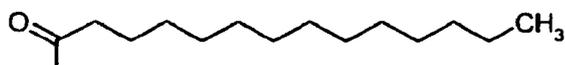
insulina humana N ϵ -LysA15 ArgB29 desB30

[0162] Preparación y purificación del precursor LysA15 ArgB29 desB30 B'A fue hecha esencialmente como se describe en el ejemplo 1 y 3. La síntesis del precursor N ϵ ^{A15}-miristil LysA15 ArgB29 desB30 B'A y la siguiente escisión por tripsina para producir el producto final, insulina humana N ϵ ^{A15}-miristil LysA15 ArgB29 desB30, fue realizado esencialmente como se describe en el ejemplo 1. MALDI-MS: derivado Intacto: 5946.14 m/z, cadena B de derivado reducido: 3356.23 m/z.

Ejemplo 5:

Síntesis de insulina humana N ϵ ^{A18}-miristil LysA18 ArgB29 desB30

[0163]

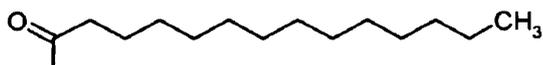
insulina humana N ϵ -LysA18 ArgB29 desB30

[0164] Preparación y purificación del precursor LysA18 ArgB29 desB30 B'A fue hecha esencialmente como se describe en el ejemplo 1 y 3. La síntesis del precursor N ϵ ^{A18}-miristil LysA18 ArgB29 desB30 B'A y la siguiente escisión por tripsina para producir el producto final, insulina humana N ϵ ^{A18}-miristil LysA18 ArgB29 desB30, fue realizada esencialmente como se describe en el ejemplo 1. LC-MS: derivado Intacto: 5959.5 m/z, cadena B de derivado reducido: 3355.50 m/z.

Ejemplo 6:

Síntesis de insulina humana N ϵ ^{A22}-miristil LysA22 ArgB29 desB30

[0165]

insulina humana N ϵ -LysA22 ArgB29 desB30

[0166] Preparación y purificación del precursor LysA22 ArgB29 desB30 B'A fue hecha esencialmente como se describe en el ejemplo 1 y 3. La síntesis del precursor N ϵ ^{A22}-miristil LysA22 ArgB29 desB30 B'A y la siguiente escisión por tripsina para producir el producto final, insulina humana N ϵ ^{A22}-miristil LysA22 ArgB29 desB30, se realizó esencialmente como se describe en el ejemplo 1. LC-MS: 6072.3 m/z

Ejemplo 7:

Hidrofobicidad de los derivados insulínicos de la invención

[0167] La hidrofobicidad de un derivado insulínico se encuentra por la HPLC en fase inversa realizada bajo condiciones isocráticas. El tiempo de elución del derivado insulínico es comparado con el de HI u otro derivado con una hidrofobicidad conocida bajo las mismas condiciones. La hidrofobicidad, k_{rel}, es calculada como: $k'_{rel,deriv} = ((t_{deriv} - t_0) / (t_{ref} - t_0)) * k'_{rel,ref}$. Usando HI como referencia: $k'_{rel,ref} = k'_{rel,HI} = 1$. Tiempo del vacío del sistema de HPLC, t₀, es determinado inyectando 5 μ l de 0.1 mM de NaNO₃. Condiciones de realización:

Columna:	Lichrosorb RP-C18, 5 μ m, 4 x 250 mm
Tampón A:	0.1 M de fosfato de sodio pH 7.3, 10 vol% CH ₃ CN
Tampón B:	50 vol% CH ₃ CN
Volumen de inyección:	5 μ l
Tiempo de ejecución:	max 60 minutos

[0168] Después de ejecutar un gradiente inicial, el nivel isocrático para ejecutar el derivado y referencia (por ejemplo HI) es elegido, y los tiempos de elución del derivado y referencia bajo condiciones isocráticas en la ecuación anterior se usan para calcular $K'_{rel_{deriv}}$.

5 Ejemplo 8:

Unión al receptor de insulina de los derivados insulínicos de la invención

[0169] La afinidad de los derivados insulínicos de la invención para el receptor de insulina humano se determina por un ensayo SPA (ensayo de proximidad de centelleo) ensayo de captura de anticuerpos en placa de microtitulación. Perlas de unión a anticuerpo de SPA-PVT, reactivo anti-ratón (Amersham Biosciences, Cat No. PRNQ0017) se mezclan con 25 ml de tampón de unión (100 mM de HEPES pH 7.8, 100 mM de cloruro sódico, 10 mM de $MgSO_4$, 0.025% Tween-20). Mezcla reactiva para un único Packard Optiplate (Packard n°. 6005190) está compuesto de 2.4 μ l de un receptor de insulina humana diluido purificado recombinante 1:5000 (bien con o sin exón 11), una cantidad de una solución stock de insulina humana A14Tyr^[125I] correspondiente a 5000 cpm por 100 μ l de mezcla reactiva, 12 μ l de una dilución 1:1000 de anticuerpo F12, 3 ml de perlas de SPA y tampón de unión a un total de 12 ml. Un total de 100 μ l de mezcla reactiva es luego adicionado a cada pocillo en el Packard Optiplate y una serie de dilución del derivado insulínico es hecho en el Optiplate de muestras apropiadas. Las muestras son luego incubadas durante 16 horas mientras se agitan suavemente. Las fases son luego separadas por centrifugado durante 1 min y las placas contadas en un Topcounter. Los datos de unión fueron ajustados usando el algoritmo de regresión no lineal en el GraphPad Prism 2.01 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Ejemplo 9:

Ensayo de afinidad de albúmina de suero humano de los derivados insulínicos de la invención

[0170] La afinidad para albúmina de suero humano de los derivados insulínicos de la invención son dados como la constante de unión relativa del derivado A14Tyr^[125I] a albúmina de suero humana (HSA) inmovilizado en partículas de Minileak y se midió a 23 °C en comparación con Detemir de insulina (equal. a 1 en tampón de solución salina): $HSA_{aff} = k_d(\text{Detemir})/k_d(\text{derivado})$.

HSA se inmoviliza en el material de Minileak (KemEnTec 1011 F) por incubación durante la noche a temperatura ambiente con HSA (Sigma A-1887) y PEG (Fluka 95172) en 0.3 M de $NaHCO_3$ pH 8.8. Tras la incubación la reacción se detiene por adición de 1 M de etanolamina pH 9.0, y el material es lavado varias veces con 0.1 M de Tris(HCl) pH 7.4, con 0.1 M de $NaHCO_3$ pH 9.0, y con 0.1 M de fosfato pH 3.0. El material de HSA-Minileak se almacena en 0.1 M de Tris(HCl) pH 7.4, 0.02% de azida. La cantidad de HSA inmovilizada en el material se evalúa incubando HSA-Minileak con ³H-ácido mirístico (PerkinElmer NET-830) y varias cantidades de HSA libre en 0.1 M de Tris(HCl) pH 7.4, 0.025% Triton-X-100 durante dos horas a temperatura ambiente. Después del centrifugado de las muestras el sobrenadante se analiza en un contador de centelleo, y la cantidad de HSA inmovilizada es calculada.

Al determinar la afinidad de los derivados insulínicos para HSA, varias cantidades de HSA-Minileak se incuban con el derivado A14Tyr^[125I] durante dos horas a temperatura ambiente en 0.1 M Tris(HCl) pH 7.4, 0.025% Triton-X-100. Tras la incubación las muestras se centrifugan y la mitad del sobrenadante se elimina a tubos nuevos. Tanto la mitad del sobrenadante (¹/₂S) como el resto de sobrenadante más granulado (¹/₂S+P) es analizado en un contador gamma, y estos datos se usan para el cálculo de k_d para el derivado de A14Tyr^[125I].

Ejemplo 10:

Análisis de propiedades auto-asociativas de los derivados insulínicos de la invención

[0171] La capacidad de los derivados insulínicos de la invención para autoasociarse en complejos grandes, pero solubles es analizada usando SEC (cromatografía de exclusión por tamaño):

50	Columna:	Superose™ 6 PC 3.2/30, CV = 2.4 ml (Amersham Biosciences)
	Temperatura:	37°C
	Tampón SEC:	140 mM NaCl, 10 mM TrisHCl, 0.01% NaN_3 , pH 7.5
	Volumen de inyección:	20 μ l
55	Flujo:	0.04 ml/min
	Tiempo de ejecución:	80 min

Para este análisis los derivados insulínicos de la invención están en una solución que consiste en 0.6 mM de derivado, 2.1 Zn^{2+} /hexámero, 16 mM de fenol, 7 mM de fosfato pH 7.8. El tiempo de retención del derivado es luego comparado con los tiempos de retención de las siguientes moléculas estándar:

5	Estándar I:	Dímero de HSA+HSA (66.4 kDa+133 kDa)	
		hexámero Co(III) (35.0 kDa)	
		monómero X2 (5.9 kDa)	
	Estándar II:	Dextrán azul (1.5 MDa)	
		Tiroglobulina (669 kDa)	
		Ferritina (440 kDa)	
		Aldolasa (158 kDa)	
		Ovalbumina (44.5 kDa)	
		Ribonucleasa (13.7 kDa)	

La siguiente ecuación se utiliza para determinar el K_{av} para el derivado:

$$K_{av} = (t - t_0) / (V_t / (f + t_d - t_0))$$

donde t es el tiempo de retención para un valor máximo dado, t_0 es el tiempo de retención para azul dextrán, V_t es el volumen de columna total (aquí 2.4 ml), f es el flujo (aquí 0.04 ml/min), y t_d es el tiempo de retención para azul dextrán sin la columna en el sistema.

[0172] El valor K_{av} indica el grado de auto-asociación de un derivado, es decir un gran K_{av} similar al K_{av} para el hexámero Co(III) y el monómero X2 muestra poca o ninguna propensión del derivado para formar complejos grandes, auto-asociados, mientras K_{av} muy pequeño próximo a cero o incluso negativo muestra gran propensión del derivado a auto-asociación en complejos grandes solubles.

Compuesto	Hidrofobicidad relativa a insulina humana	Afinidad de receptor de insulina relativa a insulina humana	Autoasociación: K_{av} (% área de valor máximo)
Ejemplo 1	+	++	Valor máximo 1 (37%): ++ Valor máximo 2 (63%): ++
Ejemplo 2	+	+++	++ (100%)
Ejemplo 3	+	++	+(100%)
Ejemplo 4	+	++	-
Ejemplo 5	+	+++	Valor máximo 1 (95%): ++ Valor máximo 2 (5%): +

Nota: hidrofobicidad relativa a insulina humana: $K_{rel} < 1$: +++, 1-10: ++, >10: + (HI =1) afinidad de receptor de insulina relativa a insulina humana: <5%: +, 5-50%: ++, >50%: +++ Autoasociación: $K_{av} < 0.55$: ++ y $K_{av} \geq 0.55$: +
($K_{av} = 0.55$ para albúmina de suero humano (HSA), $K_{av} = 0.63$ para insulina humana hexámero Co(III), y $K_{av} = 0.72$ para el análogo de insulina monomérico X2.)

Ejemplo 11:

Efecto de disminución de glucosa en sangre después de inyección i.v. en bolo en rata de los derivados insulínicos de la invención

[0173] Ratas Wistar macho, 200-300 g, ayunadas durante 18 h, fueron anestesiadas usando bien Hypnorm-Dormicum s.c. (1.25 mg/ml de Dormicum, 2.5 mg/ml de fluanisona, 0.079 mg/ml de fentanil citrato) 2 ml/kg como una dosis de cebado (hasta el punto temporal de -30 min antes de evaluar la dosificación de la sustancia) y 1 ml/kg adicional cada 20 minutos.

[0174] Los animales se dosifican con una inyección intravenosa (vena caudal), 1 ml/kg, de compuestos de control y de prueba (gama de dosis usual 0.125-20 nmol/kg). Muestras de sangre para la determinación de concentración de glucosa de sangre fueron recogidas en tubos de vidrio heparinizados de 10 µl por punción de los vasos capilares en la punta de cola en el tiempo -20min y 0 min (antes de dosificación), y en los tiempos 10, 20, 30, 40, 60, 80, 120, y 180 min después de la dosificación. Las concentraciones de glucosa en sangre fueron medidas después de la dilución en tampón de análisis por el método de glucosa oxidasa inmovilizado usando un autoanalizador EBIO Plus (Eppendorf, Alemania). La media de transcurros de concentraciones de glucosa en sangre (media ± SEM) se ha hecho para cada dosis y cada compuesto.

Ejemplo 12:

Determinación en cerdos de $T_{50\%}$ de los análogos de insulina de la invención

[0175] $T_{50\%}$ es el tiempo cuando el 50% de una cantidad inyectada del derivado marcado A14 Tyr^[125] de una insulina que debe evaluarse ha desaparecido del sitio de inyección según es medido con un γ -contador externo

5 [0176] Se siguieron los principios de cuidado de animales de laboratorio. LYYD sin patógeno específico, cerdas no diabéticas, cruce de Danés Landrace, Yorkshire y Duroc, fueron usados (Holmenlund, Haarlov, Dinamarca) para estudios farmacodinámicos y farmacocinéticos. Los cerdos estaban conscientes, de 4-5 meses de edad y peso de 70-95 kg. Los animales fueron ayunados durante toda la noche durante 8 h antes del experimento.

10 [0177] Preparaciones formuladas de derivados insulínicos marcados en Tyr^{A14} con ¹²⁵I fueron inyectados sc. en cerdos tal y como se ha descrito anteriormente (Ribel, U., Jørgensen, K, Brange, J, y Henriksen, U. El cerdo como un modelo para absorción de insulina subcutánea en el hombre. Serrano-Rios, M y Lefèbvre, P. J. 891-896. 1985. Amsterdam; Nueva York; Oxford, Elsevier Science Publishers. 1985 (Conference Proceeding)).

15 [0178] Al principio de los experimentos una dosis de 60 nmol del derivado insulínico según la invención (compuesto de prueba) y una dosis de 60 nmol de insulina detemir (ambos marcados ¹²⁵I en TyrA14) fueron inyectados en dos sitios separados en el cuello de cada cerdo.

20 [0179] La desaparición del marcador radiactivo del sitio de inyección sc. fue vigilada usando una modificación del método de recuento tradicional de gamma externos (Ribel, U. Subcutaneous absorption of insulin analogues. Berger, M. y Gries, F. A. 70-77 (1993). Stuttgart; Nueva York, Georg Time Verlag (Conference Proceeding)). Con este método modificado fue posible medir continuamente la desaparición de radioactividad de un depósito subcutáneo durante varios días usando dispositivo inalámbrico portátil (Scancys Laboratorieteknik, Vaerløse, DK-3500, Dinamarca). Las mediciones fueron realizadas en intervalos de 1-min, y los valores contados fueron corregidos para actividad de fondo

25 **Ejemplo 13:**

Potencia de los derivados insulínicos de la invención en relación a la insulina humana

30 [0180] Ratas Sprague Dawley macho de 238-383 g de peso en el día del experimento fueron usadas para el experimento de pinzamiento. Las ratas tuvieron libre acceso al alimento bajo condiciones ambiente controladas y fueron ayunadas durante toda la noche (desde 3 pm) antes del experimento de pinzamiento..

Protocolo experimental:

35 [0181] Las ratas fueron aclimatadas a las instalaciones para animales durante al menos 1 semana antes del procedimiento quirúrgico. Aproximadamente 1 semana antes del experimento de pinzamiento se insertaron catéteres Tygon con anestesia de halotano en la vena yugular (para infusión) y la arteria carótida (para muestra de sangre) y fijados y exteriorizados en el cuello. A las ratas se les dio Streptocilin vet. (Boehringer Ingelheim; 0.15 ml/rata, i.m.) post-quirúrgicamente y se colocaron en una unidad de cuidado de animales (25 °C) durante el periodo de recuperación. Para obtener analgesia, se administró Anorfina (0.06 mg/rata, s.c.) durante la anestesia y se administró Rimadyl (1.5 mg/kg, s.c.) después de la recuperación completa de la anestesia (2-3 h) y nuevamente una vez al día durante 2 días..

45 [0182] La técnica de pinzamiento empleada fue adaptada a partir de (1). A las 7 am del día del experimento, las ratas ayunadas durante toda la noche (desde las 3 pm del día precedente) fueron pesadas y conectadas a las jeringas de muestreo y sistema de infusión (bombas Harvard 22 Basic, Harvard, y jeringa de vidrio Perfectum Hipodermic, Aldrich) y luego se colocaron en jaulas de pinzamiento individuales donde permanecieron durante aprox. 45 min antes del inicio del experimento. Las ratas fueron capaces de moverse libremente en su lecho usual durante todo el experimento y tuvieron libre acceso a agua potable. Después de un periodo basal de 30 min durante el cual los niveles de glucosa en sangre fueron medidos a intervalos de 10 min, el derivado insulínico que debe evaluarse y la insulina humana (un nivel de dosis por rata, n = 6-7 por nivel de dosis) fueron infundidos (i.v.) a un índice constante durante 300 min. Los niveles de glucosa en sangre fueron medidos en intervalos de 10 min en todas partes y la infusión de 20% de glucosa acuosa fue ajustada por consiguiente para mantener euglicemia. Muestras de eritrocitos resuspendidos fueron agrupadas de cada rata y devueltas en aproximadamente volúmenes de $1/2$ ml vía catéter carótido.

55 [0183] En cada día del experimento, muestras de las soluciones de los derivados insulínicos individuales que deben evaluarse y la solución de insulina humana fueron tomadas antes y al final de los experimentos de pinzamiento y las concentraciones de los péptidos fueron confirmadas por HPLC. Concentraciones en plasma de insulina de rata y péptido C al igual que del derivado insulínico que debe evaluarse e insulina humana fueron medidas en puntos temporales pertinentes antes y después de los estudios. Las ratas fueron matadas al final del experimento usando una dosis excesiva de pentobarbital.

60

Ejemplo 14:

Suministro pulmonar de derivados insulínicos a ratas

5 [0184] La sustancia de prueba será dosificada pulmonarmente por el método de instilación por goteo. En resumen, ratas
Wistar macho (aprox. 250 g) se anestesian en aprox. 60 ml de fentanil/deshidrodanzperidol/-dormicum dado como una dosis
preparatoria sc de 6.6 ml/kg y seguido de 3 dosis de mantenimiento sc de 3.3 ml/kg con un intervalo de 30 min. Diez minutos
después de la inducción de anestesia, muestras basales se obtienen de la vena caudal (t = -20 min) seguido de una muestra
10 basal inmediatamente antes de la dosificación de sustancia de prueba (t=0). A t= 0, la sustancia de prueba es dosificada
intratraquealmente en un pulmón. Una cánula especial con punta redondeada se instala en una jeringa conteniendo 200 ul
de aire y sustancia de prueba (1 ml/kg). Por medio del orificio, la cánula se introduce en la tráquea y avanza por uno de los
bronquios principales - justo pasando la bifurcación. Durante la inserción, el cuello es palpado desde el exterior para
asegurar el posicionamiento intratraqueal. El contenido de la jeringa es inyectado seguido de 2 seg de pausa. Luego, la
15 cánula es extraída lentamente. Las ratas son mantenidas anestesiadas durante la prueba (muestras de sangre hasta 4 u 8
hrs) y son eutanizadas después del experimento.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Derivado insulínico comprendiendo una insulina progenitora y un sustituyente, donde el sustituyente está unido bien a un grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena A de la insulina progenitora en la posición A8, A9, A10, A12, A14, A15, A17, A18, A21, A22, A23 o A24 o a un grupo ϵ -amino de un residuo de Lys en la cadena B de la insulina progenitora en la posición B1, B2, B3, B4, B20, B21 o B22 a condición de que cuando B3 es Lys, entonces B29 no es Glu, donde el sustituyente es un grupo lipofílico con de 4 a 40 átomos de carbono.
- 10 2. Derivado insulínico según la reivindicación 1, donde el grupo acilo es $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-CO-}$, donde $4 \leq n \leq 38$.
3. Derivado insulínico según la reivindicación 1, donde el grupo acilo es $\text{(NH}_2\text{-CO)-(CH}_2\text{)}_n\text{-CO-}$, donde $4 \leq n \leq 38$.
4. Derivado insulínico según la reivindicación 1, donde el grupo acilo es $\text{HO-(CH}_2\text{)}_n\text{-CO-}$, donde $4 \leq n \leq 38$.
- 15 5. Derivado insulínico según la reivindicación 1, donde el grupo acilo es ácido litocólico 5- α o ácido litocólico 5- β .
6. Derivado insulínico según la reivindicación 1, donde el grupo acilo es isómeros 5- α o 5- β de ácido cólico, ácido iocólico, ácido deoxicólico, ácido quenodesoxicólico, ácido ursodesoxicólico, ácido iodeoxicólico o ácido colánico.
- 20 7. Derivado insulínico según la reivindicación 1, donde el grupo acilo es un isómero 5- α o 5- β de ácido dehidrolitocólico.
8. Derivado insulínico según la reivindicación 1, donde el grupo acilo es ácido fusídico, un derivado de ácido fusídico o ácido glicirretínico.
- 25 9. Derivado insulínico según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde la insulina progenitora es un análogo de insulina.
10. Complejo de zinc de un derivado insulínico según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde dos iones de zinc, tres iones de zinc, cuatro iones de zinc, cinco iones de zinc, seis iones de zinc, siete iones de zinc, ocho iones de zinc, nueve iones de zinc, diez iones de zinc, once iones de zinc o doce iones de zinc están unidos por seis moléculas de derivado insulínico.
- 30 11. Composición farmacéutica para el tratamiento de diabetes en un paciente con la necesidad de tal tratamiento, comprendiendo una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado insulínico según cualquiera de las reivindicaciones precedentes opcionalmente junto con un portador farmacéuticamente aceptable.
- 35 12. Método para la producción de una composición farmacéutica según la reivindicación 11 o un complejo de zinc de un derivado insulínico según la reivindicación 10, donde hasta aproximadamente 12 iones de zinc por 6 moléculas de derivado insulínico se agregan a la composición farmacéutica.
- 40 13. Derivado insulínico para uso como un medicamento para tratar la diabetes en un paciente con la necesidad de tal tratamiento, comprendiendo la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado insulínico según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 opcionalmente junto con un portador farmacéuticamente aceptable.
- 45 14. Derivado insulínico según la reivindicación 1, donde el derivado insulínico se selecciona del grupo consistente en
- 50 insulina humana $N^{\epsilon\text{A9}}$ -miristil LysA9 ArgB29 desB30,
insulina humana $N^{\epsilon\text{B3}}$ -miristil LysB3 ArgB29 desB30,
insulina humana $N^{\epsilon\text{B22}}$ -miristil LysB22 ArgB29 desB30,
insulina humana $N^{\epsilon\text{A15}}$ -miristil LysA15 ArgB29 desB30,
insulina humana $N^{\epsilon\text{A18}}$ -miristil LysA18 ArgB29 desB30,
insulina humana $N^{\epsilon\text{A22}}$ -miristil LysA22 ArgB29 desB30,