

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 522**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/62** (2006.01)

**A61K 38/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2006 E 06707956 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013 EP 1846447**

54 Título: **Derivados de insulina**

30 Prioridad:

**02.02.2005 DK 200500156**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**20.12.2013**

73 Titular/es:

**NOVO NORDISK A/S (100.0%)**

**Novo Allé**

**2880 Bagsvård, DK**

72 Inventor/es:

**GARIBAY, PATRICK, WILLIAM;**

**HOEG-JENSEN, THOMAS;**

**JONASSEN, IB;**

**HAVELUND, SVEND;**

**MADSEN, PETER y**

**JAKOBSEN, PALLE**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 435 522 T3

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).

## DESCRIPCIÓN

Derivados de insulina

## 5 Campo de la invención

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

Antecedentes de la invención

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

20 [0003] Las composiciones de insulina de acción prolongada son conocidas en la técnica. De este modo, un tipo principal de composiciones de insulina de acción prolongada comprende suspensiones acuosas inyectables de cristales de insulina o de insulina amorfa. En estas composiciones, los compuestos de insulina utilizados típicamente son insulina de protamina, insulina de zinc o insulina zinc-protamina.

25 [0004] Algunos inconvenientes se asocian al uso de suspensiones de insulina. Así, para asegurar una dosificación precisa, las partículas de insulina se deben suspender homogéneamente por agitación suave antes de que un volumen definido de la suspensión se retire de un vial o se expulse de un cartucho. Además, para el almacenamiento de las suspensiones de insulina, la temperatura se debe mantener dentro de unos límites más estrechos que para las soluciones de insulina para evitar la formación de grumos o la coagulación.

30 [0005] Otro tipo de composiciones de insulina de acción prolongada son soluciones que tienen un valor de pH inferior al pH fisiológico a partir del cual la insulina se precipitará debido al aumento en el valor del pH cuando se inyecta la solución. Un inconveniente derivado de estas soluciones es que la distribución del tamaño de las partículas del precipitado formado en el tejido durante la inyección, y de este modo, el perfil de liberación de la medicación, depende del flujo sanguíneo en el sitio de inyección y de otros parámetros bastante imprevisibles. Otro inconveniente es que las partículas sólidas de la insulina pueden actuar como irritante local causando una 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  $\epsilon$ -amino de LysB29. Varios derivados de insulina que se sustituyen en uno o más de estos grupos se conocen en la técnica anterior. De este modo, la patente estadounidense n.º 3 528 960 (Eli Lilly) se refiere a insulinas de N-carboxiaroil en las que uno, dos o tres grupos amino primarios de la molécula de insulina presentan un grupo carboxiaroil.

40 [0007] Según la patente GB n.º 1.492.997 (Nat. Res. Dev. Corp.), se ha descubierto que la insulina con una sustitución de carbamilo en N<sup>B29</sup> tiene un perfil mejorado de efecto hipoglucémico.

45 [0008] La solicitud de patente abierta a inspección pública JP n.º 1-254699 (Kodama Co., Ltd.) divulga una insulina donde un ácido graso está ligado al grupo amino de PheB1 o al grupo  $\epsilon$ -amino de LysB29 o a ambos. El objetivo declarado de la derivación es obtener una preparación de insulina estable farmacológicamente aceptable.

50 [0009] Las insulinas que en la posición B30 tienen un aminoácido con al menos cinco átomos de carbono que no tienen que ser codificados necesariamente por un triplete de nucleótidos, se describen en la solicitud de patente abierta a inspección pública JP n.º 57-067548 (Shionogi). Se reivindica que los análogos de insulina son útiles en el tratamiento de la diabetes mellitus, particularmente en pacientes que son resistentes a la insulina debido a la generación de anticuerpos de insulina bovina o porcina.

55 [0010] El documento WO 95/07931 (Novo Nordisk A/S) divulga derivados de insulina humana en los que el grupo  $\epsilon$ -amino de LysB29 tiene un sustituyente lipofílico. Estos derivados de insulina tienen un perfil de acción prolongada y son solubles en valores de pH fisiológico.

60 [0011] El documento EP 894095 divulga derivados de insulina en los que el grupo N-terminal de la cadena B y/o el grupo  $\epsilon$ -amino de Lys en la posición B28, B29 o B30 tiene un sustituyente de la fórmula -CO-W-COOH, donde W puede ser un grupo hidrocarburo de cadena larga. Estos derivados de insulina tienen un perfil de acción prolongada y son solubles en valores de pH fisiológico.

[0012] Lamentablemente, muchos diabéticos son reacios a someterse a terapia intensiva debido a la incomodidad asociada con la gran cantidad de inyecciones necesarias para mantener un control estricto de los niveles de glucosa. Este tipo de terapia puede ser tanto doloroso psicológicamente como físicamente. Mediante 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 tenido como resultado una absorción de insulina eficaz.

[0013] 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 en una medida significativa. Esto se debe al moco superpuesto que tiene un grosor de aproximadamente 30-40  $\mu\text{m}$  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.

[0014] No obstante, se reconoce ampliamente que las propiedades de los péptidos se pueden mejorar injertando en ellos moléculas orgánicas de tipo cadena. Tal injerto puede mejorar propiedades farmacéuticas tales como la vida media en el suero, la estabilidad contra la degradación proteolítica y la inmunogenicidad reducida.

[0015] Las moléculas similares a cadenas orgánicas frecuentemente usadas para mejorar las propiedades son cadenas a base de polietilenglicol o a base de polietileno, es decir, cadenas que se basan en la unidad de repetición  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ . De ahora en adelante, se usa la abreviatura "PEG" para el polietilenglicol.

[0016] La tecnología de PEG tradicional aprovecha la provisión de polipéptidos con tamaño aumentado (radio de Stoke) uniendo una molécula orgánica soluble al polipéptido (Kochendoerfer, G., et al., Science (299) 884-, 2003). Esta tecnología conduce a la depuración reducida en el hombre y los animales de un polipéptido de la hormona en comparación con el polipéptido nativo. Sin embargo, esta técnica es frecuentemente dificultada por la potencia reducida de los polipéptidos de la hormona sometida a esta técnica (Hinds, K., et al., Bioconjugate Chem. (11), 195 -, 2000). El documento WO 02/20033 divulga un método general para la síntesis de péptidos modificados de polímeros bien definidos.

[0017] No obstante, sigue existiendo la necesidad de insulinas con un perfil de acción más prolongada que los derivados de insulina conocidos hasta hoy y que sean al mismo tiempo solubles en valores de pH fisiológico y presenten una potencia comparable a la de la insulina humana. Además, existe la necesidad de más formulaciones de insulina que estén bien adecuadas para la aplicación pulmonar.

Resumen de la invención

[0018] La presente invención se basa en el reconocimiento de que la acilación de insulina se puede realizar en uno o más residuos de etilenglicol, propilenglicol y/o butilenglicol en combinación con residuos de ácidos grasos sorprendentemente ha demostrado una buena biodisponibilidad.

[0019] Las moléculas similares a las cadenas orgánicas, que se pueden usar para mejorar propiedades, son cadenas a base de polietilenglicol, a base de polipropilenglicol o a base de polibutilenglicol, es decir, cadenas que se basan en la unidad de repetición  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$  o  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ . En adelante, la abreviatura "PEG" se usa para el polietilenglicol, "PPG" se usa para polipropilenglicol y "PBG" se usa para polibutilenglicol.

[0020] En un aspecto, la presente invención se refiere a derivados de insulina con una cadena lateral unida bien al grupo  $\alpha$ -amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B o a un grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la molécula de insulina progenitora mediante un enlace amida cuya cadena lateral comprende uno o más residuos de etilenglicol, propilenglicol y/o butilenglicol que contienen independientemente en cada terminal un grupo seleccionado de  $-\text{NH}_2$  y  $-\text{COOH}$ ; una fracción de diácido graso con 4 a 22 átomos de carbono; al menos un grupo de ácido carboxílico libre o un grupo cargado negativamente con pH neutro; y posibles enlaces que conectan los componentes individuales en la cadena lateral mediante enlace amida, éter o amina. Dichos enlaces opcionalmente comprenden un grupo de ácido carboxílico libre.

[0021] En un aspecto los derivados de insulina contienen un grupo PEG, PPG o PBG bifuncional que tiene de 2 a 20, de 2 a 10 o de 2 a 5 residuos de etilenglicol, propilenglicol o butilenglicol, respectivamente.

[0022] En un aspecto la cadena lateral del derivado de insulina comprende un residuo único de etilenglicol.

[0023] En un aspecto la cadena lateral del derivado de insulina comprende un residuo único de propilenglicol.

[0024] En un aspecto la cadena lateral del derivado de insulina comprende un residuo único de butilenglicol.

[0025] En un aspecto la cadena lateral del derivado de insulina tiene residuos únicos de etilenglicol, propilenglicol o butilenglicol solo o en combinación.

5 [0026] En un aspecto la cadena lateral del derivado de insulina tiene un residuo de propilenglicol y un residuo de butilenglicol.

[0027] En un aspecto el diácido graso comprende de 4 a 22 átomos de carbono en la cadena de carbono.

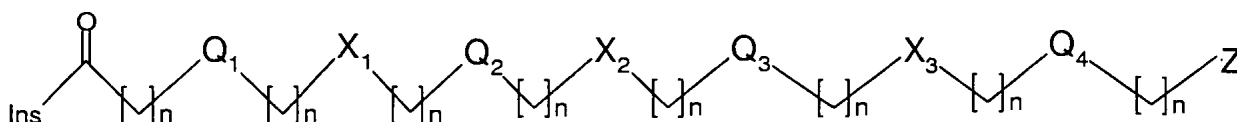
10 [0028] En un aspecto el diácido graso comprende de 6 a 22, de 8 a 20, de 8 a 18, de 4 a 18, de 6 a 18, de 8 a 16, de 8 a 22, de 8 a 17 o de 8 a 15 átomos de carbono en la cadena de carbono.

[0029] También se describe en la presente una variante donde el enlazador es un residuo de aminoácido, una cadena peptídica de 2-4 residuos de aminoácidos o tiene el motivo que es  $\alpha$ -Asp;  $\beta$ -Asp;  $\alpha$ -Glu;  $\gamma$ -Glu;  $\alpha$ -hGlu;  $\delta$ -hGlu; -N(CH<sub>2</sub>COOH)CH<sub>2</sub>CO-; -N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-; -N(CH<sub>2</sub>COOH)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO- o -N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH)CH<sub>2</sub>CO-.

15

[0030] En un aspecto el residuo de Lys en la cadena B será la posición B3; B29 o en una de las posiciones B23-B30.

[0031] En otro aspecto la invención se refiere a un derivado de insulina con la fórmula



20

donde Ins es la fracción de insulina progenitora que mediante el grupo  $\alpha$ -amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B o un grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la fracción de insulina se liga al grupo CO- en la cadena lateral mediante un enlace amida; cada n es independientemente 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6; Q<sub>1</sub>, Q<sub>2</sub>, Q<sub>3</sub> y Q<sub>4</sub> independientemente uno del otro pueden ser

25

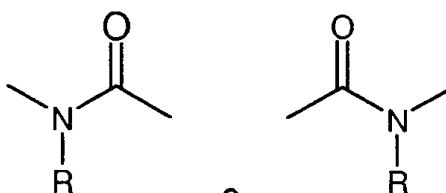
- (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>s</sub> -; donde s es 1-20
- -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub> - donde r es un número entero de 4 a 22; o una cadena de hidrocarburo bivalente que comprende 1, 2 o 3 grupos -CH=CH- y un número de grupos -CH<sub>2</sub>- suficiente para dar un número total de átomos de carbono en la cadena en el rango de 4 a 22;
- -(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub> o -(CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-, donde t es un número entero de 1 a 6;
- -(CR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-, donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> independientemente uno del otro pueden ser H, -COOH, (CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub> COOH y R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> pueden ser diferentes en cada carbono, y q es 1-6,
- -((CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)<sub>q1</sub>)<sub>1</sub> -(NHCO-(CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)<sub>q1</sub>-NHCO)<sub>1-2</sub>-((CR<sub>3</sub> R<sub>4</sub>)<sub>q1</sub>)<sub>1</sub>, o -((CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)<sub>q1</sub>)<sub>1</sub>-(CONH-(CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)<sub>q1</sub>-CONH)<sub>1-2</sub>-((CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)<sub>q1</sub>)<sub>1</sub>-, donde R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> independientemente uno del otro pueden ser H, - COOH, y R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> pueden ser diferentes en cada carbono, y q<sub>1</sub> es 1-6-, o
- un enlace;
- con la condición de que Q<sub>1</sub> - Q<sub>4</sub> son diferentes;
- X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub> son independientemente
- O;
- un enlace; o

30

35

40

45



50

o

donde R es hidrógeno o  $-(CH_2)_p-COOH$ ,  $-(CH_2)_p-SO_3H$ ,  $-(CH_2)_p-PO_3H_2$ ,  $-(CH_2)_p-O-SO_3H$ ;  $-(CH_2)_p-O-PO_3H_2$ ; o  $-(CH_2)_p$ -tetrazol-5-il, donde cada p independientemente de los otros p es un número entero en el rango de 1 a 6 y

[0032] Z es:

5

- COOH;
- CO-Asp;
- CO-Glu;
- CO-Gly;
- 10 - CO-Sar;
- CH(COOH)<sub>2</sub>;
- N(CH<sub>2</sub>COOH)<sub>2</sub> ;
- SO<sub>3</sub>H
- OSO<sub>3</sub>H
- 15 - OPO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>
- PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> o
- tetrazol-5-il

15

y cualquier complejo Zn<sup>2+</sup> del mismo.

20

[0033] Donde se menciona que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> pueden ser diferentes en cada carbono se entiende que R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> pueden ser diferentes para cada valor de q o q<sub>1</sub>.

[0034] En un aspecto r es de 6 a 22, de 8 a 20, de 8 a 18, de 4 a 18, de 6 a 18 de 8 a 16 de 8 a 22 de 8 a 17 de 8 a 15.

25

[0035] En otro aspecto s está en el rango de 2-12, 2-4 o 2-3.

[0036] En otro aspecto s es 1.

30

[0037] En un aspecto n es de 1-6, de 2-6, de 2-5, de 2-4, de 0-2 o de 2-3.

[0038] En un aspecto q es de 1-5, de 1-4, de 1-3 o de 1-2.

[0039] En un aspecto q<sub>1</sub> es de 1-5, de 1-4, de 1-3 o de 1-2.

35

[0040] En un aspecto t es de 1-6, de 1-5, de 1-4, de 1-3 o de 1-2.

[0041] En un aspecto Z es -COOH.

40

[0042] En un aspecto Z es -CO-Asp.

[0043] En otro aspecto Z es -CO-Glu.

[0044] En otro aspecto Z es -CO-Gly.

45

[0045] En otro aspecto Z es -CO-Sar.

[0046] En otro aspecto Z es -CH(COOH)<sub>2</sub>.

50

[0047] En otro aspecto Z es -N(CH<sub>2</sub>COOH)<sub>2</sub>.

[0048] En otro aspecto Z es -SO<sub>3</sub>H.

[0049] En otro aspecto Z es -PO<sub>3</sub>H.

55

[0050] En otro aspecto Z es O-SO<sub>3</sub>H;

[0051] En otro aspecto Z es O-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>;

60

[0052] En otro aspecto Z es tetrazol-5-il.

[0053] En otro aspecto la insulina progenitora es un análogo de insulina humana desB30.

[0054] Ejemplos no limitativos de insulinas progenitoras son insulina humana; insulina humana desB1; insulina humana desB30; insulina humana GlyA21; insulina humana GlyA21 desB30; insulina humana AspB28; insulina porcina; insulina humana LysB28 ProB29; insulina humana GlyA21 ArgB31 ArgB32; insulina humana LysB3 GluB29 o insulina humana AspB28 desB30.

5 [0055] En otras formas de realización, el derivado de insulina se selecciona del grupo que consiste en N<sup>εB29</sup>-(3-[2-(2-(2-[ω-carboxi-pentadecanoil-γ-glutamil-(2-amino-etoxi)]-etoxi)-etoxi)-etoxi]-propinoil) insulina humana desB30, N<sup>εB29</sup>-(3-[2-(2-(2-[ω-carboxi-heptadecanoil-γ-glutamil-(2-amino-etoxi)]-etoxi)-etoxi)-etoxi]-propinoil) insulina humana desB30, N<sup>εB29</sup>-(3-[2-(2-(2-(2-(ω-carboxi-pentadecanoilamino)-etoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxi]-propionil-γ-glutamil) insulina humana desB30, N<sup>εB19</sup>-(ω-[2-(2-(2-(2-(2-carboxi-etoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxi)-etilcarbamoil]-heptadecanoil-α-glutamil) insulina humana desB30, N<sup>εB29</sup>-(ω[2-(2-(2-(2-(2-carboxi-etoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxi)-etilcarbamoil]-heptadecanoil-γ-glutamil) insulina humana desB30, N<sup>εB29</sup>-(3-[2-(2-(2-(ω-carboxi-heptadecanoilamino)-etoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxi]-propionil-γ-glutamil) insulina humana desB30, N<sup>εB29</sup>-(3-(3-[2-(2-(3-[7-carboxiheptanoilamino]propoxi)etoxi)-etoxi]propilcarbamoil)propionil) insulina humana desB30, N<sup>εB29</sup>-(3-(3-[4-[3-(7-carboxiheptanoilamino)propoxi]butoxi]propilcarbamoil)-propionil-γ-glutamil) insulina humana desB30, N<sup>εB29</sup>-(3-(3-[2-(2-(3-[9-carboxinonanoilamino]propoxi)etoxi]etoxi)-propilcarbamoil)propionil) insulina humana desB30, N<sup>εB29</sup>-(3-(2-[2-(2-(9-carboxinonanoilamino)etoxi]etoxi)etilcarbamoil) propionil-γ-glutamil) insulina humana desB30, N<sup>εB29</sup>-(3-(3-[4-[3-(9-carboxinonanoilamino)propoxi]butoxi]-propilcarbamoil)propionil-γ-glutamil) insulina humana desB30, N<sup>εB29</sup>-(2-[3-(2-(2-(2-(7-carboxiheptanoilamino)etoxi)etoxi)-etilcarbamoil]propionil-γ-glutamil) insulina humana desB30, N<sup>εB29</sup>-(3-[2-(2-(2-(2-(ω-carboxipentadecanoilamino)etoxi]etoxi)etoxi)etoxi]propionil)) insulina humana desB30, N<sup>εB29</sup>-(3-(2-[2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-(ω-carboxi-tridecanoilamino)-etoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxi)-propionoil-γ-glutamil) insulina humana desB30, N<sup>εB29</sup>-(3-[2-(2-(2-(2-(ω-carboxi-tridecanoilamino)-etoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxi]-propionoil-γ-glutamil) insulina humana desB30, N<sup>εB29</sup>-(3-[2-(2-(2-(2-(ω-carboxi-tridecanoilamino)-etoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-etoxi)-etoxi)-propionoil-γ-glutamil) insulina humana desB30, N<sup>εB29</sup>-(3-(3-[2-(2-(3-[ω-carboxipentadecanoilamino]propoxi)etoxi]-etoxi]propilcarbamoil)propionil-γ-glutamil) insulina humana desB30, N<sup>εB29</sup>-(3-(3-[4-[3-(ω-carboxiundecanoilamino)propoxi]butoxi]propilcarbamoil)propionil-γ-glutamil) insulina humana desB30, N<sup>εB29</sup>-(3-(3-[4-[3-(ω-carboxitridecanoilamino)propoxi]butoxi]propilcarbamoil)propionil-γ-glutamil) insulina humana desB30, N<sup>εB29</sup>-(3-(2-[2-(2-(ω-carboxiundecanoilamino)etoxi]etoxi)etilcarbamoil)propionil-γ-glutamil) insulina humana desB30, N<sup>εB29</sup>-(3-(2-[2-(2-(ω-carboxitridecanoilamino)etoxi]etoxi)etilcarbamoil)-propionil-γ-glutamil) insulina humana desB30, N<sup>εB29</sup>-(3-[2-(2-(2-(2-(ω-carboxi-pentadecanoilamino)etoxi]etoxi)etoxi)etoxi]propionil-gamma-γ-D-glutamil) insulina humana desB30, N<sup>εB29</sup>-(3-[2-(2-(2-(2-(7-carboxiheptanoilamino)etoxi]etoxi)etoxi)etoxi]-propionil-γ-glutamil) insulina humana desB30, N<sup>εB29</sup>-(3-[2-(2-(2-(2-(9-carboxinonanoilamino)etoxi]etoxi)etoxi)etoxi]propionil-γ-glutamil) insulina humana desB30, N<sup>εB29</sup>-(3-[2-(2-(2-(2-(ω-carboxiundecanoilamino)etoxi]etoxi)etoxi)etoxi]-propionil-γ-glutamil) insulina humana desB30, N<sup>εB29</sup>-(3-[2-(2-(2-(2-(ω-carboxitridecanoilamino)etoxi]etoxi)etoxi)etoxi]propionil-γ-glutamil) insulina humana desB30.

[0056] Los derivados de insulina según la invención se pueden proveer en forma de compuestos esencialmente desprovistos de zinc o en forma de complejos de zinc. Cuando se proveen complejos de zinc de un derivado de insulina según la invención, dos iones de Zn<sup>2+</sup>, tres iones de Zn<sup>2+</sup> o cuatro iones de Zn<sup>2+</sup> se pueden ligar a cada hexámero de insulina. Las soluciones de complejos de zinc de los derivados de insulina contendrán mezclas de estas especies.

[0057] En otro aspecto de la invención, se puede proveer una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de insulina según la invención junto con un soporte farmacéuticamente aceptable para el tratamiento de la diabetes de tipo 1, la diabetes de tipo 2 y otros estados que causan hiperglucemia en pacientes que necesitan este tratamiento. Un derivado de insulina según la invención se puede usar para producir una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 y otros estados que causan hiperglucemia.

[0058] En otro aspecto de la invención, se provee una composición farmacéutica para tratar la diabetes de tipo 1, la diabetes de tipo 2 y otros estados que causan hiperglucemia en un paciente que necesita dicho tratamiento, comprendiendo una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de insulina según la invención mezclado con una insulina o un análogo de insulina que tiene un inicio de acción rápida, junto con portadores y aditivos farmacéuticamente aceptables.

[0059] En otro aspecto, la invención se refiere a la aplicación pulmonar para el tratamiento de la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 y otros estados que causan hiperglicemia en un paciente que necesita este tratamiento, comprendiendo una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de insulina de acuerdo con la invención opcionalmente en una mezcla con una insulina o un análogo de insulina que tiene un inicio de acción rápido junto con portadores y/o aditivos farmacéuticamente aceptables.

[0060] En un aspecto de la invención, provee una composición farmacéutica que es una mezcla de un derivado de insulina según la invención y un análogo de insulina de acción rápida seleccionado en el grupo que consiste en insulina humana AspB28; insulina humana LysB28 ProB29 e insulina humana LysB3 GluB29.

[0061] El derivado de insulina según la invención y el análogo de insulina de acción rápida se pueden mezclar en una proporción de aproximadamente 90/10%, aproximadamente 70/30% o aproximadamente 50/50%.

5 [0062] En otro aspecto de la invención, se provee un método para tratar la diabetes de tipo 1, la diabetes de tipo 2 y otros estados que causan hiperglicemia en un paciente que necesita tal tratamiento, comprendiendo la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de insulina según la invención junto con un portador y aditivos farmacéuticamente aceptables.

10 [0063] En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para tratar la diabetes de tipo 1, la diabetes de tipo 2 y otros estados que causan hiperglicemia en un paciente que requiere tal tratamiento, que comprende la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de insulina según la invención mezclado con una insulina o un análogo de insulina que tiene un inicio de acción rápido, junto con un portador farmacéuticamente aceptable y aditivos farmacéuticos aceptables.

15 [0064] Según otro aspecto de la invención, los derivados de insulina comprenden una cadena lateral unida bien al grupo  $\alpha$ -amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B o a un grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la molécula de insulina progenitora mediante un enlace amida cuya cadena lateral comprende un grupo PEG monodisperso bifuncional que contiene independientemente en cada terminal un grupo seleccionado de -OH; -NH<sub>2</sub> y -COOH; una fracción de diácido graso con 4 a 22 átomos de carbono; al menos un grupo de ácido carboxílico libre o un grupo cargado negativamente con pH neutro; y posibles enlaces que conectan los componentes individuales en la cadena lateral mediante enlace amida, éter o amina. Dichos enlaces opcionalmente comprenden un grupo de ácido carboxílico libre.

20 [0065] En otro aspecto de la invención del grupo PEG del derivado de insulina tiene de 1 a 20, de 1 a 10 o de 1 a 5 residuos de etileno.

25 [0066] Según otro aspecto de la invención, los derivados de insulina comprenden una cadena lateral unida bien al grupo  $\alpha$ -amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B o a un grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la molécula de insulina progenitora mediante un enlace amida cuya cadena lateral comprende un grupo PEG monodisperso bifuncional que contiene independientemente en cada terminal un grupo seleccionado de -OH; -NH<sub>2</sub> y -COOH; una fracción de diácido graso con 4 a 22 átomos de carbono; al menos un grupo de ácido carboxílico libre o un grupo cargado negativamente con pH neutro; y posibles enlaces que conectan los componentes individuales en la cadena lateral mediante enlace amida, éter o amina. Dichos enlaces opcionalmente comprenden un grupo de ácido carboxílico libre.

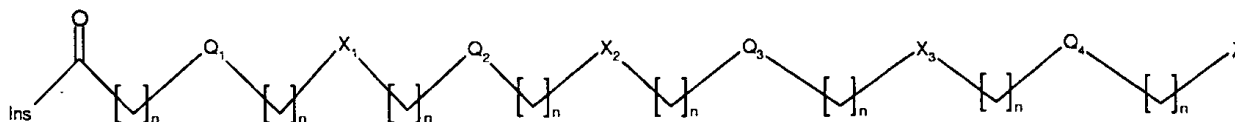
30 [0067] Según otro aspecto de la invención, los derivados de insulina comprenden un grupo PEG disfuncional que tiene de 1 a 20; de 1 a 10 o de 1 a 5 unidades de etileno.

35 [0068] En otro aspecto de la invención los derivados de insulina comprenden un diácido graso que comprende de 4 a 22 átomos de carbono en la cadena de carbono.

40 [0069] En otro aspecto de la invención los derivados de insulina comprenden un ácido graso donde el diácido graso comprende de 6 a 22, de 8 a 20, de 8 a 18, de 4 a 18, de 6 a 18, de 8 a 16, de 8 a 22, de 8 a 17 o de 8 a 15 átomos de carbono en la cadena de carbono.

45 [0070] En otro aspecto de la invención los derivados de insulina comprenden un residuo de Lys donde el residuo de Lys en la cadena B de la insulina progenitora está en cualquier posición B3 o en una de las posiciones B23-30.

[0071] En otro aspecto de la invención los derivados de insulina tienen la fórmula

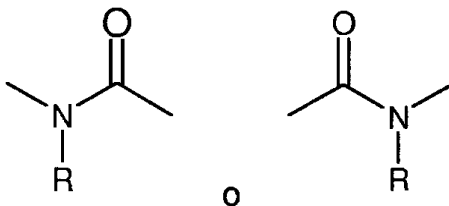


50 en donde Ins es la fracción de insulina progenitora que mediante el grupo  $\alpha$ -amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B o un grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la fracción de insulina se una al grupo CO- en la cadena lateral mediante un enlace amida; cada n es independientemente 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6; Q<sub>1</sub>, Q<sub>2</sub>, Q<sub>3</sub>, y Q<sub>4</sub> pueden ser independientemente uno de otro

- 55
- (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>s</sub> - donde s es 1-20,
  - -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub> - donde r es un número entero de 4 a 22; o una cadena de hidrocarburo bivalente que comprende 1, 2 o 3 grupos -CH=CH- y un número de grupos -CH<sub>2</sub>- suficiente para dar un número total de átomos de carbono en la cadena en el rango de 4 a 22;
  - -(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>- o -(CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-, donde t es un número entero de 1 a 6;
- 60
- -(CR, R<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-, donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> independientemente uno del otro pueden ser H, -COOH, y R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> pueden ser

diferentes en cada carbono, y q es 1-6,

- $((CR_3R_4)_{q1})_1 - (NHCO-(CR_3R_4)_{q1} - NHCO)_{1-2} - ((CR_3R_4)_{q1})_1$  o  $-((CR_3R_4)_{q1})_1 - (CONH-(CR_3R_4)_{q1} - CONH)_{1-2} - ((CR_3R_4)_{q1})_1$ , donde  $R_3$  y  $R_4$  independientemente uno del otro pueden ser H,  $-COOH$ , y  $R_3$  y  $R_4$  pueden ser diferentes en cada carbono, y  $q_1$  es 1-6-, o
  - un enlace;
  - con la condición de que  $Q_1 - Q_4$  son diferentes;
  - X y V y G son independientemente
  - O,
  - un enlace; o



donde R es hidrógeno o  $-(CH_2)_p-COOH$ ,  $-(CH_2)_p-SO_3H$ ,  $-(CH_2)_p-PO_3H_2$ ,  $-(CH_2)_p-O-SO_3H$ ;  $-(CH_2)_p-O-PO_3H_2$ ; o  $-(CH_2)_p$ -tetrazolilo, donde cada p independientemente del otro p es un número entero en el rango de 1 a 6 y

[0072] Z es:

- $COOH$ ;
- $CO-Asp$ ;
- $CO-Glu$ ;
- $CO-Gly$ ;
- $CO-Sar$ ;
- $CH(COOH)_2$ ;
- $N(CH_2COOH)_2$ ;
- $SO_3H$
- $OSO_3H$
- $OPO_3H_2$
- $PO_3H_2$  o
- tetrazolilo.

[0073] En otro aspecto de la invención los derivados de insulina según la fórmula, s es de 6 a 22, de 8 a 20, de 8 a 18, de 4 a 18, de 6 a 18, de 8 a 16, de 8 a 22, de 8 a 17 o de 8 a 15.

[0074] En otro aspecto de la invención los derivados de insulina según la fórmula s es de 1 -20, de 1-10 o de 1-5.

[0075] En otro aspecto de la invención del derivado de insulina según la fórmula, Z es  $-COOH$ .

[0076] En otro aspecto de la invención del derivado de insulina según la invención, la insulina progenitora es un análogo de insulina humana desB30.

[0077] En otro aspecto de la invención del derivado de insulina según la invención, la insulina progenitora se selecciona del grupo que consiste en insulina humana; insulina humana desB1; insulina humana desB30; insulina humana GlyA21; insulina humana GlyA21 desB30; insulina humana AspB28; insulina porcina; insulina humana LysB28ProB29; insulina humana GlyA21 ArgB31ArgB32 e insulina humana LysB3GluB29.

[0078] En otras formas de realización el derivado de insulina según la invención se selecciona del grupo que consiste en  $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-\gamma-L-Glu-HN(CH_2CH_2O)_4CH_2CH_2CO)$  insulina humana desB30;  $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{16}CO)-\gamma-L-Glu-HN(CH_2CH_2O)_4CH_2CH_2CO)$  insulina humana des(B30);  $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2CH_2O)_4CH_2CH_2NH-OC(CH_2)_{16}CO)-\alpha-L-Glu-)$  insulina humana des(B30);  $N^{\epsilon B29}$ -{3-[2-(2-[2-(15-carboxi-pentadecanoilamino)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-propionil-gamma-Glu insulina desB30 y  $N^{\epsilon B29}$ -3-[2-(2-[2-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-propionil  $\gamma$ -Glu insulina desB30.

[0079] En otro aspecto de la invención se proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de la diabetes en un paciente que requiere tal tratamiento, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de insulina según la invención junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

[0080] En otro aspecto de la invención se proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de la diabetes en un paciente que requiere tal tratamiento, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de insulina según la invención mezclado con una insulina o un análogo de insulina que tiene un inicio de



acción rápido, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

[0081] En otro aspecto de la invención se proporciona una composición farmacéutica según la invención destinada para la administración pulmonar.

5

[0082] En otro aspecto de la invención, se provee un método para tratar la diabetes en un paciente que necesita tal tratamiento, que comprende la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de insulina según la reivindicación 1 junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

10

[0083] En otro aspecto de la invención, se provee un método para tratar la diabetes en un paciente que necesita tal tratamiento, que comprende la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de insulina según la reivindicación 1 mezclado con una insulina o un análogo de insulina que tiene un inicio de acción rápido, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

15

Descripción detallada de la invención

[0084] Los presentes derivados de insulina se caracterizan por tener una cadena lateral unida bien a un grupo Lys en la cadena B o al grupo amino N-terminal en la cadena B de la molécula de insulina progenitora cuya cadena lateral comprende uno o más residuos de etilenglicol, propilenglicol y/o butilenglicol y una fracción de ácido diácido.

20

[0085] El derivado de insulina según la invención está además caracterizado por el hecho de tener al menos un grupo de ácido carboxílico libre en la cadena lateral y puede comprender hasta 2, 3 o 4 grupos de ácido carboxílico libre o un grupo que esté cargado negativamente con pH neutro.

25

[0086] Los derivados de insulina solo contendrán un residuo de lisina. Este residuo de lisina puede estar en la posición B29 como en la insulina humana o en una de las posiciones B3; B30 o B23 a B28.

30

[0087] Los residuos de etilenglicol, propilenglicol y/o butilenglicol tendrán cualquier combinación de los tres grupos -OH; -NH<sub>2</sub> y -COOH en cada extremo. Los residuos de etilenglicol, propilenglicol y/o butilenglicol típicamente serán en forma de un residuo de etilenglicol seguido de un residuo de butilenglicol o tendrán una longitud de cadena de 2 a 20 residuos de PEG, PPG o PBG correspondientes a un peso molecular de aproximadamente 200 a 800.

35

[0088] Los residuos de etilenglicol, propilenglicol y/o butilenglicol típicamente serán en forma de un residuo de etilenglicol seguido de un residuo de butileno  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m$  donde m es 1 a 20.

[0089] El PEG o PPG o PBG bifuncional tendrá cualquier combinación de los tres grupos -OH; -NH<sub>2</sub> y -COOH en cada extremo y típicamente tendrá una longitud de cadena de 1 a 20 residuos de PEG correspondientes a un peso molecular de aproximadamente 200 a 1000.

40

[0090] Ejemplos no limitativos de fracciones de PEG de amino son  $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_u-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-\text{O}(\text{CH}_2)_u-\text{COOH}$  y  $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_v-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_u-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-(\text{CH}_2)_u-\text{COOH}$ , donde u es independientemente 1 a 6, m es 2 a 20 y v es 1 a 6.

45

[0091] Ejemplos no limitativos de fracciones de PPG de amino son  $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_u-(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_m-\text{O}(\text{CH}_2)_u-\text{COOH}$  y  $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_v-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_u-(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_m-(\text{CH}_2)_u-\text{COOH}$ , donde u es independientemente 1 a 6, m es 2 a 20 y v es 1 a 6.

[0092] Ejemplos no limitativos de fracciones de PBG de amino son  $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_u-(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_m-\text{O}(\text{CH}_2)_u-\text{COOH}$  y  $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_v-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_u-(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_m-(\text{CH}_2)_u-\text{COOH}$ , donde u es independientemente 1 a 6, m es 2 a 20 y v es 1 a 6.

50

[0093] El diácido graso típicamente comprenderá de 4 a 22, de 6 a 22, de 8 a 20, de 8 a 18, de 4 a 18, de 6 a 18, de 8 a 16, de 8 a 22, de 8 a 12, de 8 a 10, de 8 a 17 o de 8 a 15 átomos de carbono en la cadena de carbono.

[0094] Ejemplos no limitativos de la fracción de diácido graso son diácidos con la fórmula  $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{r_1}-\text{COOH}$ , donde r<sub>1</sub> es 4 a 22. Ejemplos de diácidos grasos son ácido succínico, ácido hexanedioico, ácido octanedioico, ácido decanedioico, ácido dodecanodioico, ácido tetradecanodioico, ácido hexadecanodioico o ácido octadecanodioico.

55

[0095] La fracción de insulina, también denominada insulina progenitora en el presente texto, o un derivado de insulina según la invención puede ser insulina de origen natural tal como la insulina humana o la insulina porcina. Alternativamente, la insulina progenitora puede ser un análogo de insulina.

60

[0096] En un grupo de análogos de insulina progenitora, el residuo de aminoácido en la posición A21 es Asn.

[0097] En otro grupo de análogos de insulina progenitora, el residuo de aminoácido en la posición B1 ha sido eliminado. Un ejemplo específico de este grupo de análogos de insulina progenitora es la insulina humana desB1.

65

[0098] En otro grupo de análogos de insulina progenitora, el residuo de aminoácido en la posición B30 ha sido

eliminado. Un ejemplo específico de este grupo de análogos de insulina progenitora es la insulina humana desB30.

[0099] En otro grupo de análogos de insulina progenitora, el residuo de aminoácido en la posición B28 es Asp. Un ejemplo específico de este grupo de análogos de insulina progenitora es la insulina humana AspB28.

5

[0100] En otro grupo de análogos de insulina progenitora, el residuo de aminoácido en la posición B28 es Lys y el residuo de aminoácido en la posición B29 es Pro. Un ejemplo específico de este grupo de análogos de insulina progenitora es la insulina humana LysB28 ProB29.

10

[0101] En otro grupo de análogos de insulina progenitora el residuo de aminoácido en la posición B30 es Lys y el residuo de aminoácido en la posición B29 es cualquier aminoácido codificable excepto Cys, Arg y Lys. Un ejemplo es un análogo de insulina donde el residuo de aminoácido en la posición B29 es Thr y el residuo de aminoácido en la posición B30 es Lys. Un ejemplo específico de este grupo de análogos de insulina progenitora es la insulina humana ThrB29 LysB30.

15

[0102] En otro grupo de análogos de insulina progenitora, el residuo de aminoácido en la posición B3 es Lys y el residuo de aminoácido en la posición B29 es Glu. Un ejemplo específico de este grupo de análogos de insulina progenitora es la insulina humana LysB3 GluB29.

20

[0103] Ejemplos de derivados de insulina descritos en la presente son los siguientes compuestos:

$N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-(2-( $\omega$ -carboxiheptadecanoilamino)etoxi]etoxi]etoxi)-etoxi]propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30;

$N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-(2-( $\omega$ -carboxihexadecanoilamino)etoxi]etoxi]etoxi)-etoxi]propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30;

25

$N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-(2-( $\omega$ -carboxitridecanoilamino)etoxi]etoxi]etoxi)-etoxi]propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30;

$N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-(2-( $\omega$ -carboxiundecanoilamino)etoxi]etoxi]etoxi)-etoxi]propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30;

30

$N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-(2-( $\omega$ -carboxinonanoilamino)etoxi]etoxi]etoxi)-etoxi]propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30;

$N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-(2-( $\omega$ -carboxiheptanoilamino)etoxi]etoxi]etoxi)-etoxi]propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30;

35

$N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-(2-( $\omega$ -carboxiheptadecanoilamino)etoxi]etoxi]etoxi)-etoxi]propionil) insulina humana desB30;

$N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-(2-( $\omega$ -carboxihexadecanoilamino)etoxi]etoxi]etoxi)-etoxi]propionil) insulina humana desB30;

$N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-(2-( $\omega$ -carboxitridecanoilamino)etoxi]etoxi]etoxi)-etoxi]propionil) insulina humana desB30;

40

$N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-(2-( $\omega$ -carboxiundecanoilamino)etoxi]etoxi]etoxi)-etoxi]propionil) insulina humana desB30;

$N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-(2-( $\omega$ -carboxinonanoilamino)etoxi]etoxi]etoxi)-etoxi]propionil) insulina humana desB30;

45

$N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-(2-( $\omega$ -carboxiheptanoilamino)etoxi]etoxi]etoxi)-etoxi]propionil) insulina humana desB30;

$N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-(3-( $\omega$ -carboxiheptadecanoilamino)propoxi]etoxi]-propilcarbamoil)propionil) insulina humana desB30;

$N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-(3-( $\omega$ -carboxihexadecanoilamino)propoxi]etoxi]-propilcarbamoil)propionil) insulina humana desB30;

50

$N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-(3-( $\omega$ -carboxipentadecanoilamino)propoxi]etoxi]-propilcarbamoil)propionil) insulina humana desB30;

$N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-(3-( $\omega$ -carboxitridecanoilamino)propoxi]etoxi]-propilcarbamoil)propionil) insulina humana desB30;

55

$N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-(3-( $\omega$ -carboxiundecanoilamino)propoxi]etoxi]-propilcarbamoil)propionil) insulina humana desB30;

$N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-(3-( $\omega$ -carboxinonanoilamino)propoxi]etoxi]-propilcarbamoil)propionil) insulina humana desB30;

$N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-(3-( $\omega$ -carboxiheptanoilamino)propoxi]etoxi]-propilcarbamoil)propionil) insulina humana desB30;

60

$N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-(3-( $\omega$ -carboxiheptadecanoilamino)propoxi]etoxi]-propilcarbamoil)propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30;

$N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-(3-( $\omega$ -carboxihexadecanoilamino)propoxi]etoxi]-propilcarbamoil)propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30;

65

$N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-(3-( $\omega$ -carboxipentadecanoilamino)propoxi]etoxi]-propilcarbamoil)propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana

- desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-{2-[3-( $\omega$ -carboxitridecanoilamino)propoxi]etoxi}-propilcarbamoil)propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30;
- 5  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-{2-[3-( $\omega$ -carboxiundecanoilamino)propoxi]etoxi}-propilcarbamoil)propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-{2-[3-( $\omega$ -carboxinonanoilamino)propoxi]etoxi}-propilcarbamoil)propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30;
- 10  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-{2-[3-( $\omega$ -carboxiheptanoilamino)propoxi]etoxi}-propilcarbamoil)propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-{2-[2-( $\omega$ -carboxipentadecanoilamino)etoxi]etoxi}-etilcarbamoil)propionil) insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-{2-[2-( $\omega$ -carboxihexadecanoilamino)etoxi]etoxi}-etilcarbamoil)propionil) insulina humana desB30;
- 15  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-{2-[2-( $\omega$ -carboxipentadecanoilamino)etoxi]etoxi}-etilcarbamoil)propionil) insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-{2-[2-( $\omega$ -carboxitridecanoilamino)etoxi]etoxi}-etilcarbamoil)propionil) insulina humana desB30;
- 20  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-{2-[2-( $\omega$ -carboxiundecanoilamino)etoxi]etoxi}-etilcarbamoil)propionil) insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-{2-[2-( $\omega$ -carboxinonanoilamino)etoxi]etoxi}-etilcarbamoil)propionil) insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-{2-[2-( $\omega$ -carboxiheptanoilamino)etoxi]etoxi}-etilcarbamoil)propionil) insulina humana desB30;
- 25  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-{2-[2-( $\omega$ -carboxiheptadecanoilamino)etoxi]etoxi}-etilcarbamoil)propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-{2-[2-( $\omega$ -carboxihexadecanoilamino)etoxi]etoxi}-etilcarbamoil)propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30;
- 30  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-{2-[2-( $\omega$ -carboxipentadecanoilamino)etoxi]etoxi}-etilcarbamoil)propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-{2-[2-( $\omega$ -carboxitridecanoilamino)etoxi]etoxi}-etilcarbamoil)propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-{2-[2-( $\omega$ -carboxiundecanoilamino)etoxi]etoxi}-etilcarbamoil)propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30;
- 35  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-{2-[2-( $\omega$ -carboxinonanoilamino)etoxi]etoxi}-etilcarbamoil)propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-{2-[2-( $\omega$ -carboxiheptanoilamino)etoxi]etoxi}-etilcarbamoil)propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30;
- 40  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-( $\omega$ -carboxiheptadecanoilamino)propoxi]etoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-( $\omega$ -carboxipentadecanoilamino)propoxi]etoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30;
- 45  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-( $\omega$ -carboxipentadecanoilamino)propoxi]etoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-( $\omega$ -carboxitridecanoilamino)propoxi]etoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30;
- 50  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-( $\omega$ -carboxiundecanoilamino)propoxi]etoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-( $\omega$ -carboxinonanoilamino)propoxi]etoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30;
- 55  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-( $\omega$ -carboxinonanoilamino)propoxi]etoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-( $\omega$ -carboxiheptanoilamino)propoxi]etoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30;
- 60  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-( $\omega$ -carboxiheptadecanoilamino)propoxi]etoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil) insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-( $\omega$ -carboxihexadecanoilamino)propoxi]etoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil) insulina humana desB30;
- 65

- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-[2-[3-( $\omega$ -carboxipentadecanoilamino)propoxi]etoxi}etoxi)-propilcarbamoil]propionil) insulina humana desB30;
- 5  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-[2-[3-( $\omega$ -carboxitridecanoilamino)propoxi]etoxi}etoxi)-propilcarbamoil]propionil) insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-[2-[3-( $\omega$ -carboxiundecanoilamino)propoxi]etoxi}etoxi)-propilcarbamoil]propionil) insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-[2-[3-( $\omega$ -carboxinonanoilamino)propoxi]etoxi}etoxi)-propilcarbamoil]propionil) insulina humana desB30;
- 10  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-[2-[3-( $\omega$ -carboxiheptanoilamino)propoxi]etoxi}etoxi)-propilcarbamoil]propionil) insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxiheptadecanoilamino)etoxi]etoxi}etoxi)-etoxi]propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxihexadecanoilamino)etoxi]etoxi}etoxi)-etoxi]propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana;
- 15  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxitridecanoilamino)etoxi]etoxi}etoxi)-etoxi]propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxiundecanoilamino)etoxi]etoxi}etoxi)-etoxi]propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana;
- 20  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxinonanoilamino)etoxi]etoxi}etoxi)-etoxi]propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxiheptanoilamino)etoxi]etoxi}etoxi)-etoxi]propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxiheptadecanoilamino)etoxi]etoxi}etoxi)-etoxi]propionil) insulina humana;
- 25  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxihexadecanoilamino)etoxi]etoxi}etoxi)etoxi]propionil) insulina humana
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxitridecanoilamino)etoxi]etoxi}etoxi)etoxi]propionil) insulina humana
- 30  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxiundecanoilamino)etoxi]etoxi}etoxi)-etoxi]propionil) insulina humana;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxinonanoilamino)etoxi]etoxi}etoxi)-etoxi]propionil) insulina humana;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxiheptanoilamino)etoxi]etoxi}etoxi)-etoxi]propionil) insulina humana;
- 35  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-[3-( $\omega$ -carboxiheptadecanoilamino)propoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil) insulina humana;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-[3-( $\omega$ -carboxihexadecanoilamino)propoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil) insulina humana;
- 40  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-[3-( $\omega$ -carboxipentadecanoilamino)propoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil) insulina humana;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-[3-( $\omega$ -carboxitridecanoilamino)propoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil) insulina humana;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-[3-( $\omega$ -carboxiundecanoilamino)propoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil) insulina humana;
- 45  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-[3-( $\omega$ -carboxinonanoilamino)propoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil) insulina humana;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-[3-( $\omega$ -carboxiheptanoilamino)propoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil) insulina humana;
- 50  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-[3-( $\omega$ -carboxiheptadecanoilamino)propoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-[3-( $\omega$ -carboxihexadecanoilamino)propoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-[3-( $\omega$ -carboxipentadecanoilamino)propoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana;
- 55  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-[3-( $\omega$ -carboxitridecanoilamino)propoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-[3-( $\omega$ -carboxiundecanoilamino)propoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana;
- 60  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-[3-( $\omega$ -carboxinonanoilamino)propoxi]etoxi)propilcarbamoil]propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-[3-( $\omega$ -carboxiheptanoilamino)propoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-( $\omega$ -carboxipentadecanoilamino)etoxi]etoxi)-etilcarbamoil]propionil) insulina humana;
- 65  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-( $\omega$ -carboxihexadecanoilamino)etoxi]etoxi)-etilcarbamoil]propionil) insulina humana;



- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-( $\omega$ -carboxiheptanoilamino)etoxi]etoxi)etoxi]-etoxi]propionil- $\gamma$ -glutamil) Insulina humana B28D;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-( $\omega$ -carboxiheptadecanoilamino)etoxi]etoxi)etoxi]-etoxi]propionil) Insulina humana B28D;
- 5  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-( $\omega$ -carboxihexadecanoilamino)etoxi]etoxi)etoxi]-etoxi]propionil) Insulina humana B28D;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-( $\omega$ -carboxitridecanoilamino)etoxi]etoxi)etoxi]-etoxi]propionil) Insulina humana B28D;
- 10  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-( $\omega$ -carboxiundecanoilamino)etoxi]etoxi)etoxi]-etoxi]propionil) Insulina humana B28D;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-( $\omega$ -carboxinonanoilamino)etoxi]etoxi)etoxi]-etoxi]propionil) Insulina humana B28D;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-( $\omega$ -carboxiheptanoilamino)etoxi]etoxi)etoxi]-etoxi]propionil) Insulina humana B28D;
- 15  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-[3-( $\omega$ -carboxiheptadecanoilamino)propoxi]etoxi]-propilcarbamoil)propionil) Insulina humana B28D;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-[3-( $\omega$ -carboxihexadecanoilamino)propoxi]etoxi]-propilcarbamoil)propionil) Insulina humana B28D;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-[3-( $\omega$ -carboxipentadecanoilamino)propoxi]etoxi]-propilcarbamoil)propionil) Insulina humana B28D;
- 20  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-[3-( $\omega$ -carboxitridecanoilamino)propoxi]etoxi]-propilcarbamoil)propionil) Insulina humana B28D;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-[3-( $\omega$ -carboxiundecanoilamino)propoxi]etoxi]-propilcarbamoil)propionil) Insulina humana B28D;
- 25  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-[3-( $\omega$ -carboxinonanoilamino)propoxi]etoxi]-propilcarbamoil)propionil) Insulina humana B28D;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-[3-( $\omega$ -carboxiheptanoilamino)propoxi]etoxi]-propilcarbamoil)propionil) Insulina humana B28D;
- 30  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-[3-( $\omega$ -carboxiheptadecanoilamino)propoxi]etoxi]-propilcarbamoil)propionil- $\gamma$ -glutamil) Insulina humana B28D;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-[3-( $\omega$ -carboxihexadecanoilamino)propoxi]etoxi]-propilcarbamoil)propionil- $\gamma$ -glutamil) Insulina humana B28D;
- 35  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-[3-( $\omega$ -carboxipentadecanoilamino)propoxi]etoxi]-propilcarbamoil)propionil- $\gamma$ -glutamil) Insulina humana B28D;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-[3-( $\omega$ -carboxitridecanoilamino)propoxi]etoxi]-propilcarbamoil)propionil- $\gamma$ -glutamil) Insulina humana B28D;
- 40  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-[3-( $\omega$ -carboxiundecanoilamino)propoxi]etoxi]-propilcarbamoil)propionil- $\gamma$ -glutamil) Insulina humana B28D;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-[3-( $\omega$ -carboxinonanoilamino)propoxi]etoxi]-propilcarbamoil)propionil- $\gamma$ -glutamil) Insulina humana B28D;
- 45  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-[3-( $\omega$ -carboxiheptanoilamino)propoxi]etoxi]-propilcarbamoil)propionil- $\gamma$ -glutamil) Insulina humana B28D;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxipentadecanoilamino)etoxi]etoxi]-etilcarbamoil)propionil) Insulina humana B28D;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxihexadecanoilamino)etoxi]etoxi]-etilcarbamoil)propionil) Insulina humana B28D;
- 50  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxipentadecanoilamino)etoxi]etoxi]-etilcarbamoil)propionil) Insulina humana B28D;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxitridecanoilamino)etoxi]etoxi]etilcarbamoil)-propionil) Insulina humana B28D;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxiundecanoilamino)etoxi]etoxi]-etilcarbamoil)propionil) Insulina humana B28D;
- 55  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxinonanoilamino)etoxi]etoxi]etilcarbamoil)-propionil) Insulina humana B28D;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxiheptanoilamino)etoxi]etoxi]etilcarbamoil)-propionil) Insulina humana B28D;
- 60  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxiheptadecanoilamino)etoxi]etoxi]-etilcarbamoil)propionil- $\gamma$ -glutamil) Insulina humana B28D;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxihexadecanoilamino)etoxi]etoxi]-etilcarbamoil)propionil- $\gamma$ -glutamil) Insulina humana B28D;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxipentadecanoilamino)etoxi]etoxi]-etilcarbamoil)propionil- $\gamma$ -glutamil) Insulina humana B28D;
- 65  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxitridecanoilamino)etoxi]etoxi]etilcarbamoil)-propionil- $\gamma$ -glutamil) Insulina humana B28D;

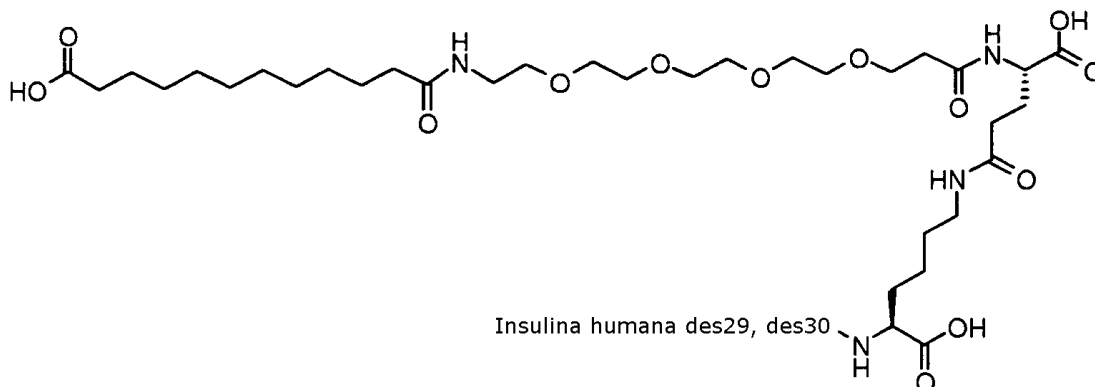
- 5  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-{2-(ω-carboxiundecanoilamino)etoxi}etoxi)-etilcarbamoil)propionil-γ-glutamil) Insulina humana B28D;
- 5  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-{2-(ω-carboxinonanoilamino)etoxi}etoxi)etilcarbamoil)-propionil-γ-glutamil) Insulina humana B28D;
- 5  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-{2-(ω-carboxiheptanoilamino)etoxi}etoxi)etilcarbamoil)-propionil-γ-glutamil) Insulina humana B28D;
- 10  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-(ω-carboxiheptadecanoilamino)propoxi]etoxi}etoxi)-propilcarbamoil]propionil-γ-glutamil) Insulina humana B28D;
- 10  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-(ω-carboxipentadecanoilamino)propoxi]etoxi}etoxi)-propilcarbamoil]propionil-γ-glutamil) Insulina humana B28D;
- 15  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-(ω-carboxipentadecanoilamino)propoxi]etoxi}etoxi)-propilcarbamoil]propionil-γ-glutamil) Insulina humana B28D;
- 20  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-(ω-carboxitridecanoilamino)propoxi]etoxi}etoxi)-propilcarbamoil]propionil-γ-glutamil) Insulina humana B28D;
- 20  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-(ω-carboxiundecanoilamino)propoxi]etoxi}etoxi)-propilcarbamoil]propionil-γ-glutamil) Insulina humana B28D;
- 25  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-(ω-carboxinonanoilamino)propoxi]etoxi}etoxi)-propilcarbamoil]propionil-γ-glutamil) Insulina humana B28D;
- 25  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-(ω-carboxiheptanoilamino)propoxi]etoxi}etoxi)-propilcarbamoil]propionil-γ-glutamil) Insulina humana B28D;
- 30  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-(ω-carboxiheptadecanoilamino)propoxi]etoxi}etoxi)-propilcarbamoil]propionil) Insulina humana B28D;
- 30  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-(ω-carboxihexadecanoilamino)propoxi]etoxi}etoxi)-propilcarbamoil]propionil) Insulina humana B28D;
- 35  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-(ω-carboxipentadecanoilamino)propoxi]etoxi}etoxi)-propilcarbamoil]propionil) Insulina humana B28D;
- 35  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-(ω-carboxitridecanoilamino)propoxi]etoxi}etoxi)-propilcarbamoil]propionil) Insulina humana B28D;
- 40  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-(ω-carboxiundecanoilamino)propoxi]etoxi}etoxi)-propilcarbamoil]propionil) Insulina humana B28D;
- 40  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-(ω-carboxinonanoilamino)propoxi]etoxi}etoxi)-propilcarbamoil]propionil) Insulina humana B28D;
- 45  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[2-(ω-carboxiheptadecanoilamino)etoxi]etoxi}etoxi)-etoxi]propionil-γ-glutamil) B28D, insulina humana desB30;
- 45  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[2-(ω-carboxihexadecanoilamino)etoxi]etoxi}etoxi)-etoxi]propionil-γ-glutamil) B28D, insulina humana desB30;
- 50  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-{2-[2-(ω-carboxitridecanoilamino)etoxi]etoxi}etoxi)-etoxi]propionil-γ-glutamil) B28D, insulina humana desB30;
- 50  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-{2-[2-(ω-carboxiundecanoilamino)etoxi]etoxi}etoxi)-etoxi]propionil-γ-glutamil) B28D, insulina humana desB30;
- 55  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-{2-[2-(ω-carboxinonanoilamino)etoxi]etoxi}etoxi)-etoxi]propionil-γ-glutamil) B28D, insulina humana desB30;
- 55  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-{2-[2-(ω-carboxiheptanoilamino)etoxi]etoxi}etoxi)etoxi]-propionil-γ-glutamil) B28D, insulina humana desB30;
- 60  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-{2-[2-(ω-carboxiheptadecanoilamino)etoxi]etoxi}etoxi)-etoxi]propionil) B28D, insulina humana desB30;
- 60  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-{2-[2-(ω-carboxihexadecanoilamino)etoxi]etoxi}etoxi)-etoxi]propionil) B28D, insulina humana desB30;
- 65  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-{2-[2-(ω-carboxitridecanoilamino)etoxi]etoxi}etoxi)-etoxi]propionil) B28D, insulina humana desB30;
- 65  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-{2-[2-(ω-carboxiundecanoilamino)etoxi]etoxi}etoxi)-etoxi]propionil) B28D, insulina humana desB30;

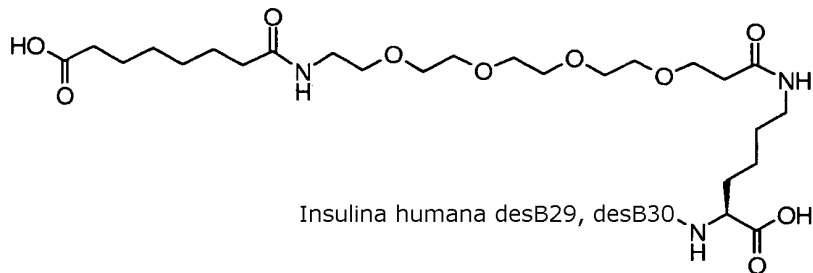
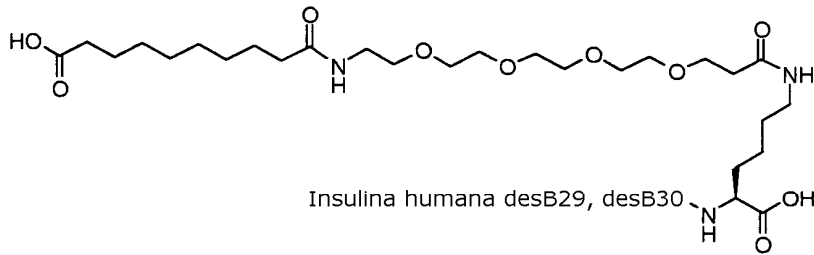
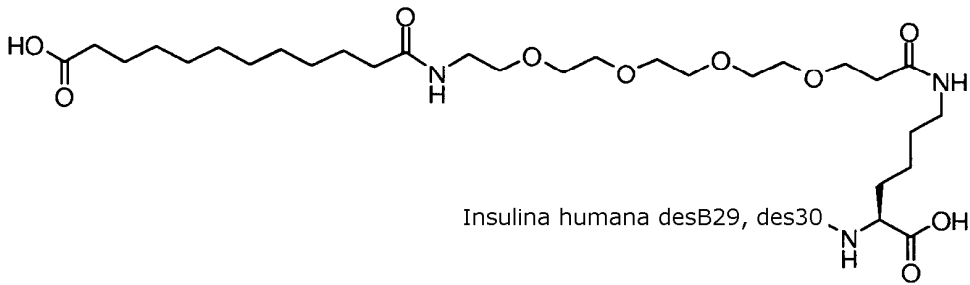
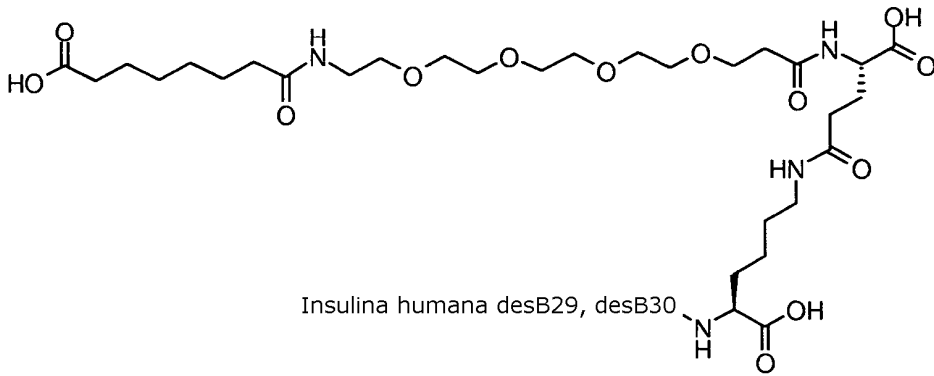
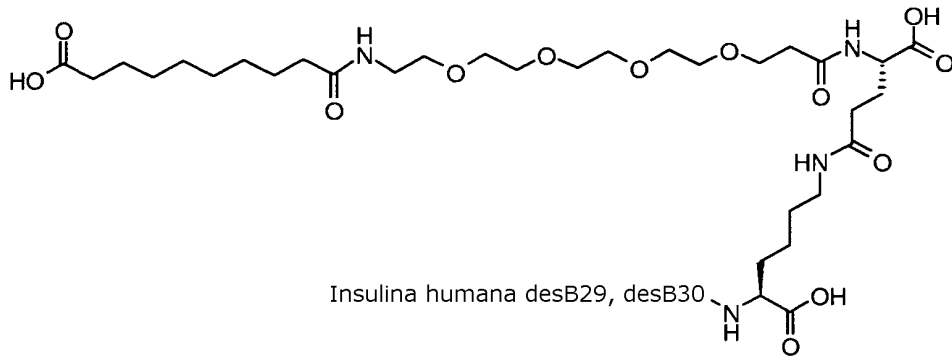
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-( $\omega$ -carboxinonanoilamino)etoxi]etoxi)etoxi)-etoxi]propionil) B28D, insulina humana desB30;
- 5  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-( $\omega$ -carboxiheptanoilamino)etoxi]etoxi)etoxi)-etoxi]propionil) B28D, insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-[3-( $\omega$ -carboxiheptadecanoilamino)propoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil) B28D, insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-[3-( $\omega$ -carboxihexadecanoilamino)propoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil) B28D, insulina humana desB30;
- 10  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-[3-( $\omega$ -carboxipentadecanoilamino)propoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil) B28D, insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-[3-( $\omega$ -carboxitridecanoilamino)propoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil) B28D, insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-[3-( $\omega$ -carboxiundecanoilamino)propoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil) B28D, insulina humana desB30;
- 15  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-[3-( $\omega$ -carboxinonanoilamino)propoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil) B28D, insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-[3-( $\omega$ -carboxiheptanoilamino)propoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil) B28D, insulina humana desB30;
- 20  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-[3-( $\omega$ -carboxiheptadecanoilamino)propoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil- $\gamma$ -glutamil) B28D, desB30 insulina humana;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-[3-( $\omega$ -carboxihexadecanoilamino)propoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil- $\gamma$ -glutamil) B28D, insulina humana desB30;
- 25  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-[3-( $\omega$ -carboxipentadecanoilamino)propoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil- $\gamma$ -glutamil) B28D, insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-[3-( $\omega$ -carboxitridecanoilamino)propoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil- $\gamma$ -glutamil) B28D, insulina humana desB30;
- 30  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-[3-( $\omega$ -carboxiundecanoilamino)propoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil- $\gamma$ -glutamil) B28D, insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-[3-( $\omega$ -carboxinonanoilamino)propoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil- $\gamma$ -glutamil) B28D, insulina humana desB30;
- 35  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-[3-( $\omega$ -carboxiheptanoilamino)propoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil- $\gamma$ -glutamil) B28D, insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(3-[2-[3-( $\omega$ -carboxihexadecanoilamino)propoxi]etoxi)-propilcarbamoil]propionil- $\gamma$ -glutamil) B28D, insulina humana desB30;
- 40  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxipentadecanoilamino)etoxi]etoxi)-etilcarbamoil]propionil) B28D, insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxihexadecanoilamino)etoxi]etoxi)-etilcarbamoil]propionil) B28D, insulina humana desB30;
- 45  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxipentadecanoilamino)etoxi]etoxi)-etilcarbamoil]propionil) B28D, insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxitridecanoilamino)etoxi]etoxi)-etilcarbamoil]propionil) B28D, insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxiundecanoilamino)etoxi]etoxi)-etilcarbamoil]propionil) B28D, insulina humana desB30;
- 50  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxinonanoilamino)etoxi]etoxi)-etilcarbamoil]propionil) B28D, insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxiheptanoilamino)etoxi]etoxi)-etilcarbamoil]propionil) B28D, insulina humana desB30;
- 55  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxiheptadecanoilamino)etoxi]etoxi)-etilcarbamoil]propionil- $\gamma$ -glutamil) B28D, insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxihexadecanoilamino)etoxi]etoxi)-etilcarbamoil]propionil- $\gamma$ -glutamil) B28D, insulina humana desB30;
- 60  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxipentadecanoilamino)etoxi]etoxi)-etilcarbamoil]propionil- $\gamma$ -glutamil) B28D, insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-[2-[2-( $\omega$ -carboxitridecanoilamino)etoxi]etoxi)-etilcarbamoil]propionil- $\gamma$ -glutamil) B28D, insulina humana desB30;
- 65

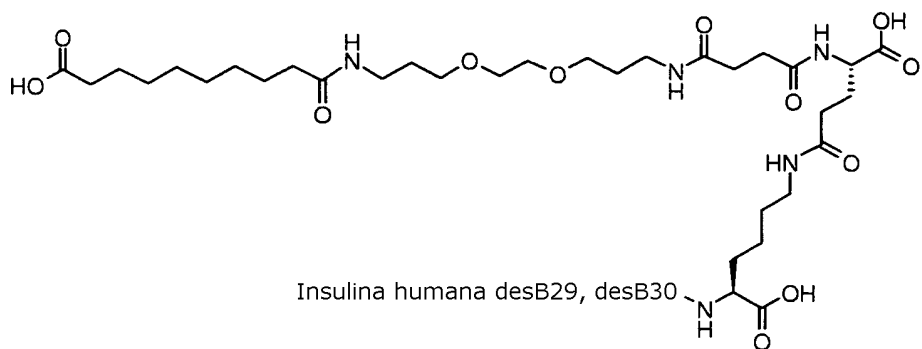
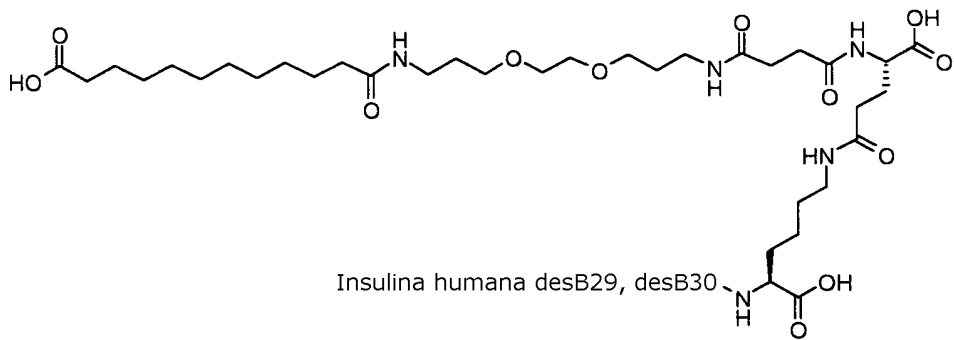
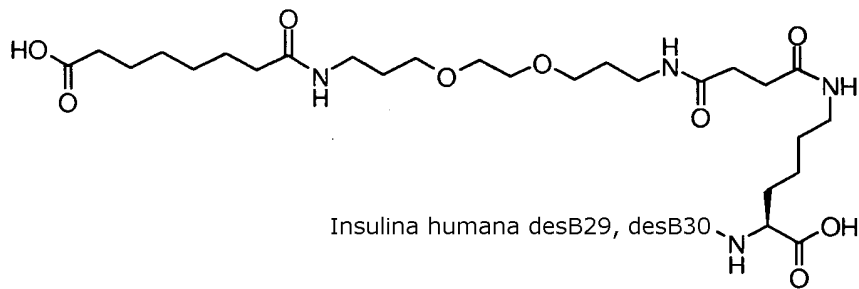
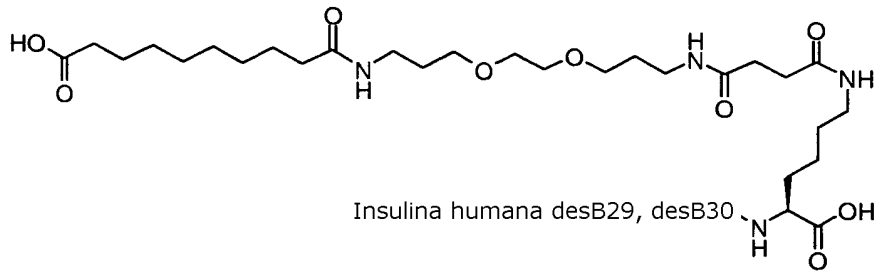
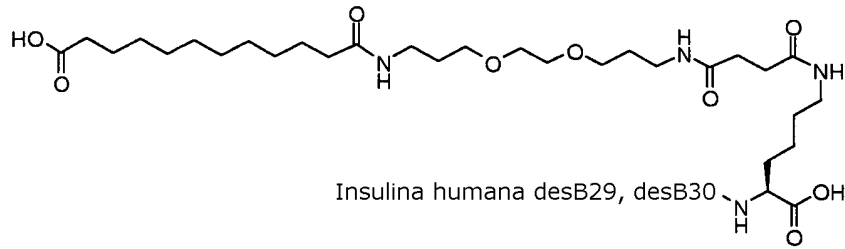


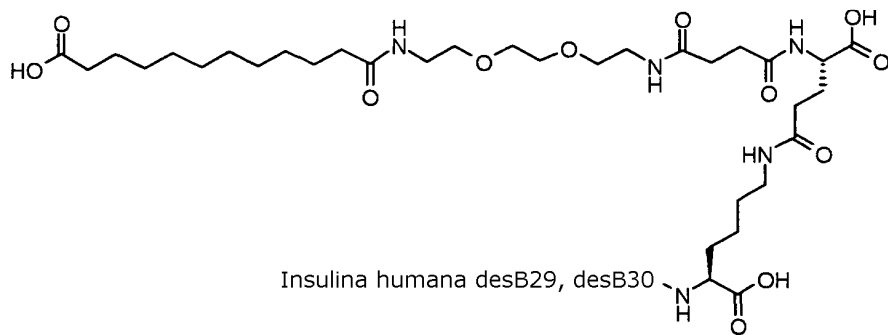
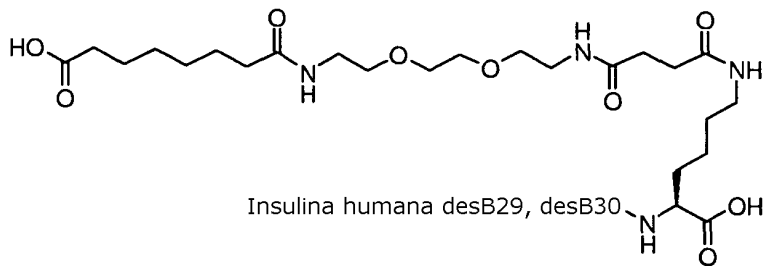
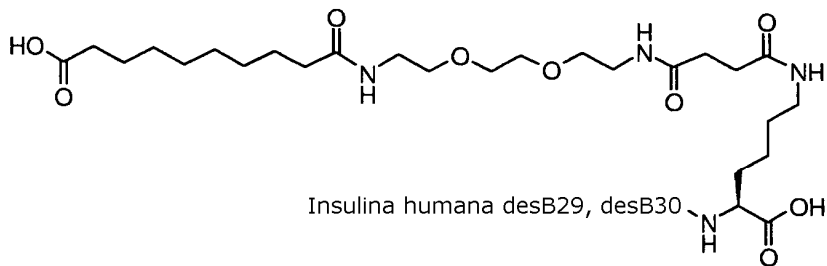
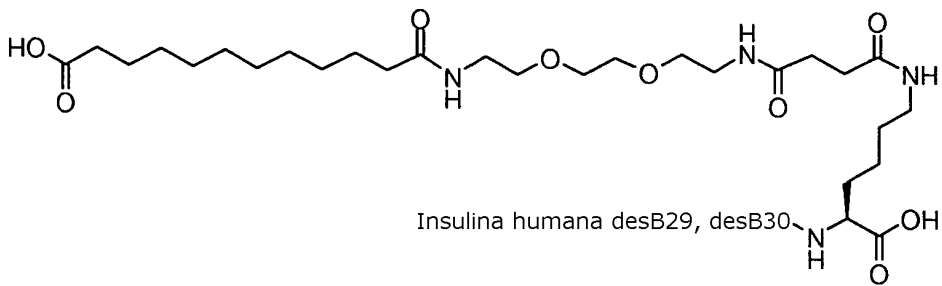
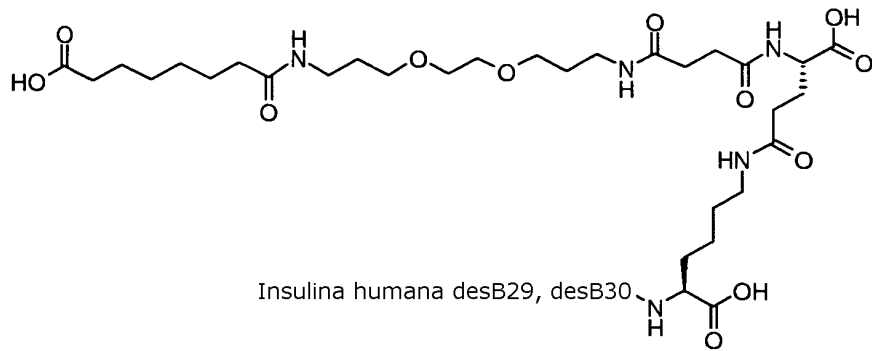
- 5  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-{2-[2-( $\omega$ -carboxiundecanoilamino)etoxi]etoxi}-etilcarbamoil)propionil- $\gamma$ -glutamil) B28D, insulina humana desB30;
- 10  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-{2-[2-( $\omega$ -carboxinonanoilamino)etoxi]etoxi}-etilcarbamoil)propionil- $\gamma$ -glutamil) B28D, insulina humana desB30;
- 15  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-{2-[2-( $\omega$ -carboxiheptanoilamino)etoxi]etoxi}-etilcarbamoil)propionil- $\gamma$ -glutamil) B28D, insulina humana desB30;
- 20  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-( $\omega$ -carboxiheptadecanoilamino)propoxi]etoxi}-etoxi)propilcarbamoil]propionil- $\gamma$ -glutamil) B28D, insulina humana desB30;
- 25  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-( $\omega$ -carboxipentadecanoilamino)propoxi]etoxi}etoxi)-propilcarbamoil]propionil- $\gamma$ -glutamil) B28D, insulina humana desB30;
- 30  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-( $\omega$ -carboxitridecanoilamino)propoxi]etoxi}etoxi)-propilcarbamoil]propionil- $\gamma$ -glutamil) B28D, insulina humana desB30;
- 35  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-( $\omega$ -carboxiundecanoilamino)propoxi]etoxi}etoxi)-propilcarbamoil]propionil- $\gamma$ -glutamil) B28D, insulina humana desB30;
- 40  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-( $\omega$ -carboxinonanoilamino)propoxi]etoxi}etoxi)-propilcarbamoil]propionil- $\gamma$ -glutamil) B28D, insulina humana desB30;
- 45  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-( $\omega$ -carboxiheptadecanoilamino)propoxi]etoxi}-etoxi)propilcarbamoil]propionil) B28D, insulina humana desB30;
- 50  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-( $\omega$ -carboxihexadecanoilamino)propoxi]etoxi}etoxi)-propilcarbamoil]propionil) B28D, insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-( $\omega$ -carboxipentadecanoilamino)propoxi]etoxi}etoxi)-propilcarbamoil]propionil) B28D, insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-( $\omega$ -carboxitridecanoilamino)propoxi]etoxi}etoxi)-propilcarbamoil]propionil) B28D, insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-( $\omega$ -carboxiundecanoilamino)propoxi]etoxi}etoxi)-propilcarbamoil]propionil) B28D, insulina humana desB30;
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-( $\omega$ -carboxinonanoilamino)propoxi]etoxi}etoxi)-propilcarbamoil]propionil) B28D, insulina humana desB30; y
- $N^{\epsilon B29}$ -(3-[3-(2-{2-[3-( $\omega$ -carboxiheptanoilamino)propoxi]etoxi}etoxi)-propilcarbamoil]propionil) B28D, insulina humana desB30

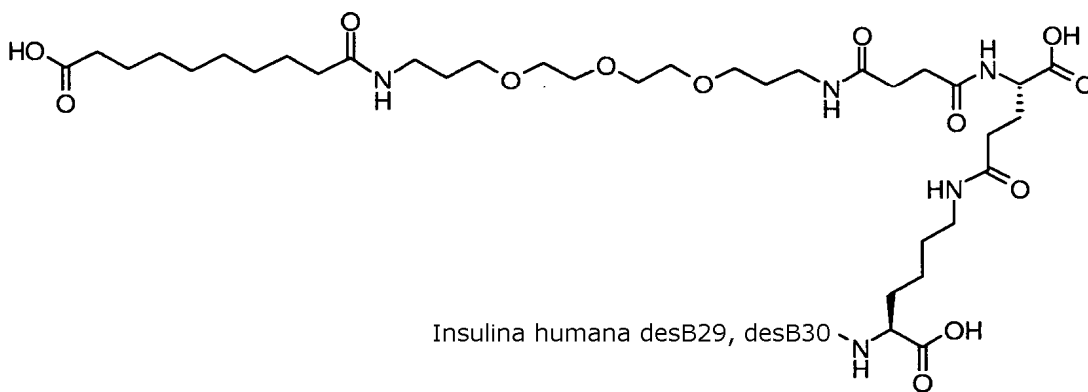
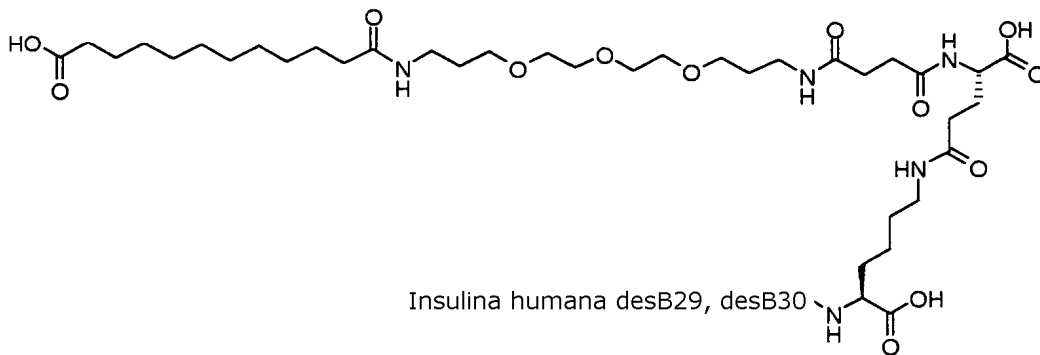
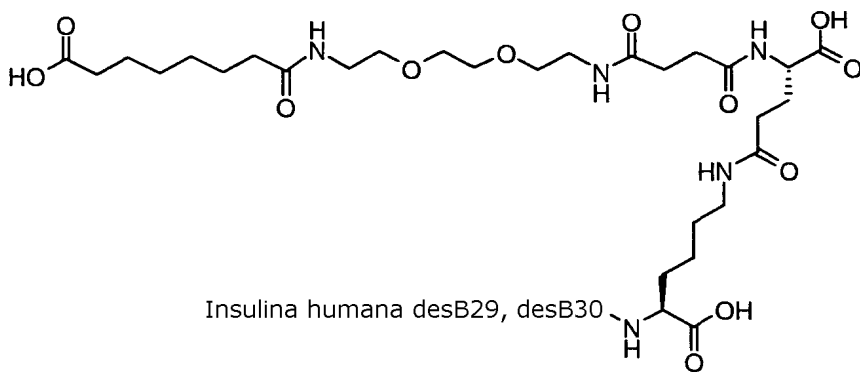
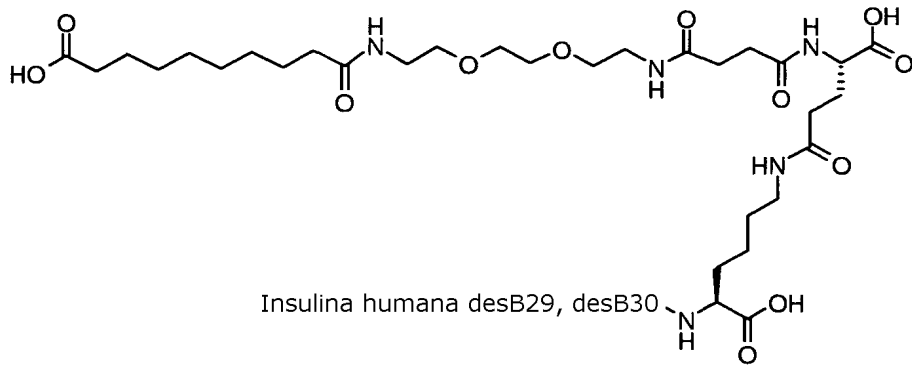
[0104] Fórmulas representativas son:



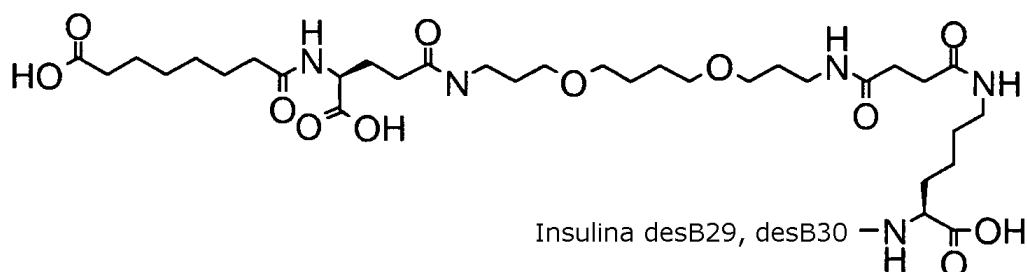
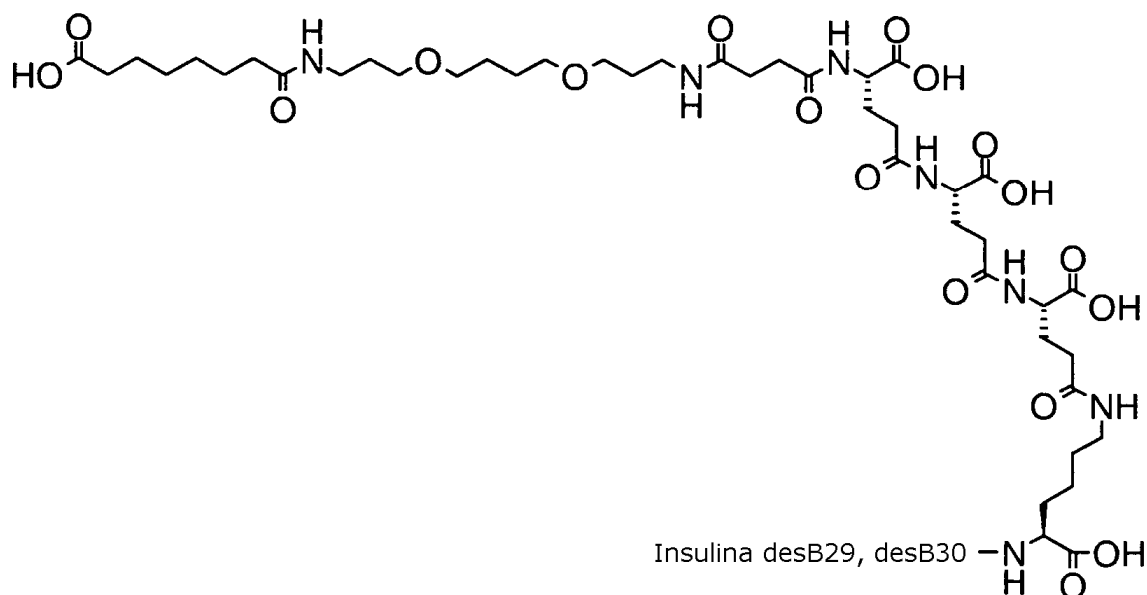
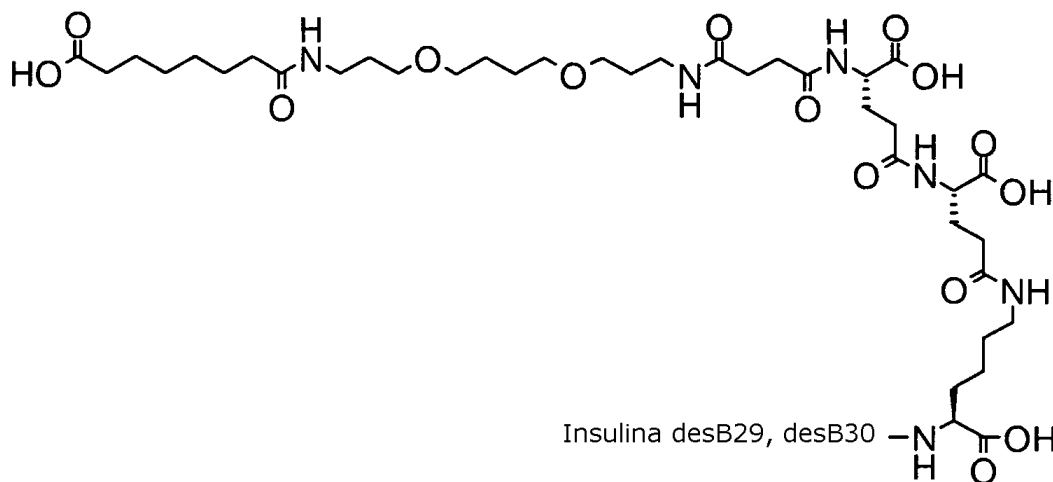












[0105] En otro aspecto, la presente invención se refiere a derivados de insulina que tienen una hidrofobicidad global que es esencialmente similar a la de la insulina humana.

5 [0106] En otro aspecto, los derivados de insulina de la presente invención tienen un índice hidrofóbico,  $k'_{rel}$ , que está en el rango de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 10, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5; de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 2; de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 1; de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2; o de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2.

10

[0107] Según un aspecto de la presente invención, los derivados de insulina comprenderán una cadena lateral de

fórmula general (I) tal como se ha definido anteriormente que tiene al menos un grupo de ácido carboxílico libre y según otro aspecto, la cadena lateral opcionalmente tendrá uno o más grupos de ácido carboxílico libre.

5 [0108] Se midió la hidrofobicidad (índice hidrofóbico) de los derivados de insulina de la invención con respecto a la insulina humana,  $k'_{rel}$ , en una columna de HPLC LiChrosorb RP18 (5  $\mu$ m, 250x4 mm) por elución isocrática a 40 °C usando mezclas de A) 0,1 M de tampón de fosfato sódico, pH 7,3, conteniendo 10% de acetonitrilo, y B) 50% de acetonitrilo en agua como eluyentes. La elución se monitorizó siguiendo la absorción de UV del eluato a 214 nm. El tiempo cero,  $t_0$ , se determinó inyectando 0,1 mM de nitrato sódico. El tiempo de retención para la insulina humana,  $t_{humana}$ , se ajustó en al menos  $2t_0$  mediante la variación de la proporción entre las soluciones A y B.  $k'_{rel} = (t_{derivado} - t_0)/(t_{humana} - t_0)$ .

[0109] En otra forma de realización, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un derivado de insulina según la invención que es soluble en valores de pH fisiológico.

15 [0110] En otra forma de realización, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un derivado de insulina según la invención que es soluble en valores de pH en el intervalo de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5.

20 [0111] En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica con un perfil de acción prolongada que comprende un derivado de insulina según la invención.

25 [0112] En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica la cual es una solución que contiene 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 de insulina de acuerdo con la invención o de una mezcla del derivado de insulina de acuerdo con la invención con un análogo de insulina de acción rápida.

30 [0113] El producto inicial para la acilación, la insulina progenitora o el 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 que contiene una secuencia de ADN que codifica el polipéptido y es capaz de expresar el polipéptido en un medio nutritivo adecuado bajo condiciones que permitan la expresión del péptido, después de lo cual el péptido resultante es recuperado del cultivo.

35 [0114] Como ejemplo, la insulina humana desB30 se puede producir a partir de un precursor de insulina humana B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21) que se produce en levadura como se describe en la patente estadounidense n.º 4916212. Este precursor de insulina puede después ser convertido en insulina humana desB30 por escisión ALP de la cadena peptídica Ala-Ala-Lys para dar insulina humana desB30 que puede luego ser acilada para dar el presente tipo de insulina.

40 [0115] El medio usado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para hacer crecer las células huéspedes, tales como medios mínimos o complejos con suplementos apropiados. Se dispone de medios adecuados de proveedores comerciales o se pueden preparar según recetas publicadas (por ejemplo, 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 incluida la separación de las células huéspedes del medio por centrifugado o filtración, la precipitación de los componentes proteínicos del sobrenadante o filtrado mediante una sal, por ejemplo sulfato de amonio, la 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.

45 [0116] La secuencia de ADN que codifica la insulina progenitora puede adecuadamente ser de origen genómico o ADNc, por ejemplo obtenido 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 and Manual, Cold Spring Harbor Laboratory and 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 el documento US 4.683.202 o Saiki et al., Science 239 (1988), 487 - 491.

50 [0117] 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).

5 [0118] El vector es preferentemente un vector de expresión en el que la secuencia de ADN que codifica la insulina progenitora está operativamente unida 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*.

10 [0119] La secuencia de ADN que codifica la insulina progenitora puede también, si fuera necesario, estar 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.

15 [0120] 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.

20 [0121] 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. Las 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.

25 [0122] Los procedimientos usados para enlazar las secuencias de ADN que codifican para la insulina progenitora, el promotor y opcionalmente el terminador y/o la 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 (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra*).

30 [0123] La célula huésped en la que la secuencia de ADN o el vector recombinante es introducido puede ser cualquier célula que sea 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.

35 [0124] La molécula de insulina progenitora es luego convertida en los derivados de insulina de la invención por introducción de la cadena lateral pertinente en 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. Aparecerán más detalles a partir de los siguientes ejemplos.

#### Composiciones farmacéuticas

40 [0125] Los derivados de insulina de esta invención de la fórmula reivindicada pueden, por ejemplo, ser administrados subcutáneamente, por vía oral o pulmonar.

45 [0126] 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.

50 [0127] Los derivados de insulina 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 la diabetes o la hiperglicemia. El logro de dosis eficaces de insulina requiere la administración de una dosis inhalada de derivado de insulina de esta invención superior a aproximadamente 0,5 µg/kg a aproximadamente 50 µg/kg. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser determinada por un profesional experto, que tendrá en cuenta factores que incluyen el nivel de insulina, los niveles de glucosa en sangre, la condición física del paciente, el estado pulmonar del paciente o similares.

55 [0128] Según la invención, el derivado de insulina de esta invención se puede entregar por inhalación para conseguir una duración prolongada de la acción. La administración por inhalación puede tener como resultado farmacocinéticas comparables a la administración subcutánea de insulinas. Diferentes dispositivos de inhalación típicamente proporcionan farmacocinéticas similares cuando se comparan los tamaños de partícula similares y niveles similares de deposición pulmonar.

60 [0129] Según la invención, un derivado de insulina de esta invención puede ser entregado 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. Preferentemente, el derivado de insulina 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 de insulina 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  $\mu\text{m}$ , por ejemplo aproximadamente 1-5  $\mu\text{m}$ , 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.

[0130] Como reconocerán los expertos en la técnica, la formulación de derivado de insulina de esta invención, la cantidad de la formulación entregada y la duración de la administración de una dosis individual dependen 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 por el que el sistema es activado dependerá principalmente de la concentración de conjugado de insulina en el aerosol. Por ejemplo, se pueden usar períodos más cortos de administración en 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 distribuir la cantidad deseada de insulina conjugada. Los dispositivos tales como inhaladores de polvo distribuyen el agente activo hasta que una carga dada de agente sea expulsada del dispositivo. En este tipo de inhalador, la cantidad de derivado de insulina de esta invención en una cantidad dada del polvo determina la dosis entregada en una única administración.

[0131] El tamaño de partícula de derivado de insulina 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 preferentemente en las vías respiratorias inferiores o alveolos. Preferentemente, el derivado de insulina de esta invención se formula de modo que al menos aproximadamente el 10% del conjugado de insulina entregado se deposite en el pulmón, preferiblemente de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 20%, o más. Se conoce que la eficiencia máxima de deposición pulmonar para seres humanos que respiran por la boca se obtiene con tamaños de partícula de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 3  $\mu\text{m}$ . Cuando los tamaños de partícula están por encima de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ , la deposición pulmonar se reduce sustancialmente. Los tamaños de partícula por debajo de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  provocan que la deposición pulmonar se reduzca y que se vuelve difícil entregar partículas con masa suficiente para ser terapéuticamente eficaz. Así, las partículas del derivado de insulina entregadas por inhalación tienen un tamaño de partícula preferentemente inferior a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , más preferentemente en la gama de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ . La formulación del derivado de insulina se selecciona para producir el tamaño de partícula deseado en el dispositivo de inhalación elegido.

[0132] Ventajosamente para la administración como un polvo seco, un derivado de insulina de esta invención se prepara en una forma granulosa con un tamaño de partícula inferior a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , preferentemente aproximadamente de 1 a aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ . El tamaño de partícula es eficaz para la entrega a los alveolos del pulmón del paciente. Preferentemente, el polvo seco está compuesto en gran medida por partículas producidas de modo que una mayoría de las partículas tengan 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  $\mu\text{m}$ . Tales formulaciones se pueden conseguir por secado por atomización, trituración, o condensación de punto crítico de una solución con conjugado de insulina y otros ingredientes deseados. Otros métodos también adecuados para generar partículas útiles en la presente invención son conocidos en la técnica.

[0133] Las partículas se separan normalmente de una formulación de polvo seco en un recipiente y luego se transportan al 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.

[0134] Las formulaciones de derivados de insulina de esta invención para la administración a partir de un inhalador de polvo seco típicamente incluyen un polvo seco finamente dividido que contiene el derivado, pero el polvo también puede incluir un agente de carga, portador, excipiente, otro aditivo o similar. Se pueden incluir aditivos en una formulación de polvo seco de conjugado de insulina, 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 para 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 de insulina puede mezclarse con un aditivo a un nivel molecular o la formulación sólida puede incluir partículas del conjugado de insulina 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; surfactantes, 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.

5

[0135] Un pulverizador que incluya los derivados de insulina de esta invención se puede producir forzando una suspensión o solución de conjugado de insulina a través de una boquilla bajo presión. El tamaño de boquilla y configuración, la presión aplicada y la velocidad de alimentación del líquido se pueden elegir para conseguir el rendimiento y el tamaño de partícula deseados. Un electro spray puede ser producido, por ejemplo, por un campo eléctrico en conexión con una alimentación capilar o por boquilla. Ventajosamente, las partículas de conjugado de insulina distribuidos por un pulverizador tienen un tamaño de partícula inferior a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , preferentemente en el rango de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ .

10

[0136] Formulaciones de derivados de insulina de esta invención adecuadas para el uso con un pulverizador típicamente incluyen el derivado de insulina 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, preferentemente, zinc. La formulación también puede incluir un excipiente o un agente para estabilización del derivado de insulina, tal como un tampón, un agente reductor, una proteína en masa o un carbohidrato. Las proteínas en masa útiles en la formulación de conjugados de insulina incluyen albúmina, protamina o similares. Los 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 surfactante, 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. Pueden emplearse varios tensioactivos convencionales, 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.

15

20

25

[0137] Composiciones farmacéuticas con un derivado de insulina según la presente invención pueden también ser administradas parenteralmente a pacientes que requieran tal tratamiento. La administración parenteral puede ser realizada por inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa 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 nasal o pulmonar, preferentemente en composiciones, polvos o líquidos específicamente diseñados para el propósito.

30

[0138] Composiciones inyectables de los derivados de insulina 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 de insulina según la invención se disuelve 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 añaden 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 necesario. Finalmente, el volumen de la solución se ajusta con agua para dar la concentración deseada de los ingredientes.

35

40

[0139] En otro aspecto de la invención el tampón es seleccionado del grupo que consiste en acetato sódico, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, 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 alternativo de la invención.

45

[0140] 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, (3p-clorofenoxipropano-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, 19.<sup>a</sup> edición, 1995.

50

55

60

[0141] 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 polialcohol, 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

65

5 mismos. Se puede utilizar cualquier azúcar tal como mono-, di-, o polisacáridos, o glucanos hidrosolubles, incluidos, por ejemplo, fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, hidroxietil almidón y carboximetilcelulosa de sodio. En un aspecto, el aditivo de azúcar es sacarosa. El polialcohol 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 polialcohol es manitol. Los azúcares o polialcoholes mencionados anteriormente pueden ser utilizados individualmente o en combinación. No hay ningún límite fijo para la cantidad usada, siempre que el azúcar o el polialcohol sean solubles en la preparación líquida y no afecten contrariamente los efectos estabilizantes conseguidos usando los métodos de la invención. En un aspecto, la concentración de azúcar o de polialcohol 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, 19.<sup>a</sup> edición, 1995.

20 [0142] Agentes típicos isotónicos son cloruro sódico, manitol, dimetil sulfona y glicerol y conservantes típicos son fenol, m-cresol, metil p-hidroxibenzoato y alcohol bencílico.

[0143] Ejemplos de tampones adecuados son acetato sódico, glicilglicina, HEPES (ácido de 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico) y fosfato sódico.

25 [0144] Una composición para la administración nasal de un derivado de insulina según la presente invención puede, por ejemplo, ser preparada como se describe en la patente europea n.º 272097 (de Novo Nordisk A/S).

30 [0145] Las composiciones que contienen derivados de insulina 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 la diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 e hiperglicemia, por ejemplo, como se ve a veces en personas gravemente lesionadas y personas que se han sometido a cirugía mayor. El nivel de dosis óptimo para cualquier paciente dependerá de una variedad de factores que incluyen: la eficacia del derivado de insulina específico empleado, la edad, el peso corporal, la actividad física y la dieta del paciente, una combinación posible con otros fármacos y la gravedad del estado a tratar. Se recomienda que la dosificación diaria del derivado de insulina de esta invención sea determinada para cada paciente por expertos en la técnica de una manera similar a las composiciones de insulina conocidas.

35 [0146] En caso de ser conveniente, los derivados de insulina de esta invención se pueden utilizar en una mezcla con otros tipos de insulina, por ejemplo, análogos de insulina con un inicio de acción más rápido. Ejemplos de tales análogos de insulina se describen, por ejemplo, en las solicitudes de patentes europeas cuyos números de publicación son: EP 214826 (Novo Nordisk A/S), EP 375437 (Novo Nordisk A/S) y EP 383472 (Eli Lilly & Co.)

40 [0147] En otro aspecto de la presente invención, los presentes compuestos se administran en combinación con una o más sustancias activas adicionales en cualquier proporción adecuada. Tales agentes activos adicionales se pueden seleccionar de agentes contra la diabetes, agentes antihiperlipidémicos, agentes antiobesidad, agentes antihipertensivos y agentes para el tratamiento de complicaciones que sea resultado de la diabetes o estén asociados a esta.

45 [0148] Agentes contra la diabetes adecuados incluyen insulina, GLP-1 (péptido 1 similar al glucagón) derivados tales como aquellos descritos en el documento WO 98/08871 (Novo Nordisk A/S), al igual que agentes hipoglucémicos activos por vía oral.

50 [0149] Los agentes hipoglucémicos activos por vía oral adecuados preferentemente comprenden imidazolininas, sulfonilureas, biguanidas, meglitinidas, oxadiazolidinedionas, tiazolidinadionas, sensibilizantes de insulina, inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa, agentes que actúan sobre el canal de potasio ATP-dependiente de las células  $\beta$  pancreáticas, por ejemplo, abridores de canal de potasio tales como aquellos descritos en los documentos WO 97/26265, WO 99/03861 y WO 00/37474 (Novo Nordisk A/S), abridores de canal de potasio tales como mitiglinida, bloqueadores de canal de potasio, tal como nateglinida o BTS-67582, antagonistas de glucagón tales como aquellos descritos en los documentos WO 99/01423 y WO 00/39088 (Novo Nordisk A/S y Agouron Pharmaceuticals, Inc.), agonistas de GLP-1 tales como aquellos descritos en el documento WO 00/42026 (Novo Nordisk A/S y Agouron Pharmaceuticals, Inc.), inhibidores de DPP-IV (dipeptidil peptidasa IV), inhibidores de PTPasa (proteína tirosina fosfatasa), inhibidores de enzimas hepáticas implicadas en la estimulación de gluconeogénesis y/o glucogenólisis, moduladores de absorción de glucosa, inhibidores de GSK-3 (glucógeno-sintasa quinasa-3), compuestos que modifican el metabolismo de lípidos tales como agentes antihiperlipidémicos y agentes antilipidémicos, compuestos reductores de la ingesta de alimentos, agonistas de PPAR (receptor activado por proliferador de peroxisoma) y RXR (receptores de retinoide X), tales como ALRT-268, LG-1268 o LG- 1069.

65

## Definiciones

- 5 [0150] 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 humana desB29desB30"** significa una insulina natural o un derivado análogo que carece de los residuos de aminoácido B29 y B30.
- 10 [0151] Con **"B (1-29)"** se entiende una cadena B de insulina natural o un derivado análogo que carece del residuo de aminoácido B30. **"A (1-21)"** significa la cadena A de insulina natural o un derivado análogo.
- 15 [0152] 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, Phe<sup>B1</sup> que significa que el residuo de aminoácido en la posición B1 es un residuo de fenilalanina.
- 20 [0153] Con **"insulina"** como se utiliza en este caso se entiende insulina humana con puentes disulfuro entre Cys<sup>A7</sup> y Cys<sup>B7</sup> y entre Cys<sup>A20</sup> y Cys<sup>B19</sup> y un puente disulfuro interno entre Cys<sup>A6</sup> y Cys<sup>A11</sup>, insulina porcina e insulina bovina.
- 25 [0154] 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 residuos de aminoácidos codificables u otros residuos de aminoácidos de origen natural o residuos de aminoácidos puramente sintéticos.
- 30 [0155] Los análogos de insulina pueden ser tales que en la posición 28 de la cadena B se pueden modificar desde el residuo Pro natural hasta uno de Asp, Lys o Ile. En otro aspecto, Lys en la posición B29 se cambia a Pro. En un aspecto, B30 puede ser Lys y B29 puede después ser cualquier aminoácido codificable excepto Cys, Met, Arg y Lys. También, Asn en la posición A21 se puede cambiar en Ala, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, en particular a Gly, Ala, Ser o Thr y preferentemente a Gly. Además, Asn en la posición B3 se puede cambiar a Lys o Asp. Más ejemplos de análogos de insulina son insulina humana desB30; análogos de insulina humana desB30; análogos de insulina en los que se han eliminado tanto B1 como B2; análogos de insulina en los que la cadena A y/o la cadena B tienen una extensión N-terminal y análogos de insulina en los que la cadena A y/o la cadena B tiene una extensión C-terminal. Más ejemplos de análogos de insulina son aquellos en los cuales. De este modo, se puede añadir uno o dos Arg en posición B1. También uno o más de B26-B30 pueden haber sido eliminados.
- 35 [0156] Por **"derivado de insulina"**, como se utiliza en la presente, se entiende una insulina de origen natural o un análogo de insulina que ha sido modificado químicamente, por ejemplo, por introducción de una cadena lateral en una o más posiciones de la estructura de insulina o por oxidación o reducción de los grupos de residuos de aminoácidos presentes en la insulina o por conversión de un grupo carboxílico libre en un grupo de éster o por acilación de un grupo amino libre o grupo hidroxilo.
- 40 [0157] La expresión **"aminoácido codificable"** o **"residuo de aminoácido codificable"** se utiliza para indicar un aminoácido o un residuo de aminoácido que puede ser codificado por un triplete ("codón") de nucleótidos.
- 45 [0158]  $\alpha$ -Asp es la forma L de  $-\text{HNCH}(\text{CO}-)\text{CH}_2\text{COOH}$ .
- 50 [0159]  $\beta$ -Asp es la forma L de  $-\text{HNCH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{CO}-$ .
- [0160]  $\alpha$ -Glu es la forma L de  $-\text{HNCH}(\text{CO}-)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ .
- [0161]  $\gamma$ -Glu es la forma L de  $-\text{HNCH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$ .
- 55 [0162] La expresión **"residuo de aminoácido con un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral"** designa residuos de aminoácidos tales como Asp, Glu y hGlu. Los aminoácidos pueden presentar una configuración L o D. Si no se especifica nada, se entiende que el residuo de aminoácido tiene la configuración L.
- 60 [0163] La expresión **"residuo de aminoácido con una cadena lateral neutra"** designa residuos de aminoácidos tales como Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro, Ser, Thr, Cys, Met, Tyr, Asn y Gln.
- 65 [0164] Cuando un derivado de insulina según la invención se define como **"soluble en valores de pH fisiológicos"**, significa que el derivado de insulina se puede usar para preparar composiciones de insulina que se disuelven completamente en valores de pH fisiológico. Tal solubilidad favorable se puede deber a las propiedades inherentes del derivado de insulina solo o bien ser el resultado de una interacción favorable entre el derivado de insulina y uno o más ingredientes contenidos en el vehículo.

[0165] Se han utilizado las siguientes abreviaturas en la especificación y los ejemplos:

5	Aad:	ácido alfa-amino-adípico (ácido homoglutámico)	
	Bzl = Bn:	bencilo	
	CN:	ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico	DIEA: N, N-diisopropiletilamina
	DMF:	N, N-dimetilformamida	
	IDA:	ácido iminodiacético	Sar: sarcosina (N-metil-glicina)
	tBu:	tert-butilo	
10	TSTU:	O -(N-succinimidil) -1, 1, 3, 3-tetrametiluronio tetrafluoroborato	
	THF:	tetrahidrofurano	
	EtOAc:	acetato etílico	
	DIPEA:	N, N-diisopropiletilamina	HOAt: 1-Hidroxi-7-azabenzotriazola
	TEA:	triethylamina	SA: ácido sinapínico
15	Su:	succinimidil= 2, 5-dioxo-pirrolidin-1-il	
	TFA:	ácido trifluoracético	
	DCM:	diclorometano	DMSO: dimetil sulfóxido
	PEG:	polietilenglicol	
	PBG:	poli-1,4-butilenglicol	
20	PPG:	poli-1,3-propilenglicol	
	TLC:	cromatografía en capa fina	
	RT:	temperatura ambiente	

25 [0166] Con “**diácido graso**” se entienden ácidos dicarboxílicos lineales o ramificados que tienen al menos 2 átomos de carbono y que son saturados o insaturados. Ejemplos no limitativos de diácidos grasos son ácido succínico, ácido hexanedioico, ácido octanedioico, ácido decanedioico, ácido dodecanodioico, ácido tetradecanodioico, ácido hexadecanodioico y ácido octadecanodioico.

30 [0167] Todos los títulos y subtítulos se utilizan en este documento por conveniencia únicamente y de ninguna manera se deben considerar como limitantes de la invención.

35 [0168] El uso de cualquiera y la totalidad de los ejemplos, o el lenguaje ejemplar (por ejemplo, “tal como”) proporcionado en este documento, se propone solamente para ilustrar mejor la invención y no presenta una limitación sobre el alcance de la invención a menos que se reclame lo contrario. Ningún lenguaje en la especificación se debe considerar como que indica que algún elemento no reivindicado es esencial para la práctica de la invención.

[0169] La mención de documentos de patentes en la presente se hace por conveniencia únicamente y no refleja ninguna visión de la validez, la patentabilidad ni la ejecutabilidad de tales documentos de patentes.

40 [0170] Esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes del contenido citado en las reivindicaciones anexas a la presente según lo permite la ley aplicable.

### Ejemplos

45 [0171] Los siguientes ejemplos y procedimientos generales se refieren a compuestos intermedios y productos finales identificados en la especificación y en los esquemas de síntesis. La preparación de los compuestos de la presente invención se describe en detalle usando los ejemplos siguientes, pero las reacciones químicas descritas son descritas en cuanto a su aplicabilidad general a la preparación de los compuestos 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  
50 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 en la presente 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  
55 pueden ser obtenidas fácilmente 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 los 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.

60 [0172] Los componentes 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.

65 [0173] Después de HPLC ácida o desalación, los compuestos se aíslan por liofilización de las fracciones puras.

[0174] Después de HPLC neutra o cromatografía de intercambio aniónico, los compuestos son desalados, precipitados con pH isoelectrico o purificados por HPLC acídica.

## 5 Procedimientos típicos de purificación:

[0175] El sistema de HPLC es un sistema Gilson que consiste en lo siguiente: manipulador de líquidos modelo 215, bomba modelo 322-H2 y detector UV modelo 155. La detección es típicamente a 210 nm y 280 nm.

10 [0176] El sistema FPLC de purificador Äkta (Amersham Biosciences) consiste en lo siguiente: bomba modelo P-900, detector UV modelo UV-900, pH modelo pH/C-900 y detector de conductividad, colector de fracciones modelo Frac-950. La detección UV es típicamente a 214 nm, 254 nm y 276 nm.

### HPLC acídica:

**Columna:** Macherey-Nagel SP 250/21 Nucleusil 300-7 C4  
**Flujo:** 8 ml/min  
**Tampón A:** 0,1% de TFA en acetonitrilo  
**Tampón B:** 0,1% de TFA en agua.  
**Gradiente:** 0,0 - 5,0 min: 10% A  
 5,00 - 30,0 min: 10% A a 90% A  
 30,0 - 35,0 min: 90% A  
 35,0 - 40,0 min: 100% A

15

### HPLC neutra:

**Columna:** Phenomenex, Jupiter, C4 5µm 250 × 10.00 mm, 300 Å  
**Flujo:** 6 ml/min  
**Tampón A:** 5 mM TRIS, 7,5 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, pH = 7,3, 20% CH<sub>3</sub> CN  
**Tampón B:** 60% CH<sub>3</sub>CN, 40% agua  
**Gradiente:** 0 - 5 min: 10% B  
 5 - 35 min: 10- 60% B  
 35 - 39 min: 60% B  
 39 - 40 min: 70% B  
 40 - 43,5 min: 70% B

### Cromatografía de intercambio aniónico:

**Columna:** RessourceQ, 1 ml  
**Flujo:** 6 ml/min  
**Tampón A:** 0,09% NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 0,25% NH<sub>4</sub>OAc, 42,5% etanol pH 8,4  
**Tampón B:** 0,09% NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 2,5% NH<sub>4</sub>OAc, 42,5% etanol pH 8,4  
**Gradiente:** 100% A a 100% B durante 30 volúmenes de columna

### Desalación:

**Columna:** HiPrep 26/10  
**Flujo:** 10 ml/min, 6 volúmenes de columna  
**Tampón:** 10 mM NH<sub>4</sub> HCO<sub>3</sub>

20

## Procedimientos analíticos:

### Método 1:

25

[0177]

### Dos bombas de HPLC Waters 510

#### Detector de absorbancia Waters 2487 Dual λ

**Tampón A:** 0,1% de TFA en acetonitrilo.

**Tampón B:** 0,1% de TFA en agua.

**Flujo:** 1,5 ml/min.

**Gradiente:** 1-17 min: 25% B a 85% B, 17- 22 min: 85% B, 22-23 min: 85% B a 25% B, 23-30 min 25% B, 30- 31 min 25% B flujo :0,15 ml/min.

**Columna:** C4 5µ 150×4,60 mm Phenomenex (Jupiter).

**Detección:** UV 214 nm.

**Método 2:**

5 [0178]

**Dos bombas de HPLC Waters 510****Detector de absorbanza Waters 2487 Dual  $\lambda$** 

Tampón A: 0,1% TFA, 10% CH<sub>3</sub> CN, 89,9% agua.  
 Tampón B: 0,1% TFA, 80% CH<sub>3</sub> CN, 19,9% agua.  
 Flujo: 1,5 ml/min.  
 Gradiente: 0-17 min: 20% -90% B, 17-21 min 90% B.  
 Columna: C4 5 $\mu$  150x4,60 mm Phenomenex (Jupiter), mantenida a 40 °C.  
 Detección: UV 214 nm.

**Método 3: dos bombas de HPLC Waters 510**

10

[0179]

Detector de absorbanza sintonizable Waters 486

Automuestreador Waters 717

Columna: C4 5 $\mu$  150x4,60 mm Phenomenex (Jupiter).  
 Inyección: 20  $\mu$ l.  
 Tampón A: 80% 0,0125 M Tris, 0,0187 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> pH = 7, 20% CH<sub>3</sub> CN.  
 Tampón B: 80% CH<sub>3</sub> CN, 20% agua.  
 Flujo: 1,5 ml/min.  
 Gradiente: 0 min 5% B -> 20 min 55% B -> 22 min 80% B -> 24 min 80% B -> 25 min 5% B 32 min 5% B.  
 Detección: UV 214 nm.

**Método 4:**

[0180]

**Dos bombas de HPLC Waters 510****Detector de absorbanza Waters 2487 Dual  $\lambda$** 

Columna: C4 5 $\mu$  150x4,60mm Phenomenex (Jupiter).  
 Inyección: 20  $\mu$ l  
 Tampón A: 80% 0,0125 M Tris, 0,0187 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> pH = 7, 20% CH<sub>3</sub> CN  
 Tampón B: 80% CH<sub>3</sub> CN, 20% agua  
 Flujo: 1,5 ml/min  
 Gradiente: 0 min 10% B ->20 min 50% B -> 22 min 60% B -> 23 min 10% B -> 30 min 10% B -> 31min 10% B flujo 0,15 min  
 Detección: 214 nm

20

**Método 5:**

[0181]

**Módulo de separaciones Waters 2695****Detector de red de fotodiodos Waters 996**

Columna: C4 5 $\mu$  150x4,60mm Phenomenex (Jupiter).  
 Inyección: 25  $\mu$ l  
 Tampón A: 80% 0,01 M Tris, 0,015 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> pH = 7,3; 20% CH<sub>3</sub> CN  
 Tampón B: 20% agua; 80% CH<sub>3</sub> CN  
 Flujo: 1,5 ml/min  
 Gradiente: 1-20 min: 5-50% B, 20-22 min: 50-60% B, 22-23 min: 60-5% B, 23-30 min 0%B 30-31min 0-5%B, flujo: 0,15 ml/min.  
 Detección: 214 nm

25

**Método 6:**



[0182]

**Módulo de separaciones Waters 2795**  
**Detector de red de fotodiodos Waters 2996**  
**Espectrómetro de masas de electroespray Waters Micromass ZQ 4000**

**Método LC:**

**Columna:** Phenomenex, Jupiter 5µ C4 300Å 50 x 4,60 mm  
**Tampón A:** 0,1 % de TFA en agua  
**Tampón B:** CH<sub>3</sub>CN  
**Flujo:** 1 ml/min  
**Gradiente:** 0-7,5 min: 10-90% B  
 7,5 - 8,5 min: 90-10%B  
 8,5 - 9,5 min 10% B  
 9,5 - 10,00 min 10% B, flujo: 0,1 ml/min

**Método MS:**

Mw:500 - 2000 ES+  
 Voltaje de cono 60V  
 Tiempo de exploración 1  
 Retraso de interexploración: 0,1

5

**Método 7:**

[0183]

**Serie Agilent 1100**

**Columna:** GraceVydac Protein C4, 5µm 4,6x250mm (Cat# 214TP54)  
**Tampón A:** 10 mM Tris, 15 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, 20% CH<sub>3</sub>CN en agua pH 7,3  
**Tampón B:** 20% de agua en CH<sub>3</sub>CN  
**Flujo:** 1,5 ml/min  
**Gradiente:** 1-20 min: 10% B a 50% B, 20- 22 min: 50% B a 60% B, 22-23 min: 60% B a 10% B, 23- 30 min 10% B  
 30-31 min 10%B, flujo 0,15 ml/min.  
**Detección:** 214 nm

10

**Método 8: HPLC-MS**

[0184] Se utiliza la siguiente instrumentación:

15

- Bomba Hewlett Packard serie 1100 G1312A Bin
- Detector de red de diodos Hewlett Packard serie 1100 MSD G1315A DAD
- Espectrómetro de masas triplecuadrípolo Sciex3000Micro inyector Gilson 215
- Detector de dispersión de la luz evaporativo Sedex 55

20

[0185] Las bombas y los detectores son controlados por el programa MassChrom 1.1.1 ejecutado en un ordenador Macintosh G3. Gilson Unipoint Versión 1.90 controla el auto-inyector.

[0186] La bomba de HPLC se conecta a dos depósitos de eluyente que contienen:

25

A: 0,01 % de TFA en agua  
 B: 0,01% de TFA en acetonitrilo

[0187] El análisis se realiza a temperatura ambiente inyectando un volumen apropiado de la muestra (preferiblemente 10 µl) sobre la columna, que es eluida con un gradiente de acetonitrilo. El eluato de la columna fue pasado a través del detector de UV para encontrar un separador de flujo, que pasó aproximadamente 30 µl/min (1/50) a través de la interfaz electroespray asistido por turbo nebulización API de espectrómetro API 3000. Los restantes 1,48 ml/min (49/50) fueron pasados a través del detector ELS.

30

[0188] Las condiciones de HPLC, los ajustes del detector y los ajustes de espectrómetro de masas usados se proporcionan en la siguiente tabla.

35

Columna	Waters X-Terra C18, 5µ, 50 mmx3 mm id
Gradiente	5% - 90% de acetonitrilo linealmente durante 7,5 min a 1,5 ml/min

Detección	210 nm (salida análoga de DAD)
MS	Electrospray asistido por turbo nebulización API de modo de ionización
ELS	Ganancia 8 y 40°C

**Método 9: HPLC-MS**

5 [0189]

- Bomba Hewlett Packard serie 1100 G1312A Bin
- Compartimiento de columna Hewlett Packard serie 1100
- Detector de red de diodos Hewlett Packard serie 1100 G1315A DAD
- Hewlett Packard serie 1100 MSD
- Detector de dispersión de la luz evaporativo Sedere 75

10

[0190] El instrumento fue controlado por el programa HP Chemstation.

15 [0191] La bomba de HPLC fue conectada a dos depósitos de eluyente que contenían:

- A: 0,01% de TFA en agua
- B: 0,01% de TFA en acetonitrilo

20 [0192] El análisis se realiza a 40 °C inyectando un volumen apropiado de la muestra (preferiblemente 1 µl) sobre la columna, que es eluida con un gradiente de acetonitrilo.

[0193] Las Condiciones de HPLC, los ajustes del detector y los ajustes de espectrómetro de masas usados se proporcionan a continuación:

25

- Columna:** Waters Xterra MS C-18 X 3 mm id 5 µm
- Gradiente:** 5% - 100% acetonitrilo lineal durante 7,5 min a 1,5ml/min
- Detección:** 210 nm (salida análoga de DAD)  
ELS (salida análoga de ELS)

30

[0194] Después del DAD, el flujo fue dividido produciendo aprox. 1 ml/min al ELS y 0,5 ml/min al MS.

[0195] Los espectros de **MALDI-TOF-MS** fueron registrados en un Bruker Autoflex II TOF/TOF operando en modo lineal usando una matriz de ácido sinapínico, un láser de nitrógeno y detección de iones positivos. Voltaje de aceleración: 20 kV.

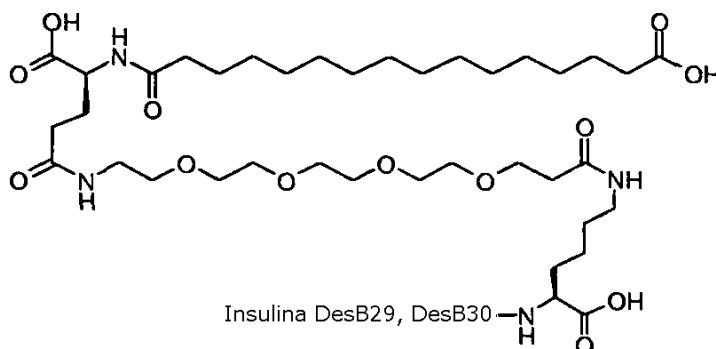
35

**Ejemplo 1**

Síntesis de N<sup>tB29</sup>-(3-[2-{2-(2-[ω-carboxi-pentadecanoil-γ-glutamil-(2-amino-etoxi)]-etoxi)-etoxi]-etoxi]-propinoil)-insulina humana desB30

40

[0196]



45

[0197] Insulina humana DesB30 (400 mg, 0,070 mmol) se disolvió en 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5 ml, pH 10,2) a temperatura ambiente. 3-[2-{2-(2-[ω-tert-butil-carboxi-pentadecanoil-γ-glutamil-α-tert-butil-(2-amino-etoxi)]-etoxi)-etoxi]-etoxi]-propinoil succinimidílico (72 mg, 0,084 mmol, preparado como se describe abajo) se disolvió en acetonitrilo (5 ml) y

posteriormente se añadió a la solución de insulina. Después de 30 minutos, se agregó metilamina 0,2 M (0,5 ml). El pH se ajustó por medio de HCl a 5,5 y el producto precipitado isoeléctrico se recolectó por medio de la centrifugación y se secó al vacío para proporcionar 345 mg. El rendimiento de acoplamiento fue 64% (RP-HPLC, columna C4; Tampón A: MeCN al 10% en TFA al 0,1%-agua, Tampón B: MeCN al 80% en TFA al 0,1%-agua; gradiente de 20% a 90% de B en 16 minutos). El producto protegido se disolvió en TFA al 95% (10 ml), se dejó durante 30 minutos y se evaporó al vacío. El producto crudo se disolvió en agua y se liofilizó.

[0198] La N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(3-[2-{2-(2-[ω-carboxi-pentadecanoil-γ-glutamil-(2-amino-etoxi)]-etoxi)-etoxi]-etoxi]-propinoil) insulina humana desB30 se purificó por medio de la RP-HPLC en una columna C4, tampón A: EtOH al 20% + TFA al 0,1%, tampón B: EtOH al 80% + TFA al 0,1%; gradiente de 15-60% de B, seguido por la HPLC en una columna C4, tampón A: Tris 10 mM + sulfato de amonio 15 mM en EtOH al 20%, pH 7,3, tampón B: EtOH al 80%, gradiente de 15-60% de B. Las fracciones recolectadas se desalinizaron en Sep-Pak con acetonitrilo al 70% + TFA al 0,1%, se neutralizaron por la adición de amoníaco y se liofilizaron. El rendimiento no optimizado fue 60 mg, 13%. La pureza evaluada por medio de la HPLC fue >98%. MALDI-TOF-MS 6349, C<sub>285</sub>H<sub>432</sub>N<sub>66</sub>O<sub>86</sub>S<sub>6</sub> requiere 6351.

[0199] Preparación de succinimidil 3-[2-{2-(2-[ω-tert-butil-carboxi-pentadecanoil-γ-glutamil-α-tert-butil-(2-amino-etoxi)]-etoxi)-etoxi]-etoxi]-propinoil).

[0200] El ácido hexadecadioico (40,0 g, 140 mmol) se suspendió en tolueno (250 ml) y la mezcla se calentó a reflujo. El di-tert-butil acetal de *N,N*-dimetilformamida (76,3 g, 375 mmol) se agregó gota a gota durante 4 horas. La mezcla se calentó a reflujo durante toda la noche. El solvente se retiró in vacuo a 50 °C y el material crudo se suspendió en DCM/AcOEt (500 ml, 1:1) y se agitó durante 15 minutos. Los sólidos se recolectaron por medio de la filtración y se trituraron con DCM (200 ml). Los productos filtrados se evaporaron in vacuo para proporcionar el hexadecandioato de mono-tert-butilo crudo, 30 gramos. Este material se suspendió en DCM (50 ml), se enfrió con hielo durante 10 minutos y se filtró. El solvente se retiró in vacuo para dejar 25 gramos de hexadecandioato de mono-tert-butilo crudo, el cual se recrystalizó a partir de heptano (200 ml) para proporcionar el hexadecandioato de mono-tert-butilo, 15,9 g (33%). Alternativamente a la recrystalización, el mono-éster se puede purificar por cromatografía de sílice en AcOEt/heptano.

[0201] <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 2,35 (t, 2H), 2,20 (t, 2H), 1,65-1,55 (m, 4H), 1,44 (s, 9H), 1,34-1,20 (m, 20 H).

[0202] El éster mono-tert-butílico (2 g, 5,8 mmol) se disolvió en THF (20 ml) y se trató con TSTU (2,1 g, 7,0 mmol) y DIEA (1,2 ml, 7,0 mmol) y se agitó durante toda la noche. La mezcla se filtró y el filtrado se evaporó in vacuo. El residuo se disolvió en AcOEt y se lavó dos veces con HCl 0,1 M y agua fríos. El secado sobre MgSO<sub>4</sub> y la evaporación in vacuo proporcionaron el hexadecandioato de succinimidil-tert-butilo, 2,02 g (79%).

[0203] <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 2,84 (s, 4H), 2,60 (t, 2H), 2,20 (t, 2H), 1,74 (p, 2H), 1,56 (m, 2H), 1,44 (s, 9H), 1,40 (m, 2H), 1,30-1,20 (m, 18H).

[0204] El hexadecandioato de succinimidil-tert-butilo (1 g, 2,27 mmol) se disolvió en DMF (15 ml) y se trató con L-Glu-OtBu (0,51 g, 2,5 mmol) y DIEA (0,58 ml, 3,41 mmol) y la mezcla se agitó durante toda la noche. El solvente se evaporó in vacuo y el producto crudo se disolvió en AcOEt y se lavó dos veces con HCl 0,2 M, con agua y salmuera. El secado sobre MgSO<sub>4</sub> y la evaporación in vacuo proporcionaron el éster de ω-tert-butil-carboxi-pentadecanoil-L-glutamil-α-tert-butilo, 1,2 g (100%).

[0205] <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 6,25 (d, 1 H), 4,53 (m, 1 H), 2,42 (m, 2H), 2,21 (m, 4H), 1,92 (m, 1 H), 1,58 (m, 4H), 1,47 (s, 9H), 1,43 (s, 9H), 1,43-1,22 (m, 18H).

[0206] El éster de 15-tert-butil-carboxi-pentadecanoil-L-glutamil-α-tert-butilo (1,2 g, 2,27 mmol) se disolvió en THF (15 ml) y se trató con TSTU (0,82 g, 2,72 mmol) y DIEA (0,47 ml, 2,72 mmol) y se agitó durante toda la noche. La mezcla se filtró y el filtrado se evaporó in vacuo. El residuo se disolvió en AcOEt y se lavó dos veces con HCl 0,1 M y agua fríos. El secado sobre MgSO<sub>4</sub> y la evaporación in vacuo proporcionaron el éster succinimidílico de ω-tert-butil-carboxipentadecanoil-L-glutamil-α-tert-butilo 1,30 g (92%).

[0207] <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 6,17 (d, 1H), 4,60 (m, 1 H), 2,84 (s, 4H), 2,72 (m, 1H), 2,64 (m, 1 H), 2,32 (m, 1 H), 2,20 (m, 4H), 2,08 (m, 1 H), 1,6 (m, 4H), 1,47 (s, 9H), 1,43 (s, 9H), 1,33-1,21 (m, 20 H).

[0208] El éster succinimidílico de 15-tert-butil-carboxi-pentadecanoil-L-glutamil-α-tert-butilo (109 mg, 0,17 mmol) se disolvió en DMC (2 ml) y se trató con ácido 3-(2-{2-(2-(2-amino-etoxi)-etoxi)-etoxi]-etoxi)-propiónico (51 mg, 0,19 mmol, Quanta Biodesign, OH, EE. UU.) y DIEA (45 μL, 0,26 mmol). La mezcla fue agitada durante toda la noche y evaporada in vacuo. El residuo se disolvió en AcOEt y se lavó dos veces con HCl 0,2 M, agua y solución salina fríos. El secado sobre MgSO<sub>4</sub> y la evaporación *in vacuo* dieron ácido 3-[2-{2-(2-[ω-tert-butil-carboxipentadecanoil-γ-glutamil-α-tert-butil-(2-amino-etoxi)]-etoxi)-etoxi]-etoxi]-propiónico, 119 mg (88%).

[0209] <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,01 (t, 1 H), 6,58 (d, 1 H), 4,42 (m, 1 H), 3,76 (d, 2H), 3,62 (m, 16H), 3,55 (t, 2H), 3,42 (m, 1 H), 2,58 (t, 2H), 2,28 (m, 2H), 2,17 (m, 2H), 2,11 (m, 1 H), 1,94 (m, 1 H), 1,57 (m, 4H), 1,43 (s, 9H), 1,42 (s, 9H), 1,22 (m, 20 H).

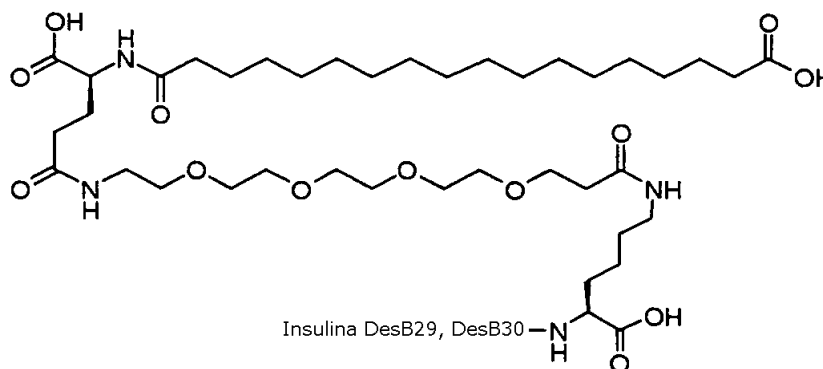
[0210] El ácido 3-[2-{2-(2-[ω-tert-butil-carboxi-pentadecanoil-γ-glutamilo-α-tert-butil-(2-amino-etoxi)]-etoxi)-etoxi]-etoxi]-propiónico (119 mg, 0,15 mmol) se disolvió en THF (2 ml) y se trató con TSTU (55 mg, 0,18 mmol) y DIEA (31 μL, 0,18 mmol) y se agitó durante toda la noche. La mezcla se filtró y el filtrado se evaporó *in vacuo*. El residuo se disolvió en AcOEt y se lavó dos veces con HCl 0,1 M y agua fríos. El secado sobre MgSO<sub>4</sub> y la evaporación *in vacuo* dieron ácido succinimidílico 3-[2-{2-(2-[ω-tert-butil-carboxi-pentadecanoil-γ-glutamilo-α-tert-butil-(2-amino-etoxi)]-etoxi)-etoxi]-etoxi]-propinoil, 123 mg (92%).

[0211] <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 6,64 (t, 1 H), 6,54 (d, 1 H), 4,35 (m, 1 H), 3,80 (d, 2H), 3,59 (m, 16H), 3,51 (t, 2H), 3,39 (m, 1 H), 2,85 (t, 2H), 2,79 (s, 4H), 2,22 (m, 2H), 2,15 (m, 2H), 2,08 (m, 1 H), 1,90 (m, 1 H), 1,55 (m, 4H), 1,41 (s, 9H), 1,39 (s, 9H), 1,20 (m, 20 H).

## Ejemplo 2

15 Síntesis de N<sup>εB29</sup>-(3-[2-{2-(2-[ω-carboxi-heptadecanoil-γ-glutamilo-(2-amino-etoxi)]-etoxi)-etoxi]-etoxi]-propinoil) insulina humana desB30

[0212]



20

[0213] Este compuesto se preparó en analogía con el ejemplo 1 mediante reacción de L-GluOtBu con tert-butilo succinimidil octadecanoato seguido por activación con TSTU, activación con TSTU, reacción con ácido 3-(2-{2-(2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-propiónico, activación con TSTU, acoplamiento con insulina humana DesB30 y desprotección por TFA.

25

[0214] MALDI-TOF-MS 6380, calculado 6379.

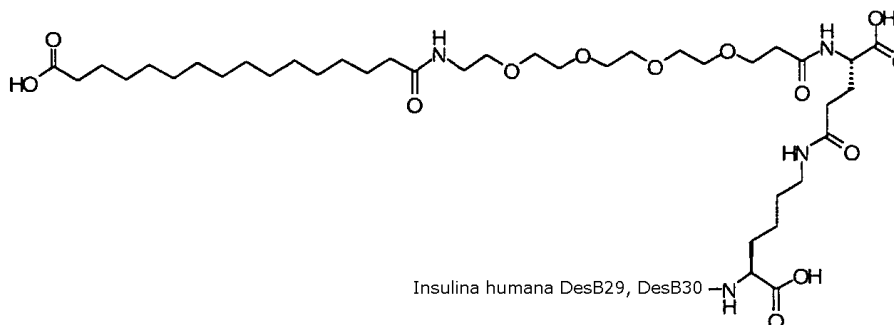
## Ejemplo 3

30

Síntesis de N<sup>εB29</sup>-(3-[2-{2-(2-[2-(15-carboxi-pentadecanoilamino)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi]-propinoil-γ-glutamilo) insulina humana desB30

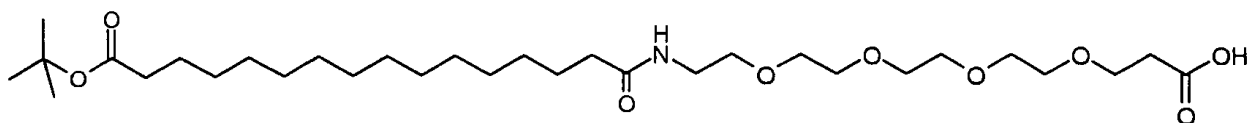
[0215]

35



Paso 1: Éster tert-butilico de ácido ω-[2-(2-{2-(2-(2-carboxi-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etilcarbamoil]-pentadecanoico

40 [0216]



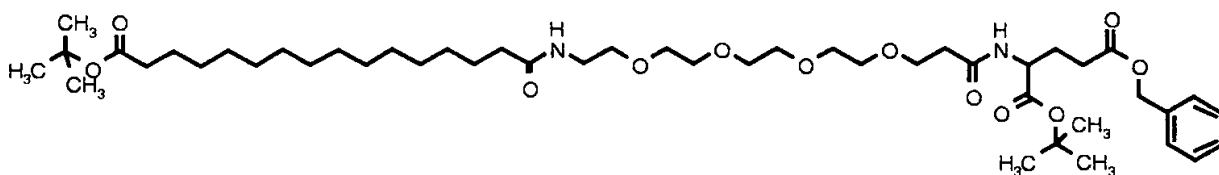
[0217] El éster tert-butílico de ácido hexadecanedioico 2,5-dioxo pirrolidin-1-il 0,12 g, 0,283 mmol) se disolvió en DMF (2,5 ml), se añadió ácido 3-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-propionico (75 mg, 0,283 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla reactiva se combinó con otra mezcla reactiva realizada en una escala de 0,038 mmol. Se añadió AcOEt (25 ml) y la solución se lavó con agua acidificada (15 ml + 300 µl de HCl 0,1 N) y agua (3 x 15 ml), se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró al vacío, añadiendo un poco de DCM y concentrando nuevamente dos veces, produciendo así un residuo grasoso blanco (0,15 g, 79%)

[0218] HPLC-MS m/z: 590 (M+1), R<sub>t</sub> = 5,24 min.

[0219] 1 H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 6,48 (br, 1 H), 3,79 (t, 2H), 3,6-3,7 (m, 14H), 3,47 (m, 2H), 2,60 (t, 2H), 2,17- 2,22 (m, 4H), 1,57-1,64 (m, 4H), 1,44 (s, 9H), 1,2-1,3 (m, 20H).

Paso 2: Éster 5-bencilo éster 1-tert-butilo de ácido 2-{3-[2-(2-{2-[2-(ω-tert-butoxicarbonilpentadecanoilamino)etoxi]-etoxi]etoxi]etoxi]propionilamino}pentanodioico

[0220]



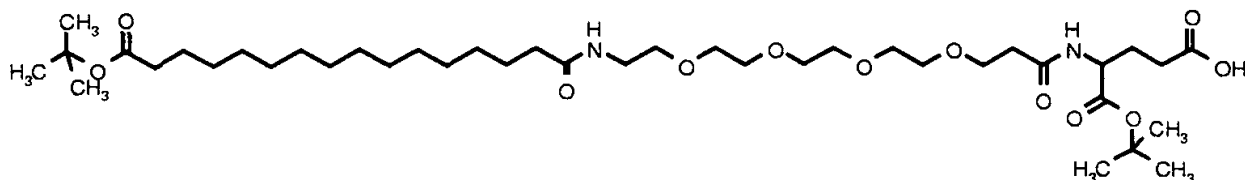
[0221] Se disolvió éster tert-butilo de ácido hexadecanoico (0,15 g, 0,254 mmol) en DMF (2,5 ml) y se añadieron HOBT (48 mg, 0,356 mmol) y EDAC (63 mg, 0,331 mmol). La solución fue agitada a temperatura ambiente durante 30 min y se añadieron H-Glu-(OBzl)- OtBu (117 mg, 0,356 mmol). La reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 16 h y se añadió AcOEt (25 ml). La solución fue lavada con agua (10 ml), HCl 0,2 N (3 x 10 ml), 1:1 NaCl saturado/agua (3 x 10 ml), se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró para producir un aceite (0,24 g). El producto se purificó por cromatografía en columna rápida (sílice, 95:5 DCM/metanol) para producir un aceite 0,2 g.

[0222] HPLC-MS (método 9): m/z: 866 (M+1), R<sub>t</sub> = 6,99-7,09 min

[0223] 1 H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 7,34-7,38 (m, 5H), 6,83 (d, 1 H), 6,10 (br, 1 H), 5,11 (s, 2H), 4,50-4,55 (m, 1H), 3,71-3,75 (m, 2H), 3,60-3,65 (m, 12H), 3,55 (t, 2H), 3,36-3,42 (m, 2H), 2,36-2,51 (m, 4H), 2,14-2,24 (m, 5H), 1,93-2,00 (m, 1 H), 1,57-1,63 (m, 4H), 1,46 (s, 9H), 1,44 (s, 9H), 1,2-1,3 (m, 20H).

Paso 3: Éster tert-butilo de ácido 2-{3-[2-(2-{2-[2-(ω-tert-butoxicarbonil-pentadecanoilamino)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propionilamino}pentanodioico

[0224]

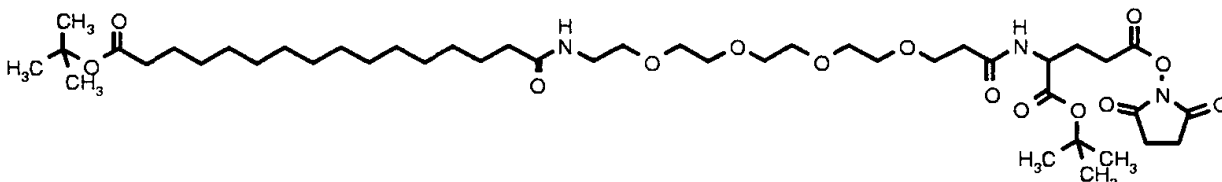


[0225] Se disolvió éster 5-bencilo éster 1-tert-butilo de ácido 2-{3-[2-(2-{2-[2-(ω-tert-butoxicarbonilpentadecanoilamino)etoxi]-etoxi]etoxi]etoxi]propionilamino}pentanodioico (0,2 g, 0,23 mmol) en THF. El matraz se llenó con N<sub>2</sub> y se añadió paladio (0,3 g, 10% en carbón, 50% de agua), y se equipó el matraz con un globo lleno de H<sub>2</sub>. La mezcla se agitó durante 16 h a temperatura ambiente, y se filtró a través de celita, lavando con THF. El filtrado se concentró para producir un aceite (0,16 g, 89%).

[0226] HPLC-MS (método 9m/z: 775 (M+1), Rt = 5,46 min.

**Paso 4:** Éster 5-tert-butil éster 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) de ácido 2-{3-[2-(2-{2-[2-(ω-tert-butoxicarbonil-pentadecanoilamino)etoxi]-etoxi}etoxi)etoxi]-propionilamino}pentanodioico

[0227]

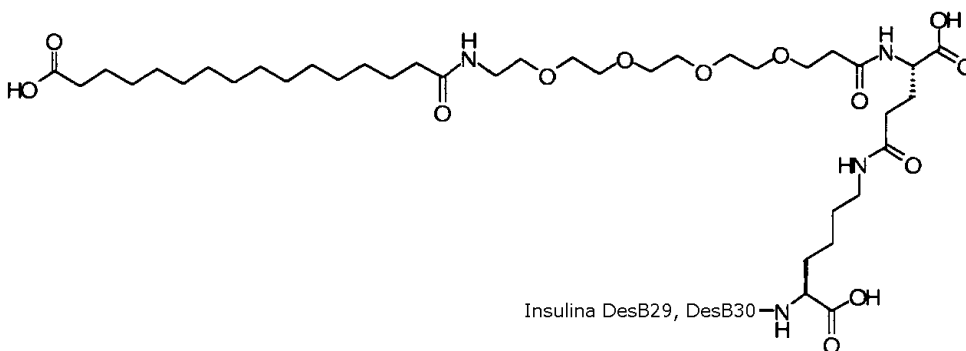


[0228] Se disolvió éster 1-tert-butilo de ácido 2-{3-[2-(2-{2-[2-(artert-butoxicarbonil-pentadecanoilamino)etoxi]-etoxi}etoxi)etoxi]-propionilamino}pentanodioico (0,16 g, 0,21 mmol) en DMF (2 ml) y se añadieron THF (4 ml) y DIEA (42 μl, 0,25 mmol). La solución fue enfriada a 0 °C y se añadió TSTU (74 mg, 0,21 mmol). La reacción se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente, el solvente se quitó al vacío y se añadió AcOEt (25 ml). La mezcla se lavó con 0,2 N HCl (3 x 10 ml), NaHCO<sub>3</sub> saturado (3 x 10 ml), se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró al vacío para producir un aceite (0,16 g). El producto fue purificado por cromatografía en columna rápida (sílice, 95:5 DCM/metanol) para producir un aceite (0,11 g, 61%).

[0229] HPLC-MS (método 9) m/z: 872 (M+1), Rt = 5,67 min.

**Paso 5:** N<sup>εB29</sup>-{3-[2-(2-{2-[2-(ω-carboxi-pentadecanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-etoxi]-propionil-γ-glutamil insulina humana desB30

[0230]



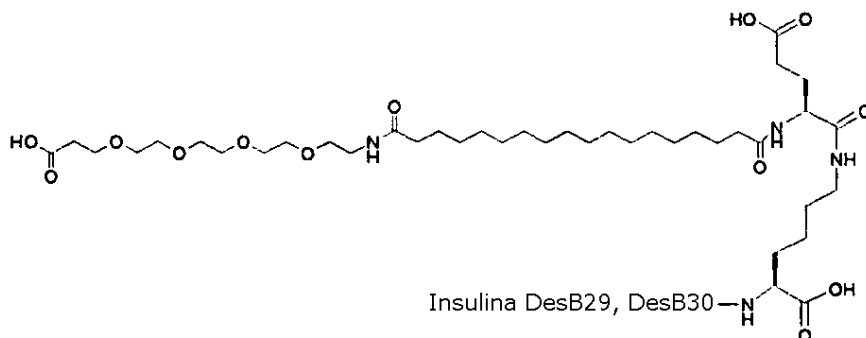
[0231] El éster α-tert-butilo éster 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) éster de ácido 2-{3-[2-(2-{2-[2-(ω-tert-butoxicarbonil-pentadecanoilamino)etoxi]-etoxi}etoxi)etoxi]-propionilamino}pentanodioico se acopló a la insulina humana desB30 de manera similar a lo que se describe en el Ejemplo 1. El producto intermedio fue purificado por HPLC preparatoria (C<sub>18</sub> -5 cm dia.) antes del tratamiento con TFA. El producto final fue purificado por HPLC preparatoria (C<sub>4</sub>, 2 cm dia.) luego (C<sub>4</sub>, 1 cm dia.) (20-60% de acetonitrilo).

[0232] MALDI-TOF-MS: 6355, calculado: 6351

#### Ejemplo 4

**Síntesis de N<sup>εB29</sup>(ω-[2-(2-{2-[2-(2-carboxi-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etilcarbamoil]-heptadecanoil-α-glutamil) insulina humana desB30**

[0233]



[0234] Este compuesto se preparó en analogía con el ejemplo 1 mediante la reacción de  $H_2N(CH_2CH_2O)_4CH_2CH_2COOtBu$  (Quanta Biodesign, OH, EE. UU.) con mono-succinimidil octadecandioato seguido por activación con TSTU, reacción con L-Glu(OtBu), activación con TSTU, acoplamiento con insulina humana DesB30 y desprotección por TFA.

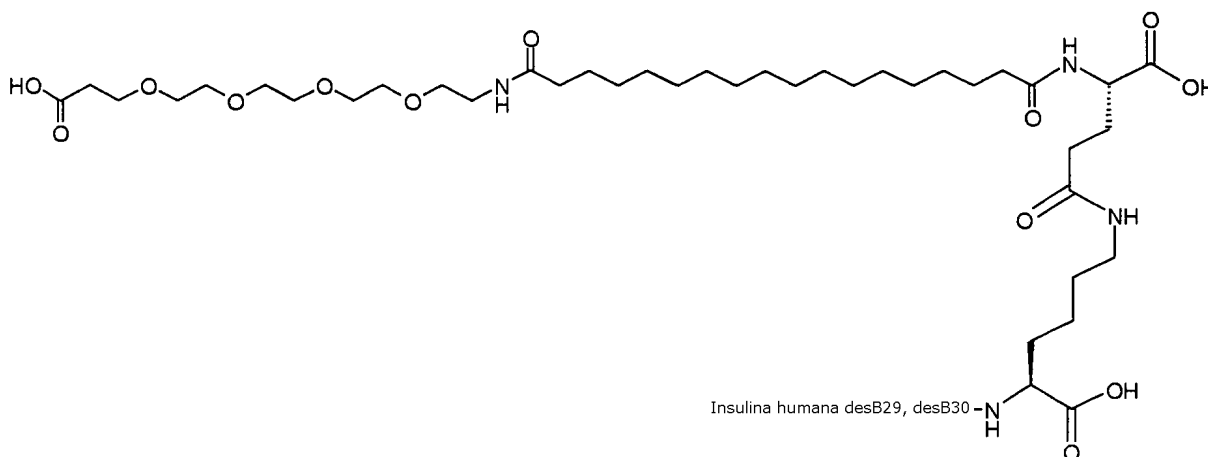
5

[0235] LCMS 6380, método 6, calculado 6379.

### Ejemplo 5

10 Síntesis de  $N^{EB29}-(\omega-[2-(2-[2-(2-(2-carboxi-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etilcarbamoil]-heptadecanoil-\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30

[0236]



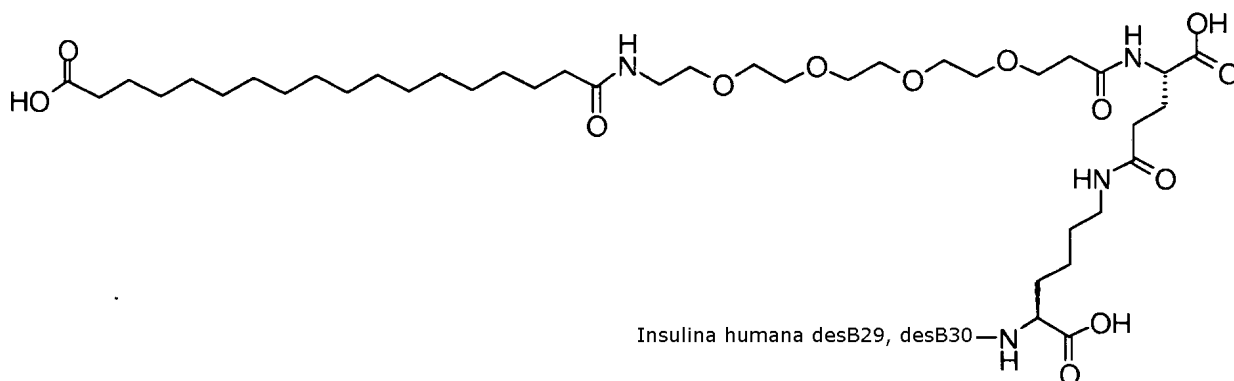
15 [0237] Este compuesto se preparó en analogía con el ejemplo 1 mediante la reacción de  $H_2N(CH_2CH_2O)_4CH_2CH_2COOtBu$  (Quanta Biodesign, OH, EE. UU.) con mono-succinimidil octadecandioato seguido por activación con TSTU, reacción con L-Glu-OtBu, activación con TSTU, acoplamiento con insulina humana DesB30 y desprotección por TFA.

20 [0238] LCMS 6378,4, método 6, calculado 6379,4.

### Ejemplo 6

25 Síntesis de  $N^{EB29}-3-[2-(2-[2-(2-(\omega-carboxi-heptadecanoilamino)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-etoxil-propionil-\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30

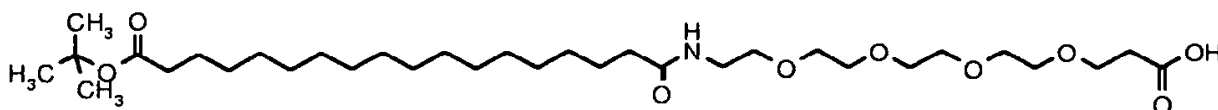
[0239]



[0240] El compuesto fue preparado de la misma manera que con N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-3-[2-(2-[2-(2-(ω-carboxi-pentadecanoilamino)-etoxi]-etoxi)-etoxi)-etoxi]-propionil-γ-glutamil insulina humana desB30 usando éster tert-butilo éster 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il de ácido octadecanodioico como la materia prima.

Paso 1: Éster tert-butilo de ácido ω-[2-(2-[2-(2-carboxi-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etilcarbamoil]-heptadecanoico

[0241]



10

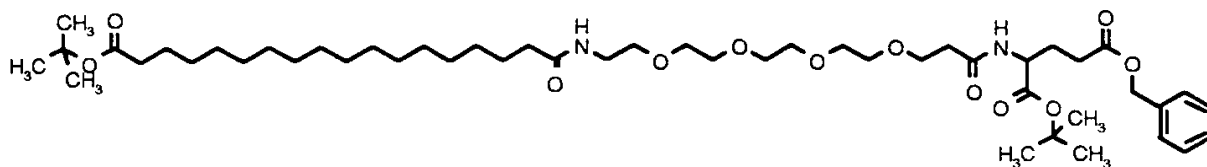
[0242] HPLC-MS (método 9) m/z: 618 (M+1), Rt = 5,92 min.

[0243] 1 H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 6,46 (br, 1 H), 3,79 (t, 2H), 3,61-3,69 (m, 14H), 3,44-3,49 (m, 2H), 2,60 (t, 2H), 2,16-2,22 (m, 4H), 1,51-1,68 (m, 4H), 1,44 (s, 9H), 1,19-1,36 (m, 24H).

15

Paso 2: Éster 5-bencilo éster 1t-tert-butilo de ácido 2-{3-[2-(2-[2-(2-(ω-tert-butoxicarbonilheptadecanoilamino)etoxi]-etoxi)etoxi)etoxi]propionilamino}pentanedioico

[0244]



20

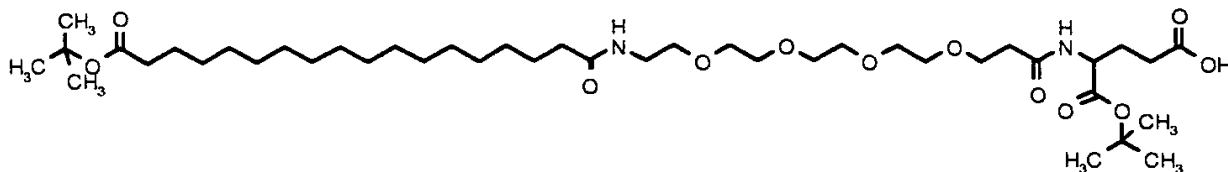
[0245] HPLC-MS (método 9) m/z: 894 (M+1), Rt = 7,82-7,89 min.

[0246] 1H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 7,29-7,42 (m, 5H), 6,83 (d, 1 H), 6,13 (br, 1 H), 5,11 (s, 2H), 4,46-4,59 (m, 1 H), 3,68-3,81 (m, 2H), 3,57-3,68 (m, 12H), 3,55 (t, 2H), 3,39-3,49 (m, 2H), 2,32-2,55 (m, 4H), 2,12-2,28 (m, 5H), 1,86-2,07 (m, 1 H), 1,51-1,68 (m, 4H), 1,46 (s, 9H), 1,44 (s, 9H), 1,17-1,36 (m, 24H).

25

Paso 3: Éster 1-tert-butilo de ácido 2-{3-[2-(2-[2-(17-tert-butoxicarbonilheptadecanoilamino)etoxi]-etoxi)etoxi]etoxi]propionilamino}pentanedioico

[0247]



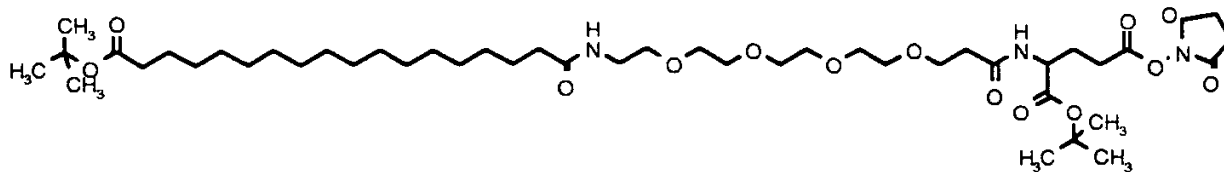
30

[0248] HPLC-MS (método 9) m/z: 804 (M+1), Rt = 5,81 min.



Paso 4: Éster 5-tert-butil éster 1-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-il) de ácido 2-{3-[2-(2-{2-[2-(w-tert-butoxicarbonil-heptadecanoilamino)etoxi]-etoxi]etoxi]etoxi]-propionilamino}pentanodioico

[0249]



5

[0250] HPLC-MS (método 9) m/z: 901 (M+1), Rt = 6,00 min.

10

[0251] 1 H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 6,94 (d, 1 H), 6,15 (br, 1 H), 4,55-4,62 (m, 1 H), 3,71-3,79 (m, 2H), 3,59-3,71 (m, 12 H), 3,55 (t, 2H), 3,42-3,47 (m, 2H), 2,84 (s, 4H), 2,58-2,79 (m, 2H), 2,52 (t, 2H), 2,24-2,41 (m, 1 H), 2,13-2,24 (m, 4H), 2,04-2,10 (m, 1 H), 1,51-1,70 (m, 4H), 1,48 (s, 9H), 1,44 (s, 9H) 1,19-1,37 (m, 24H).

Paso 5: N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(3-[2-(2-[2-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi]-propionil gamma-glutamil insulina humana desB30

15

[0252] El producto final fue purificado por HPLC (C<sub>18</sub>-5cm dia.).

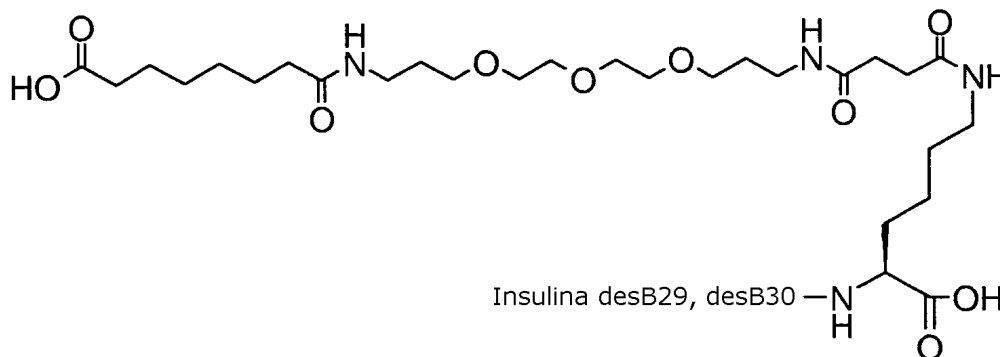
[0253] HPLC-MS (método 9) m/z: 1596,4 (M+4/4), calculado 6379, Rt = 4,05 min

20

**Ejemplo 7**

Síntesis de N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(3-(3-[2-[2-(3-[7-carboxiheptanoilamino]propoxi)etoxil-etoxi]ropilcarbamoil)propionil) insulina humana desB30

[0254]



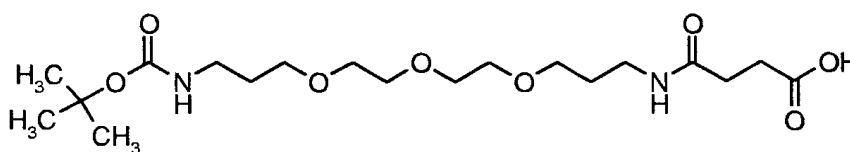
25

[0255] Este compuesto se preparó usando los mismos pasos de síntesis que los proporcionados para la síntesis del ejemplo 1.

30

Paso 1. Ácido N-(3-[2-[2-(3-tert-butoxicarbonilaminopropoxi)etoxi]etoxi]propil)succinámico

[0256]

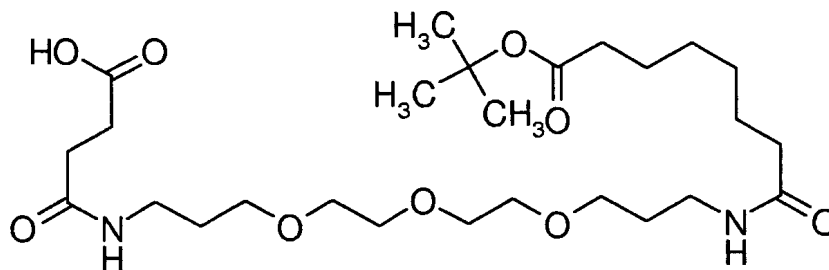


35

La preparación de 1-(tert-butoxicarbonilamino)-4,7,10-trioxa-13-tridecanamina (5 g) y anhídrido succínico (1,98) dio 7 g de producto bruto. LCMS (método 6): Rt 3,34 min; m/z (M+1) 421 calculado: 421

Paso 2. Éster tert-butilo de ácido 7-[3-(2-[2-[3-(3-carboxipropionilamino)-propoxi]-etoxi]-etoxi)-propilcarbamoil]-heptanoico

[0257]



5 [0258] Este compuesto se preparó por desprotección de ácido N-(3-{2-[2-(3-tert-butoxicarbonilaminopropoxi)-etoxi]etoxi}propil)succinámico (1,56 mmol) mediante TFA, seguido de reacción con éster tert-butilo éster 2,5-dioxopirrolidin-1-il de ácido octanodioico (1,56 mmol) como se describe en el ejemplo 8, paso 3.

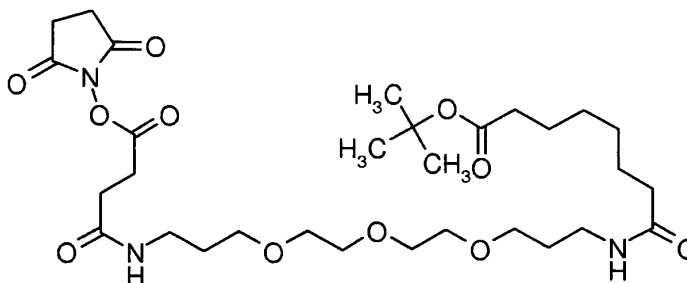
10 [0259] El producto bruto se purificó sobre Gilson usando HPLC acidica en una columna C18 (Jones, Kromasil RP18 5µm 15x225 mm).

[0260] Gradiente: 0,0-4,0 min 20% A; 4,0 - 11,0 min 20-90% A; 11-16 min 90% A.

15 [0261] El producto fue recogido en fracciones de 15,0-17,0 min. Las fracciones combinadas se evaporaron produciendo el producto deseado (0,78 g).

[0262] LCMS (método 9): Rt 4,03 min; m/z (M+1) 533, calculado: 533.

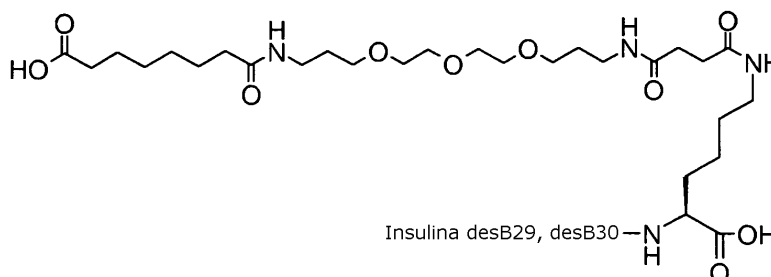
20 [0263] Paso 3. Éster tert-butilo de ácido 7-{3-[2-(2-[3-(3-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxicarbonil)-propionilamino]-propoxi)-etoxi)-etoxi]-propilcarbamoil]-heptanoico.



25 [0264] El éster tert-butilo de ácido 7-[3-(2-[2-[3-(3-carboxipropionilamino)-propoxi]-etoxi)-etoxi]-propilcarbamoil]-heptanoico (0,78 g, 1,46 mmol) se activó mediante TSTU como se describe en el ejemplo 8, paso 4. El rendimiento crudo fue 360 mg, método LCMS 6: Rt 4,40 min; m/z (M+1) 630 calculado: 630. El compuesto se usó sin purificación adicional.

30 Paso 4. N<sup>ε</sup>B29-(3-(3-{2-[2-(3-[7-carboxiheptanoilamino]propoxi)etoxi]-etoxi}propilcarbamoil)propionil-γ-glutamil) insulina humana desB30

[0265]



[0266] La preparación después del paso 6 en el ejemplo 8 dio como resultado 0,78 g del producto objetivo después de la purificación sobre Gilson usando HPLC ácida en una columna C18 (Jones, Kromasil RP18 5µm 15x225 mm). Gradiente: 0,0-1,0 min: 30% CH3CN, 1,00 – 15,0 min: 30 - 50% CH3CN, 15,0 – 20,0 min : 50% CH3CN flujo: 10 ml / min. Rt = 14,5-16,0 min.

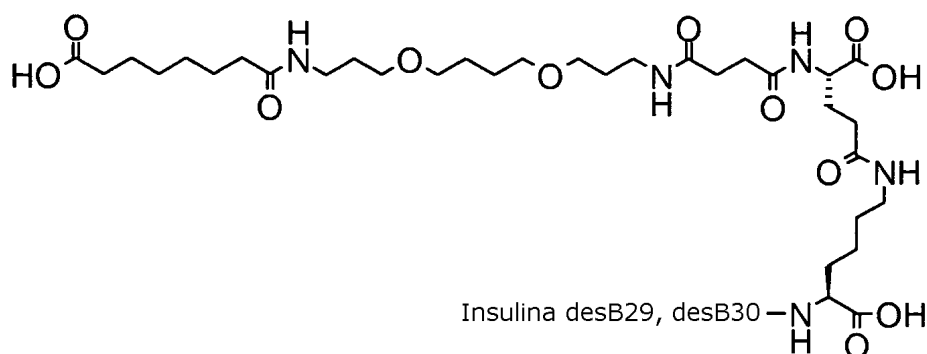
[0267] MALDI-TOF-MS (matriz SA): m/z 6167 calc. 6165.

[0268] HPLC (método 5); Rt 3,973 min.

### Ejemplo 8

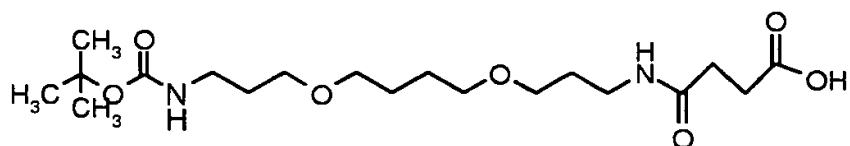
Síntesis de N<sup>ε</sup>B29-(3-(3-{4-[3-(7-carboxiheptanoilamino)propoxi]butoxi}propilcarbamoil)-propionil-γ-glutamil) insulina humana desB30.

[0269]



Paso 1: ácido N-{3-[4-(3-tert-butoxicarbonilaminopropoxi)-butoxi]-propil}succinámico

[0270]



[0271] 1-(tert-butoxicarbonilamino)-4,9-dioxo-12-dodecanamino (5,0 g, 16,45 mmol) se disolvió en THF (30 ml), se añadió anhídrido succínico (1,81 g, 18.1 mmol) en acetonitrilo (10 ml) y la mezcla se calentó a 60 C durante 4 h, y posteriormente se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche.

[0272] La mezcla se evaporó hasta quedar seca y se añadió EtAc (50 mL).

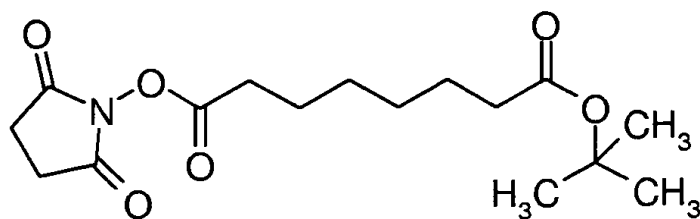
[0273] La fase de EtAc se lavó con HCl (0,1 M) 3 veces, se secó con MgSO<sub>4</sub> y posteriormente la fase orgánica se evaporó hasta quedar seca lo que dió 5,86 g (88%) de un aceite espeso.

[0274] LCMS (método 6): Rt 2,86 min; m/z (M+1) 405. Calculado: 405.

[0275] Este producto se utilizó sin purificación adicional.

Paso 2. Éster tert-butilo éster 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il de ácido octanodioico

[0276]



[0277] Éster mono-tert-butilo de ácido octanodioico (3,14g, 13,63 mmol) se disolvió en THF (100 mL). Se añadió TSTU (4,9 g, 16,3 mmol) y el pH se ajustó a 8,5 con DIPEA (2,85 ml).

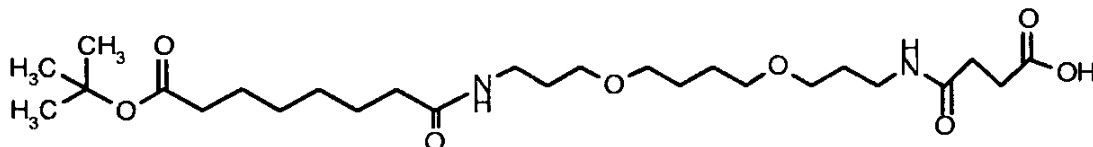
5 [0278] La mezcla se agitó bajo nitrógeno durante toda la noche, se evaporó a sequedad, se disolvió en EtAc (50 ml) que posteriormente se extrajo 2 veces con HCL (0,1 M). La fase orgánica se secó con MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó dando como resultado un aceite ligeramente amarillo (5 g, con cantidades pequeñas de solvente).

[0279] LCMS (Método 6): Rt 6,56 min; m/z (M+1) 328. Calculado: 328.

10

Paso 3: Éster tert-butilo de ácido 7-(3-{4-[3-(3- carboxipropionilamino)propoxi]butoxi}propilcarbamoil)heptanoico

[0280]



15 [0281] El ácido N-{3-[4-(3-tert-butoxicarbonilaminopropoxi)-butoxi]-propil}succinámico (4,60 g, 11,37 mmol) se agitó con TFA (20 ml) a temperatura ambiente durante 60 min, después de la evaporación, el residuo se eliminó con DCM (30 ml x2) y se evaporó hasta quedar seco.

20 [0282] El aceite resultante se disolvió en acetonitrilo (30 ml) y se añadió éster tert-butilo éster 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il (4,46 g, 13,6 mmol) de ácido octanodioico en DMF (20 ml).

25 [0283] El pH se ajustó a 8,5 con DIPEA y la mezcla se agitó durante toda la noche bajo nitrógeno. La mezcla se evaporó posteriormente hasta quedar seca y se redisolvió en EtAc (50 ml). La fase de EtAc se extrajo 3 veces con HCl (0,1 M), la capa orgánica se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y se evaporó dando como resultado un aceite cristalino ligeramente amarillo (6,5 g, contenido de residuos de solvente).

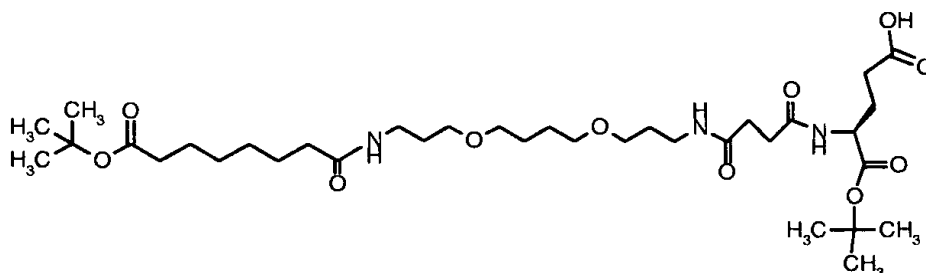
[0284] LCMS (método 6): Rt 4,31 min; m/z (M+1) 517. Calculado: 517.

[0285] El producto crudo se utilizó para la reacción adicional sin purificación adicional.

30

Paso 4. Éster 1-tert-butilo de ácido 2-[3-(3-{4-[3-(7-tert-butoxicarbonilheptanoilamino)propoxi]butoxi}-propilcarbamoil)-propionilamino]pentanodioico.

[0286]



35 [0287] El éster tert-butilo del ácido 7-(3-{4-[3-(3-carboxipropionilamino)propoxi]butoxi}propilcarbamoil)-heptanoico (5,9 g), el producto crudo anterior, se disolvió en THF (20 mL), se agregó TSTU (4,13 g, 13,7 mmol) junto con DMF (6 ml), el pH se ajustó a 8,2 con DIPEA (2,6 ml). La mezcla se agitó durante toda la noche bajo nitrógeno.

40 [0288] La mezcla se evaporó y el residuo se disolvió en EtAc el cual se extrajo con HCl (0,1 M) 3 veces.

[0289] La capa orgánica se secó con sulfato de magnesio, se filtró y el filtrado se evaporó para proporcionar un aceite.

[0290] LCMS (método 6): Rt 4, 57 minutos; m/z 614, que corresponde al ácido activado.

5 [0291] Esto se disolvió en THF (30 ml), el pH se ajustó a 8,2 con DIPEA (0,4 ml) y se añadió H-glu-OtBu (1,7g, 4,9 mmol) junto con DMF (10 ml).

[0292] La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h, la filtración seguida por la evaporación proporcionó un aceite espeso color amarillo.

10 [0293] Este se extrajo entre EtAc y HCl (0,1 M) como se indicó anteriormente y la capa seca resultante de EtAc proporcionó 3,5 g de producto crudo con la evaporación. LCMS (método 6): Rt 4,77 min; m/z (M+1) 702.

15 [0294] El producto crudo se purificó sobre Gilson utilizando HPLC ácida en una columna C18 (Jones, Kromasil RP18 5µm 15x225 mm).

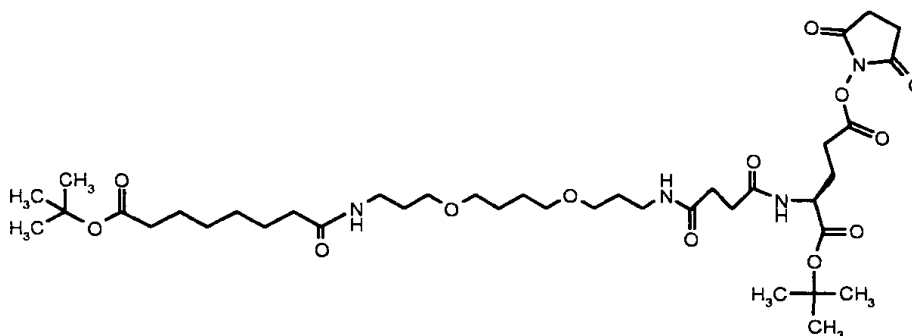
[0295] Gradiente: 0,0-10,0 min 35% A; 10,0 - 25,0 min 35-80% A; 25-30 min 90% A; 30-35 min 100% A.

20 [0296] El producto se recolectó en fracciones de 21-22,5 min. Las fracciones combinadas se evaporaron generando el producto deseado (1,8 g).

[0297] LCMS (método 6): Rt 4,77 min; m/z (M+1) 702, calculado 702.

25 Paso 5. Éster 5-tert-butil éster 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) de ácido 2-[3-(3-{4-[3-(7-tert- butoxicarbonilheptanoilamino) propoxi]butoxi}propilcarbamoil)- propionilamino]pentanedioico

[0298]

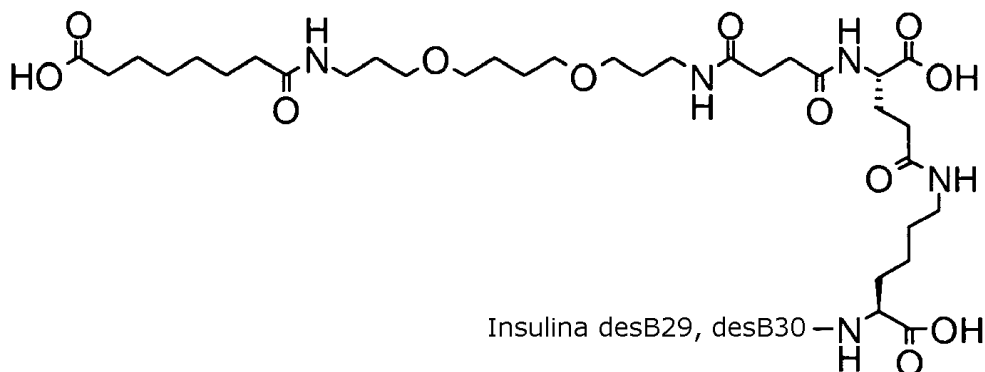


30 [0299] Se disolvió éster 1-tert-butilo de ácido 2-[3-(3-{4-[3-(7-tert-butoxycarbonilheptanoilamino)propoxi]butoxi}- propilcarbamoil)-propionilamino]pentanedioico (1,5 g, 2,14 mmol) en THF (20 ml), el pH se ajustó a 8,5 con DIPEA (0,9 ml), se añadió TSTU (0,83 g, 2,77 mmol) en DMF (5 ml). La mezcla se agitó durante toda la noche bajo nitrógeno; la evaporación y extracción posteriores entre EtAc y HCl como se ha descrito anteriormente dieron como resultado 1,75 g de producto bruto.

35 [0300] LCMS (método 6): Rt 5,10 min; m/z (M+1) 800, calculado: 800.

Paso. N<sup>B29</sup>-(3-(3-{4-[3-(7-carboxiheptanoilamino)propoxi]butoxi}propilcarbamoil)-propionil-γ-glitamil) insulina humana desB30:

40 [0301]



5 Se disolvió ácido 5-tert-butilo éster 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) éster (0,255 g, 0,319 mmol) del ácido 2-[3-(3-{4-[3-(7-tert-butoxicarbonilheptanoilamino)propoxi]butoxi}propilcarbamoil) - propionilamino]pentanedioico en acetonitrilo (10 mL) y se añadió a una solución de insulina humana desB30 (1,82 g) disuelta en solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10 ml, pH 10,3), el pH se ajustó a 10,1 con NaOH (0,1 M). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h, luego el pH se ajustó a 5,5 mediante HCl (2M, 3 ml) dando como resultado la precipitación de una masa cristalina aceitosa.

[0302] Este se aisló y disolvió en el ácido acético en agua (1 M) y se liofilizó.

10 [0303] El producto resultante se disolvió en agua y se purificó sobre Gilson usando la HPLC ácida en una columna C18 (Jones, Kromasil RP18 5µm 15x225 mm).

[0304] Gradiente: 0,0-5,0 min 35% un; 5,0 - 25,0 min 35-80% un; 25-30 min 90% un; 30-35 min 100% A. Las fracciones de alrededor de 15 min a temperatura ambiente fueron se recogieron, se mezclaron y se evaporaron.

15 [0305] El producto fue tratado con TFA/DCM 1/1 (20 ml) por agitación a temperatura ambiente durante 1 h; la evaporación hasta quedar seco y la eliminación posterior con DCM 40 ml 2 veces dio como resultado el producto desprotegido que se disolvió en agua y se liofilizó dando 540 mg del producto deseado.

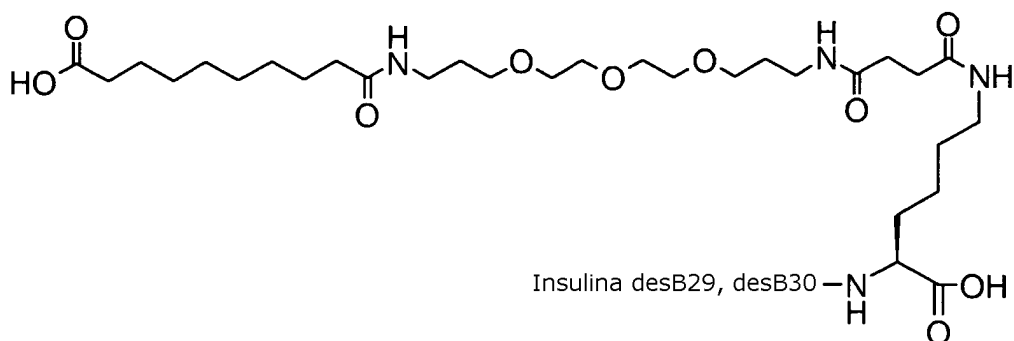
20 [0306] MALDI.TOF-MS: m/z 6276,66 calc. 6276.

[0307] HPLC (método 5); Rt 10,19 min.

### Ejemplo 9

25 Síntesis de N<sup>ε</sup>B29-(3-(3-{2-[2-(3-[9-carboxinonanoilamino]propoxi)etoxi]etoxi}-propilcarbamoil)propionil) insulina humana esB30

[0308]



30 [0309] El producto resultó siguiendo el procedimiento del ejemplo 7, pero cambiando la parte de diácido.

[0310] La preparación siguiendo el paso 6 en el ejemplo 8 usando 0,114 mmol de insulina desB30 dio como resultado 0,96 g del compuesto protegido.

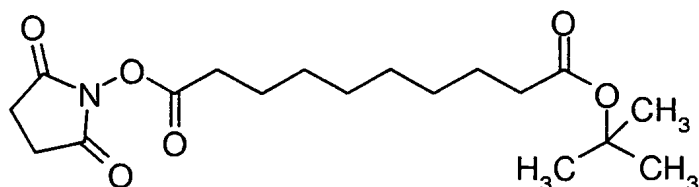
35 [0311] Purificación de Gilson usando HPLC ácida en una columna C18 (Jones, Kromasil RP18 5µm 15x225 mm). Gradiente: 0,0-1,0 min: 35 % CH<sub>3</sub>CN, 1,00 -15,0 min: 35-55% CH<sub>3</sub>CN, 15,0-20,0 min: 55% CH<sub>3</sub>CN flujo: 10 ml / min. Rt = 12,5- 14,0 min.

40 [0312] La desprotección por TFA dio 0,141 g de compuesto incoloro después de la liofilización.

[0313] MALDI-TOF-MS (matriz SA): m/z 6195 calculado 6186

[0314] HPLC (método 5): Rt; 4,094 min.

5 [0315] Éster tert-butilo éster 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il de ácido decanodioico.



[0316] La preparación como se describe en el paso 2 del ejemplo 8 dio 5,57 g de producto bruto que se utilizó sin purificación adicional. LCMS (método 6): Rt 5,82 min; m/z (M+1) 356, calculado: 355.

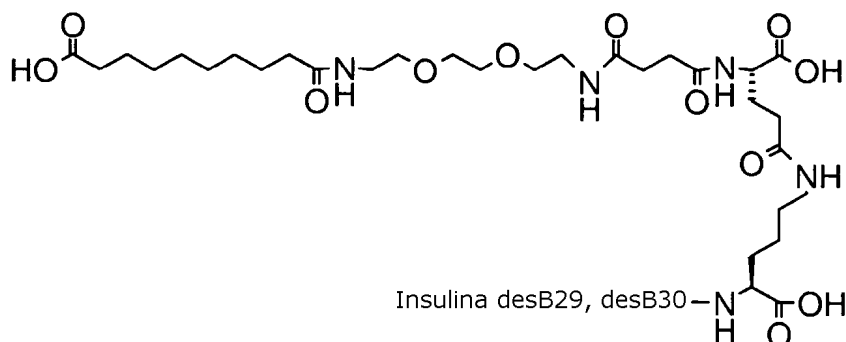
10

### Ejemplo 10

Síntesis de *N*<sup>B29</sup>-(3-(2-{2-[2-(9-carboxinonanoilamino)etoxi]etoxi}etilcarbamoil) propionil-γ-glutamil) insulina humana desB30

15

[0317]



[0318] La preparación se realizó usando la metodología descrita en el ejemplo 8.

20

[0319] El éster 1-tert-butilo del ácido (S)-2-[3-(2-[2-[2-(9-tert-butoxicarbonilnonanoilamino)etoxi]etoxi]-etilcarbamoil) propionilamino]pentanedioico (0,59 g, 0,876 mmol) se activó con TSTU 0,132 g (0,171 mmol), el producto reactivo crudo fue reaccionado con insulina desB30 (0,154 mmol) como se describe en el ejemplo 8.

25

[0320] Esto dio como resultado 740 mg de precipitado aceitoso que fue liofilizado y purificado sobre Gilson usando HPLC ácida en una columna C18 (Jones, Kromasil RP18 5 μm 15x225 mm).

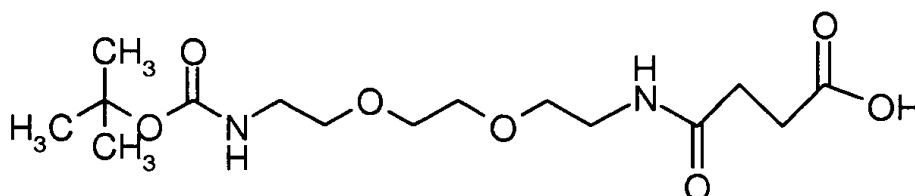
[0321] Gradiente: 0,0-5,0 min 30% A; 5,0 – 20,0 min 35-50% A.

30

[0322] Se aislaron 105 mg de compuesto objetivo. MALDI.TOF-MS (matriz ciano): m/z 6245,9 calculado 6243.

[0323] HPLC (método 5); Rt 8.759 min.

[0324] Ácido N-[2-[2-(2-tert-butoxicarbonilamino-etoxi)-etoxi]-etil]-succinámico.

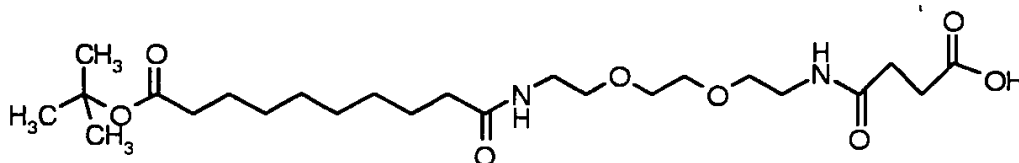


35

[0325] La preparación de 1-(t-butiloxycarbonilamino)-3,6-dioxa-8-octanoamina (5 g, 20,16 mmol) y anhídrido succínico (2,218 g, 22,18 mmol) dio un aceite amarillo espeso que se cristalizó en reposo (6,5 g, rendimiento 98%). LCMS (método 6): Rt 2,99 min; m/z (M+1) 349 calculado.: 349.

Éster tert-butilo del ácido 9-(2-[2-[2-(3-carboxipropionilamino)etoxi]etoxi]etilcarbamoil)nonanoico

[0326]



5

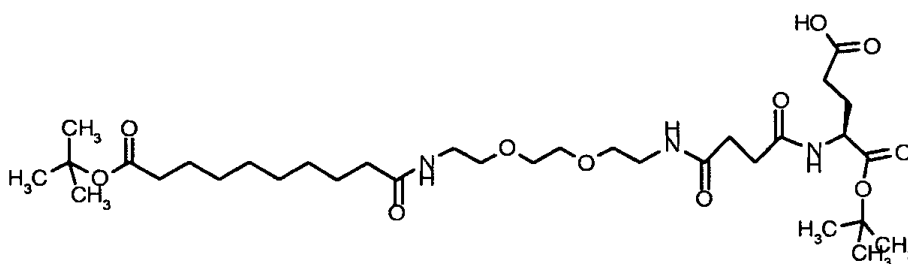
[0327] La preparación de éster tert-butilo éster 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il de ácido decanodioico (1,13 g, 3,45 mmol) y ácido N-{ 2-[2-(2-tert-butoxicarbonilamino-etoxi)-etoxi]-etil}-succinámico (1 g, 2,84 mmol) como se describe en el paso 3 del ejemplo 8 dio 1,68 g de producto bruto que se utilizó sin purificación adicional. LCMS (método 6): Rt 3,86 min; m/z (M+1) 489 calculado: 489.

10

Éster de 1-tert-butilo del ácido (S)-2-[3-(2-[2-[2-(9-tert-Butoxicarbonilnonanoilamino)etoxi]etoxi]-etilcarbamoil)propionilamino]pentanedioico

15

[0328]



[0329] La preparación del éster tert-butilo del ácido 9-(2-[2-[2-(3-carboxipropionilamino)etoxi]etoxi]-etilcarbamoil)nonanoico (1,4 g, 2,86 mmol) y glu-OtBu (0,87g, 4,29 mmol) siguiendo el método descrito en el paso 4 del ejemplo 8 dio 1,8 g de producto crudo. LCMS (método 6): Rt 5,1 min; m/z (M+1) 674; calculado: 674

20

[0330] Purificación de Gilson utilizando HPLC ácida en una columna C18 (Jones, Kromasil RP18 5µm 15x225 mm), gradiente: 0,0-10,0 min: 35% CH<sub>3</sub>CN, 10,00 - 25,0 min:35 - 90% CH<sub>3</sub>CN, flujo: 10 ml/min. Las fracciones a temperatura ambiente = 20,0-25,0 min se recogieron y evaporaron a sequedad dando 0,590 g de un aceite amarillo. LCMS (método 6): Rt 5,1 min; m/z (M+1) 674 calculado: 674.

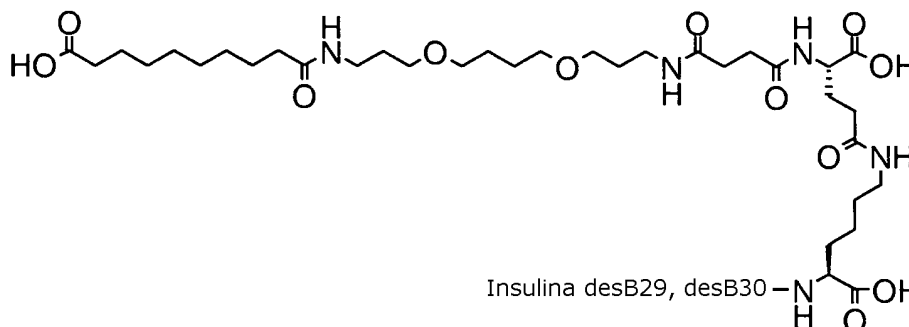
25

### Ejemplo 11.

Síntesis de N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-(3-(3-{4-[3-(9-carboxinonoilamino)propoxi]butoxi}-propilcarbamoil)propionil-γ-glutamil) insulina humana desB30.

30

[0331]



[0332] El éster 5-tert-butilo éster 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) del ácido (S)-2-[3-(3-{4-[3-(9-tert-butoxicarbonilnonanoilamino)propoxi]butoxi}-propilcarbamoil)propionilamino]pentanedioico (0,06 g, 0,073 mmol) y la insulina desB30 (0,065 mmol) se reaccionaron como se describe en el ejemplo 8. El producto tratado con TFA se purificó sobre Gilson utilizando HPLC ácida en una columna C18 (Jones, Kromasil RP18 5µm 15x225 mm).

35



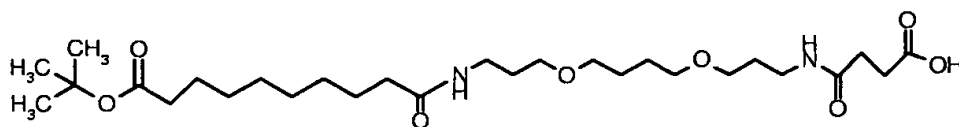
[0333] Gradiente: 0,0-5,0 min 30% A; 5,0 – 20,0 min 35-50% A. Las fracciones a temperatura ambiente 16,0 min – 17,5 min se recogieron y evaporaron y posteriormente se liofilizaron. Rendimiento 34 mg.

[0334] MALDI.TOF-MS: m/z 6305,69 calculado 6299.

[0335] HPLC método 5; Rt 8,850 min.

Éster de tert-butilo del ácido 9-(3-{4-[3-(3-carboxipropionilamino)propoxi]butoxi}propilcarbamoil)nonanoico

[0336]



[0337] Preparación de éster tert-butilo éster 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il del ácido decanodioico (0,88 g,

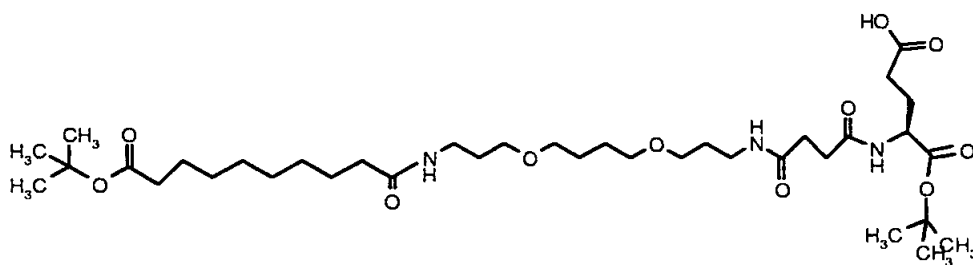
[0338] 2,47 mmol) y ácido N-{3-[4-(3-tert-butoxicarbonilaminopropoxi)-butoxi]-propil}succinámico

[0339] (1 g, 2,47 mmol) como se describe en el ejemplo 8 proporcionó 150 mg de compuesto después de la purificación.

[0340] LCMS (método 6): Rt 4,31 min; m/z (M+1) 545; calculado: 545

Éster tert-butilo del ácido (S)-2-[3-(3-{4-[3-(9-tert-butoxicarbonilnonanoilamino)propoxi]butoxi}propilcarbamoil)propionilamino]pentanedioico

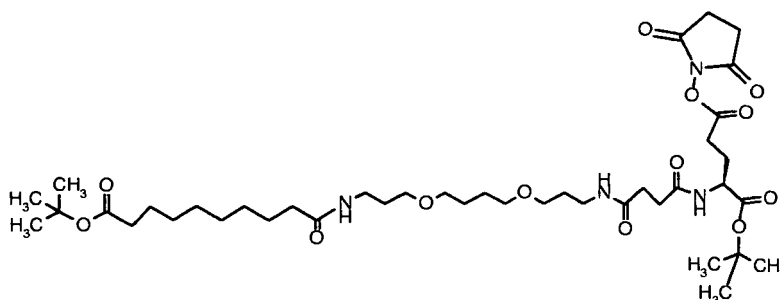
[0341]



25 Éster tert-butilo del ácido 9-(3-{4-[3-(3-carboxipropionilamino)propoxi]butoxi}propilcarbamoil)nonanoico (0,15 g, 0,276 mmol) se activo con TSTU, el derivado de OSu resultante se reaccionó con H-Glu-OtBu (0,076g, 0,37 mmol) como se describió anteriormente. Después del análisis, el aceite resultante se purificó sobre Gilson utilizando HPLC ácida en una columna C18 (Jones, Kromasil RP18 5µm 15x225 mm).

30 [0342] Gradiente: 0,0-5,0 min 20% A; 5,0 – 20,0 min 20 - 90% A. Las fracciones a temperatura ambiente 24,5 min – 25,5 min se recogieron y evaporaron y posteriormente se liofilizaron. Rendimiento 50 mg. LCMS Método 6: Rt 5,43 min; m/z (M+1) 730; calculado: 730

35 [0343] Este compuesto se activó con TSTU dando como resultado 60 mg de éster 5-tert-butil éster del ácido 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) crudo



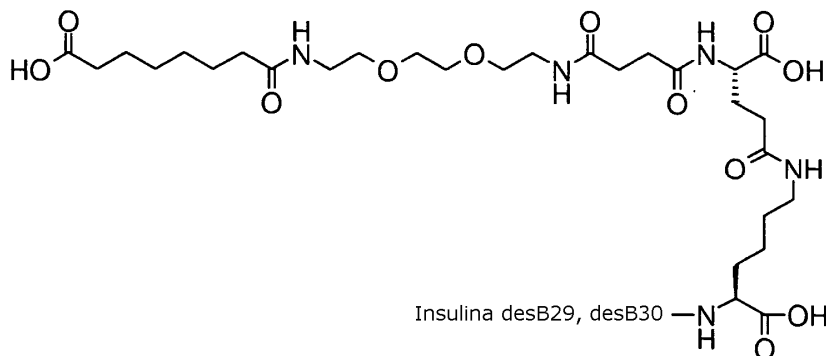
[0344] LCMS Método 6: Rt 5,79 min; m/z (M+Na) 850; calculado: 850.

[0345] El producto crudo se utilizó sin purificación adicional.

5 **Ejemplo 12**

Síntesis de N<sup>B29</sup>-(2-[3-(2-(2-[2-(7-carboxiheptanoilamino)etoxi]etoxi)-etilcarbamoil]propionil-γ-glutamil) insulina humana desB30

10 [0346]



15 El éster 5-tert-butilo éster 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) del ácido (S)-2-[3-(2-[2-[2-(7-tert-butoxicarbonilheptanoilamino)etoxi]etoxi]etilcarbamoil]-propionilamino]pentanedioico (0,126 g, 0,17 mmol) reaccionó con insulina desB30 (0,153 mmol) como se describió anteriormente. El producto crudo después del tratamiento con TFA tratamiento (0,750 mg) se purificó dos veces sobre Gilson utilizando HPLC ácida en una columna C18 (Jones, Kromasil RP18 5µm 15x225 mm).

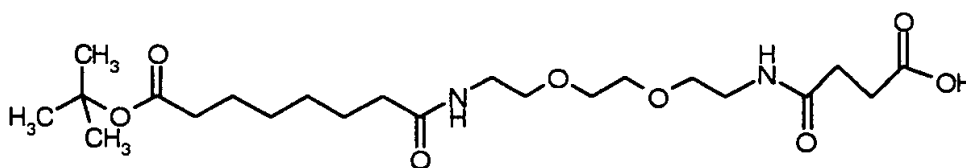
[0347] Gradiente: 0.0-5,0 min 25% A; 5,0 – 20,0 min 20-50%. Las fracciones a temperatura ambiente 21,0 - 22,0 min fueron recogidas y evaporadas dando como resultado 13 mg de compuesto.

20 [0348] MALDI.TOF-MS (matriz SA): m/z 6221,15 calculado 6215.

[0349] LCMS (método 6): Rt 3,53 min; m/z (M+4/4) 1556 Calculado: 1554

Éster tert-butilo del ácido 7-(2-[2-[2-(3-Carboxi-propionilamino)-etoxi]-etoxi]-etilcarbamoil)-heptanoico

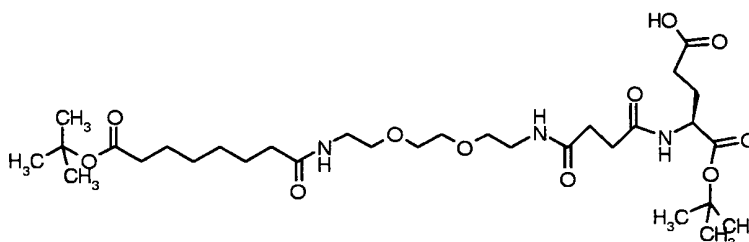
25 [0350]



30 [0351] El ácido tert-butilo éster 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il del ácido octanedioico (1,13g, 3,45 mmol) y ácido N-{2-[2-(2-tert-butoxicarbonilamino-etoxi)-etoxi]-etil}-succinámico (1 g, 2,874 mmol) se reaccionaron como se describió anteriormente. Se aislaron 1,75 g del producto crudo y se utilizaron sin purificación adicional. LCMS (método 6): Rt 3,86 min; m/z (M+1) 461 calculado: 461.

Éster 1-tert-butilo del ácido (S)-2-[3-(2-[2-[2-(7-tert-Butoxicarbonilheptanoilamino)etoxi]etoxi]-etilcarbamoil]propionilamino]pentanedioico

35 [0352]



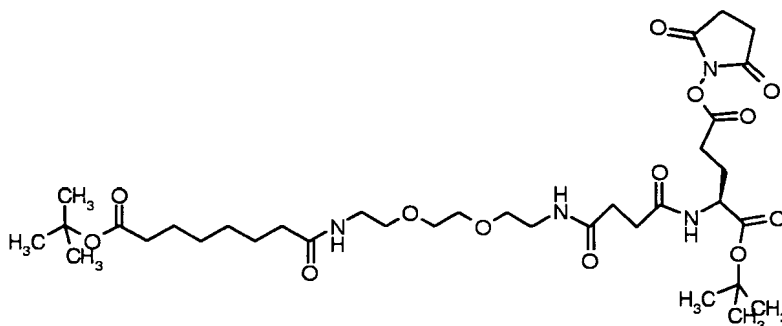
[0353] El éster tert-butilo del ácido 7-(2-{2-[2-(3-carboxi-propionilamino)-etoxi]-etoxi}-etilcarbamoil)-heptanoico (1,3 g, 2,83 mmol) se activó con TSTU y posteriormente el producto crudo se reaccionó con H-glu-OtBu (0,86 g, 4,2 mmol). Después del análisis, usando el método descrito en el ejemplo 8, el producto se purificó adicionalmente sobre Gilson utilizando HPLC ácida en una columna C18 (Jones, Kromasil RP18 5µm 15x225 mm).

5

[0354] Gradiente: 0,0-10,0 min 30% A; 10,0 - 25,0 min 30-90% A, las fracciones a temperatura ambiente 20-25 min fueron recogidas y evaporadas dando como resultado 600 mg de producto que se utilizaron para la activación con TSTU descrita más abajo. LCMS (método 6): Rt 4,51 min; m/z (M+1) 646; calculado: 646

10 Éster 5-tert-butilo éster 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) del ácido (S)-2-[3-(2-{2-[2-(7-tert-butoxicarbonilheptanoilamino)etoxi]etoxi}-etilcarbamoil)propionilamino]pentanedioico

[0355]



15

[0356] El éster 1-tert-butilo del ácido (S)-2-[3-(2-{2-[2-(7-tert-butoxicarbonilheptanoilamino)etoxi]etoxi}-etilcarbamoil)propionilamino]pentanedioico (0,6g, 0,93 mmol) se activó con TSTU usando el procedimiento anteriormente descrito.

[0357] Esto dio como resultado 0,75 g de compuesto crudo que fue usado sin purificación adicional.

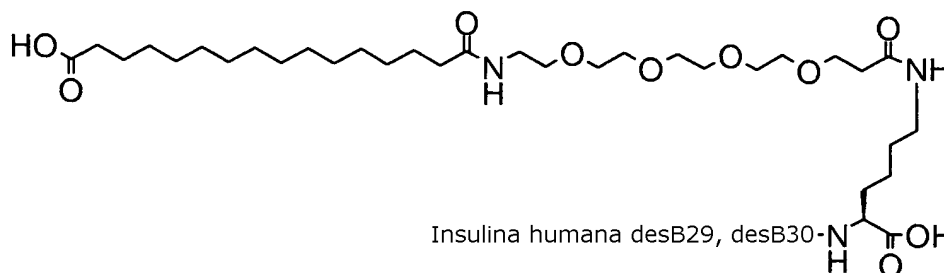
20

[0358] LCMS (método 6): Rt 4,81 min; m/z (M+1) 743; calculado: 743

### Ejemplo 13

25 Síntesis de N<sup>B29</sup>-(3-[2-(2-{2-[2-(15-carboxipentadecanoilamino)etoxi]etoxi]etoxi)-etoxi]propionil)) insulina humana desB30

[0359]



30 [0360] Este compuesto se preparó de forma similar a la descrita en el ejemplo 4. El éster de tert-butilo intermedio del ácido 15-[2-(2-{2-[2-(2-carboxietoxi)etoxi]etoxi]etilcarbamoil)pentadecanoico se activó al OSu-éster usando TSTU y se acopló a insulina humana desB30. La desprotección usando TFA proporcionó el compuesto del título.

[0361] MALDI-TOF MS: m/z = 6222. Calculado: 6222

35

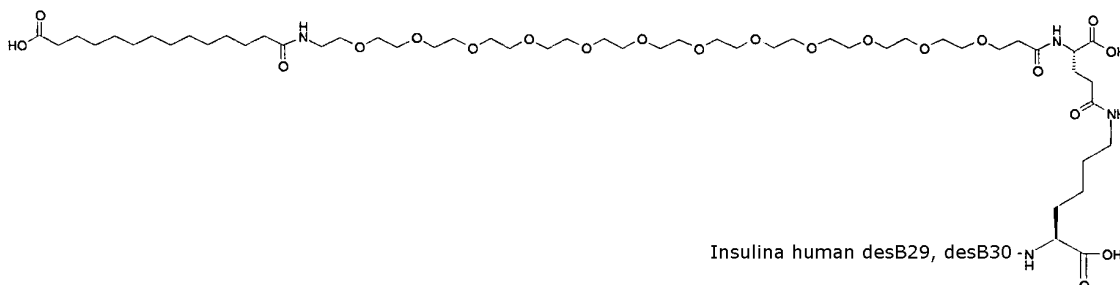
[0362] HPLC (método 1): R<sub>t</sub> = 11,12 min.

[0363] HPLC (método 5): R<sub>t</sub> = 12,03 min.

### 40 Ejemplo 14

Síntesis de N<sup>εB29</sup>-(3-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(13-carboxi-tridecanoilamino)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi)-propionil-γ-glutamil) insulina humana desB30

5 [0364]



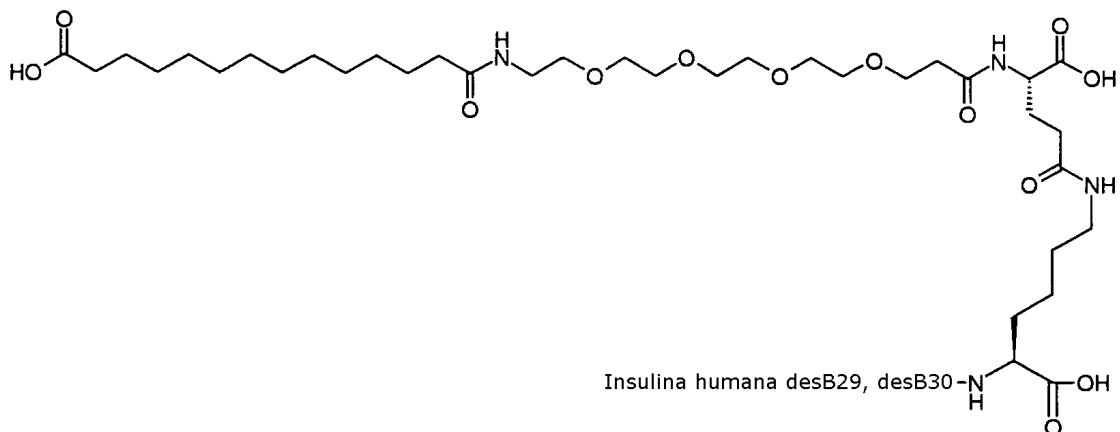
10 [0365] Este compuesto se preparó en la analogía con el ejemplo 1 mediante reacción de H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>12</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH (Quanta Biodesign, OH, EE. UU.) con O-succinimidil tetradecandioato tert-butilo seguido por activación con TSTU, reacción con L-Glu-OtBu, activación con TSTU, acoplamiento con insulina humana DesB30 y desprotección por TFA.

15 [0366] LCMS 6676,0, método 6, calculado 6675,8.

**Ejemplo 15**

20 Síntesis de N<sup>εB29</sup>-(3-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(13-carboxi-tridecanoilamino)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi)-propionil-γ-glutamil) insulina humana desB30

[0367]



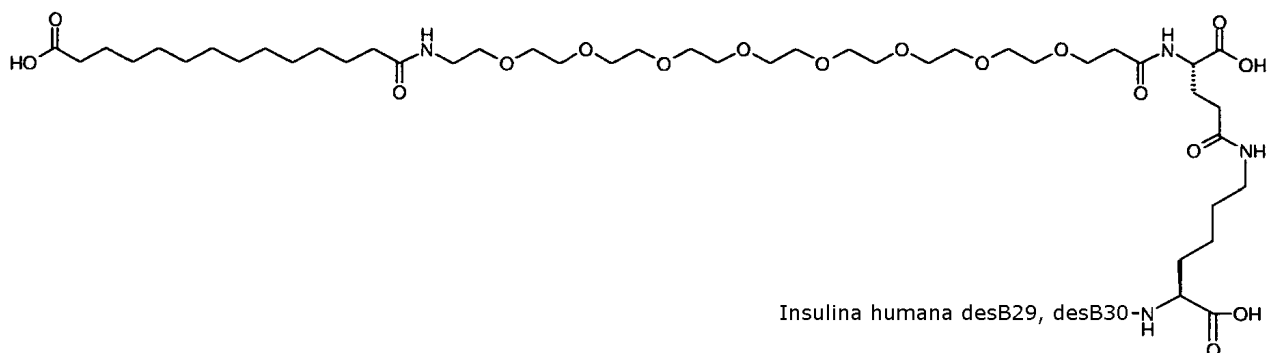
25 [0368] Este compuesto se preparó en la analogía con el ejemplo 1 mediante reacción de H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH (Quanta Biodesign, OH, EE. UU.) con O-succinimidil tetradecandioato tert-butilo seguido por activación con TSTU, reacción con L-Glu-OtBu, activación con TSTU, acoplamiento con insulina humana DesB30 y desprotección por TFA.

30 [0369] LCMS 6323,2, (método 6) calculado 6323,3.

**Ejemplo 16**

35 Síntesis de N<sup>εB29</sup>-(3-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(13-carboxi-tridecanoilamino)-etoxi]-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi)-propionil-γ-glutamil) insulina humana desB30

[0370]



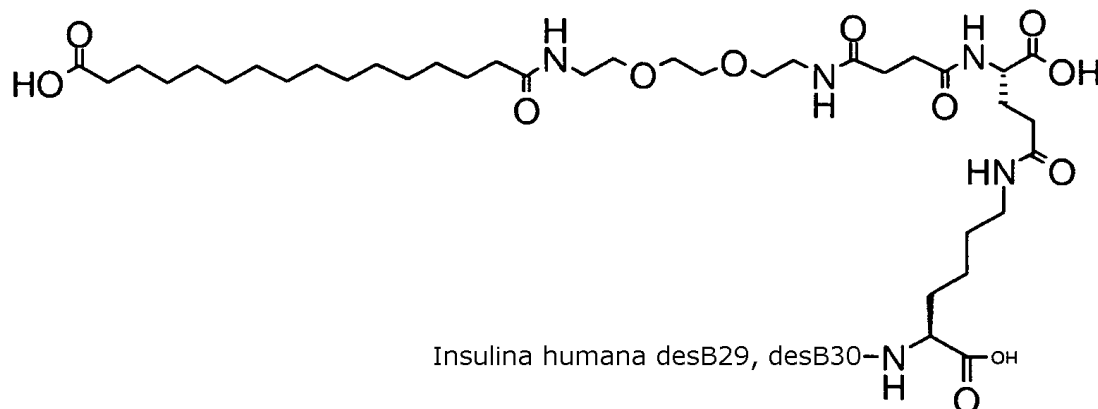
[0371] Este compuesto se preparó en la analogía con el ejemplo 1 mediante reacción de  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_8\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$  (Quanta Biodesign, OH, EE. UU.) con O-succinimidil tetradecanoato tert-butilo seguido por activación con TSTU, reacción con L-Glu-OtBu, activación con TSTU, acoplamiento con insulina humana Des(B30) y desprotección por TFA.

[0372] LCMS 6498,8, método 6, calculado 6499,6.

10 **Ejemplo 17**

Síntesis de  $N^{\text{B}29}$ -(3-(2-{2-[2-(15-carboxi-pentadecanoilamino)-etoxi]-etoxi}-etilcarbamoil)-propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30

15 [0373]



[0374] MALDI-TOF MS (matriz: SA):  $m/z = 6336$ . Calculado: 6334

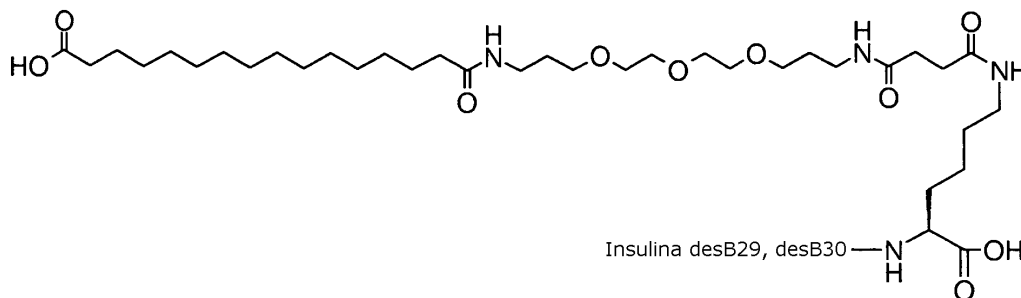
[0375] HPLC (método 1):  $R_t = 11,71$  min.

[0376] HPLC (método 5):  $R_t = 9,37$  min.

20 **Ejemplo 18**

25 Síntesis de  $N^{\text{B}29}$ -(3-(3-{2-[2-(3-[15-carboxipentadecanoilamino]propoxi)etoxi]-etoxi}propilcarbamoil)propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30

[0377]



5 El éster tert-butilo del ácido 15-{3-[2-(2-{3-[3-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxicarbonil)propionilamino]propoxi]etoxi]etoxi]-propilcarbamoil}pentadecanoico (producto crudo 0,196 g, 0,264 mmol) se reaccionó con insulina humana desB30 (0,132 mmol) como se describió anteriormente dando como resultado 400 mg de precipitado que se purificó con Gilson, gradiente: 0,0-5,0 min 40% A; 5,0 -15,0 min 40-80% A, las fracciones a Rt 15,5-16,0 min fueron recogidas y evaporadas hasta secarse.

10 [0378] La masa resultante fue posteriormente tratada con TFA/DCM 1/1 (100 ml) para desproteger los grupos carboxi. Después de la evaporación, el producto resultante se purificó 3 veces en la HPLC sobre Gilson usando la HPLC ácida en una columna C18 (Jones, Kromasil RP18 5µm 15x225 mm).

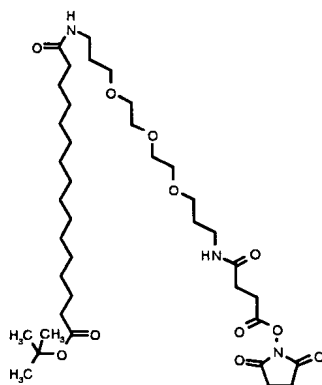
[0379] Gradiente: 0,0-5,0 min 35% A; 5,0 – 20,0 min 20-90%. Las fracciones de Rt 15,0 - 16,0 min fueron recogidas y evaporadas dando como resultado 23 mg de compuesto.

15 [0380] MALDI-TOF-MS: m/z 6277,15 calculado 6270.

[0381] HPLC (método 5): Rt 9,50 min.

20 Éster tert-butilo del ácido ω-{3-[2-(2-{3-[3-(2,5-Dioxopirrolidin-1-iloxicarbonil)propionilamino]propoxi]etoxi]etoxi]-propilcarbamoil}pentadecanoico

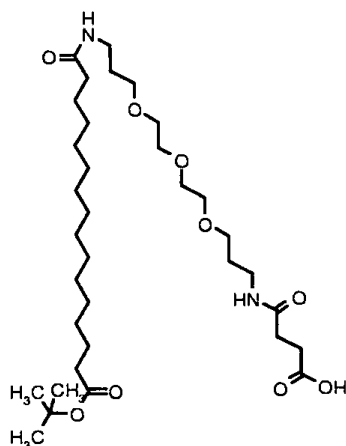
[0382]



25 [0383] La preparación del éster tert-butilo del ácido ω-[3-(2-[2-[3-(3-carboxipropionilamino)propoxi]etoxi]etoxi)-propilcarbamoil]-pentadecanoico (0,17g, 0,264 mmol) y TSTU dio 196 mg de producto crudo que se utilizó sin purificación adicional. LCMS método 6 : Rt 7,36 min; m/z (M+1) 742; calculado: 742

30 Éster tert-butilo del ácido ω-[3-(2-[2-[3-(3-carboxipropionilamino)propoxi]etoxi]etoxi)-propilcarbamoil]-pentadecanoico

[0384]



[0385] El éster tert-butilo éster 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il del ácido hexadecanodioico (0,5g, 1,13 mmol) y ácido N-(3-{2-[2-(3-aminopropoxi)etoxi]etoxi}propil)succinámico (0,36g, 1,13 mmol) se reaccionaron como se describió anteriormente.

5 [0386] Purificación del producto crudo sobre Gilson en la HPLC ácida usando una columna C18 (Jones, Kromasil RP18 5 $\mu$ m 15x225 mm). Gradiente: 0,0-1,0 min 50% A; 1,0 - 30,0 min 50-90%. Las fracciones con temperatura ambiente 24,0 - 26,0 min recogidas y evaporadas dieron como resultado 170 mg del producto objetivo.

[0387] LCMS (método 6): Rt 7,06 min; m/z (M+1) 645; calculado: 645

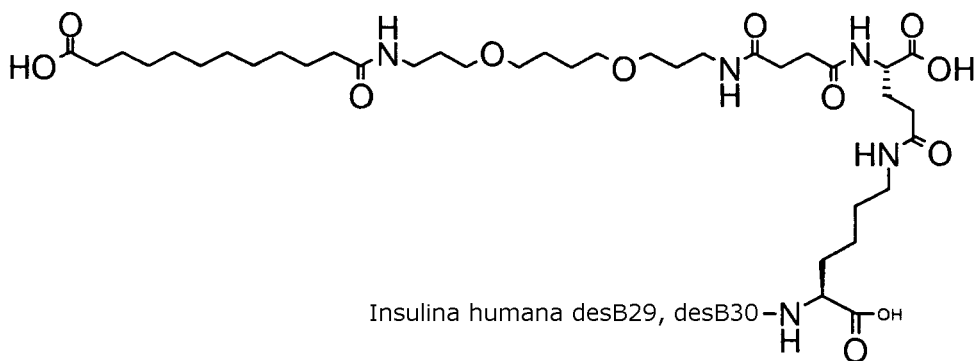
10

### Ejemplo 19

Síntesis de  $N^{\text{B}29}$ -(3-(3-{4-[3-( $\omega$ -carboxiundecanoilamino)propoxi]butoxi}propil)carbamoil)-propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30

15

[0388]



Insulina humana desB29, desB30

20 [0389] Este compuesto se preparó de forma similar a la descrita en el ejemplo 8 usando éster tert-butilo del ácido dodecanoico.

[0390] Datos para el compuesto del título:

[0391] MALDI-TOF-MS: m/z = 6332. Calculado: 6334

25

[0392] HPLC (método 1):  $R_t$  = 9,57 min.

[0393] HPLC (método 5):  $R_t$  = 7,50 min.

30

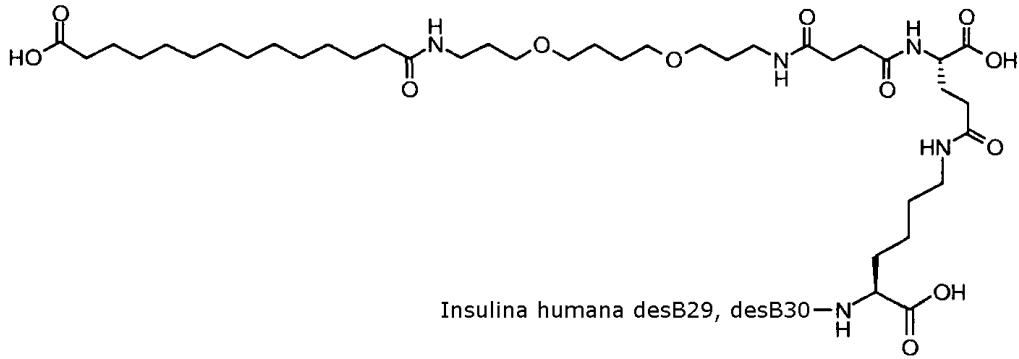
[0394] HPLC (método 6):  $R_t$  = 4,11 min; m/z: 1584 (M+4)/4. calculado: 1584.

### Ejemplo 20

$N^{\text{B}29}$ -(3-(3-{4-[3-( $\omega$ -carboxitridecanoilamino)propoxi]butoxi}propil)carbamoil)-propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30:

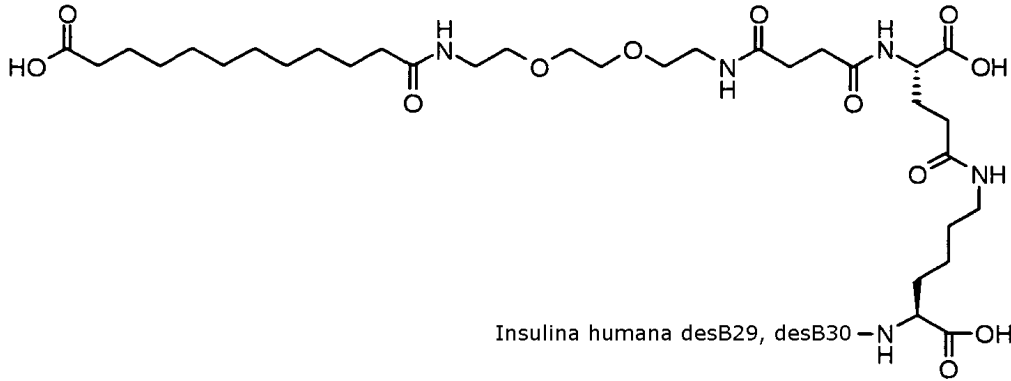
35

[0395]



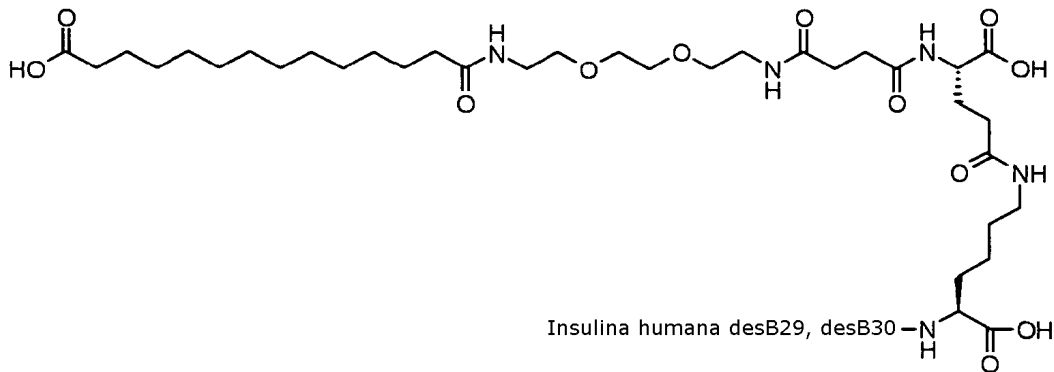
**Ejemplo 21**

5  $N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-[2-(2-(11-carboxiundecanoilamino)etoxi]etoxi]etilcarbamoil)propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30  
[0396]



10 **Ejemplo 22**

$N^{\epsilon B29}$ -(3-(2-[2-(2-( $\omega$ -carboxitridecanoilamino)etoxi]etoxi]etilcarbamoil)propionil- $\gamma$ -glutamil) insulina humana desB30:  
[0397]

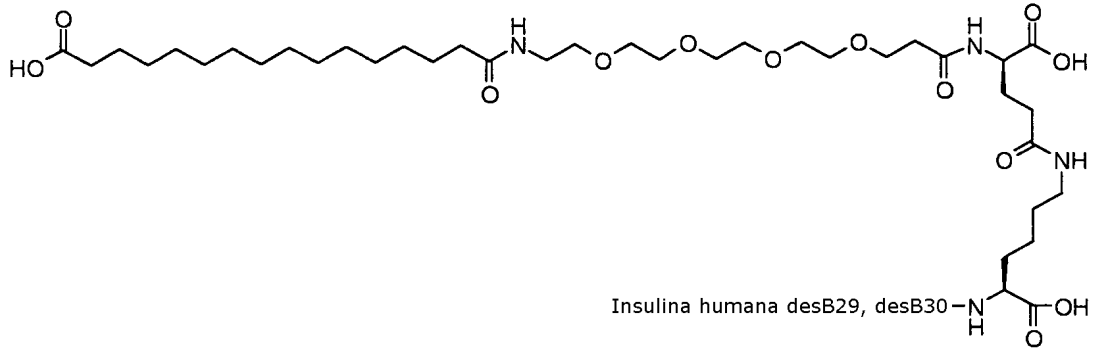


15

**Ejemplo 23**

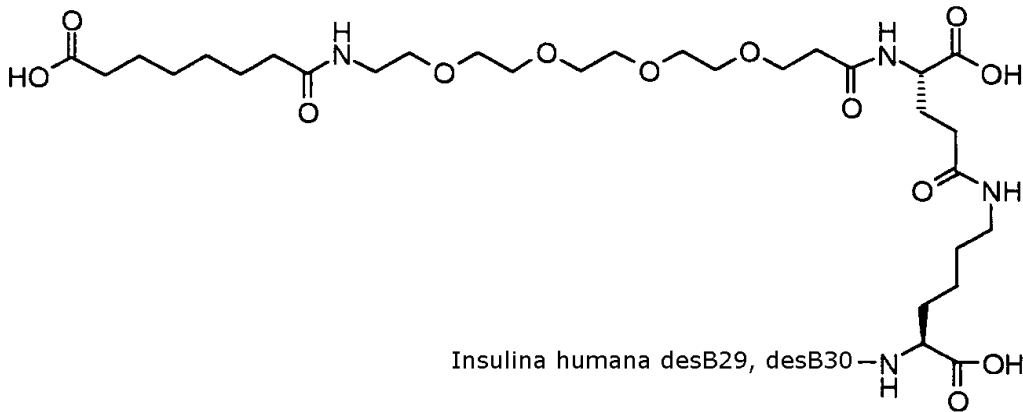
20  $N^{\epsilon B29}$ -(3-[2-(2-[2-(2-( $\omega$ -carboxipentadecanoilamino)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propionil- $\gamma$ -D-glutamil) insulina humana desB30:  
[0398]





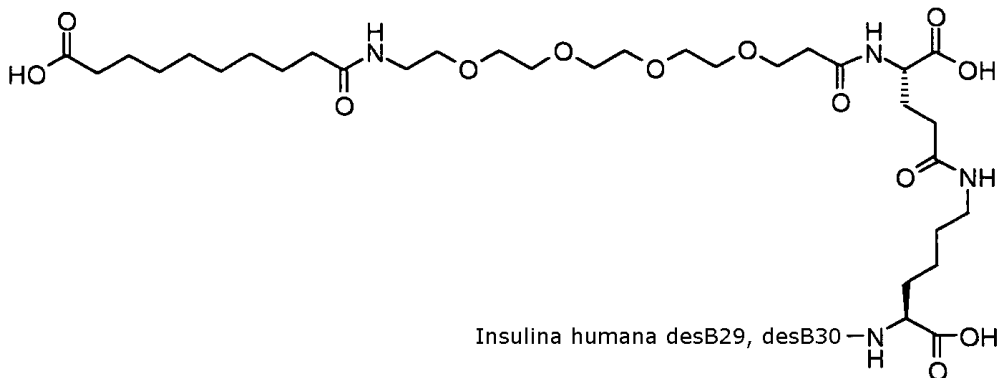
**Ejemplo 24**

5  $N^{\epsilon B29}$ -{3-[2-(2-[2-(2-(7-carboxiheptanoilamino)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propionil- $\gamma$ -glutamil} insulina humana desB30  
 [0399]



10 **Ejemplo 25**

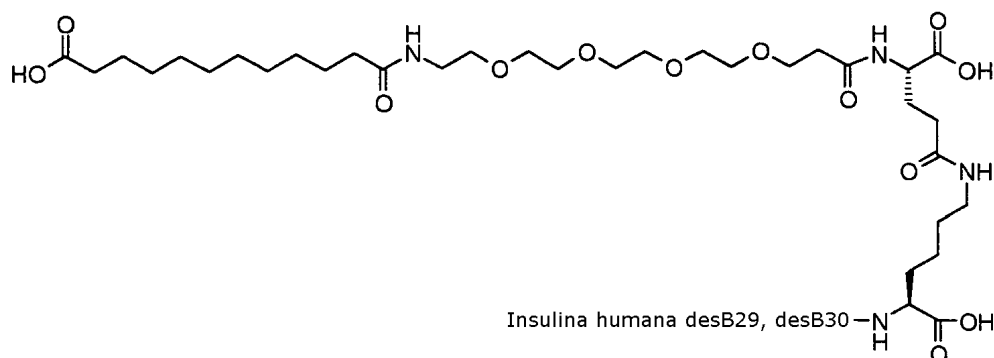
$N^{\epsilon B29}$ -{3-[2-(2-[2-(2-(9-carboxinonanoilamino)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propionil- $\gamma$ -glutamil} insulina humana desB30  
 [0400]



15

**Ejemplo 26**

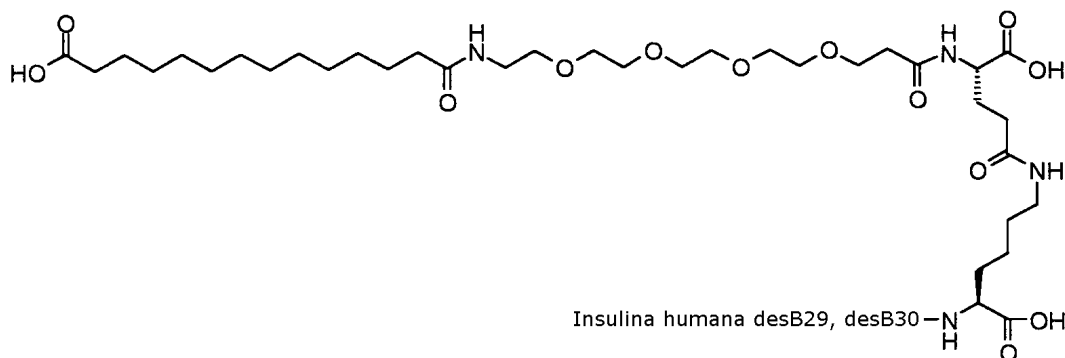
20  $N^{\epsilon B29}$ -{3-[2-(2-[2-(2-(11-carboxiundecanoilamino)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propionil- $\gamma$ -glutamil} insulina humana desB30  
 [0401]



**Ejemplo 27**

5 N<sup>ε</sup>B29-{3-[2-(2-[2-(2-(13-carboxitridecanoilamino)etoxi)etoxi)etoxi)etoxi]propionil-y-glutamil}insulina humana desB30

[0402]



10 **Ejemplo 28**

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

15 [0403] La afinidad de los derivados de insulina de la invención para el receptor de insulina humano se determinó por un ensayo SPA (ensayo de proximidad de centelleo) ensayo de captura de anticuerpos en placa de microtitulación. Las perlas de enlace de anticuerpos SPA-PVT, reactivo anti-ratón (Amersham Biosciences, No. de catálogo PRNQ0017) se mezclaron con 25 ml de tampón de enlace (HEPES 100 mM pH 7,8; cloruro de sodio 100 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, Tween-20 al 0,025%). La mezcla de reactivos para una placa individual Packard Optiplat (Packard No. 6005190) está compuesta de 2,4 µl de un receptor de insulina humana recombinante purificado diluido 1:5000 - exon 11, una cantidad de una solución madre de insulina humana A14 Tyr<sup>[125]I</sup>] que corresponde a 5000 cpm por 100 µl de mezcla de reactivos, 12 µl de una dilución 1:1000 del anticuerpo F12, 3 ml de perlas de SPA y tampón de enlace para un total de 12 ml. Entonces se agrega un total de 100 µl y se hace una serie de diluciones de muestras apropiadas. A la serie de diluciones entonces se agregó 100 µl de mezcla de reactivos y las muestras se incubaron durante 16 horas mientras se agitaban suavemente. Las fases entonces se separaron por medio de centrifugación durante 1 minuto y las placas se contaron en un dispositivo Topcounter. Los datos de enlace se ajustaron utilizando el algoritmo de regresión no lineal en el programa GraphPad Prism 2,01 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Ensayo de afinidad de albúmina de suero humano

30 [0404] La constante de enlace relativa del análogo de 125I-TyrA14 a la albúmina de suero humano inmovilizada en partículas Minileak y medida a 23 °C (detemir = 1 en tampón de solución salina)

Compuesto	Afinidad del receptor de insulina con relación a la insulina humana	Afinidad de albúmina con relación a insulina Determir
Ejemplo 1	11	2,381
Ejemplo 2	12	10,649
Ejemplo 3	14	4,273
Ejemplo 4	9,2	1,201
Ejemplo 5	5,6	0,48
Ejemplo 6	8,3	3,59

Ejemplo 7	35	
Ejemplo 8	34	
Ejemplo 9	34	
Ejemplo 10	27	
Ejemplo 11	16	
Ejemplo 12	38	
Ejemplo 13	17	
Ejemplo 14	15	
Ejemplo 15	35	
Ejemplo 16	31	
Ejemplo 17	17	

**Ejemplo 29**

**Suministro pulmonar de derivados de insulina a ratas**

5

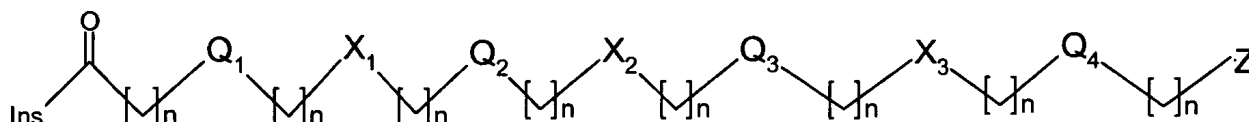
[0405] La sustancia de prueba será dosificada en los pulmones por el método de instilación por goteo. En resumen, las ratas Wistar macho (aprox. 250 g) se anestesian con aprox. 60 ml de fentanil/deshidrodenezperidol/dormicum como dosis preparatoria sc de 6.6 ml/kg y seguido de 3 dosis de mantenimiento sc de 3,3 ml/kg con un intervalo de 30 min. Diez minutos después de la inducción de anestesia, se obtienen muestras basales de la vena caudal (t = -20 min) seguido de una muestra basal inmediatamente antes de la dosificación de la 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 que contiene 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 cánula es extraída lentamente. Las ratas son mantenidas anestesiadas durante la prueba (muestras de sangre hasta 4 h) y son eutanizadas después del experimento.

10

15

REIVINDICACIONES

1. Derivados de insulina que tienen una cadena lateral unida al grupo  $\alpha$ -amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B o a un grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la molécula de insulina progenitora mediante un enlace amida cuya cadena lateral comprende un grupo PEG monodisperso bifuncional que contiene independientemente en cada terminal un grupo seleccionado de  $-\text{NH}_2$  y  $-\text{COOH}$ ; una fracción de diácido graso con 4 a 22 átomos de carbono y al menos un grupo gamma-glutamil.
2. Derivados de insulina según la reivindicación 1, donde el grupo PEG bifuncional tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 20, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 o de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 unidades de etileno.
3. Derivados de insulina según la reivindicación 1, donde el diácido graso comprende de 6 a 22, de 8 a 20, de 8 a 18, de 4 a 18, de 6 a 18, de 8 a 16, de 8 a 22, de 8 a 17 o de 8 a 15 átomos de carbono en la cadena de carbono.
4. Derivados de insulina según la reivindicación 1, donde el residuo de Lys en la cadena B de la insulina progenitora está en la posición B3, B29 o en una de las posiciones B23-30.
5. Derivados de insulina según la reivindicación 1 con la fórmula

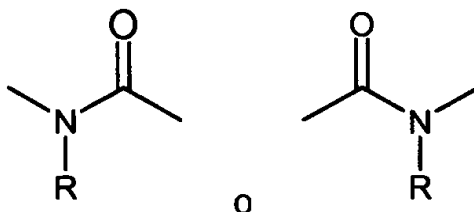


donde Ins es la fracción de insulina progenitora que mediante el grupo  $\alpha$ -amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B o un grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la fracción de insulina se una al grupo  $\text{CO}-$  en la cadena lateral mediante un enlace amida;  
 cada n es independientemente 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6;  
 $Q_1, Q_2, Q_3$  y  $Q_4$  pueden ser independientemente uno de otro

- $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_s-$  donde s es 1-20
- $-(\text{CH}_2)_r-$  donde r es un número entero de 4 a 22 o una cadena de hidrocarburo bivalente que comprende 1, 2 o 3 grupos  $-\text{CH}=\text{CH}-$  y varios grupos  $-\text{CH}_2-$  suficientes para dar un número total de átomos de carbono en la cadena en el rango de 4 a 22;
- $-(\text{CH}_2)_r-$  o  $-\text{CH}_2\text{OCH}_2)_t-$ , donde t es un número entero de 1 a 6;
- $-(\text{CR}_1\text{R}_2)_{q1}-$ , donde  $\text{R}_1$  y  $\text{R}_2$  independientemente uno del otro pueden ser H,  $-\text{COOH}$ , y  $\text{R}_1$  y  $\text{R}_2$  pueden ser diferentes en cada carbono, y q es 1-6,
- $-\text{((CR}_3\text{R}_4)_{q1})_1-\text{NHCO}-(\text{CR}_3\text{R}_4)_{q1}-\text{NHCO})_{1-2}-\text{((CR}_3\text{R}_4)_{q1})_1$  o  $-\text{((CR}_3\text{R}_4)_{q1})_1-\text{CONH}-(\text{CR}_3\text{R}_4)_{q1}-\text{CONH})_{1-2}-\text{((CR}_3\text{R}_4)_{q1})_1-$ , donde  $\text{R}_3$  y  $\text{R}_4$  independientemente uno del otro pueden ser H,  $-\text{COOH}$ , y  $\text{R}_3$  y  $\text{R}_4$  pueden ser diferentes en cada carbono, y  $q_1$  es 1-6-, o
- un enlace;

con la condición de que  $Q_1 - Q_4$  son diferentes;  
 $X_1, X_2$  y  $X_3$  son independientemente

- O;
- un enlace; o



donde R es hidrógeno o  $-(\text{CH}_2)_p-\text{COOH}$ ,  $-(\text{CH}_2)_p-\text{SO}_3 \text{H}$ ,  $-(\text{CH}_2)_p-\text{PO}_3 \text{H}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_p-\text{O}-\text{SO}_3 \text{H}$ ;  $-(\text{CH}_2)_p-\text{O}-\text{PO}_3 \text{H}_2$ ; o  $-(\text{CH}_2)_p$ -tetrazolilo, donde cada p independientemente de la otra p es un número entero en el rango de 1 a 6 y  
 Z es:  
 -  $\text{COOH}$ ;  
 -  $\text{CO-Asp}$ ;  
 -  $\text{CO-Glu}$ ;  
 -  $\text{CO-Gly}$ ;  
 -  $\text{CO-Sar}$ ;

- 5
- CH(COOH)<sub>2</sub>;
  - N(CH<sub>2</sub>COOH)<sub>2</sub>;
  - SO<sub>3</sub>H
  - OSO<sub>3</sub>H
  - OPO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>
  - PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> o
  - tetrazolilo
- 10
- donde la cadena lateral comprende
- un grupo PEG monodisperso bifuncional que contiene independientemente en cada terminal un grupo seleccionado de -NH<sub>2</sub> y -COOH;
  - una fracción de diácido graso con 4 a 22 átomos de carbono; y
  - al menos un grupo gamma-glutamil.
- 15
6. Derivados de insulina según la reivindicación 5, donde s es de 6 a 22, de 8 a 20, de 8 a 18, de 4 a 18, de 6 a 18, de 8 a 16, de 8 a 22, de 8 a 17 o de 8 a 15.
- 20
7. Derivado de insulina según la reivindicación 5, donde s es de 1-20, de 1-10 o de 1-5.
8. Derivado de insulina según la reivindicación 5, donde Z es -COOH.
- 25
9. Derivado de insulina según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la insulina progenitora es un análogo de insulina humana desB30.
- 30
10. Derivado de insulina según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la insulina progenitora es seleccionada del grupo que consiste en insulina humana; insulina humana desB1; insulina humana desB30 insulina; humana GlyA21; insulina humana GlyA21 desB30; insulina humana AspB28; insulina porcina; insulina humana LysB28 ProB29; insulina humana GlyA21 ArgB31 ArgB32 e insulina humana LisB3 GluB29 o insulina humana AspB28 desB30.
- 35
11. Derivado de insulina según la reivindicación 1 seleccionado del grupo que consiste en N<sup>εB29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CO)-γ-L-Glu-HN(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO) insulina humana desB30; N<sup>εB29</sup>-(N<sup>α</sup>-(HOOC(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CO)-γ-L-Glu-HN(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO) insulina humana des(B30); N<sup>εB29</sup>-{3-[2-(2-[2-(15-carboxi-pentadecanoilamino)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi]-propionil-gamma-Glu insulina humana desB30 y N<sup>εB29</sup>-3-[2-(2-[2-(17-carboxi-heptadecanoilamino)-etoxi]-etoxi)-etoxi]-etoxi]-propionil γ-Glu insulina desB30.
- 40
12. Composición farmacéutica para el tratamiento de la diabetes en un paciente que requiere tal tratamiento, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de insulina según la invención 1 junto con un portador farmacéuticamente aceptable.
- 45
13. Composición farmacéutica para el tratamiento de la diabetes en un paciente que requiere tal tratamiento, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de insulina según la invención 1 mezclada con una insulina o un análogo de insulina que tiene un inicio de acción rápido, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.
- 50
14. Composición farmacéutica según la reivindicación 12 o 13 para administración pulmonar.
15. Derivado de insulina según la reivindicación 1 para uso como un medicamento junto con un portador farmacéuticamente aceptable.
16. Derivado de insulina según la reivindicación 15 mezclado con una insulina o un análogo de insulina que tiene un inicio de acción rápido.