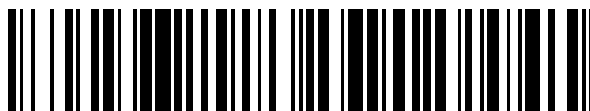


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 472 421**

51 Int. Cl.:

C07K 14/62 (2006.01)

A61K 38/28 (2006.01)

A61P 5/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2004** **E 10174494 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2014** **EP 2275439**

54 Título: **Nuevos derivados de insulina**

30 Prioridad:

05.08.2003 DK 200301129

14.08.2003 US 495451 P

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

01.07.2014

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)
Corporate Patents, Novo Allé
2880 Bagsvaerd , DK

72 Inventor/es:

JONASSEN, IB;
HOEG-JENSEN, THOMAS;
HAVELUND, SVEND;
RIBEL-MADSEN, ULLA;
TAGMOSE, TINA MØLLER y
MADSEN, PETER

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 472 421 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

Nuevos derivados de insulina

5 CAMPO DE LA INVENCION

[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 e hiperglucemia usando los derivados de insulina de la invención y al uso de tales derivados de insulina en el tratamiento de diabetes e hiperglucemia.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[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.

[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 protamina, insulina zinc o insulina zinc-protamina.

[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 límites más estrechos que para las soluciones de insulina para evitar la formación de grumos o la coagulación.

[0005] Mientras que en el pasado se creía que las protaminas no eran inmunogénicas, hoy en día se ha descubierto que las protaminas pueden ser inmunogénicas en el ser humano y que su uso con fines médicos puede llevar a la formación de anticuerpos. También hay evidencias de que el complejo protamina-insulina es en sí mismo inmunogénico. Por lo tanto, con algunos pacientes se debe evitar el uso de composiciones de insulina de acción prolongada que contienen protaminas.

[0006] 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.

[0007] WO 91/12817 (Novo Nordisk A/S) divulga composiciones de insulina soluble que comprenden complejos de insulina de cobalto (III). El perfil de acción de estos complejos se prolonga sólo moderadamente y la biodisponibilidad se reduce con respecto a la insulina humana.

[0008] La insulina humana tiene tres grupos amino primarios: el grupo N-terminal de la cadena A y de la cadena B y el grupo ϵ -amino de Lys^{B29}. Varios derivados de insulinas que se sustituyen en uno o más de estos grupos se conocen por la técnica anterior. De este modo, la patente US n°: 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.

[0009] Según la patente GB n°: 1.492.997 (Nat. Res. Dev. Corp.), se ha descubierto que la insulina con una sustitución de carbamilo en N^{εB29} tiene un perfil mejorado de efecto hipoglucémico.

[0010] La solicitud de patente pública JP n°: 1-254699 (Kodama Co., Ltd.) divulga una insulina donde un ácido graso está ligado al grupo amino de Phe^{B1} o al grupo ϵ -amino de Lys^{B29} o a ambos. El objetivo declarado de la derivación es obtener una preparación de insulina estable farmacológicamente aceptable.

[0011] Las insulinas que en su 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 pública JP n°: 57-067548 (Shionogi). Se reivindica que los análogos de insulina son útiles en el tratamiento de la diabetes mellitus, particularmente en pacientes que son insulino-resistentes debido a la generación de anticuerpos de insulina bovina o porcina.

[0012] WO 95/07931 (Novo Nordisk A/S) divulga derivados de insulina humana en los que el grupo ϵ -amino de Lys^{B29} tiene un sustituyente lipofílico. Estos derivados de insulina tienen un perfil de acción prolongada y son solubles en valores de pH fisiológico.

5 [0013] EP 894095 divulga derivados de insulina en los que el grupo N-terminal de la cadena B y/o el grupo ϵ -amino de Lys en la posición B28, B29 o B30 tiene un sustituyente de la fórmula $-\text{CO}-\text{W}-\text{COOH}$, 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.

10 [0014] WO 99/21888 divulga agregados hidrosolubles de derivados de insulina humana que tienen un perfil de acción prolongado.

[0015] No obstante, sigue existiendo la necesidad de insulinas con un perfil de acción más prolongado 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.

RESUMEN DE LA INVENCION

20 [0016] La presente invención se basa en el reconocimiento de que la hidrofobicidad global de una molécula de derivado de insulina tiene una función importante para la potencia *in vivo* del derivado.

[0017] En un aspecto, la presente invención se refiere a un derivado de insulina de des(B30) insulina humana que tiene una cadena lateral unida al grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la des(B30) insulina humana, la cadena lateral siendo la fórmula general:

25
$$-\text{W}-\text{X}-\text{Y}-\text{Z}$$

donde W es:

30

- un residuo de α -aminoácido con un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral, este aminoácido está seleccionado del grupo que consiste en α -Asp, β -Asp, α -Glu, γ -Glu, α -hGlu y δ -hGlu y este residuo forma, con uno de sus grupos de ácido carboxílico, un grupo de amida con el grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la des(B30) insulina humana;

35 X es:

- $-\text{CO}-$;

Y es:

40

- $-(\text{CH}_2)_m$ donde m es un número entero en el intervalo de 12 a 16;

y

Z es:

45

- $-\text{COOH}$;

y cualquier complejo Zn^{2+} de los mismos.

50 [0018] En una forma de realización, la cadena lateral $-\text{W}-\text{X}-\text{Y}-\text{Z}$ se une al grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la posición 28 de la cadena B. En otro aspecto más específico de esta forma de realización, la cadena lateral $-\text{W}-\text{X}-\text{Y}-\text{Z}$ se une al grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la posición 29 de la cadena B. En otro aspecto más específico de esta forma de realización, la cadena lateral $-\text{W}-\text{X}-\text{Y}-\text{Z}$ se une al grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la posición 30 de la cadena B.

55 [0019] En una forma de realización W se puede conectar al grupo ϵ -amino del residuo de Lys presente en la cadena B a través de un derivado de urea.

60 [0020] La subestructura X de la cadena lateral $-\text{W}-\text{X}-\text{Y}-\text{Z}$ puede ser un grupo de la fórmula $-\text{CO}-$ que, por medio de un enlace a partir del carbono de carbonilo subrayado, forma un enlace amida con un grupo amino en W.

[0021] En otra forma de realización, la subestructura X de la cadena lateral puede ser un grupo que consiste en α -Asp, β -Asp, α -Glu, and γ -Glu; X es $-\text{CO}-$; Y es $-(\text{CH}_2)_m-$, donde m es un número entero en el intervalo de 12 a 16 y Z es $-\text{COOH}$.

65

[0022] La fracción de insulina, también denominada insulina progenitora en el presente texto, de un derivado de insulina según la invención es un análogo de insulina.

[0023] El análogo de insulina progenitor es des(B30) insulina humana.

[024] Ejemplos de derivados de insulina según la invención son los siguientes compuestos:

$N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-\gamma-Glu)$ des(B30) insulina humana;
 $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{15}CO)-\gamma-Glu)$ des(B30) insulina humana;
 $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{16}CO)-\gamma-Glu)$ des(B30) insulina humana;
 $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{13}CO)-\gamma-Glu)$ des(B30) insulina humana;
 $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{13}CO)-\beta-Glu)$ des(B30) insulina humana;
 $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{13}CO)-\alpha-Glu)$ des(B30) insulina humana;
 $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{16}CO)-\gamma-D-Glu)$ des(B30) insulina humana;
 $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-\beta-D-Asp)$ des(B30) insulina humana;
 $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{16}CO)-\beta-D-Asp)$ des(B30) insulina humana;

[0025] 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^{2+} , tres iones de Zn^{2+} o cuatro iones de Zn^{2+} se pueden ligar a cada hexámero de insulina. Las soluciones de complejos de zinc de los derivados de insulina contendrán mezclas de estas especies.

[0026] 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.

[0027] 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, que comprende 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 rápido de acción, junto con soportes y aditivos farmacéuticamente aceptables.

[0028] En una forma de realización, 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 del grupo que consiste en insulina humana Asp^{B28}, insulina humana Lys^{B28}Pro^{B29} e insulina humana Lys^{B3}Glu^{B29}.

[0029] En una forma de realización, la invención provee una composición farmacéutica que comprende $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-\gamma-Glu)$ des(B30) insulina humana e insulina humana AspB28 junto con soportes y aditivos farmacéuticamente aceptables.

[0030] 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%.

[0031] En otro aspecto de la invención, se provee un método para tratar la diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 y otros estados que causan hiperglucemia 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 invención junto con un soporte y aditivos farmacéuticamente aceptables.

[0032] 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 hiperglucemia 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 rápido de acción, junto con un soporte farmacéuticamente aceptable y aditivos farmacéuticos aceptables.

[0033] 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.

[0034] En otro aspecto, la presente invención se refiere a derivados de insulina que tienen un índice hidrofóbico, k'_{rel} , que está en el rango de aproximadamente 2 a aproximadamente 200.

[0035] 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 o de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2.

5 [0036] Según una forma de realización de la presente invención, los derivados de insulina comprenderán una cadena lateral W-X-Y-Z, tal como se ha definido anteriormente, que tiene al menos una región hidrofílica y al menos una región hidrofóbica.

10 [0037] Según otra forma de realización de la presente invención, los derivados de insulina comprenderán una cadena lateral -W-X-Y-Z, tal como se ha definido anteriormente, que tiene al menos un grupo de ácido carboxílico libre y según otra forma de realización, la cadena lateral tendrá al menos dos grupos de ácido carboxílico libres.

[0038] En otra forma de realización, la invención se refiere a una composición farmacéutica comprendiendo un derivado de insulina según la invención que es soluble en valores de pH fisiológico.

15 [0039] En otra forma de realización, la invención se refiere a una composición farmacéutica comprendiendo un derivado de insulina según la invención soluble en valores de pH en el intervalo de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5.

20 [0040] En otra forma de realización, la invención se refiere a una composición farmacéutica con un perfil de acción prolongada que comprende un derivado de insulina según la invención.

25 [0041] En otra forma de realización, la invención se refiere a una composición farmacéutica que 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 según la invención o de una mezcla del derivado de insulina según la invención con un análogo de insulina de acción rápida.

Datos de hidrofobicidad en derivados de insulina según la invención.

30 [0042] 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 μ 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 descubrió durante la inyección de 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. $k'_{rel} = (t_{derivado} - t_0)/(t_{humana} - t_0)$. Los k'_{rel} encontrados para varios derivados de insulina según la invención se muestran en la Tabla 1.

40

Tabla 1

Derivado de insulina	k'_{rel}
N^{EB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₄ CO- γ -Glu) des(B30) insulina humana	0,87
N^{EB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₆ CO- γ -Glu) des(B30) insulina humana	1,15
N^{EB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₈ CO- γ -Glu) des(B30) insulina humana	0,45
N^{EB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₂₆ CO- γ -Glu-N-(γ -Glu) des(B30) insulina humana	1,17
N^{EB29} -(N-(Asp-OC(CH ₂) ₁₆ CO)- γ -Glu) des(B30) insulina humana	0,70
N^{EB29} -(N-(Glu-OC(CH ₂) ₁₄ CO- γ -Glu) des(B30) insulina humana	0,33
N^{EB29} -(N-(Glu-OC(CH ₂) ₁₄ CO-) des(B30) insulina humana	1,17
N^{EB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₆ CO- α -Glu)-N-(β -Asp) des(B30) insulina humana	1,11
N^{EB29} -(N-(Gly-OC(CH ₂) ₁₃ CO- γ -Glu) des(B30) insulina humana	0,58
N^{EB29} -(N-(Sar-OC(CH ₂) ₁₃ CO- γ -Glu) des(B30) insulina humana	0,63
N^{EB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₆ CO- α -Glu)-N-(AspAsp) des(B30) insulina humana	1,07
N^{EB29} -(N-(Gly-OC(CH ₂) ₁₄ CO- γ -Glu) des(B30) insulina humana	0,88
N^{EB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₅ CO- γ -L-Glu) des(B30) insulina humana	1,13
N^{EB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₄ CO- β -L-Asp) Des(B30) insulina humana	0,69

N ^{εB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₃ CO-β-L-Glu) des(B30) insulina humana	0,54
N ^{εB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₃ CO-β-L-Asp) des(B30) insulina humana	0,47
N ^{εB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₆ CO-δ-L-Aad) des(B30) insulina humana	0,84
N ^{εB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₆ CO-γ-D-Glu) des(B30) insulina humana	1,4
N ^{εB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₅ CO-β-L-Asp) des(B30) insulina humana	1,09
N ^{εB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₆ CO-α-L-Asp) des(B30) insulina humana	1,49
N ^{εB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₆ CO-α-L-Glu) des(B30) insulina humana	1,51
N ^{εB29} -(N-(HOOC(CH ₂) ₁₄ CO-ε-L-LysCO-) des(B30) insulina humana	0,90
N ^{εB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₆ CO-β-L-Asp) des(B30) insulina humana	1,54
N ^{εB29} -(N-(Gly-OC(CH ₂) ₁₆ CO-γ-L-Glu) des(B30) insulina humana	1,57
N ^{εB29} -[N-(HOOC(CH ₂) ₁₆ CO)-N-(carboximetil)-β-Ala] des(B30) insulina humana	1,13
N ^{εB29} -[N ^α -(HOOC(CH ₂) ₁₁)NHCO(CH ₂) ₃ CO)-γ-L-Glu] des(B30) insulina humana	0,42

Composiciones farmacéuticas

[0043] Las composiciones farmacéuticas que contienen un derivado de insulina según la presente invención se pueden administrar parenteralmente a pacientes que necesitan tal tratamiento. La administración parenteral se puede realizar por inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular mediante una jeringa, opcionalmente una jeringa tipo pluma. Alternativamente, la administración parenteral se puede realizar mediante una bomba de infusión. Otras opciones son la administración de la insulina nasal o pulmonarmente, preferiblemente en composiciones, polvos o líquidos, específicamente diseñados para este propósito.

[0044] Las composiciones inyectables de los derivados de insulina de la invención se pueden preparar usando las técnicas convencionales de la industria farmacéutica que implican la disolución y la mezcla de los ingredientes de forma apropiada para producir 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 al volumen final de la composición que se va a preparar. Se añade un agente isotónico, un conservante y un tampón según las necesidades y se ajusta el valor de pH de la solución, si se requiere, mediante el uso de un ácido, por ejemplo ácido clorhídrico, o de una base, por ejemplo hidróxido sódico acuoso, según las necesidades. Finalmente, se ajusta el volumen de la solución con agua para producir la concentración deseada de los ingredientes.

[0045] En otra forma de realización de la invención el tampón se selecciona en el grupo que consiste en acetato sódico, carbonato de sodio, citrato, glicil-glicina, histidina, glicina, lisina, arginina, fosfato dihidrogenado de sodio, fosfato hidrogenado de disodio, fosfato sódico y tris(hidroximetil)-aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas de estos. Cada uno de estos tampones específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención.

[0046] En otra forma de realización de la invención la formulación comprende también un conservante farmacéuticamente aceptable que se puede seleccionar del grupo que consiste en fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, p-hidroxibenzoato de butilo, 2-feniletanol, alcohol bencílico, clorobutanol y tiomersal, bronopol, ácido benzoico, imidurea, clorhexidina, deshidroacetato de sodio, clorocresol, p-hidroxibenzoato etílico, cloruro de bencetonio, clorfenesina (3p-clorfenoxipropano-1,2-diol) o mezclas de estos. En otra forma de realización de la invención, el conservante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 20 mg/ml. En otra forma de realización de la invención, el conservante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml. En otra forma de realización de la invención, el conservante está presente en una concentración de 5 mg/ml a 10 mg/ml. En otra forma de realización 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 una forma de realización alternativa 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, 19th edition, 1995.

[0047] En otra forma de realización de la invención, la formulación comprende también un agente isotónico que se puede seleccionar del grupo que consiste en una sal (p. ej. cloruro sódico), un azúcar o alcohol de azúcar, un aminoácido (p. ej. L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (p. ej. glicerol (glicerina), 1,2- propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol) polietilenoglicol (p. ej. PEG400) o mezclas de éstos. Se puede utilizar cualquier azúcar, tal como mono-, di- o polisacáridos, o glucanos solubles en agua, incluyendo, por ejemplo, fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, almidón de hidroxietilo y carboximetilcelulosa-Na. En una forma de

realización, el aditivo de azúcar es sacarosa. El alcohol de azúcar se define como un hidrocarburo C4-C8 con al menos un grupo -OH e incluye por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabitól. En una forma de realización, el aditivo de alcohol de azúcar es manitol. Los azúcares o alcoholes de azúcar mencionados más arriba se pueden utilizar individualmente o en combinación. No hay límite fijado que determine la cantidad usada, siempre que el azúcar o el alcohol de azúcar sean solubles en la preparación líquida y no actúen de forma adversa en los efectos estabilizantes conseguidos mediante el uso de los métodos de la invención. En una forma de realización, la concentración de azúcar o de alcohol de azúcar se sitúa entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml. En otra forma de realización de la invención, el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/ml a 50 mg/ml. En otra forma de realización de la invención, el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/ml a 7 mg/ml. En otra forma de realización de la invención, el agente isotónico está presente en una concentración de 8 mg/ml a 24 mg/ml. En otra forma de realización de la invención, el agente isotónico está presente en una concentración de 25 mg/ml a 50 mg/ml. Cada uno de estos agentes específicos isotónicos constituye una forma de realización alternativa de la invención. El uso de un agente isotónico 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, 19th edition, 1995.

[0048] Agentes isotónicos típicos son cloruro sódico, manitol, dimetil sulfona y glicerol y unos conservantes típicos son fenol, m-cresol, p-hidroxibenzoato metílico y alcohol bencílico.

[0049] Ejemplos de tampones adecuados son acetato sódico, glicil-glicina, HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico) y fosfato sódico.

[0050] Una composición para una administración nasal de un derivado de insulina según la presente invención se puede preparar por ejemplo tal y como se describe en la patente europea nº: 272097 (de Novo Nordisk A/S).

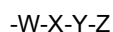
[0051] Las composiciones que contienen las insulinas de esta invención se pueden usar para el tratamiento de estados que son sensibles a la insulina. De este modo, se pueden utilizar para el tratamiento de la diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 e hiperglucemia, por ejemplo, como se ha visto a veces, en personas gravemente heridas y en personas sometidas a una 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 para ser tratado. Se recomienda que la dosificación diaria del derivado de insulina de esta invención se determine para cada paciente por expertos en la técnica de una manera similar a las composiciones de insulina conocidas.

[0052] 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.).

[0053] La presente invención se ilustra más en detalle en los siguientes ejemplos que, no obstante, no se deben interpretar como una limitación del ámbito de la protección.

[0054] La invención se resume en los siguientes párrafos:

1. Derivado de insulina que es des(B30) insulina humana que tiene una cadena lateral unida al grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la des(B30) insulina humana, la cadena lateral siendo de la fórmula general:



donde W es:

- un residuo de α -aminoácido con un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral, este aminoácido está seleccionado del grupo que consiste en α -Asp, β -Asp, α -Glu, γ -Glu, α -hGlu y δ -hGlu y este residuo forma, con uno de sus grupos de ácido carboxílico, un grupo de amida con el grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la des(B30) insulina humana;

X es:

- $-\underline{\text{CO}}-$;

Y es:

- $-(\text{CH}_2)_m$ donde m es un número entero en el intervalo de 12 a 16;

y

Z es:

- -COOH;

5 y cualquier complejo Zn^{2+} de los mismos.

10. Derivado de insulina según el párrafo 1 seleccionado del grupo que consiste en $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-\gamma-Glu)$ des(B30) insulina humana; $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{15}CO)-\gamma-Glu)$ des(B30) insulina humana; $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{16}CO)-\gamma-Glu)$ des(B30) insulina humana; $(N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{13}CO)-P-Asp)$ des(B30) insulina humana; $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{13}CO)-\alpha-Glu)$ des(B30) insulina humana; $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{13}CO)-\alpha-Glu)$ des(B30) insulina humana; $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{16}CO)-\gamma-D-Glu)$ des(B30) insulina humana; $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-\beta-D-Asp)$ des(B30) insulina humana; $N^{\epsilon B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{16}CO)-\beta-D-Asp)$ des(B30) insulina humana;

15 11. Complejo de zinc de un derivado de insulina según cualquiera de los párrafos anteriores donde cada hexámero de insulina se enlaza a dos iones de zinc, tres iones de zinc o cuatro iones de zinc.

12. Composición farmacéutica para el tratamiento de la diabetes en un paciente que necesita este tratamiento, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de insulina según el párrafo 1 junto con un soporte farmacéuticamente aceptable.

20 13. Composición farmacéutica para el tratamiento de la diabetes en un paciente que necesita este tratamiento, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de insulina según el párrafo 1 en mezcla con una insulina o un análogo de insulina que tiene un inicio de acción rápido, junto con un soporte farmacéuticamente aceptable.

25 14. Método para tratar la diabetes en un paciente que necesita este tratamiento, que comprende la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de insulina según el párrafo 1 junto con un soporte farmacéuticamente aceptable.

30 15. Método para tratar la diabetes en un paciente que necesita este tratamiento, que comprende la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de insulina según el párrafo 1 en mezcla con una insulina o un análogo de insulina que tiene un inicio de acción rápido, junto con un soporte farmacéuticamente aceptable.

35 DEFINICIONES

[0055] Por "análogo de insulina", como se utiliza en este caso, se entiende un polipéptido cuya estructura molecular puede derivar formalmente de la estructura de una insulina de origen natural, por ejemplo la estructura de la insulina humana, mediante la eliminación y/o el cambio de al menos un residuo de aminoácido presente en la insulina de origen natural y/o por la adición de al menos un residuo de aminoácido. Los residuos de aminoácidos añadidos y/o cambiados pueden ser residuos de aminoácidos codificables u otros residuos de origen natural o residuos de aminoácidos puramente sintéticos. Ejemplos de análogos de insulina son des(B30) insulina humana; análogos de des(B30) insulina humana.

45 [0056] 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.

50 [0057] 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.

[0058] hGlu es ácido homoglutámico.

55 [0059] α -Asp es la forma L de $-HNCH(CO-)CH_2COOH$.

[0060] β -Asp es la forma L de $-HNCH(COOH)CH_2CO-$.

60 [0061] α -Glu es la forma L de $-HNCH(CO-)CH_2CH_2COOH$.

[0062] γ -Glu es la forma L de $-HNCH(COOH)CH_2CH_2CO-$.

[0063] α -hGlu es la forma L de $-HNCH(CO-)CH_2CH_2CH_2COOH$.

65

[0064] δ -hGlu es la forma L de $-\text{HNCH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$.

[0065] β -Ala es $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$.

5 [0066] Sar es sarcosina (N-metilglicina).

[0067] 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.

10

[0068] La expresión "residuo de aminoácido con una cadena lateral neutra" se refiere a residuos de aminoácidos tales como Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro, Ser, Thr, Cys, Met, Tyr, Asn y Gln.

15

[0069] 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 inyectables 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.

20

[0070] Se ha utilizado las siguientes abreviaturas en la especificación y ejemplos:

Aad: ácido alfa-amino-adípico (ácido homoglutámico)

Bzl = Bn: bencilo

DIEA: N,N-diisopropiletilamina

25

DMF: N,N-dimetilformamida

IDA: ácido iminodiacético

Sar: sarcosina (N-metil-glicina)

tBu: tert-butilo

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

30

THF: tetrahidrofurano

EtOAc: acetato etílico

DIPEA: diisopropiletilamina

HOAt: 1-Hidroxi-7-azabenzotriazola

TEA: trietilamina

35

Su: succinimidil= 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il

TFA: ácido trifluoracético

DCM: diclorometano

DMSO: dimetil sulfóxido

TLC: cromatografía en capa fina

40

RT: temperatura ambiente

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

45

Síntesis de $\text{N}^{\text{B29}}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})-\gamma\text{-Glu})$ des(B30) insulina humana

[0071] Se disolvieron 200 mg de des(B30) insulina humana en 10 ml de 50 mM de Na_2CO_3 (pH 10,2) contenidos en un tubo que se colocó al baño maría a 15°C. El metil hexadecandioil-Glu(OSu)-OMe (37,90 mg, preparado tal y como se describe más abajo), se disolvió en 10 ml de acetonitrilo y posteriormente se añadió a la solución de insulina. La reacción se detuvo después de 30 min por la adición de 3,8 ml de 0,2 M de etanolamina ajustada a pH 9,0 con HCl diluido. El rendimiento de la reacción fue de 37% según se determinó por RP-HPLC. El producto se precipitó después de la adición de 2,5 volúmenes de agua y del ajuste de pH a 5,5. El precipitado se disolvió después en 10 ml de agua a pH 8 y se colocó en hielo. A esta solución se le añadió 10 ml de 0,2 M de NaOH helado para la saponificación y la mezcla se incubó durante 40 min con enfriamiento en hielo y se ajustó luego a pH 5,5 para precipitar el producto. El precipitado se aisló y se disolvió en 5 ml de tampón A (véase más adelante) y se diluyó con 33 ml de 42,5% p/p de etanol acuoso dividido entre tres y se sometió a una cromatografía de intercambio aniónico mediante el uso de una columna de intercambio aniónico Resource™ de 6 ml eluida con un sistema de tampón que consistía en un tampón A: Tris 0,24% p/p, NH_4Ac 0,25%, 42% etanol p/p, pH 7,5 y tampón B: Tris 0,24% p/p, NH_4Ac 1,25%, 42% etanol p/p pH 7,5. La muestra fue eluida por un flujo de 6 ml/min en un gradiente de 0 a 100% de tampón B durante 30 min. Las fracciones que contenían el compuesto deseado fueron identificadas por RP-HPLC. El rendimiento del producto deseado era de 15,3 mg (pureza: 72,9%). El volumen de las fracciones agrupadas que contenían el compuesto deseado se redujo a 20 ml en condiciones de vacío y esta solución se sometió después a una purificación por RP-HPLC utilizando una columna HPLC de fase inversa Nucleosil, C4 250/10 mm, 10 μm , 300A. El sistema de tampón consistía en un tampón A: 10 mM Tris, 15mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10% etanol, pH 7,3 y tampón B: 70% vol/vol de etanol.

65

[0072] El producto se eluyó con un gradiente de 10% a 60% de tampón B durante 120 min en un flujo de 2 ml/min. Las fracciones apropiadas se agruparon y se precipitó y se liofilizó el compuesto. El rendimiento era de 7,7 mg (pureza: 99,4%).

- 5 [0073] El peso molecular, determinado por espectroscopia de masas: 6097,2, calculado 6104,1. El péptido B-terminal que contiene la cadena lateral se obtuvo después de la digestión con proteasa de *Staphylococcus aureus*. Peso molecular, determinado por espectroscopia de masas: 1413,1, calculado: 1413,5.

Preparación de metil hexadecandioil-Glu(OSu)-OMe

10

[0074] Se saponificó hexadecandioato dimetílico en MeOH usando 1,0 de equivalente de NaOH, y se aisló el éster mono-metílico bajo acidificación de HCl por recristalización de heptano.

15

[0075] Se disolvió hexadecandioato mono-metílico (275 mg, 0,91 mmol) en THF (3 ml) y se trató con succinimidil tetrametiluroniotetrafluoroborato (331 mg, 1,1 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (188 μ L, 1,1 mmol) y la mezcla se agitó durante 20 horas. El solvente se eliminó *in vacuo* y el residuo se disolvió en acetato de etilo y se lavó con 0,1 M de HCl (dos veces) y agua. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó *in vacuo* para producir 350 mg (96 %) de metil succinimidil hexadecandioato.

20

[0076] ¹H-NMR (CDCl₃): 3,66 (s; 3H), 2,83 (s; 4H), 2,60 (t; 2H), 2,30 (t; 2H), 1,74 (p; 2H), 1,62 (p; 2H), 1,40 (m; 2H), 1,35-1,22 (m, 18 H).

25

[0077] El metil succinimidil hexadecandioato (240 mg, 0,58 mmol) en dimetilformamida (5 ml) se trató con GluOMe (93 mg, 0,58 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (200 μ L, 1,16 mmol). La mezcla se agitó durante 20 horas y se evaporó después *in vacuo*. El residuo se redisolvió en acetato de etilo. Mediante el lavado con 0,1 M de HCl y agua, seguido del secado (MgSO₄) y la evaporación *in vacuo*, se produjo 226 mg (88%) de metil hexadecandioil-Glu-OMe.

¹H-NMR: 6,22 (d; 1H), 4,65 (m; 1H), 3,76 (s; 3H), 3,66 (s; 3H), 2,42 (t; 2H), 2,29 (m; 4H), 2,22 (t; 2H), 1,97 (m; 2H), 1,62 (m; 4H), 1,35-1,22 (m, 20 H).

30

[0078] El metil hexadecandioil-Glu-OMe (200 mg, 0,45 mmol) se disolvió en diclorometano (4 ml), se enfrió con un baño de hielo y se trató con diciclohexilcarbodiimida (93 mg, 0,45 mmol) y N-hidroxisuccinimida (52 mg, 0,45 mmol). La mezcla se agitó durante 20 horas, se filtró y se evaporó *in vacuo*, para producir 243 mg (100 %) del intermedio deseado. ¹H-RMN (CDCl₃): 6,34 (d; 1H), 4,67 (m; 1H), 3,73 (s; 3H), 3,64 (s; 3H), 2,81 (s; 4H), 2,66 (m; 2H), 2,27 (m; 4H), 2,20 (t; 2H), 1,89 (m; 1H), 1,70 (m; 1H), 1,58 (m; 4H), 1,29-1,20 (m, 20 H).

35

EJEMPLO 2

Síntesis de N^εB29-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₆CO)-γ-Glu) des(B30) insulina humana

40

[0079] 300 mg de des(B30) insulina humana fueron acilados, purificados y aislados como se describe en el Ejemplo 1, excepto que en el presente ejemplo el metil octadecandioil-Glu(OSu)-OMe (preparado como se describe más abajo) se usó como agente acilante en vez del metil hexadecandioil-Glu(OSu)-OMe usado en el Ejemplo 1. Se obtuvo 25,5 mg del compuesto del título (pureza: 97,4%). Peso molecular, determinado por espectroscopia de masas: 6136,6, calculado: 6132. El péptido B-terminal que contiene el ligando fue obtenido después de la digestión por proteasa de

45

Staphylococcus aureus. Peso molecular, determinado por espectroscopia de masas: 1439,1, calculado: 1442,5.

Preparación de metil octadecandioil-Glu(OSu)-OMe

50

[0080] Este compuesto se obtuvo a partir de dimetil octadecandioato en analogía con el derivado de hexadecandioil descrito en el Ejemplo 1.

¹H-NMR (CDCl₃): 6,20 (d; 1H), 4,70 (m; 1H), 3,78 (s; 3H), 3,67 (s; 3H), 2,84 (s; 4H), 2,70 (m; 2H), 2,30 (m; 4H), 2,22 (t; 2H), 1,93 (m; 1H), 1,70 (m; 1H), 1,62 (m; 4H), 1,33-1,23 (m, 24 H).

55

EJEMPLO 3

Síntesis de N^εB29-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₆CO)-γ-Glu-N-(γ-Glu)) des(B30) insulina humana

60

[0081] De manera similar a lo que se describe en el Ejemplo 1, 300 mg de des(B30) insulina humana fue acilada con metil octadecandioil-Glu(Glu(OSu)-OMe)-OMe. Se realizó la purificación por intercambio aniónico tal como se ha descrito anteriormente. No obstante, se realizó la elución prolongada con 100% de tampón B a fin de eluir el producto deseado. Las fracciones que contenían el producto deseado se identificaron por RP-HPLC y se obtuvo 47,5 mg con una pureza del 55%. El volumen de las fracciones que contenían el producto deseado se redujo *in vacuo* y la solución obtenida fue sometida a purificación por RP-HPLC mediante el uso de una columna de HPLC de fase inversa Jupiter, C4 250/10 mm, 10 μ m, 300 Å de Phenomenex. El sistema de tampón consistía en tampón A: 0,1% TFA, 10% vol/vol

65

etanol y tampón B: 80% vol/vol etanol. La muestra se eluyó por medio de un gradiente de 40% a 60% de tampón B a 40 °C durante 120 min con un flujo de 2 ml/min. Las fracciones apropiadas se agruparon y se liofilizaron y se obtuvo 31,1 mg del compuesto del título (pureza: 94%).

- 5 [0082] Peso molecular del compuesto del título determinado por espectroscopia de masas: 6259,65, calculado: 6261,2. El peso molecular (por espectroscopia de masas) del péptido B-terminal que contiene la cadena lateral, obtenido después de la digestión con proteasa de *Staphylococcus aureus* resultó ser 1569,88, calculado: 1569,88.

Preparación de metil octadecandioil-Glu(Glu(OSu)-OMe)-OMe

10

[0083] El metil octadecandioil-Glu(OSu)-OMe (preparado tal y como se describe en el Ejemplo 2, 200 mg, 0,35 mmol) en dimetilformamida (5 ml) se trató con GluOMe (62 mg, 0,39 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (90 µL, 53 mmol) y la mezcla se agitó durante 20 horas. El solvente se eliminó *in vacuo* y el residuo se disolvió en acetato de etilo y se lavó dos veces con 0,2 M HCl, agua y solución salina. Mediante el secado sobre MgSO₄ y la evaporación se produjo el metil octadecandioil-Glu(Glu-OMe)-OMe, 180 mg (83 %).

15

[0084] Se disolvió metil octadecandioil-Glu(Glu-OMe)-OMe (180 mg, 0,29 mmol) en THF (9 ml) y se trató con succinimidil tetrametiluroniotetrafluoroborato (106 mg, 0,35 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (60 µL, 0,35 mmol). La mezcla se agitó durante toda la noche, se evaporó, se redisolvió en acetato de etilo y se lavó con 2x 0,1 M HCl y agua. Mediante el secado sobre MgSO₄ y la evaporación se produjo 190 mg (93%) del intermedio deseado.
¹H-NMR (CDCl₃)δ: 6,73 (d; 1H), 6,43 (d; 1H), 4,69 (m; 1H), 4,56 (m; 1H), 3,77 (s; 3H), 3,74 (s; 3H), 3,66 (s; 3H), 2,85 (s; 4H), 2,72 (m; 2H), 2,41-2,12 (m; 8H), 2,95 (m; 2H), 1,72-1,56 (m; 6H), 1,35-1,22 (m, 22 H).

20

EJEMPLO 4

25

Síntesis de N^εB²⁹(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-L-Glu) des(B30) insulina humana

[0085] Se disolvió des(B30) insulina humana (500 mg, 0,088 mmol) en 100 mM de Na₂CO₃ (5 ml, pH 10,2) a temperatura ambiente. El tert-butil hexadecandioil-Glu(OSu)-OtBu (66 mg, 0,105 mmol, preparado tal y como se describe más abajo), se disolvió en acetonitrilo (5 ml) y posteriormente se añadió a la solución de insulina. Después de 30 min, se agregó 0,2 M de metalemina (0,5 ml). El pH se ajustó por HCl a 5,5 y el precipitado isoeléctrico se recogió por centrifugado y se secó *in vacuo* para producir 525 mg. El rendimiento de acoplamiento era del 78% (RP-HPLC, columna C4; tampón A: 10 % MeCN en 0,1 % de TFA-agua, tampón B: 80 % de MeCN en 0,1 % de TFA-agua; gradiente 20% a 90 % B en 16 minutos). El producto protegido se disolvió en TFA (10 ml), se dejó 30 min y se evaporó *in vacuo*. El producto bruto se disolvió en agua y se liofilizó (610 mg). 0454 se purificó por RP-HPLC en la columna C4, tampón A: 20 % EtOH + 0,1 % TFA, tampón B: 80 % EtOH + 0,1 % TFA; gradiente 15-60 % B, seguido de HPLC en la columna C4, tampón A: 10 mM Tris + 15 mM sulfato de amonio en 20 % EtOH, pH 7,3, tampón B: 80 % EtOH, gradiente 15-60 % B. Las fracciones recogidas se desalaron en el Sep-Pak con 70% de acetonitrilo + 0,1% de TFA, se neutralizaron mediante la adición de amoniaco y se liofilizaron. El rendimiento no optimizado era de 64 mg, 12 %. La pureza evaluada por HPLC era de 99,2 %. LCMS 6102,9; C₂₇₄H₄₁₁N₆₅O₈₁S₆ requiere 6104,1. El péptido B-terminal que comprende la cadena lateral (RGFFYTPK(N^ε-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-L-Glu) se obtuvo después de la digestión con proteasa de *Staphylococcus aureus*. MALDI-MS: 1413,1, calculado: 1412,7.

30

35

40

Preparación de tert-butil hexadecandioil-L-Glu(OSu)-OtBu

45

[0086] Se suspendió ácido hexadecadioico (40,0 g, 140 mmol) en tolueno (250 ml) y la mezcla se calentó a reflujo. N,N-dimetilformamida di-tert-butil acetal (76,3 g, 375 mmol) se añadió gota a gota durante más de 4 horas. La mezcla se sometió a reflujo durante toda la noche. El solvente se eliminó *in vacuo* a 50 °C y el material bruto se suspendió en DCM/AcOEt (500 ml, 1:1) y se agitó durante 15 min. Los sólidos se recogieron por filtración y se trituraron con DCM (200 ml). El filtrado se evaporó *in vacuo* para producir mono-tert-butil hexadecandioato bruto, 30 gramos. Este material se suspendió en DCM (50 ml), se enfrió con hielo durante 10 min y se filtró. El solvente se eliminó *in vacuo* para producir 25 gramos de mono-tert-butil hexadecandioato crudo, que se recrystalizó a partir de heptano (200 ml) para producir mono-tert-butil hexadecandioato, 15,9 g (33 %). De forma alternativa a la recrystalización, el mono-éster se puede purificar por cromatografía de sílice en AcOEt/heptano.

50

55

¹H-NMR (CDCl₃)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).

[0087] El mono éster de tert-butilo (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 0,1 M HCl frío y con agua. Mediante el secado sobre MgSO₄ y la evaporación *in vacuo* se produjo succinimidil tert-butil hexadecandioato, 2,02 g (79%).

60

¹H-NMR (CDCl₃)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)).

Se disolvió el succinimidil tert-butil hexadecandioato (1 g, 2,27 mmol) 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 bruto se disolvió en AcOEt y se lavó dos veces con 0,2M HCl, agua y solución salina. Mediante el secado sobre MgSO₄ y la evaporación *in vacuo* se produjo tert-butil hexadecandioil-L-Glu-OtBu, 1,2 g (100%).

65

¹H-NMR (CDCl₃)δ: 6,25 (d; 1H), 4,53 (m; 1H), 2,42 (m; 2H), 2,21 (m; 4H), 1,92 (m; 1H), 1,58 (m; 4H), 1,47 (s; 9H), 1,43 (s; 9H), 1,43-1,22 (m, 18H).

[0088] El tert-butil hexadecandioil-L-Glu-OtBu (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 0,1 M HCl frío y con agua. Mediante el secado sobre MgSO₄ y la evaporación *in vacuo* se produjo tert-butil hexadecandioil-L-Glu(OSu)-OtBu, 1,30 g (92%).

¹H-NMR (CDCl₃)δ: 6,17 (d; 1H), 4,60 (m; 1H), 2,84 (s; 4H), 2,72 (m; 1H), 2,64 (m; 1H), 2,32 (m; 1H), 2,20 (m; 4H), 2,08 (m; 1H), 1,6 (m; 4H), 1,47 (s; 9H), 1,43 (s; 9H), 1,33-1,21 (m, 20 H).

EJEMPLO 5

Síntesis de N^εB²⁹-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₆CO)-γ-L-Glu) des(B30) insulina humana

[0089] Se disolvió insulina desB30 (50 mg, 9 μmol) en 0,1 M de Na₂CO₃ acuoso (0,65 ml), pH 10,5. Se disolvió octadecandioil-L-Glu(OSu) (50,1 mg, 9,9 μmol, preparado tal y como se describe más abajo) en acetonitrilo (0,65 ml) y se añadió a la solución de insulina; el pH era de 10,3. Después de 30 min, se añadió 0,2 M de metalemina (50 μl). El pH se ajustó por HCl a 5,5 y el precipitado isoeléctrico se recogió por centrifugado y se secó *in vacuo*. HPLC mostró que el rendimiento de acoplamiento bruto era del 52% (no optimizado); columna C4; tampón A: 10 % MeCN en 0,1 % TFA-agua, tampón B: 80 % MeCN en 0,1 % TFA-agua; gradiente 20% a 90 % B en 16 minutos). El LCMS 6133,2; C₂₇₆H₄₁₅N₆₅O₈₁S₆ requiere 6132,2.

Preparación de octadecandioil-L-Glu(OSu)

[0090] Se suspendió ácido octadecanodioico (2,5 g, 8,0 mmol) en DCM (60 mL), tratado con trietilamina (1,16 mL, 8,3 mmol) y se enfrió en hielo. Se añadió bencilclorofomato (1,14 mL) gota a gota bajo nitrógeno y se agitó la mezcla durante 10 min, cuando se añadió DMAP (0,097 g, 0,80 mmol). Después de la agitación de 20 min a 4°C (TLC, 1:1 AcOEt:heptano), la reacción se evaporó hasta quedar seca. El material bruto (3,9 g) se disolvió en DCM (60 ml), se trató con sílice (15 g) y se evaporó. El sílice se cargó en una columna de sílice (175 g) y el producto se eluyó con AcOEt/heptano 1:7 a 1:1. La evaporación de las fracciones deseadas produjo octadecandioato de mono-bencilo (1,15 g, 36 %).

¹H-NMR (CDCl₃)δ: 7,35 (m; 5H), 5,11 (s; 2H), 2,35 (t; 4H), 1,63 (t; 4H), 1,30-1,22 (m, 24).

[0091] Se disolvió octadecandioato de mono-bencilo en DMF (3,5 mL) y THF (7 mL) y se enfrió con un baño de hielo. Se añadió DIEA (0,103 mL) y TSTU y se agitó la mezcla durante 1 h en un baño de hielo y a temperatura ambiente durante toda la noche. El solvente se evaporó *in vacuo* y el residuo se disolvió en AcOEt y se lavó dos veces con 0,2 N HCl, NaHCO₃ saturado, éste se secó, se filtró y se evaporó hasta quedar seco para producir succinimidil mono-bencil octadecandioato (0,25 g, 100 %).

¹H-NMR (CDCl₃)δ: 7,35 (m; 5H), 5,11 (s; 2H), 2,83 (s; 4H), 2,60 (t; 2H), 2,35 (t; 2H), 1,80-1,60 (m; 4H), 1,40-1,20 (m, 24).

[0092] Se disolvió succinimidil mono-bencil octadecandioato (95 mg, 0,19 mmol) en DMF (1,5 ml) y se trató con L-Glu-OBzl (49 mg, 0,21 mmol) y DIEA (50 μl, 0,28 mmol) y la mezcla se agitó durante toda la noche. El solvente se evaporó *in vacuo* y el producto bruto se disolvió en AcOEt y se lavó dos veces con 0,2M HCl, agua y solución salina. Mediante el secado sobre MgSO₄ y la evaporación *in vacuo* se produjo BzIO-octadecandioil-L-Glu-OBzl, 114 mg (97%).

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7,35 (m; 5H), 6,22 (d; 2H), 5,17 (s; 2H), 5,11 (s; 2H), 4,71 (m; 1H), 2,37 (m; 4H), 2,22 (m; 3H), 1,98 (m; 1H), 1,63 (m; 4H), 1,31-1,20 (m, 24H).

[0093] Se disolvió BzIO-octadecandioil-L-Glu-OBzl (110 g, 0,18 mmol) en THF (2 ml) y se trató con TSTU (64 mg, 0,21 mmol) y DIEA (36 μl, 0,21 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 0,1 M HCl frío y agua. Mediante el secado sobre MgSO₄ y la evaporación *in vacuo* se produjo BzIO-octadecandioil-L-Glu(OSu)-OBzl, 119 g (94%).

¹H-NMR (CDCl₃)δ: 7,36 (m; 5H), 6,40 (d; 2H), 5,19 (s; 2H), 5,11 (s; 2H), 4,75 (m; 1H), 2,82 (s; 4H), 2,68 (m; 1H), 2,59 (m; 1H), 2,35 (t; 2H), 2,19 (t; 2H), 1,62 (m; 4H), 1,32-1,21 (m, 24H).

[0094] Se disolvió BzIO-octadecandioil-L-Glu(OSu)-OBzl (59 mg, 0,082 mmol) en acetona/0,1 % TFA (1 ml). Se añadió Pd/C (20 mg). El matraz se evacuó y se rellenó varias veces con N₂ y se conectó un globo lleno de H₂. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h y se filtró después a través de celita. Con la precipitación a partir de heptano y la evaporación de solventes residuales se produjo octadecandioil-L-Glu(OSu) (27 mg, 61%).

¹H-NMR (CDCl₃)δ: 6,32 (d; 1H), 4,70 (m; 1H), 3,70 (m; 1H), 3,06 (m; 2H), 2,88 (s; 4H), 2,62 (m; 2H), 2,35 (m; 2H), 2,24 (m; 1H), 1,74 (m; 1H), 1,64 (m; 2H), 1,50-1,20 (m, 26 H).

EJEMPLO 6

Síntesis de N^εB²⁹-(N-(L-Asp-OC(CH₂)₁₆CO)-γ-L-Glu) des(B30) insulina humana

[0095] Este compuesto se preparó en analogía con el ejemplo 4, mediante la reacción de L-Asp(OtBu)-OtBu con succinimidil octadecandioato seguido de la activación con TSTU, reacción con L-GluOtBu, activación con TSTU, acoplamiento con des(B30) insulina humana y desprotección por TFA. LCMS 6247,5, calculado 6247,3.

5

EJEMPLO 7

Síntesis de N^{εB29}-(N-(L-Glu-OC(CH₂)₁₄CO-γ-L-Glu) des(B30) insulina humana

10 [0096] Este compuesto se preparó en analogía con el ejemplo 4, mediante la reacción de L-Glu(OtBu)-OtBu con succinimidil hexadecandioato seguido de la activación con TSTU, reacción con L-GluOtBu, activación con TSTU, acoplamiento con des(B30) insulina humana y desprotección por TFA. LCMS 6261,3, calculado 6261,3.

EJEMPLO 8

15

Síntesis de N^{εB29}-(N-(L-Glu-OC(CH₂)₁₄CO-) des(B30) insulina humana

[0097] Este compuesto se preparó en analogía con el ejemplo 4, mediante la reacción de L-Glu(OtBu)-OtBu con succinimidil hexadecandioato seguido de la activación con TSTU, acoplamiento con des(B30) insulina humana y desprotección por TFA. LCMS 6130,8, calculado 6132,2.

20

EJEMPLO 9

Síntesis de N^{εB29}-(N-HOOC(CH₂)₁₆CO-α-L-Glu)-N-(β-L-Asp) des(B30) insulina humana

25

[0098] Este compuesto se preparó en analogía con el ejemplo 4, mediante la reacción de tert-butil succinimidil octadecandioato con L-Glu(OtBu) seguido de la activación con TSTU, reacción con L-AspOtBu, activación con TSTU, acoplamiento con des(B30) insulina humana y desprotección por TFA. LCMS 6246,9, calculado 6247,3.

EJEMPLO 10

30

Síntesis de N^{εB29}-(N-HOOC(CH₂)₁₅CO-γ-L-Glu) des(B30) insulina humana

35 [0099] Este compuesto se preparó en analogía con el ejemplo 4, mediante la reacción de tert-butil succinimidil heptadecandioato (A.C. Cope, U. Axen, E.P. Burrows, J. Weinlich, J. Am. Chem Soc. 1966, 88, 4228) con L-GluOtBu seguido de la activación con TSTU, acoplamiento con des(B30) insulina humana y desprotección por TFA. LCMS 6118,3, calculado 6118,1.

EJEMPLO 11

40

Síntesis de N^{εB29}-(N-(Gly-OC(CH₂)₁₃CO-γ-L-Glu) des(B30) insulina humana

[0100] Este compuesto se preparó en analogía con el ejemplo 4, mediante la reacción de L-GlyOtBu con succinimidil pentadecandioato seguido de la activación con TSTU, reacción con L-GluOtBu, activación con TSTU, acoplamiento con des(B30) insulina humana y desprotección por TFA. LCMS 6147,5, calculado 6147,1.

45

EJEMPLO 12

Síntesis de N^{εB29}-(N-(L-Sar-OC(CH₂)₁₃CO-γ-L-Glu) des(B30) insulina humana

50

[0101] Este compuesto se preparó en analogía con el ejemplo 4, mediante la reacción de L-Sar-OtBu con succinimidil octadecandioato, seguido de la activación con TSTU, reacción con L-GluOtBu, activación con TSTU, acoplamiento con des(B30) insulina humana y desprotección por TFA. LCMS 6161,0, calculado 6161,1.

EJEMPLO 13

55

Síntesis de N^{εB29}-(N-HOOC(CH₂)₁₆CO-α-L-Asp)-N-(β-L-Asp) des(B30) insulina humana

60 [0102] Este compuesto se preparó en analogía con el ejemplo 4, mediante la reacción de tert-butil succinimidil octadecandioato con L-Asp(OtBu) seguido de la activación con TSTU, reacción con L-AspOtBu, activación con TSTU, acoplamiento con des(B30) insulina humana y desprotección por TFA. LCMS 6233,8, calculado 6233,2.

EJEMPLO 14

65

Síntesis de N^{εB29}-(N-(Gly-OC(CH₂)₁₄CO-γ-L-Glu) des(B30) insulina humana

[0103] Este compuesto se preparó en analogía con el ejemplo 4, mediante la reacción de L-GlyOtBu con succinimidil hexadecandioato seguido de la activación con TSTU, reacción con L-GluOtBu, activación con TSTU, acoplamiento con des(B30) insulina humana y desprotección por TFA. LCMS 6160,7, calculado 6161,1.

EJEMPLO 15

Síntesis de N^{εB29}-(N-HOOC(CH₂)₁₄CO-β-L-Asp) des(B30) insulina humana

[0104] Este compuesto se preparó en analogía con el ejemplo 4, mediante la reacción de tert-butil succinimidil hexadecandioato con L-AspOtBu seguido de la activación con TSTU, acoplamiento con des(B30) insulina humana y desprotección por TFA. LCMS 6089,8, calculado 6089,8.

EJEMPLO 16

Síntesis de N^{εB29}-(N-HOOC(CH₂)₁₆CO-β-L-Asp) des(B30) insulina humana

[0105] Este compuesto se preparó en analogía con el ejemplo 4, mediante la reacción de tert-butil succinimidil octadecandioato con L-AspOtBu seguido de la activación con TSTU, acoplamiento con des(B30) insulina humana y desprotección por TFA. LCMS 6117,8, calculado 6118,1.

EJEMPLO 17

Síntesis de N^{εB29}-(N-(Gly-OC(CH₂)₁₆CO-γ-L-Glu) des(B30) insulina humana

[0106] Este compuesto se preparó en analogía con el Ejemplo 4, mediante la reacción de L-GlyOtBu con succinimidil octadecandioato seguido de la activación con TSTU, reacción con L-GluOtBu, activación con TSTU, acoplamiento con des(B30) insulina humana y desprotección por TFA. LCMS 6189,2, calculado 6189,2.

EJEMPLO 18

Síntesis de N^{εB29}-(N-(HOOC(CH₂)₁₄CO -ε-L-LysCO-) des(B30) insulina humana

[0107] Este compuesto se preparó en analogía con el ejemplo 4, mediante la reacción de tert-butil succinimidil hexadecandioato con L-Lys(Z)-OtBu, seguido de la hidrogenación sobre Pd/C y la activación in situ por 4-nitrofenil clorofornato, acoplamiento con des(B30) insulina humana y desprotección por TFA. LCMS 6189,2, calculado 6189,2.

EJEMPLO 19

Síntesis de N^{εB29}-(N-HOOC(CH₂)₁₆CO-α-L-Glu) des(B30) insulina humana

[0108] Este compuesto se preparó en analogía con el ejemplo 4, mediante la reacción de tert-butil succinimidil octadecandioato con L-Glu(OtBu) seguido de la activación con TSTU, acoplamiento con des(B30) insulina humana y desprotección por TFA. LCMS 6132,1, calculado 6132,2.

EJEMPLO 20

Síntesis de N^{εB29}-(N-HOOC(CH₂)₁₆CO-α-L-Asp) des(B30) insulina humana

[0109] Este compuesto se preparó en analogía con el Ejemplo 4, mediante la reacción de tert-butil succinimidil octadecandioato con L-Asp(OtBu), seguido de la activación con TSTU, acoplamiento con des(B30) insulina humana y desprotección por TFA. LCMS 6117,8, calculado 6118,1.

EJEMPLO 21

Síntesis de N^{εB29}-(N-HOOC(CH₂)₁₅CO-β-L-Asp) des(B30) insulina humana

[0110] Este compuesto se preparó en analogía con el ejemplo 4, mediante la reacción de tert-butil succinimidil heptadecandioato con L-AspOtBu, seguido de la activación con TSTU, acoplamiento con des(B30) insulina humana y desprotección por TFA. LCMS 6104,2, calculado 6104,1.

EJEMPLO 22

Síntesis de N^{εB29}-(N-HOOC(CH₂)₁₆CO-γ-D-Glu) des(B30) insulina humana

[0111] Este compuesto se preparó en analogía con el ejemplo 4, mediante la reacción de tert-butil succinimidil octadecandioato con D-GluOtBu, seguido de la activación con TSTU, acoplamiento con des(B30) insulina humana y desprotección por TFA. LCMS 6132,4, calculado 6132,2.

5 EJEMPLO 23

Síntesis de N^{εB29}-(N-HOOC(CH₂)₁₆CO-δ-L-Aad) des(B30) insulina humana

10 [0112] Este compuesto se preparó en analogía con el ejemplo 4, mediante la reacción de tert-butil succinimidil octadecandioato con L-AadOtBu (obtenido a partir de L-Aad(OMe) comercial por tert-butilación con AcOtBu/BF₃.OEt₂ y saponificación del éster metílico), seguido de la activación con TSTU, acoplamiento con des(B30) insulina humana y desprotección por TFA. LCMS 6116,9, calculado 6118,1.

15 EJEMPLO 24

Síntesis de N^{εB29}-(N-HOOC(CH₂)₁₃CO-β-L-Asp) des(B30) insulina humana

20 [0113] Este compuesto se preparó en analogía con el Ejemplo 4, mediante la reacción de tert-butil succinimidil pentadecandioato con L-AspOtBu, seguido de la activación con TSTU, acoplamiento con des(B30) insulina humana y desprotección por TFA. LCMS 6074,7, calculado 6076,1.

EJEMPLO 25

25 Síntesis de N^{εB29}-(N-HOOC(CH₂)₁₃CO-β-L-Glu) des(B30) insulina humana

[0114] Este compuesto se preparó en analogía con el ejemplo 4, mediante la reacción de tert-butil succinimidil pentadecandioato con L-GluOtBu, seguido de la activación con TSTU, acoplamiento con des(B30) insulina humana y desprotección por TFA. MALDI-MS 6080,6, calculado 6076,1.

30 EJEMPLO 26

Síntesis de N^{εB29}-(N-HOOC(CH₂)₁₄CO-β-D-Asp) des(B30) insulina humana

35 [0115] Este compuesto se preparó en analogía con el ejemplo 4, mediante la reacción de tert-butil succinimidil hexadecandioato con D-AspOtBu, seguido de la activación con TSTU, acoplamiento con des(B30) insulina humana y desprotección por TFA. LCMS 6089,1, calculado 6090,1.

EJEMPLO 27

40 Síntesis de N^{εB29}-(N-HOOC(CH₂)₁₆CO-β-D-Asp) des(B30) insulina humana

[0116] Este compuesto se preparó en analogía con el ejemplo 4, mediante la reacción de tert-butil succinimidil octadecandioato con D-AspOtBu, seguido de la activación con TSTU, acoplamiento con des(B30) insulina humana y desprotección por TFA. LCMS 6117,1, calculado 6118,1.

45

EJEMPLO 28

Síntesis de N^{εB29}-(N-HOOC(CH₂)₁₄CO-IDA) des(B30) insulina humana

50 [0117] Este compuesto se preparó en analogía con el ejemplo 4, mediante la reacción de tert-butil 3,4-dihidro-4-oxo-1,2,3- benzotriacina-3-il hexadecandioato con ácido iminodiacético, seguido de la activación con TSTU, acoplamiento con des(B30) insulina humana y desprotección por TFA. LCMS 6089,1, calculado 6090,1.

EJEMPLO 29

55 Síntesis de N^{εB29}-[N-(HOOC(CH₂)₁₆CO)-N-(carboximetil)-β-Ala] des(B30) insulina humana

60 [0118] La A1 N, B1N-diBoc DesB30 insulina humana (Kurtzhals P; Havelund S; Jonassen I; Kiehr B; Larsen UD; Ribel U; Markussen J Biochemical Journal, 1995, 312, 725-731) (186 mg, 0,031 mmol) se disolvió en DMSO (1,8 ml). Una solución de tert-butil octadecandioil-N-(tert-butoxicarbonilmetil)-β-Ala-OSu (27 mg, 0,04 mmol) en THF (1,8 ml) y se añadió trietilamina (0,045 ml, 0,31 mmol) (el pH fue 10). Después de una agitación lenta a temperatura ambiente durante 45 min, la reacción se enfrió con 0,2M de metilamina en THF (0,20 ml). Se añadió agua (5 ml) y el pH se ajustó a 5,5 con 1 N de HCl. El precipitado isoelectrico se recogió por centrifugado y se liofilizó para producir 150 mg. El rendimiento de acoplamiento era del 74% (LCMS m/z: 2148,9 [(M+3)/3], rt 5,04). El producto protegido se disolvió en TFA (2,5 ml) se dejó durante 1 h y se evaporó *in vacuo*. El producto bruto se purificó por RP-HPLC en la columna C4,

65

tampón A: 0,1 % TFA, tampón B: MeCN + 0,1 % TFA; gradiente 10-70 % B. Las fracciones recogidas se liofilizaron. El rendimiento era de 75 mg, 52 %. La pureza determinada por HPLC era de 97,2 %. MALDI-MS: 6132,1, calculado: 6132,2.

5 Preparación de tert-butil octadecandioil-N-(tert-butoxicarbonilmetil)-β-Ala-OSu

[0119] Se disolvió ácido octadecanodioico (5,64 g, 17,9 mmol) en tolueno (80 ml) a 115°C. Se añadió N,N-dimetilformamida di-tert-butilacetil (12,9 ml, 53,8 mmol) gota a gota durante 1,5 h. Después del reflujo durante 3 h, se añadió más N,N-dimetilformamida di-tert-butilacetil (2,15 ml) durante 20 min. El reflujo continuó durante toda la noche y se añadió más N,N-dimetilformamida di-tert-butilacetil (2,15 ml) durante 20 min. Después de la agitación durante otras 2 h., la mezcla reactiva se enfrió a temperatura ambiente. Se añadió agua y DCM. El diácido se eliminó por filtración. El filtrado se concentró en gel de sílice (40 g) y se purificó en una columna de silicagel de 1,5 L usando DCM/MeOH 14:1. Se aisló el mono-tert-butil éster de ácido octadecanodioico en 53% de rendimiento (3,52 g).

LC-MS: 393 (M+Na), rt 6,40.

15 ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 1,22 (br s, 24H), 1,38 (s; 9H), 1,47 (m; 4H), 2,14 (t, 2H), 2,18 ppm (t, 2H).

[0120] A una solución de octadecanedioato mono-tert-butilico (1,00 g, 2,7 mmol) en THF seco (8 ml), se añadió DIPEA (0,555 ml, 3,2 mmol) seguido de TSTU (1,00 g, 3,2 mmol). La mezcla reactiva se agitó bajo nitrógeno durante 18 h. El solvente se había evaporado. AcOEt se añadió al residuo y la suspensión resultante se filtró. El filtrado se lavó con 0,1 M de HCl frío (2x) y agua, se secó y se concentró para producir succinimidil tert-butil octadecandioato en forma de sólido blanco.

20 ¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,25 (m s, 20H), 1,39 (m, 2H), 1,44 (s; 9H), 1,58 (m; 4H), 1,74 (p; 2H), 2,2 (t, 2H), 2,60 (t; 2H), 2,85 ppm (m, 2H).

25 [0121] A una suspensión de H-Gly-OtBu (1,00 g, 6,0 mmol) en seco DMF (6 ml) se añadió trietilamina (0,835 ml, 6,0 mmol). Se observó una precipitación de hidrocloreto de trietilamina. Se añadió una solución de acrilato de bencilo (0,910 ml, 6,0 mmol) en DMF (6 ml). Se agitó la suspensión obtenida a temperatura ambiente durante 2 días. El precipitado se eliminó por filtración y se concentró el filtrado. El residuo se disolvió en AcOEt y se lavó con NaHCO₃ saturado. La capa orgánica se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró para producir un aceite claro, que se purificó por cromatografía flash mediante el uso de AcOEt/heptano 1:3 y 1:1 en forma de eluyente. Se aisló el N-tert-butoxicarbonilmetil)-β-Ala-OBn en un rendimiento de 29% (0,505 g).

30 ¹H-NMR (CDCl₃): ppm 1,43 (s; 9H), 2,55 (t; 2H), 2,92 (t; 2H), 3,30 (s; 2H), 5,15 (s; 2H), 7,65 (m, 5H).

[0122] El succinimidil tert-butil octadecandioato (0,15 g, 0,32 mmol) y N-(tert-butoxicarbonilmetil)-β-Ala-OBn (0,10 g, 0,32 mmol) se disolvió en DMF seco (2,5 ml), se añadió DIEA (0,070 ml, 0,38 mmol). Después de una agitación bajo nitrógeno durante 30 min, se añadió HOAt (0,045 g, 0,32 mmol) y la mezcla se volvió amarilla. Se continuó la agitación a temperatura ambiente bajo nitrógeno por cuestiones prácticas durante 13 días. La mezcla reactiva se concentró. El residuo se disolvió en AcOEt, se lavó con 0,1 N HCl (2x) y con agua, se secó (Na₂SO₄) y se concentró para producir tert-butil octadecandioil-N-(tert-butoxicarbonilmetil)-β-Ala-OBn en forma de aceite blanco. 205 mg, rendimiento de 99%.

40 ¹H-NMR (CDCl₃): ppm 1,25 (m; 26H), 1,45 (s; 9H), 1,50 (s; 9H), 1,6 (m; 4H), 2,20 (t; 2H), 2,40 (t; 2H), 2,75 (q; 2H), 3,62 (t; 2H), 3,97 (s; 2H), 5,20 (s; 2H); 7,35 (m; 5H)

[0123] El tert-butil octadecandioil-N-(tert-butoxicarbonilmetil)-β-Ala-OBn (200 mg, 0,31 mmol) se disolvió en EtOAc (10 ml) y THF (5 ml). Se añadió 10% de Pd/C y la mezcla se hidrogenó a 1 atm durante 16 h. La mezcla reactiva se filtró y se concentró para producir tert-butil octadecandioil-N-(tert-butoxicarbonilmetil)-β-Ala-OH en forma de aceite claro. Rendimiento 180 mg, 100%.

45 ¹H-NMR (CDCl₃): ppm 1,25 (m; 26H), 1,45 (s; 9H), 1,50 (s; 9H), 1,6 (m; 4H), 2,20 (t; 2H), 2,40 (t; 2H), 2,70 (m; 2H), 3,65 (m; 2H), 4,05 (s, 2H).

50 [0124] El tert-butil octadecandioil-N-(tert-butoxicarbonilmetil)-β-Ala-OH (0,110 g, 0,2 mmol) se disolvió en THF seco (2 ml). DIEA (0,045 ml, 0,24 mmol) y TSTU (0,075 g, 0,24 mmol) se añadieron. La mezcla se agitó bajo nitrógeno durante 18 h. La mezcla reactiva se filtró. Se añadió AcOEt al filtrado y se lavó con 0,2 M HCl (2x), solución salina (1x), se secó (Na₂SO₄) y se concentró para producir tert-butil octadecandioil-N-(tert-butoxicarbonilmetil)-β-Ala-OSu en forma de jarabe claro. Rendimiento 124 mg, 96%.

55 ¹H-NMR (CDCl₃): ppm 1,25 (m; 26H), 1,40 (s; 9H), 1,57 (s; 9H), 1,6 (m; 4H), 2,40 (m; 4H), 2,58 (br s, 4H), 3,0 (t; 2H), 3,7 (t; 2H), 4,03 (s, 2H).

Ejemplo 30

60 Síntesis de N^{εB29}-[N-(HOOC(CH₂)₁₆CO)-N-(2-carboxietil)-Gly] des(B30) insulina humana

[0125] La A1N, B1N-diBoc desB30 insulina humana (Kurtzhals P; Havelund S; Jonassen I; Kiehr B; Larsen UD; Ribøl U; Markussen J Biochemical Journal, 1995, 312, 725-731) (120 mg, 0,020 mmol) se disolvió en DMSO (1,2 ml). Se añadió una solución de tert-butil octadecandioil-N-(2-(tert-butoxicarbonil)etil)-Gly-OSu (16 mg, 0,025 mmol) en THF (1,2 ml) y trietilamina (0,033 ml, 0,24 mmol) (el pH era de 10). Después de una agitación lenta a temperatura ambiente durante 3h y 20 min, se añadió agua (4 ml) y el pH se ajustó a 5,5 con 1 N de HCl. El precipitado isoeléctrico se recogió por

centrifugado, se lavó con agua y se aisló por centrifugado. El producto se liofilizó. El producto bruto se purificó por RP-HPLC en columna C18, tampón A: 0,1 % TFA, tampón B: MeCN + 0,1 % TFA; gradiente 20-90 % B. Las fracciones recogidas se liofilizaron. El rendimiento de acoplamiento no optimizado era de 15 mg, 11% (MALDI-MS 6441, calculado: 6444,5). El producto protegido se disolvió en TFA (1 ml) y se dejó durante 1 h y se evaporó *in vacuo*. El producto bruto se purificó por RP-HPLC en columna C4, tampón A: 0,1 % TFA, tampón B: MeCN + 0,1 % TFA; gradiente 10-80 % B, y por RP-HPLC en columna C4, tampón A: 20 % EtOH + 0,1 % TFA, tampón B: 80 % EtOH + 0,1 % TFA; gradiente 15-60 % B, seguido de HPLC en columna C4, tampón A: 10 mM Tris + 15 mM sulfato de amonio en 20 % EtOH, pH 7,3, tampón B: 80 % EtOH, gradiente 15-60 % B. Las fracciones recogidas se desalaron en Sep-Pak con 70% de acetonitrilo + 0,1% de TFA, se neutralizaron por adición de amoníaco y se liofilizaron. El rendimiento no optimizado era de 1,8 mg, 13 %. La pureza determinada por HPLC era de 96,4 %. MALDI: 6132,1, calculado: 6132,2.

Preparación de tert-butil octadecandioil-N-(2-(tert-butoxicarbonil)etil)-Gly-OSu

[0126] H-Gly-OBn, HCl (3,03 g, 15 mmol) se disolvió en DMF seco (15 ml) y se enfrió en un baño de hielo. Se añadió TEA (2,10, 15 mmol) bajo precipitación de TEA-hidrocloruro. La suspensión se agitó durante 5 min antes de la adición de acrilato de t-butilo (2,20 ml, 15 mmol). Se dejó el baño de enfriamiento hasta alcanzar lentamente la temperatura ambiente y se continuó la agitación bajo nitrógeno durante 2 días. La mezcla reactiva se filtró y se concentró el filtrado. El residuo, que seguía conteniendo DMF, se disolvió en AcOEt y se lavó con NaHCO₃ saturado acuoso (2x) y con agua (1x). La capa orgánica se filtró antes de su secado (Na₂SO₄) y concentración para obtener un aceite amarillo. La purificación por cromatografía flash o HPLC preparatoria produjo N-(2-(tert-butoxicarbonil)etil)-Gly-OBn en forma de aceite claro (0,739 g, 17%).

¹H-NMR (CDCl₃) δ: ppm 1,46 (s; 9H) 2,50 - 2,61 (m, 2H) 2,82 - 2,99 (m; 2H) 3,31 (s, 2H) 5,14 (s; 2H) 7,29 - 7,43 (m, 5 H).

[0127] Se suspendió N-(2-(tert-butoxicarbonil)etil)-Gly-OBn (0,030 g, 0,1 mmol) y succinimidil tert-butiloctadecanedioato (descrito en el ejemplo 29, 0,050 mg, 0,1 mmol) en DMF seco (1 ml). Se añadió HOAt (0,014 g, 0,1 mmol) y DIEA (0,21 ml, 1,2 mmol). Se agitó la mezcla reactiva amarilla bajo nitrógeno durante 42 h. La mezcla reactiva se concentró. El residuo se redisolvió en AcOEt y se lavó con 0,1 N HCl (2x), agua (1x), se secó (Na₂SO₄) y se concentró para obtener tert-butil octadecandioil-N-(2-(tert-butoxicarbonil)etil)-Gly-OBn en un rendimiento de 85% (55 mg).

¹H-NMR (CDCl₃) δ: ppm 1,3 (m; 26H) 1,38 (s, 9H), 1,46 (s, 9 H), 1,6 (m; 4H), 2,2 (m; 2H), 2,35 (m, 2 H), 2,65 (m; 2H), 2,85 (s, 2 H) 3,65 (m; 2H), 5,15 (s, 2 H) 7,35 (m, 5 H).

[0128] Se disolvió tert-butil octadecandioil-N-(2-(tert-butoxicarbonil)etil)-Gly-OBn (0,054 g, 0,08 mmol) en THF (2 ml). Se añadió 10% de paladio en carbón y la mezcla se hidrogenó en 1 atm y a temperatura ambiente durante todo el fin de semana. La mezcla reactiva seca se disolvió en AcOEt y se filtró 3 veces para eliminar el carbono. El filtrado se concentró para producir tert-butil octadecandioil-N-(2-(tert-butoxicarbonil)etil)-Gly-OH en un rendimiento del 80% (37 mg).

¹H-NMR (CDCl₃) δ: ppm 1,3 (m; 26H) 1,40 (s, 9H), 1,46 (s, 9 H), 1,6 (m; 4H), 1,75 (p; 2H), 2,2 (m; 2H), 2,35 (m, 2 H), 2,63 (m; 2H), 2,83 (s, 2 H).

[0129] El tert-butil octadecandioil-N-(2-(tert-butoxicarbonil)etil)-Gly-OH (0,07 mmol) se disolvió en THF seco (2 ml). Se añadió TSTU (24 mg, 0,08 mmol) y DIPEA (15 uL, 0,08 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Después de 19 h, la reacción no había finalizado según TLC (DCM/MeOH 10:1). Se añadió más DIEA (20 uL, 0,11 mmol) y se continuó la agitación. Después de 42 h, la mezcla reactiva se filtró. El filtrado se diluyó con AcOEt y se lavó con 0,1 N HCl (2x) y una solución salina (1x), se secó (Na₂SO₄) y se concentró para producir tert-butil octadecandioil-N-(2-(tert-butoxicarbonil)etil)-Gly-OSu en forma de sólido blanco en un rendimiento del 84% (36 mg).

¹H-NMR (CDCl₃) δ: ppm 1,3 (m; 26H) 1,40 (m, 2H), 1,44 (s; 9H), 1,46 (s, 9 H), 1,58 (m; 2H), 1,73 (p; 2H), 2,2 (t; 2H), 2,60 (t; 2H), 2,8 (m, 6 H).

EJEMPLO 31

Síntesis de N^{εB29}-[N-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-N-(carboxietil)-Gly] des(B30) insulina humana

[0130] Este compuesto se preparó en analogía con el ejemplo 30, mediante la reacción de N-(2-(tert-butoxicarbonil)etil)-Gly-OBn con succinimidil hexadecandioato (descrito en el ejemplo 4), seguido de una desbencilación, activación con TSTU, acoplamiento con A1N, B1N-diBOC-Des(B30) insulina humana y desprotección por TFA. MALDI-MS: 6093,0, calculado 6104,1.

EJEMPLO 32

Síntesis de N^{εB29}-[N-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-N-(carboximetil)-β-Ala] des(B30) insulina humana

[0131] Este compuesto se preparó en analogía con el ejemplo 29 mediante la reacción de N-(tert-butoxicarbonilmetil)-β-Ala-OBn con succinimidil hexadecandioato (descrito en el ejemplo 4), seguido de una desbencilación, activación con TSTU, acoplamiento con A1N, B1N-diBOC-Des(B30) insulina humana y desprotección por TFA. MALDI-MS: 6097,6, calculado 6104,1.

EJEMPLO 33

Síntesis de N^{εB29}-[N^α-(HOOC(CH₂)₁₁)NHCO(CH₂)₃CO]-γ-L-Glu] des(B30) insulina humana

[0132] Este compuesto se preparó de forma similar a lo que se describe en el ejemplo 1, mediante el uso de (MeOOC(CH₂)₁₁)NHCO(CH₂)₃CO)-Glu(OSu)-OMe, preparado tal y como se describe más abajo, en forma de agente acilante.
LCMS (electrospray): M+3: 2049, calculado 2050 M+4: 1538, calculado 1537,8 M+5: 1231, calculado 1230,4.
MALDI-TOF MS: calculado: 6147; determinado: 6153.

Preparación de (MeOOC(CH₂)₁₁)NHCO(CH₂)₃CO)-Glu(OSu)-OMe

[0133] Se enfrió MeOH (40 ml) a 0-5 °C y se añadió gota a gota SOCl₂ (4 ml) en agitación durante 30 minutos. Se añadió ácido 12-aminododecanóico (3 g, 13,9 mmol) y se agitó la suspensión obtenida a 0-5 °C mientras que el hielo del baño de enfriamiento se derretía y permitía el calentamiento a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla se filtró y el sólido se secó por succión para proveer 2,23 g (60%) de hidrocloreto de éster metílico de ácido 12-aminododecanóico. Se aisló otro lote del licor madre de 0,92 g (25%).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 7,97 (bs; 3H), 3,58 (s; 3H), 2,73 (m, 2H), 2,28 (t; 2H), 1,52 (m; 4H), 1,25 ("s", 14H).

[0134] El hidrocloreto de éster metílico de ácido 12-aminododecanoico (1 g, 3,8 mmol) se suspendió en THF (15 ml) y se añadió anhídrido de ácido glutárico (1,29 g, 3,8 mmol) y TEA (0,52 ml, 3,8 mmol) y la mezcla resultante (suspensión) se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Se añadió agua (75 ml) gradualmente. Después de 25 ml, se obtuvo una solución y más tarde apareció una suspensión. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y se filtró. El sólido se lavó con agua y se secó *in vacuo*. Esto produjo 1,02 g (80%) de éster metílico de ácido dodecanoico 12-(4-carboxibutirilamino).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 12 (bs; 1H), 7,73 (t; 1H), 3,57 (s; 3H), 3,00 (q; 2H), 2,28 (t; 2H), 2,18 (t; 2H), 2,06 (t; 2H), 1,69 (p; 2H), 1,50 (p; 2H), 1,36 (p; 2H), 1,23 ("s", 14H).

[0135] El éster metílico de ácido dodecanoico 12-(4-carboxibutirilamino) (0,33 g, 0,95 mmol) se disolvió en una mezcla de THF y DMF (2:1,6 ml) y se añadió DIEA (0,178 ml, 1,04 mmol). La mezcla se enfrió a 0-5 °C y se añadió TSTU (0,314 g, 1,04 mmol). La mezcla se agitó a 0-5 °C durante 1 hora y a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla se concentró hasta su secado *in vacuo*. El residuo (éster metílico ácido dodecanoico OSu-activado 12-(4-carboxibutirilamino)) se disolvió en DMF (10 ml) y se añadió DIEA (0,24 ml, 1,4 mmol) y H-Glu-OMe (0,168 g, 1,04 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla se concentró *in vacuo* y el residuo se disolvió en AcOEt (100 ml) y se lavó con 0,2M de ácido clorhídrico (3 x 50 ml). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄) y se concentró *in vacuo*. Esto produjo 0,358 g (78%) de (MeOOC(CH₂)₁₁)NHCO(CH₂)₃CO)-Glu-OMe.

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 12 (bs; 1H), 8,22 (d; 1H), 7,73 (t; 1H), 4,24 (m; 1H), 3,61 (s; 3H), 3,57 (s; 3H), 3,00 (q; 2H), 2,27 (m; 4H), 2,10 (t; 2H), 2,04 (t; 2H), 1,9 (m; 1H), 1,8 (m; 1H), 1,68 (t; 2H), 1,50 (m; 2H), 1,36 (m; 2H), 1,23 ("s", 14H).

[0136] (MeOOC(CH₂)₁₁)NHCO(CH₂)₃CO)-Glu-OMe (0,36 g, 0,36 mmol) se disolvió en THF (10 ml) y se enfrió a 0-5 °C. Se añadió DIEA (0,13 ml) y TSTU (0,129 g, 0,43 mmol) y la mezcla se agitó a 0-5 °C durante unas horas y a temperatura ambiente durante 3 días. La mezcla se concentró *in vacuo*. El residuo se disolvió en AcOEt (100 ml) y se lavó con 0,2N de ácido clorhídrico (3 x 50 ml) y NaHCO₃ saturado acuoso (3 x 100 ml). Se secó (Na₂SO₄) y la concentración *in vacuo* proporcionó 0,17 g (84%) de (MeOOC(CH₂)₁₁)NHCO(CH₂)₃CO)-Glu(OSu)-OMe.

¹H-NMR (DMSO-d₆) picos seleccionados, δ: 8,27 (d; 1H), 7,72 (t; 1H), 4,31 (m; 1H), 3,63 (s; 3H), 3,57 (s; 3H), 3,00 (q; 2H), 2,81 (s; 4H), 2,28 (t; 2H), 2,12 (t; 2H), 2,05 (t; 2H), 1,70 (m; 2H), 1,50 (m; 2H), 1,35 (m; 2H), 1,23 ("s", 14H).

EJEMPLO 34

Síntesis de N^{εB29}-[N^α-(HOOC(CH₂)₁₁)NHCO(CH₂)₂CO]-γ-L-Glu] des(B30) insulina humana

[0137] Este compuesto se preparó de forma similar a lo que se describe en el ejemplo 1 mediante el uso de (MeOOC(CH₂)₁₁)NHCO(CH₂)₂CO)-Glu(OSu)-OMe, el cual a su vez se preparó de forma similar a lo que se describe en el ejemplo 33, mediante el uso de anhídrido de ácido succínico en vez de anhídrido de ácido glutárico como agente acilante.

MALDI-TOF MS: calculado: 6133; determinado: 6134.

EJEMPLO 35

Síntesis de N^{εB29}-[N^α-(HOOC(CH₂)₁₆CO)]-Gly-γ-L-Glu des(B30) insulina humana

[0138] Este compuesto se preparó de forma similar a lo que se describe en el ejemplo 4, usando tert-butil octadecandioil-Gly-Glu(OSu)-O^tBu, preparado tal y como se describe más abajo, en forma de agente acilante.

[0139] MALDI-TOF MS: calculado: 6189; determinado: 6191.

Preparación de tert-butil octadecandioil-Gly-Glu(OSu)-OtBu

- 5 [0140] A Z-Gly-OH (1,0 g, 4,78 mmol) se añadió THF (10 ml), DIEA (0,98 ml, 5,74 mmol) y TSTU (1,7 g, 5,74 mmol) y la mezcla obtenida se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. AcOEt (100 ml) se añadió y la mezcla se lavó con 0,2N de ácido clorhídrico (100 ml) y agua (2 x 100 ml). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄) y se concentró *in vacuo* para proporcionar 1,34 g (92%) de Z-Gly-OSu en forma de aceite.
¹H-NMR (CDCl₃), δ: 7,35 (s; 5H), 5,32 (t; 1H), 5,15 (s; 2H), 4,35 (d; 2H), 2,83 (s, 4H).
- 10 [0141] Z-Gly-OSu (1,3 g, 4,25 mmol) se disolvió en DMF (15 ml) y DIEA (1,82 ml, 10,6 mmol) y se añadió H-Glu-O^tBu (0,949 g, 4,67 mmol), la mezcla obtenida se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Se añadió AcOEt (100 ml) y se lavó la mezcla con 0,2N de ácido clorhídrico (100 ml) y agua (2 x 100 ml). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄) y se concentró *in vacuo* para proporcionar 1,7 g (cant.) de Z-Gly-Glu-O^tBu en forma de aceite.
¹H-NMR (CDCl₃), δ: 7,33 (s; 5H), 7,1 (d; 1H), 5,80 (t; 1H), 5,12 (s; 2H), 4,53 (m; 1H), 3,90 (d; 2H), 2,36 (t; 2H), 2,22 (m; 1H), 1,95 (m; 1H), 1,45 (s, 9H).
- 15 [0142] Se disolvió Z-Gly-Glu-O^tBu (1,7 g, 4,3 mmol) en 1,4-dioxano (15 ml) y se añadió 10% de paladio negro (0,6 g) bajo N₂. La mezcla se hidrogenó bajo presión atmosférica durante 5 horas. La mezcla se filtró y se agitó el paladio con agua (200 ml) durante 2 horas, se filtró y se liofilizó el filtrado. Esto produjo 0,65 g (58%) de H-Gly-Glu-O^tBu.
¹H-NMR (DMSO-d₆), picos seleccionados, δ: 8,31 (d; 1H), 2,20 (t; 2H), 1,91 (m; 1H), 1,80 (m; 1H), 1,40 (s, 9H).
- 20 [0143] Se suspendió H-Gly-Glu-O^tBu (0,15 g, 0,58 mmol) en DMF (5 ml) y DIEA (0,15 ml, 0,86 mmol) y se añadió succinimidil tert-butil octadecandioato (0,27 g, 0,58 mmol), la mezcla obtenida se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Se añadió AcOEt (50 ml) y se lavó la mezcla con 0,2N de ácido clorhídrico (100 ml) y agua (3 x 100 ml). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄) y se concentró *in vacuo* para proporcionar 0,34 g (cant.) de tert-butil octadecandioil-Gly-Glu-O^tBu.
¹H-NMR (CDCl₃), δ: 7,11 (d; 1H), 6,55 (t; 1H), 4,55 (dt; 1H), 4,00 (dq; 2H), 2,40 (t; 2H), 2,26 (t; 2H), 2,20 (t; 4H), 2,00 (m; 1H), 1,57-1,65 (m; 5H), 1,47 (s; 9H), 1,44 (s; 9H), 1,25 ("s", 22H, superposición con HDO).
- 25 [0144] Se disolvió el tert-butil octadecandioil-Gly-Glu-O^tBu (0,32 g, 0,52 mmol) en THF (5 ml) y se añadió DIEA (0,11 ml, 0,63 mmol) y TSTU (0,19 g, 0,63 mmol), la mezcla obtenida se agitó a temperatura ambiente bajo N₂ durante 3 días. Se añadió AcOEt (100 ml) y la mezcla se lavó con 0,15N de ácido clorhídrico (100 ml) y agua (3 x 100 ml). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄) y se concentró *in vacuo* para proporcionar 0,3 g (81 %) de tert-butil octadecandioil-Gly-Glu(OSu)-O^tBu.
¹H-NMR (CDCl₃), picos seleccionados, δ: 6,89 (d; 1H), 6,44 (t; 1H), 4,60 (m; 1H), 3,95 (dq; 2H), 2,86 (s; 4H), 2,68 (q; 2H), 2,24 (t; 2H), 2,20 (t; 4H), 1,57-1,65 (m; 5H), 1,48 (s; 9H), 1,44 (s; 9H), 1,25 ("s", 22H, superposición con HDO).
- 30
- 35

EJEMPLO 36

- 40 Síntesis de N^εB²⁹-[N-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-N-(2-carboxietil)-β-Ala] insulina humana desB30

- 45 [0145] Este compuesto se preparó en analogía con el ejemplo 1, mediante el acoplamiento de 15-[[2-(2,5-dioxo-pirrolidina-1-iloxicarbonil)-etil]-(2-metoxicarbonil-etil)-carbamoil]-éster metílico de ácido pentadecanóico con des(B30) insulina humana y la desprotección por NaOH.
 LC-MS: M+4. 1530,3, calculado 1529,5

Preparación de metil hexadecandioil N-(2-(metoxicarbonil)etil)-β-Ala-OSu

- 50 [0146] Se disolvió hidrocloreto H-β-Ala-OMe (5,45 g, 39 mmol) en DMSO (100 ml) y se añadió acrilato tert-butilico (5,71 ml, 39 mmol) y DIEA (13,4 ml, 78 mmol), la mezcla obtenida se agitó a temperatura ambiente durante 6 días. La mezcla se repartió en agua (500 ml) y AcOEt (2 x 250 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con NH₄Cl saturado acuoso, se secaron (MgSO₄) y se concentraron *in vacuo*. Esto produjo 7,24 g (80%) de N-(2- (metoxicarbonil)etil)-β-Ala-OtBu.
¹H-NMR (CDCl₃), δ: 3,58 (s; 3H), 2,72 (t; 2H), 2,67 (t; 2H), 2,41 (t; 2H), 2,29 (t; 2H), 1,39 (s, 9H).
- 55 [0147] Se disolvió éster de monometil de ácido hexadecanodióico (150 mg, 0,5 mmol) en DMF (5 mL). HOAt (102 mg, 0,75 mmol), se añadió EDAC (143 mg, 0,75 mmol) y la reacción se agitó a 50°C durante 1 hora. Tras el enfriamiento a temperatura ambiente, se añadió DIEA (0,256 mL, 1,5 mmol) y N-(2-(metoxicarbonil)etil)-β-Ala-OtBu (139 mg, 0,6 mmol). Se agitó la reacción durante toda la noche a temperatura ambiente. La mezcla se repartió en agua (2 x 50 mL) y AcOEt (100 mL). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄) y se concentró *in vacuo* en un aceite. Se añadió DCM (10 mL) y TFA (10 mL) y la mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, se eliminó el solvente *in vacuo* para proporcionar 170 mg (87 %) de metil hexadecandioil N-(2-(metoxicarbonil)etil)-β-Ala-OH.
 LC-MS: 458 (M+1).
- 60
- 65

[0148] Se disolvió el metil hexadecandioil N-(2-(metoxicarbonil)etil)-β-Ala-OH (161 mg, 0,351 mmol) en THF (10 mL), se añadió DIEA (0,073 mL, 0,42 mmol) y TSTU (127 mg, 0,42 mmol). Se agitó la mezcla durante su enfriamiento en un baño de hielo durante 30 min, seguido de una agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla se repartió en AcOEt (100 mL) y HCl acuoso (0,2 N, 2x 80 mL). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄) y se concentró *in vacuo*. Esto produjo 140 mg (72 %) de metilo hexadecandioil N-(2-(metoxicarbonil)etil)-β-Ala-OSu como un aceite. LC-MS: 555 (M+1).

EJEMPLO 37

Síntesis de N^{εB29}-[N-(HOOC(CH₂)₁₆CO)-N-(2-carboxietil)-β-Ala] insulina humana des B30

[0149] Este compuesto se preparó en analogía con el ejemplo 1 y 36 mediante el acoplamiento de metil octadecandioil N-(2-(metoxicarbonil)etil)-β-Ala-OSu con des(B30) insulina humana y la desprotección por NaOH.

Preparación de metil octadecandioil N-(2-(metoxicarbonil)etil)-β-Ala-OSu

[0150] Este compuesto se sintetizó en analogía con el metil hexadecandioil N-(2-(metoxicarbonil)etil)-β-Ala-OSu mediante el uso de éster mono metílico de ácido octadecanodióico.

MALDI-TOF MS: calculado 6146; determinado: 6151

LC-MS: 583 (M+1)

MÉTODOS FARMACOLÓGICOS

Ensayo (I)

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

[0151] La afinidad de los análogos de insulina de la invención con el receptor de insulina humana se determinó mediante un ensayo SPA (ensayo de proximidad de centelleo) ensayo de captura de anticuerpos en placa de microtitulación. Se mezclaron perlas de unión al anticuerpo SPA-PVT y reactivo anti-ratón (Amersham Biosciences, Cat No. PRNQ0017) con 25 ml de tampón de unión (100 mM HEPES pH 7,8, 100 mM cloruro sódico, 10 mM MgSO₄, 0,025% Tween-20). La mezcla reactiva para un único Packard Optiplate (Packard No. 6005190) se compone de 2,4 µl de un receptor - exón 11 de insulina humana recombinante purificada diluido a 1:5000, una cantidad de una solución madre de insulina humana A14 Tyr^[125I] correspondiente a 5000 cpm por 100 µl de mezcla reactiva, 12 µl de una dilución a 1:1000 de anticuerpo F12, 3 ml de perlas SPA y tampón de unión hasta un total de 12 ml. Un total de 100 µl se añadieron después y se realizó una serie de diluciones a partir de muestras apropiadas. A la serie de diluciones se añadió después 100 µl de mezcla reactiva y las muestras se incubaron durante 16 horas en agitación suave. Las fases se separaron después por centrifugado durante 1 min y las placas se contaron en un Topcounter. Los datos de unión se ajustaron mediante el uso del algoritmo de regresión no lineal en el GraphPad Prism 2.01 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Preparación de anticuerpos mIR monoclonales

[0152] Se produjeron anticuerpos específicos (F12) mediante una técnica monoclonal: se inmunizaron ratones RBF por inyección de 50 µg de mIR purificado en FCA seguido de dos inyecciones subcutáneas con 20 µg de mIR en FIA. Los ratones de respuesta alta fueron estimulados por vía intravenosa con 25 µg de mIR y se retiraron los bazo después de 3 días. Las células de bazo se fusionaron con la línea celular de mieloma de zorro (Köhler, G & Milstein C. (1976), European J. Immunology, 6:511-19; Taggart RT *et al* (1983), Science 219:1228-30). Se seleccionaron sobrenadantes para la producción de anticuerpos en una técnica ELISA específica mIR. Se clonaron los pocillos positivos y se evaluaron mediante la técnica de transferencia Western.

Tabla 2

Producto	Unión al receptor (% de insulina humana)
Insulina humana	100
N ^{εB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₄ CO-γ-Glu) Des(B30) insulina humana	26
N ^{εB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₆ CO-γ-Glu) Des(B30) insulina humana	9,2
N ^{εB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₆ CO-γ-Glu-N-(γ-Glu) Des(B30) insulina humana	11
N ^{εB29} -(N-(Asp-OC(CH ₂) ₁₆ CO)-γ-Glu) Des(B30) insulina humana	13
N ^{εB29} -(N-(Glu-OC(CH ₂) ₁₄ CO-γ-Glu) Des(B30) insulina humana	13

N ^{εB29} -(N-(Glu-OC(CH ₂) ₁₄ CO-) Des(B30) insulina humana	9,4
N ^{εB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₆ CO-α-Glu)-N-(β-Asp) Des(B30) insulina humana	11
N ^{εB29} -(N-(Gly-OC(CH ₂) ₁₃ CO-γ-Glu) Des(B30) insulina humana	22
N ^{εB29} -(N-(Sar-OC(CH ₂) ₁₃ CO-γ-Glu) Des(B30) insulina humana	20
N ^{εB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₆ CO-α-L-Asp)-N-(β-L-Asp) Des(B30) insulina humana	14
N ^{εB29} -(N-(Gly-OC(CH ₂) ₁₄ CO-γ-Glu) Des(B30) insulina humana	32
N ^{εB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₅ CO-γ-L-Glu) Des(B30) insulina humana	4
N ^{εB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₄ CO-β-L-Asp) Des(B30) insulina humana	16
N ^{εB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₄ CO-β-D-Asp) Des(B30) insulina humana	37
N ^{εB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₃ CO-β-L-Glu) Des(B30) insulina humana	15
N ^{εB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₃ CO-β-L-Asp) Des(B30) insulina humana	11
N ^{εB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₆ CO-δ-L-Aad) Des(B30) insulina humana	7
N ^{εB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₆ CO-γ-D-Glu) Des(B30) insulina humana	13
N ^{εB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₅ CO-β-L-Asp) Des(B30) insulina humana	5,4
N ^{εB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₆ CO-α-L-Asp) Des(B30) insulina humana	13
N ^{εB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₆ CO-α-L-Glu) Des(B30) insulina humana	16
N ^{εB29} -(N-(HOOC(CH ₂) ₁₄ CO-ε-L-LysCO-) Des(B30) insulina humana	5,7
N ^{εB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₆ CO-β-L-Asp) Des(B30) insulina humana	11
N ^{εB29} -(N-(Gly-OC(CH ₂) ₁₆ CO-γ-L-Glu) Des(B30) insulina humana	9,1
N ^{εB29} -[N-(HOOC(CH ₂) ₁₆ CO)-N-(carboximetil)-β-Ala] Des(B30) insulina humana	9,4
N ^{εB29} -[N ⁰ -(HOOC(CH ₂) ₁₁)NHCO(CH ₂) ₃ CO)-γ-L-Glu] Des(B30) insulina humana	46

Ensayo (II)

Potencia de los derivados de insulina de la invención con respecto a la insulina humana

[0153] Para el experimento de fijación se usó ratas macho Sprague Dawley con un peso de 238-383 g el día del experimento. Las ratas tenían acceso libre a alimentos en condiciones ambientales controladas y se quedaron en ayuno durante toda una noche (desde las 3 pm) antes del experimento de fijación.

Protocolo Experimental

[0154] Las ratas se aclimataron a las instalaciones para animales durante al menos 1 semana antes del procedimiento quirúrgico. Aproximadamente 1 semana antes del experimento de fijación se insertaron catéteres Tygon bajo anestesia con halotano en la vena yugular (para infusión) y la arteria carótida (para muestra de sangre) y éstos se exteriorizaron y se fijaron en la parte posterior del cuello. Las ratas recibieron *Streptocilin vet.* (Boehringer Ingelheim; 0,15 ml/rata, i.m.) post-quirúrgicamente y se dispusieron en una unidad de cuidado animal (25 °C) durante el periodo de recuperación. Para obtener analgesia, se administró Anorfina (0,06 mg/rata, s.c.) durante la anestesia y se administró Rimadyl (1,5 mg/kg, s.c.) después de la recuperación completa de la anestesia (2-3 h) y de nuevo una vez al día durante 2 días.

[0155] La técnica de fijación empleada se adaptó según (1). A las 7 am el día del experimento, en ayuno durante toda la noche (desde las 3 pm del día anterior), se pesaron las ratas y éstas se conectaron a las jeringas de toma de muestras y al sistema de infusión (bombas básicas Harvard 22, de Harvard, y jeringa de vidrio Perfectum Hypodermic, de Aldrich) y éstas se colocaron después en jaulas de fijación individuales en las que permanecieron durante aprox. 45 min antes del inicio del experimento. Las ratas podían moverse libremente en su lecho habitual durante todo el experimento y tenían acceso libre al agua potable. Después de un periodo basal de 30 min durante el cual se midieron los niveles de glucosa en sangre en intervalos de 10 min, el derivado de insulina que se iba a experimentar y la insulina humana (una dosis por rata, n = 6-7 por nivel de dosis) se inyectaron (i.v.) a una velocidad constante durante 300 min. Los niveles de glucosa en sangre se midieron en intervalos de 10 min y se ajustó la infusión de 20% de glucosa acuosa en ese sentido para mantener la euglucemia. Se agruparon muestras de eritrocitos resuspendidos de cada rata y se restituyeron en aproximadamente ½ ml de volúmenes a través del catéter carótido.

[0156] Cada día del experimento, se tomaron muestras de las soluciones de los derivados de insulina individuales que se tenían que evaluar y la solución de insulina humana antes y al final de los experimentos de fijación, y las concentraciones de los péptidos se confirmaron por HPLC. Las concentraciones de plasma de insulina de rata y de péptido C, al igual que las del derivado de insulina a evaluar y de insulina humana, se midieron en momentos pertinentes antes y al final de los estudios. Se mataron las ratas al final de experimento mediante una sobredosis de pentobarbital.

[0157] **Compuestos y dosis de prueba:** las insulinas que se tenían que someter a prueba se diluyeron a partir de una solución madre comprendiendo 97 μM del derivado de insulina en 5mM de fosfato pH 7,7. La concentración final de la solución lista para el uso era de 0,45 μM del derivado de insulina, 5 mM de fosfato, 100 mM de cloruro sódico, 0,007% de polisorbato 20. El pH era 7,7 y la velocidad de infusión i.v. de 15 y 20 $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$.

[0158] Una solución madre de insulina humana usada en forma de compuesto de referencia se formuló en un medio similar y se inyectó i.v. en 6, 15 o 30 $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$.

[0159] Ambas soluciones madre se almacenaron a -20°C y se descongelaron durante toda la noche a 4°C antes de ser usadas. Se voltearon despacio las soluciones boca abajo varias veces durante 15 min antes de transferirlas a las jeringas de infusión.

Tabla 3

Derivado de insulina	Potencia con respecto a la insulina humana
$\text{N}^{\text{B29}}\text{-(N-HOOC(CH}_2\text{)}_{14}\text{CO-}\gamma\text{-Glu des(B30) insulina humana}$	>50%
$\text{N}^{\text{B29}}\text{-(N-HOOC(CH}_2\text{)}_{16}\text{CO-}\gamma\text{-Glu des(B30) insulina humana}$	>50%
$\text{N}^{\text{B29}}\text{-(N-HOOC(CH}_2\text{)}_{16}\text{CO-}\gamma\text{-Glu-N-(}\gamma\text{-Glu) des(B30) insulina humana}$	>50%
$\text{N}^{\text{B29}}\text{-(N-HOOC(CH}_2\text{)}_{14}\text{CO-}\beta\text{-L-Asp) des(B30) insulina humana}$	>50%
$\text{N}^{\text{B29}}\text{-(N-(Gly-OC(CH}_2\text{)}_{14}\text{CO-}\gamma\text{-Glu) des(B30) insulina humana}$	>50%
$\text{N}^{\text{B29}}\text{-(N-HOOC(CH}_2\text{)}_{14}\text{CO-O-L-Asp) des(B30) insulina humana}$	>50%

Ensayo (III)

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

[0160] $T_{50\%}$ es el tiempo en el que el 50% de una cantidad inyectada del derivado marcado A14 Tyr¹²⁵I de una insulina que se debe evaluar desapareció del sitio de inyección según la medición con un γ -contador externo.

[0161] Se siguieron los principios de cuidados de animales de laboratorio, se usaron cerdos hembra no diabéticos sin patógenos específicos LYYD, cruzados con Danish Landrace, Yorkshire y Duroc (Holmenlund, Haarlov, Dinamarca) para estudios farmacodinámicos y farmacocinéticos. Las cerdas estaban conscientes, tenían de 4-5 meses de edad y un peso de 70-95 kg. Los animales estuvieron en ayunas toda una noche durante 18 h antes del experimento.

[0162] Las preparaciones formuladas de derivados de insulina marcados en Tyr^{A14} con ¹²⁵I se inyectaron s.c. en las cerdas tal como se ha descrito anteriormente (Ribel, U., Jørgensen, K, Brange, J, and Henriksen, U. The pig as a model for subcutaneous insulin absorption in man. Serrano-Rios, M and Lefèvre, P. J. 891-896. 1985. Amsterdam; New York; Oxford, Elsevier Science Publishers. 1985 (Conference Proceeding)).

[0163] Al inicio de los experimentos se inyectó una dosis de 60 nmol del derivado de insulina según la invención (compuesto de prueba) y una dosis de 60 nmol de insulina detemir (ambos ¹²⁵I marcados en Tyr A14) en dos sitios separados del cuello de cada cerda.

[0164] La desaparición del marcador radiactivo del sitio de inyección sc. se monitorizó mediante una modificación del método de conteo gamma externo tradicional (Ribel, U. Subcutaneous absorption of insulin analogues. Berger, M. and Gries, F. A. 70-77 (1993). Stuttgart; New York, Georg Thime Verlag (Conference Proceeding)). Con este método modificado se pudo medir continuamente la desaparición de la radioactividad de un depósito subcutáneo durante varios días mediante el uso de un dispositivo portátil inalámbrico (Scancys Laboratorieteknik, Værløse, DK-3500, Dinamarca). Las mediciones se realizaron en intervalos de 1 min y los valores contados se corrigieron para una actividad de fondo.

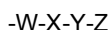
[0165] En la tabla 4, la columna "ensayo/detemir" muestra el $T_{50\%}$ determinado para cada uno de los compuestos probados ("prueba") y el $T_{50\%}$ determinado para la insulina detemir ("detemir") en el mismo experimento.

Tabla 4

Derivado de insulina	T _{50%} , horas prueba/detemir
N ^{εB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₄ CO-γ-Glu) Des(B30) insulina humana	9,0/9,5
N ^{εB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₆ CO-γ-Glu) Des(B30) insulina humana	10,6/9,7
N ^{εB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₆ CO-γ-Glu-N-(γ-Glu) Des(B30) insulina humana	7,8/7,4
N ^{εB29} -(N-(Asp-OC(CH ₂) ₁₆ CO-γ-Glu) Des(B30) insulina humana	3,5/7,4
N ^{εB29} -(N-(Asp-OC(CH ₂) ₁₆ CO-) Des(B30) insulina humana	4,1/7,4
N ^{εB29} -(N-HOOC(CH ₂) ₁₆ CO-α-Glu)-N-(β-Asp) Des(B30) insulina humana	8,7/9,1

REIVINDICACIONES

1. Derivado de insulina de la des(B30) insulina humana que posee una cadena lateral fijada al grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de des(B30) insulina humana, la cadena lateral tiene la fórmula general:



donde W es:

- un residuo de α -aminoácido con un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral, este aminoácido está seleccionado del grupo que consiste en α -Asp, β -Asp, α -Glu, γ -Glu, α -hGlu y δ -hGlu y este residuo forma, con uno de sus grupos de ácido carboxílico, un grupo de amida con el grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la des(B30) insulina humana;

X es:

- $-\underline{\text{CO}}-$;

Y es:

- $-(\text{CH}_2)_m$ donde m es un número entero en el intervalo de 12 a 16;

y

Z es:

- $-\text{COOH}$;

y cualquier complejo Zn^{2+} de los mismos.

2. Derivado de insulina según la reivindicación 1, donde el derivado de insulina consiste en $\text{N}^{\epsilon\text{B29}}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})-\gamma\text{-Glu})$ des(B30) insulina humana.

3. Complejo de zinc de un derivado de insulina según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde cada hexámero de insulina se enlaza con dos iones de zinc.

4. Complejo de zinc de un derivado de insulina según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 donde cada hexámero de insulina se enlaza con tres iones de zinc.

5. Complejo de zinc de un derivado de insulina según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 donde cada hexámero de insulina se enlaza con cuatro iones de zinc

6. Composición farmacéutica para el tratamiento de la diabetes en un paciente que necesita tal tratamiento, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de insulina según la reivindicación 1 junto con un soporte farmacéuticamente aceptable.

7. Composición farmacéutica para el tratamiento de la diabetes en un paciente que necesita tal tratamiento, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de insulina según la reivindicación 1 mezclado con una insulina o un análogo de insulina que presenta un inicio rápido de acción, junto con un soporte farmacéuticamente aceptable.

8. Composición farmacéutica según la reivindicación 7, donde el derivado de insulina es $\text{N}^{\epsilon\text{B29}}-(\text{N}^{\alpha}-(\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO})-\gamma\text{-Glu})$ des(B30) insulina humana y el análogo de insulina que presenta un inicio rápido de acción es insulina humana Asp^{B28} .

9. Derivado de insulina según la reivindicación 1 para su uso en forma de medicamento 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 soporte farmacéuticamente aceptable.

10. Derivado de insulina según la reivindicación 1 para su uso en forma de medicamento 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 rápido de acción, junto con un soporte farmacéuticamente aceptable.