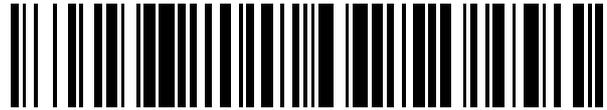


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 924**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/62**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.08.2008 E 08787262 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014 EP 2178910**

54 Título: **Insulinas con una fracción acilo que comprende unidades repetitivas de aminoácidos que contienen alquilenglicol**

30 Prioridad:

**15.08.2007 EP 07114387**

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

**16.01.2015**

73 Titular/es:

**NOVO NORDISK A/S (100.0%)  
Novo Allé  
2880 Bagsværd, DK**

72 Inventor/es:

**MADSEN, PETER;  
KJELDSEN, THOMAS BØRGLUM;  
KODRA, JÁNOS TIBOR y  
GRAM, DORTE XENIA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 526 924 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

Insulinas con una fracción acilo que comprende unidades repetitivas de aminoácidos que contienen alquilenglicol

## 5 Campo de esta invención

La presente invención se refiere a nuevos análogos acilados de la insulina y a aspectos relacionados.

## 10 Antecedentes de esta invención

10 La insulina es una hormona polipeptídica segregada por las células  $\beta$  del páncreas. La insulina consta de dos cadenas polipeptídicas denominadas las cadenas A y B que están unidas entre sí por dos puentes disulfuro intercatenarios. En la insulina humana, porcina y bovina, las cadenas A y B contienen 21 y 30 residuos de aminoácidos, respectivamente. Sin embargo, existen variaciones de una especie a otra entre los residuos de aminoácidos presentes en las diferentes posiciones en las dos cadenas. El uso ampliamente generalizado de la ingeniería genética ha hecho posible preparar análogos de las insulinas de origen natural mediante intercambio de uno o más residuos de aminoácidos.

20 La insulina se utiliza para el tratamiento de la diabetes y de las enfermedades asociadas o que son consecuencia de ella. La insulina es esencial para mantener la regulación metabólica normal. Habitualmente, la insulina se administra mediante inyecciones. Desafortunadamente, muchos diabéticos no están dispuestos a emprender un tratamiento intensivo debido al malestar asociado a las muchas inyecciones necesarias para mantener un estrecho control de la glucemia. Luego de la administración oral, la insulina se degrada rápidamente en el tubo gastrointestinal y no es absorbida en el torrente sanguíneo. Por consiguiente, se han investigado rutas alternativas para administrar la insulina como las vías oral, rectal, transdérmica y nasal. Hasta ahora, sin embargo, estas vías de administración no han resultado en una absorción de la insulina suficientemente eficaz.

25 Durante décadas, se ha contado con preparaciones de insulina tanto de acción prolongada como de rápida acción y muchos pacientes reciben 2 a 4 inyecciones por día. En las últimas décadas, ha resultado que es extremadamente importante para un paciente diabético mantener un control estricto de la glucemia.

30 La administración pulmonar eficaz de una proteína depende de la capacidad para administrar la proteína al epitelio alveolar de la zona profunda del pulmón. Las proteínas que se depositan en el epitelio de las vías respiratorias superiores no se absorben en gran medida. Esto se debe a la mucosidad que las recubre que actúa como una barrera ante la absorción. Además, las proteínas depositadas en este epitelio son depuradas por el transporte mucociliar hacia las vías respiratorias y después eliminadas a través del tubo gastrointestinal. La medida en que las proteínas no son absorbidas y en cambio son eliminadas por estas rutas depende de su solubilidad, su tamaño, así como de otras características menos estudiadas. Las propiedades de los péptidos se pueden potenciar injertando moléculas orgánicas de tipo cadena en ellos. Dicho injerto puede mejorar las propiedades farmacéuticas como la vida media sérica, la estabilidad frente a la degradación proteolítica y una menor inmunogenia.

35 La solicitud de patente internacional número PCT/EP2007/057321 publicada alrededor del 21 de enero de 2008 (nuestra ref.: 7460) describe insulinas PEGiladas que no tienen grupos acilo. La solicitud de patente internacional número PCT/EP2007/ publicada alrededor del 29 de Agosto de 2007 (nuestra ref.: 7302) describe insulinas que tienen una cadena lateral compleja sin fracciones alquilenglicol. La solicitud de patente internacional que tiene el número de publicación WO 2006/082205 (nuestra ref.: 7142) describe insulinas que tienen una cadena lateral compleja.

40 Un producto de insulina humana vagamente definido denominado MIH2 se describe en Diabetes Technology & Therapeutics 4 (2002), 459-66, y en Metabolism 53 (2004), 54-8. Productos similares y relacionados se describen en la patente de Estados Unidos US 6,858,580. La solicitud de patente de Estados Unidos N° 2006/0183668 describe en la reivindicación 1 un derivado de insulina que es una insulina de origen natural o uno de sus análogos que tiene una cadena lateral unida al grupo  $\alpha$ -amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B o al grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina original, siendo la cadena lateral de fórmula -W-X-Y-Z cada uno de los cuales es según se definen en este documento.

## Definiciones

45 En este documento, el término insulina abarca las insulinas de origen natural, por ej., la insulina humana, así como los análogos de estas insulinas.

50 En este documento, el término análogo de la insulina abarca un polipéptido que tiene una estructura molecular que formalmente puede ser derivada de la estructura de una insulina de origen natural, por ej., la insulina humana, eliminando y/o sustituyendo (reemplazando) uno o más residuos de aminoácidos presentes en la insulina natural.

Preferentemente, los residuos de aminoácidos sustituidos son residuos de aminoácidos codificables. En este documento, también se usa la expresión insulina original o análogo de la insulina original para el análogo de la insulina. Principalmente, el término original se usa para diferenciarla de un análogo de la insulina que tiene una cadena lateral que, por ejemplo, puede ser introducida químicamente por acilación.

En este documento términos como A1, A2, A3 etc. indican la posición 1, 2 y 3, respectivamente, en la cadena A de la insulina (contando desde el extremo N-terminal). De manera similar, términos como B1, B2, B3 etc. indican la posición 1, 2 y 3, respectivamente, en la cadena B de la insulina (contando desde el extremo N-terminal). Empleando códigos de una letra para los aminoácidos, términos como A21A, A21G y A21Q indican que el aminoácido en la posición A21 es A, G y Q, respectivamente. Empleando códigos de 3 letras para los aminoácidos, las expresiones correspondientes son AlaA21, GlyA21 y GlnA21, respectivamente.

En este documento términos como desB29 y desB30 indican un análogo de la insulina que carece del residuo de aminoácido B29 o B30, respectivamente.

La numeración de las posiciones en las cadenas A y B en los análogos de la insulina se hace de manera que haya la mayor identidad entre los residuos de aminoácidos presentes en las posiciones con los mismos números en el análogo de la insulina y en la insulina humana.

En este documento, la expresión residuo de aminoácido abarca un aminoácido del que fue eliminado un átomo de hidrógeno de un grupo amino y/o del que fue eliminado un grupo hidroxilo de un grupo carboxilo y/o del que fue eliminado un átomo de hidrógeno de un grupo mercapto. De manera imprecisa, un residuo de aminoácido puede ser denominado un aminoácido.

En este documento, el término "codificable" relacionado a expresiones como aminoácido, residuo de aminoácido, péptido o residuo peptídico se usa para indicar un aminoácido, un residuo de aminoácido, un péptido o un residuo peptídico que puede ser codificado por un triplete ("codón") de nucleótidos, *vide* ingeniería genética.

En este documento, el término mutación abarca cualquier cambio en la secuencia de aminoácidos (sustituciones e inserciones con aminoácidos codificables así como eliminaciones).

A menos que se indique explícitamente, los aminoácidos mencionados en este documento son L-aminoácidos.

Con la expresión insulina de acción rápida se quiere dar a entender una insulina que tiene un inicio de acción más rápido que la insulina humana normal o de rutina.

Con la expresión perfil de acción prolongada en relación con la insulina así como con la expresión insulina basal se quiere dar a entender una insulina que tiene una duración de acción más prolongada que la insulina humana normal o de rutina.

Por elevada estabilidad física se quiere dar a entender que la tendencia a la fibrilación es menor del 50% de la de la insulina humana. La fibrilación se puede escribir como el retraso en el tiempo antes de que se inicie la formación de fibrillas en determinadas condiciones.

Un polipéptido con afinidad por el receptor de la insulina y el receptor IGF-1 es un polipéptido capaz de interactuar con un receptor de insulina y un receptor IGF-1 humano en un ensayo de unión adecuado. Dichos ensayos de receptores son bien conocidos en el área y se describen con más detalle en los ejemplos. Las insulinas aciladas de esta invención no se unirán al receptor IGF-1 o tendrán una afinidad más bien baja por dicho receptor. Más precisamente, las insulinas aciladas de esta invención tendrán una afinidad por el receptor IGF-1 de prácticamente la misma magnitud o menor que la de la insulina humana.

A beneficio de la conveniencia, a continuación se indican entre paréntesis los nombres de los aminoácidos con los códigos de tres letras y los códigos de una letra habituales: Glicina (Gly & G), prolina (Pro & P), alanina (Ala & A), valina (Val & V), leucina (Leu & L), isoleucina (Ile & I), metionina (Met & M), cisteína (Cys & C), fenilalanina (Phe & F), tirosina (Tyr & Y), triptófano (Trp & W), histidina (His & H), lisina (Lys & K), arginina (Arg & R), glutamina (Gln & Q), asparragina (Asn & N), ácido glutámico (Glu & E), ácido aspártico (Asp & D), serina (Ser & S) y treonina (Thr & T). Si, debido a errores de digitación, existen desviaciones de los códigos empleados habitualmente, aplican los códigos empleados habitualmente. Los aminoácidos presentes en las insulinas de esta invención son preferentemente aminoácidos que pueden ser codificados por un ácido nucleico. Los aminoácidos como Glu y Asp pueden estar en la forma  $\alpha$ ,  $\gamma$ , L o D.

Se han empleado las abreviaturas siguientes en la memoria y los ejemplos: Da es Dalton (peso molecular), kDa es kilo Dalton (= 1000 Da), PM es peso molecular, OSu es 1-succinimidiloxi = 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo, TA es temperatura ambiente, SA es ácido sinapínico y Su es 1-succinimidilo = 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo, TFA es ácido

trifluoroacético, DCM es diclorometano, NMP es *N*-metil pirrolidinona (1-metil-2-pirrolidinona), tBu es *tert*-butilo, OTBU es *tert*-butoxi, DIEA (y DIPEA) es *N,N*-diisopropiletilamina, TSTU es tetrafluoroborato de *N,N,N',N'*-tetrametil-*O*-(*N*-succinimidil)uronio, Tris es tris(hidroximetil)aminometano, VC es volumen de la columna, OEG es el aminoácido ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico, HSA seroalbúmina humana, TNBS es ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico, HOBT (o HOBt) es 1-hidroxibenzotriazol. HOAt es 1-hidroxi-7-azabenzotriazol, NaOH es hidróxido de sodio, DMF es *N,N*-dimetilformamida, THF es tetrahidrofurano, TFA es ácido trifluoroacético, mmol es milimoles, Fmoc es fluoren-9-ilmetoxicarbonilo, OEG es ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico (o un residuo de éste), gGlu (en este documento también denominado  $\gamma$ Glu) es ácido gamma-glutámico, y en el ejemplo 11, por conveniencia, se usan las anotaciones siguientes para especificar la secuencia de las fracciones acilo de las insulinas de la invención y del estado anterior de la técnica: C16 es hexadecanodioilo, C17 es heptadecanodioilo, C18 es octadecanodioilo, C20 es eicosanodioilo, gGlu es ácido gamma-glutámico, PEG3 es ácido 3-(2-[2-(2-aminoetoxi)-etoxi]etoxi)etoxi)propiónico, PEG5 es ácido 3-{2-[2-(2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi)etoxi]etoxi}etoxi)propiónico y PEG7 es ácido 3-[2-(2-[2-(2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi)etoxi]etoxi)etoxi]etoxi)etoxi)propiónico (las estructuras/secuencias completas se pueden encontrar en los ejemplos).

#### Objetivos de esta invención

El objetivo de esta invención es superar o mejorar al menos una de las desventajas del estado anterior de la técnica, o proporcionar una alternativa útil.

Un objetivo de esta invención es proporcionar derivados de insulina que tengan buena biodisponibilidad.

Un aspecto de esta invención es mejorar la absorción de las insulinas a través de los tejidos humanos.

Otro objetivo de esta invención es proporcionar derivados de insulina que se puedan administrar por vía pulmonar.

Otro aspecto de esta invención es mejorar la vida media *in vivo* de las insulinas.

Otro aspecto de esta invención es encontrar derivados de insulina con mayor potencia.

Otro aspecto de esta invención es encontrar derivados de insulina que tengan una estabilidad física satisfactoria.

Otro aspecto de esta invención es encontrar derivados de insulina que tengan una estabilidad química satisfactoria.

Otro aspecto de esta invención es encontrar derivados de insulina que tengan una estabilidad proteolítica satisfactoria.

Otro aspecto de esta invención es encontrar derivados de insulina que tengan una solubilidad satisfactoria.

Otro objetivo de esta invención es proporcionar derivados de insulina que tengan un perfil de acción prolongada.

Otro objetivo de esta invención es proporcionar derivados de insulina, que se puedan utilizar como insulinas basales.

Otro objetivo de esta invención es proporcionar derivados de insulina, que tengan elevadas afinidades de unión al receptor de la insulina.

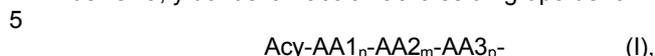
#### Resumen de esta invención

En resumen, esta invención se refiere a una insulina acilada en la que una fracción acilo está unida a la insulina original donde dicha fracción acilo comprende unidades repetitivas de aminoácidos que contienen alquilenglicol. En otro aspecto, esta invención se refiere a una insulina acilada, en la que la fracción acilo es un grupo de fórmula general (I):  $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$ , en la que *n* es 0 o un número entero en el intervalo 1-3, *m* es 0 o un número entero en el intervalo 1-6, *p* es un número entero en el intervalo 2-30, Acy es un ácido graso o un diácido graso que contiene 8 a 24 átomos de carbono del cual, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxi, AA1 es un aminoácido cíclico neutro del cual, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxi y, formalmente, se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino, AA2 es un aminoácido ácido del cual, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxi y, formalmente, se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino, AA3 es un aminoácido neutro que contiene alquilenglicol del cual, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxi y, formalmente, se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino, y las uniones entre Acy, AA1, AA2 y/o AA3 son enlaces amida (peptídicos).

#### Descripción de las realizaciones preferidas

En su primer aspecto la invención proporciona insulinas aciladas.

En una insulina acilada de la invención, una fracción acilo está unida a la insulina original donde dicha fracción acilo comprende unidades repetitivas de aminoácidos que contienen alquilenglicol y donde hay un único residuo de lisina (K & Lys) en la insulina original, en la que dicha fracción acilo está unida a un grupo épsilon-amino en dicho residuo de lisina, y donde la fracción acilo es un grupo de fórmula general (I):



en la que

- 10 n es 0 o un número entero en el intervalo 1-3,  
 m es 0 o un número entero en el intervalo 1-6,  
 p es un número entero en el intervalo 2-30,  
 Acy es un ácido graso o un diácido graso que contiene 8 a 24 átomos de carbono del cual, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo del ácido graso, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo de uno de los grupos carboxi del diácido graso,  
 15 AA1 es un aminoácido cíclico neutro del cual, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxi y se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino,  
 AA2 es un aminoácido ácido del cual, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxi y se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino,  
 20 AA3 es un aminoácido neutro que contiene alquilenglicol del cual, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxi y se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino,  
 el orden en el cual aparecen AA1, AA2 y AA3 en el grupo de fórmula I puede ser intercambiado de manera independiente, y  
 las uniones entre Acy, AA1, AA2 y/o AA3 son enlaces amida (peptídicos).

25 En una primera realización, la fracción acilo es la definida antes, en la que n es 0 o 1.

[00 40] En otra realización preferida, la fracción acilo es la definida antes, en la que m es 1.

30 En una tercera realización, la fracción acilo es la definida antes, en la que p se encuentra en el intervalo de 2 a 20, preferentemente en el intervalo de 2 a 10, más preferentemente en el intervalo de 2 a 4, y, específicamente es 2, 3, 4, 10, 20 o 30.

35 En una cuarta realización, la fracción acilo es la definida antes, donde la fracción acilo de fórmula general (I) tiene una de las fórmulas siguientes: Acy-AA1-AA2-AA3-AA3-, Acy-AA2-AA3-AA3-, Acy-AA2-AA3-AA3-AA3-, Acy-AA2-AA3-AA3-AA3-AA3- o Acy-AA3-AA3-AA2, en las que cada uno de Acy, AA1, AA2 y AA3 es el definido antes.

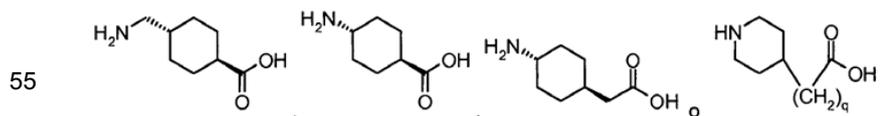
40 En una quinta realización, la fracción acilo es la definida antes, en la que Acy contiene 14 a 20 átomos de carbono, preferentemente 16 a 20 átomos de carbono, más preferentemente 16 a 18 átomos de carbono, alternativamente 18 a 20 átomos de carbono y específicamente 10, 12, 14, 16, 17, 18, 20 o 22 átomos de carbono.

En una sexta realización, la fracción acilo es la definida antes, en la que Acy contiene 16 a 20 átomos de carbono.

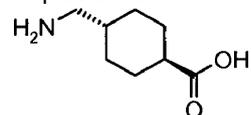
45 En una séptima realización, la fracción acilo es la definida antes, en la que Acy es un diácido graso del cual, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo de uno de los grupos carboxi.

50 En una octava realización, la fracción acilo es la definida antes, en la que Acy es un ácido hexadecanodioico, ácido heptadecanodioico, ácido octadecanodioico o ácido eicosanodioico del cual, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo de uno de los grupos carboxi.

En una novena realización preferida, la fracción acilo es la definida antes, en la que AA1 es

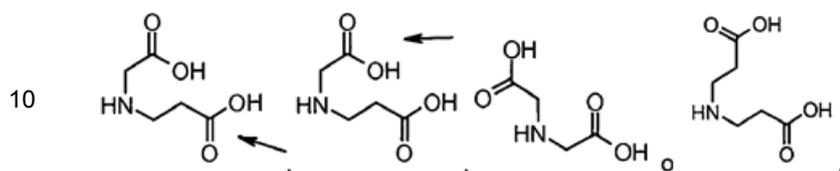


60 del cual, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxi y se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino, y en el que q es 0, 1, 2, 3 o 4. En una décima realización, la fracción acilo es la definida antes, en la que AA1 es



del cual, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxi y se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino.

5 En una undécima realización, la fracción acilo es la definida antes, en la que AA2 es Glu ( $\alpha$  o  $\gamma$ , L o D), Asp ( $\alpha$  o  $\beta$ , L o D),



15 del cual, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxi y se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino, y en el que las flechas indican el punto de unión al grupo amino de AA3.

20 En una duodécima realización, la insulina acilada de la invención es la definida antes, en la que dicha fracción acilo comprende unidades repetitivas de aminoácidos que contienen alquilenglicol y donde hay un único residuo de lisina (K & Lys) en la insulina original y en la que la fracción acilo es un grupo de fórmula general (I):



en la que

25 n es 0 o un número entero en el intervalo 1-3,  
m es 0 o un número entero en el intervalo 1-6,  
p es un número entero en el intervalo 2-30,

30 Acy es un ácido graso o un diácido graso que contiene 8 a 24 átomos de carbono del cual, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo del ácido graso, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo de uno de los grupos carboxi del diácido graso,

35 AA1 es un aminoácido cíclico neutro del cual, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxi y se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino,

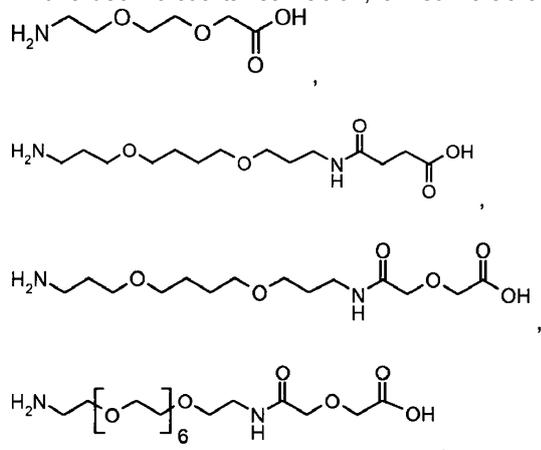
AA2 es un aminoácido ácido del cual, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxi y se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino,

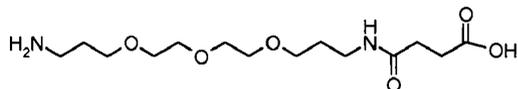
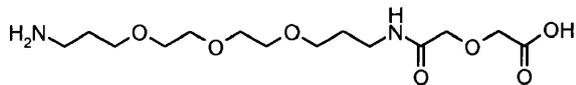
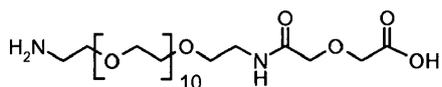
40 AA3 es un aminoácido neutro que contiene alquilenglicol del cual, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxi y se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino, el orden en el cual aparecen AA1, AA2 y AA3 en el grupo de fórmula I puede ser intercambiado de manera independiente, y

las uniones entre Acy, AA1, AA2 y/o AA3 son enlaces amida (peptídicos).

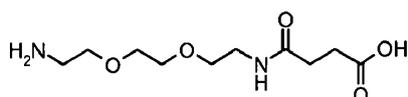
45 En una décimo tercera realización, la insulina acilada de la invención es la definida antes, en la que AA2 es  $\gamma$ -L-Glu (también denominado:  $\gamma$ Glu) del cual se ha de eliminar un grupo hidroxilo del grupo carboxi y se ha de eliminar un átomo de hidrógeno del grupo amino.

45 En una décimo cuarta realización, la insulina acilada de la invención es la definida antes, en la que AA3 es:

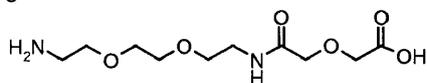




5

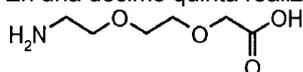


o



10 del cual, formalmente, se ha de eliminar el grupo hidroxilo del grupo carboxi y se ha de eliminar un átomo de hidrógeno del grupo amino.

En una décimo quinta realización, la insulina acilada de la invención es la definida antes, en la que AA3 es:



15 del cual se ha de eliminar el grupo hidroxilo del grupo carboxi y se ha de eliminar un átomo de hidrógeno del grupo amino.

En una décimo sexta realización, la insulina acilada de la invención es la definida antes, donde la insulina original es insulina humana; desB30 insulina humana; B28D insulina humana; B28D, desB30 insulina humana; B28K, B29P insulina humana y B3K, B29E insulina humana.

20

En una décimo séptima realización, la insulina acilada de la invención es la definida antes, donde la insulina original es insulina humana; desB30 insulina humana; B28D insulina humana y B28D, desB30 insulina humana.

25 En una décimo novena realización, la insulina acilada de la invención es la definida antes, donde la insulina original es desB30 insulina humana.

En una vigésima realización, la insulina acilada de la invención es la definida antes, en la que la insulina original consta de 51 residuos de aminoácidos.

30

En una vigésimo primera realización, la insulina acilada de la invención es la definida antes, en la que la insulina original consta de 50 residuos de aminoácidos.

En una vigésimo segunda realización, la insulina acilada de la invención es la definida antes, en la que la insulina original es insulina humana.

35

En una vigésimo tercera realización, la insulina acilada de la invención es la definida antes, en la que el residuo de aminoácido en la posición B3 de la insulina original es K (Lys) y el residuo de aminoácido de la posición B29 de la insulina original es E (Glu).

40

En una vigésimo cuarta realización, la insulina acilada de la invención es la definida antes, en la que el residuo de aminoácido en la posición B28 de la insulina original es D (Asp).

En una vigésimo quinta realización, la insulina acilada de la invención es la definida antes, en la que el aminoácido en la posición B28 es K y el aminoácido en la posición B29 es P.

45

En una vigésimo sexta realización, la insulina acilada de la invención es la definida antes, en la que el residuo de aminoácido en la posición B29 de la insulina original es Lys.

En una vigésimo séptima realización, la insulina acilada de la invención es la definida antes, en la que el residuo de aminoácido en la posición B29 de la insulina original es E o P (Glu o Pro).

5 En una vigésimo octava realización, la insulina acilada de la invención es la definida antes, en la que no hay un residuo de aminoácido en la posición B30 de la insulina original (es decir una desB30 insulina).

En una vigésimo novena realización, la insulina acilada de la invención es la definida antes, en la que todos los residuos de aminoácidos de la insulina original son residuos de aminoácidos codificables.

10 En una trigésima realización, la insulina acilada de la invención es la definida antes, en la que sólo uno de los residuos de aminoácidos de la insulina original se aparta de los residuos de aminoácidos presentes en la insulina humana.

15 En una trigésimo primera realización, la insulina acilada de la invención es la definida antes, en la que exactamente dos de los residuos de aminoácidos de la insulina original se apartan de los residuos de aminoácidos presentes en la insulina humana.

20 En una trigésimo segunda realización, la insulina acilada de la invención es la definida antes, en la que exactamente tres de los residuos de aminoácidos de la insulina original se apartan de los residuos de aminoácidos presentes en la insulina humana.

25 En una trigésimo tercera realización, la insulina acilada de la invención es la definida antes, en la que exactamente cuatro de los residuos de aminoácidos de la insulina original se apartan de los residuos de aminoácidos presentes en la insulina humana.

En una trigésimo cuarta realización, la insulina acilada de la invención se elige del grupo que consiste en

30 B29K(N<sup>ε</sup>[2-(2-[2-(2-[2-(octadecanodioil-γGlu)amino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]-etoxi]acetil]), desB30 insulina humana;

B29K(N<sup>ε</sup>[2-(2-[2-(2-[2-(eicosanodioil-γGlu)amino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi)-acetil]), desB30 insulina humana;

B28D, B29K(N<sup>ε</sup>-[2-(2-[2-(2-[2-(octadecanodioil-γGlu)amino]etoxi)etoxi]acetilamino)-etoxi]etoxi]acetil]) insulina humana;

35 B29K(N<sup>ε</sup>-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-(octadecanodioil-γGlu)amino]etoxi)etoxi]acetilamino)-etoxi]etoxi]acetilamino)-etoxi]etoxi]acetil]), desB30 insulina humana;

B29K(N<sup>ε</sup>-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-(octadecanodioil-γGlu)amino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil-amino)etoxi]etoxi]acetil]) insulina humana;

40 B29K(N<sup>ε</sup>-[2-(2-[2-(2-[2-(octadecanodioilamino)etoxi]-etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil-gGlu), desB30 insulina humana;

B29K(N<sup>ε</sup>[2-(2-[2-(2-[2-(4-[(octadecanodioilamino)metil]-*trans*-ciclohexanocarboxil)amino]-etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil]), desB30 insulina humana;

45 B29K(N<sup>ε</sup>[2-(2-[2-(2-[2-(4-[(eicosanodioilamino)metil]-*trans*-ciclohexanocarboxil)amino]-etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil]), desB30 insulina humana;

B29K(N(eps)-[2-(2-[2-(2-[2-(heptadecanodioil-gGlu)amino]etoxi)etoxi]acetilamino)-etoxi]etoxi]acetil]), desB30 insulina humana; y

50 B29K(N(eps)-[2-(2-[2-(2-[2-(hexadecanodioil-gGlu)amino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]-etoxi]acetil]), desB30 insulina humana.

55 En una trigésimo quinta realización, la insulina acilada de la invención está destinada a ser utilizada como un medicamento, a ser utilizada en un medicamento o a ser utilizada en la preparación de un medicamento.

En una trigésimo sexta realización, la insulina acilada de la invención está destinada al tratamiento de la diabetes o el uso de una insulina acilada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes del posible producto para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de la diabetes.

60 Sorprendentemente, las insulinas aciladas de esta invención tienen una buena biodisponibilidad.

Las insulinas aciladas de esta invención pueden, formalmente, ser formadas a partir de una insulina y una fracción acilo que comprenda unidades repetitivas de aminoácidos que contienen alquilenglicol que tenga la fórmula colectiva (I), es decir, Acy-AA1<sub>n</sub>-AA2<sub>m</sub>-AA3<sub>p</sub>, en la que Acy, AA1, AA2, AA3, n, m y p son los definidos en este documento

(por ej., eliminando formalmente un átomo de hidrógeno de un grupo amino de la insulina y uniendo la cadena lateral de fórmula (I) en ese lugar).

5 En las insulinas aciladas de esta invención, la fracción acilo que comprende unidades repetitivas de aminoácidos que contienen alquilenglicol y que tiene la fórmula (I) está unida a un grupo épsilon-amino en un residuo de lisina que está presente en la insulina original. Por ejemplo, la fracción acilo que comprende unidades repetitivas de aminoácidos que contienen alquilenglicol y que tiene la fórmula (I) se puede unir a un residuo de lisina en la posición B29 o B30 de la insulina original.

10 El grupo acilo presente en el grupo de fórmula (I), es decir,  $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$ , se origina a partir de un ácido graso o un diácido graso.

15 En este documento, la expresión "ácido graso" abarca ácidos carboxílicos alifáticos, lineales o ramificados, que tienen al menos dos átomos de carbono y que son saturados o insaturados. Los ejemplos no limitantes de ácidos grasos son ácido mirístico, ácido palmítico y ácido esteárico.

20 En este documento, la expresión "diácido graso" abarca ácidos dicarboxílicos alifáticos, lineales o ramificados, que tienen al menos dos átomos de carbono y que son saturados o insaturados. Los ejemplos no limitantes de diácidos grasos son ácido succínico, ácido hexanodioico, ácido octanodioico, ácido decanodioico, ácido dodecanodioico, ácido tetradecanodioico, ácido hexadecanodioico, ácido heptadecanodioico, ácido octadecanodioico y ácido eicosanodioico.

25 Como se menciona en este documento, el orden en el cual aparecen AA1, AA2 y AA3 en la fracción acilo de fórmula (I) ( $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$ ) puede ser intercambiado de manera independiente. Consecuentemente, la fórmula  $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$  también abarca fracciones como, por ej., la fórmula  $\text{Acy-AA2}_m\text{-AA1}_n\text{-AA3}_p$  y la fórmula  $\text{Acy-AA3}_p\text{-AA2}_m\text{-AA1}_n$ , en las que Acy, AA1, AA2, AA3, n, m y p son los definidos aquí.

30 El aminoácido cíclico neutro relacionado con la fracción denominada AA1 es un aminoácido que contiene un anillo carbocíclico de 6 miembros saturado, que contiene opcionalmente un heteroátomo de nitrógeno, y, preferentemente, el anillo es un anillo ciclohexano o un anillo piperidina. Preferentemente, el peso molecular de este aminoácido cíclico neutro se encuentra en el intervalo entre aproximadamente 100 y aproximadamente 200 Da.

35 El aminoácido ácido relacionado con la fracción denominada AA2 es un aminoácido con un peso molecular de hasta aproximadamente 200 Da que comprende dos grupos ácido carboxílico y un grupo amino primario o secundario.

El aminoácido neutro que contiene alquilenglicol relacionado con la fracción denominada AA3 es una fracción alquilenglicol, opcionalmente una fracción oligo- o polialquilenglicol que contiene una funcionalidad ácido carboxílico en un extremo y una funcionalidad grupo amino en el otro extremo.

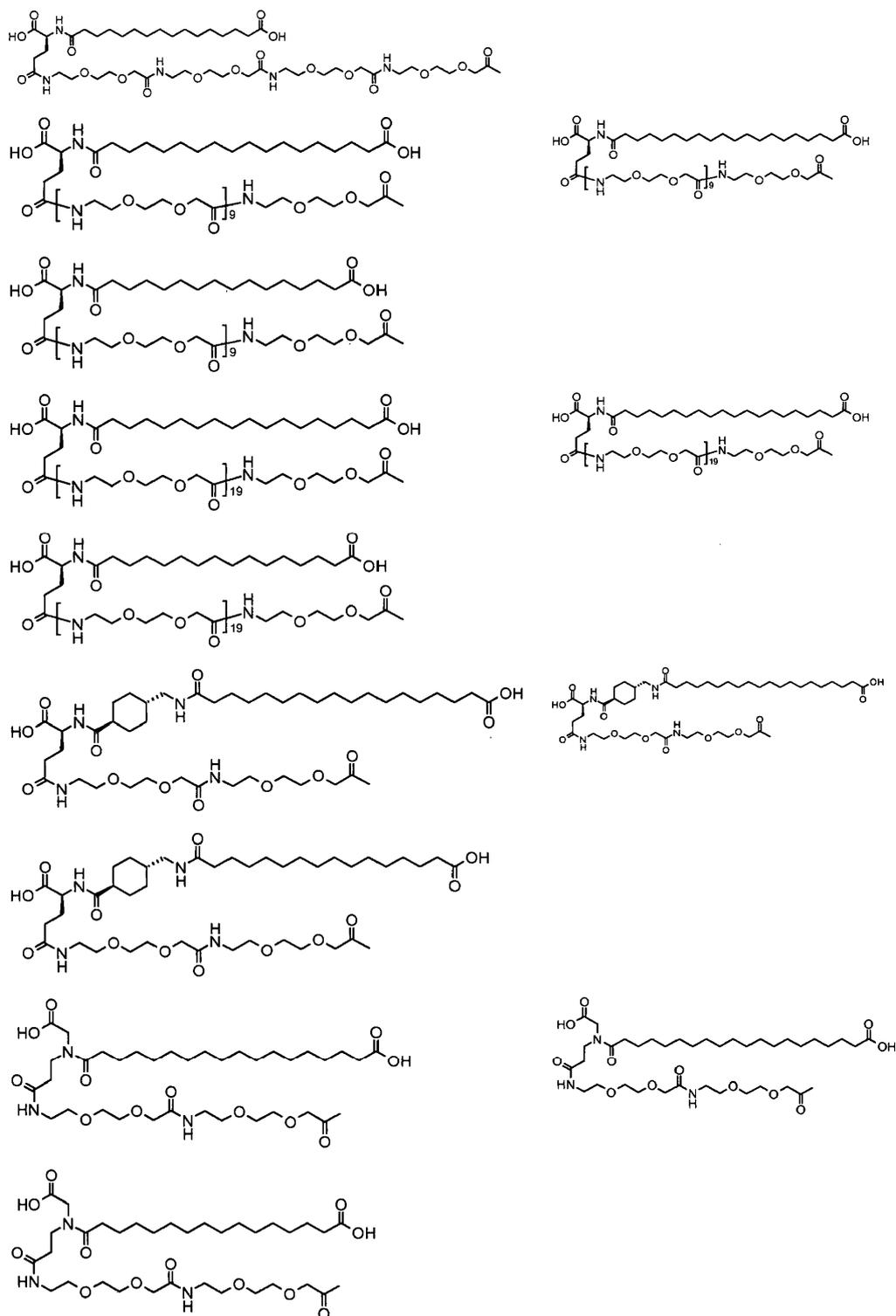
40 En este documento, la expresión fracción alquilenglicol abarca las fracciones oligo- y polialquilenglicol así como las fracciones monoalquilenglicol. Los polialquilenglicoles comprenden las cadenas a base de polietilenglicol, a base de polipropilenglicol y a base de polibutilenglicol, es decir, las cadenas basadas en la unidad repetitiva  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$  o  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ . La fracción alquilenglicol puede ser monodispersa (con longitud/peso molecular bien definidos) así como polidispersa (con longitud/peso molecular promedio menos definidos). Las fracciones monoalquilenglicol comprenden  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$  o  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$  que contienen grupos diferentes en cada extremo.

45 Las uniones entre las fracciones Acy, AA1, AA2 y/o AA3 se obtienen formalmente mediante formación del enlace amida ( $-\text{CONH}-$ ) (enlace peptídico).

50 Los ejemplos específicos de la insulina original presente en las insulinas aciladas de esta invención son los siguientes (con la condición de que, en este caso, se ha agregado un átomo de hidrógeno al grupo amino): insulina humana; desB30 insulina humana; B28D insulina humana; B28D, desB30 insulina humana; B28K, B29P insulina humana y B3K, B29E insulina humana.

55 Los ejemplos específicos de fracciones acilo de fórmula  $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$  unidas al grupo épsilon-amino de un residuo de lisina que está presente en la insulina original, presente en una insulina acilada de esta invención son los siguientes:





Cualquiera de los ejemplos específicos no limitantes anteriores de fracciones acilo de fórmula (I) (Acy-AA1<sub>n</sub>-AA2<sub>m</sub>-AA3<sub>p</sub>-) puede estar unido a un grupo épsilon-amino de un residuo de lisina presente en cualquiera de los ejemplos específicos no limitantes anteriores de insulinas dando por consiguiente otros ejemplos específicos de insulinas aciladas de esta invención.

5

Las insulinas originales se pueden preparar de manera conocida *per se*. Por ejemplo, se pueden producir expresando una secuencia de ADN que codifique la insulina de cadena única en cuestión, en una célula huésped adecuada, por técnicas bien conocidas como la dada a conocer, por ej., en EP 1,246,845. La insulina se expresa en una célula huésped transformada como una molécula precursora que es convertida en la molécula de insulina

10

deseada por procesos enzimáticos y químicos in vitro como los dados a conocer, por ej., en EP 163,529 y EP 214,826. La molécula precursora se puede expresar con una extensión N-terminal que posteriormente es escindida como se da a conocer, por ej., en EP 1246,845. Los ejemplos de extensiones N-terminales del tipo adecuado en la presente invención son, por ej., dadas a conocer en la patente de Estados Unidos N° 5,395,922 y en la patente EP N° 765,395. Más específicamente, se puede hacer referencia a WO 2006/082205, desde la página 37, línea 31, hasta la página 39, línea 29.

Las insulinas aciladas de esta invención se pueden proporcionar en forma de compuestos esencialmente exentos de zinc o en forma de complejos de zinc. Cuando se proporcionan complejos de zinc de una insulina acilada de esta invención, dos iones  $Zn^{2+}$ , tres iones  $Zn^{2+}$  o cuatro iones  $Zn^{2+}$  pueden estar unidos a cada hexámero de insulina. Las soluciones de complejos de zinc de las insulinas aciladas de esta invención contendrán mezclas de dichas especies.

En otro aspecto, esta invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de una insulina acilada de esta invención junto con un portador farmacéuticamente aceptable, que se puede utilizar para el tratamiento de la diabetes de tipo 1, la diabetes de tipo 2 y otras afecciones que causan hiperglucemia en pacientes que necesitan dicho tratamiento. Una insulina acilada de esta invención se puede emplear para la fabricación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de la diabetes de tipo 1, la diabetes de tipo 2 y otras afecciones que causan hiperglucemia. Dichas composiciones se preparan de manera conocida *per se*.

En otro aspecto de esta invención, se proporciona una composición farmacéutica para tratar la diabetes de tipo 1, la diabetes de tipo 2 y otras afecciones que causan hiperglucemia en un paciente que necesita dicho tratamiento, que consiste en una cantidad terapéuticamente eficaz de una insulina acilada de esta invención mezclada con una insulina o un análogo de la insulina que tenga un inicio de acción rápido, junto con portadores y aditivos farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto, esta invención se refiere a una aplicación pulmonar para tratar la diabetes de tipo 1, la diabetes de tipo 2 y otras afecciones que causan hiperglucemia en un paciente que necesita dicho tratamiento, que consiste en una cantidad terapéuticamente eficaz de una insulina acilada de esta invención, opcionalmente mezclada con una insulina o un análogo de la insulina que tenga un inicio de acción rápido, junto con portadores y aditivos farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto, esta invención proporciona una composición farmacéutica que es una mezcla de una insulina acilada de esta invención y un análogo de la insulina de rápida acción elegido del grupo que consiste en AspB28 insulina humana; LysB28 ProB29 insulina humana y LysB3 GluB29 insulina humana.

Las insulinas aciladas de esta invención y el análogo de la insulina de rápida acción se pueden mezclar en una proporción de aproximadamente 90/10%; aproximadamente 70/30% o aproximadamente 50/50%.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para tratar la diabetes de tipo 1, la diabetes de tipo 2 y otras afecciones que causan hiperglucemia en un paciente que necesita dicho tratamiento, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una insulina acilada de esta invención junto con un portador farmacéuticamente aceptable y aditivos farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para tratar la diabetes de tipo 1, la diabetes de tipo 2 y otras afecciones que causan hiperglucemia en un paciente que necesita dicho tratamiento, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una insulina acilada de esta invención mezclada con una insulina o un análogo de la insulina que tenga un inicio de acción rápido, junto con un portador farmacéuticamente aceptable y aditivos farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de la diabetes en un paciente que necesita dicho tratamiento, que consiste en una cantidad terapéuticamente eficaz de una insulina acilada de esta invención mezclada con una insulina o un análogo de la insulina que tenga un inicio de acción rápido, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto de la invención se proporciona una composición farmacéutica según la invención destinada a la administración pulmonar.

En otro aspecto de la invención se proporciona un método de tratamiento de la diabetes en un paciente que necesita dicho tratamiento, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una insulina acilada de acuerdo con la reivindicación 1 junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método de tratamiento de la diabetes en un paciente que necesita dicho tratamiento, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una

insulina acilada de acuerdo con la reivindicación 1 mezclada con una insulina o un análogo de la insulina que tenga un inicio de acción rápido, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

5 En otro aspecto, la presente invención se refiere a insulinas aciladas de esta invención que tienen afinidades de unión al receptor de la insulina como las descritas aquí, medidas en presencia de HSA (por ejemplo presencia de 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4% o 4.5% de HSA), que son >1%, más preferentemente >1.2%, más preferentemente >1.5%, más preferentemente >1.75% en relación con la insulina humana.

10 En otro aspecto, la presente invención se refiere a insulinas aciladas de esta invención que tienen potencias determinadas en el experimento de clamp (pinzamiento) en ratas descrito en este documento que son >40%, más preferentemente >45%, más preferentemente >50%, más preferentemente >55%, más preferentemente >60%, más preferentemente >65%, más preferentemente >70%, más preferentemente >75% en relación con la insulina humana.

15 En otro aspecto, la presente invención se refiere a insulinas aciladas de esta invención que tienen una hidrofobicidad general que es esencialmente similar a la de la insulina humana.

20 En otro aspecto, las insulinas aciladas de esta invención tienen un índice hidrofóbico,  $k'_{rel}$ , en el intervalo entre aproximadamente 0.02 y aproximadamente 10, entre aproximadamente 0.1 y aproximadamente 5; entre aproximadamente 0.5 y aproximadamente 5; entre aproximadamente 0.2 y aproximadamente 2; entre aproximadamente 0.2 y aproximadamente 1; entre aproximadamente 0.1 y aproximadamente 2; o entre aproximadamente 0.5 y aproximadamente 2. La hidrofobicidad (índice hidrofóbico) de las insulinas aciladas de esta invención con respecto a la insulina humana,  $k'_{rel}$ , se midió en una columna de HPLC LiChrosorb RP18 (5  $\mu$ m, 250 x 4 mm) mediante elución isocrática a 40 °C usando mezclas de A) tampón de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.3, que contenía 10% de acetonitrilo, y B) 50% de acetonitrilo en agua, como eluyentes. La elución se monitoreó siguiendo la absorción UV del eluido a 214 nm. El tiempo de evacuación,  $t_0$ , se encontró inyectando nitrato de sodio 0.1 mM. El tiempo de retención para la insulina humana,  $t_{humana}$ , se ajustó a al menos  $2t_0$  variando la proporción entre las soluciones A y B.  $k'_{rel} = (t_{derivado} - t_0) / (t_{humana} - t_0)$ .

30 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene una insulina acilada de esta invención que es soluble a valores de pH fisiológico.

35 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene una insulina acilada de esta invención que es soluble a valores de pH en el intervalo entre aproximadamente 6.5 y aproximadamente 8.5.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica con un perfil de acción prolongada que contiene una insulina acilada de esta invención.

40 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que es una solución que contiene entre aproximadamente 120 nmol/ml y aproximadamente 2400 nmol/ml, entre aproximadamente 400 nmol/ml y aproximadamente 2400 nmol/ml, entre aproximadamente 400 nmol/ml y aproximadamente 1200 nmol/ml, entre aproximadamente 600 nmol/ml y aproximadamente 2400 nmol/ml o entre aproximadamente 600 nmol/ml y aproximadamente 1200 nmol/ml de una insulina acilada de esta invención o de una mezcla de una insulina acilada de esta invención junto con un análogo de la insulina de rápida acción.

45 Uso de los compuestos de esta invención

50 La vía de administración puede ser cualquier vía que transporte eficazmente un compuesto de esta invención al lugar deseado o apropiado del organismo, como la vía parenteral, por ejemplo, subcutánea, intramuscular o intravenosa. Alternativamente, un compuesto de esta invención se puede administrar por vía oral, pulmonar o nasal.

55 Para la administración parenteral, un compuesto de esta invención se formula análogamente a las formulaciones de insulina conocidas. Además, para la administración parenteral, un compuesto de esta invención se administra análogamente a la administración de insulinas conocidas y los médicos están familiarizados con este procedimiento.

La administración parenteral se puede realizar por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa semejante a una lapicera. Alternativamente, la administración parenteral se puede realizar por medio de una bomba de infusión.

60 Las composiciones inyectables de un compuesto de esta invención se pueden preparar usando las técnicas convencionales de la industria farmacéutica que implican disolver y mezclar los ingredientes según sea apropiado para dar el producto final deseado. Por lo tanto, según un procedimiento, un compuesto de esta invención se disuelve en una cantidad de agua que es algo menor que el volumen final de la composición que se va preparar. Se agregan un agente isotónico, un conservante y un tampón, según sea necesario, y el valor del pH de la solución se ajusta, si fuera necesario, utilizando un ácido, por ejemplo, ácido clorhídrico, o una base, por ejemplo, hidróxido de

sodio acuoso, según sea necesario. Finalmente, el volumen de la solución se ajusta con agua para dar la concentración deseada de los ingredientes.

Más precisamente, una preparación de insulina de esta invención, por ejemplo una solución o suspensión, se puede preparar disolviendo un compuesto de esta invención en un medio acuoso en condiciones ligeramente ácidas, por ejemplo, en una concentración en el intervalo entre aproximadamente 240 y aproximadamente 1200 nmol/ml. El medio acuoso se hace isotónico, por ejemplo, con cloruro de sodio o glicerol. Además, el medio acuoso puede contener iones de zinc en concentraciones de hasta aproximadamente 20  $\mu\text{g}$  de  $\text{Zn}^{++}$  por unidad de actividad de insulina, tampones como de acetato y citrato, y conservantes como m-cresol o fenol. El valor de pH de la solución se ajusta hacia la neutralidad sin llegar demasiado cerca del punto isoeléctrico del compuesto de esta invención para evitar la precipitación. El valor de pH de la preparación de insulina final depende del número de cargas que, opcionalmente, hayan sido cambiadas en el compuesto de esta invención, la concentración de iones zinc, la concentración del compuesto de esta invención y el compuesto de la invención elegido. La preparación de insulina se esteriliza, por ejemplo, mediante esterilización por filtración.

Las preparaciones de insulina de esta invención se usan de manera similar a la empleada para las preparaciones de insulina conocidas.

La cantidad a administrar de un compuesto de esta invención, la determinación de la frecuencia de administración de un compuesto de esta invención, y la elección de cuál compuesto o compuestos de esta invención administrar, opcionalmente junto con otro compuesto antidiabético, se decide en consulta con un facultativo que esté familiarizado con el tratamiento de la diabetes.

[0115]Por consiguiente, esta invención también se refiere a un método para tratar la diabetes, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto de esta invención a un paciente que necesite dicho tratamiento.

#### Composiciones farmacéuticas

Las insulinas aciladas de esta invención se pueden administrar por vía subcutánea, oral o pulmonar.

Para la administración subcutánea, las insulinas aciladas de esta invención se formulan análogamente a las formulaciones de insulina conocidas. Además, para la administración subcutánea, las insulinas aciladas de esta invención se administran análogamente a la administración de las insulinas conocidas y, en general los médicos están familiarizados con este procedimiento.

Las insulinas aciladas de esta invención se pueden administrar por inhalación en una dosis eficaz para aumentar los niveles de insulina circulantes y/o para disminuir los niveles de glucosa circulantes. Dicha administración puede ser eficaz para tratar trastornos como la diabetes o la hiperglucemia. Lograr dosis eficaces de insulina requiere la administración de una dosis inhalada en el intervalo entre aproximadamente 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y aproximadamente 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de una insulina acilada de esta invención. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser determinada por un facultativo con conocimientos que tendrá en cuenta factores que incluyen el nivel de insulina, la glucemia, el estado físico del paciente, el estado pulmonar del paciente o aspectos similares.

Las insulinas aciladas de esta invención se pueden administrar por inhalación para lograr una absorción lenta y/o una menor depuración sistémica de éstas. Los diferentes dispositivos de inhalación proporcionan habitualmente una farmacocinética similar cuando se comparan partículas de tamaños semejantes y niveles de depósito en los pulmones semejantes.

Las insulinas aciladas de esta invención se pueden administrar mediante cualquiera de una serie de dispositivos de inhalación conocidos en el área para la administración de un agente terapéutico por inhalación. Estos dispositivos incluyen inhaladores de dosis fija, nebulizadores, generadores de polvo seco, pulverizadores y análogos. Preferentemente, las insulinas aciladas de esta invención se administran mediante un inhalador de polvo seco o un pulverizador. Existen varias características deseables en un dispositivo de inhalación para la administración de las insulinas aciladas de esta invención. Por ejemplo, la administración mediante el dispositivo de inhalación es ventajosamente confiable, reproducible y exacta. El dispositivo de inhalación debe administrar partículas pequeñas o aerosoles, por ej., menores de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , por ejemplo de aproximadamente 1-5  $\mu\text{m}$ , para una buena respirabilidad. Algunos ejemplos específicos de dispositivos de inhalación comerciales adecuados para la práctica de esta invención son Cyclohaler, Turbohaler™ (Astra), Rotahaler® (Glaxo), Diskus® (Glaxo), inhalador Spiros™ (Dura), dispositivos comercializados por Inhale Therapeutics, AERx™ (Aradigm), el nebulizador Ultravent® (Mallinckrodt), el nebulizador Acorn II® (Marquest Medical Products), el inhalador de dosis fija Ventolin® (Glaxo), el inhalador de polvo Spinhaler® (Fisons), o análogos.

Como reconocerán los expertos, la formulación de las insulinas aciladas de esta invención, la cantidad de la formulación administrada y la duración de la administración de una dosis única, dependen del tipo de dispositivo de

inhalación empleado. Para algunos sistemas de suministro de aerosol, como los nebulizadores, la frecuencia de administración y el tiempo durante el cual el sistema está activado dependerán principalmente de la concentración de la insulina acilada de esta invención en el aerosol. Por ejemplo, a mayores concentraciones de la insulina acilada de esta invención en la solución del nebulizador se pueden usar períodos más cortos de administración. Los dispositivos como los inhaladores de dosis fija pueden producir altas concentraciones de aerosol y se pueden operar durante períodos de tiempo más cortos para suministrar la cantidad deseada de una insulina acilada de esta invención. Los dispositivos como los inhaladores de polvo suministran el principio activo hasta que se expela una determinada carga del fármaco desde el dispositivo. En este tipo de inhalador, la cantidad de insulina acilada de esta invención en una determinada cantidad del polvo determina la dosis suministrada en una única administración.

El tamaño de partícula de las insulinas aciladas de esta invención en la formulación suministrada mediante el dispositivo de inhalación es fundamental con respecto a la capacidad de la insulina para llegar a los pulmones, y preferentemente a las vías respiratorias inferiores o los alveolos. Preferentemente, las insulinas aciladas de esta invención se formulan de manera que al menos aproximadamente 10% de la insulina acilada de esta invención suministrada se deposite en el pulmón, preferentemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20%, o más. Las partículas de la insulina acilada suministrada por inhalación tienen un tamaño de partícula preferentemente menor de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , más preferentemente en el intervalo entre aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ . La formulación de la insulina acilada se elige para obtener el tamaño de partícula deseado en el dispositivo de inhalación elegido.

De manera ventajosa para la administración como un polvo seco, una insulina acilada de esta invención se prepara en forma particulada con un tamaño de partícula menor de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , preferentemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ . El tamaño de partícula preferido es eficaz para la administración en los alveolos del pulmón del paciente. Preferentemente, el polvo seco está compuesto en gran medida por partículas producidas de modo que la mayoría tengan un tamaño de partícula en el intervalo deseado. Ventajosamente, al menos aproximadamente 50% del polvo seco consiste en partículas que tienen un diámetro menor de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ . Dichas formulaciones se pueden lograr mediante secado por aspersion, molienda, micronización, o punto de condensación crítico de una solución que contenga una insulina acilada de esta invención y otros ingredientes deseados. Se conocen otros métodos también adecuados para generar partículas útiles para la invención actual.

Generalmente las partículas se separan de una formulación en polvo seco en un recipiente y después son transportadas al interior del pulmón de un paciente a través de un sistema portador de corriente de aire. Habitualmente, en los inhaladores de polvo seco actuales, la fuerza para desintegrar el sólido es proporcionada únicamente por la inhalación del paciente. En otro tipo de inhalador, el flujo de aire generado por la inhalación del paciente activa un motor impulsor que desaglomera las partículas.

Las formulaciones de insulinas aciladas de esta invención para administración desde un inhalador de polvo seco incluyen generalmente un polvo seco finamente dividido que contiene el derivado, pero el polvo también puede incluir un incrementador de volumen, un portador, un excipiente, otro aditivo o análogos. Se pueden incluir aditivos en una formulación en polvo seco de una insulina acilada, por ej., para diluir el polvo según sea necesario para el suministro desde el inhalador de polvo particular, para facilitar el procesamiento de la formulación, para proporcionar propiedades del polvo ventajosas para la formulación, para facilitar la dispersión del polvo desde el dispositivo de inhalación, para estabilizar la formulación (por ejemplo, antioxidantes o tampones), para proporcionar sabor a la formulación, o semejantes. Convenientemente, el aditivo no afecta adversamente a las vías respiratorias del paciente. La insulina acilada se puede mezclar con un aditivo a nivel molecular o la formulación sólida puede incluir partículas de una insulina acilada mezclada o recubierta con partículas del aditivo. Los aditivos típicos incluyen mono, di y polisacáridos; alcoholes de azúcares y otros polioles, por ej. lactosa, glucosa, rafinosa, melezitosa, lactitol, maltitol, trehalosa, sacarosa, manitol, almidón o sus combinaciones; surfactantes como sorbitoles, difosfatidilcolina o lecitina, o análogos. Habitualmente un aditivo, como un incrementador de volumen, está presente en una cantidad eficaz para un propósito descrito antes, a menudo entre aproximadamente 50% y aproximadamente 90% en peso de la formulación. Otros agentes conocidos para la formulación de una proteína como una proteína análoga de la insulina también se pueden incluir en la formulación.

Se puede producir un aerosol que contenga las insulinas aciladas de esta invención forzando a presión una suspensión o solución de una insulina acilada a través de una boquilla. El tamaño de la configuración de la boquilla, la presión aplicada y la velocidad de alimentación del líquido se pueden elegir para lograr la salida y el tamaño de partícula deseados. Se puede producir una electronebulización, por ej., mediante un campo eléctrico conectado a una alimentación capilar o por boquilla. Convenientemente, las partículas del conjugado de insulina suministradas por un pulverizador tienen un tamaño de partícula menor de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , preferentemente en el intervalo entre aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ .

Las formulaciones de insulinas aciladas de esta invención adecuadas para utilizar con un pulverizador contendrán generalmente la insulina acilada de esta invención en una solución acuosa a una concentración entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 500 mg de una insulina acilada por ml de solución. Dependiendo de la

insulina acilada elegida y de otros factores conocidos por el asesor médico, el límite superior puede ser menor de, por ej., 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 120, 100 o 50 mg de la insulina acilada por ml de solución. La formulación puede contener agentes como un excipiente, un tampón, un agente de isotonicidad, un conservante, un surfactante, y preferentemente, zinc. La formulación también puede contener un excipiente o un estabilizante de la insulina acilada, como un tampón, un reductor, una proteína incrementadora del volumen o un carbohidrato. Las proteínas incrementadoras de volumen útiles en la formulación de conjugados de insulina incluyen albúmina, protamina o análogos. Los carbohidratos útiles en la formulación de la insulina acilada incluyen sacarosa, manitol, lactosa, trehalosa, glucosa o análogos. Una formulación de una insulina acilada de esta invención también puede contener un surfactante, que puede reducir o prevenir la agregación inducida por la superficie del conjugado de insulina causada por la atomización de la solución al formar un aerosol. Se pueden emplear diversos s convencionales, como ésteres de polioxietileno de ácidos grasos y alcoholes, y ésteres de polioxietilensorbitol de ácidos grasos. Las cantidades variarán generalmente entre aproximadamente 0.001 y aproximadamente 4% en peso de la formulación.

Las composiciones farmacéuticas que contienen una insulina acilada de esta invención también se pueden administrar por vía parenteral a los pacientes que necesiten un tratamiento de ese tipo. La administración parenteral se puede realizar por inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa en forma de lapicera. Alternativamente, la administración parenteral se puede realizar por medio de una bomba de infusión.

Las composiciones inyectables de las insulinas aciladas de esta invención se pueden preparar usando las técnicas convencionales de la industria farmacéutica que implican disolver y mezclar los ingredientes según sea apropiado para dar el producto final deseado. Por lo tanto, según un procedimiento, una insulina acilada se disuelve en una cantidad de agua que sea algo menor que el volumen final de la composición que se va preparar. Se agregan zinc, un agente isotónico, un conservante y/o un tampón, según sea necesario, y el valor del pH de la solución se ajusta, si fuera necesario, utilizando un ácido, por ej., ácido clorhídrico, o una base, por ej., hidróxido de sodio acuoso, según sea necesario. Finalmente, el volumen de la solución se ajusta con agua para dar la concentración deseada de los ingredientes.

En otra realización de esta invención el tampón se elige del grupo que consiste en acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, fosfato ácido de sodio, fosfato disódico, fosfato monosódico, y tris(hidroximetil)-aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o sus mezclas. Cada uno de estos tampones específicos constituye una realización alternativa de esta invención.

En otra realización de esta invención la formulación contiene además un conservante farmacéuticamente aceptable que se puede elegir 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 timerosal, bronopol, ácido benzoico, imidurea, clorhexidina, deshidroacetato de sodio, clorocresol, p-hidroxibenzoato de etilo, cloruro de bencetonio, clorfenesina (3-(4-clorofenoxi)-1,2-propanodiol) o sus mezclas. En otra realización de esta invención el conservante está presente en una concentración entre aproximadamente 0.1 mg/ml y 20 mg/ml. En otra realización de esta invención el conservante está presente en una concentración entre aproximadamente 0.1 mg/ml y 5 mg/ml. En otra realización de esta invención el conservante está presente en una concentración entre aproximadamente 5 mg/ml y 10 mg/ml. En otra realización de esta invención el conservante está presente en una concentración entre aproximadamente 10 mg/ml y 20 mg/ml. Cada uno de estos conservantes específicos constituye una realización alternativa de esta invención. El uso de un conservante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª Edición, 1995.

En otra realización de esta invención, la formulación contiene además un agente isotónico que se puede elegir del grupo que consiste en una sal (por ej., cloruro de sodio), un azúcar o un alcohol de azúcar, un aminoácido (por ejemplo, L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano o treonina), un alditol (por ej. glicerol (glicerina), 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol o 1,3-butanodiol), polietilenglicol (por ej., PEG400) o sus mezclas. Se puede emplear cualquier azúcar como mono, di, o polisacáridos, o glucanos solubles en agua, incluidas por ejemplo fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, hidroxietil almidón y carboximetilcelulosa de sodio. En una realización, el aditivo azúcar es sacarosa. El alcohol de azúcar se define como un hidrocarburo C4-C8 que tiene al menos un grupo -OH e incluye, por ej., manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabitol. En una realización, el aditivo alcohol de azúcar es manitol. Los azúcares o alcoholes de azúcares mencionados antes se pueden utilizar individualmente o en combinación. No existen límites fijos para la cantidad empleada, en tanto el azúcar o el alcohol de azúcar sea soluble en la preparación líquida y no afecte adversamente los efectos estabilizantes logrados utilizando los métodos de esta invención. En una realización, la concentración del azúcar o del alcohol de azúcar es entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml. En otra realización de esta invención el agente isotónico está presente en una concentración entre aproximadamente 1 mg/ml y 50 mg/ml. En otra realización de esta invención el agente isotónico está presente en una concentración entre aproximadamente 1

mg/ml y 7 mg/ml. En otra realización de esta invención el agente isotónico está presente en una concentración entre aproximadamente 8 mg/ml y 24 mg/ml. En otra realización de esta invención el agente isotónico está presente en una concentración entre aproximadamente 25 mg/ml y 50 mg/ml. Cada uno de estos agentes isotónicos específicos constituye una realización alternativa de esta invención. El uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª Edición, 1995.

Los agentes isotónicos típicos son cloruro de sodio, manitol, dimetilsulfona y glicerol y los conservantes típicos son fenol, m-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo y alcohol bencílico.

Los ejemplos de tampones adecuados son acetato de sodio, glicilglicina, HEPES ácido (4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinaetanosulfónico) y fosfato de sodio.

Una composición para la administración nasal de una insulina acilada de esta invención se puede preparar, por ej., como se describe en la patente europea N° 272097.

Las composiciones que contienen insulinas aciladas de esta invención se pueden usar en el tratamiento de afecciones que sean sensibles a la insulina. Por lo tanto, se pueden emplear en el tratamiento de la diabetes de tipo 1, la diabetes de tipo 2 y la hiperglucemia por ejemplo como se ha visto a veces en personas seriamente lesionadas y personas que han sido sometidas a una cirugía mayor. El nivel de dosificación óptimo para cualquier paciente dependerá de diversos factores que incluyen la eficacia del derivado de insulina específico empleado, la edad, el peso corporal, la actividad física y la dieta del paciente, de una posible combinación con otros fármacos y de la gravedad de la afección a tratar. Se recomienda que la dosis diaria de la insulina acilada de esta invención sea determinada por los expertos para cada paciente en particular de manera similar que para las composiciones de insulina conocidas.

### Ejemplos

Procedimientos generales:

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

Todos los plásmidos de expresión son del tipo C-POT, similares a los descritos en EP 171142, que se caracterizan por contener el gen de la triosa fosfato isomerasa (POT) de *Schizosaccharomyces pombe* con el propósito de la selección de plásmidos y la estabilización en *S. cerevisiae*. Los plásmidos también contienen el promotor y el terminador de la triosa fosfato isomerasa de *S. cerevisiae*. Estas secuencias son semejantes a las secuencias correspondientes en el plásmido pKFN1003 (descritas en WO 90/10075) como son todas las secuencias excepto la secuencia del fragmento *EcoRI-XbaI* que codifica la proteína de fusión del líder y el producto de insulina. Para expresar diferentes proteínas de fusión, el fragmento *EcoRI-XbaI* de pKFN1003 es simplemente reemplazado por un fragmento *EcoRI-XbaI* que codifica la fusión líder-insulina de interés. Dichos fragmentos *EcoRI-XbaI* se pueden sintetizar usando oligonucleótidos sintéticos y PCR según técnicas estándar.

Se prepararon transformantes de levadura por transformación de la cepa huésped *S. cerevisiae* cepa MT663 (*MATa/MATa pep4-3/pep4-3 HIS4/his4 tpi::LEU2/tpi::LEU2* Cir<sup>+</sup>). La cepa de levadura MT663 fue depositada en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen en relación con la presentación WO 92/11378 y recibió el número de depósito DSM 6278.

Se cultivó MT663 en YPGaL (extracto de levadura Bacto al 1%, Bacto peptona al 2%, galactosa al 2%, lactato al 1%) hasta una D.O. a 600 nm de 0.6. Se recogieron 100 ml de cultivo por centrifugación, se lavaron con 10 ml de agua, se volvieron a centrifugar y suspender en 10 ml de una solución que contenía sorbitol 1.2 M, Na<sub>2</sub>EDTA 25 mM pH = 8.0 y 6.7 mg/ml de diotritol. La suspensión se incubó a 30 °C durante 15 minutos, se centrifugó y las células se resuspendieron en 10 ml de una solución que contenía sorbitol 1.2 M, Na<sub>2</sub>EDTA 10 mM, citrato de sodio 0.1 M, pH 5.8 y 2 mg de Novozym<sup>®</sup>234. La suspensión se incubó a 30 °C durante 30 minutos, las células se recogieron por centrifugación, se lavaron en 10 ml de sorbitol 1.2 M y 10 ml de CAS (sorbitol 1.2 M, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, Tris HCl 10 mM (pH = 7.5) y se resuspendieron en 2 ml de CAS. Para la transformación, 1 ml de las células suspendidas en CAS se mezclaron con aproximadamente 0.1 mg de ADN plasmídico y se dejaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se agregó 1 ml de (polietilenglicol 4000 al 20%, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, Tris HCl 10 mM, pH = 7.5) y la mezcla se dejó durante otros 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó y el sedimento se resuspendió en 0.1 ml de SOS (sorbitol 1.2 M, YPD al 33% v/v, CaCl<sub>2</sub> 6.7 mM) y se incubó a 30 °C durante 2 horas. Después se centrifugó la suspensión y el sedimento se resuspendió en 0.5 ml de sorbitol 1.2 M. Después, se agregaron 6 ml de agar de la parte superior (el medio SC de Sherman et al. (1982) Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory) que contenía sorbitol 1.2 M más 2.5% de agar) a 52 °C y la suspensión se vertió sobre la parte superior

de placas que contenían el mismo medio de agar solidificado que contenía sorbitol. La cepa MT663 de *S. cerevisiae* transformada con plásmidos de expresión se cultivó en YPD durante 72 h a 30 °C.

Los ejemplos siguientes se refieren a compuestos intermedios y productos finales identificados en la memoria y en los ejemplos. La preparación de los derivados de insulina de esta invención se describe en detalle utilizando los ejemplos siguientes, pero las reacciones químicas y los esquemas de purificación descritos se dan a conocer en términos de su aplicabilidad general a la preparación de los derivados de insulina de la invención. Ocasionalmente, la reacción puede no ser aplicables según se describe para cada compuesto dado a conocer incluido en el alcance de la invención. Los compuestos para los cuales ocurre esto serán fácilmente reconocidos por los expertos. En esos casos las reacciones se pueden llevar a cabo exitosamente mediante modificaciones convencionales conocidas por los técnicos, es decir, mediante protección adecuada de los grupos que interfieren, cambiando a otros reactivos convencionales o por modificación rutinaria de las condiciones de reacción. Alternativamente, otras reacciones convencionales dadas a conocer en este documento o en otro, serán aplicables a la preparación de los compuestos correspondientes de la invención. En todos los métodos preparativos, todos los materiales de partida son conocidos o se pueden preparar fácilmente a partir de materiales de partida conocidos. Todas las temperaturas se indican en grados Celsius y a menos que se indique lo contrario, todas las partes y porcentajes son en peso cuando se refieren a cantidades y todas las partes son en volumen cuando se refieren a solventes y eluyentes. Los derivados de insulina de esta invención se pueden purificar empleando uno o más de los procedimientos siguientes que son típicos en el área. Estos procedimientos se pueden modificar, si fuera necesario, en lo que respecta a gradientes, pH, sales, concentraciones, flujo, columnas, etc. Dependiendo de factores como el perfil de impurezas, la solubilidad de las insulinas en cuestión, etcétera, estas modificaciones pueden ser reconocidas y realizadas fácilmente por un técnico con experiencia.

Procedimiento general para la síntesis en fase sólida de reactivos de acilación de fórmula general (II):



en la que Acy, AA1, AA2, AA3, n, m y p son los definidos antes y OSu es 1-succinimidiloxi = 2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi (es decir un éster *N*-hidroxisuccinimidílico).

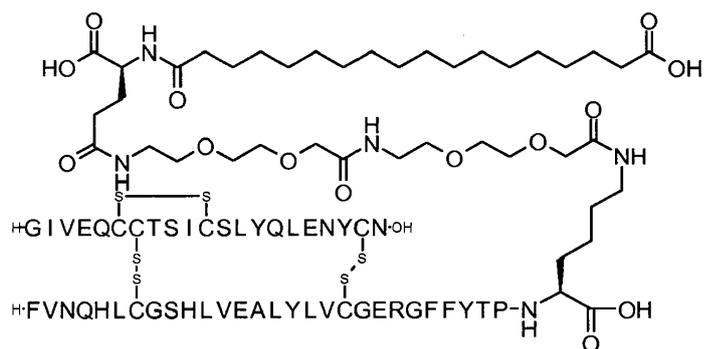
Los compuestos según esta invención que contienen un grupo de fórmula general II se pueden sintetizar sobre un soporte sólido usando procedimientos muy conocidos por los técnicos de síntesis de péptidos en fase sólida. Este procedimiento comprende la unión de un aminoácido protegido con Fmoc a una resina de 2-clorotritilcloruro de poliestireno. La unión se puede llevar a cabo, por ej., utilizando el aminoácido *N*-protegido libre en presencia de una amina terciaria, como trietilamina o *N,N*-diisopropiletilamina (véase la bibliografía más adelante). El extremo C-terminal (que está unido a la resina) de este aminoácido está en el extremo de la secuencia de síntesis que se está acoplado a las insulinas originales de la invención. Luego de la unión del aminoácido-Fmoc a la resina, el grupo Fmoc es eliminado empleando, por ej., aminas secundarias, como piperidina o dietilamina, seguido del acoplamiento de otro (o el mismo) aminoácido protegido con Fmoc y eliminación. Esta secuencia de síntesis se termina acoplado ( $\alpha$ ,  $\omega$ )-diácidos grasos protegidos con mono-*tert*-butilo como ésteres mono-*tert*-butílicos de los ácidos hexadecanodioico, heptadecanodioico, octadecanodioico o eicosanodioico. La escisión de los compuestos de la resina se lleva a cabo utilizando ácido diluido como TFA/DCM (ácido trifluoroacético en diclorometano) al 0.5-5%, ácido acético (por ej., 10% en DCM, o HOAc/trifluoroetanol/DCM 1:1:8), o hexafluoroisopropanol en DCM (véase, por ej., "Organic Synthesis on Solid Phase", F.Z. Dörwald, Wiley-VCH, 2000. ISBN 3-527-29950-5, "Peptides: Chemistry and Biology", N. Sewald & H.-D. Jakubke, Wiley-VCH, 2002, ISBN 3-527-30405-3 o "The Combinatorial Chemistry Catalog" 1999, Novabiochem AG, y la bibliografía citada allí). Esto asegura que los ésteres *tert*-butílicos presentes en los compuestos como grupos protectores del ácido carboxílico no sean eliminados. Finalmente, el grupo carboxi C-terminal (liberado de la resina) se activa, por ej., como el éster de *N*-hidroxisuccinimida (OSu) y se usa directamente, o después de la purificación, como reactivo de acoplamiento en la unión a las insulinas originales de la invención. Esto se ilustra en el Ejemplo 1.

Procedimiento general (A) para la preparación de insulinas aciladas extendidas de esta invención

El procedimiento general (A) se describe a continuación y se ilustra en el primer ejemplo:

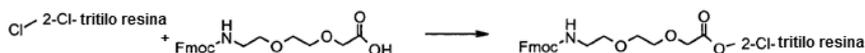
Ejemplo 1 Procedimiento general (A):

B29K(N<sup>ε</sup>[2-(2-[2-(2-[2-(octadecanodioilo- $\gamma$ Glu)amino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil)], desB30 insulina humana

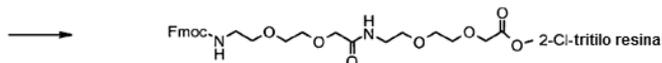


- Se disolvió desB30 insulina humana (3.15 g, 0.55 mmol) en  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  acuoso 100 mM (25 mL) y se le agregó acetonitrilo (25 mL). Cuando fue necesario, el pH se ajustó a pH 10-10.5 por adición de NaOH 1N. Se disolvió octadecanodioil-Glu(OEG-OEG-OSu)-OTBU de *tert*-butilo (650 mg, 0.7 mmol, preparación: véase más adelante) en acetonitrilo (10 mL) y se agregó lentamente a la solución de insulina. El pH se mantuvo a 10-10.5. Después de 50 minutos, se agregó agua (150 mL) a la mezcla de reacción y el pH se ajustó a 5.2 con HCl acuoso 1 N. El precipitado se aisló por centrifugación y se liofilizó. Al producto crudo se le agregó ácido trifluoroacético (TFA, 60 mL) y se dejó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se vertió en éter dietílico helado (300 mL), y el producto precipitado se aisló por filtración y se lavó dos veces con éter dietílico. Cuando la desprotección fue incompleta, el tratamiento con TFA se repitió una vez. El producto se purificó por HPLC (acetonitrilo, agua, TFA al 1%), seguido de cromatografía de intercambio iónico (Ressource Q, gradiente 0.25% - 1.25% de acetato de amonio en 42.5% de etanol, pH 7.5). Se juntaron las fracciones puras, el pH se ajustó a 5.2 con HCl 1 N, y el material precipitado se aisló y se liofilizó para obtener la insulina del título.
- LC-MS (electronebulización):  $m/z = 1285 (M+5)/5$  y  $1606 (M+6)/6$ .

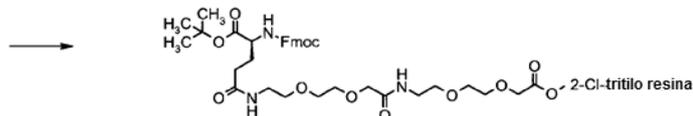
El reactivo de acilación para la preparación de esta insulina se preparó como se describe a continuación:



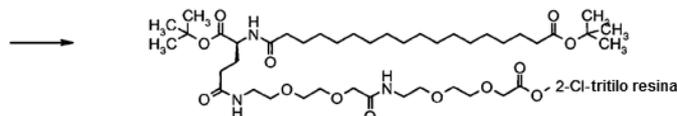
5



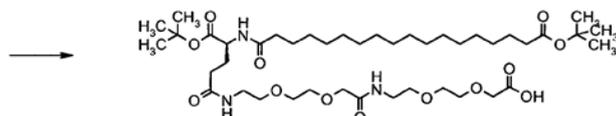
10



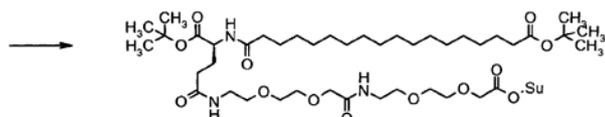
15



20



25



30

Resina de partida: resina de 2-clorotritilo, 1.60 mmol/g  
Se hinchó 1.0 g de la resina durante 30 minutos en DCM (10 ml).

35

1. Acilación con ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico:

40

Se disolvió 0.39 g (0.63 eq., 1.0 mmol) de ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico (Fmoc-OEG-OH) en DCM (15ml) y se agregó a la resina. Se le agregó gota a gota *N,N*-disopropiltilamina (DIEA) (0.44 ml, 2.5 mmol). La mezcla de reacción se agitó en vórtex durante 30 min y después se le agregó metanol (2 ml) y la mezcla se volvió a agitar en vórtex durante otros 15 min. La resina se filtró y se lavó con NMP (2 x 8 ml) y DCM (8 x 8 ml).

45

Se agregó piperidina al 20%/NMP (8 ml), se dejó en reposo durante 10 min, se repitió una vez. Se filtró y se lavó con NMP (2 x 8 ml), DCM (3 x 8 ml) y NMP (5 x 8 ml). Una prueba TNBS positiva dio resinas coloreadas de rojo.

2. Acilación con ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico:

50

Se disolvió 0.78 g (2 eq., 2.0 mmol) de ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico en NMP/DCM 1:1 (10 ml). Se le agregó lentamente 0.28 g (2.2 eq., 2.4 mmol) de HOSu seguido de la adición de 0.37 ml (2.2 eq., 2.4 mmol) de DIC. La mezcla de reacción se dejó en reposo durante 1 hora y después se agregó a la resina y finalmente se agregó 0.407 ml (2.2 eq) de DIEA. La mezcla se agitó en vórtex durante 16 horas, se filtró y se lavó con NMP (2 x 8 ml), DCM (3 x 8 ml) y NMP (5 x 8 ml).

55

Una prueba TNBS positiva dio resinas incoloras.

Se agregó piperidina al 20%/NMP (10 ml), se dejó en reposo durante 10 min, se repitió una vez. Se filtró y se lavó con NMP (2 x 8 ml), DCM (3 x 8 ml) y NMP (5 x 8 ml). Una prueba TNBS positiva dio resinas coloreadas de rojo.

60

Acilación con Fmoc-Glu-OtBu:

Se disolvió 0.86 g (2 eq., 2.0 mmol) de Fmoc-Glu-OtBu en NMP/DCM 1:1 (10 ml). Se le agregó 0.32 g (2.2 eq., 2.4 mmol) de HOBT seguido de la adición de 0.37 ml (2.2 eq., 2.4 mmol) de DIC. La mezcla de reacción se dejó en

reposito durante 20 min y después se transfirió a la resina y finalmente se le agregó 0.407 ml (2.2 eq.) de DIEA. La mezcla se agitó en vórtex durante 16 horas, se filtró y se lavó con NMP (2 x 8 ml), DCM (3 x 8 ml) y NMP (5 x 8 ml). Una prueba TNBS positiva dio resinas incoloras.

- 5 Se agregó piperidina al 20%/NMP (10 ml), se dejó en reposo durante 10 min, se repitió una vez. Se filtró y se lavó con NMP (2 x 8 ml), DCM (3 x 8 ml) y NMP (5 x 8 ml). Una prueba TNBS positiva dio resinas coloreadas de rojo.

Acilación con éster mono *tert*-butílico del ácido octadecanodioico:

- 10 Se disolvió 0.75 g (2 eq, 2.0 mmol) de éster mono *tert*-butílico del ácido octadecanodioico en NMP/DCM 1:1 (10 ml). Se agregó lentamente 0.32 g (2.2 eq, 2.4 mmol) de HBOT seguido de la adición de 0.37 ml (2.2 eq, 2.4 mmol) de DIC. La mezcla de reacción se dejó en reposo durante 20 min y después se transfirió a la resina y finalmente se le agregó 0.41 ml (2.2 eq) de DIEA. La mezcla se agitó en vórtex durante 16 horas, se filtró y se lavó con NMP (2 x 8 ml), DCM (3 x 8 ml) y NMP (5 x 8 ml).

Escisión con TFA:

- 20 Se agregaron 8 ml de TFA al 5%/DCM a la resina y la mezcla de reacción se agitó en vórtex durante 2 horas, se filtró y se recogió el filtrado. Se agregó más TFA al 5%/DCM (8 ml) a la resina, y la mezcla se agitó en vórtex durante 10 min, se filtró y la resina se lavó con DCM (2 x 10 ml). Se ajustó el pH de los filtrados y los lavados combinados a un pH básico utilizando 800 µl de DIEA. La mezcla se evaporó al vacío produciéndose un aceite (3.5 g). Se agregó éter dietílico (30 ml) y el aceite no disuelto se separó por decantación y se evaporó al vacío. Esto produjo 1.1 g de éster *tert*-butílico del ácido 17-((S)-1-*tert*-butoxicarbonil-3-[2-(2-((2-carboximetoxietoxi)etilcarbamoil]metoxi)etoxi)etilcarbamoil]-propilcarbamoil}heptadecanoico (nombre alternativo: octadecanodioil-Glu(OEG-OEG-OH)-OTBU) de *tert*-butilo como un aceite. LC-MS (Sciex100 API): m/z = 846.6 (M+1)<sup>+</sup>.

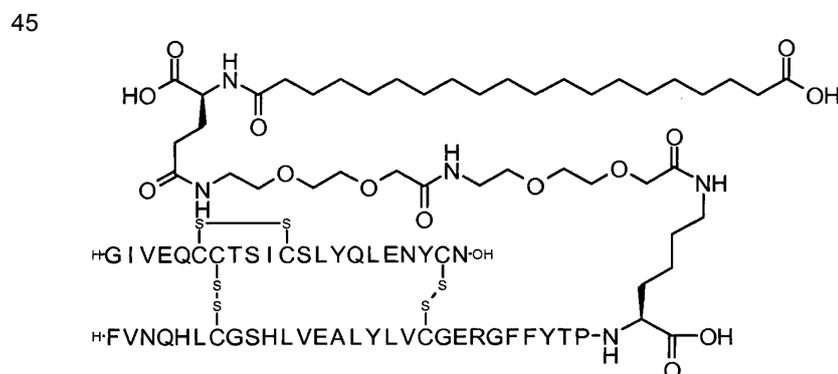
Activación de OSu:

- 30 El octadecanodioil-Glu(OEG-OEG-OH)-OTBU de *tert*-butilo (0.63 g) anterior se disolvió en THF (35 ml). Se le agregó DIEA (0.255 ml, 2 eq.) seguida de TSTU (0.45 g, 2 eq.), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla se particionó entre acetato de etilo (250 ml) y NaHSO<sub>4</sub> acuoso (3 x 100 ml). La fase orgánica se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se concentró al vacío para obtener 0.65 g de éster *tert*-butílico del ácido 17-((S)-1-*tert*-butoxicarbonil-3-{2-[2-({2-[2-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxicarbonilmetoxi)-etoxi]etilcarbamoil]metoxi)etoxi]etilcarbamoil}propilcarbamoil}heptadecanoico (nombre alternativo: octadecanodioil-Glu(OEG-OEG-OSu)-OTBU) de *tert*-butilo como un aceite.

LC-MS: m/z = 943.4 (M+1)<sup>+</sup>.

- 40 Ejemplo 2, Procedimiento general (A):

B29K(N<sup>ε</sup>[2-(2-[2-(2-[2-(eicosanodioil-γGlu)amino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi)-acetil]), desB30 insulina humana;

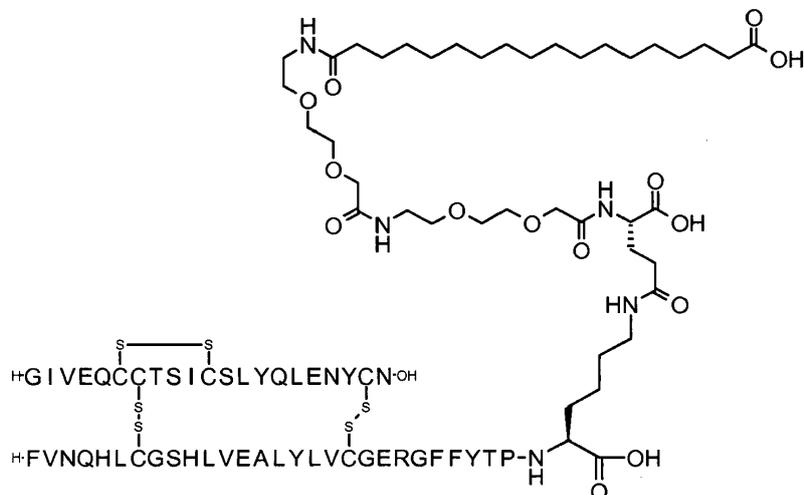


- 50 Se disolvió desB30 insulina humana (0.7 g) en Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> acuoso 100 mM (25 mL) y se le agregó acetonitrilo (25 mL). Cuando fue necesario, el pH se ajustó a pH 10-10.7 por adición de NaOH 1 N. Se disolvió eicosanodioil-Glu(OEG-OEG-OSu)-OTBU de *tert*-butilo (140 mg, preparado de manera similar a la descrita antes usando éster mono *tert*-butílico del ácido eicosanodioico en lugar de éster mono *tert*-butílico del ácido octadecanodioico) en acetonitrilo (3 mL) y se agregó lentamente a la solución de insulina. El pH se mantuvo a 10.5. Después de 45 minutos, se agregó agua (150 mL) a la mezcla de reacción y el pH se ajustó a 5.2 con HCl acuoso 1 N. El precipitado se aisló por



B29K(N<sup>f</sup>-{2-[2-(2-[2-(2-(octadecanodioilamino)etoxi]-etoxi)acetilamino)etoxi]etoxi]acetil-gGlu), desB30 insulina humana;

5

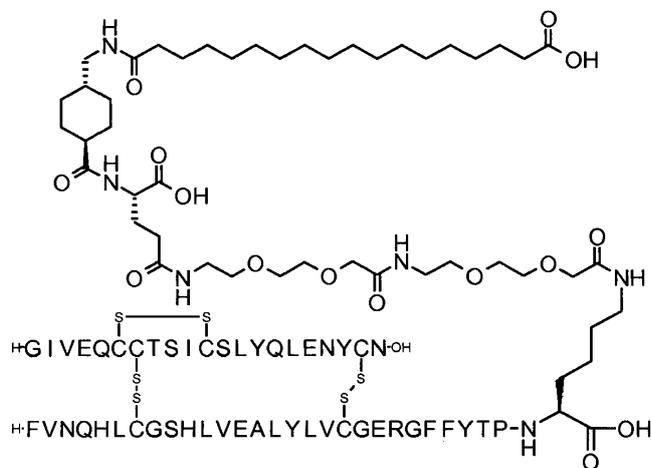


MALDI-TOF MS: 6428

Ejemplo 7, Procedimiento general (A):

10

B29K(N<sup>f</sup>[2-(2-[2-(2-[2-(4-[(octadecanodioilamino)metil]-*trans*-ciclohexanocarboxil)amino]-etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil)], desB30 insulina humana;



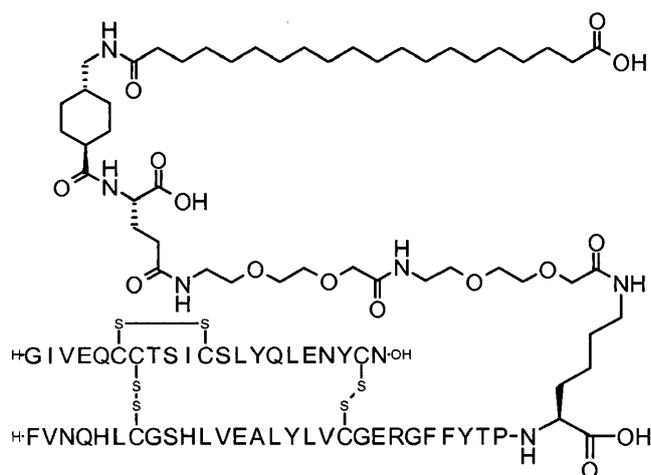
15

MALDI-TOF MS: 6563

Ejemplo 8, Procedimiento general (A):

20

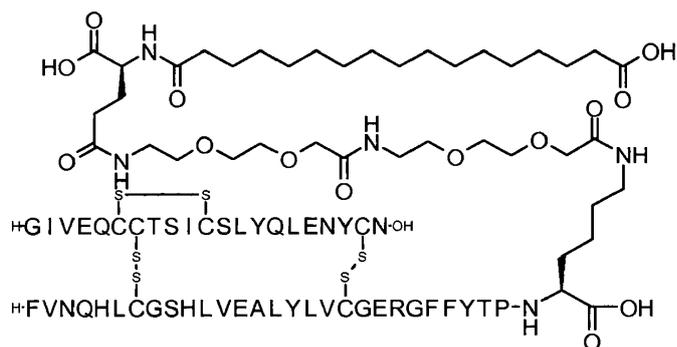
B29K(N<sup>f</sup>[2-(2-[2-(2-[2-(4-[(eicosanodioilamino)metil]-*trans*-ciclohexanocarboxil)amino]-etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil)], desB30 insulina humana;



MALDI-TOF MS: 6594

Ejemplo 9, Procedimiento general (A):

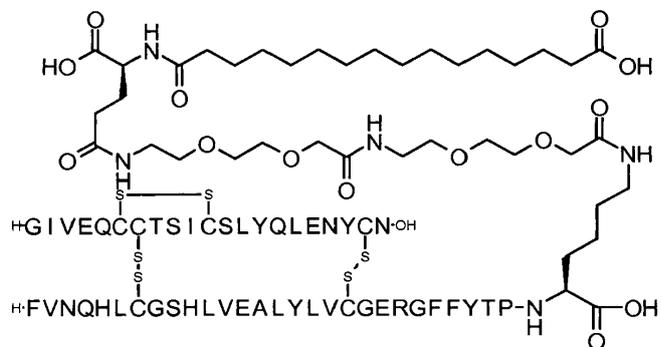
- 5 B29K(N(eps)-[2-(2-[2-(2-[2-(heptadecanodioil-gGlu)amino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi)-acetil]), desB30 insulina humana.



- 10 LC-MS (electronebulización): m/z: 1603 (M+4)/4

Ejemplo 10, Procedimiento general (A):

- 15 B29K(N(eps)-[2-(2-[2-(2-[2-(hexadecanodioil-gGlu)amino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi)-acetil]), desB30 insulina humana.



- 20 MALDI-TOF MS: 6395

Ejemplo 11:

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

25

La afinidad de los derivados de insulina de esta invención por el receptor de la insulina humana se determinó mediante un ensayo de captura de anticuerpo en una placa de microtitulación de ensayo SPA (Ensayo de centelleo por proximidad). 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 (HEPES 100 mM pH 7.8; cloruro de sodio 100 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, Tween-20 al 0.025%). La mezcla de reactivo para una única placa Optiplate Packard (Packard No. 6005190) estuvo compuesta por 2.4 µl de receptor de insulina humana recombinada purificado diluido 1:5000 (con o sin exón 11), una cantidad de solución madre de A14Tyr<sup>[125]</sup>I-insulina humana correspondiente a 5000 cpm por 100 µl de mezcla de reactivo, 12 µl de una dilución 1:1000 de anticuerpo F12, 3 ml de perlas de SPA y tampón de unión hasta un total de 12 ml. Después se agregó un total de 100 µl de mezcla de reactivo a cada pocillo de la placa Optiplate Packard y se preparó una serie de diluciones del derivado de insulina en la Optiplate de las muestras apropiadas. Después las muestras se incubaron durante 16 horas mientras se agitaban suavemente. Luego las fases se separaron por centrifugación durante 1 min y las placas se contaron en un Topcounter. Los datos de unión se ajustaron usando el algoritmo de regresión no lineal en el GraphPad Prism 2.01 (GraphPad Software, San Diego, CA).

El tampón de unión también se modificó para poseer 4.5% de HSA (seroalbúmina humana) para simular o "imitar" mejor la situación fisiológica de la unión al receptor.

Datos de unión al receptor de la insulina (isoforma A) de compuestos escogidos de la invención:

Nº de Ej.	Modificación	Insulina original	Afinidad al RI-A 0% de HSA (% respecto a la insulina humana)	Afinidad al RI-A 4.5% de HSA (% respecto a la insulina humana)
	C18-gGlu	desB30	9.2	0.16
1	C18-gGlu-OEG-OEG	desB30	12.6	1.35
2	C20-gGlu-OEG-OEG	desB30	8.6	1.96
3	C18-gGlu-OEG-OEG	B28D	4.7	ND
4	C18-gGlu-(OEG) <sub>3</sub>	desB30	10.0	ND
5	C18-gGlu-(OEG) <sub>4</sub>	desB30	8.9	ND
6	C18-OEG-OEG-gGlu	desB30	11.4	ND
7	C18-Trx-gGlu-(OEG) <sub>2</sub>	desB30	10.1	ND
8	C20-Trx-gGlu-(OEG) <sub>2</sub>	desB30	6.7	ND
9	C17-gGlu-OEG-OEG	desB30	10.8	ND
10	C16-gGlu-OEG-OEG	desB30	34.7	1.18

Las "modificaciones" de la tabla anterior se incluyeron para facilitar la lectura. La estructura/secuencia completa de estas insulinas se puede encontrar en los ejemplos.

Como se puede ver en la tabla, la inclusión de unidades repetitivas de aminoácidos que contienen alquilenglicol en la cadena lateral como se hace en los compuestos de esta invención mejora en diez veces la afinidad por el receptor de insulina en presencia de 4.5% de HSA.

Ejemplo 12:

Efecto reductor de la glucemia en ratas luego de la inyección *i.v.* en bolo de los derivados de insulina de esta invención

Se anestesiaron ratas Wistar machos, 200-300 g, en ayunas durante 18 h, utilizando Hypnorm-Dormicum s.c. (1.25 mg/ml Dormicum, 2.5 mg/ml fluanisona, 0.079 mg/ml de citrato de fentanilo) 2 ml/kg como dosis de preparación (para el tiempo -30 min antes de la dosificación de la sustancia de prueba) y 1 ml/kg adicional cada 20 minutos.

Los animales se dosificaron con una inyección intravenosa (vena de la cola), 1 ml/kg, de control y compuestos de prueba (rango de dosis usual 0.125-20 nmol/kg). Se extrajeron muestras de sangre para la determinación de la concentración de toda la glucosa sanguínea en tubos de vidrio de 10 µl heparinizados mediante punción de los vasos capilares de la punta de la cola para los tiempos -20 min y 0 min (antes de la dosificación), y para los tiempos 10, 20, 30, 40, 60, 80, 120 y 180 después de la dosificación. Se midieron las concentraciones de glucosa sanguínea luego de la dilución en tampón de análisis por el método de la glucosa oxidasa inmovilizada utilizando un autoanalizador EBIO Plus (Eppendorf, Alemania). Se hicieron curvas de concentraciones de glucosa plasmática media  $\pm$  SEM para cada dosis y cada compuesto.

#### 10 Ejemplo 13:

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

15 Se usaron ratas Sprague Dawley machos que pesaban 238-383 g el día del experimento, para el experimento de clamp (pinzamiento). Las ratas tuvieron acceso libre al alimento en condiciones ambientales controladas y se dejaron en ayunas toda la noche (desde las 3 pm) antes del experimento de clamp.

Protocolo experimental:

20 Las ratas se aclimataron en las instalaciones para animales durante al menos 1 semana antes del procedimiento quirúrgico. Aproximadamente 1 semana antes del experimento de clamp, se les insertaron catéteres Tygon bajo anestesia con halotano en la vena yugular (para infusión) y la arteria carótida (para extracción de muestras de sangre) y se exteriorizaron y se fijaron en la parte de atrás del cuello. Las ratas recibieron Streptocilin vet. (Boehringer Ingelheim; 0.15 ml/rata, i.m.) luego de la cirugía y fueron colocadas en una unidad de cuidado de animales (25 °C) durante el período de recuperación. Para obtener analgesia, se les administró Anorphin (0.06 mg/rata, s.c.) durante la anestesia y Rimadyl (1.5 mg/kg, s.c.) luego de la recuperación total de la anestesia (2-3 h) y nuevamente una vez por día durante 2 días.

30 A las 7 am del día del experimento, después de una noche en ayunas (desde las 3 pm del día anterior) las ratas se pesaron y se conectaron a las jeringas de extracción de muestras y al sistema de infusión (bombas básicas Harvard 22, Harvard, y jeringa hipodérmica de vidrio Perfectum, Aldrich) y después se colocaron en jaulas para clamp individuales, donde permanecieron durante casi 45 minutos antes del inicio del experimento. Las ratas pudieron moverse libremente en su lecho de paja habitual durante todo el experimento y tuvieron acceso libre a agua para beber. Después de un período basal de 30 min durante el cual se midieron los niveles de glucosa plasmática a intervalos de 10 min, se infundieron (i.v.) el derivado de insulina a analizar e insulina humana (un nivel de dosis por rata, n = 6-7 por nivel de dosis) a una velocidad constante durante 300 min. Los niveles de glucosa plasmática se midieron a intervalos de 10 min de principio a fin y la infusión de glucosa acuosa al 20% se ajustó concordantemente para mantener la euglucemia. Se juntaron las muestras de eritrocitos resuspendidos de cada rata y se les retornaron en volúmenes de aproximadamente ½ ml a través del catéter carotideo.

40 Cada día de experimento, se tomaron muestras de las soluciones de los derivados de insulina individuales a analizar y de la solución de insulina humana, antes y al final de los experimentos de clamp, y las concentraciones de los péptidos se confirmaron por HPLC. Las concentraciones plasmáticas de péptido C e insulina de rata así como del derivado de insulina a analizar y de la insulina humana se midieron a los tiempos correspondientes, antes y al final de los estudios. Las ratas fueron sacrificadas al final de los experimentos usando una sobredosis de pentobarbital.

50 Todo los compuestos según la presente invención analizados, mostraron una potencia significativamente mayor que la potencia de un compuesto conocido, es decir, B29K(N<sup>6</sup>-octadecanodiol-γGlu), desB30 insulina humana, administrado como la potencia en el período de estabilidad de la infusión *iv* de clamp. Por consiguiente, los compuestos de esta invención tienen una mayor potencia.

#### Ejemplo 14:

Administración pulmonar de derivados de insulina a ratas

55 La sustancia de prueba se dosificó pulmonarmente por el método de instilación de gotas. En resumen, se anestesiaron ratas Wistar machos (aprox. 250 g) con aproximadamente 60 ml de fentanilo/deshidrodenezperidol/dormicum administrados como una dosis de preparación sc de 6.6 ml/kg y seguido de 3 dosis de mantenimiento de 3.3 ml/kg sc con un intervalo de 30 min. Diez minutos después de la inducción de la anestesia, se obtuvieron muestras basales de la vena de la cola (t = -20 min) seguido de una muestra basal inmediatamente antes de la administración de la sustancia de prueba (t = 0). A t = 0, la sustancia de prueba se administró intratraquealmente en el pulmón. Se montó una cánula especial con extremos redondeados en una jeringa que contenía 200 µl de aire y la sustancia de prueba (1 ml/kg). A través del orificio, la cánula se introdujo en la tráquea y se llevó hasta uno de los bronquios principales apenas pasando la bifurcación. Durante la introducción,

se palpó el cuello desde el exterior para asegurar el posicionamiento intratraqueal. El contenido de la jeringa se inyectó seguido de una pausa de 2 segundos. A continuación, la cánula se extrajo lentamente. Las ratas se mantuvieron anestesiadas durante la prueba (se extrajeron muestras de sangre por hasta 4 u 8 h) y fueron sacrificadas luego del experimento.

5 Listado de secuencias

SEQ ID NO:1 es la cadena A1-A21 de los ejemplos 1-10. SEQ ID NO:2 es la cadena B1-B28 de los ejemplos 1, 2 y 4-10. SEQ ID NO:3 es la cadena B1-B28 del ejemplo 3.

10 Figura

La figura 1 muestra los resultados de la instilación intratraqueal de gotas de la insulina del ejemplo 1 en ratas.

15 Listado de secuencias

<110> Novo Nordisk A/S

20 <120> Insulinas con una fracción acilo que comprenden unidades repetitivas de aminoácidos que contienen alquilenglicol

<130> 7702.204-WO

<160> 3

<170> PatentIn version 3.4

25 <210> 1

< 211> 21

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> A1-A21

30 <400> 1

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu  
1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn  
20

35 <210> 2

< 211> 28

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> B1-B28

40 <400> 2

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr  
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro  
20 25

45 <210> 3

< 211> 28

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> B1-B28

50 <400> 3



REIVINDICACIONES

1. Una insulina acilada en la que una fracción acilo está unida a la insulina original y donde dicha fracción acilo comprende unidades repetitivas de aminoácidos que contienen alquilenglicol y donde hay un único residuo de lisina (K & Lys) en la insulina original, en la que dicha fracción acilo está unida a un grupo épsilon-amino de dicho residuo de lisina, y en la que la fracción acilo es un grupo de fórmula general (I):



en la que

n es 0 o un número entero en el intervalo 1-3,  
m es 0 o un número entero en el intervalo 1-6,  
p es un número entero en el intervalo 2-30

Acy es un ácido graso o un diácido graso que contiene 8 a 24 átomos de carbono del cual, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo del ácido graso y, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo de uno de los grupos carboxi del diácido graso,

AA1 es un aminoácido cíclico neutro del cual, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxi y se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino,

AA2 es un aminoácido ácido del cual, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxi y se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino,

AA3 es un aminoácido neutro que contiene alquilenglicol del cual, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxi y se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino,

el orden en el cual aparecen AA1, AA2 y AA3 en el grupo de fórmula I puede ser intercambiado de manera independiente, y

las uniones entre Acy, AA1, AA2 y/o AA3 son enlaces amida (peptídicos).

2. Una insulina acilada, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que n es 0 o 1.

3. Una insulina acilada, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que m es 1.

4. Una insulina acilada, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que p se encuentra en el intervalo de 2 a 20, preferentemente en el intervalo de 2 a 10, más particularmente en el intervalo de 2 a 4, y, específicamente es 2, 3, 4, 10, 20 o 30.

5. Una insulina acilada, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la fracción acilo es un grupo de fórmula general (I) que tiene una de las fórmulas generales siguientes: Acy-AA1-AA2-AA3-AA3-, Acy-AA2-AA3-AA3-, Acy-AA2-AA3-AA3-AA3-, Acy-AA2-AA3-AA3-AA3-AA3- o Acy-AA3-AA3-AA2, donde cada uno de Acy, AA1, AA2 y AA3 es el definido en este documento.

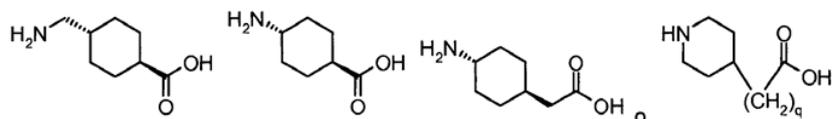
6. Una insulina acilada, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que Acy contiene 14 a 20 átomos de carbono, preferentemente 16 a 20 átomos de carbono, más particularmente 16 a 18 átomos de carbono, alternativamente 18 a 20 átomos de carbono y específicamente 10, 12, 14, 16, 17, 18, 20 o 22 átomos de carbono.

7. Una insulina acilada, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que Acy contiene 16 a 20 átomos de carbono.

8. Una insulina acilada, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que Acy es un diácido graso del cual, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo de uno de los grupos carboxi.

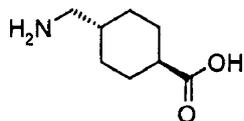
9. Una insulina acilada, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que Acy es ácido hexadecanodioico, ácido heptadecanodioico, ácido octadecanodioico o ácido eicosanodioico del cual, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo de uno de los grupos carboxi.

10. Una insulina acilada, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que AA1 es



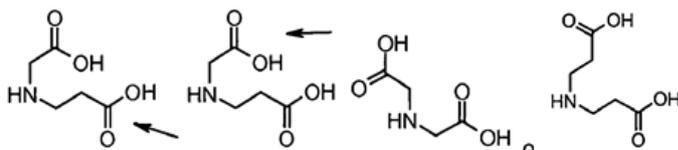
del cual, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxi y se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino y en el cual q es 0, 1, 2, 3 o 4.

11. Una insulina acilada, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que AA1 es



del cual, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxi y se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino.

12. Una insulina acilada, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que AA2 es Glu ( $\alpha$  o  $\gamma$ , L o D), Asp ( $\alpha$  o  $\beta$ , L o D),



del cual, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxi y se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino, y en el que las flechas indican el punto de unión al grupo amino de AA3.

13. Una insulina acilada en la que una fracción acilo está unida a la insulina original y donde dicha fracción acilo comprende unidades repetitivas de aminoácidos que contienen alquilenglicol y donde hay un único residuo de lisina (K & Lys) en la insulina original y en la que la fracción acilo es un grupo de fórmula general (I):



en la que

n es 0 o un número entero en el intervalo 1-3,  
m es 0 o un número entero en el intervalo 1-6,  
p es un número entero en el intervalo 2-30

Acy es un ácido graso o un diácido graso que contiene 8 a 24 átomos de carbono del cual, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo del ácido graso y, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo de uno de los grupos carboxi del diácido graso,

AA1 es un aminoácido cíclico neutro del cual, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxi y se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino,

AA2 es un aminoácido ácido del cual, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxi y se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino,

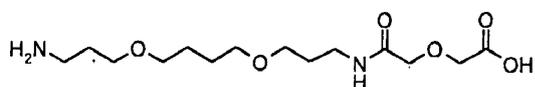
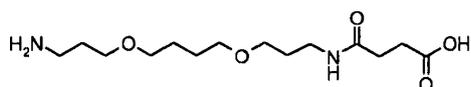
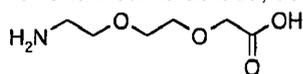
AA3 es un aminoácido neutro que contiene alquilenglicol del cual, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxi y se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino,

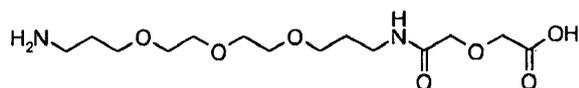
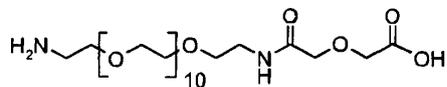
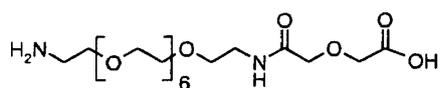
el orden en el cual aparecen AA1, AA2 y AA3 en el grupo de fórmula I puede ser intercambiado de manera independiente, y

las uniones entre Acy, AA1, AA2 y/o AA3 son enlaces amida (peptídicos).

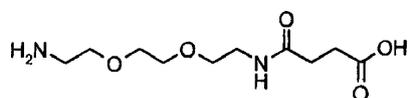
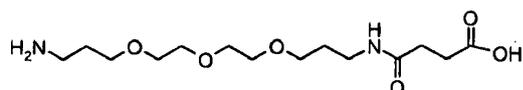
14. Una insulina acilada, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que AA2 es  $\gamma$ -L-Glu (también denominado:  $\gamma$ Glu) del cual se ha de eliminar un grupo hidroxilo del grupo carboxi y se ha de eliminar un átomo de hidrógeno del grupo amino.

15. Una insulina acilada, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que AA3 es:

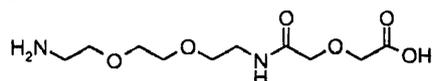




5

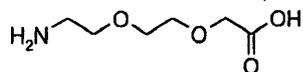


10 o



del cual, formalmente, se ha de eliminar un grupo hidroxilo del grupo carboxi y se ha de eliminar un átomo de hidrógeno del grupo amino.

15 16. Una insulina acilada, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que AA3 es:



del cual se ha de eliminar un grupo hidroxilo del grupo carboxi y se ha de eliminar un átomo de hidrógeno del grupo amino.

20 17. Una insulina acilada, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la insulina original es insulina humana; desB30 insulina humana; B28D insulina humana; B28D, desB30 insulina humana; B28K, B29P insulina humana y B3K, B29E insulina humana.

25 18. Una insulina acilada, de acuerdo con la reivindicación precedente, en la que la insulina original es insulina humana; desB30 insulina humana; B28D insulina humana y B28D, desB30 insulina humana.

19. Una insulina acilada, de acuerdo con la reivindicación precedente, en la que la insulina original es desB30 insulina humana.

30 20. Una insulina acilada, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la insulina original consta de 51 residuos de aminoácidos.

21. Una insulina acilada, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la insulina original consta de 50 residuos de aminoácidos.

35 22. Una insulina acilada, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la insulina original es insulina humana.

40 23. Una insulina acilada, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el residuo de aminoácido en la posición B3 de la insulina original es K (Lys) y el residuo de aminoácido en la posición B29 de la insulina original es E (Glu).

45 24. Una insulina acilada, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el residuo de aminoácido en la posición B28 de la insulina original es D (Asp).

25. Una insulina acilada, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes excepto la última, en la que el aminoácido en la posición B28 es K y el aminoácido en la posición B29 es P.
- 5 26. Una insulina acilada, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el residuo de aminoácido en la posición B29 de la insulina original es Lys.
27. Una insulina acilada, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes excepto la última, en la que el residuo de aminoácido en la posición B29 de la insulina original es E o P (Glu o Pro).
- 10 28. Una insulina acilada, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que no hay residuo de aminoácido en la posición B30 de la insulina original (es decir una desB30 insulina).
29. Una insulina acilada, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que todos los residuos de aminoácidos de la insulina original son aminoácidos codificables.
- 15 30. Una insulina acilada, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que sólo uno de los residuos de aminoácidos de la insulina original se aparta de los residuos de aminoácidos presentes en la insulina humana.
- 20 31. Una insulina acilada, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que exactamente dos de los residuos de aminoácidos de la insulina original se apartan de los residuos de aminoácidos presentes en la insulina humana.
- 25 32. Una insulina acilada, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que exactamente tres de los residuos de aminoácidos de la insulina original se apartan de los residuos de aminoácidos presentes en la insulina humana.
- 30 33. Una insulina acilada, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que exactamente cuatro de los residuos de aminoácidos de la insulina original se apartan de los residuos de aminoácidos presentes en la insulina humana.
34. Una insulina acilada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes que se elige del grupo que consiste en B29K(N<sup>ε</sup>[2-(2-[2-(2-(octadecanodioil-γGlu)amino]etoxi)etoxi]acetilamino)-etoxi]etoxi]acetil)), desB30 insulina humana; B29K(N<sup>ε</sup>[2-(2-[2-(2-(eicosanodioil-γGlu)amino)-etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil)), desB30 insulina humana; B28D, B29K(N<sup>ε</sup>-[2-(2-[2-(2-[2-(octadecanodioil-γGlu)amino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil)) insulina humana; B29K(N<sup>ε</sup>-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-(octadecanodioil-γGlu)amino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil-amino)etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil)) insulina humana; B29K(N<sup>ε</sup>-[2-(2-[2-(2-[2-(2-(2-(2-(octadecanodioilamino)etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil-gGlu), desB30 insulina humana; B29K(N<sup>ε</sup>[2-(2-[2-(2-[2-(4-[(octadecanodioilamino)metil]-*trans*-ciclohexanocarboxil)amino]-etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil)), desB30 insulina humana; B29K(N<sup>ε</sup>[2-(2-[2-(2-[2-(4-[(eicosanodioilamino)metil]-*trans*-ciclohexanocarboxil)amino]etoxi]etoxi]acetilamino)-etoxi]etoxi]acetil)), desB30 insulina humana; B29K(N(eps)-[2-(2-[2-(2-[2-(heptadecanodioil-gGlu)-amino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil)), desB30 insulina humana y B29K(N(eps)-[2-(2-[2-(2-[2-(hexadecanodioil-gGlu)amino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi)-acetil)), desB30 insulina humana.
- 35 35. Una insulina acilada, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para ser utilizada como un medicamento, para ser utilizada en un medicamento o para ser utilizada en la preparación de un medicamento.
- 40 36. Una insulina acilada, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para ser utilizada en el tratamiento de la diabetes o el uso de una insulina acilada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de la diabetes.
- 45 50

Fig. 1

