

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 146**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/28** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

**A61P 3/08** (2006.01)

**A61P 5/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2007 E 07787588 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 2049149**

54 Título: **Insulinas extendidas PEGiladas.**

30 Prioridad:

**31.07.2006 EP 06118171**

**15.09.2006 EP 06120735**

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

**31.07.2015**

73 Titular/es:

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

**Novo Allé**

**2880 Bagsvaerd , DK**

72 Inventor/es:

**MADSEN, PETER;**

**KJELDEN, THOMAS BØRGLUM;**

**TAGMOSE, TINA MØLLER y**

**JAKOBSEN, PALLE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 542 146 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 extendidas PEGiladas.

## 5 Campo de esta invención

10 [0001] La presente invención se refiere a insulinas extendidas PEGiladas, que tienen actividad de insulina y se pueden utilizar para el tratamiento de la diabetes. Las insulinas extendidas PEGiladas tienen mayor biodisponibilidad y un perfil de acción más prolongada que la insulina regular y son adecuadas en particular para la administración pulmonar. También tendrán una elevada estabilidad física y una baja tendencia a la fibrilación y serán solubles a pH neutro. Esta invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen las insulinas extendidas PEGiladas.

## 15 Antecedentes de esta invención

20 [0002] La estabilidad física y química heredada de la molécula de insulina es una condición básica para el tratamiento con insulina de la diabetes mellitus. Estas propiedades básicas son fundamentales para la formulación de insulina y para los métodos de administración de insulina aplicables, así como para las condiciones de almacenamiento y vida útil de preparaciones farmacéuticas. El uso de soluciones en la administración de insulina expone la molécula a una combinación de factores, por ejemplo, temperatura elevada, interfases aire-líquido-sólido variables así como fuerzas de cizallamiento, que pueden resultar en cambios irreversibles de la conformación, por ejemplo, formación de fibrilla.

25 [0003] Desafortunadamente, muchos diabéticos no están dispuestos a emprender un tratamiento intensivo debido al malestar asociado a las múltiples inyecciones necesarias para mantener un estrecho control de la glucemia. Este tipo de tratamiento puede ser tanto psicológica como físicamente doloroso. Luego de la administración oral, la insulina se degrada rápidamente en el tubo gastrointestinal y no es absorbida en el torrente sanguíneo. Por consiguiente, muchos investigadores han estudiado 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 eficaz de la insulina.

35 [0004] La administración pulmonar eficaz de una proteína depende de la capacidad para suministrar 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 tiene aproximadamente 30-40  $\mu\text{m}$  de espesor y que actúa como una barrera para 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. Este mecanismo también contribuye sustancialmente a la baja absorción de algunas partículas proteicas. 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 comprendidas.

45 [0005] Se reconoce, sin embargo, que las propiedades de los péptidos se pueden potenciar injertándoles moléculas orgánicas de tipo cadena. Dicho injerto puede mejorar las propiedades farmacéuticas como la vida media sérica, la estabilidad frente a la degradación proteolítica y una menor inmunogenia.

[0006] Las moléculas orgánicas tipo cadena utilizadas a menudo para potenciar las propiedades son cadenas a base de polietilenglicol, es decir cadenas que se basan en la unidad repetida  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ -. En adelante, se utiliza la abreviatura "PEG" para polietilenglicol.

50 [0007] La tecnología de PEG clásica toma ventaja de proporcionar polipéptidos con mayor tamaño (radio de Stoke) mediante la unión de una molécula orgánica soluble al polipéptido (Kochendoerfer, G., et al., Science (299) 884 et seq., 2003). Esta tecnología conduce a una menor depuración en seres humanos y animales de un polipéptido hormonal en comparación con el polipéptido natural. No obstante, esta técnica se ve obstaculizada a menudo por la menor potencia de los polipéptidos hormonales sometidos a esta técnica (Hinds, K., et al., Bioconjugate Chem. (11), 195 - 201, 2000).

60 [0008] Se dan a conocer en WO 02/094200 y WO 03/022996 composiciones de insulina para administración pulmonar que contienen un conjugado de insulina de dos cadenas acoplado covalentemente a una o más moléculas de polímeros que no son naturalmente hidrófilos como polialquilenglicoles y métodos para su preparación.

## Objetivos de esta invención

[0009] Todavía existe la necesidad de insulinas que tengan un perfil de acción más prolongada que los derivados de insulina conocidos hasta ahora y que al mismo tiempo sean solubles a los valores de pH fisiológicos y tengan una

potencia que sea comparable a la de la insulina humana. Además, existe la necesidad de otras formulaciones de insulina que se adapten bien a la aplicación pulmonar.

5 [0010] Un aspecto de esta invención se ocupa de proporcionar un medicamento que pueda ser administrado convenientemente por vía pulmonar para el tratamiento de pacientes diabéticos.

[0011] Otro aspecto de esta invención se ocupa de proporcionar un medicamento que pueda ser administrado convenientemente por vía pulmonar para el tratamiento de pacientes diabéticos y para reducir el riesgo de sufrir algunas o todas las complicaciones posteriores asociadas a menudo a la diabetes.

10 [0012] Otro aspecto de esta invención se ocupa de proporcionar un medicamento que pueda ser administrado convenientemente por vía pulmonar para el tratamiento de pacientes diabéticos y que para muchos pacientes su uso sea más conveniente que el de las inyecciones.

15 [0013] Otro aspecto de esta invención se ocupa de proporcionar un medicamento que pueda ser administrado convenientemente por vía pulmonar para el tratamiento de pacientes diabéticos y que tenga suficiente estabilidad química.

20 [0014] Otro aspecto de esta invención se ocupa de proporcionar un medicamento que pueda ser administrado convenientemente por vía pulmonar para el tratamiento de pacientes diabéticos y que tenga suficiente estabilidad física.

[0015] Otro aspecto de esta invención se ocupa de proporcionar un medicamento que tenga una afinidad suficientemente alta por el receptor de la insulina.

25 [0016] 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.

Definiciones

30 [0017] La insulina es una hormona polipeptídica secretada por las células  $\beta$  del páncreas y que consta de dos cadenas polipeptídicas denominadas cadenas A y B que están unidas entre sí por dos puentes disulfuro intercatenarios. La hormona se sintetiza como un precursor proinsulina de una sola cadena (preproinsulina) que consiste en un prepéptido de 24 aminoácidos, seguido de proinsulina que contiene 86 aminoácidos en la configuración: prepéptido-B-Arg-Arg-C-Lys-Arg-A, en la que C es un péptido de conexión de 31 aminoácidos, y A y B son las cadenas A y B, respectivamente, de la insulina. Arg-Arg y Lys-Arg son sitios de escisión para la escisión del péptido de conexión entre las cadenas A y B para formar la molécula de insulina de dos cadenas. La insulina es esencial para mantener la regulación metabólica normal.

40 [0018] En este documento, el término insulina abarca las insulinas de origen natural, por ej., la insulina humana, así como los análogos de estas insulinas.

[0019] 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.

50 [0020] 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 y/o agregando uno o más residuos de aminoácidos. Los residuos de aminoácidos agregados y/o sustituidos pueden ser residuos de aminoácidos codificables u otros residuos de aminoácidos de origen natural o residuos de aminoácidos puramente sintéticos.

55 [0021] En este documento, la expresión insulina extendida abarca un análogo de la insulina en el que (en comparación con la insulina humana) se agregan uno o más residuos de aminoácidos ya sea C - o N-terminalmente a la cadena A o B de la insulina. Por ejemplo, la cadena A puede extenderse en su extremo C-terminal, por ejemplo, mediante 1, 2, 3 o 4 residuos de aminoácidos (en comparación con la insulina humana) donde dichas extensiones se indican cómo A22, A23, A24 y A25, respectivamente. Por ejemplo, cuando el residuo de aminoácido en la posición A23 está PEGilado, entonces el aminoácido en la posición A22 puede ser cualquier residuo de aminoácido excepto Cys y Lys, y así sucesivamente. Por ejemplo, la cadena A puede extenderse en su extremo N-terminal, por ejemplo, mediante 1, 2, 3 o 4 residuos de aminoácidos (en comparación con la insulina humana) donde dichas extensiones se indican cómo A-1, A-2, A-3 y A-4, respectivamente. Por ejemplo, cuando el residuo de aminoácido en la posición A-2 está PEGilado, entonces el aminoácido en la posición A-1 puede ser cualquier residuo de aminoácido excepto Cys y

Lys, y así sucesivamente. Aun cuando la insulina extendida tenga una extensión en uno de sus cuatro extremos puede haber eliminaciones en otras posiciones de dicha insulina extendida. Análogamente a la insulina humana, la insulina extendida consta de dos cadenas, es decir la cadena A y la cadena B. En la insulina extendida, hay seis residuos de cisteína, dos de los cuales están presentes en la cadena A formando un enlace disulfuro intracatenario (que corresponde a las posiciones A6 y A11 en la insulina humana) y cuatro de los cuales forman dos puentes disulfuro intercatenarios (que corresponden a las posiciones A7, A20, B7 y B19 en la insulina humana). En este documento, los últimos 4 residuos de cisteína mencionados se denominan residuos de cisteína intercatenarios. En cada cadena (cadenas A y B), uno de los residuos de cisteína intercatenarios está más próximo al extremo N-terminal y el otro residuo de cisteína está más próximos al extremo C-terminal de cada cadena y, en este documento, dichos residuos de cisteína intercatenarios se denominan un residuo de cisteína intercatenario N-terminal y un residuo de cisteína intercatenario C-terminal, respectivamente. Cuando se determina si un análogo de la insulina es una insulina extendida, se debe contar el número de residuos de aminoácidos presente en cada cadena en el lado N-terminal del residuo de cisteína intercatenario N-terminal y contar el número de residuos de aminoácidos presente en cada cadena en el lado C-terminal del residuo de cisteína intercatenario C-terminal. Si uno de esos números (cifras) es más grande que el número correspondiente para la insulina humana, esa insulina se considera una insulina extendida. En la insulina humana, hay seis residuos de aminoácidos presentes en el lado N-terminal del residuo de cisteína intercatenario N-terminal de la cadena A, un residuo de aminoácido presente en el lado C-terminal del residuo de cisteína intercatenario C-terminal de la cadena A, seis residuos de aminoácidos presentes en el lado N-terminal del residuo de cisteína intercatenario N-terminal de la cadena B, y once residuos de aminoácidos presentes en el lado C-terminal del residuo de cisteína intercatenario C-terminal de la cadena B.

[0022] En este documento la expresión insulina original significa la insulina extendida sin las porciones PEG añadidas.

[0023] En este documento, el término mutación abarca cualquier cambio en la secuencia de aminoácidos (sustituciones e inserciones con aminoácidos codificables así como eliminaciones).

[0024] En este documento, las expresiones análogos de la cadena A y análogos de la cadena B de la insulina humana abarcan las cadenas A y B de la insulina humana, respectivamente, que tienen una o más sustituciones, eliminaciones o extensiones (adiciones) de las cadenas de aminoácidos A y B, respectivamente, en relación con las cadenas A y B, respectivamente, de la insulina humana.

[0025] 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 los 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 los códigos de tres letras para los aminoácidos, las expresiones correspondientes son AlaA21, GlyA21 y GlnA21, respectivamente.

[0026] En este documento términos como A-1, B-1, etcétera, indican las posiciones de los primeros aminoácidos N-terminales en las posiciones A1 y B1, respectivamente, y así sucesivamente.

[0027] En este documento términos como desB29 y desB30 indican un análogo de la insulina que carece del residuo de aminoácido B29 o B30, respectivamente.

[0028] En este documento la expresión insulina de una sola cadena abarca una secuencia polipeptídica de la estructura general B-C-A, donde A es la cadena A de la insulina humana o un análogo de la misma, B es la cadena B de la insulina humana o un análogo de la misma y C es un enlace o el denominado péptido de conexión, por ejemplo, una cadena peptídica de aproximadamente 1-35 residuos de aminoácidos que conecta el residuo del aminoácido C-terminal de la cadena B, por ejemplo, B30, con el residuo del aminoácido N-terminal de la cadena A, por ejemplo, A1. Si la cadena B es una cadena desB30, el péptido de conexión (C) conectará B29 con A1. La insulina de una sola cadena contendrá los tres puentes disulfuro correctamente posicionados como en la insulina humana, es decir, entre Cys<sup>A7</sup> y Cys<sup>B7</sup>, entre Cys<sup>A20</sup> y Cys<sup>B19</sup> y entre Cys<sup>A6</sup> y Cys<sup>A11</sup>.

[0029] La expresión péptido de conexión abarca una cadena peptídica que puede conectar el residuo del aminoácido C-terminal de la cadena B con el residuo de aminoácido N-terminal de la cadena A de la insulina. En este documento la expresión B'A significa una insulina de una sola cadena en la que el péptido de conexión no consiste en ningún aminoácido sino que es simplemente un enlace, es decir, existe un enlace entre el extremo C-terminal de la cadena B y el extremo N-terminal de la cadena A.

[0030] 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 regular.

[0031] Con la expresión insulina de acción prolongada se quiere dar a entender una insulina que tiene una duración

de acción más prolongada que la insulina humana normal o regular.

[0032] La numeración de las posiciones en los análogos de la insulina, las insulinas extendidas y las cadenas A y B se hacen de manera que el compuesto original sea la insulina humana con la numeración utilizada para ésta.

[0033] La expresión insulina basal según se usa en este documento significa un péptido insulínico que tiene un tiempo de acción de más de 8 horas, en particular de al menos 9 horas. Preferentemente, la insulina basal tiene un tiempo de acción de al menos 10 horas. Por lo tanto, la insulina basal puede tener un tiempo de acción en el intervalo entre aproximadamente 8 y 24 horas, preferentemente en el intervalo entre aproximadamente 9 y aproximadamente 15 horas.

[0034] En este documento el término enlazador abarca una molécula química que conecta un grupo -HN- de la insulina extendida con el grupo -O- de la molécula de PEG. El enlazador no tiene ninguna influencia sobre la acción deseada de la insulina extendida PEGilada final, especialmente no tiene ninguna influencia adversa.

[0035] Con "PEG" o polietilenglicol, según se usa en este documento se quiere dar entender cualquier poli(etilenglicol) o poli(óxido de etileno) soluble en agua. La expresión PEG comprenderá la estructura  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ , en la que n es un número entero entre 2 y aproximadamente 1000. Un PEG comúnmente utilizado es un PEG con extremos protegidos (end-capped), en el que uno de los extremos terminales del PEG está protegido con un grupo relativamente inactivo como alcoxi, mientras que el otro extremo es un grupo hidroxilo que puede ser modificado aún más mediante moléculas enlazadoras. Un grupo protector utilizado a menudo es metoxi y el PEG protegido se indica a menudo como mPEG. Por lo tanto, mPEG es  $\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ , en el que n es un número entero entre 2 y aproximadamente 1000 suficiente para dar el peso molecular promedio indicado para toda la molécula de PEG, por ej., para el mPEG de PM 2000, n es aproximadamente 44 (un número que está sometido a variación lote a lote). La noción de PEG se utiliza a menudo en lugar de mPEG. "PEG" seguido de un número (que no sea un subíndice) indica una molécula de PEG cuyo peso molecular es aproximadamente igual a ese número. Por lo tanto, "PEG2000" es una molécula de PEG que tiene un peso molecular aproximado de 2000.

[0036] Las formas específicas de PEG de esta invención son PEG ramificados, lineales, ahorquillados, en forma de mancuerna y similares, y los grupos PEG son habitualmente polidispersos, con un índice de polidispersión bajo, menor de 1.05. Las moléculas de PEG presentes en una insulina extendida consistirán generalmente para un peso molecular dado en una serie de monómeros de etilenglicol (u óxido de etileno). Por ejemplo, una molécula de PEG de peso molecular 2000 consistirá habitualmente en  $44 \pm 10$  monómeros, siendo el promedio de alrededor de 44 monómeros. El peso molecular (y el número de monómeros) estará sometido habitualmente a cierta variación lote a lote.

[0037] Otras formas específicas de PEG son monodispersas que también pueden ser ramificadas, lineales, ahorquilladas, o en forma de mancuerna. Ser monodisperso significa que la longitud (o el peso molecular) del polímero de PEG está definida específicamente y no es una mezcla de diversas longitudes (o pesos moleculares). En este documento la noción de mdPEG se usa para indicar que la molécula de mPEG es monodispersa, empleando "d" por "discreta". El subíndice numérico después de mdPEG, por ejemplo "12" en mdPEG<sub>12</sub>, indica el número de monómeros de etilenglicol dentro del polímero monodisperso (oligómero).

[0038] El término PEGilación abarca la modificación de la insulina mediante la unión de uno o más grupos PEG a través de un enlazador. La molécula de PEG puede unirse por sustitución nucleofílica (acilación) en grupos alfa-amino N-terminales o en residuo(s) de lisina en las posiciones gamma, por ejemplo, con ésteres OSu-activados, o las moléculas de PEG pueden unirse por alquilación reductora - también en los grupos amino presentes en la molécula de insulina extendida - usando reactivos PEG-aldehídos y un reductor, como el cianoborohidruro de sodio, o, alternativamente, las moléculas de PEG pueden unirse a la cadena lateral de un residuo de cisteína no apareado en una reacción de adición de Michael con, por ejemplo, reactivos PEG-maleimida.

[0039] Por insulina extendida PEGilada que tiene actividad de insulina se quiere dar a entender una insulina extendida PEGilada que tiene la capacidad de reducir la glucemia en mamíferos, medida en un modelo animal adecuado, que puede ser un modelo de rata, conejo o cerdo, después de la administración adecuada, por ejemplo por administración intravenosa, subcutánea o pulmonar, o que tiene afinidad de unión por el receptor de la insulina.

[0040] En este documento el término alquilo abarca un grupo hidrocarburo saturado lineal o ramificado.

[0041] En este documento el término alcoxi abarca el radical "alquil-O-". Los ejemplos representativos son, metoxi, etoxi, propoxi (por ej., 1-propoxi y 2-propoxi), butoxi (por ej., 1-butoxi, 2-butoxi y 2-metil-2-propoxi), pentoxi (1-pentoxi y 2-pentoxi), hexoxi (1-hexoxi y 3-hexoxi) y análogos.

[0042] En este documento el término alquileo abarca un grupo hidrocarburo saturado, lineal o ramificado bivalente, que tiene de 1 a 12 átomos de carbono. Los ejemplos representativos incluyen, pero no exclusivamente, metileno,

1,2-etileno, 1,3-propileno, 1,2-propileno, 1,3-butileno, 1,4-butileno, 1,4-pentileno, 1,5-pentileno, 1,5-hexileno, 1,6-hexileno y análogos.

5 [0043] Por elevada estabilidad física se quiere dar a entender que la tendencia a la fibrilación es menor que el 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 fibrilla en determinadas condiciones.

10 [0044] Un polipéptido con afinidad por el receptor de la insulina y el receptor de IGF-1 es un polipéptido capaz de interaccionar con un receptor de insulina y un receptor de 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. La insulina extendida PEGilada de la presente no se unirá al receptor de IGF-1 o tendrá una afinidad más bien baja por dicho receptor. Más precisamente, las insulinas extendidas PEGiladas de esta invención tendrán una afinidad por el receptor de IGF-1 de prácticamente la misma magnitud o menor que la de la insulina humana.

15 [0045] Los términos "tratamiento" y "tratar" según se usan en este documento significan el manejo y la atención de un paciente con el propósito de combatir una enfermedad, un trastorno o una afección. Los términos pretenden incluir el retraso del avance de la enfermedad, el trastorno o la afección, el alivio o la mitigación de los síntomas y las complicaciones, y/o la cura o eliminación de la enfermedad, el trastorno o la afección. El paciente a tratar es preferentemente un mamífero, en particular un ser humano.

20 [0046] La expresión "tratamiento de una enfermedad" según se usa en este documento significa el manejo y la atención de un paciente que sufre una enfermedad, una afección o un trastorno. El propósito del tratamiento es combatir la enfermedad, la afección o el trastorno. El tratamiento incluye la administración de los principios activos para eliminar o controlar la enfermedad, la afección o el trastorno, así como para aliviar los síntomas o las complicaciones asociados a la enfermedad, la afección o el trastorno.

25 [0047] La expresión prevención de una enfermedad según se usa en este documento se define como el manejo y la atención de un individuo que corre riesgo de sufrir la enfermedad, antes del inicio clínico de la enfermedad. El propósito de la prevención es combatir el avance de la enfermedad, la afección o el trastorno, e incluye la administración de los principios activos para prevenir o retrasar el inicio de los síntomas o las complicaciones y para prevenir o retrasar la aparición de enfermedades, afecciones o trastornos relacionados.

30 [0048] La expresión "cantidad eficaz" según se usa en este documento significa una dosis suficiente para que el tratamiento del paciente sea eficaz en comparación con la falta de tratamiento.

35 [0049] POT es el gen de la triosa fosfato isomerasa de *Schizosaccharomyces pombe*, y TPI1 es el gen de la triosa fosfato isomerasa de *S. cerevisiae*.

40 [0050] Por líder se entiende una secuencia de aminoácidos que consta de un prepéptido (el péptido señal) y un propéptido.

45 [0051] La expresión péptido señal se entiende que significa un prepéptido que está presente como una secuencia N-terminal en la forma precursora de una proteína. La función del péptido señal es permitir que la proteína heteróloga facilite la traslocación en el retículo endoplasmático. El péptido señal normalmente se escinde en el transcurso de este proceso. El péptido señal puede ser heterólogo u homólogo al organismo levadura que produce la proteína. Se pueden usar varios péptidos señal con el constructo de ADN de esta invención que incluyen el péptido señal de levadura aspártico proteasa 3 (YAP3) o cualquier análogo funcional (Egel-Mitani et al. (1990) YEAST 6:127-137 y US 5,726,038) y la señal factor  $\alpha$  del gen MF $\alpha$ 1 (Thorner (1981 en *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae*, Strathern et al., eds., pp 143-180, Cold Spring Harbor Laboratory, NY y US 4,870,00).

50 [0052] El término propéptido significa una secuencia polipeptídica cuya función es permitir que el polipéptido expresado sea dirigido desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi y posteriormente a una vesícula secretora para la secreción en el medio de cultivo (es decir la exportación del polipéptido a través de la pared celular o al menos a través de la membrana celular al espacio periplásmico de la célula de levadura). El propéptido puede ser el propéptido factor  $\alpha$  de levadura, véase US 4,546,082 y 4,870,008. Alternativamente, el propéptido puede ser un propéptido sintético es decir un propéptido que no se encuentra en la naturaleza. Se dan a conocer propéptidos sintéticos adecuados en US 5,395,922; 5,795,746; 5,162,498 y WO 98/32867. El propéptido contendrá preferentemente un sitio de procesamiento de endopeptidasa en el extremo C-terminal, como una secuencia Lys-Arg o cualquier análogo funcional de ésta.

60 [0053] En el presente contexto, las indicaciones de tres letras o de una letra de los aminoácidos se utilizaron en su sentido convencional según se indica a continuación. A menos que se indique explícitamente, los aminoácidos mencionados en este documento son L-aminoácidos. Además, los extremos izquierdo y derecho de una secuencia de aminoácidos de un péptido son, respectivamente, el extremo N-terminal y el extremo C-terminal, a menos que se

especifique lo contrario.

Abreviaturas para los aminoácidos

5 [0054]

Aminoácido	Código de tres letras	Código de una letra
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
Asparagina	Asn	N
Ácido glutámico	Glu	E
Ácido aspártico	Asp	D
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T

[0055] Los aminoácidos presentes en las insulinas PEGiladas de esta invención son, preferentemente, aminoácidos que pueden ser codificados por un ácido nucleico.

10 [0056] Las abreviaturas siguientes se han utilizado en la memoria y los ejemplos: Da es Dalton (peso molecular), kDa es kiloDalton (= 1000 Da), mPEG-SBA es mPEG-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-CO-OSu (éster N-hidroxisuccinimidílico del ácido mPEG-butanoico), mPEG-SMB es mPEG-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)-CO-OSu (éster N-hidroxisuccinimidílico del ácido mPEG- $\alpha$ -metilbutanoico), mPEG-SPA es mPEG-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-CO-OSu (éster N-hidroxisuccinimidílico del ácido mPEG-propiónico), PM es el peso molecular, OSu es 1-succinimidiloxi = 2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi, R es temperatura ambiente, SA es ácido sinapínico y Su es 1-succinimidil = 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo.

Resumen de esta invención

20 [0057] En un aspecto, esta invención se refiere a un análogo de la insulina PEGilada que, en comparación con la insulina humana, tiene una o más extensiones que se extienden desde las posiciones A1, B1, A21 y/o B30, dichas extensiones consisten en residuos de aminoácidos, y en el que la molécula de PEG, a través de un enlazador, está unida a uno o más de los residuos de aminoácidos de la extensión o extensiones.

25 [0058] A través de un grupo enlazador adecuado, un grupo PEG se puede unir a una o más cadenas laterales de residuos de lisina o cisteína cuando están presentes o unir a los grupos amino N-terminales o en ambos lugares en la insulina original. El enlazador es habitualmente un derivado de un ácido carboxílico, donde la funcionalidad del ácido carboxílico se usa para la unión a la insulina original a través de un enlace amida. El enlazador puede ser una molécula de ácido acético con el motivo de enlace: -CH<sub>2</sub>CO-, una molécula de ácido propiónico con el motivo de enlace: -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO- o -CHCH<sub>3</sub>CO-, o una molécula de ácido butírico con el motivo de enlace: -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO- o -CH<sub>2</sub>CHCH<sub>3</sub>CO-. Alternativamente, el enlazador puede ser un grupo -CO-.

5 [0059] Dado que la PEGilación del grupo lisina presente en la posición B29 de la cadena B de la insulina humana no es deseada, este residuo de aminoácido debe ser sustituido por otro residuo de aminoácido. Los residuos de aminoácidos adecuados para la sustitución son Ala, Arg, Gln e His. Además, es deseable que no haya ninguna Lys presente en ninguna de las posiciones 1 a 21 en la cadena A (A1-A21) y que no haya Lys presente en ninguna de las posiciones 1 a 30 en la cadena B (B1-B30).

[0060] La molécula de insulina original puede tener un número limitado de residuos de aminoácidos naturales sustituidos con otros residuos de aminoácidos, como se explica en la parte detallada de la memoria.

10 [0061] En una realización, esta invención se refiere a una insulina extendida PEGilada, en la que el análogo de la insulina original se aparta de la insulina humana en una o más de las eliminaciones o sustituciones siguientes: E o D en la posición A14, Q en la posición A18, A, G o Q en la posición A21, G o Q en la posición B1 o ningún residuo de aminoácido en la posición B1, Q, S o T en la posición B3 o ningún residuo de aminoácido en la posición B3, Q en la posición B13, H en la posición B25 o ningún residuo de aminoácido en la posición B25, ningún residuo de aminoácido en la posición B27, D, E o R en la posición B28, P, Q o R en la posición B29 o ningún residuo de aminoácido en la posición B29, ningún residuo de aminoácido en la posición B30.

15 [0062] El grupo PEG puede variar en tamaño dentro de un amplio margen como es bien sabido en el área. Sin embargo, grupos PEG demasiado grandes pueden interferir de manera negativa con la actividad biológica de la molécula de insulina extendida PEGilada.

20 [0063] Aún en otro aspecto, esta invención se refiere a preparaciones farmacéuticas que contienen la insulina extendida PEGilada de esta invención y adyuvantes y aditivos adecuados como uno o más estabilizantes, conservantes o agentes de isotonicidad, por ejemplo, iones zinc, fenol, cresol, un parabeno, cloruro de sodio, glicerol o manitol. El contenido de zinc de las formulaciones de la presente puede ser entre 0 y aproximadamente 6 átomos de zinc por hexámero de insulina. El valor de pH de la preparación farmacéutica puede ser entre aproximadamente 4 y aproximadamente 8.5, entre aproximadamente 4 y aproximadamente 5 o entre aproximadamente 6.5 y aproximadamente 7.5.

25 [0064] En otra realización, esta invención se refiere al uso de la insulina extendida PEGilada como un producto farmacéutico para disminuir los niveles de glucemia en mamíferos, particularmente, para el tratamiento de la diabetes.

30 [0065] En otro aspecto, esta invención se refiere al uso de la insulina extendida PEGilada para la elaboración de una preparación farmacéutica destinada a reducir los niveles de glucemia en mamíferos, particularmente, para el tratamiento de la diabetes.

35 [0066] En otra realización, esta invención se refiere a un método para reducir el nivel de glucemia en mamíferos mediante administración de una dosis terapéuticamente activa de una insulina extendida PEGilada de esta invención a un paciente que necesita dicho tratamiento.

40 [0067] En otro aspecto de esta invención, las insulinas extendidas PEGiladas se administran en combinación con uno o más principios activos en cualquier proporción adecuada. Dichos otros principios activos se pueden elegir entre insulina humana, análogos de la insulina de acción rápida, antidiabéticos, antihiperlipidémicos, fármacos antiobesidad, antihipertensivos y fármacos para el tratamiento de las complicaciones resultantes de la diabetes o asociadas a ella.

45 [0068] En una realización, los dos principios activos se administran como una preparación farmacéutica mixta. En otra realización, los dos componentes se administran por separado ya sea simultánea o secuencialmente.

50 [0069] En una realización, las insulinas extendidas PEGiladas de esta invención se pueden administrar junto con insulina humana de acción rápida o análogos de la insulina humana. Dicho análogo de la insulina de acción rápida puede ser tal que el residuo de aminoácido en la posición B28 sea Asp, Lys, Leu, Val o Ala y el residuo de aminoácido en la posición B29 sea Lys o Pro, des(B28-B30), des(B27) o des(B30) insulina humana y un análogo en el que el residuo de aminoácido en la posición B3 sea Lys y el residuo de aminoácido en la posición B29 sea Glu o Asp. La insulina extendida PEGilada de esta invención y la insulina humana de acción rápida o análogo de la insulina humana se pueden mezclar en una proporción entre aproximadamente 90/10%; aproximadamente 70/30% o aproximadamente 50/50%.

55 [0070] Las insulinas extendidas PEGiladas de esta invención también se pueden usar en un tratamiento de combinación junto con un antidiabético.

[0071] Los antidiabéticos incluirán la insulina, GLP-1(1-37) (péptido-1 semejante al glucagón) descrito en WO 98/08871, WO 99/43706, US 5424286 y WO 00/09666, GLP-2, exendina-4(1-39), fragmentos insulíntricos de



éstos, análogos insulíntrópicos de éstos y derivados insulíntrópicos de éstos. Los fragmentos insulíntrópicos de GLP-1 (1-37) son péptidos insulíntrópicos para los cuales se puede encontrar toda la secuencia en la secuencia de GLP-1 (1-37) y en los cuales al menos un aminoácido terminal ha sido eliminado.

5 [0072] Las insulinas extendidas PEGiladas de esta invención también se pueden usar en un tratamiento de combinación junto con un anti-diabético oral como una tiazolidindiona, metformina y otra preparación farmacéutica para tratamiento oral de la diabetes tipo 2.

10 [0073] Además, las insulinas extendidas PEGiladas de esta invención se pueden administrar en combinación con uno o más fármacos anti-obesidad o reguladores del apetito.

15 [0074] En una realización, esta invención se refiere a preparaciones farmacéuticas pulmonares que contienen la insulina extendida PEGilada de esta invención y adyuvantes y aditivos adecuados como uno o más estabilizantes, conservantes o agentes de isotonicidad, por ejemplo, iones zinc, fenol, cresol, un parabeno, cloruro de sodio, glicerol, propilenglicol o manitol.

20 [0075] Se debe entender que cualquier combinación adecuada de las insulinas extendidas PEGiladas con dieta y/o ejercicio, uno o más de los compuestos mencionados precedentemente y opcionalmente uno o más de otros principios activos, se considera comprendida por el alcance de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

25 [0076] Las propiedades de estabilidad y solubilidad de la insulina son aspectos subyacentes importantes del tratamiento actual con insulina. Esta invención apunta a estas cuestiones al proporcionar análogos de la insulina extendida PEGilada, estables, en los que la PEGilación en la extensión disminuye la flexibilidad molecular y reduce concomitantemente la propensión a la fibrilación y limita o modifica la zona del pH de precipitación.

30 [0077] Las insulinas extendidas PEGiladas de esta invención están particularmente destinadas a la administración pulmonar debido a su relativamente alta biodisponibilidad en comparación, por ejemplo, con la insulina humana. Además, las insulinas extendidas PEGiladas tendrán una actividad de insulina prolongada.

35 [0078] Debido a que prácticamente todos los polímeros de PEG son mezclas de muchas moléculas grandes, se debe recurrir a promedios para describir el peso molecular. Entre muchas formas posibles de informar promedios, tres son de uso común: el peso molecular promedio en número, el peso molecular promedio en masa y el peso molecular promedio z. El peso molecular promedio en masa es probablemente el más útil de los tres, porque representa bastante bien las contribuciones de diferentes tamaños de cadenas al comportamiento general del polímero y se correlaciona mejor con la mayoría de las propiedades físicas de interés.

- Peso molecular promedio en número ( $M_n$ , en inglés).

$$\frac{\sum(M_i N_i)}{\sum(N_i)}$$

- 
- Peso molecular promedio en masa ( $M_w$ , en inglés).

$$\frac{\sum(M_i^2 N_i)}{\sum(M_i N_i)}$$

- 
- Peso molecular promedio z ( $M_z$ , en inglés).

$$\frac{\sum(M_i^3 N_i)}{\sum(M_i^2 N_i)}$$

45 donde  $N_i$  es la fracción molar (o la fracción en número) de moléculas con peso molecular  $M_i$  en la mezcla de polímeros. La relación entre  $M_w$  y  $M_n$  se conoce como índice de polidispersión (PDI) y proporciona una indicación aproximada de la amplitud de la distribución. El PDI se acerca a 1.0 (el límite inferior) para polímeros especiales con distribuciones de PM muy estrechas.

50 [0079] Si bien pueden ser preferibles grupos PEG con peso molecular más bajo para aumentar la biodisponibilidad, las cadenas de PEG de alto peso molecular, por ejemplo, que tengan un peso molecular promedio de 4000-6000 Dalton o mayor, aunque generalmente se encuentra que disminuyen la bioactividad de la molécula de insulina, pueden ser preferibles para aumentar la vida media, por ejemplo, en el caso de formulaciones para la administración pulmonar.

[0080] Los grupos PEG de esta invención contendrán generalmente un número de subunidades (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-).

5 [0081] Los grupos PEG de la invención consistirán habitualmente para un peso molecular dado en una serie de monómeros de etilenglicol (u óxido de etileno). Por ejemplo, un grupo PEG de peso molecular de 2000 Dalton consistirá habitualmente en 43 ± 10 monómeros, siendo el promedio alrededor de 43-44 monómeros.

10 [0082] La molécula de insulina original que está PEGilada en esta invención es una molécula de insulina extendida, es decir, una molécula de insulina que tiene uno o más residuos de aminoácidos unidos al extremo N-terminal de la cadena original A y/o B, por ejemplo, a A1 y/o B1, y/o unidos al extremo C-terminal de la cadena original A y/o B, por ejemplo, A21 y/o B30, con relación a la insulina humana. Preferentemente, la molécula de insulina extendida, es decir, la insulina original, contiene al menos 52 residuos de aminoácidos.

15 [0083] Las insulinas extendidas PEGiladas de esta invención pueden estar monosustituidas con un solo grupo PEG unido a un residuo de aminoácido lisina en la molécula de insulina original o a un residuo de aminoácido N-terminal. Alternativamente, las insulinas extendidas PEGiladas de esta invención pueden contener dos, tres o cuatro grupos PEG. Si la insulina extendida contiene más de un grupo PEG, tendrá habitualmente la misma molécula de PEG unida a cada grupo lisina o al residuo de aminoácido N-terminal. Sin embargo, los grupos PEG individuales también pueden variar entre sí en tamaño y longitud.

20 [0084] Por ejemplo, una insulina extendida que tenga las desviaciones siguientes en comparación con la insulina humana: A22K, B29R, desB30 y que esté PEGilada en el residuo de lisina en la posición A22 con ácido mPEG-propiónico, 2 kDa, por ejemplo, utilizando mPEG-SPA se denomina A22K(N<sup>m</sup>mPEG2000-propionil) B29R desB30 insulina humana. Es obvio que si cualquiera de los otros reactivos de PEGilación correspondientes (PM 2000 Da),  
25 que contienen otros enlazadores, por ejemplo los enlazadores de ácido butírico, hubiera sido utilizado para la preparación de ese compuesto en particular, el nombre "exacto" de ese compuesto en particular sería diferente, pero las pequeñas diferencias moleculares no darán lugar a ninguna diferencia en las propiedades biológicas. En esta solicitud, las insulinas extendidas PEGiladas son, en gran medida, denominadas como si la molécula de enlace fuera un enlazador de ácido propiónico, independientemente del enlazador real. De hecho, en la bibliografía de la PEGilación de proteínas, raramente se especifica cuáles grupos de enlace se utilizan. Las variables importantes son,  
30 con respecto a las propiedades biológicas: tamaño (en Daltons) y forma de la molécula de PEG y posición de la unión de PEG dentro de la proteína.

35 [0085] Las insulinas originales se producen mediante expresión de una secuencia de ADN que codifica la insulina extendida en cuestión en una célula huésped adecuada por técnicas bien conocidas como las dadas a conocer por ejemplo en la patente de Estados Unidos N° 6500645. La insulina original se expresa directamente como una molécula precursora que tiene una extensión N-terminal en la cadena B. Esta extensión N-terminal puede tener la función de aumentar la cantidad de producto expresado directamente y puede tener hasta 15 residuos de aminoácidos de longitud. La extensión N-terminal se va a escindir in vitro después del aislamiento del caldo de cultivo y por lo tanto tendrá un sitio de escisión próximo a B1. Las extensiones N-terminales del tipo adecuado para esta invención se dan a conocer en la patente de Estados Unidos N° 5,395,922 y la patente europea N° 765,395A.

45 [0086] La secuencia de polinucleótidos que codifica la insulina original se puede preparar sintéticamente mediante métodos estándar establecidos, por ejemplo, el método de la fosfoamidita descrito por Beaucaage et al. (1981) Tetrahedron Letters 22:1859-1869, o el método descrito por Matthes et al. (1984) EMBO Journal 3: 801-805. Según el método de la fosfoamidita, los oligonucleótidos se sintetizan, por ejemplo, en un sintetizador automático de ADN, se purifican, se transforman en dúplex y se ligan para formar el constructo de ADN sintético. Una forma preferida en la actualidad de preparar el constructo de ADN es mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

50 [0087] Las secuencias de polinucleótidos pueden también ser de origen mixto genómico, ADNc y sintético. Por ejemplo una secuencia genómica o ADNc que codifica un péptido líder se puede unir a una secuencia genómica o ADNc que codifica las cadenas A y B, luego de lo cual la secuencia de ADN puede ser modificada en un sitio insertando oligonucleótidos sintéticos que codifican la secuencia de aminoácidos deseada para la recombinación homóloga, de conformidad con procedimientos bien conocidos, o preferentemente generando la secuencia deseada por PCR empleando oligonucleótidos adecuados.

60 [0088] El método de recombinación hará uso habitualmente de un vector que sea capaz de replicarse en el microorganismo o la célula huésped elegidos y que lleve una secuencia de polinucleótidos que codifique la insulina original. El vector recombinante puede ser un vector que se replique autónomamente, es decir, un vector, que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar su autoreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica junto con el cromosoma o cromosomas en los que se ha integrado. Además, se puede usar un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que

juntos contengan el ADN total a ser introducido en el genoma de la célula huésped, o un transposón. El vector puede ser plásmidos lineales o circulares cerrados y preferentemente contendrá uno o más elementos que permitan la integración estable del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

5 [0089] El vector de expresión recombinante es capaz de replicarse en levaduras. Los ejemplos de secuencias que permiten que el vector se replique en levaduras son los genes de replicación REP 1-3 de 2 µm del plásmido de levadura y el origen de la replicación.

10 [0090] El vector puede contener uno o más marcadores seleccionables que permitan la fácil selección de células transformadas. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto aporta resistencia biocida o viral, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos, y similares. Los ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son los genes *dal* de *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*, o los marcadores que confieren resistencia a antibióticos como resistencia a ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Los marcadores seleccionables para usar en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina carbamoiltransferasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato decarboxilasa) y *trpC* (antranilato sintasa). Los marcadores adecuados para las células huésped de levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Un marcador seleccionable muy adecuado para levaduras es el gen TPI de *Schizosaccharomyces pombe* (Russell (1985) Gene 40:125-130).

20 [0091] En el vector, la secuencia de polinucleótidos está conectada operablemente a una secuencia promotora adecuada. El promotor puede ser cualquier secuencia de ácido nucleico que tenga actividad transcripcional en la célula huésped de elección, incluidos los promotores mutantes, truncados e híbridos, y que se pueda obtener de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares ya sean homólogos o heterólogos a la célula huésped.

25 [0092] Los ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción en una célula huésped bacteriana, son los promotores obtenidos del operón *lac* de *E. coli*, el gen de la agarasa de *Streptomyces coelicolor* (*dagA*), el gen de la levansucrasa de *Bacillus subtilis* (*sacB*), el gen de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (*amyL*), el gen de la amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (*amyM*), el gen de la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (*amyQ*) y el gen de la penicilinasa de *Bacillus licheniformis* (*penP*). Los ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción en una célula huésped fúngica filamentosa son los promotores obtenidos de los genes de la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, la proteínasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, la alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* y la alfa-amilasa estable a los ácidos de *Aspergillus niger*. En una célula huésped de levadura, los promotores útiles son los promotores Ma1, TPI, ADH o PGK de *Saccharomyces cerevisiae*.

35 [0093] La secuencia de polinucleótidos que codifica la insulina original estará también habitualmente conectada operablemente a un terminador adecuado. En levaduras un terminador adecuado es el terminador TPI (Alber et al. (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:419-434).

40 [0094] Los procedimientos que se utilizan para unir la secuencia de polinucleótidos que codifica la insulina original, el promotor y el terminador, respectivamente, y para insertarlos en un vector adecuado que contenga la información necesaria para la replicación en el huésped elegido, son bien conocidos por los expertos en el área. Se entenderá que el vector puede ser construido primero preparando un constructo de ADN que contenga la secuencia completa de ADN que codifica las insulinas extendidas de esta invención y posteriormente insertando este fragmento en un vector de expresión adecuado, o insertando secuencialmente fragmentos de ADN que contengan información genética para los elementos individuales (como la señal, el propéptido, el péptido de conexión y las cadenas A y B) seguido de la unión.

45 [0095] El vector que contiene la secuencia de polinucleótidos que codifica la insulina original se introduce en una célula huésped para que el vector se mantenga como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autoreplicante. La expresión "célula huésped" abarca cualquier progenie de una célula original que no sea idéntica a la célula original debido a mutaciones que ocurren durante la replicación. La célula huésped puede ser un microorganismo unicelular, por ejemplo un procarionta, o un microorganismo no unicelular, por ejemplo un eucariota. Las células unicelulares útiles son células bacterianas como bacterias grampositivas que incluyen, pero no exclusivamente, una célula de *Bacillus*, una célula de *Streptomyces*, o bacterias gramnegativas como *E. coli* y *Pseudomonas* sp. Las células eucariotas pueden ser células de mamíferos, insectos, plantas u hongos. En una realización, la célula huésped es una célula de levadura. El organismo levadura puede ser cualquier organismo levadura adecuado que, al cultivarse, produzca grandes cantidades de la insulina de una sola cadena de la invención. Los ejemplos de organismos levadura adecuados son cepas elegidas entre las especies de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces uvarum*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia kluyveri*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida* sp., *Candida utilis*, *Candida cacaoui*, *Geotrichum* sp. y *Geotrichum fermentans*.

60 [0096] La transformación de las células de levadura puede realizarse por ejemplo mediante formación de protoplasto, seguida de la transformación de una manera conocida en sí. El medio utilizado para cultivar las células

puede ser cualquier medio convencional adecuado para el cultivo de organismos levadura. La insulina extendida secretada, una proporción significativa de la cual estará presente en el medio en forma correctamente procesada, puede ser recuperada del medio por procedimientos convencionales que incluyen la separación de las células de levadura del medio por centrifugación, filtración o captura del precursor de la insulina mediante una matriz de intercambio iónico o mediante una matriz de absorción en fase reversa, por precipitación de los componentes proteicos del sobrenadante o el filtrado por medio de una sal, por ejemplo, sulfato de amonio, seguido de purificación por diversos procedimientos cromatográficos como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad o similares.

#### 10 Composiciones farmacéuticas

[0097] Las insulinas extendidas PEGiladas de esta invención se pueden administrar por vía subcutánea, oral o pulmonar.

15 [0098] Para la administración subcutánea, las insulinas extendidas PEGiladas de esta invención se formulan análogamente a las formulaciones de insulina conocidas. Además, para la administración subcutánea, las insulinas extendidas PEGiladas de esta invención se administran análogamente a la administración de las insulinas conocidas y, en general, los médicos están familiarizados con este procedimiento.

20 [0099] Las insulinas extendidas PEGiladas 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 de más de aproximadamente 0.5 µg/kg a aproximadamente 50 µg/kg de las insulinas extendidas PEGiladas de esta invención. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser  
25 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.

[0100] Las insulinas extendidas PEGiladas 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.

[0120] Las insulinas extendidas PEGiladas de esta invención se pueden administrar mediante cualquiera de una serie de dispositivos de inhalación conocidos en el área para la administración por inhalación de un agente terapéutico. Estos dispositivos incluyen inhaladores de dosis fija, nebulizadores, generadores de polvo seco, pulverizadores y análogos. Preferentemente, las insulinas extendidas PEGiladas 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 extendidas PEGiladas 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 µm, por ejemplo de aproximadamente 1-5 µm, 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.

[0102] Como reconocerán los expertos en el área, la formulación de las insulinas extendidas PEGiladas 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 las insulinas extendidas PEGiladas en el aerosol. Por ejemplo, a mayores concentraciones de las insulinas extendidas PEGiladas 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 concentraciones más altas de aerosol y se pueden operar durante períodos de tiempo más cortos para suministrar la cantidad deseada de las insulinas extendidas PEGiladas. Los dispositivos como los inhaladores de polvo suministran el principio activo hasta que se expelen una determinada carga del fármaco desde el dispositivo. En este tipo de inhalador, la cantidad de insulinas extendidas PEGiladas de esta invención en una determinada cantidad del polvo determina la dosis suministrada en una única administración.

60 [0103] El tamaño de partícula de las insulinas extendidas PEGiladas 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 extendidas PEGiladas de esta invención se formulan de modo que al menos 10% de las insulinas extendidas PEGiladas administradas se depositen en el pulmón, preferentemente entre aproximadamente 10 y

aproximadamente 20%, o más. Se sabe que la máxima eficiencia de depósito pulmonar para la respiración por boca en los seres humanos se obtiene con tamaños de partícula entre aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  y aproximadamente 3  $\mu\text{m}$ . Cuando el tamaño de las partículas es superior a aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ , el depósito pulmonar disminuye sustancialmente. Tamaños de partícula inferiores a aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  causan que el depósito pulmonar disminuya, y se torna difícil administrar partículas con masa suficiente para que sean terapéuticamente eficaces. Por consiguiente, las partículas de las insulinas extendidas PEGiladas administradas 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 las insulinas extendidas PEGiladas se elige para obtener el tamaño de partícula deseado en el dispositivo de inhalación elegido.

[0104] De manera ventajosa para la administración como un polvo seco, una insulina extendida PEGilada 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 aspersión, molienda, micronización, o punto de condensación crítico de una solución que contenga la insulina extendida PEGilada de esta invención y otros ingredientes deseados. Se conocen otros métodos también adecuados para generar partículas útiles para la invención actual.

[0105] 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.

[0106] Las formulaciones de insulinas extendidas PEGiladas 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 extendida PEGilada, 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 similares. Convenientemente, el aditivo no afecta adversamente a las vías respiratorias del paciente. La insulina extendida PEGilada se puede mezclar con un aditivo a nivel molecular o la formulación sólida puede incluir partículas de una insulina extendida PEGilada 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 uno de los propósitos descritos antes, a menudo entre aproximadamente 50% y aproximadamente 90% en peso de la formulación. También se pueden incluir en la formulación otros agentes conocidos para la formulación de una proteína como una proteína análoga a la insulina.

[0107] Se puede producir un aerosol que contenga las insulinas extendidas PEGiladas de esta invención forzando a presión una suspensión o solución de la insulina extendida PEGilada a través de una boquilla. El tamaño y 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  $\mu\text{m}$ .

[0108] Las formulaciones de insulinas extendidas PEGiladas de esta invención adecuadas para utilizar con un pulverizador contendrán generalmente las insulinas extendidas PEGiladas en una solución acuosa a una concentración entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 500 mg de la insulina extendida PEGilada por ml de solución. Dependiendo de la insulina PEGilada 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 PEGilada 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 incluir un excipiente o un estabilizante para la insulina extendida PEGilada, como un tampón, un reductor, una proteína incrementadora de 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 extendida PEGilada incluyen sacarosa, manitol, lactosa, trehalosa, glucosa o análogos. La formulación de

insulinas extendidas PEGiladas 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 surfactantes 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.

[0109] Las composiciones farmacéuticas que contienen una insulina extendida PEGilada 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.

[0110] Las composiciones inyectables de las insulinas extendidas PEGiladas 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 extendida PEGilada 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.

[0111] 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.

[0112] 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.

[0113] 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, incluidos por ejemplo fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, hidroxietil almidón y carboximetilcelulosa de sodio. En 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.

[0114] 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.

5 [0115] Los ejemplos de tampones adecuados son acetato de sodio, glicilglicina, HEPES ácido (4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinaetanosulfónico) y fosfato de sodio.

[0116] Una composición para la administración nasal de las insulinas extendidas PEGiladas de esta invención se puede preparar, por ej., como se describe en la patente europea N° 272097.

10 [0117] Las composiciones que contienen insulinas extendidas PEGiladas 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 tipo 1, la diabetes tipo 2 y la hiperglucemia por ejemplo como se ha visto a veces en personas seriamente lesionadas y en 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 extendida PEGilada de esta invención sea determinada por los expertos para cada paciente en particular de manera similar que para las composiciones de insulina conocidas.

20 Características preferidas de esta invención

[0118] En resumen, las características de esta invención son las siguientes:

25 1. Un análogo de la insulina PEGilada que, en comparación con la insulina humana, tiene una o más extensiones que contienen PEG que se extienden desde las posiciones A1, B1, A21 y/o B30, dichas extensiones consisten en residuos de aminoácidos, y en el que la molécula de PEG, a través de un enlazador, está unida a uno o más de los residuos de aminoácidos de la extensión o extensiones.

30 2. Un análogo de la insulina PEGilada, según la cláusula 1, en el que sólo uno de los residuos de aminoácidos en una de las extensiones tiene una molécula de PEG.

3. Un análogo de la insulina PEGilada, según la cláusula 1, en el que sólo dos de las extensiones tienen una molécula de PEG, y preferentemente, sólo hay dos moléculas de PEG.

35 4. Un análogo de la insulina PEGilada, según la cláusula 1, en el que la extensión que tiene una molécula de PEG está situada N-terminalmente con respecto a la posición A1.

5. Un análogo de la insulina PEGilada, según la cláusula 1, en el que la extensión que tiene una molécula de PEG está situada N-terminalmente con respecto a la posición B1.

40 6. Un análogo de la insulina PEGilada, según la cláusula 1, en el que la extensión que tiene una molécula de PEG está situada C-terminalmente con respecto a la posición A21.

7. Un análogo de la insulina PEGilada, según la cláusula 1, en el que la extensión que tiene una molécula de PEG está situada C-terminalmente con respecto a la posición B30.

45 8. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el número de extensiones por molécula de insulina es cuatro.

50 9. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el número de extensiones por molécula de insulina es tres.

10. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el número de extensiones por molécula de insulina es dos.

55 11. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el número de extensiones por molécula de insulina es uno.

60 12. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el análogo de la insulina original se desvía de la insulina humana en una o más de las extensiones siguientes: G en la posición A-3, G en la posición A-2, K o R en la posición A-1, G o K en la posición A22, G o K en la posición A23, G o K en la posición A24, K en la posición A25, y K en la posición B31 y, comparado con la insulina humana, hay, opcionalmente, hasta 12 o más mutaciones entre eliminaciones, sustituciones y adiciones de un residuo de aminoácido y, preferentemente no hay otras mutaciones en dicho análogo de la insulina.

13. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que la extensión consiste en una o más de las fórmulas siguientes en las que la molécula de PEG está unida a la cadena o cadenas laterales de los residuos de lisina o cisteína cuando están presentes o al grupo o grupos amino N-terminales (o ambas cosas):

- 5  
-AA<sub>x1</sub>K (para extensiones C-terminales), donde x1 es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 (y donde K es lisina),  
K-AA<sub>x2</sub>- (para extensiones N-terminales), donde x2 es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 (y donde K es lisina),  
10 -AA<sub>x3</sub>C (para extensiones C-terminales), donde x3 es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 (y donde C es cisteína),  
C-AA<sub>x4</sub>- (para extensiones N-terminales), donde x4 es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 (y donde C es cisteína),  
15 AA<sub>x5</sub>-R<sub>y</sub>- (para extensiones N-terminales), donde x5 es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8, e y es 0 o 1 (y donde R es arginina),  
y donde AA es el residuo de cualquier aminoácido codificable excepto Lys y Cys, y, preferentemente, AA es una cadena peptídica donde cada uno de los residuos de aminoácidos codificables es el mismo o diferente.

14. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que AA es un residuo de glicina, alanina o glutamina, y, preferentemente, AA es una cadena peptídica en la que cada uno de los residuos de aminoácidos codificables es el mismo o diferente.

15. Un análogo de la insulina PEGilada, según la cláusula precedente, en el que AA es un residuo de glicina.

16. Un análogo de la insulina PEGilada, según la cláusula precedente, en el que AA es un residuo de alanina.

17. Un análogo de la insulina PEGilada, según la cláusula precedente, en el que AA es un residuo de glutamina.

18. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que la extensión consiste en una o más de las fórmulas siguientes en las que la molécula de PEG está unida a la cadena o cadenas laterales de los residuos de lisina o cisteína cuando están presentes o al grupo o grupos amino N-terminales (o ambas cosas):

- 35 -G<sub>x1</sub>K (para extensiones C-terminales), donde x1 es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 (y donde G y K son glicina y lisina, respectivamente),  
K-G<sub>x2</sub>- (para extensiones N-terminales), donde x2 es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 (y donde G y K son glicina y lisina, respectivamente),  
40 -G<sub>x3</sub>C (para extensiones C-terminales), donde x3 es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 (y donde G y C son glicina y cisteína, respectivamente),  
C-G<sub>x4</sub>- (para extensiones N-terminales), donde x4 es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 (y donde G y C son glicina y cisteína, respectivamente),  
45 G<sub>x5</sub>-R<sub>y</sub> (para extensiones N-terminales), donde x5 es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8, e y es 0 o 1 (y donde G y R son glicina y arginina, respectivamente).

19. Una insulina PEGilada según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en la que la insulina original contiene opcionalmente una o más de las mutaciones siguientes: A14E/D, A18Q, A21 G/A/Q, desB1, B1G/Q, B3Q/S/T, B13Q, desB25, B25H, desB27, B28D/E/R, desB29, B29P/Q/R o desB30.

20. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el análogo de la insulina original se desvía de la insulina humana porque tiene A22K, B29R y desB30 y, preferentemente, no hay otras mutaciones en dicho análogo de la insulina.

21. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el análogo de la insulina original se desvía de la insulina humana porque tiene A22G, A23K, B29R y desB30 y, preferentemente, no hay otras mutaciones en dicho análogo de la insulina.

22. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el análogo de la insulina original se desvía de la insulina humana porque tiene A22G, A23G, A24K, B29R y desB30 y, preferentemente, no hay otras mutaciones en dicho análogo de la insulina.







55. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el análogo de la insulina original se desvía de la insulina humana porque tiene A21A, A22K, B29R y desB30 y, preferentemente, no hay otras mutaciones en dicho análogo de la insulina.
- 5 56. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el análogo de la insulina original se desvía de la insulina humana porque tiene A21A, A22G, A23K, B29R y desB30 y, preferentemente, no hay otras mutaciones en dicho análogo de la insulina.
- 10 57. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el análogo de la insulina original se desvía de la insulina humana porque tiene A21A, A22G, A23G, A24K, B29R y desB30 y, preferentemente, no hay otras mutaciones en dicho análogo de la insulina.
- 15 58. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el análogo de la insulina original se desvía de la insulina humana porque tiene A21A, A22G, A23G, A24G, A25K, B29R y desB30 y, preferentemente, no hay otras mutaciones en dicho análogo de la insulina.
- 20 59. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el análogo de la insulina original se desvía de la insulina humana porque tiene A21G, A22K, B29R y desB30 y, preferentemente, no hay otras mutaciones en dicho análogo de la insulina.
- 25 60. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el análogo de la insulina original se desvía de la insulina humana porque tiene A21G, A22G, A23K, B29R y desB30 y, preferentemente, no hay otras mutaciones en dicho análogo de la insulina.
- 30 61. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el análogo de la insulina original se desvía de la insulina humana porque tiene A21G, A22G, A23G, A24K, B29R y desB30 y, preferentemente, no hay otras mutaciones en dicho análogo de la insulina.
- 35 62. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el análogo de la insulina original se desvía de la insulina humana porque tiene A21G, A22G, A23G, A24G, A25K, B29R y desB30 y, preferentemente, no hay otras mutaciones en dicho análogo de la insulina.
- 40 63. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el análogo de la insulina original se desvía de la insulina humana porque tiene A21Q, A22K, B3Q, B29R y desB30 y, preferentemente, no hay otras mutaciones en dicho análogo de la insulina.
- 45 64. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el análogo de la insulina original se desvía de la insulina humana porque tiene A21G, A22K, B3Q, B29R y desB30 y, preferentemente, no hay otras mutaciones en dicho análogo de la insulina.
- 50 65. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el análogo de la insulina original se desvía de la insulina humana porque tiene A21A, A22K, B3Q, B29R y desB30 y, preferentemente, no hay otras mutaciones en dicho análogo de la insulina.
- 55 66. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el análogo de la insulina original se desvía de la insulina humana porque tiene A14E, A22K, B25H, B29R y desB30 y, preferentemente, no hay otras mutaciones en dicho análogo de la insulina.
- 60 67. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, donde dicho grupo que contiene PEG está unido a un grupo -NH de un residuo de lisina y/o a un residuo de cisteína presente en la extensión o extensiones y/o se une N-terminalmente a la extensión o extensiones.
68. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, que contiene una porción  $-(OCH_2CH_2)_n-$ , donde n es un entero en el intervalo entre 2 y aproximadamente 1000, preferentemente entre 2 y aproximadamente 500, preferentemente entre 2 y aproximadamente 250, preferentemente entre 2 y aproximadamente 125, preferentemente entre 2 y aproximadamente 50 y preferentemente entre 2 y aproximadamente 25.
69. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, donde la molécula de polietilenglicol tiene un peso molecular nominal en el intervalo entre aproximadamente 200 y aproximadamente 40 000, preferentemente entre aproximadamente 200 y aproximadamente 30 000, preferentemente entre aproximadamente 200 y aproximadamente 20 000, preferentemente entre aproximadamente 200 y aproximadamente 10 000, preferentemente entre aproximadamente 200 y aproximadamente 5000, preferentemente entre aproximadamente 200 y aproximadamente 2000, preferentemente entre aproximadamente 200 y

aproximadamente 1000 y preferentemente entre aproximadamente 200 y aproximadamente 750.

70. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que la molécula de polietilenglicol es monodispersa.

71. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que la molécula de polietilenglicol tiene la fórmula general  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ , donde  $n$  es un número entero que es al menos aproximadamente 6, preferentemente al menos aproximadamente 10, y no más de aproximadamente 110, preferentemente no más de aproximadamente 75, y aún más preferentemente  $n$  está en el intervalo entre aproximadamente 6 y aproximadamente 30, preferentemente en el intervalo entre aproximadamente 10 y aproximadamente 48.

72. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que la molécula de polietilenglicol es polidispersa.

73. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que la molécula de polietilenglicol es lineal, ramificada, ahorquillada o en forma de mancuerna.

74. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, que contiene un grupo de fórmula general  $-\text{Q}^1-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{R}^1$ , en el que  $\text{Q}^1$  es un enlazador que conecta la molécula de polietilenglicol a un grupo  $\alpha$ - o  $\gamma$ -NH- de un aminoácido de la extensión, preferentemente a través de un enlace amida o carbamato,  $n$  es un entero en el intervalo entre aproximadamente 2 y aproximadamente 1000, y  $\text{R}^1$  es alcoxi o hidroxilo, preferentemente metoxi.

75. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que  $n$  es un entero en el intervalo entre 2 y aproximadamente 1000, preferentemente entre 2 y aproximadamente 500, preferentemente entre 2 y aproximadamente 250, preferentemente entre 2 y aproximadamente 125, preferentemente entre 2 y aproximadamente 50 y preferentemente entre 2 y aproximadamente 25.

76. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que  $\text{Q}^1$  es -alquileo-CO-, que está conectado al residuo -NH- de la insulina extendida a través del grupo carbonilo.

77. Un análogo de la insulina PEGilada, según la cláusula precedente, en el que  $\text{Q}^1$  es etileno carbonil  $-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$ ), que está conectado al residuo -NH- a través de un grupo carbonilo.

78. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, excepto las dos últimas, en el que  $\text{Q}^1$  es -alquileo-NHCO-alquileo-CO-, que está conectado al residuo -NH- de la insulina extendida a través del grupo carbonilo.

79. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, excepto las tres últimas, en el que  $\text{Q}^1$  es -CO-alquileo-CO-.

80. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, excepto las cuatro últimas, en el que  $\text{Q}^1$  es -CO-(4-nitrofenoxi).

81. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, excepto las cinco últimas, en el que  $\text{Q}^1$  es (-alquileo-NHCO-alquileo-O-alquileo-) $_p\text{CH}_q-\text{NH CO-alquileo}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_r-\text{NHCO-alquileo-CO-}$ , donde  $p$  es 1, 2 o 3,  $q$  es 0, 1 o 2,  $p + q$  es 3, y  $r$  es un entero en el intervalo entre 1 y aproximadamente 12, que está conectado al residuo -NH- de la insulina extendida a través del grupo carbonilo.

82. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que  $\text{Q}^1$  es - $\text{CH}_2\text{CO-}$ , - $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO-}$ , - $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO-}$ , - $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CO-}$ , - $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO-}$ , - $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CO-}$ , - $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO-}$ , - $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH-COCH}_2\text{CH}_2\text{CO-}$ , - $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH-COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO-}$ , - $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH-COCH}_2\text{CH}_2\text{CO-}$ , - $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH-COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO-}$ , - $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO-}$ , - $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO-}$ , -CO-(4-nitrofenoxi), (- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2$ ) $_3\text{CNHCOCH}_2\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{CO-}$  o (- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2$ ) $_3\text{CNH-COCH}_2\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO-}$ .

83. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que  $\text{R}^1$  es alcoxi.

84. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que  $\text{R}^1$  es metoxi.

85. Un compuesto según una de las cláusulas del producto precedentes, que es cualquiera de los compuestos mencionados específicamente en la memoria anterior como en los ejemplos específicos, especialmente cualquiera

de los ejemplos 1 et seq. anteriores.

86. El uso de un compuesto según cualquiera de las cláusulas del producto precedentes para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de la diabetes.

87. El uso de un compuesto según cualquiera de las cláusulas del producto precedentes para la preparación de una composición farmacéutica que puede ser administrada por vía pulmonar para el tratamiento de la diabetes.

88. El uso de un compuesto según cualquiera de las cláusulas del producto precedentes para la preparación de una composición farmacéutica que puede ser administrada por vía pulmonar para el tratamiento de la diabetes y que proporciona un efecto de acción prolongada.

89. El uso de un compuesto según cualquiera de las cláusulas del producto precedentes para la preparación de una composición farmacéutica en polvo que puede ser administrada por vía pulmonar para el tratamiento de la diabetes.

90. El uso de un compuesto según cualquiera de las cláusulas del producto precedentes para la preparación de una composición farmacéutica líquida que puede ser administrada por vía pulmonar para el tratamiento de la diabetes.

91. Un compuesto para utilizar en el método de tratamiento de la diabetes que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto según cualquiera de las cláusulas del producto precedentes.

92. Una composición que contiene insulina humana así como un análogo de la insulina PEGilada según cualquiera de las cláusulas precedentes.

93. Una composición que contiene insulina aspart así como un análogo de la insulina PEGilada según cualquiera de las cláusulas precedentes.

94. Una composición que contiene insulina Lispro así como un análogo de la insulina PEGilada según cualquiera de las cláusulas precedentes.

95. Una composición que contiene insulina Glulisina así como un análogo de la insulina PEGilada según cualquiera de las cláusulas precedentes.

96. Cualquier característica nueva o combinación de las características que se describen en este documento.

#### Comentarios generales

[0119] Todos los encabezados y subencabezados se usan en este documento sólo a efectos de conveniencia y no deben ser tomados como limitantes de esta invención en modo alguno.

[0120] El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o el lenguaje ejemplar (por ej., "como") provistos en este documento, pretende únicamente iluminar mejor esta invención y no plantea ninguna limitación al alcance de la misma a menos que se reivindique lo contrario. Ningún lenguaje de esta memoria se debe interpretar que indica que algún elemento no reivindicado es esencial para la práctica de esta invención.

[0121] En este documento, la palabra "comprende(n)" se debe interpretar ampliamente con el significado de "incluye(n)", "contiene(n)" o "está(n) compuesto(s)" (directrices de EPO C 4.13).

[0122] Esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes de la temática de las reivindicaciones adjuntas según lo permita la ley aplicable.

[0123] Combinar una o más de las realizaciones descritas en este documento, opcionalmente también con una o más de las reivindicaciones siguientes, resulta en otras realizaciones y esta invención se refiere a todas las combinaciones posibles de dichas realizaciones y reivindicaciones.

[0124] En pos de la integridad, se debe observar que esta invención no se relaciona con análogos de la insulina PEGilada en los que el análogo de la insulina original es la denominada insulina de una sola cadena (Danish appl. N°: 2005/00400 y WO appl. N°: EP2006/060816; nuestra ref.: 7148). Por lo tanto, en esta invención, por la presente rechazamos el contenido de las mismas.

[0125] Los ejemplos siguientes se ofrecen a título ilustrativo y no con carácter limitante.

[0126] En la lista siguiente, figuran los reactivos de PEGilación elegidos como ésteres de N-hidroxisuccinimida

activados (OSu). Obviamente, se pueden emplear otros ésteres activos como 4-nitrofenoxi y muchos otros ésteres activos conocidos por los expertos en el área. La molécula de PEG (o mPEG),  $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ , puede tener cualquier tamaño hasta PM 40 000 Da, por ejemplo, 750 Da, 2000 Da, 5000 Da, 20 000 Da y 40 000 Da. La molécula de mPEG puede ser polidispersa pero también monodispersa constando de mPEG con longitudes de cadena bien definidas (y, por lo tanto, pesos moleculares) de, por ejemplo, 12 o 24 unidades de etilenglicol repetidas - indicada como mdPEG<sub>x</sub>, m: por extremos protegidos con metil/metoxi, d: por discreta y x: por el número de repetición de los residuos de etilenglicol, por ejemplo, 12 o 24. La molécula de PEG puede ser de cadena lineal o ramificada. La estructura/secuencia del residuo que contiene PEG en la insulina extendida se puede obtener formalmente sustituyendo el grupo saliente (por ejemplo, "-OSu") de los diversos reactivos de PEGilación con "NH-insulina", donde la insulina está PEGilada, ya sea en una posición épsilon de un residuo de lisina o en la posición alfa-amino en la cadena A- o B- (o ambas cosas):

mPEG-COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-OSu,  
 mPEG-COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-OSu,  
 15 mPEG-CH<sub>2</sub>CO-OSu,  
 mPEG-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-OSu,  
 mPEG-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-OSu,  
 mPEG-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-OSu,  
 mPEG-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-OSu,  
 20 mPEG-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CO-OSu,  
 mPEG-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CO-OSu,  
 mPEG-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-OSu,  
 mPEG-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-OSu,  
 mPEG-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-OSu,  
 25 mPEG-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-OSu,  
 mPEG-CO-(4-nitrofenoxi),  
 (mdPEG<sub>12</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CNHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-OSu (o, abreviadamente:  
 (mdPEG<sub>12</sub>)<sub>3</sub>-dPEG<sub>4</sub>-OSu),  
 (mdPEG<sub>12</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CNHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-OSu (o,  
 30 abreviadamente: (mdPEG<sub>12</sub>)<sub>3</sub>-dPEG<sub>4</sub>-OSu),  
 mdPEG<sub>x</sub>-COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-OSu,  
 mdPEG<sub>x</sub>-COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-OSu,  
 35 mdPEG<sub>x</sub>-CH<sub>2</sub>CO-OSu,  
 mdPEG<sub>x</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-OSu,  
 mdPEG<sub>x</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-OSu,  
 mdPEG<sub>x</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-OSu,  
 mdPEG<sub>x</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-OSu,  
 40 mdPEG<sub>x</sub>-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CO-OSu,  
 mdPEG<sub>x</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CO-OSu,  
 mdPEG<sub>x</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-OSu,  
 mdPEG<sub>x</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-OSu,  
 mdPEG<sub>x</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-OSu,  
 45 mdPEG<sub>x</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-OSu,  
 mdPEG<sub>x</sub>-CO-(4-nitrofenoxi),

donde x es un entero en el intervalo entre aproximadamente 6 y aproximadamente 48, por ejemplo, 12 o 24.

[0127] Además, los reactivos de PEGilación más grandes se pueden preparar ensamblando dos o más reactivos de PEG más pequeños. Por ejemplo, los reactivos de PEG con extremos protegidos como los ésteres de N-hidroxisuccinimida como cualquiera de los anteriores se pueden acoplar a moléculas de PEG - opcionalmente protegidas - que son funcionalizadas por grupos amino en un extremo y ácido carboxílico (ésteres) en el otro extremo. Después de la desprotección del ácido carboxílico (si fuera necesario), el ácido carboxílico se activa por ejemplo como el éster N-hidroxisuccinimida para proporcionar un reactivo de PEGilación más largo. Si se desea, el reactivo de PEGilación obtenido se puede extender aún más repitiendo el ciclo una o más veces. Este principio y metodología se ilustran en los ejemplos.

[0128] Esta metodología permite la construcción de reactivos de PEGilación monodispersos (y polidispersos) más grandes, de tamaño a medida.

[0129] Los ejemplos de residuos de PEG de la invención incluyen:

mPEG750 (en el que "750" indica el peso molecular promedio en Da),  
 mPEG2000,

mPEG5000,  
mPEG 10000,  
mPEG20000,  
mPEG30000,  
mPEG40000,

5 mdPEG<sub>12</sub>, (en el que "12" en subíndice indica el número de monómeros de PEG -según lo definido en este documento y por ejemplo por Quanta BioDesign Ltd.)

mdPEG<sub>24</sub>,

10 mdPEG<sub>3x12</sub> (en el que "3x12" en subíndice indica que PEG está ramificado y consta de 3 ramificaciones cada una compuesta por 12 monómeros de PEG -según lo definido en este documento y por ejemplo por Quanta BioDesign Ltd.),

mdPEG<sub>12</sub>-dPEG<sub>12</sub>,

mdPEG<sub>12</sub>-dPEG<sub>24</sub>,

mdPEG<sub>24</sub>-dPEG<sub>12</sub>,

15 mdPEG<sub>24</sub>-dPEG<sub>24</sub>,

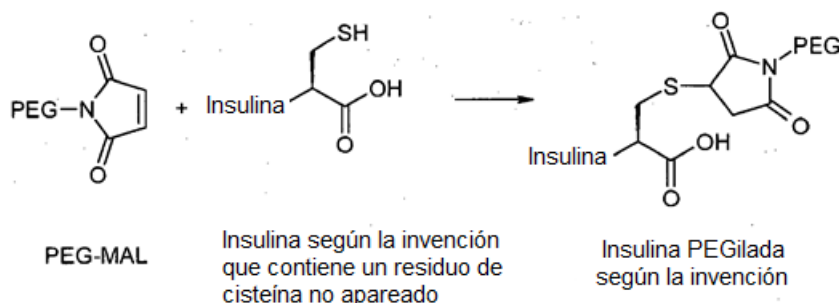
mdPEG<sub>24</sub>-dPEG<sub>24</sub>-dPEG<sub>24</sub>,

mdPEG<sub>3x12</sub>-dPEG<sub>12</sub>,

mdPEG<sub>3x12</sub>-dPEG<sub>24</sub>-dPEG<sub>24</sub>

20 [0130] A continuación se indican los reactivos de PEGilación elegidos como derivados de maleimida. Obviamente, como alternativas al grupo maleimida, se pueden emplear otros receptores de Michael, como vinilsulfonas y muchos otros aceptores de Michael conocidos por los expertos en el área. La molécula de PEG (o mPEG), CH<sub>3</sub>O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-H, puede ser de cualquier tamaño hasta PM de aproximadamente 40 000 Da. La estructura/secuencia del residuo que contiene PEG en la insulina extendida se puede obtener formalmente sustituyendo la maleimida

25 "MAL" de los diversos reactivos de PEGilación con "3-tiosuccinimidil-Ala-insulina", donde la insulina está PEGilada en un residuo de cisteína libre según el esquema siguiente.



30 [0131] Este esquema ilustra la PEGilación en una Cys terminal. Obviamente, la Cys no necesita ser colocada terminalmente para permitir la PEGilación.

Ejemplo de PEG-MAL: mPEG-MAL.

35 [0132] Las insulinas extendidas PEGiladas de esta invención fueron todas denominadas a continuación como si el enlazador que conecta la molécula de PEG a la insulina fuera en todos los casos un enlazador (3-)propionilo (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-). Es evidente de lo anterior que muchos tipos de enlazadores están disponibles en el comercio y dado que no es la estructura/composición exacta del enlazador la que gobierna los efectos beneficiosos de la colocación de la molécula de PEG en los residuos fuera de la secuencia de la insulina regular, se debe entender que todos los tipos de enlazadores (cf. anteriores) están comprendidos por el alcance de esta invención.

40 [0133] Las insulinas extendidas originales de la invención comprenden las siguientes:

A22K, B29R, desB30 insulina humana;

A21Q, A22G, A23K, B29R, desB30 insulina humana;

45 A21G, A22G, A23K, B29R, desB30 insulina humana;

A22G, A23K, B29R, desB30 insulina humana;

A21Q, A22G, A23G, A24K, B29R, desB30 insulina humana;

A21G, A22G, A23G, A24K, B29R, desB30 insulina humana;

A21Q, A22G, A23G, A24G, A25K, B29R, desB30 insulina humana;

50 A21G, A22G, A23G, A24G, A25K, B29R, desB30 insulina humana;

A21G, A22K, B29R, desB30 insulina humana;

- A21G, A22G, A23K, B29R, desB30 insulina humana;  
A21G, A22G, A23G, A24K, B29R, desB30 insulina humana;  
A21G, A22G, A23G, A24G, A25K, B29R, desB30 insulina humana;  
A21Q, A22K, B29R, desB30 insulina humana;
- 5 A21Q, A22G, A23K, B29R, desB30 insulina humana;  
A21Q, A22G, A23G, A24K, B29R, desB30 insulina humana;  
A21Q, A22G, A23G, A24G, A25K, B29R, desB30 insulina humana;
- A14E, A22K, B25H, B29R, desB30 insulina humana;
- 10 A14E, A21Q, A22K, B25H, B29R, desB30 insulina humana;  
A14E, A21G, A22K, B25H, B29R, desB30 insulina humana;  
A14E, A21Q, A22G, A23K, B25H, B29R, desB30 insulina humana;  
A14E, A21G, A22G, A23K, B25H, B29R, desB30 insulina humana;
- 15 A14E, A21Q, A22G, A23G, A24K, B25H, B29R, desB30 insulina humana;  
A14E, A21G, A22G, A23G, A24G, A25K, B25H, B29R, desB30 insulina humana;  
A14E, A21Q, A22G, A23G, A24G, A25K, B25H, B29R, desB30 insulina humana;
- B29Q, B31 K insulina humana;
- 20 A22K, B3Q, B29R, desB30 insulina humana;  
A22K, B3S, B29R, desB30 insulina humana;  
A22K, B3T, B29R, desB30 insulina humana;  
A22K, B1Q, B29R, desB30 insulina humana;  
A18Q, A22K, B29R, desB30 insulina humana;
- 25 A22K, desB1, B3Q, B29R, desB30 insulina humana;  
A21G, B29Q, B31K insulina humana;  
A21A, B29Q, B31 K insulina humana;  
A21Q, B29Q, B31 K insulina humana;  
A-1K, desB30 insulina humana;
- 30 A-1K, B29R, desB30 insulina humana;  
A-3G, A-2G, A-1 R desB30 insulina humana; (para A-3-PEGilación N-terminal)  
A22K, B28E, B29R, desB30 insulina humana;  
A22K, B28D, B29R, desB30 insulina humana;  
A22K, desB27, B28E, B29R, desB30 insulina humana;
- 35 B28E, B29Q, B31 K insulina humana;  
desB27, B28E, B29Q, B31 K insulina humana;  
A22K, B28R, desB29, desB30 insulina humana;  
B28R, B29P, B31 K insulina humana;  
A22K, B3Q, B28E, B29R, desB30 insulina humana;
- 40 A21G, B3Q, B28E, B29Q, B31K insulina humana;  
A22K, B13Q, B29R, desB30 insulina humana;  
A22K, desB1, B29R, desB30 insulina humana;  
A14E, A22K, B25H, desB30 insulina humana;
- 45 A14E, B25H, B29Q, B31K insulina humana;  
A13E, A22K, B25H, desB30 insulina humana;  
A21Q, A22G, A23K, B29R, desB30 insulina humana;  
A21Q, A22G, A23G, A24K, B29R, desB30 insulina humana;  
A21Q, A22G, A23G, A24G, A25K, B29R, desB30 insulina humana;
- A21A, A22K, B29R, desB30 insulina humana;
- 50 A21A, A22G, A23K, B29R, desB30 insulina humana;  
A21G, A22G, A23K, B29R, desB30 insulina humana;  
A21A, A22G, A23G, A24K, B29R, desB30 insulina humana;  
A21G, A22G, A23G, A24K, B29R, desB30 insulina humana;  
A21G, A22G, A23G, A24G, A25K, B29R, desB30 insulina humana;
- 55 A21A, A22G, A23G, A24G, A25K, B29R, desB30 insulina humana;  
A21Q, A22K, B3Q, B29R, desB30 insulina humana;  
A21A, A22K, B3Q, B29R, desB30 insulina humana;  
A21G, A22K, B3Q, B29R, desB30 insulina humana.

60 **Ejemplos**

Procedimientos generales:

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



insulina de la invención

[0134] 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 lo 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.

[0135] Se prepararon transformantes de levadura por transformación de la cepa huésped *S. cerevisiae* cepa MT663 (MATa/MAT $\alpha$  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.

[0136] 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 ditioneitol. 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.

Producción, purificación y caracterización de los derivados de la insulina PEGilada de la invención

[0137] Se produjeron varios precursores de la insulina como se describió antes y se aislaron del medio de cultivo y se purificaron. Los precursores de la insulina se PEGilaron y se procesaron como se describe a continuación para producir los derivados finales de la insulina (Procedimiento general (A)). Opcionalmente, los precursores se pueden procesar mediante tripsina antes de la PEGilación (Procedimiento general (B)). Estos derivados de la insulina se analizaron para determinar la actividad biológica de insulina medida por afinidad de unión al receptor de la insulina humana con relación a la de la insulina humana, como se describe a continuación.

[0138] 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 la 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 la insulina de la invención. Ocasionalmente, la reacción puede no ser aplicable según se describe para cada compuesto incluido en el alcance divulgado 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 dadas a conocer en este documento o de lo contrario convencionales, 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.

[0139] Los derivados de la 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.

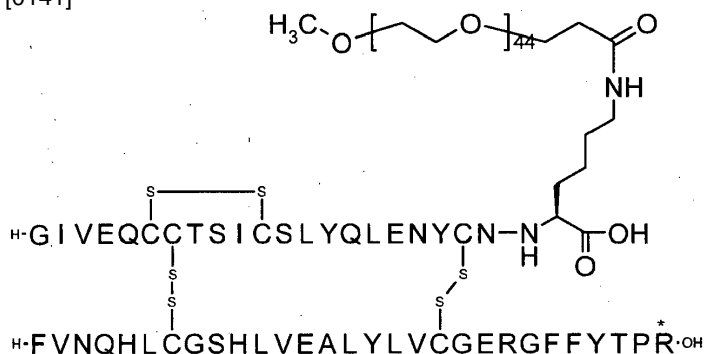
Procedimiento general (A) para la preparación de insulinas extendidas PEGiladas de esta invención

5 [0140] El procedimiento general (A) se describe a continuación y se ilustra en el primer ejemplo:

Ejemplo 1, Procedimiento general (A)

10 A22K(N<sup>E</sup>-mPEG2000-propionil), B29R, desB30 insulina humana

[0141]



15 Paso 1: Preparación y purificación del precursor de la insulina LysA22 ArgB29 B29R desB30 B'A

[0142] El precursor de la insulina A22K, B29R, desB30, insulina de una sola cadena B'A se puede purificar como se describe en los pasos de purificación A a C a continuación.

20 Paso de purificación A: Captura

[0143] En el paso A, 10.75 litros de medio de cultivo clarificado se diluyeron por adición de 4.5 litros de etanol 99%, para dar un volumen total de 15.25 litros que contenían etanol 30% vol (conductividad 2.7 mS/cm, pH = 3.4). Una columna de Separosa SP de perlas grandes de 300 ml (100-300  $\mu$ m, Amersham Biosciences) se equilibró con 1 litro de ácido cítrico 0.1 M pH 3.5 (flujo ap. 20 ml/min), antes de cargar durante de la noche los 15.25 litros de medio de cultivo preparado (flujo ap. 10 ml/min). Después de cargarla, la columna se volvió a lavar con 1 litro de ácido cítrico 0.1 M de pH 3.5 seguido de 1 litro de etanol 40% vol (flujo ap. 20 ml/min). El precursor de la insulina unido A22K, B29R, desB30, insulina de una sola cadena B'A se eluyó después con 1.5 litros de acetato de sodio 0.2 M, etanol 35% vol, pH 5.75 (flujo: 1.5 ml/min, volumen de precursor eluido: 400 ml, cantidad de precursor: 220 mg).

30 Paso de purificación B: HPLC de fase reversa

[0144] En el paso B el eluato se evaporó hasta sequedad y el precipitado se volvió a disolver en ácido acético 0.25 M. El pH se redujo posteriormente a 1.5 inmediatamente antes de la purificación por HPLC de fase reversa en una columna C18 (ODDMS C18, 20 x 250 mm, 200  $\text{Å}$ , 10  $\mu$ m, FeF Chemicals A/S). Antes de aplicarla a la columna, la solución de precursor se esterilizó por filtración (22  $\mu$ m, Low Protein Binding Durapore<sup>®</sup> (PVDF), Millipore). Se corrió en la columna un gradiente de 15% B a 50% B, siendo el tampón A: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2 M, ácido ortofosfórico 0.04 M, etanol 10% vol, pH 2.5 y el tampón B: etanol 70% vol. El gradiente se corrió durante 120 min con un flujo de 5 ml/min, temperatura de la columna a 40 °C. El precursor de la insulina A22K, B29R, desB30, insulina de una sola cadena B'A se eluyó y se juntó (volumen total 75 ml).

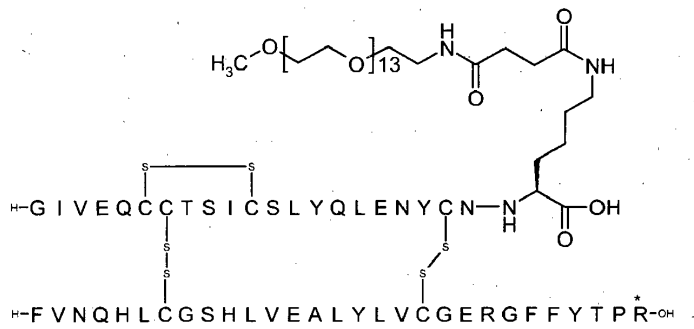
40 Paso de purificación C: Desalinización por filtración en gel

[0145] En el paso C el contenido de etanol en el eluato de la HPLC de fase reversa se redujo a menos de 5% vol con un evaporador rotatorio (nuevo volumen: -50 ml). Una columna Sephadex G25 de 1000 ml (5 x 55 cm, Amersham Biosciences) se lavó en ácido acético 0.5 M y el precursor de la insulina A22K, B29R, desB30, insulina humana de una sola cadena B'A se aplicó a la columna y por lo tanto se desalinizó por filtración en gel en ácido acético 0.5 M. El precursor de la insulina se siguió por detección UV a 280 nm, mientras la sal se siguió por medición de conductividad. Inmediatamente después de la desalinización, el precursor de la insulina se liofilizó.

50 Paso 2: Síntesis de A22K(N<sup>E</sup>-mPEG2000-propionil), B29R, desB30 precursor de la insulina humana B'A

[0146] 0.15 mmol de precursor de la insulina liofilizado LysA22 ArgB29 desB30 B'A se disolvió en carbonato de sodio



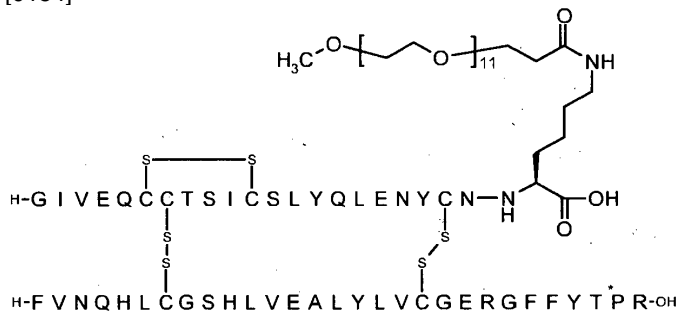


[0153] MALDI-MS (matriz: ácido sinapínico); m/z: 5862.

5 Ejemplo 4, Procedimiento general (B):

A22K(N<sup>ε</sup>mdPEG<sub>12</sub>-propionil), B29R, desB30 insulina humana

[0154]



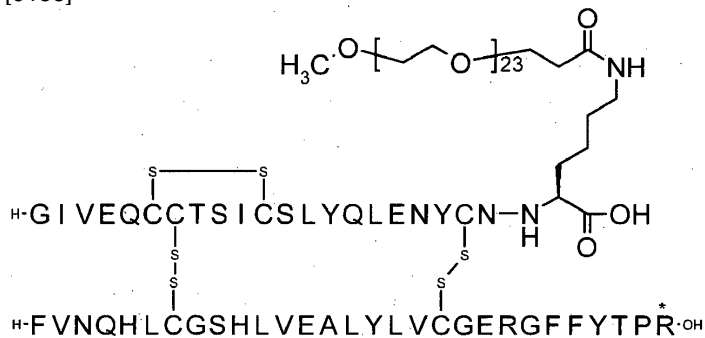
10 H-FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPR<sup>\*</sup>-OH

[0155] MALDI (matriz: ácido sinapínico); m/z: 6432.

15 Ejemplo 5, Procedimiento general (B):

A22K(N<sup>ε</sup>mdPEG<sub>24</sub>-propionil), B29R, desB30 insulina humana

[0156]



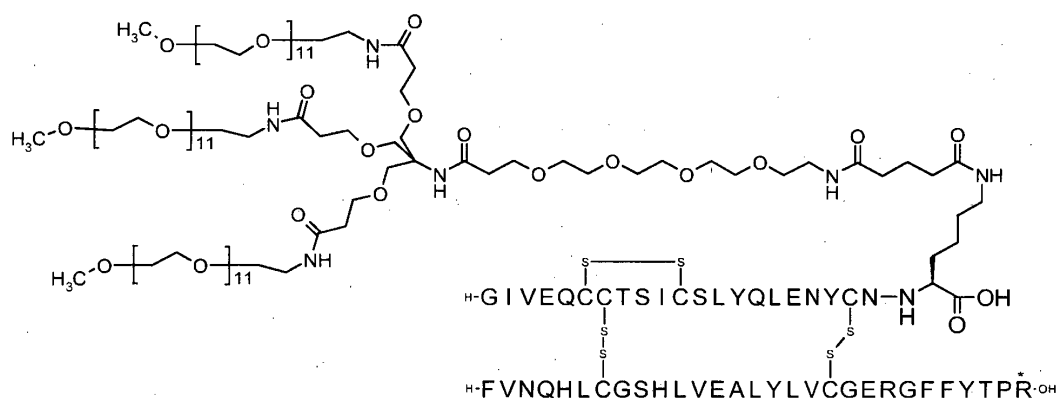
20

[0157] MALDI (matriz: ácido sinapínico); m/z: 6962.

Ejemplo 6, Procedimiento general (B):

25 A22K(N<sup>ε</sup>(mdPEG<sub>12</sub>)<sub>3</sub>-dPEG<sub>4</sub>-il), B29R, desB30 insulina humana

[0158]

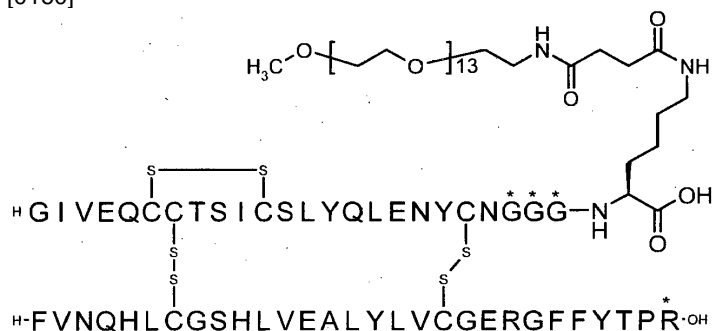


[0159] MALDI-MS (matriz: ácido sinapínico); m/z: 8167.

5 Ejemplo 7, Procedimiento general (B):

A22G, A23G, A24G, A25K(N<sup>f</sup>mPEG750-propionil), B29R, desB30 insulina humana

[0160]



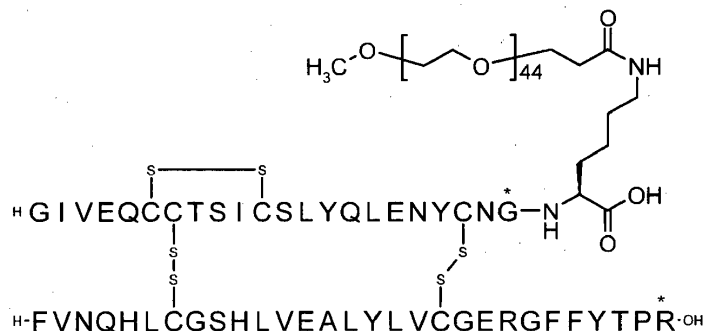
10

[0161] MALDI-MS (matriz: ácido sinapínico); m/z: 6807.

15 Ejemplo 8, Procedimiento general (B):

A22G, A23K(N<sup>f</sup>mPEG2000-propionil), B29R, desB30 insulina humana

[0162]



20

[0163] MALDI-MS (matriz: ácido sinapínico); m/z: 8170.

Ejemplo 9, Procedimiento general (B):

25 A22K(N<sup>f</sup>mdPEG<sub>8</sub>-propionil), B29R, desB30 insulina humana

[0164]

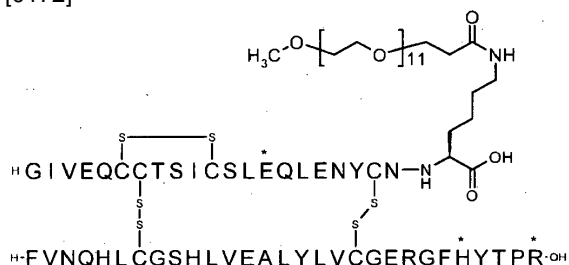


[0171] MALDI-MS (matriz: ácido sinapínico); m/z: alrededor de 21500.

Ejemplo 13, Procedimiento general (B):

5 A14E, A22K(N<sup>ε</sup>mdPEG<sub>12</sub>-propionil), B25H, B29R, desB30 insulina humana

[0172]

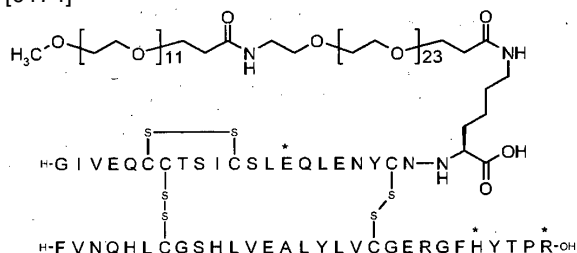


10 [0173] MALDI-MS (matriz: ácido sinapínico); m/z: 7520.

Ejemplo 14, Procedimiento general (B):

15 A14E, A22K(N<sup>ε</sup>mdPEG<sub>12</sub>-dPEG<sub>24</sub>-propionil), B25H, B29R, desB30 insulina humana

[0174]



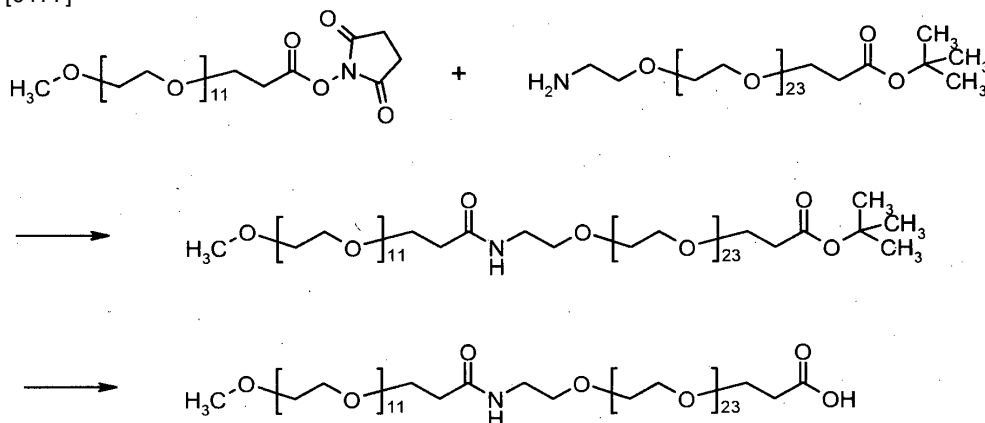
[0175] MALDI-MS (matriz: ácido sinapínico); m/z: 7520.

20

[0176] El reactivo de PEGilación se preparó como se describe a continuación:

Preparación del ácido omega-(metoxi-PEG<sub>11</sub>propanoilamino)-PEG<sub>24</sub>propanoico (ácido mdPEG<sub>12</sub>-dPEG<sub>24</sub>)

25 [0177]



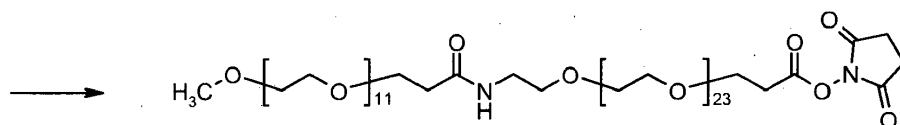
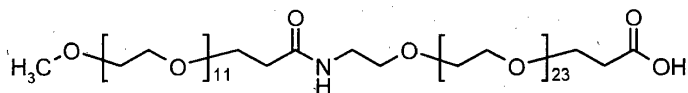
30

[0178] Se disolvieron por separado éster mdPEG<sub>12</sub> NHS (0.457 mmol, Quanta BioDesign Ltd. Product No 10262) y éster amino-dPEG<sub>24</sub>tert-butilo (0.416 mmol, Quanta BioDesign, Product No 10311) en acetonitrilo (cada uno 10 mL) y después las dos soluciones se mezclaron, se ajustó el pH con DIPEA a pH 8 (la medición del pH se hizo usando tiras indicadoras húmedas). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche, y a continuación se evaporó hasta sequedad, seguido de tratamiento con TFA/DCM (1/1), 10 mL durante 1 h a temperatura ambiente. Después la mezcla se evaporó hasta sequedad y se extrajo dos veces con DCM. El residuo

se purificó por HPLC (columna C18, 2 cm) empleando acetonitrilo (AcCN)/0.1 % de TFA y agua/0.1 % de TFA como eluyentes. Gradiente: 10- 80% AcCN/TFA de 5 a 20 min. Se recogieron las fracciones que contenían el compuesto deseado, se combinaron y se evaporaron hasta sequedad dando lugar al ácido omega-(metoxi-PEG<sub>11</sub>-propanoil-amino)PEG<sub>23</sub>-propanoico como un aceite (249 mg , 35%).

5 Preparación del éster N-hidroxisuccinimidílico del ácido omega-(metoxi-PEG<sub>11</sub>-propanoil-amino)-PEG<sub>24</sub>-propanoico (mdPEG<sub>12</sub>-dPEG<sub>24</sub>-NHS o éster OSu del ácido mdPEG<sub>12</sub>-dPEG<sub>24</sub>-propanoico)

[0179]



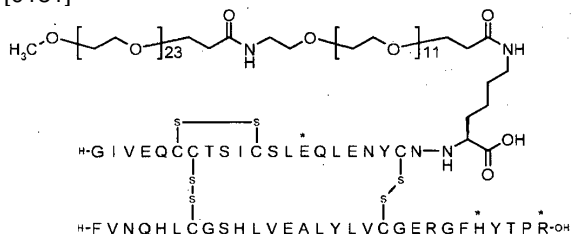
10 [0180] Se disolvió ácido omega-(metoxi-PEG<sub>11</sub>-propanoil-amino)PEG<sub>24</sub>-propanoico (249 mg, 0.145 mmol) en acetonitrilo (10 mL) y el pH se ajustó a 8 por adición de DIPEA (la medición del pH se hizo con tiras indicadoras húmedas). Se agregó TSTU (48 mg, 0.16 mmol) en acetonitrilo (10 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h, y se evaporó hasta sequedad. El residuo se disolvió en DCM y se lavó con ácido clorhídrico (0.01 M), la fase orgánica se secó (MgSO<sub>4</sub>), se filtró y el filtrado se evaporó hasta sequedad. El éster N-hidroxisuccinimidílico del ácido omega-(metoxi-PEG<sub>11</sub>-propanoil-amino)-PEG<sub>24</sub> propanoico se usó para acoplar a la insulina sin purificación adicional.

LCMS: m/z 1813.8 (M+1)<sup>+</sup>.

20 Ejemplo 15, Procedimiento general (B):

A14E, A22K(N<sup>f</sup>mdPEG<sub>24</sub>-dPEG<sub>12</sub>-propionil), B25H, B29R, desB30 insulina humana

25 [0181]



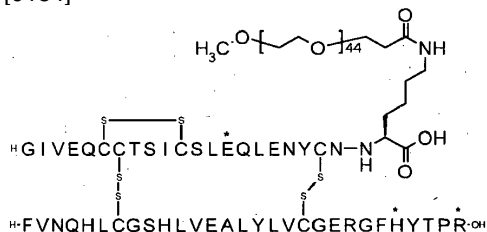
[0182] MALDI-MS (matriz: ácido sinapínico); m/z: 7519.

30 [0183] El reactivo PEG activado con N-hidroxisuccinimida se preparó de manera similar a la descrita antes para el éster mdPEG<sub>24</sub> NHS (Quanta BiodDesign Ltd. Producto N° 10304) y el éster amino-dPEG<sub>12</sub> tert-butilo (Quanta BioDesign Ltd. Producto N° 10281) a través del éster tert-butílico del ácido omega-(metoxi-PEG<sub>23</sub>-propanoil-amino)PEG<sub>12</sub> propanoico, el ácido omega-(metoxi-PEG<sub>23</sub>-propanoil-amino)PEG<sub>12</sub> propanoico y el éster NHS del ácido omega-(metoxi-PEG<sub>23</sub>-propanoil-amino)PEG<sub>12</sub> propanoico LCMS: m/z 1814 (M+1)<sup>+</sup>.

35 Ejemplo 16, Procedimiento general (B):

A14E, A22K(N<sup>f</sup>mPEG2000-propionil) B25H, B29R, desB30 insulina humana

40 [0184]





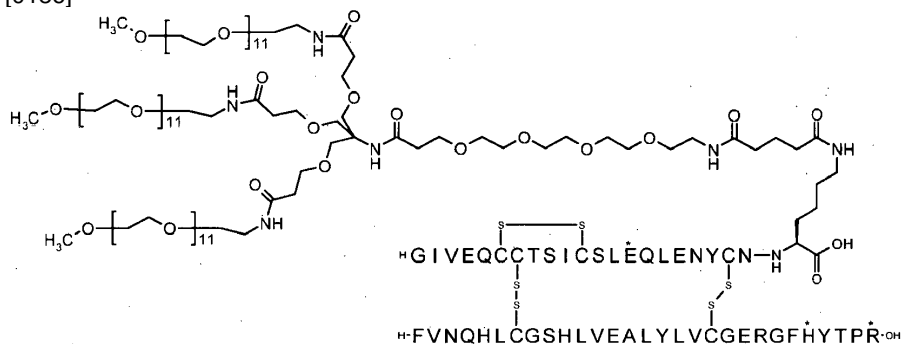
[0185] MALDI-MS (matriz: ácido sinapínico); m/z: alrededor de 8200.

Ejemplo 17, Procedimiento general (B):

5

A14E, A22K(N<sup>ε</sup>(mdPEG<sub>12</sub>)<sub>3</sub>-dPEG<sub>4</sub>-il), B25H, B29R, desB30 insulina humana

[0186]



10

[0187] MALDI-MS (matriz: ácido sinapínico); m/z: 8123.

[0188] Esta insulina se preparó empleando el reactivo PEG éster NHS-dPEG<sub>4</sub>-(m-dPEG<sub>12</sub>)<sub>3</sub> (Quanta BioDesign Ltd. Producto N° 10401).

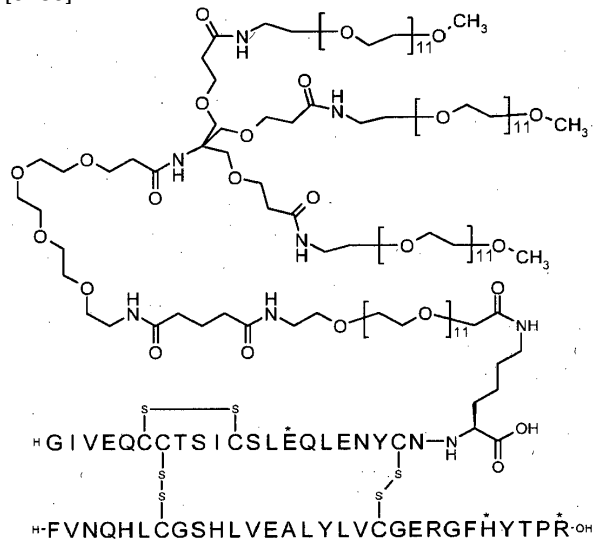
15

Ejemplo 18, Procedimiento general (B):

A14E, A22K(N<sup>ε</sup>(mdPEG<sub>12</sub>)<sub>3</sub>-dPEG<sub>4</sub>-il-12-il), B25H, B29R, desB30 insulina humana

20

[0189]



[0190] MALDI-MS (matriz: ácido sinapínico); m/z: 8724.

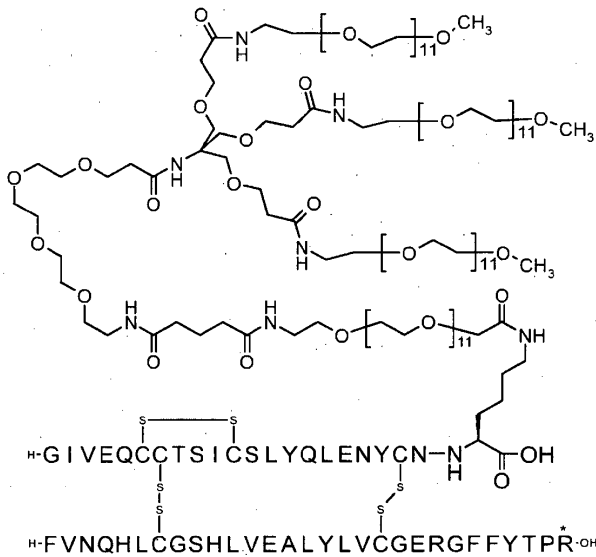
[0191] Esta insulina se preparó usando el reactivo PEG éster NHS-dPEG<sub>4</sub>-(m-dPEG<sub>12</sub>)<sub>3</sub> (Quanta BioDesign Ltd. Producto N° 10401) y éster amino-dPEG<sub>12</sub> tert-butilo (Quanta BioDesign Producto N° 10281) de manera similar a la descrita antes.

Ejemplo 19, Procedimiento general (B):

30

A22K(N<sup>ε</sup>(mdPEG<sub>12</sub>)<sub>3</sub>-dPEG<sub>4</sub>-il-12-il), B29R, desB30 insulina humana

[0192]



[0193] MALDI-MS (matriz: ácido sinapínico); m/z: 8768.

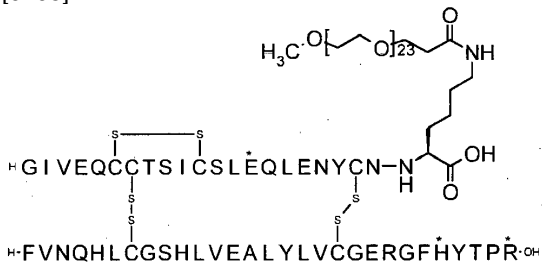
- 5 [0194] Esta insulina se preparó usando el reactivo PEG éster NHS-dPEG<sub>4</sub>-(m-dPEG<sub>12</sub>)<sub>3</sub> (Quanta BioDesign Ltd. Producto N° 10401) y éster amino-dPEG<sub>12</sub> tert-butilo (Quanta BioDesign Producto N° 10281) de manera similar a la descrita antes.

Ejemplo 20, Procedimiento general (B):

10

A22K(N<sup>ε</sup>(mdPEG<sub>24</sub>-propionil), A14E, B25H, B29R, desB30 insulina humana

[0195]



15

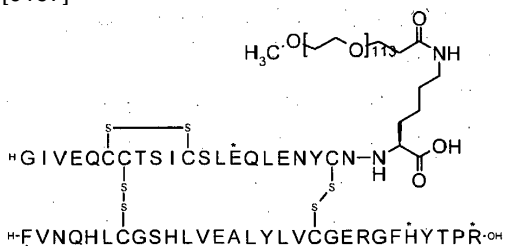
[0196] MALDI-MS (matriz: ácido sinapínico); m/z: 6918.

Ejemplo 21, Procedimiento general (B):

20

A22K(N<sup>ε</sup>(mPEG5.000-propionil), A14E, B25H, B29R, desB30 insulina humana

[0197]



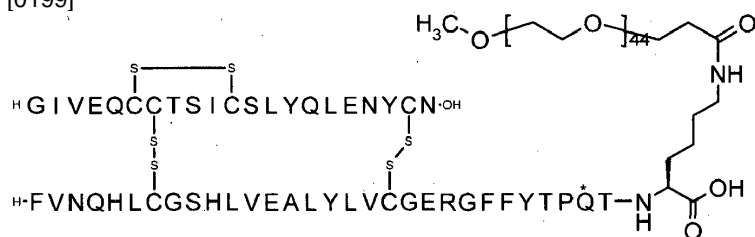
25

[0198] MALDI-MS (matriz: ácido sinapínico); m/z: alrededor de 11400.

Ejemplo 22, Procedimiento general (B):

B29Q, B31K(N<sup>ε</sup>(mPEG2000-propionil)) insulina humana

[0199]



5

[0200] MALDI-MS (matriz: ácido sinapínico); m/z: alrededor de 8268.

Ejemplo 23:

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

[0201] La afinidad de los derivados de la 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 Optiplat Packard (Packard No. 6005190) estuvo compuesta por 2.4 µl de receptor de la insulina humana recombinante 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 Optiplat Packard y se preparó una serie de diluciones del derivado de la insulina en la Optiplat 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).

25

Afinidades de unión al receptor de la insulina de los compuestos elegidos de esta invención:

[0202]

Ej. Nº:	Unión al receptor de la insulina, isoforma A (sin exón 11) con relación a la insulina humana:
1,2	90%
3	123%
4	188%
6	120%
5	118%
7	44%
8	58%
9	128%
10	123%
15	20%
13	24%
14	16%
17	19%
18	16%
19	106%
20	24%
22	14%

Ej. Nº:	Unión al receptor de la insulina, isoforma A (sin exón 11) con relación a la insulina humana:
16	15%

Ejemplo 24:

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

10 [0203] 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.

15 [0204] 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 glucosa en sangre entera 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 glucemia 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 (media ± SEM) para cada dosis y cada compuesto.

20 Ejemplo 25:

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

25 [0205] 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:

30 [0206] 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 introdujeron 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 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 Anorphan (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.

40 [0207] 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.

50 [0208] 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 se sacrificaron al final del experimento usando una sobredosis de pentobarbital.

55 Ejemplo 26:

Administración pulmonar de derivados de insulina a ratas

60 [0209] La sustancia de prueba se dosificó pulmonarmente por el método de instilación de gotas. En resumen, se

5 anestesiaron ratas Wistar machos (aprox. 250 g) con aproximadamente 60 ml de fentanilo/deshidroenzperidol/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 un 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 se sacrificaron luego del experimento.

15 [0210] Las insulinas extendidas PEGiladas de los ejemplos siguientes se pueden preparar de manera similar a la descrita antes:

Ejemplos 27-419

[0211]

Ej. #:	Insulina extendida PEGilada:
27	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
28	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
29	A22G A23K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) B29R desB30 insulina humana;
30	A22G A23K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
31	A22G A23K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
32	A22G A23K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
33	A22G A23K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
34	A22G A23K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;
35	A22G A23K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;
36	A22G A23K((mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) B29R desB30 insulina humana;
37	A22G A23G A24K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) B29R desB30 insulina humana;
38	A22G A23G A24K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
39	A22G A23G A24K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
40	A22G A23G A24K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
41	A22G A23G A24K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
42	A22G A23G A24K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
43	A22G A23G A24K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;
44	A22G A23G A24K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;
45	A22G A23G A24K(N <sup>ε</sup> (mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) B29R desB30 insulina humana;
46	A22G A23G A24G A25K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
47	A22G A23G A24G A25K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
48	A22G A23G A24G A25K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
49	A22G A23G A24G A25K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
50	A22G A23G A24G A25K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
51	A22G A23G A24G A25K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;
52	A22G A23G A24G A25K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;

ES 2 542 146 T3

Ej. #:	Insulina extendida PEGilada:
53	A22G A23G A24G A25K(N <sup>ε</sup> (mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) B29R desB30 insulina humana;
54	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) B3Q B29R desB30 insulina humana;
55	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) B3Q B29R desB30 insulina humana;
56	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) B3Q B29R desB30 insulina humana;
57	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) B3Q B29R desB30 insulina humana;
58	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) B3Q B29R desB30 insulina humana;
59	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) B3Q B29R desB30 insulina humana;
60	A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) B3Q B29R desB30 insulina humana;
61	A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) B3Q B29R desB30 insulina humana;
62	A22K(N <sup>ε</sup> (mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) B3Q B29R desB30 insulina humana;
63	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) B3S B29R desB30 insulina humana;
64	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) B3S B29R desB30 insulina humana;
65	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) B3S B29R desB30 insulina humana;
66	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) B3S B29R desB30 insulina humana;
67	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) B3S B29R desB30 insulina humana;
68	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) B3S B29R desB30 insulina humana;
69	A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) B3S B29R desB30 insulina humana;
70	A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) B3S B29R desB30 insulina humana;
71	A22K(N <sup>ε</sup> (mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) B3S B29R desB30 insulina humana;
72	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) B3T B29R desB30 insulina humana;
73	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) B3T B29R desB30 insulina humana;
74	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) B3T B29R desB30 insulina humana;
75	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) B3T B29R desB30 insulina humana;
76	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) B3T B29R desB30 insulina humana;
77	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) B3T B29R desB30 insulina humana;
78	A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) B3T B29R desB30 insulina humana;
79	A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) B3T B29R desB30 insulina humana;
80	A22K(N <sup>ε</sup> (mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) B3T B29R desB30 insulina humana;
81	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) B1Q B29R desB30 insulina humana;
82	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) B1Q B29R desB30 insulina humana;
83	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) B1Q B29R desB30 insulina humana;
84	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) B1Q B29R desB30 insulina humana;
85	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) B1Q B29R desB30 insulina humana;
86	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) B1Q B29R desB30 insulina humana;
87	A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) B1Q B29R desB30 insulina humana;
88	A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) B1Q B29R desB30 insulina humana;
89	A22K(N <sup>ε</sup> (mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) B1Q B29R desB30 insulina humana;

## ES 2 542 146 T3

Ej. #:	Insulina extendida PEGilada:
90	A18Q A22K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) B29R desB30 insulina humana;
91	A18Q A22K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
92	A18Q A22K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
93	A18Q A22K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
94	A18Q A22K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
95	A18Q A22K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
96	A18Q A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;
97	A18Q A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;
98	A18Q A22K(N <sup>ε</sup> (mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) B29R desB30 insulina humana;
99	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) desB1 B3Q B29R desB30 insulina humana;
100	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) desB1 B3Q B29R desB30 insulina humana;
101	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) desB1 B3Q B29R desB30 insulina humana;
102	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) desB1 B3Q B29R desB30 insulina humana;
103	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) desB1 B3Q B29R desB30 insulina humana;
104	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) desB1 B3Q B29R desB30 insulina humana;
105	A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) desB1 B3Q B29R desB30 insulina humana;
106	A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) desB1 B3Q B29R desB30 insulina humana;
107	A22K(N <sup>ε</sup> (mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) desB1 B3Q B29R desB30 insulina humana;
108	B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) insulina humana;
109	B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) insulina humana;
110	B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) insulina humana;
111	B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) insulina humana;
112	B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) insulina humana;
113	B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) insulina humana;
114	B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) insulina humana;
115	B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) insulina humana;
116	B29Q B31K(N <sup>ε</sup> (mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) insulina humana;
117	A21G B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) insulina humana;
118	A21G B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) insulina humana;
119	A21G B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) insulina humana;
120	A21G B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) insulina humana;
121	A21G B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) insulina humana;
122	A21G B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) insulina humana;
123	A21G B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) insulina humana;
124	A21G B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) insulina humana;
125	A21G B29Q B31K(N <sup>ε</sup> (mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) insulina humana;
126	A21A B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) insulina humana;
127	A21A B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) insulina humana;

ES 2 542 146 T3

Ej. #:	Insulina extendida PEGilada:
128	A21A B29Q B31 K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) insulina humana;
129	A21A B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) insulina humana;
130	A21A 29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) insulina humana;
131	A21A B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) insulina humana;
132	A21A B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) insulina humana;
133	A21A B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) insulina humana;
134	A21A B29Q B31K(N <sup>ε</sup> (mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) insulina humana;
135	A21Q B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) insulina humana;
136	A21Q B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) insulina humana;
137	A21Q B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) insulina humana;
138	A21Q B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) insulina humana;
139	A21Q B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) insulina humana;
140	A21Q B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) insulina humana;
141	A21Q B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) insulina humana;
142	A21Q B29Q B31 K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) insulina humana;
143	A21Q B29Q B31 K(N <sup>ε</sup> (mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) insulina humana;
144	A-1K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) desB30 insulina humana;
145	A-1K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) desB30 insulina humana;
146	A-1K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) desB30 insulina humana;
147	A-1K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) desB30 insulina humana;
148	A-1 K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) desB30 insulina humana;
149	A-1K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) desB30 insulina humana;
150	A-1K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) desB30 insulina humana;
151	A-1K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) desB30 insulina humana;
152	A-1K(N <sup>ε</sup> (mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) desB30 insulina humana;
153	A-1K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) B29R desB30 insulina humana;
154	A-1K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
155	A-1K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
156	A-1K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
157	A-1K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
158	A-1K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
159	A-1K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;
160	A-1K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;
161	A-1K(N <sup>ε</sup> (mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) B29R desB30 insulina humana;
162	A-3G(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) A-2G A-1R desB30 insulina humana;
163	A-3G(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) A-2G A-1R desB30 insulina humana;
164	A-3G(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) A-2G A-1R desB30 insulina humana;
165	A-3G(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) A-2G A-1R desB30 insulina humana;



ES 2 542 146 T3

Ej. #:	Insulina extendida PEGilada:
166	A-3G(N <sup>o</sup> mPEG20.000-propionil) A-2G A-1R desB30 insulina humana;
167	A-3G(N <sup>o</sup> mPEG40.000-propionil) A-2G A-1R desB30 insulina humana;
168	A-3G(N <sup>o</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) A-2G A-1R desB30 insulina humana;
169	A-3G(N <sup>o</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) A-2G A-1R desB30 insulina humana;
170	A-3G(N <sup>o</sup> (mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) A-2G A-1R desB30 insulina humana;
171	A22K(N <sup>o</sup> mPEG750-propionil) B28E B29R desB30 insulina humana;
172	A22K(N <sup>o</sup> mPEG2.000-propionil) B28E B29R desB30 insulina humana;
173	A22K(N <sup>o</sup> mPEG5.000-propionil) B28E B29R desB30 insulina humana;
174	A22K(N <sup>o</sup> mPEG10.000-propionil) B28E B29R desB30 insulina humana;
175	A22K(N <sup>o</sup> mPEG20.000-propionil) B28E B29R desB30 insulina humana;
176	A22K(N <sup>o</sup> mPEG40.000-propionil) B28E B29R desB30 insulina humana;
177	A22K(N <sup>o</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) B28E B29R desB30 insulina humana;
178	A22K(N <sup>o</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) B28E B29R desB30 insulina humana;
179	A22K(N <sup>o</sup> (mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) B28E B29R desB30 insulina humana;
180	A22K(N <sup>o</sup> mPEG750-propionil) B28D B29R desB30 insulina humana;
181	A22K(N <sup>o</sup> mPEG2.000-propionil) B28D B29R desB30 insulina humana;
182	A22K(N <sup>o</sup> mPEG5.000-propionil) B28D B29R desB30 insulina humana;
183	A22K(N <sup>o</sup> mPEG10.000-propionil) B28D B29R desB30 insulina humana;
184	A22K(N <sup>o</sup> mPEG20.000-propionil) B28D B29R desB30 insulina humana;
185	A22K(N <sup>o</sup> mPEG40.000-propionil) B28D B29R desB30 insulina humana;
186	A22K(N <sup>o</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) B28D B29R desB30 insulina humana;
187	A22K(N <sup>o</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) B28D B29R desB30 insulina humana;
188	A22K(N <sup>o</sup> (mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) B28D B29R desB30 insulina humana;
189	A22K(N <sup>o</sup> mPEG750-propionil) desB27 B28E B29R desB30 insulina humana;
190	A22K(N <sup>o</sup> mPEG2.000-propionil) desB27 B28E B29R desB30 insulina humana;
191	A22K(N <sup>o</sup> mPEG5.000-propionil) desB27 B28E B29R desB30 insulina humana;
192	A22K(N <sup>o</sup> mPEG10.000-propionil) desB27 B28E B29R desB30 insulina humana;
193	A22K(N <sup>o</sup> mPEG20.000-propionil) desB27 B28E B29R desB30 insulina humana;
194	A22K(N <sup>o</sup> mPEG40.000-propionil) desB27 B28E B29R desB30 insulina humana;
195	A22K(N <sup>o</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) desB27 B28E B29R desB30 insulina humana;
196	A22K(N <sup>o</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) desB27 B28E B29R desB30 insulina humana;
197	A22K(N <sup>o</sup> (mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) desB27 B28E B29R desB30 insulina humana;
198	B28E B29Q B31K(N <sup>o</sup> mPEG750-propionil) insulina humana;
199	B28E B29Q B31K(N <sup>o</sup> mPEG2.000-propionil) insulina humana;
200	B28E B29Q B31K(N <sup>o</sup> mPEG5.000-propionil) insulina humana;
201	B28E B29Q B31K(N <sup>o</sup> mPEG10.000-propionil) insulina humana;
202	B28E B29Q B31K(N <sup>o</sup> mPEG20.000-propionil) insulina humana;
203	B28E B29Q B31K(N <sup>o</sup> mPEG40.000-propionil) insulina humana;

ES 2 542 146 T3

Ej. #:	Insulina extendida PEGilada:
204	B28E B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) insulina humana;
205	B28E B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) insulina humana;
206	B28E B29Q B31K(N <sup>ε</sup> (mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) insulina humana;
207	desB27 B28E B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) insulina humana;
208	desB27 B28E B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) insulina humana;
209	desB27 B28E B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) insulina humana;
210	desB27 B28E B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) insulina humana;
211	desB27 B28E B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) insulina humana;
212	desB27 B28E B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) insulina humana;
213	desB27 B28E B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) insulina humana;
214	desB27 B28E B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) insulina humana;
215	desB27 B28E B29Q B31K(N <sup>ε</sup> (mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) insulina humana;
216	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) B28R desB29 desB30 insulina humana;
217	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) B28R desB29 desB30 insulina humana;
218	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) B28R desB29 desB30 insulina humana;
219	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) B28R desB29 desB30 insulina humana;
220	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) B28R desB29 desB30 insulina humana;
221	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) B28R desB29 desB30 insulina humana;
222	A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) B28R desB29 desB30 insulina humana;
223	A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) B28R desB29 desB30 insulina humana;
224	A22K(N <sup>ε</sup> (mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) B28R desB29 desB30 insulina humana;
225	B28R B29P B31K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) insulina humana;
226	B28R B29P B31K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) insulina humana;
227	B28R B29P B31K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) insulina humana;
228	B28R B29P B31K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) insulina humana;
229	B28R B29P B31K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) insulina humana;
230	B28R B29P B31K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) insulina humana;
231	B28R B29P B31K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) insulina humana;
232	B28R B29P B31K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) insulina humana;
233	B28R B29P B31K(N <sup>ε</sup> (mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) insulina humana;
234	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) B3Q B28E B29R desB30 insulina humana;
235	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) B3Q B28E B29R desB30 insulina humana;
236	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) B3Q B28E B29R desB30 insulina humana;
237	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) B3Q B28E B29R desB30 insulina humana;
238	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) B3Q B28E B29R desB30 insulina humana;
239	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) B3Q B28E B29R desB30 insulina humana;
240	A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) B3Q B28E B29R desB30 insulina humana;
241	A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) B3Q B28E B29R desB30 insulina humana;

ES 2 542 146 T3

Ej. #:	Insulina extendida PEGilada:
242	A22K(N <sup>ε</sup> (mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) B3Q B28E B29R desB30 insulina humana;
243	A21G B3Q B28E B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) insulina humana;
244	A21G B3Q B28E B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) insulina humana;
245	A21G B3Q B28E B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) insulina humana;
246	A21G B3Q B28E B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) insulina humana;
247	A21G B3Q B28E B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) insulina humana;
248	A21G B3Q B28E B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) insulina humana;
249	A21G B3Q B28E B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) insulina humana;
250	A21G B3Q B28E B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) insulina humana;
251	A21G B3Q B28E B29Q B31 K(N <sup>ε</sup> (mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) insulina humana;
252	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) B13Q B29R desB30 insulina humana;
253	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) B13Q B29R desB30 insulina humana;
254	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) B13Q B29R desB30 insulina humana;
255	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) B13Q B29R desB30 insulina humana;
256	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) B13Q B29R desB30 insulina humana;
257	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) B13Q B29R desB30 insulina humana;
258	A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) B13Q B29R desB30 insulina humana;
259	A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) B13Q B29R desB30 insulina humana;
260	A22K(N <sup>ε</sup> ((mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) B13Q B29R desB30 insulina humana;
261	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) desB1 B29R desB30 insulina humana;
262	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) desB1 B29R desB30 insulina humana;
263	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) desB1 B29R desB30 insulina humana;
264	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) desB1 B29R desB30 insulina humana;
265	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) desB1 B29R desB30 insulina humana;
266	A22K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) desB1 B29R desB30 insulina humana;
267	A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) desB1 B29R desB30 insulina humana;
268	A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) desB1 B29R desB30 insulina humana;
269	A22K(N <sup>ε</sup> ((mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) desB1 B29R desB30 insulina humana;
270	A14E A22K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) B25H desB30 insulina humana;
271	A14E A22K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) B25H desB30 insulina humana;
272	A14E A22K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) B25H desB30 insulina humana;
273	A14E A22K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) B25H desB30 insulina humana;
274	A14E A22K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) B25H desB30 insulina humana;
275	A14E A22K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) B25H desB30 insulina humana;
276	A14E A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) B25H desB30 insulina humana;
277	A14E A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) B25H desB30 insulina humana;
278	A14E A22K(N <sup>ε</sup> (mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) B25H desB30 insulina humana;

ES 2 542 146 T3

Ej. #:	Insulina extendida PEGilada:
279	A14E B25H B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) insulina humana;
280	A14E B25H B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) insulina humana;
281	A14E B25H B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) insulina humana;
282	A14E B25H B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) insulina humana;
283	A14E B25H B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) insulina humana;
284	A14E B25H B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) insulina humana;
285	A14E B25H B29Q B31 K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) insulina humana;
286	A14E B25H B29Q B31K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) insulina humana;
287	A14E B25H B29Q B31K(N <sup>ε</sup> (mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) insulina humana;
288	A13E A22K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) B25H desB30 insulina humana;
289	A13E A22K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) B25H desB30 insulina humana;
290	A13E A22K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) B25H desB30 insulina humana;
291	A13E A22K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) B25H desB30 insulina humana;
292	A13E A22K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) B25H desB30 insulina humana;
293	A13E A22K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) B25H desB30 insulina humana;
294	A13E A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) B25H desB30 insulina humana;
295	A13E A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) B25H desB30 insulina humana;
296	A13E A22K(N <sup>ε</sup> (md PEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) B25H desB30 insulina humana;
297	A21Q A22K(N <sup>ε</sup> (mPEG750-propionil) B29R desB30 insulina humana;
298	A21Q A22K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
299	A21Q A22K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
300	A21Q A22K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
301	A21Q A22K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
302	A21Q A22K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
303	A21Q A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;
304	A21Q A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;
305	A21Q A22K((mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) B29R desB30 insulina humana;
306	A21Q A22G A23K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) B29R desB30 insulina humana;
307	A21Q A22G A23K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
308	A21Q A22G A23K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
309	A21Q A22G A23K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
310	A21Q A22G A23K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
311	A21Q A22G A23K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
312	A21Q A22G A23K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;
313	A21Q A22G A23K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;
314	A21Q A22G A23K((mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) B29R desB30 insulina humana;
315	A21Q A22G A23G A24K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) B29R desB30 insulina humana;
316	A21Q A22G A23G A24K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;

ES 2 542 146 T3

Ej. #:	Insulina extendida PEGilada:
317	A21Q A22G A23G A24K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
318	A21Q A22G A23G A24K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
319	A21Q A22G A23G A24K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
320	A21Q A22G A23G A24K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
321	A21Q A22G A23G A24K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;
322	A21Q A22G A23G A24K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;
323	A21Q A22G A23G A24K((mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) B29R desB30 insulina humana;
324	A21Q A22G A23G A24G A25K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) B29R desB30 insulina humana;
325	A21Q A22G A23G A24G A25K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
326	A21Q A22G A23G A24G A25K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
327	A21Q A22G A23G A24G A25K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
328	A21Q A22G A23G A24G A25K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
329	A21Q A22G A23G A24G A25K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
330	A21Q A22G A23G A24G A25K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;
331	A21Q A22G A23G A24G A25K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;
332	A21Q A22G A23G A24G A25K((mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) B29R desB30 insulina humana;
333	A21A A22K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) B29R desB30 insulina humana;
334	A21A A22K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
335	A21A A22K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
336	A21A A22K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
337	A21A A22K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
338	A21A A22K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
339	A21A A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;
340	A21A A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;
341	A21A A22K((mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) B29R desB30 insulina humana;
342	A21A A22G A23K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) B29R desB30 insulina humana;
343	A21A A22G A23K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
344	A21A A22G A23K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
345	A21A A22G A23K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
346	A21A A22G A23K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
347	A21A A22G A23K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
348	A21A A22G A23K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;
349	A21A A22G A23K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;
350	A21A A22G A23K((mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) B29R desB30 insulina humana;
351	A21A A22G A23G A24K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) B29R desB30 insulina humana;
352	A21A A22G A23G A24K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
353	A21A A22G A23G A24K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
354	A21A A22G A23G A24K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;

ES 2 542 146 T3

Ej. #:	Insulina extendida PEGilada:
355	A21A A22G A23G A24K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
356	A21A A22G A23G A24K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
357	A21A A22G A23G A24K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;
358	A21A A22G A23G A24K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;
359	A21A A22G A23G A24K((mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) B29R desB30 insulina humana;
360	A21A A22G A23G A24G A25K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) B29R desB30 insulina humana;
361	A21A A22G A23G A24G A25K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
362	A21A A22G A23G A24G A25K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
363	A21A A22G A23G A24G A25K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
364	A21A A22G A23G A24G A25K(N <sup>ε</sup> mREG20.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
365	A21A A22G A23G A24G A25K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
366	A21A A22G A23G A24G A25K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;
367	A21A A22G A23G A24G A25K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;
368	A21A A22G A23G A24G A25K((mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) B29R desB30 insulina humana;
369	A21G A22K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) B29R desB30 insulina humana;
370	A21G A22K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
371	A21G A22K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
372	A21G A22K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
373	A21G A22K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
374	A21G A22K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
375	A21G A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;
376	A21G A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;
377	A21G A22K((mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) B29R desB30 insulina humana;
378	A21G A22G A23K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) B29R desB30 insulina humana;
379	A21G A22G A23K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
380	A21G A22G A23K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
381	A21G A22G A23K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
382	A21G A22G A23K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
383	A21G A22G A23K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
384	A21G A22G A23K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;
385	A21G A22G A23K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;
386	A21G A22G A23K((mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) B29R desB30 insulina humana;
387	A21G A22G A23G A24K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) B29R desB30 insulina humana;
388	A21G A22G A23G A24K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
389	A21G A22G A23G A24K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
390	A21G A22G A23G A24K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
391	A21G A22G A23G A24K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
392	A21G A22G A23G A24K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;

ES 2 542 146 T3

Ej. #:	Insulina extendida PEGilada:
393	A21G A22G A23G A24K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;
394	A21G A22G A23G A24K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;
395	A21G A22G A23G A24K((mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) B29R desB30 insulina humana;
396	A21G A22G A23G A24G A25K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) B29R desB30 insulina humana;
397	A21G A22G A23G A24G A25K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
398	A21G A22G A23G A24G A25K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
399	A21G A22G A23G A24G A25K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
400	A21G A22G A23G A24G A25K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
401	A21G A22G A23G A24G A25K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) B29R desB30 insulina humana;
402	A21G A22G A23G A24G A25K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;
403	A21G A22G A23G A24G A25K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) B29R desB30 insulina humana;
404	A21G A22G A23G A24G A25K((mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) B29R desB30 insulina humana;
405	A21Q A22K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) B3Q B29R desB30 insulina humana;
406	A21Q A22K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) B3Q B29R desB30 insulina humana;
407	A21Q A22K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) B3Q B29R desB30 insulina humana;
408	A21Q A22K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) B3Q B29R desB30 insulina humana;
409	A21Q A22K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) B3Q B29R desB30 insulina humana;
410	A21Q A22K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) B3Q B29R desB30 insulina humana;
411	A21Q A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) B3Q B29R desB30 insulina humana;
412	A21Q A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) B3Q B29R desB30 insulina humana;
413	A21Q A22K((mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) B3Q B29R desB30 insulina humana;
414	A21G A22K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) B3Q B29R desB30 insulina humana;
415	A21G A22K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) B3Q B29R desB30 insulina humana;
416	A21G A22K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) B3Q B29R desB30 insulina humana;
417	A21G A22K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) B3Q B29R desB30 insulina humana;
418	A21G A22K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) B3Q B29R desB30 insulina humana;
419	A21G A22K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) B3Q B29R desB30 insulina humana;
420	A21G A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) B3Q B29R desB30 insulina humana;
421	A21G A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) B3Q B29R desB30 insulina humana;
422	A21G A22K((mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) B3Q B29R desB30 insulina humana;
423	A21A A22K(N <sup>ε</sup> mPEG750-propionil) B3Q B29R desB30 insulina humana;
424	A21A A22K(N <sup>ε</sup> mPEG2.000-propionil) B3Q B29R desB30 insulina humana;
425	A21A A22K(N <sup>ε</sup> mPEG5.000-propionil) B3Q B29R desB30 insulina humana;
426	A21A A22K(N <sup>ε</sup> mPEG10.000-propionil) B3Q B29R desB30 insulina humana;
427	A21A A22K(N <sup>ε</sup> mPEG20.000-propionil) B3Q B29R desB30 insulina humana;
428	A21A A22K(N <sup>ε</sup> mPEG40.000-propionil) B3Q B29R desB30 insulina humana;
429	A21A A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>12</sub> -propionil) B3Q B29R desB30 insulina humana;
430	A21A A22K(N <sup>ε</sup> mdPEG <sub>24</sub> -propionil) B3Q B29R desB30 insulina humana;

Ej. #:	Insulina extendida PEGilada:
431	A21A A22K((mdPEG <sub>12</sub> ) <sub>3</sub> -dPEG <sub>4</sub> -il) B3Q B29R desB30 insulina humana.

Breve descripción de las figuras

5 [0212] La Fig. 1 y la Fig. 2 son la instilación intratraqueal de gotas en rata de la insulina de los ejemplos 1 y 2. La Fig. 3 es instilación intratraqueal de gotas en rata de la insulina del ejemplo 6. La Fig. 4 es la instilación intratraqueal de gotas en rata de la insulina del ejemplo 5. La Fig. 5 es la instilación intratraqueal de gotas en rata de la insulina del ejemplo 16. La Fig. 6 es la instilación intratraqueal de gotas en rata de la insulina del ejemplo 18. La Fig. 7 en la instilación intratraqueal de gotas en rata de la insulina del ejemplo 17. La Fig. 8 es la instilación intratraqueal de gotas en rata de la insulina del ejemplo 19. La Fig. 9 es la instilación intratraqueal de gotas en rata de la insulina del ejemplo 22. La Fig. 10 es el perfil de glucemia por administración pulmonar de un polvo seco en aerosol de la insulina de los ejemplos 1 y 2 a minicerdos, donde la dosis media administrada fue de  $0.037 \pm 0.009$  mg/kg. La Fig. 11 es el perfil farmacocinético por administración pulmonar de un polvo seco en aerosol de la insulina de los ejemplos 1 y 2 a minicerdos, donde la dosis media administrada fue de  $0.037 \pm 0.009$  mg/kg.



## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un análogo de la insulina PEGilada que, en comparación con la insulina humana, tiene una o más extensiones que contienen PEG que se extienden desde las posiciones A1, B1, A21 y/o B30, dichas extensiones consisten en residuos de aminoácidos, y en el que la molécula de PEG está unida, a través de un enlazador, a uno o más de los residuos de aminoácidos de la extensión o extensiones y con la condición de que, preferentemente, el análogo de la insulina original contenga sólo un residuo de lisina.
- 10 2. Un análogo de la insulina PEGilada, según la reivindicación 1, en el que sólo una de las extensiones tiene una molécula de PEG, y preferentemente, sólo hay una extensión.
- 15 3. Un análogo de la insulina PEGilada, según la reivindicación 1, en el que la extensión que tiene una molécula de PEG está situada C-terminalmente con respecto a la posición A21.
- 20 4. Un análogo de la insulina PEGilada, según la reivindicación 1, en el que la extensión que tiene una molécula de PEG está situada C-terminalmente con respecto a la posición B30.
- 25 5. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el análogo de la insulina original se desvía de la insulina humana en una o más de las extensiones siguientes: G en la posición A-3, G en la posición A-2, K o R en la posición A-1, G o K en la posición A22, G o K en la posición A23, G o K en la posición A24, K en la posición A25, y K en la posición B31 y, en comparación con la insulina humana, hay, opcionalmente, hasta 12, preferentemente hasta 8, más preferentemente hasta 4, mutaciones más entre eliminaciones, sustituciones y adiciones de un residuo de aminoácido, preferentemente, no hay otras mutaciones en dicho análogo de la insulina y con la condición de que, preferentemente, el análogo de la insulina original contenga sólo un residuo de lisina.
- 30 6. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la extensión consiste en una o más de las fórmulas siguientes en las que la molécula de PEG está unida a la cadena o cadenas laterales de los residuos de lisina o cisteína, cuando están presentes o al grupo o grupos amino N-terminales (o ambas cosas):
- 35 -AA<sub>x1</sub>K (para extensiones C-terminales), donde x1 es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 (y donde K es lisina),  
 K-AA<sub>x2</sub>- (para extensiones N-terminales), donde x2 es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 (y donde K es lisina),  
 -AA<sub>x3</sub>C (para extensiones C-terminales), donde x3 es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 (y donde C es cisteína),  
 C-AA<sub>x4</sub>- (para extensiones N-terminales), donde x4 es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 (y donde C es cisteína),  
 AA<sub>x5</sub>-R<sub>y</sub>- (para extensiones N-terminales), donde x5 es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8, e y es 0 o 1 (y donde R es arginina),
- 40 y donde AA es un residuo de una cadena peptídica en la que cada uno de los residuos de aminoácidos es el mismo o diferente y cada uno es un aminoácido codificable excepto Lys y Cys.
- 45 7. Un análogo de la insulina PEGilada según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que AA es un residuo peptídico que consiste en residuos de aminoácidos de glicina, alanina o glutamina.
- 50 8. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que AA es un residuo de glicina.
- 55 9. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que AA es un residuo de alanina.
- 60 10. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que AA es un residuo de glutamina.
11. Una insulina PEGilada según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la insulina original contiene opcionalmente una o más de las mutaciones siguientes: A14E/D, A18Q, A21G/A/Q, desB1, B1G/Q, B3Q/S/T, B13Q, desB25, B25H, desB27, B28D/E/R, desB29, B29P/Q/R o desB30.
12. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el análogo de la insulina original se desvía de la insulina humana porque tiene A22K, B29R y desB30 y, preferentemente, no hay otras mutaciones en dicho análogo de la insulina.
13. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el análogo de la insulina original se desvía de la insulina humana porque tiene A22G, A23K, B29R y desB30 y, preferentemente, no hay otras mutaciones en dicho análogo de la insulina.

14. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que contiene la porción  $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ , donde  $n$  es un entero en el intervalo entre 2 y aproximadamente 1000, preferentemente entre 2 y aproximadamente 500, preferentemente entre 2 y aproximadamente 250, preferentemente entre 2 y aproximadamente 125, preferentemente entre 2 y aproximadamente 50, y preferentemente entre 2 y aproximadamente 25.
15. Un análogo de la insulina PEGilada, según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que es uno de los análogos de la insulina PEGilada siguientes: a) un análogo de la insulina PEGilada en el que el análogo de la insulina original se desvía de la insulina humana porque tiene A22G, A23G, A24K, B29R y desB30 y, preferentemente, no hay otras mutaciones en dicho análogo de la insulina, b) un análogo de la insulina PEGilada en el que el análogo de la insulina original se desvía de la insulina humana porque tiene A22G, A23G, A24G, A25K, B29R y desB30 y, preferentemente, no hay otras mutaciones en dicho análogo de la insulina, c) un análogo de la insulina PEGilada en el que el análogo de la insulina original se desvía de la insulina humana porque tiene A21Q, A22K, B29R y desB30 y, preferentemente, no hay otras mutaciones en dicho análogo de la insulina, d) un análogo de la insulina PEGilada en el que el análogo de la insulina original se desvía de la insulina humana porque tiene A21Q, A22G, A23K, B29R y desB30, y, preferentemente, no hay otras mutaciones en dicho análogo de la insulina, e) un análogo de la insulina PEGilada en el que el análogo de la insulina original se desvía de la insulina humana porque tiene A21A, A22K, B29R y desB30 y, preferentemente, no hay otras mutaciones en dicho análogo de la insulina, f) un análogo de la insulina PEGilada en el que el análogo de la insulina original se desvía de la insulina humana porque tiene A21G, A22K, B29R y desB30 y, preferentemente, no hay otras mutaciones en dicho análogo de la insulina, g) un análogo de la insulina PEGilada que contiene un grupo de fórmula general  $-\text{Q}^1-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{R}^1$ , en el que  $\text{Q}^1$  es un enlazador que conecta la molécula de polietilenglicol a un grupo  $\alpha$ - o  $\gamma$ -NH- de un aminoácido de la extensión, preferentemente a través de un enlace amida o carbamato,  $n$  es un número entero en el intervalo entre 2 y aproximadamente 1000, y  $\text{R}^1$  es alcoxi o hidroxilo, preferentemente metoxi, y h) un análogo de la insulina PEGilada en el que el análogo de la insulina original se desvía de la insulina humana porque tiene A14E, A22K, B25H, B29R y desB30 y, preferentemente, no hay otras mutaciones en dicho análogo de la insulina.

Fig. 1

Instilación traqueal de gotas en rata de la insulina de los ejemplos 1 y 2

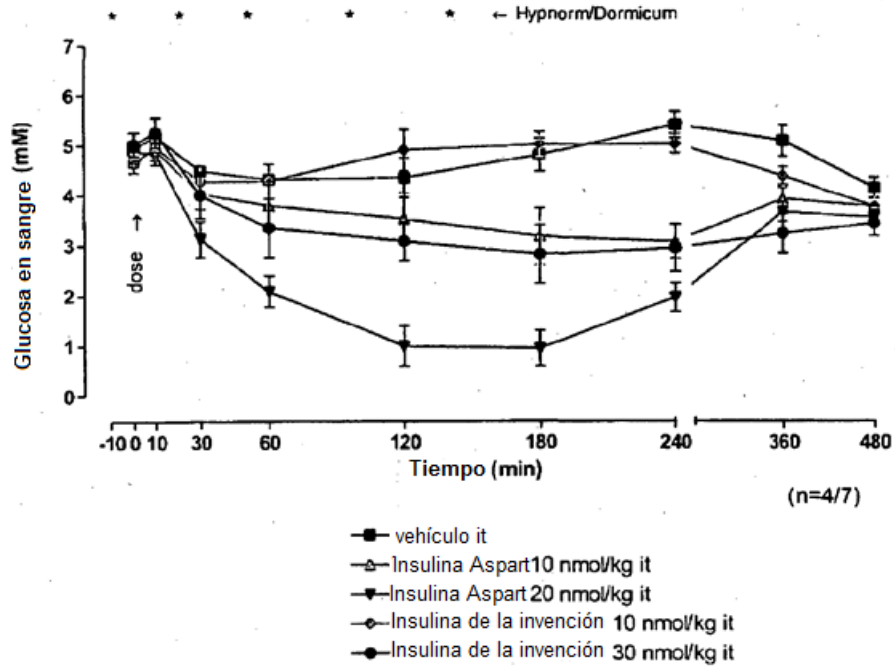


Fig. 2

Instilación traqueal de gotas en rata de la insulina de los ejemplos 1 y 2

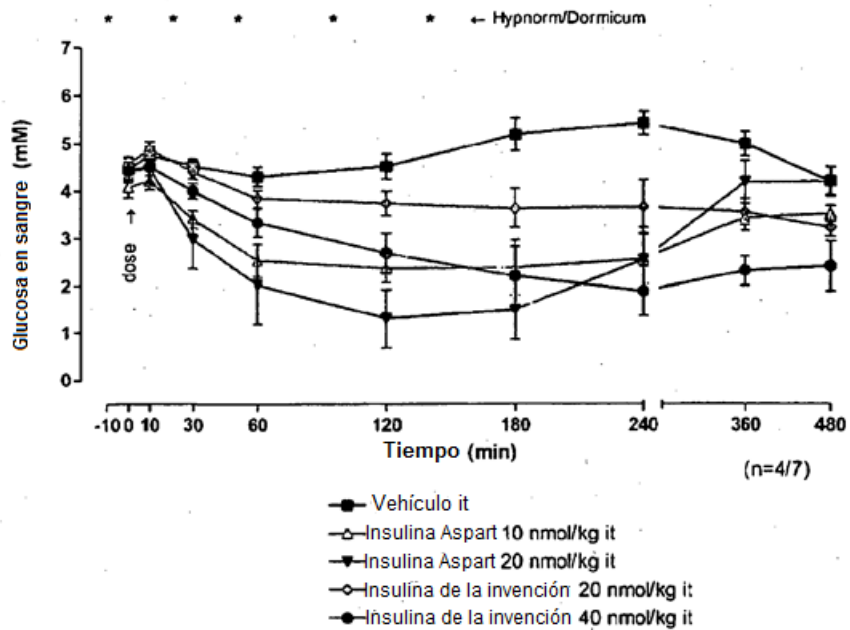


Fig. 3

Instilación intratraqueal de gotas en rata de la insulina del ejemplo 6

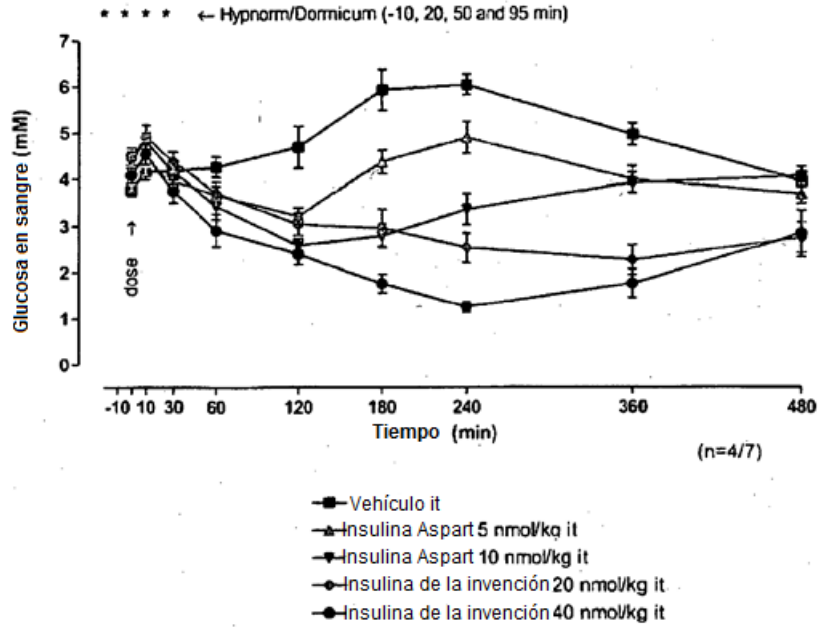


Fig. 4

Instilación intratraqueal de gotas en rata de la insulina del ejemplo 5

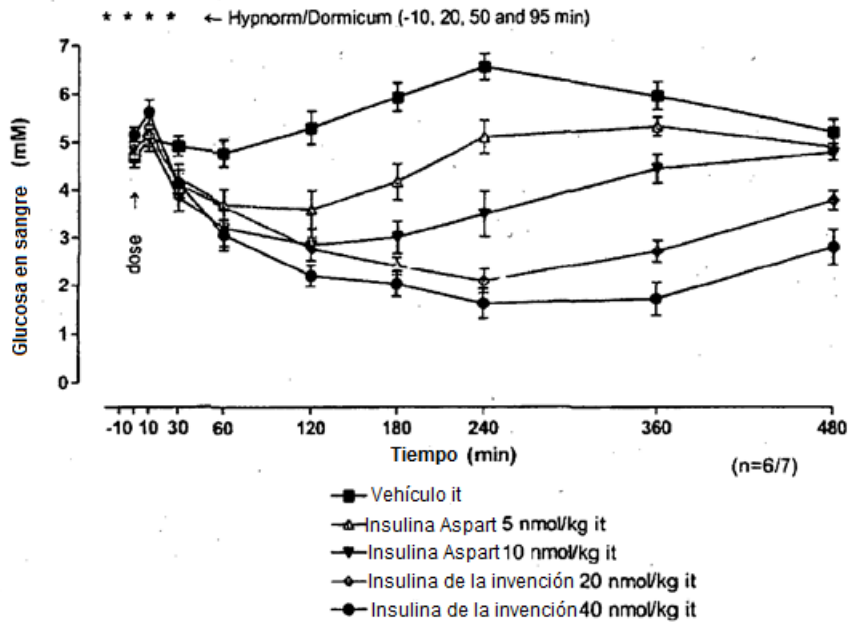


Fig. 5

Instilación intratraqueal de gotas en rata de la insulina del ejemplo 16

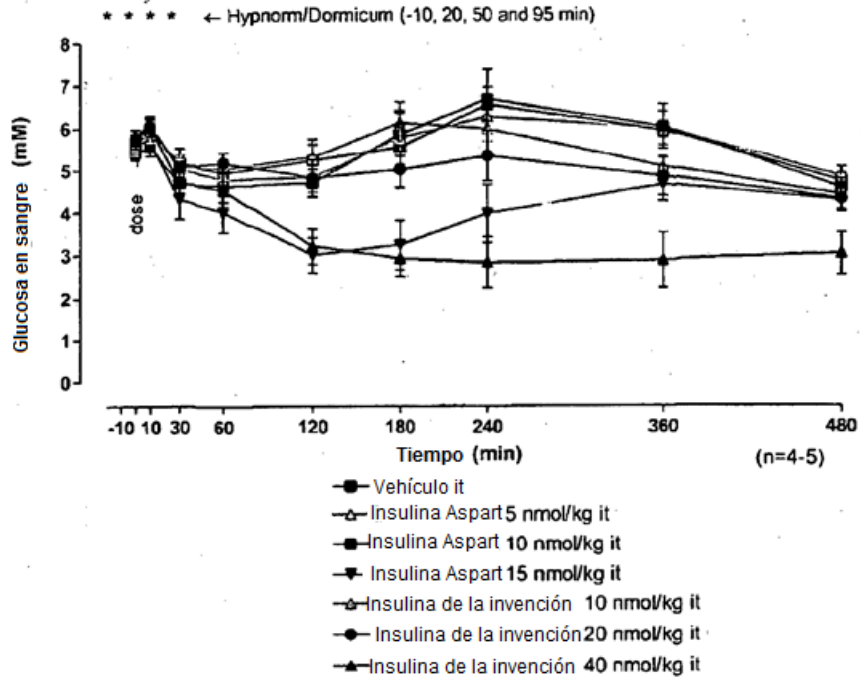


Fig. 6

Instilación intratraqueal de gotas en rata de la insulina del ejemplo 18

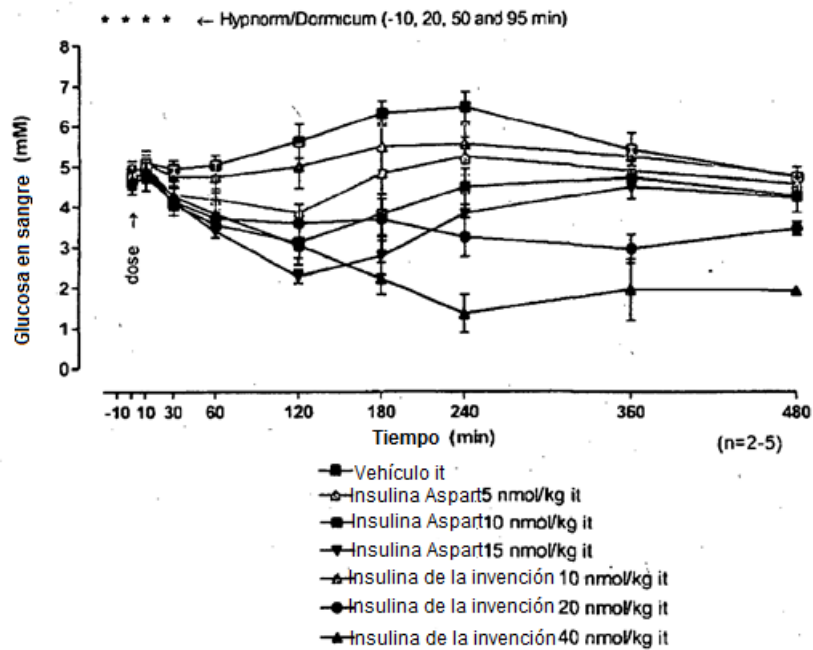


Fig. 7

Instilación intratraqueal de gotas en rata de la insulina del ejemplo 17

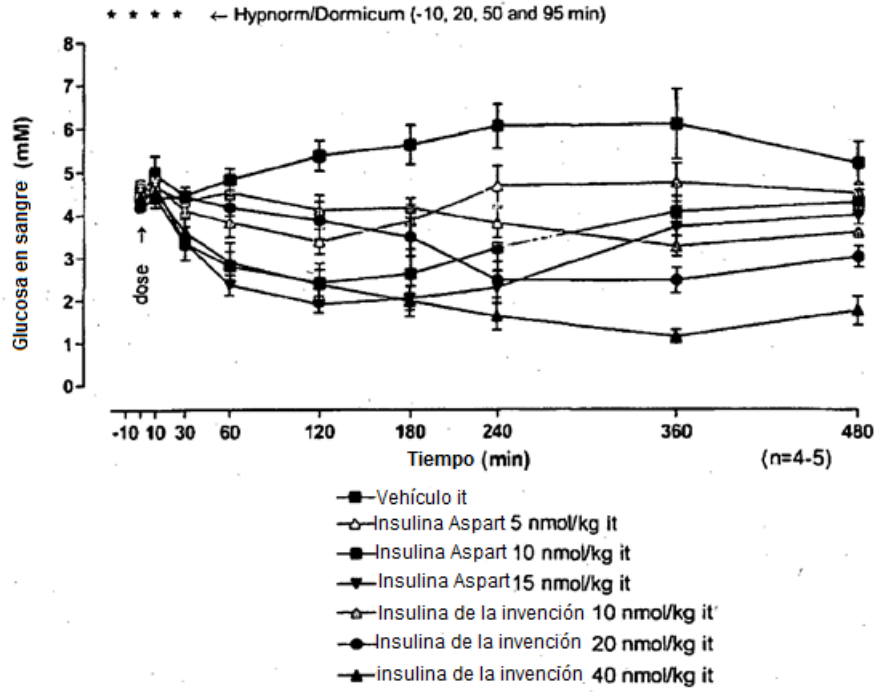


Fig. 8

Instilación intratraqueal de gotas en rata de la insulina del ejemplo 19

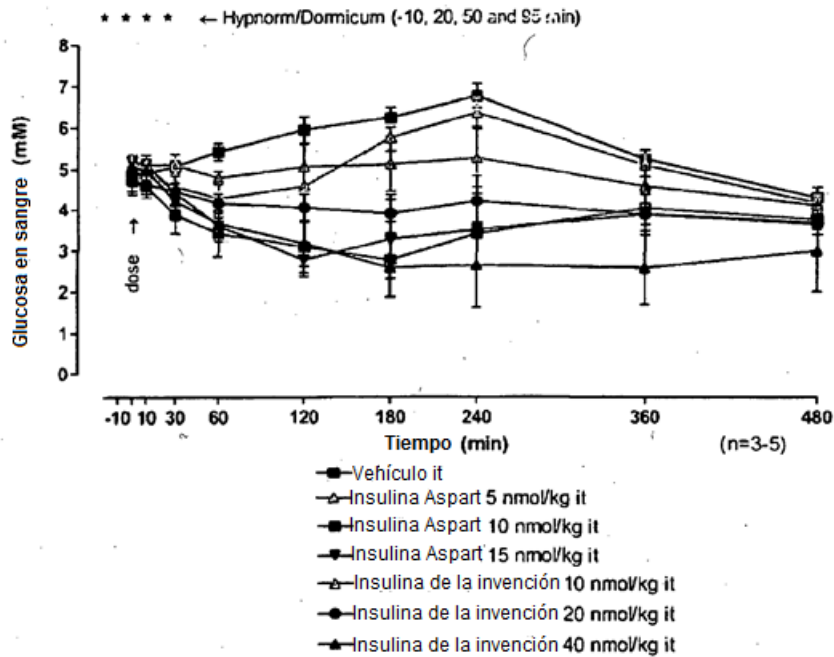


Fig. 9

**Instilación intratraqueal de gotas en rata de la insulina del ejemplo 22**

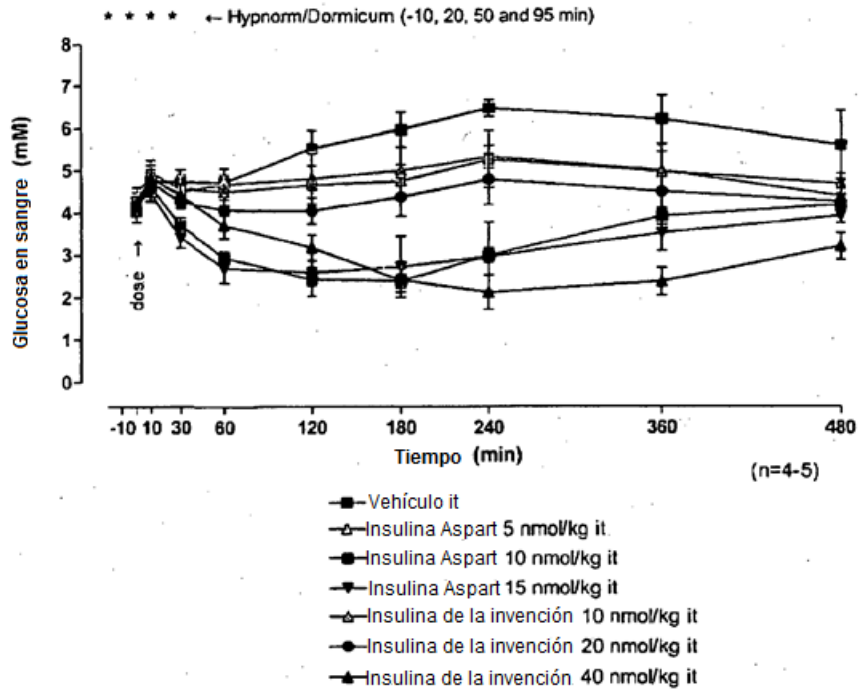


Fig. 10

**Administración pulmonar de un polvo seco en aerosol de la insulina de los ejemplos 1 y 2 a minicerdos: dosis media**

administrada  $0.037 \pm 0.009$  mg/kg

Blood glucose profile:

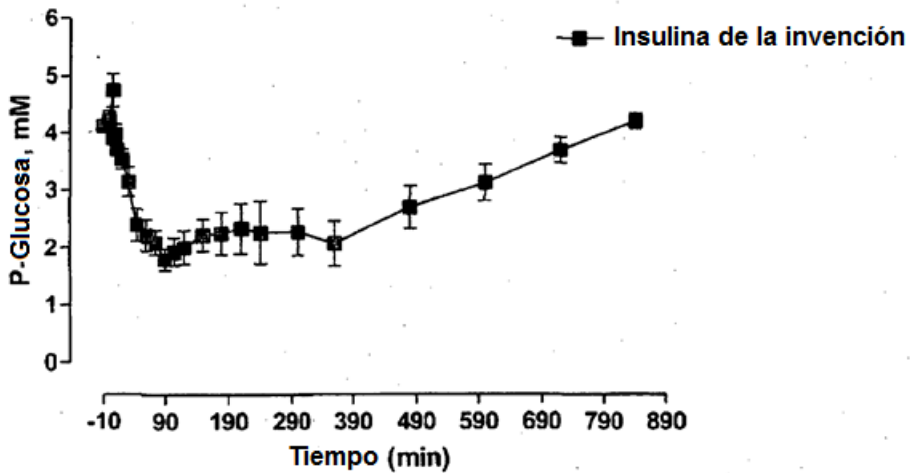


Fig. 11

Perfil farmacocinético

