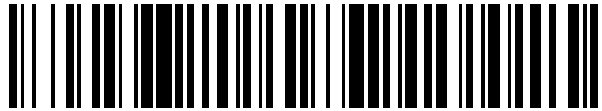


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 393**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/62** (2006.01)

**A61K 38/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2008 E 08846415 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015 EP 2217621**

54 Título: **Derivado de insulina**

30 Prioridad:

**08.11.2007 EP 07120251**  
**31.07.2008 EP 08161557**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.08.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GARIBAY, PATRICK WILLIAM y**  
**HØEG-JENSEN, THOMAS**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 543 393 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

Derivado de insulina

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere nuevos derivados de insulina humana que son solubles a valores de pH fisiológico y tienen un perfil de acción prolongado. La invención se refiere también a composiciones farmacéuticas que contienen derivados de insulina de la invención, a métodos para tratamiento de la diabetes y la hiperglucemia utilizando los derivados de insulina de la invención.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En la actualidad, el tratamiento de la diabetes, tanto diabetes tipo 1 como diabetes tipo 2, está basado en una proporción creciente en el tratamiento denominado de insulina intensiva. Conforme a este régimen, los pacientes se tratan con inyecciones diarias múltiples de insulina que comprenden una o más inyecciones diarias de una insulina de acción prolongada para cubrir el requerimiento basal de la insulina suplementado por inyecciones de bolus de una insulina de acción rápida para cubrir el requerimiento de insulina relacionado con las comidas.

Las composiciones de insulina de acción prolongada son bien conocidas en la técnica. Así, un tipo principal de composiciones de insulina de acción prolongada comprende suspensiones acuosas inyectables de cristales de insulina o insulina amorfa. En estas composiciones, los compuestos de insulina utilizados típicamente son insulina protamina, insulina cinc o insulina protamina cinc.

Ciertos inconvenientes están asociados con el uso de suspensiones de insulina. Así, con objeto de asegurar una dosificación exacta, las partículas de insulina tienen que suspenderse homogéneamente por agitación suave antes que un volumen definido de la suspensión se retire de un vial o se expulse de un cartucho. Asimismo, para el almacenamiento de suspensiones de insulina, la temperatura tiene que mantenerse dentro de límites más estrechos que para las soluciones de insulina a fin de evitar formación de grumos o coagulación.

La Solicitud de Patente Internacional WO 96/29344 (Novo Nordisk A/S) da a conocer derivados de insulina que tienen un sustituyente lipófilo.

La Solicitud de Patente Internacional WO 97/32022 (Novo Nordisk A/S) da a conocer derivados de insulina en los que el sustituyente es una cadena alifática con un grupo ácido terminal.

Havelund Svend *et al* da a conocer mecanismos de prolongación de insulina detemir. Insulina detemir es un producto de insulina de acción prolongada disponible comercialmente, vendido bajo el nombre comercial Levemir™. El sustituyente de insulina detemir es lipófilo.

La Solicitud de Patente Internacional WO 2006/082204 (Novo Nordisk A/S) da a conocer derivados de insulina que tienen un grupo aromático en la cadena lateral.

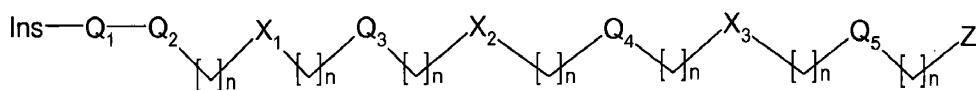
La Solicitud de Patente WO 2006/082205 (Novo Nordisk A/S) da a conocer derivados de insulina que tienen un PEG en la cadena lateral.

Derivados de insulina con un grupo terminal cargado en el sustituyente se dan a conocer en la Solicitud de Patente Internacional No. EP 2007/054444 (Novo Nordisk A/S).

Sin embargo, existe todavía necesidad de insulina que tenga un perfil de acción más prolongado que los derivados de insulina conocidos hasta ahora.

## SUMARIO DE LA INVENCION

En un aspecto, la invención concierne a un derivado de insulina que tiene una fórmula



en donde Ins es un resto de insulina parental y  $\text{Q}_1-\text{Q}_2-\left[\text{CH}_2\right]_n-\text{X}_1-\left[\text{CH}_2\right]_n-\text{Q}_3-\left[\text{CH}_2\right]_n-\text{X}_2-\left[\text{CH}_2\right]_n-\text{Q}_4-\left[\text{CH}_2\right]_n-\text{X}_3-\left[\text{CH}_2\right]_n-\text{Q}_5-\left[\text{CH}_2\right]_n-\text{Z}$  es un sustituyente y donde el Ins está unido al sustituyente por un enlace amídico entre el grupo  $\alpha$ -amino del residuo aminoácido N-terminal de la cadena B de Ins o un grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo Lys presente en la cadena A o B de Ins y un grupo CO en  $\text{Q}_1$  o  $\text{Q}_2$  del sustituyente; cada n es independientemente 0, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6;

Q<sub>1</sub> es:

- un residuo de aminoácido, residuo que forma, con su grupo ácido carboxílico, un grupo amida junto con el grupo α-amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B de Ins o junto con el grupo ε-amino de un residuo Lys presente en la cadena A o B de Ins, o
- una cadena compuesta de dos, tres o cuatro residuos de α-aminoácido como se han especificado arriba unidos entre sí por enlaces amídicos, cadena que está enlazada - por un enlace amídico - al grupo α-amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B de Ins o al grupo ε-amino de un residuo Lys presente en la cadena A o B de Ins, o

un enlace

Q<sub>2</sub> es:

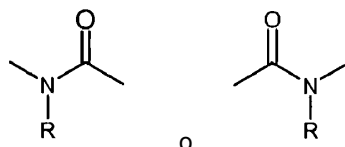
-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, o -CO-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-

Q<sub>3</sub> es:

-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>- donde m es 12, 13, 14, 15 ó 16;

X<sub>1</sub> puede ser:

- O;
- -C=O;
- un enlace;
- NCOR<sup>1</sup>, donde R<sup>1</sup> puede ser H, -CH<sub>3</sub> o -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-CH<sub>3</sub>; o



donde R es hidrógeno, C<sub>1-3</sub>-alquilo, C<sub>2-3</sub>-alqueno, -alquino;

- Q<sub>4</sub>, Q<sub>5</sub>, X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub> son enlaces y todos los n son cero,

y

Z es:

-COOH;

y cualquier complejo con Zn<sup>2+</sup> de los mismos.

La invención se refiere adicionalmente a un complejo de cinc del derivado de insulina, una composición farmacéutica que comprende el derivado de insulina o el complejo de cinc.

## DEFINICIONES

Por "**análogo de insulina**" como se utiliza en esta memoria, se entiende un polipéptido que tiene una estructura molecular que formalmente puede derivarse de la estructura de una insulina existente naturalmente, por ejemplo la de la insulina humana, por delección y/o intercambio de al menos un residuo de aminoácido que se encuentra en la insulina existente naturalmente y/o adición de al menos un residuo de aminoácido. Los residuos de aminoácido añadidos y/o intercambiados pueden ser residuos de aminoácido codificables u otros residuos existentes naturalmente o residuos de aminoácido puramente sintéticos.

Los análogos de insulina pueden ser compuestos de este tipo en los cuales la posición 28 de la cadena B puede estar modificada respecto al residuo Pro natural a uno de Asp, Lys, o Ile. En otro aspecto, Lys en la posición B29 está modificada a Pro. Asimismo, Asn en la posición A21 puede estar modificada a Ala, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, en particular a Gly, Ala, Ser, o Thr, y preferiblemente a Gly. Adicionalmente, Asn en la posición B3 puede estar modificada a Lys o Asp. Ejemplos adicionales de análogos de insulina son insulina humana des(B30); análogos de insulina humana des(B30); análogos de insulina en los que PheB1 se ha delecionado; análogos de insulina en los que la cadena A y/o la cadena B tienen una extensión N-terminal y análogos de insulina en los que la cadena A y/o la cadena B tienen una extensión C-terminal. Así, uno o dos Arg pueden añadirse a la posición B1.

En aspectos de la invención, se han modificado un máximo de 17 aminoácidos. En aspectos de la invención, se han modificado un máximo de 15 aminoácidos. En aspectos de la invención, se han modificado un máximo de 10 aminoácidos. En aspectos de la invención, se han modificado un máximo de 8 aminoácidos. En aspectos de la invención, se han modificado un máximo de 7 aminoácidos. En aspectos de la invención, se han modificado un máximo de 6 aminoácidos. En aspectos de la invención, se han modificado un máximo de 5 aminoácidos. En aspectos de la invención, se han modificado un máximo de 4 aminoácidos. En aspectos de la invención, se han modificado un máximo de 3 aminoácidos. En aspectos de la invención, se han modificado un máximo de 2 aminoácidos. En aspectos de la invención, se ha modificado un solo aminoácido.

Con "**insulina desB30**", "**insulina humana desB30**" se entiende una insulina natural o un análogo de la misma que carece de residuo de aminoácido B30. Análogamente, "**insulina desB29desB30**" o "**insulina humana**

**desB29desB30**" significa una insulina natural o un análogo de la misma que carece de los residuos de aminoácidos B29 y B30.

5 Con "**B1**", "**A1**" etc. se entiende el residuo de aminoácido en la posición 1 en la cadena B de insulina (contado desde el extremo N-terminal) y el residuo de aminoácido en la posición 1 en la cadena A de insulina (contado desde el extremo N-terminal), respectivamente. El residuo de aminoácido en una posición específica puede designarse también como v.g., PheB1, lo que significa que el residuo de aminoácido en la posición B1 es un residuo fenilalanina.

10 Con "**insulina**", como se utiliza en esta memoria, se entiende insulina humana, insulina de porcino o insulina de bovino con puentes disulfuro entre CysA7 y CysB7 y entre CysA20 y CysB19, y un puente disulfuro interno entre Cys A6 y CysA11.

15 Por "**insulina parental**" se entiende una insulina existente naturalmente tal como insulina humana o insulina de porcino. Alternativamente, la insulina parental puede ser un análogo de insulina.

La expresión "**cargado positivamente**" significa que están presentes al menos un grupo o más grupos que podrían asumir una carga positiva en el intervalo de pH de 4 a 9.

20 Cuando se indica que un derivado de insulina conforme a la invención es "**soluble a valores de pH fisiológico**", ello significa que el derivado de insulina puede utilizarse para preparar composiciones de insulina que están disueltas completamente a valores de pH fisiológico. Dicha solubilidad favorable puede ser debida a las propiedades inherentes del derivado de insulina por sí solo o resultado de una interacción favorable entre el derivado de insulina y uno o más ingredientes contenidos en el vehículo.

25 El término "**sin debilitación**", como se utiliza en esta memoria significa que cuando está formulada en una formulación, tanto la insulina de acción rápida como la insulina acilada tiene un perfil de acción que es idéntico o sustancialmente idéntico al perfil de acción, cuando la insulina de acción rápida y la insulina acilada se administran en formulaciones separadas.

30 La expresión "**insulina de peso molecular alto**" o "**hmw**" significa que el peso molecular de un complejo de insulina humana, de un análogo de insulina o de un derivado de insulina es superior a la seroalbúmina humana, por encima de un complejo dodecamérico de un análogo de insulina o de un derivado de insulina o más de aproximadamente 72 kDalton.

35 La expresión "**insulina de peso molecular medio**" o "**mmw**" significa que el peso molecular de un complejo de insulina humana, de un análogo de insulina o de un derivado de insulina es desde aproximadamente un hexámero de insulina a aproximadamente un dodecámero de insulina entre 24 y 80 kDalton.

40 La expresión "**insulina de peso molecular bajo**" o "**lmw**" significa que el peso molecular de una insulina humana, un análogo de insulina o un derivado de insulina es inferior a 24 kDalton.

La expresión "**sustituyente**" significa el resto químico que está conjugado al péptido de insulina y no forma parte de la secuencia de aminoácidos de insulina.

45 Se han utilizado en la memoria descriptiva y los ejemplos las abreviaturas siguientes:

CV	Volumen de columna
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
HSA	Seroalbúmina humana
LC	Cromatografía líquida
MALDI	Desorción Ionización Láser Asistida por Matriz
MS	Espectrometría de masas
RT	Temperatura ambiente
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaños
SPA	Ensayo de Proximidad de Centelleo
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
O.D.	Densidad óptica = absorbancia
Monómero X <sub>2</sub>	Insulina humana AspB9 Glu B27
DIEA:	N,N-diisopropiletilamina
DMF	N,N,-dimetilformamida
Sar:	Sarcosina (N-metil-glicina)
tBu:	ter-Butilo
TSTU:	Tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-1,1,3,3-tetrametiluronio
THF:	Tetrahidrofurano

EtOAc o AcOEt	Acetato de etilo
DIPEA:	Diisopropiletilamina
TEA:	Trietil-amina
TFA:	Ácido trifluoroacético
DCM:	Diclorometano
PEG:	Polietilenglicol
GIR:	Tasa de infusión de glucosa
DAP	Ácido 2,3-diaminopropiónico
DAB	Ácido 2,4-diaminobutírico
Orn	Ornitina o ácido 2,5-diamino-pentanoico

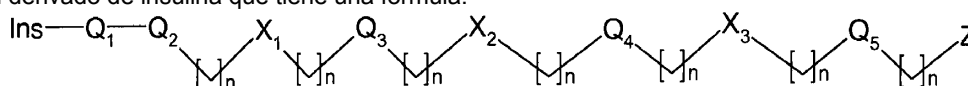
**DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

5 La presente invención está basada en el reconocimiento de que el hecho de tener una amina o un sustituyente cargado positivamente en una molécula de derivado de insulina y un grupo terminal cargado, juega un papel importante para la duración de acción in vivo de insulinas de acción prolongada, y para la susceptibilidad de mezcla de la insulina de acción prolongada con insulina de acción rápida sin debilitación alguna. Los derivados de insulina tienen tendencia a formar complejos con peso molecular alto y por consiguiente exhiben un perfil de acción prolongado.

10 Ventajosamente, los derivados de insulina conforme a la invención son solubles a valores de pH fisiológico, tienen una potencia que es comparable a la de la insulina humana, y son susceptibles de mezcla con insulinas de acción rápida sin debilitación alguna.

15 La invención se resumirá en los párrafos que siguen:

1. Un derivado de insulina que tiene una fórmula:



20 en donde Ins es un resto de insulina parental y  $\text{Q}_1-\text{Q}_2-\left[\text{CH}_2\right]_n-\text{X}_1-\left[\text{CH}_2\right]_n-\text{Q}_3-\left[\text{CH}_2\right]_n-\text{X}_2-\left[\text{CH}_2\right]_n-\text{Q}_4-\left[\text{CH}_2\right]_n-\text{X}_3-\left[\text{CH}_2\right]_n-\text{Q}_5-\left[\text{CH}_2\right]_n-\text{Z}$  es un sustituyente y donde el Ins está unido al sustituyente por un enlace amídico entre el grupo  $\alpha$ -amino del residuo aminoácido N-terminal de la cadena B de Ins o un grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo Lys presente en la cadena A o B de Ins y un grupo CO en  $\text{Q}_1$  o  $\text{Q}_2$  del sustituyente;

25 cada n es independientemente 0, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6;

$\text{Q}_1$  es:

- un residuo de aminoácido, residuo que forma, con su grupo ácido carboxílico, un grupo amida junto con el grupo  $\alpha$ -amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B de Ins o junto con el grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo Lys presente en la cadena A o B de Ins, o
- una cadena compuesta de dos, tres o cuatro residuos de  $\alpha$ -aminoácido como se han especificado arriba unidos entre sí por enlaces amídicos, cadena que está enlazada - por un enlace amídico - al grupo  $\alpha$ -amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B de Ins o al grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo Lys presente en la cadena A o B de Ins, o
- un enlace

35

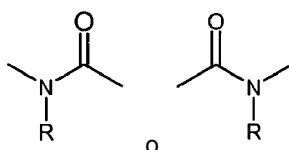
$\text{Q}_2$  es:

$-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-$ , o  $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{Q}_3-(\text{CH}_2)_m$  donde m es 12, 13, 14, 15 ó 16;

$\text{X}_1$  puede ser:

- O;
- $-\text{C}=\text{O}$ ;
- un enlace;
- $\text{NCOR}^1$ , donde  $\text{R}^1$  puede ser H,  $-\text{CH}_3$  o  $-(\text{CH}_2)_{1-6}-\text{CH}_3$ ; o

40



45 donde R es hidrógeno, C1-3-alquilo, C2-3-alqueno o C2-3-alquino;

$\text{Q}_4$ ,  $\text{Q}_5$ ,  $\text{X}_2$  y  $\text{X}_3$  son enlaces y todos los n son cero,

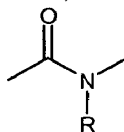
Z es:

$-\text{COOH}$ ;

y cualquier complejo con  $\text{Zn}^{2+}$  de los mismos.

2. Derivado de insulina conforme al párrafo 1, en donde Q<sub>1</sub> es un enlace.

3. Derivado de insulina conforme a los párrafos 1-2, en donde X<sub>1</sub> es



5 donde R es hidrógeno.

4. Derivado de insulina conforme a cualquiera de los párrafos anteriores, en donde el sustituyente está unido al grupo ε-amino de un residuo Lys presente en la cadena A o B de la insulina parental.

10 5. Derivado de insulina conforme a los párrafos 1-4, en donde el sustituyente está unido al grupo ε-amino del residuo Lys en la posición B29 presente en la cadena B de la insulina parental.

6. Derivado de insulina conforme a los párrafos 1-5, en donde la insulina parental es un análogo de insulina.

15 7. Derivado de insulina conforme a los párrafos 1-6, en donde el residuo de aminoácido en la posición B30 de la insulina parental es Lys o ha sido delecionado.

20 8. Derivado de insulina conforme a los párrafos 1-7, en donde el sustituyente está unido al grupo ε-amino del residuo Lys en la posición B29 de insulina humana desB30.

9. Derivado de insulina conforme a los párrafos 6-8, en donde la insulina parental es insulina humana AspB28, insulina humana GlyA21 o insulina humana GlyA2desB30, insulina humana GlyA21ArgB31ArgB32, insulina humana LysB29ProB29, insulina humana ThrB29LysB30 o insulina humana LysB3GluB29.

25 10. Un complejo de cinc de un derivado de insulina conforme a uno cualquiera de los párrafos anteriores en donde dos iones cinc, tres iones cinc, cuatro iones cinc, cinco iones cinc, seis iones cinc, siete iones cinc, ocho iones cinc, nueve iones cinc o diez iones cinc están unidos por seis moléculas de derivado de insulina.

30 11. Una composición farmacéutica para uso como medicamento para el tratamiento de la diabetes en un paciente que se encuentra en necesidad de dicho tratamiento, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de insulina conforme a los párrafos 1-9.

12. Una composición farmacéutica conforme al párrafo 11, en donde la composición comprende excipientes farmacéuticamente aceptables.

35 13. Una composición farmacéutica conforme a los párrafos 11-12, en donde la composición comprende adicionalmente un análogo de insulina que tiene un comienzo de acción rápido.

40 14. Una composición farmacéutica conforme al párrafo 13, en donde el análogo de insulina de acción rápida se selecciona del grupo constituido por insulina humana AspB28, insulina humana LysB28ProB29 e insulina humana LysB3GluB29.

45 El derivado de insulina conforme a la invención y el análogo de insulina de acción rápida pueden mezclarse en una ratio de aproximadamente 90/10%; aproximadamente 70/30% o aproximadamente 50/50%.

En un aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un derivado de insulina conforme a la invención que es soluble a valores de pH fisiológicos.

50 En un aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un derivado de insulina conforme a la invención que es soluble a valores de pH en el intervalo de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5.

En un aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica con un perfil de acción prolongado que comprende un derivado de insulina conforme a la invención.

55 En un aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que es una solución que contiene desde aproximadamente 120 nmol/mL a aproximadamente 2400 nmol/mL, desde aproximadamente 400 nmol/mL a aproximadamente 2400 nmol/mL, desde aproximadamente 400 nmol/mL a aproximadamente 1200 nmol/mL, desde aproximadamente 600 nmol/mL a aproximadamente 2400 nmol/mL, o desde aproximadamente 600 nmol/mL a aproximadamente 1200 nmol/mL de un derivado de insulina conforme a la invención o de una mezcla del derivado de insulina conforme a la invención con un análogo de insulina de acción rápida.

El producto de partida para la acilación, la enzima parental o el análogo de insulina o un precursor del mismo pueden producirse por síntesis de péptidos bien conocida o por producción recombinante bien conocida en microorganismos transformados adecuados. Así, el producto de partida de insulina puede producirse por un método que comprende cultivar una célula hospedadora que contiene una secuencia de DNA que codifica el polipéptido y es capaz de expresar el polipéptido en un medio nutriente adecuado en condiciones que permiten la expresión del péptido, después de lo cual el péptido resultante se recupera del cultivo.

El medio utilizado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para cultivo de las células hospedadoras, tales como medios mínimos o complejos que contienen suplementos apropiados. Medios adecuados están disponibles de suministradores comerciales o se pueden preparar conforme a recetas publicadas (v.g. en catálogos de la American Type Culture Collection). El péptido producido por las células puede recuperarse luego del medio de cultivo por procedimientos convencionales que incluyen separar las células hospedadoras del medio por centrifugación o filtración, precipitar los componentes proteínicos del sobrenadante o filtrado por medio de una sal, v.g. sulfato de amonio, purificar por una diversidad de procedimientos cromatográficos, v.g. cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración con gel, cromatografía de afinidad, o análogos, dependiendo del tipo de péptido en cuestión.

La secuencia de DNA que codifica la insulina parental puede ser convenientemente de origen genómico o cDNA, obtenida por ejemplo por preparación de una genoteca genómica o de cDNA y cribado respecto a secuencias de DNA que codifican la totalidad o parte del polipéptido por hibridación utilizando sondas oligonucleotídicas sintéticas conforme a técnicas estándar (véase, por ejemplo, Sambrook, J. Fritsch, EF y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1989). La secuencia de DNA que codifica la insulina parental puede prepararse también sintéticamente por métodos estándar establecidos, v.g. el método de fosfoamidito descrito por Beaucage y Caruthers, *Tetrahedron Letters* 22 (1981), 1859 - 1869, o el método descrito por Matthes et al., *EMBO Journal* 3 (1984), 801 - 805. La secuencia de DNA puede prepararse también por la reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores específicos, por ejemplo como se describe en US 4,683,202 o Saiki et al., *Science* 239 (1988), 487 - 491.

La secuencia de DNA puede insertarse en cualquier vector que pueda someterse convenientemente a procedimientos de DNA recombinante, y la elección del vector dependerá a menudo de la célula hospedadora en la que debe introducirse el mismo. Así, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir un vector que existe como identidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, v.g. un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que, una vez introducido en una célula hospedadora, se integra en el genoma de la célula hospedadora y se replica junto con el o los cromosomas en el o los que se ha integrado.

El vector es por ejemplo un vector de expresión en el que la secuencia de DNA que codifica la insulina parental está enlazada operativamente a segmentos adicionales requeridos para la transcripción del DNA, tales como un promotor. El promotor puede ser cualquier secuencia de DNA que exhiba actividad de transcripción en la célula hospedadora de elección y puede derivarse de genes que codifican proteínas homólogas o heterólogas a la célula hospedadora. Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción del DNA codificante de la insulina parental en una diversidad de células hospedadoras son bien conocidos en la técnica, véase por ejemplo Sambrook *et al.*, *supra*.

La secuencia de DNA que codifica la insulina parental puede también, en caso necesario, estar conectada operativamente a un terminador adecuado, señales de poliadenilación, secuencias intensificadoras de la transcripción, y secuencias intensificadoras de la traducción. El vector recombinante de la invención puede comprender además una secuencia de DNA que permite que el vector se replique en la célula hospedadora en cuestión.

El vector puede comprender un marcador seleccionable, v.g. un gen cuyo producto complementa un defecto en la célula hospedadora o uno que confiere resistencia a un fármaco, v.g. ampicilina, kanamicina, tetraciclina, cloranfenicol, neomicina, higromicina o metotrexato.

Para dirigir un dipéptido de la presente invención al camino secretor de las células hospedadoras, puede proporcionarse una secuencia de señal secretora (conocida también como una secuencia conductora, secuencia prepro o secuencia pre) en el vector recombinante. La secuencia de señal secretora está unida a la secuencia de DNA que codifica el péptido en el marco de lectura correcto. Las secuencias de señal secretoras están posicionadas comúnmente en 5' respecto a la secuencia de DNA que codifica el péptido. La secuencia de señal secretora puede ser la asociada normalmente con el péptido o puede ser de un gen que codifique otra proteína secretada.

Los procedimientos utilizados para ligar las secuencias de DNA que codifican la insulina parental, el promotor y opcionalmente el terminador y/o la secuencia señal secretora, respectivamente, y para insertar las mismas en vectores adecuados que contienen la información necesaria para la replicación, son bien conocidos por las personas expertas en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra*).

La célula hospedadora en la que se introduce la secuencia de DNA o el vector recombinante puede ser cualquier célula que sea capaz de producir el presente péptido e incluye bacterias, levaduras, hongos y células eucariotas superiores. Ejemplos de células hospedadoras adecuadas bien conocidas y utilizadas en la técnica son, sin limitación, *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, o linajes de células BHK o CHO de mamífero.

La molécula de insulina parental se convierte luego en los derivados de insulina de la invención por introducción del sustituyente relevante en la posición B1 o en la posición Lys seleccionada en la cadena B. El sustituyente puede introducirse por cualquier método conveniente y se describen muchos métodos en la técnica anterior para acilación de un grupo amino. Más detalles aparecerán en los ejemplos siguientes.

## COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

Los derivados de insulina de esta invención de la fórmula reivindicada pueden administrarse, por ejemplo, por vía subcutánea, oral o pulmonar.

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

Los derivados de insulina de esta invención pueden administrarse por inhalación de una manera de dosificación eficaz para aumentar los niveles circulantes de insulina y/o reducir los niveles circulantes de glucosa. Dicha administración puede ser eficaz para tratamiento de trastornos tales como diabetes o hiperglucemia. El alcance de dosis eficaces de insulina requiere la administración de una dosis inhalada de derivado de insulina de esta invención mayor que aproximadamente 0,5 µg/kg a aproximadamente 50 µg/kg. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser determinada por un técnico experto, que tendrá en cuenta factores que incluyen el nivel de insulina, los niveles de glucosa en sangre, el estado físico del paciente, el estado pulmonar del paciente, o análogos.

La administración por inhalación puede dar como resultado una farmacocinética comparable a la administración subcutánea de insulinas. Dispositivos de inhalación diferentes proporcionan típicamente farmacocinéticas similares cuando se comparan tamaños de partícula similares y niveles similares de deposición pulmonar.

Conforme a la invención, el derivado de insulina de esta invención puede suministrarse por cualquiera de una diversidad de dispositivos de inhalación conocidos en la técnica para administración de un agente terapéutico por inhalación. Estos dispositivos incluyen inhaladores de dosis medidas, nebulizadores, generadores de polvo seco, pulverizadores, y análogos. El derivado de insulina de esta invención es suministrado por un inhalador o un pulverizador de polvo seco. Existen varias características deseables de un dispositivo de inhalación para administración del derivado de insulina de esta invención. Por ejemplo, el suministro por el dispositivo de inhalación es ventajosamente fiable, reproducible, y exacto. El dispositivo de inhalación debería suministrar partículas pequeñas, por ejemplo, inferiores a aproximadamente 10 µm, por ejemplo aproximadamente 1-5 µm, para respirabilidad satisfactoria. Algunos ejemplos específicos de dispositivos de inhalación disponibles comercialmente, adecuados para la práctica de esta invención son Turbohaler™ (Astra), Rotahaler® (Glaxo), Diskus® (Glaxo), inhalador Spiros™ (Dura), dispositivos comercializados por Inhale Therapeutics, AERx™ (Aradigm), el nebulizador Ultravent® (Mallinckrodt), el nebulizador Acorn II® (Marquest Medical Products), el inhalador de dosis medidas Ventolin® (Glaxo), el inhalador de polvo Spinhaler® (Fisons), o análogos.

Como reconocerán los expertos en la técnica, la formulación del derivado de insulina de esta invención, la cantidad de la formulación suministrada, y la duración de la administración de una sola dosis deben del tipo de dispositivo de inhalación empleado. Para sistemas de suministro de aerosoles, tales como nebulizadores, la frecuencia de administración y la duración del tiempo durante la cual el sistema permanece activado dependerán principalmente de la concentración del conjugado de insulina en el aerosol. Por ejemplo, pueden utilizarse periodos de administración más cortos a concentraciones mayores de conjugado de insulina en la solución nebulizadora. Dispositivos tales como inhaladores de dosis medidas pueden producir concentraciones de aerosol mayores, y pueden funcionar durante periodos más cortos a fin de suministrar la cantidad deseada del conjugado de insulina. Los dispositivos tales como inhaladores de polvo suministran el agente activo hasta que una cantidad dada de agente es expulsada por el dispositivo. En este tipo de inhalador, la cantidad de derivado de insulina de esta invención en una cantidad dada del polvo determina la dosis suministrada en una sola administración.

El tamaño de partícula del derivado de insulina de esta invención en la formulación suministrada por el dispositivo de inhalación es crítico con respecto a la capacidad de insulina para llevar la misma a los pulmones, y a las vías aéreas inferiores o alvéolos. El derivado de insulina de esta invención puede formularse de tal modo que al menos aproximadamente 10% del conjugado de insulina suministrado se deposita en el pulmón, por ejemplo aproximadamente 10 a aproximadamente 20%, o más. Es sabido que la eficiencia máxima de deposición pulmonar para humanos que respiran por la boca se obtiene con tamaños de partícula de aproximadamente 2 µm a aproximadamente 3 µm. Cuando los tamaños de partícula son superiores a aproximadamente 5 µm, la deposición



pulmonar de insulina decrece sustancialmente. Los tamaños de partícula inferiores a aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  hacen que la deposición pulmonar disminuya, y llega a hacerse difícil suministrar partículas con masa suficiente para ser terapéuticamente eficaces. Así, las partículas del derivado de insulina suministradas por inhalación tienen un tamaño de partícula menor que aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , por ejemplo en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ . La formulación del derivado de insulina se selecciona para dar el tamaño de partícula deseado en el dispositivo de inhalación seleccionado.

Ventajosamente, para administración como un polvo seco, un derivado de insulina de esta invención se prepara en una forma particulada con un tamaño de partícula menor que aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , por ejemplo aproximadamente 1 a aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ . El tamaño de partícula es eficaz para suministro a los alvéolos de los pulmones del paciente. El polvo seco está compuesto en gran parte por partículas producidas de tal manera que la mayoría de las partículas tienen un tamaño dentro del intervalo deseado. Ventajosamente, al menos aproximadamente 50% del polvo seco está formado por partículas que tienen un diámetro menor que aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ . Tales formulaciones pueden realizarse por secado mediante pulverización, molienda, o condensación en el punto crítico de una solución que contiene conjugado de insulina y otros ingredientes deseados. Otros métodos adecuados también para generación de partículas útiles en la presente invención se conocen en la técnica.

Las partículas se separan usualmente a partir de una formulación de polvo seco en un envase y son transportadas luego al pulmón de un paciente por una corriente de aire portadora. Típicamente, en los inhaladores de polvo seco actuales, la fuerza para el desmenuzamiento del sólido es proporcionada exclusivamente por la inhalación del paciente. En otro tipo de inhalador, el flujo de aire generado por la inhalación del paciente activa un motor impulsor que desaglomera las partículas.

Las formulaciones del inhalador de insulina de esta invención para administración por un inhalador de polvo seco incluyen típicamente un polvo seco finamente dividido que contiene el derivado, pero el polvo puede incluir también un agente de aumento de volumen, portador, excipiente, otro aditivo, o análogos. Los aditivos pueden incluirse en una formulación de polvo seco de conjugado de insulina, por ejemplo, para diluir el polvo en caso requerido para suministro desde el inhalador de polvo particular a fin de facilitar el procesamiento de la formulación, proporcionar propiedades ventajosas del polvo a la formulación, facilitar la dispersión del polvo por el dispositivo de inhalación, a fin de estabilizar la formulación (por ejemplo, antioxidantes o tampones), para proporcionar sabor a la formulación, o análogos. Ventajosamente, el aditivo no afecta desfavorablemente a las vías aéreas del paciente. El derivado de insulina puede mezclarse con un aditivo a un nivel molecular, o la formulación sólida puede incluir partículas del conjugado de insulina mezcladas con o aplicadas como recubrimiento sobre las partículas del aditivo. Aditivos típicos incluyen mono-, di-, y polisacáridos; azúcar-alcoholes y otros polioles, tales como, por ejemplo, lactosa, glucosa, refinosa, melecitosa, lactitol, maltitol, trehalosa, sacarosa, manitol, almidón, o combinaciones de los mismos; agentes tensioactivos, tales como sorbitoles, difosfatidil-colina, o lecitina; o análogos. Típicamente, un aditivo, tal como un agente de aumento de volumen, está presente en una cantidad eficaz para un propósito arriba descrito, a menudo aproximadamente en un 50% a aproximadamente 90% en peso de la formulación. Agentes adicionales conocidos en la técnica para formulación de una proteína tal como un análogo de insulina pueden estar incluidos también en la formulación.

Una pulverización que incluye los derivados de insulina de esta invención puede producirse forzando una suspensión o solución de conjugado de insulina a través de una tobera a presión. El tamaño y la configuración de la tobera, la presión aplicada, y la tasa de alimentación líquida pueden seleccionarse para conseguir la producción y el tamaño de partícula deseados. Puede producirse una electropulverización, por ejemplo, por un campo eléctrico en conexión con una alimentación capilar o tobera. Ventajosamente, las partículas de conjugado de insulina suministradas por un pulverizador tienen un tamaño de partícula menor que aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , por ejemplo en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ .

Las formulaciones de derivados de insulina de esta invención adecuadas para uso con un pulverizador incluirán típicamente el derivado de insulina en una solución acuosa a una concentración de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 20 mg de conjugado de insulina por mL de solución. La formulación puede incluir agentes tales como un excipiente, un tampón, un agente de isotonicidad, un conservante, un agente tensioactivo, y, por ejemplo cinc. La formulación puede incluir también un excipiente o agente para estabilización del derivado de insulina, tal como un tampón, un agente reductor, una proteína de aumento de volumen, o un carbohidrato. Las proteínas de aumento de volumen útiles en la formulación de los conjugados de insulina incluyen albúmina, protamina, o análogas. Carbohidratos típicos útiles en la formulación de conjugados de insulina incluyen sacarosa, manitol, lactosa, trehalosa, glucosa, o análogos. En la formulación del derivado de insulina puede incluir también un agente tensioactivo, que puede reducir o impedir la agregación inducida en la superficie del conjugado de insulina causada por atomización de la solución en la formación de un aerosol. Pueden emplearse diversos agentes tensioactivos convencionales, tales como ésteres y alcoholes, y ésteres de ácidos grasos de sorbitol con polioxietileno. Las cantidades estarán comprendidas por regla general entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 4% en peso de la formulación.

Las composiciones farmacéuticas que contienen un derivado de insulina conforme a la presente invención pueden administrarse también por vía parenteral a pacientes que se encuentran en necesidad de un tratamiento de este tipo. La administración parenteral puede realizarse por inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa por medio de una jeringuilla, opcionalmente una jeringuilla de tipo pluma. Alternativamente, la administración parenteral puede ser  
5 realizada por medio de una bomba de infusión. Opciones adicionales son la administración de la insulina por vía nasal o pulmonar, por ejemplo en composiciones, polvos o líquidos, diseñados específicamente para el propósito.

Pueden prepararse composiciones inyectables de los derivados de insulina de la invención utilizando las técnicas convencionales de la industria farmacéutica que implican disolución y mezcla de los ingredientes en caso apropiado  
10 para dar el producto final deseado. Así, con arreglo a un procedimiento, un derivado de insulina conforme a la invención se disuelve en una cantidad de agua que es algo menor que el volumen final de la composición a preparar. En caso requerido se añaden un agente isotónico, un conservante y un tampón y se ajusta el valor de pH de la solución - en caso necesario - utilizando un ácido, v.g. un ácido clorhídrico, o una base, v.g. Finalmente, el volumen de la solución se ajusta con agua para dar la concentración deseada de los ingredientes.

En un efecto adicional de la invención, el tampón se selecciona del grupo constituido por acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrogeno-fosfato de sodio, hidrogenofosfato disódico, fosfato de sodio, y tris(hidroximetil)-aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas de los mismos. Cada uno de estos tampones específicos  
15 constituye un aspecto alternativo de la invención.

En un aspecto adicional de la invención, la formulación comprende además un conservante farmacéuticamente aceptable, que puede seleccionarse del grupo constituido por 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-  
25 hidroxibenzoato de etilo, cloruro de bencetonio, clorfenesina (3p-clorofenoxipropano-1,2-diol) o mezclas de los mismos. En un aspecto adicional de la invención, el conservante está presente en una concentración de 0,1 mg/mL a 20 mg/mL. En un aspecto adicional de la invención, el conservante está presente en una concentración de 0,1 mg/mL a 5 mg/mL. En un aspecto adicional de la invención, el conservante está presente en una concentración de 5  
30 mg/mL a 10 mg/mL. En un aspecto adicional de la invención, el conservante está presente en una concentración de 10 mg/mL a 20 mg/mL. Cada uno de estos conservantes específicos constituye un aspecto alternativo de la invención. El uso de un conservante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por las personas expertas. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, edición 19<sup>a</sup>, 1995.

En un aspecto adicional de la invención, la formulación comprende además un agente isotónico que puede seleccionarse del grupo constituido por una sal (v.g. cloruro de sodio), un azúcar o azúcar-alcohol con un aminoácido (v.g. glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (v.g. glicerol (glicerina), 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol), polietilenglicol (v.g. PEG400), o mezclas de los mismos. Puede utilizarse cualquier azúcar tal como mono-, di-, o polisacáridos, o glucanos solubles  
35 en agua, que incluyen por ejemplo fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, hidroxietil-almidón y carboximetilcelulosa-Na. En un aspecto, el aditivo azúcar es sacarosa. Un azúcar-alcohol se define como un hidrocarburo C4-C8 que tiene al menos un grupo OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol, y arabitol. En un aspecto, el aditivo azúcar-alcohol es manitol. Los azúcares o azúcar-alcoholes arriba mencionados pueden utilizarse  
40 individualmente o en combinación. No existe ningún límite fijo para la cantidad utilizada, con tal que el azúcar o azúcar-alcohol sea soluble en la preparación líquida y no afecte desfavorablemente a los efectos estabilizadores alcanzados utilizando los métodos de la invención. En un aspecto, la concentración de azúcar o azúcar-alcohol está comprendida entre aproximadamente 1 mg/mL y aproximadamente 150 mg/mL. En un aspecto adicional de la invención, el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/mL a 50 mg/mL. En un aspecto adicional  
50 de la invención, el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/mL a 7 mg/mL. En un aspecto adicional de la invención, el agente isotónico está presente en una concentración de 8 mg/mL a 24 mg/mL. En un aspecto adicional de la invención, el agente isotónico está presente en una concentración de 25 mg/mL a 50 mg/mL. Cada uno de estos agentes isotónicos específicos constituye un aspecto alternativo de la invención. El uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas es bien conocido por las personas expertas. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, edición 19<sup>a</sup>, 1995.

Agentes isotónicos típicos son cloruro de sodio, manitol, dimetil-sulfona y glicerol, y conservantes típicos son fenol, m-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo y alcohol bencílico.

Ejemplos de tampones adecuados son acetato de sodio, glicilglicina, HEPES (ácido 4-(3-hidroxietil)-1-  
60 p<sup>a</sup>iperazinaetanosulfónico) y fosfato de sodio.

Una composición para administración nasal de un derivado de insulina conforme a la presente invención puede prepararse, por ejemplo, como se describe en la Patente Europea No. 272,097 (otorgada a Novo Nordisk A/S).

Las composiciones que contienen derivados de insulina de esta invención pueden utilizarse en el tratamiento de estados que son sensibles a la insulina. Así, aquéllas pueden utilizarse en el tratamiento de la diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 e hiperglucemia, por ejemplo como la observada a veces en personas gravemente lesionadas y personas que han sufrido cirugía mayor. El nivel óptimo de dosis para cualquier paciente dependerá de una

diversidad de factores que incluyen la eficacia del derivado de insulina específico empleado, la edad, el peso corporal, la actividad física, y la dieta del paciente, en una posible combinación con otros fármacos, y de la gravedad del estado a tratar. Se recomienda que la dosis diaria del derivado de insulina de esta invención sea determinada para cada paciente individual por los expertos en la técnica de manera similar a lo que sucede para composiciones de insulina conocidas.

En caso adecuado, los derivados de insulina de esta invención pueden utilizarse en mezcla con otros tipos de insulina, v.g. análogos de insulina con un comienzo de acción más rápido. Ejemplos de tales análogos de insulina se describen, v.g., en las Solicitudes de Patente Europea que tienen los números de publicación EP 214826 (Novo Nordisk A/S), EP 375437 (Novo Nordisk A/S), y EP 383472 (Eli Lilly & Co.).

La presente invención se ilustra adicionalmente por los ejemplos que siguen que, sin embargo, no deben interpretarse como limitantes del alcance de protección.

Todos los encabezamientos y sub-encabezamientos se utilizan en esta memoria únicamente por conveniencia, y no deben interpretarse como limitantes de la invención en modo alguno.

El uso de cualquiera y la totalidad de los ejemplos, o expresiones lingüísticas (v.g., "tal como"), proporcionado en esta memoria, debe entenderse meramente para esclarecer mejor la invención, y no establece limitación en cuanto al alcance de la invención a no ser que se reivindique lo contrario. Ninguna expresión lingüística en la memoria descriptiva debería interpretarse como indicativa de que cualquier elemento no reivindicado sea esencial para la práctica de la invención.

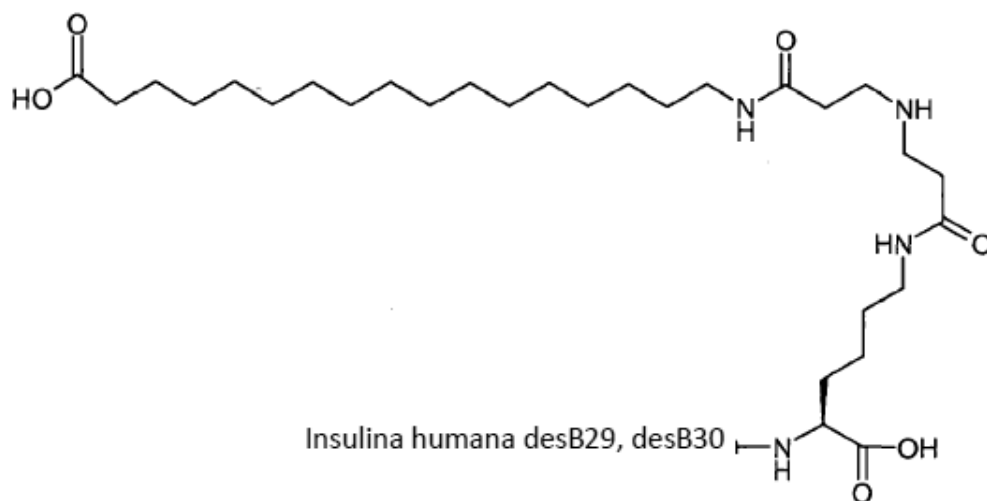
La citación e incorporación de documentos de patente en esta memoria se hace únicamente por conveniencia, y no refleja aspecto alguno en cuanto a la validez, patentabilidad, y/o aplicabilidad de tales documentos de patente.

La invención incluye todas las modificaciones equivalentes de la materia objeto citada en las reivindicaciones adjuntas a esta memoria que son permitidas por la ley aplicable.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1

Síntesis de insulina humana N<sup>eB29</sup>{3-[2-(16-carboxihexadecilcarbamoil)-etilamino]-propionil}-desB30



Paso 1: Ácido 3-(2-benciloxycarboniletilamino)-propiónico

Se añadió ácido 3-aminopropiónico (5 g, 56 milimoles) a etanol (50 mL), y se añadieron TEA (7,8 mL, 56 mmoles) y agua (50 mL), y la mezcla se calentó a reflujo bajo nitrógeno. Se añadieron éster-bencilico de ácido acrílico ((9,1 g,

56 milimoles) y más etanol (50 mL), y la mezcla se calentó a reflujo durante 16 horas. Se concentró la mezcla a vacío, se añadió tolueno y se reevaporó dos veces para dar 17,5 gramos (producto más TEA).

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO, 300 MHz) δ 7,12-7,40 (m, 5H), 4,49 (s, 2H), 2,98 (t, 4H), 2,42 (t, 4H) (más señales TEA 2,79 y 1,08)

5

Paso 2: Ácido 3-[(2-benciloxicarboniletil)-ter-butoxicarbonilamino]-propiónico

Se disolvió ácido 3-(2-benciloxicarboniletilamino)-propiónico (2 g, 7,2 milimoles) en DCM (20 mL) y se añadieron dicarbonato de di-ter-butilo (3,5 g, 15,8 milimoles) y TEA (2,59 mL, 18,6 milimoles). Después de 8 días, se añadió DCM (50 mL) y la solución se lavó con agua (75 mL) y HCl 1N (30 mL). Los lavados acuosos se extrajeron con DCM (25 mL). Las fases orgánicas se agruparon, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentraron a vacío. El compuesto se purificó por cromatografía flash (AcOEt/heptano) para dar 0,4 g.

10

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO, 300 MHz) δ 12,24 (br, 1H), 7,25-7,45 (m, 5H), 5,09 (s, 2H), 3,42 (t, 2H) 3,34 (t-br, 4H, teo., 2H), 2,58 (t, 2H), 2,41 (t, 2H).

15

Paso 3: Éster-ter-butílico del ácido 17-aminoheptadecanoico

Se añadió acetonitrilo (10 mL) a éster-mono-ter-butílico del ácido octadecanoico (500 mg, 1,3 milimoles) y se añadió TEA (0,226 mL, 1,6 milimoles). Se añadió azida difenilfosfónica (0,37 g, 1,3 milimoles) en una solución de acetonitrilo (1 mL). La mezcla se agitó a reflujo durante 2 horas, y a la temperatura ambiente durante 16 horas. La reacción se concentró a vacío, y se suspendió/disolvió en 1:2, AcOEt:heptano (2 mL) y se aplicó a un lecho seco de sílice (2 x 4 cm de diámetro). Se eluyó con AcOEt:heptano 1:2 (2 mL) y AcOEt:heptano 1:1 (60 mL). El eluato se concentró a sequedad. El residuo se suspendió parcialmente en THF (2 mL) y se añadió NaOH 1 N (2 mL). La solución/suspensión turbia se agitó durante 1 hora a la temperatura ambiente. Se añadió agua (15 mL) y se extrajo ésta con AcOEt (2 x 25 mL), añadiendo algo de salmuera para facilitar la separación. La fase orgánica se lavó con NaCl saturado, se secó, se filtró y se concentró a sequedad. Se añadió al residuo 20% de acetonitrilo/agua (15 mL), TFA (15-20 µl) y DMSO (1 mL). Una filtración de la mezcla fracasó, por lo que el filtro y la solución se extrajeron con DCM (2 x 60 mL). Los extractos orgánicos se concentraron para dar el producto bruto (0,14 g), LCMS: m/z: 342 (M+1).

20

25

30

Paso 4: Éster-ter-butílico del ácido 17-{3-[(2-benciloxicarboniletil)ter-butoxicarbonilamino]-propionilamino}-heptadecanoico

Se disolvió ácido 3-[(2-benciloxicarboniletil)ter-butoxicarbonilamino]-propiónico (0,17 g, 0,48 milimoles) en DMF (2 mL) y se añadieron HOBt (0,065 g, 0,48 milimoles) y EDAC (0,093 g, 0,48 milimoles). La mezcla se agitó durante 30 minutos, y se añadió DIEA (0,083 mL, 0,48 milimoles), añadiéndose después éster-ter-butílico del ácido 17-aminoheptadecanoico (0,15 g, 0,44 milimoles) disuelto en THF (3 mL) + DMF (0,5 mL). La reacción se agitó durante 2 días. Se concentró la mezcla de reacción y el residuo se disolvió en AcOEt (50 mL) y se lavó con HCl 0,2 N (2 x 15 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró a vacío. El producto se purificó por cromatografía flash (sílice) eluyendo con AcOEt/heptano (1:1, 7:3, 8:2) y a continuación DCM, DCM:metanol (8:2) y 5% de ACOH en DCM. Las fracciones apropiadas se agruparon y se concentraron a vacío. El residuo se disolvió en DCM. Se añadió sílice y el producto se concentró sobre la sílice a vacío. La sílice se utilizó en otra cromatografía flash, eluyendo con AcOEt/heptano (3:7 y 1:1). Las fracciones apropiadas se agruparon y se concentraron a vacío para dar 135 mg.

35

40

45

LCMS: m/z : 697 (M+23)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 7,31-7,41 (m, 5H), 5,12 (s, 2H), 3,48 (m, 2H) 3,21 (m, 2H), 2,60 (t, 2H), 2,20 (t, 2H), 1,57 (m, 2H), 1,45 (m, 20H), 1,25 (m-br, 24H).

Paso 5: Éster-ter-butílico del ácido 17-{3-[ter-butoxicarbonil-(2-carboxietil)-amino]-propionilamino}-heptadecanoico

Se disolvió éster-ter-butílico del ácido 17-{3-[(2-benciloxicarboniletil)-ter-butoxicarbonilamino]-propionilamino}-heptadecanoico (0,135 g, 0,2 milimoles) en THF (10 mL) en un matraz. El matraz se llenó con nitrógeno y se purgó varias veces a vacío. Se añadió Pd/C, con 10% de humedad (0,03 g) y el matraz se equipó con un balón lleno con la mezcla y se agitó durante 16 horas. La mezcla se filtró a través de Celita, eluyendo con THF. El filtrado se concentró a vacío. La TLC indicó que la reacción no era completa, por lo que el proceso se repitió dos veces más. El filtrado se concentró a vacío para dar un aceite amarillo (0,12 g).

50

55

LCMS: m/z : 607 (M+23)

Paso 6: Éster-ter-butílico del ácido 17-{3-[ter-butoxicarbonil-2-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxicarbonil)-etil]-amino}-propionilamido-heptadecanoico

Se disolvió éster-ter-butílico del ácido 17-{3-[ter-butoxicarbonil-2-carboxietil]-amino}-propionilamino}-heptadecanoico (0,122 g, 0,2 milimoles) en THF (5 mL). Se añadió DIEA (39 µl) y la mezcla se enfrió a 0°C. Se añadió TSTU (66 mg, 0,22 milimoles). La mezcla se agitó a 0°C durante 30 min, y luego durante 16 horas a la temperatura ambiente. La mezcla se concentró a vacío. Se añadió AcOEt (15 mL) y la solución se lavó con HCl 0,2 N (5 mL) y NaCl saturado

60

(5 mL), se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , y se secó a vacío. Se purificó por cromatografía flash (sílice) eluyendo con AcOEt/heptano (9:1) y AcOEt. Las fracciones apropiadas se agruparon y se concentraron a vacío para dar 58 mg. LCMS: m/z: 682 (M+1).

5 Paso 7: Insulina humana  $\text{N}^{\text{EB29}}$ -{3-[2-(16-carboxihexadecilcarbamoyl)-etilamino]-propionil}-desB30

Se disolvió insulina desB30 (126 mg, 0,022 milimoles) por adición de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  100 mM (1,5 mL) y acetonitrilo (1,5 mL) en un matraz de 10 mL con fondo redondo. Se añadió éster-ter-butílico del ácido 17-(3-{ter-butoxicarbonil-[2-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxicarbonil)-etil]-amino}-propionilamino-heptadecanoico (15 mg, 0,022 milimoles) en acetonitrilo (750  $\mu\text{l}$ ) y se añadió  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (750  $\mu\text{l}$ ), con lo que la solución final era  $\text{Na}_2\text{CO}_3/100$  nM/acetonitrilo 50:50.

10 La solución se agitó a la temperatura ambiente durante 1 hora. Se transfirió la solución a un tubo de centrifuga de 15 mL, lavando con agua Milli-Q (6 mL). La solución se enfrió sobre hielo, y el pH se ajustó a 5,1 por adición de HCl 1 N, lo que condujo a precipitación. El tubo se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos a 10°C. Se decantó el disolvente del sólido. Se añadió al sólido TFA/agua 95:5 (2,5 mL). La solución se vertió en un matraz RB, lavando con más TFA/agua 95:5 (2,5 mL). La solución se agitó durante 30 min a la temperatura ambiente, y se concentró a vacío. Se añadió DCM y se separó dos veces, y el matraz se secó a vacío a la temperatura ambiente. El producto se purificó utilizando cromatografía de intercambio iónico.

Columna: Resource Q 6 mL.

Tampón A: TRIS 15 mM, acetato de amonio 30 mM, etanol 50% v/v, pH 7,5 con AcOH.

Tampón B: TRIS 15 mM, acetato de amonio 300 mM, etanol 50% v/v, pH 7,5 con AcOH.

20

Se eluye con 4 mL/min de tampón A 2 CV, y luego con un gradiente de 0-80% tampón B sobre 12 CV.

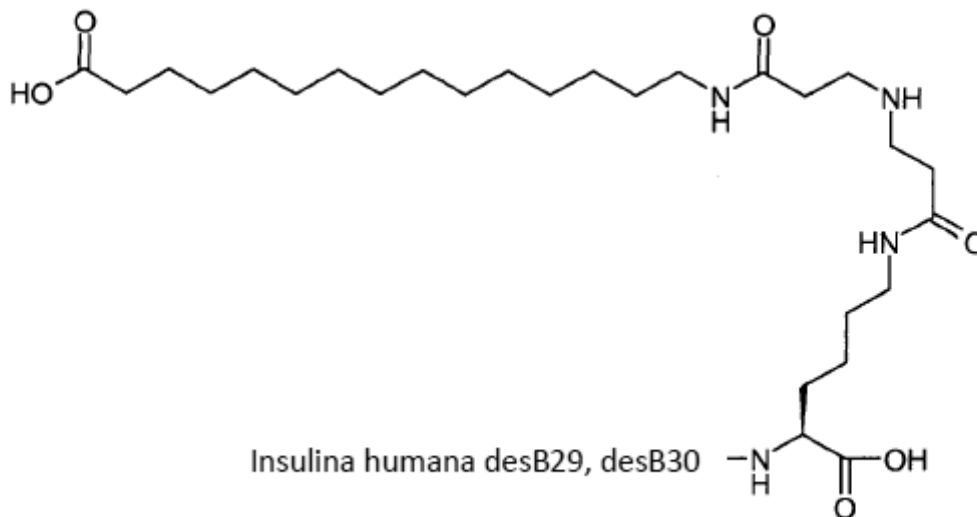
La fracción apropiada se diluyó con agua y se acidificó a pH 2, después de lo cual se cargó en una columna Resource RPC de 3 mL en etanol al 20%, TFA al 0,1% y se eluyó con etanol 50%, TFA 0,1%. Las fracciones apropiadas se agruparon, se diluyeron con agua y se liofilizaron para dar 15 mg.

25

LCMS: m/z: 1529,7 (M/4 = 1529,3).

### Ejemplo 2

30 Síntesis de insulina humana  $\text{N}^{\text{EB29}}$ -{3-[2-(2-carboxitetradecarbamoyl)-etilamino]-propionil}-desB30

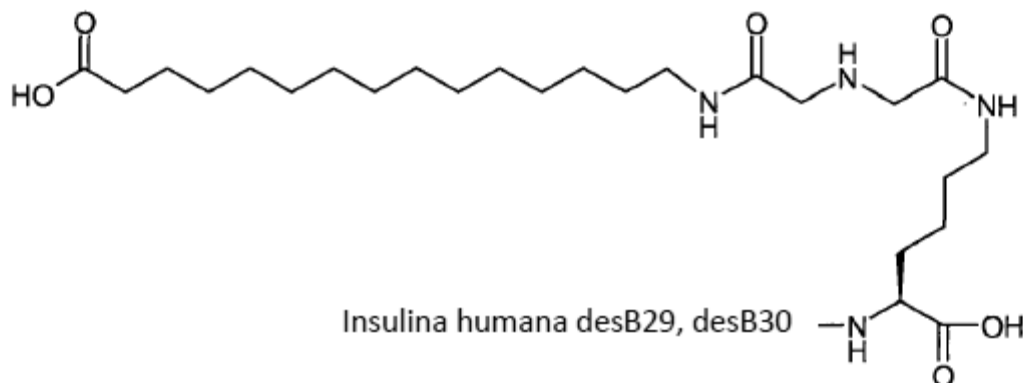


El compuesto del título se preparó de manera análoga a los métodos descritos en el Ejemplo 1, aunque el producto final se purificó utilizando HPLC preparativa (columna C18 de 2 cm de diámetro, acetonitrilo/agua/TFA al 0,1%). LCMS: 1523,3 (M/4 = 1522,3).

35

### Ejemplo 3

40 Síntesis de insulina humana  $\text{N}^{\text{EB29}}$ -(2-[[14-carboxitetradecilcarbamoyl]-metil]-amino)-acetil)desB30-



Paso 1: Ácido (ter-butoxicarbonilmetoxicarbonilmetilamino)-acético

5 Se disolvió ácido (ter-butoxicarbonilcarboximetilamino)-acético (9,5 g, 41 milimoles) en DMF, y se añadió ADAC (7,78 g, 41 milimoles). La solución se agitó a la temperatura ambiente durante 1 hora bajo nitrógeno y se añadió MeOH (1,65 mL, 41 milimoles). La mezcla se agitó durante 4 h, y se concentró a vacío. Se añadió AcOEt (150 mL), y la solución se lavó con agua (3 x 100 mL), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró a vacío para dar un aceite incoloro (9,15 g).  
 10 LCMS: m/z: 270,1 (M+23).

Paso 2: Éster-ter-butílico del ácido 15-[2-(ter-butoxicarbonil-metoxicarbonilmetil-amino)-acetilamino]-pentadecanoico

15 Se preparó éster-ter-butílico del ácido 15-aminopentadecanoico de manera análoga al éster-ter-butílico del ácido 17-aminoheptadecanoico, y se acopló a ácido (ter-butoxicarbonilmetoxicarbonilmetilamino)-acético de manera análoga al método descrito en el Ejemplo 1, Paso 4.

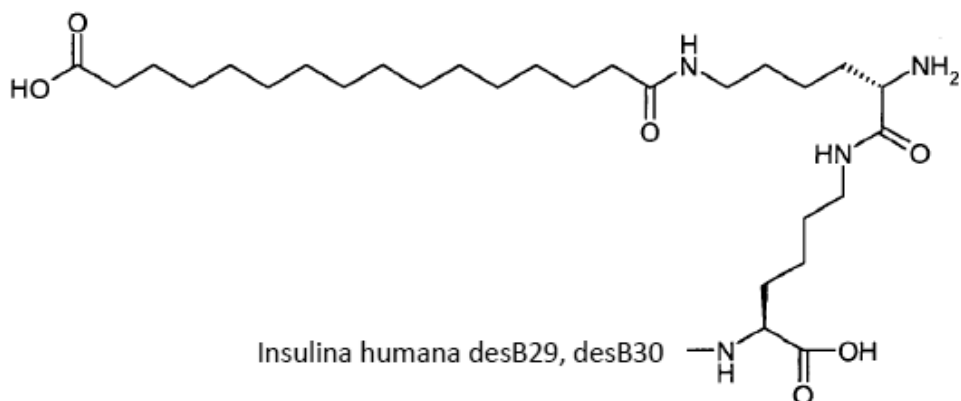
Paso 3: Éster-ter-butílico del ácido 15-[2-(ter-butoxicarbonil-carboximetil-amino)-acetilamino]-pentadecanoico

20 Se disolvió éster-ter-butílico del ácido 15-[2-(ter-butoxicarbonil-metoxicarbonilmetil-amino)-acetilamino]-pentadecanoico (0,22 g, 0,405 milimoles) en THF (5 mL) y se añadió NaOH 1N (0,405 mL). La mezcla se agitó bajo nitrógeno durante 16 horas. Se concentró la mezcla a vacío. El residuo se suspendió en AcOEt (aprox. 25 mL) y se añadieron agua (15 mL) y AcOH (3 mL). La fase orgánica se aisló y se lavó con agua (15 mL) + AcOH (1 mL), agua (15 mL) y se secó sobre sulfato de magnesio, después de lo cual se concentró a vacío.

25 Los Pasos restantes se realizaron de manera análoga a los métodos utilizados en el Ejemplo 1, y el compuesto final se purificó primeramente por HPLC preparativa y luego por cromatografía de intercambio iónico utilizando una columna Resource Q 1 mL y eluyendo desde acetato de amonio al 0,25% a acetato de amonio al 2,5% (0,24% Tris, 42,5 % etanol, pH 7,5).

**Ejemplo 4**

Síntesis de insulina humana N<sup>εB29</sup>-[(S)-2-amino-6-(15-carboxipentadecanoilamino)-hexanoil]-desB30

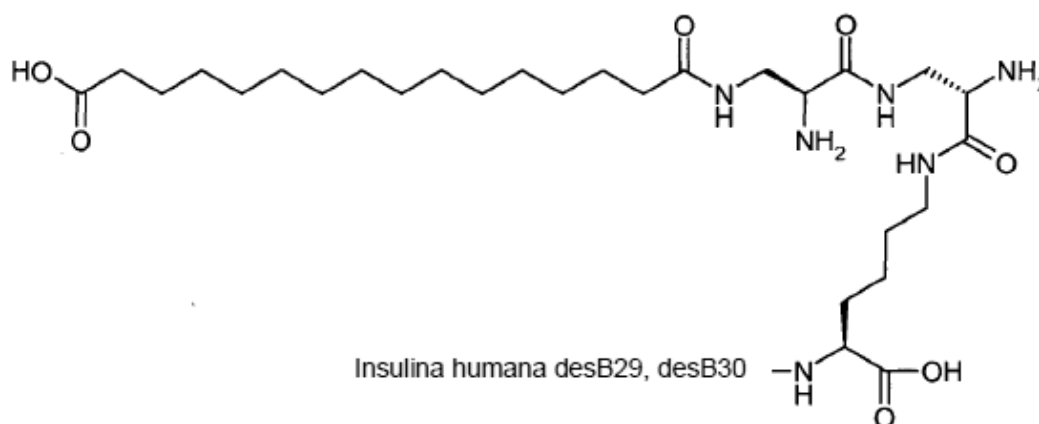


El éster-mono-ter-butílico del ácido hexadecanodioico puede activarse con TSTU de manera similar al método descrito en el Ejemplo 1, Paso 6. El producto puede hacerse reaccionar con Boc-Lys-OH en DMF a la temperatura ambiente durante 16 horas. Después de concentrar a vacío, puede añadirse AcOEt al residuo y la mezcla puede lavarse con HCl 0,2 N. La fase orgánica se seca luego sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentra a vacío para dar el producto bruto, éster-ter-butílico del ácido 15-((S)-5-ter-butoxicarbonilamino-5-carboxipentilcarbamoil)-pentadecanoico. Éste puede utilizarse sin purificación ulterior o purificarse por cromatografía flash. Este compuesto puede activarse con TSTU de manera similar al método descrito en el Ejemplo 1, Paso 6 para dar el éster-ter-butílico del ácido 15-[(S)-5-ter-butoxi-carbonilamino-5-(2,5-dioxopirrolidin-1-ilo)carbonil]-pentil-carbamoil]-pentadecanoico, y este compuesto puede acoplarse a insulina y desprotegerse para dar el compuesto del título como se describe en el Ejemplo 1, Paso 7, utilizando HPLC preparativa para aislar el producto.

### Ejemplo 5

15 Síntesis de insulina humana N<sup>εB29</sup>-[(S)-2-amino-3-[(S)-2-amino-3-(15-carboxipentadecanoilamino)-propionilamino]-propionil]-desB30

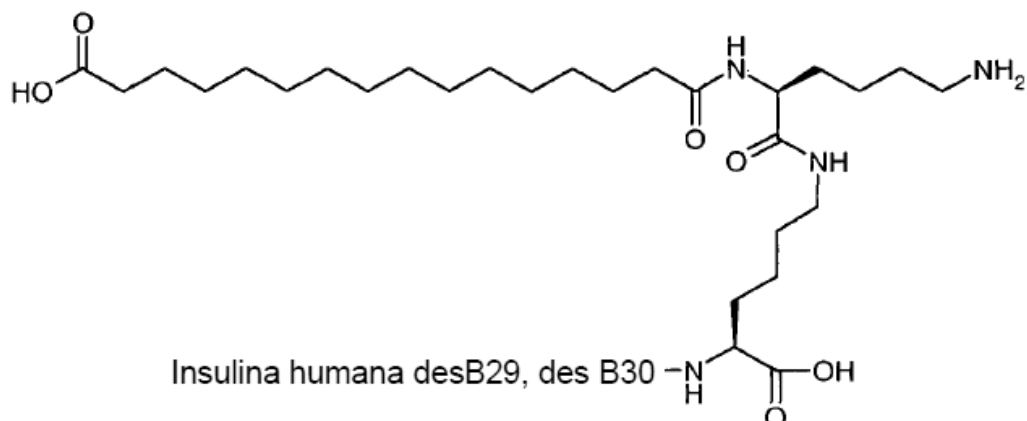
El éster-ter-butílico del ácido 15-[(S)-2-ter-butoxicarbonilamino-2-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo)carbonil]-etilcarbamoil]pentadecanoico se puede preparar de manera similar a la descrita para el éster-ter-butílico del ácido 15-[(S)-5-ter-butoxicarbonilamino-5-(2,5-dioxopirrolidin-1-ilo)carbonil]pentilcarbamoil]pentadecanoico utilizando ácido (S)-3-amino-2-ter-butoxicarbonilaminopropiónico, y éste puede hacerse reaccionar con ácido (S)-3-amino-2-ter-butoxicarbonilamino-propiónico en DMF a la temperatura ambiente durante 16 horas. Después de concentrar a vacío, puede añadirse AcOEt al residuo, y la mezcla puede lavarse con HCl 0,2 N. La fase orgánica se seca luego sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentra a vacío para dar el producto bruto, éster-ter-butílico del ácido 15-[(S)-2-ter-butoxicarbonilamino-2-((S)-2-ter-butoxicarbonilamino-2-carboxietilcarbamoil)etilcarbamoil]pentadecanoico. Éste puede utilizarse sin purificación ulterior o purificarse por cromatografía flash.



Este compuesto puede activarse con TSTU de manera similar al método descrito en el Ejemplo 1, Paso 6 para dar éster-ter-butílico del ácido 15-[(S)-2-ter-butoxicarbonilamino-2-[(S)-2-ter-butoxicarbonilamino-2-(2,5-dioxopirrolidin-1-ilo)carbonil]etilcarbamoil]etilcarbamoil]pentadecanoico, y este compuesto puede acoplarse a insulina para dar el compuesto del título como se describe en el Ejemplo 1, Paso 7 utilizando HPLC preparativa para aislar el producto.

### Ejemplo 6

Síntesis de insulina humana N<sup>εB29</sup>-[(S)-6-amino-2-(15-carboxipentadecanoilamino)-hexanoil]-desB30

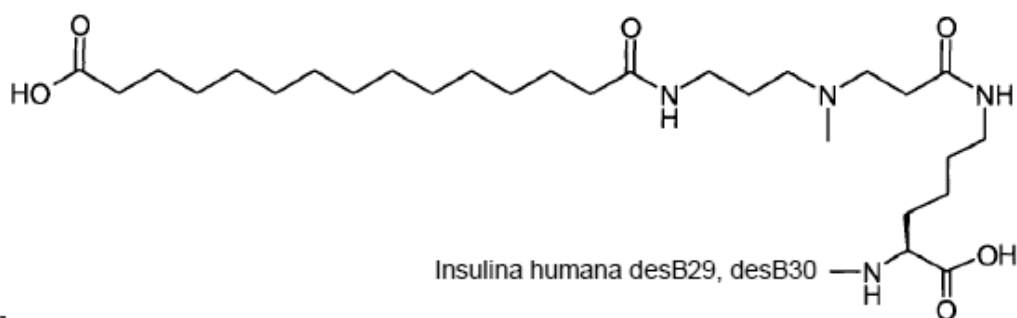


El compuesto del título puede prepararse de manera similar a los métodos utilizados en el ejemplo 4.

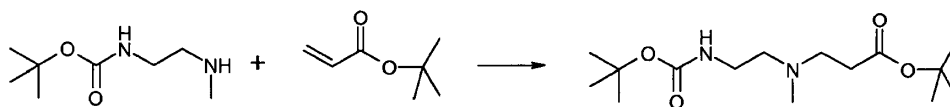
5

### Ejemplo 7

Síntesis de insulina humana N<sup>ε</sup>B<sup>29</sup>-3-[[2-(15-carboxi-pentadecanoilamino)-etil]-metil-amino]-propionil-desB30



10



15

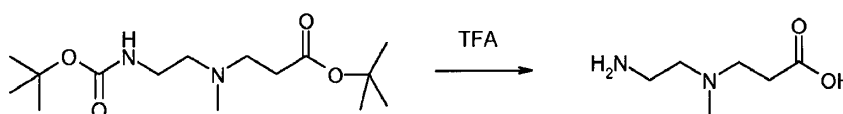
-Se disolvieron 1-Boc-amino-2-metil-amino-etano (1 g, 4,75 mmol) y acrilato de ter-butilo (0,61 g, 4,75 mmol) en etanol (10 mL) con dietilamina (1,32 mL, 9,5 mmol) y se mantuvo a reflujo durante una noche. Se evaporó el disolvente a vacío, y se aisló el éster-ter-butílico del ácido 3-(Boc-aminoetil-metil-amino)-propiónico por adición de acetato de etilo (300 mL) y lavado 2 veces con carbonato de sodio al 5%, agua y salmuera, seguido por secado sobre sulfato de magnesio y evaporación a vacío para dejar un aceite (630 mg, 44%).

20

LCMS: m/z : 303,5 (M+H)

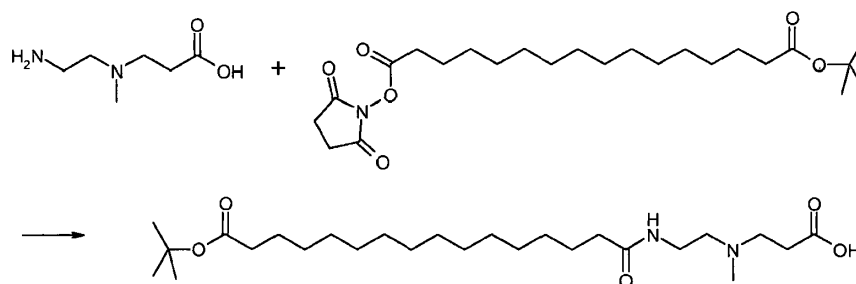
<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 5,11 (bs, 1H), 3,20 (t, 2H), 2,65 (t, 2H), 2,46 (t, 2H), 2,37 (t, 2H), 2,21 (s, 3H), 1,46 (s, 9H), 1,44 (s, 9H).

25

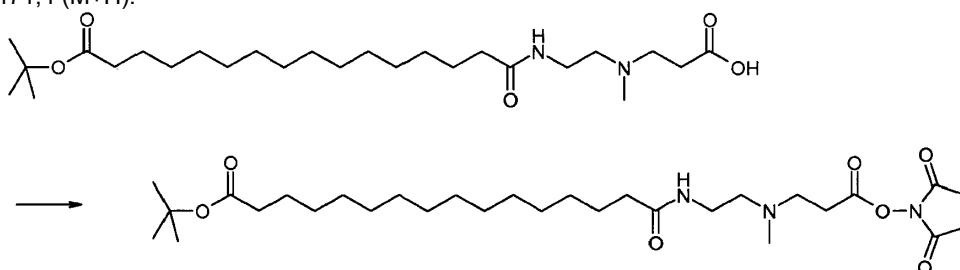


Se trató el éster-ter-butílico del ácido 3-(Boc-aminoetil-metil-amino)-propiónico (630 mg, 2,1 mmol) con ácido trifluoroacético (6 mL) durante 2 horas. Se aisló la sal de ácido trifluoroacético del ácido 3-(aminoetil-metil-amino)-propiónico por recristalización en THF para dar un polvo blanco, 974 mg (cuantitativo).





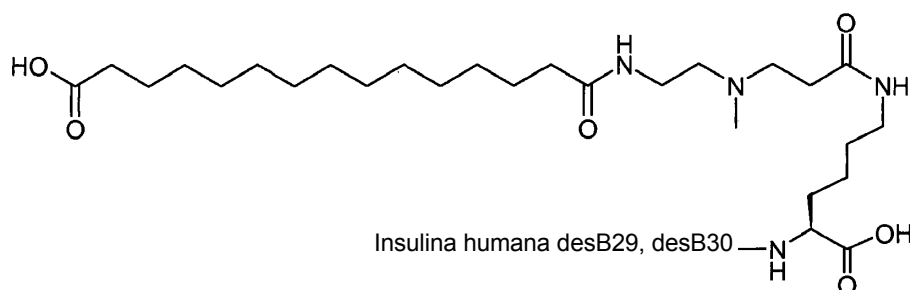
- 5 Se dejaron reaccionar durante una noche ácido 3-(aminoetil-metil-amino)-propiónico (448 mg, 1,2 mmol) y hexadecanodioato de ter-butil-succinimidilo (474 mg, 1,1 mmol) en DMF (6 mL) con trietilamina (0,53 mL, 2,0 mmol). Se evaporó el disolvente a vacío, y se aisló el ácido 3-[[2-(15-ter-butil-carboxi-pentadecanoilamino)-etil]-metil-amino]-propiónico por adición de acetato de etilo y lavado con tampón de fosfato 0,1 M de pH 4, agua y salmuera, seguido por secado sobre sulfato de magnesio y evaporación a vacío.  
LCMS: m/z: 471,4 (M+H).



- 10 Se disolvió ácido 3-[[2-(15-ter-butil-carboxi-pentadecanoilamino)-etil]-metil-amino]-propiónico (25 mg, 0,053 mmol) en tetrahidrofurano (0,3 mL) y se trató con tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-1,1,3,3-tetrametiluronio (10 mg, 0,042 mmol) y trietilamina (7,3 µl, 0,053 mmol) durante una noche. La mezcla bruta se utilizó directamente en la acilación de insulina. Se disolvió insulina humana desB30 (200 mg, 0,022 mmol) en carbonato de sodio 100 mM, pH 10,5 (1 mL) a la temperatura ambiente. El O-succinimidil-éster-del ácido 3-[[2-(15-ter-butil-carboxi-pentadecanoilamino)-etil]-metil-amino]-propiónico bruto anterior se añadió a la solución de insulina. Después de 30 min, se ajustó el pH con HCl a 5,5, y el precipitado isoelectrico se recogió por centrifugación y secó a vacío. El compuesto intermedio de insulina protegido se disolvió en TFA al 95% (3 mL), que se evaporó a vacío después de 30 minutos.
- 15 La insulina humana N<sup>εB29</sup>-3-[[2-(15-carboxi-pentadecanoilamino)-etil]-metil-amino]-propionil-desB30 se purificó por RP-HPLC en una columna C4 en tampón A: 10% MeCN en TFA al 0,1% en agua. tampón B: 80% MeCN en TFA al 0,1% en agua.  
LCMS: 1526,6 (M/4=1526,89).

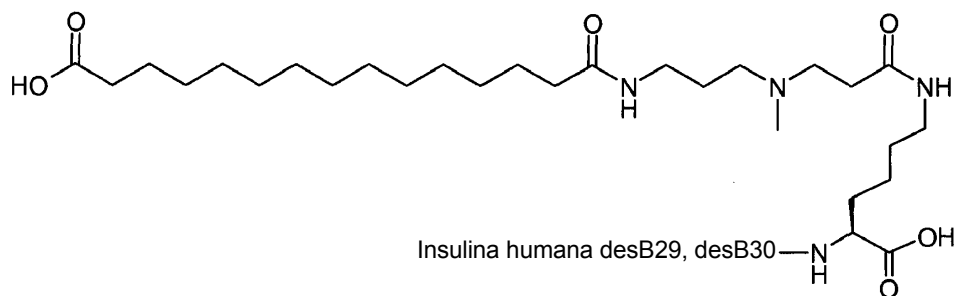
### Ejemplo 8

Síntesis de insulina humana N<sup>εB29</sup>-3-[[2-(14-carboxi-tetradecanoilamino)-etil]-metil-amino]-propionil-desB30



El compuesto se prepara como se ha descrito arriba, a partir de 1-Boc-amino-2-metil-amino-etano y acrilato de ter-butilo y pentadecanoato de ter-butil-succinimidilo.

- 45 **Ejemplo 9**  
Síntesis de insulina humana N<sup>εB29</sup>-3-[[2-(15-carboxi-tetradecanoilamino)-propyl]-metil-amino]-propionil-desB30

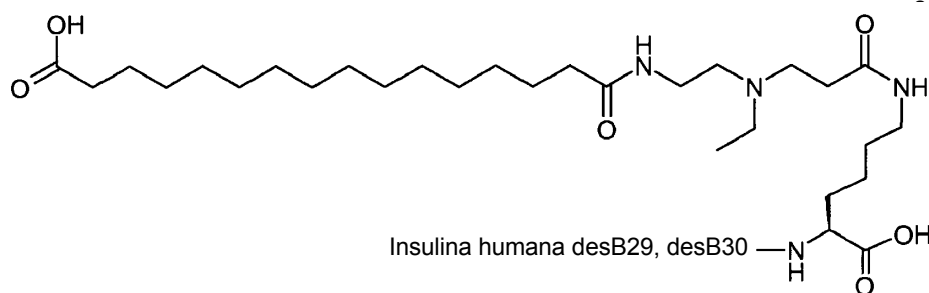


El compuesto se prepara como se ha descrito arriba a partir de 1-Boc-amino-3-metilamino-propano y acrilato de ter-butilo y succinimidil-pentadecanoato de ter-butilo.

15

**Ejemplo 10**

Síntesis de insulina humana N<sup>ε</sup>B29-3-([2-(15-carboxipentadecanoilamino)-etil]-etil-amino)-propionil-desB30



El compuesto se prepara como se ha descrito arriba a partir de 1-Boc-amino-2-amino-etano y acrilato de ter-butilo. El éster-ter-butílico intermedio del ácido 3-(Boc- aminoetil-amino)-propiónico se somete a alquilación en condiciones reductoras utilizando acetaldehído y borohidruro de sodio en metanol, seguido por reacción con succinimidil-hexadecanoato de ter-butilo protegido, activación como succinimidil-éster-y reacción con insulina como se ha descrito arriba.

35

**Ejemplo 11**

Síntesis de insulina humana N<sup>ε</sup>B29-(15-carboxi-pentadecanoil-γ-L-glutamil-(2-dimetilaminoetil-amida)-desB30

40

Se deja reaccionar Boc-L-Glu(OtBu)-OSu con 2-dimetilamino-etilamina en tetrahidrofurano y trietilamina a la temperatura ambiente durante una noche, y se trata en acetato de etilo como se ha descrito arriba. El producto, Boc-L-Glu(OtBu)-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub> se trata con ácido trifluoroacético durante 2 horas y se seca a vacío. El producto, N-Glutamil-2-dimetilaminometil-amida se hace reaccionar con hexadecanoato de ter-butil-succinimidilo, se activa como éster-de succinimidilo y se acopla a insulina humana desB30 como se ha descrito arriba.

45

**Ejemplo 12:**

Hidrofobicidad, afinidad para albúmina, autoasociación y susceptibilidad de mezcla de las insulinas de acción prolongada y acción breve

50

Análisis de las propiedades de autoasociación de los derivados de insulina de la invención

La capacidad de los derivados de insulina de la invención para autoasociarse en complejos de gran tamaño pero solubles se analiza utilizando SEC (cromatografía de exclusión por tamaños):

55

Columna:	Superose™ 6 PC 3,2/30, CV = 2,4 mL (Amerham Biosciences)
Temperatura:	37°C
Tampón SEC:	140 mM NaCl, 10 mM TrisHCl, 0,01% NaN <sub>3</sub> , pH 7,5
Volumen de inyección:	20 µl
Flujo:	0,05 mL/min
Tiempo de ejecución	60 min y equilibración de 100 min adicionales

Para este análisis, los derivados de insulina de la invención se encuentran en una solución constituida por derivado 0,6 mM, 2,1 Zn<sup>2+</sup>/hexámero, fenol 16 mM, fosfato 7 mM de pH 7,8. El tiempo de retención del derivado se compara

luego con los tiempos de retención de las moléculas estándar siguientes: azul dextrano (>5 MDa,  $K_{AV}$  0,0), tiroglobulina (669 kDa,  $K_{AV}$  0,28) Ferritina (440 kDa,  $K_{AV}$  0,39), Ovoalbúmina (44,5 kDa,  $K_{AV}$  0,56), Ribonucleasa (13,7 kDa,  $K_{AV}$  0,69) y una segunda referencia de albúmina (66 kDa,  $K_{AV}$  0,53), hexámero de Co(III)insulina (35 kDa,  $K_{AV}$  0,61), e insulina monómera X2 (6 kDa,  $K_{AV}$  0,73).

5 Para determinar el valor  $K_{AV}$  del derivado se utiliza la ecuación siguiente:

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

10 donde t es el tiempo de retención para un pico dado,  $t_0$  es el tiempo de retención para azul dextrano,  $V_t$  es el volumen total de la columna (en este caso 2,4 mL), f es el flujo (en este caso 0,04 mL/min), y  $t_d$  es el tiempo de retención para azul dextrano sin la columna en el sistema.

15 El valor  $K_{av}$  indica el grado de autoasociación de un derivado, es decir un  $K_{av}$  grande similar al  $K_{av}$  para el hexámero de Co(III)insulina y el monómero de insulina X2 exhibe poca o ninguna propensión del derivado a formar complejos grandes autoasociados, mientras que un  $K_{av}$  muy pequeño, próximo a cero o incluso negativo muestra gran propensión del derivado a autoasociación en complejos grandes solubles.

Datos de hidrofobicidad en los derivados de insulina conforme a la invención

20 La hidrofobicidad (índice de hidrofobicidad) de los derivados de insulina de la invención con relación a la insulina humana,  $k'_{rel}$ , se midió en una columna HPLC LiChrosorb RP18 (5 $\mu$ m, 250x4 mm) por elución isocrática a 40 °C utilizando mezclas de A) tampón de fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,3, que contenían 10% de acetonitrilo, y B) 50% de acetonitrilo en agua como eluyentes. La elución se monitorizó siguiendo la absorción UV del eluato a 214 nm. El tiempo en vacío,  $t_0$ , se encontró por inyección de nitrato de sodio 0,1 mM. El tiempo de retención para la insulina humana,  $t_{human}$ , se ajustó a  $2t_0$  como mínimo variando la ratio entre las soluciones A y B.  $k'_{rel} = (t_{derivado}-t_0)/(t_{human}-t_0)$ .  
 25 Valores encontrados de  $k'_{rel}$  para varios derivados de insulina conforme a la invención se dan en la Tabla 1.

Ensayo de Afinidad para Seroalbúmina Humana

30 Constante de fijación relativa del análogo 125I-TyrA14 para seroalbúmina humana inmovilizada en partículas Minileak y medida a 23 °C (detemir = 1 en tampón salino).

Susceptibilidad de mezcla de las insulinas de acción prolongada y acción breve analizadas por cromatografía de exclusión por tamaños de mezclas de insulina

35 SEC: Susceptibilidad de mezcla de Insulina Aspart (3 Zn/6 insulina, glicerol 1,6%, fenol 16 mM y m-cresol 16 mM, cloruro de sodio 10 mM, fosfato 7 mM, pH 7,4) e insulina de acción prolongada (2,1 o 6 Zn/6 insulina) 30:70, medida por recogida de fracciones de SEC (como se ha descrito arriba) y cuantificación por HPLC de la presencia de insulinas de acción prolongada y acción rápida en la fracción de peso molecular alto (fracción 2, PM > HSA) y en la fracción de peso molecular bajo (fracción 3, PM = HSA), respectivamente.

40 Se recogen 4 fracciones para el tamaño de 16 min después del retardo, de las cuales la fracción 2 [16-32 min] (pico 1) contiene la forma asociada mayor que albúmina (32 min corresponden a  $K_{AV}$  0,46) y la fracción 3 (pico 2) contiene las formas dihexamera, hexamera, dímera y monómera de insulina.

45 HPLC: Cromatografía de fase inversa en un gradiente Zorbax Eclipse XDB-C18 2,1\*15 mm (1,8  $\mu$ m) eluido con tampón A: sulfato de sodio 0,2 M, fosfato de sodio 0,04 M, acetonitrilo 10 %, pH 7,2 y tampón B: acetonitrilo 70 % a 30 °C, 19-34 % B in 4,5 min. lineal, condición inicial repentina a los 5 min., tiempo de ejecución de 7 min., flujo de 0,5 mL/min., volumen de inyección de 14  $\mu$ L y detección UV a 276 nm utilizando como referencia Insulina Aspart de 609  $\mu$ M para ambos análogos.

50

Compuesto	Hidrofobicidad relativa a insulina humana	Afinidad para el receptor de insulina relativa a insulina humana	Afinidad para seroalbúmina humana relativa a insulin-detemir	Autoasociación: $K_{av}$ (% área del pico)
Ejemplo 1	18	17%	14	0,03 (88)
Ejemplo 2	5,3	34%	2,1	0,29 (36)
Ejemplo 3	2,4	28%	2,3	0,15(77)
Ejemplo 7	4,2	31%	-	-

Leyendas de la Tabla:

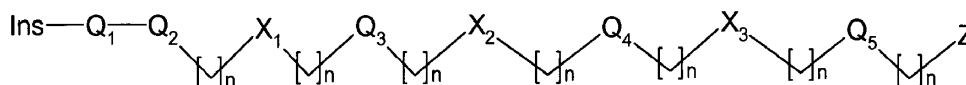
$K_{av}$  = 0,55 para seroalbúmina humana,  $K_{av}$  = 0,63 para el hexámero de Co(III) insulina humana

$K_{av}$  = 0,72 para el análogo X2 de insulina monómera

n.a. = no analizado.

REIVINDICACIONES

1. Un derivado de insulina que tiene una fórmula



5

en donde Ins es un resto de insulina parental y  $\text{Q}_1-\text{Q}_2-\left[\text{CH}_2\right]_n-\text{X}_1-\left[\text{CH}_2\right]_n-\text{Q}_3-\left[\text{CH}_2\right]_n-\text{X}_2-\left[\text{CH}_2\right]_n-\text{Q}_4-\left[\text{CH}_2\right]_n-\text{X}_3-\left[\text{CH}_2\right]_n-\text{Q}_5-\left[\text{CH}_2\right]_n-\text{Z}$  es un sustituyente y donde la Ins está unida al sustituyente por un enlace amídico entre el grupo  $\alpha$ -amino del residuo aminoácido N-terminal de la cadena B de Ins o un grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo Lys presente en la cadena A o B de Ins y un grupo CO en  $\text{Q}_1$  o  $\text{Q}_2$  del sustituyente;

10

cada n es independientemente 0, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6;

$\text{Q}_1$  es:

15

- un residuo de aminoácido, residuo que forma, con su grupo ácido carboxílico, un grupo amida junto con el grupo  $\alpha$ -amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B de Ins o junto con el grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo Lys presente en la cadena A o B de Ins, o

20

- una cadena compuesta de dos, tres o cuatro residuos de  $\alpha$ -aminoácido como se ha especificado arriba unidos entre sí por enlaces amídicos, cadena que está enlazada - por un enlace amídico - al grupo  $\alpha$ -amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B de Ins o al grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo Lys presente en la cadena A o B de Ins, o
- un enlace

25

$\text{Q}_2$  es:

$-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-$ , o  $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ ;

30

$\text{Q}_3$  es:

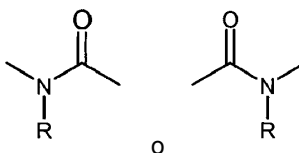
$-(\text{CH}_2)_m-$  donde m es 12, 13, 14, 15 ó 16;

35

$\text{X}_1$  puede ser:

- O;
- $-\text{C}=\text{O}$ ;
- un enlace;
- NCOR1, donde R1 puede ser H,  $-\text{CH}_3$  o  $-(\text{CH}_2)_{1-6}-\text{CH}_3$ ; o
- 

40



donde R es hidrógeno,  $\text{C}_{1-3}$ -alquilo,  $\text{C}_{2-3}$ -alquenilo o  $\text{C}_{2-3}$ -alquinilo;

45

$\text{Q}_4$ ,  $\text{Q}_5$ ,  $\text{X}_2$  y  $\text{X}_3$  son enlaces y todos los n son cero,

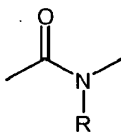
y

Z es:

$-\text{COOH}$ .

50

2. Derivado de insulina conforme a la reivindicación 1, en el que  $\text{Q}_1$  es un enlace.
3. Derivado de insulina conforme a las reivindicaciones 1-2, en el que  $\text{X}_1$  es



donde R es hidrógeno.

4. Derivado de insulina conforme a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sustituyente está  
5 unido al grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo Lys presente en la cadena A o B de la insulina parental.
5. Derivado de insulina conforme a las reivindicaciones 1-4, en el que el sustituyente está unido al grupo  $\epsilon$ -  
amino del residuo Lys en posición B29 presente en la cadena B de la insulina parental.
- 10 6. Derivado de insulina conforme a las reivindicaciones 1-5, en el que la insulina parental es un análogo de  
insulina.
7. Derivado de insulina conforme a las reivindicaciones 1-6, en el que el residuo de aminoácido en la posición  
15 B30 de la insulina parental es Lys o se ha deletado.
8. Derivado de insulina conforme a las reivindicaciones 1-7, en el que el sustituyente está unido al grupo  $\epsilon$ -  
amino del residuo Lys en posición B29 en la insulina humana desB30.
9. Derivado de insulina conforme a las reivindicaciones 6-8, en el que la insulina parental es insulina humana  
20 AspB28, insulina humana GlyA21 o insulina humana GlyA21-desB30, insulina humana GlyA21ArgB31ArgB32, insu-  
lina humana LysB28ProB29, insulina humana ThrB29LysB30 o insulina humana LysB3GluB29.
10. Un complejo de cinc de un derivado de insulina conforme a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores  
25 en el que están combinados 2 iones cinc, 3 iones cinc, 4 iones cinc, 5 iones cinc, 6 iones cinc, 7 iones cinc, 8 iones  
cinc, 9 iones cinc o 10 iones cinc por 6 moléculas de derivado de insulina.
11. Una composición farmacéutica para uso como medicamento para el tratamiento de la diabetes en un paciente  
30 que se encuentra en necesidad de dicho tratamiento, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un  
derivado de insulina conforme a las reivindicaciones 1-9.
12. Una composición farmacéutica conforme a la reivindicación 11, en la que la composición comprende  
excipientes farmacéuticamente aceptables.
13. Una composición farmacéutica conforme a las reivindicaciones 11-12, en la que la composición comprende  
35 adicionalmente un análogo de insulina que tiene un comienzo de acción rápido.
14. Una composición farmacéutica conforme a la reivindicación 13, en la que el análogo de insulina de acción  
rápida se selecciona del grupo constituido por insulina humana AspB28; insulina humana LysB28ProB29 e insulina  
humana LysB3GluB29.