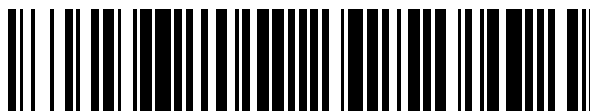


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 304**

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: **15.08.2008 E 08803059 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 2178912**

54 Título: **Análogos de la insulina que contienen una fracción acilo y alquilenglicol**

30 Prioridad:

**15.08.2007 EP 07114386**

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

**15.10.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MADSEN, PETER;  
KJELDSSEN, THOMAS BØRGLUM;  
HOEG-JENSEN, THOMAS;  
TAGMOSE, TINA MØLLER;  
JAKOBSEN, PALLE;  
KODRA, JÁNOS TIBOR;  
GARIBAY, PATRICK WILLIAM y  
GRAM, DORTE XENIA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 548 304 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

Análogos de la insulina que contienen una fracción acilo y alquilenglicol

### Campo de esta invención

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

### 5 Antecedentes de esta invención

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

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

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

25 La solicitud de patente internacional que tiene el número de publicación WO 2007/096431 que fue publicada el 30 de agosto de 2007 (Novo Nordisk A/S) describe insulinas que tienen la cadena lateral compleja sin porciones alquilenglicol. La solicitud de patente internacional con el número de publicación WO 2006/- 082205 (Novo Nordisk A/S) describe insulinas que tienen una cadena lateral compleja unida a un aminoácido en la cadena B. De acuerdo con la reivindicación 1, US 6,444,641 B1 se refiere a un análogo ácido graso-acilado de la insulina que consiste en un análogo de la insulina que está unido a una cadena acilo graso mediante un enlace amida, donde dicho análogo 30 graso de la insulina tiene un punto isoeléctrico que es superior al punto isoeléctrico de la insulina. De acuerdo con la reivindicación 1, WO 2006/082205 (Novo Nordisk A/S) se refiere a derivados de la insulina que tienen una cadena lateral unida a un grupo  $\alpha$ -amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B o a un grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la molécula de insulina original. Pharm. Res. 21 (2004), 1498-1504, se ocupa de los mecanismos de protracción de la insulina detemir.

### 35 Definiciones

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

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

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

5 En este documento, la expresión 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 al residuo de aminoácido A21. Preferentemente, los residuos de aminoácidos agregados y/o sustituidos son residuos de aminoácidos codificables. Por ejemplo, la cadena A puede ser extendida en su extremo C-terminal, por ejemplo, mediante 1, 2, 3 o 4 residuos de aminoácidos (en comparación con la insulina humana) cuyas posiciones se indican como A22, A23, A24 y A25, respectivamente. Aun cuando el análogo de la insulina tenga una extensión en la posición A21/A22, puede haber eliminaciones en otras posiciones de dicho análogo de la insulina. Similarmente a la insulina humana, en el análogo de la insulina de esta invención, el residuo de aminoácido A21 está unido a un residuo de Cys en la posición 20 donde dicho residuo de Cys participa en la formación de un puente disulfuro intercatenario. En este documento, también se usa la expresión insulina original o análogo de la insulina original para el análogo de la insulina. Principalmente, el término original se usa para diferenciarla de un análogo de la insulina que tiene una cadena lateral que, por ejemplo, puede ser introducida químicamente por acilación.

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

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

La numeración de las posiciones en los análogos de la insulina y las cadenas A y B se hace de manera que el compuesto original sea la insulina humana con la numeración utilizada para ésta.

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

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

35 Con insulina de acción rápida o insulina en bolo se quiere dar a entender una insulina que tiene un inicio de acción rápido similar o más rápido que el de la insulina humana regular y/o una duración de la acción similar o ligeramente mayor que la de la insulina humana regular.

Con insulina de acción prolongada o insulina basal se quiere dar a entender una insulina que tiene una duración de acción más prolongada que la insulina humana normal o regular.

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

45 Un polipéptido con afinidad por el receptor de la insulina y el receptor IGF-1 es un polipéptido capaz de interactuar con el receptor de la insulina y un receptor IGF-1 humano en un ensayo de unión adecuado. Dichos ensayos de receptores son bien conocidos en el área y se describen con más detalle en los ejemplos. Los análogos de la insulina acilados de esta invención no se unirán al receptor IGF-1 o tendrán una afinidad más bien baja por

dicho receptor. Más precisamente, los análogos de la insulina acilados de esta invención tendrán una afinidad por el receptor IGF-1 de prácticamente la misma magnitud o menor que la de la insulina humana.

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

Las abreviaturas siguientes se usaron en la memoria y los ejemplos: Da es Dalton (peso molecular), kDa es kilo-Dalton (= 1000 Da), PM es peso molecular, OSu es 1-succinimidiloxi = 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo, RT es temperatura ambiente, SA es ácido sinapínico y Su es 1-succinimidilo = 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo, DCM es diclorometano, DIEA (y DIPEA) es *N,N*-diisopropiletilamina, TSTU es tetrafluoroborato de *N,N,N',N'*-tetrametil-*O*-(*N*-succinimidil)uronio, Tris es tris(hidroxi-metil)aminometano, CV es volumen de la columna, NMP es *N*-metilpirrolidin-2-ona, OTBU es *tert*-butoxi, OEG es el aminoácido ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico, HSA es seroalbúmina humana, TNBS es ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico, HOBT (O HOBt) es 1-hidroxibenzotriazol, HOAt es 1-hidroxi-7-azabenzotriazol, NaOH es hidróxido de sodio, DMF es *N,N*-dimetilformamida, THF es tetrahidrofurano, TFA es ácido trifluoroacético, mmol es milimoles, Fmoc es fluoren-9-ilmetoxicarbonilo, OEG es ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico (o un residuo de éste), gGlu (en este documento también se designa  $\gamma$ Glu) es ácido gamma-glutámico, y en el ejemplo 48, por conveniencia, se usan las anotaciones siguientes para especificar la secuencia de fracciones acilo de las insulinas de la invención y del estado anterior de la técnica: C18 octadecanodioilo, C20 es eicosanodioilo, gGlu es ácido gamma-glutámico, PEG3 es ácido 3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi}-etoxi)propiónico, PEG5 es ácido 3-{2-[2-(2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi)etoxi]etoxi}-etoxi)propiónico y PEG7 es ácido 3-[2-(2-[2-(2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi)etoxi]etoxi)-etoxi]etoxi]propiónico (las estructuras/secuencias completas se pueden encontrar en los ejemplos).

### Objetivos de esta invención

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

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

Otro objetivo de la invención es proporcionar derivados de la insulina, que se puedan utilizar como insulinas de rápida acción.

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

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

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

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

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

Otro objetivo de esta invención es proporcionar derivados de la insulina que tengan una menor tendencia que la

insulina humana a dar lugar a condiciones hipoglucémicas.

Otro aspecto de esta invención es encontrar insulinas que tengan una estabilidad física satisfactoria, especialmente después de 2 años de almacenamiento.

5 Otro aspecto de esta invención es encontrar insulinas que tengan una estabilidad química satisfactoria, especialmente después de 2 años de almacenamiento.

Otro aspecto de esta invención es encontrar insulinas que tengan una estabilidad proteolítica satisfactoria, especialmente después de 2 años de almacenamiento.

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

### Resumen de esta invención

10 En resumen, esta invención se refiere a un análogo de la insulina acilado donde dicho análogo de la insulina contiene un residuo de aminoácido unido al extremo C terminal del residuo de aminoácido A21 o un residuo peptídico de hasta 4 residuos de aminoácidos unido al extremo C terminal del residuo de aminoácido A21, caracterizado porque una fracción acilo que contiene una fracción alquilenglicol está unida a un residuo de lisina en la posición A22 o unida a un residuo de lisina presente en el residuo peptídico unido al extremo C terminal del residuo de aminoácido A21. Por consiguiente, el análogo de la insulina contiene un aminoácido en la posición A22.

Se encontró sorprendentemente que las insulinas de la invención (análogos de la insulina acilados que contienen una o más porciones alquilenglicol) poseen mayor afinidad de unión al receptor de la insulina que los análogos de la insulina acilados similares sin porciones alquilenglicol, cuando se mide en ensayos de unión al receptor de la insulina conducidos en altas concentraciones de HSA (seroalbúmina humana), por ej. 4.5% de HSA.

### 20 Descripción de las realizaciones preferidas

Sorprendentemente, los análogos de la insulina acilados de esta invención muestran una buena biodisponibilidad y elevada afinidad por el receptor de unión a la insulina en presencia de altas concentraciones de HSA.

25 El análogo de la insulina presente en un análogo de la insulina acilado según esta invención puede ser ilustrado formalmente como insulina humana que tiene un residuo de aminoácido unido C-terminalmente al residuo de aminoácido en la posición A21 o como insulina humana que tiene un residuo peptídico de hasta 4 residuos de aminoácidos unido C-terminalmente al residuo de aminoácido en la posición A21 y, opcionalmente, en el que uno o más de los residuos de aminoácidos en las posiciones A1-A21 y B1-B30 han sido eliminados o sustituidos por otro residuo de aminoácido. Según la nomenclatura, el residuo de aminoácido unido al residuo de aminoácido en la posición A21 está en la posición A22. Análogamente, los residuos de aminoácidos presentes en el residuo peptídico unido al residuo de aminoácido en la posición A21 están en las posiciones A22, A23, A24 o A25.

30 Los análogos de la insulina acilados de esta invención pueden, formalmente, ser preparados a partir de un análogo de la insulina y una fracción acilo que contiene alquilenglicol que tiene la fórmula colectiva (I):  $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p\text{-}$ , en la que Acy, AA1, AA2, AA3, n, m y p son los definidos en este documento, por ej., eliminando formalmente un átomo de hidrógeno de un grupo amino del análogo de la insulina y uniendo la cadena lateral de fórmula (I) en ese lugar.

35 En los análogos de la insulina acilados de esta invención, la fracción acilo que contiene alquilenglicol de fórmula (I) se une a un residuo de lisina en una posición que está en el lado o extremo C terminal del residuo de aminoácido A21. Por ejemplo, la fracción acilo que contiene alquilenglicol de fórmula (I) se puede unir a un residuo de lisina en la posición A22. Si la fracción acilo que contiene alquilenglicol de fórmula (I) se une a un residuo peptídico que está unido al residuo de aminoácido en la posición A21, la fracción acilo que contiene alquilenglicol de fórmula (I) se une

a un residuo de lisina en cualquiera de las posiciones A22, A23, A24 o A25.

Como se mencionó en este documento, el grupo acilo presente en la fórmula  $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$ , se origina a partir de un ácido graso o un diácido graso.

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

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

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

El residuo de aminoácido ácido denominado AA2 es un aminoácido con un peso molecular de hasta aproximadamente 200 Da que contiene dos grupos ácido carboxílico y un grupo amino primario o secundario.

20 El residuo de aminoácido neutro que contiene alquilenglicol denominado AA3 es una fracción alquilenglicol, opcionalmente una fracción oligo- o polialquilenglicol que contiene una funcionalidad ácido carboxílico en un extremo y una funcionalidad grupo amino en el otro extremo.

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

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

Como se menciona en este documento, las uniones entre las fracciones Acy, AA1, AA2 y/o AA3 son enlaces amida ( $-\text{CONH}-$  donde  $-\text{CO}-$  se origina a partir de una de las fracciones Acy, AA1, AA2 y AA3 y  $-\text{NH}-$  se origina a partir de una de las fracciones AA1, AA2 y AA3).

### 35 Realizaciones preferidas de la invención.

40 En una realización, la insulina original de la invención puede, aparte de la lisina en la posición A22 y aparte de cualquier residuo peptídico de hasta 4 aminoácidos unido C terminalmente al residuo de aminoácido A21 y aparte de las mutaciones B29R y/o desB30, comprender una o más de las mutaciones siguientes. En este documento, se indica primero la posición en la cadena A o B, y después, se indican el posible o los posibles residuos de aminoácidos como códigos de una letra. En una realización, hay 5 mutaciones, en otra realización, hay 4 mutaciones, en otra realización, hay 3 mutaciones, en otra realización, hay 2 mutaciones, en otra realización, hay 1 mutación y en otra realización, no hay ninguna mutación, aparte de la lisina en la posición A22 y aparte de cualquier residuo peptídico de hasta 4 aminoácidos unido C terminalmente al residuo de aminoácido A21 y aparte de las

mutaciones B29R y/o desB30:

A4: A o Q.

A5: L.

A8: R, N, Q, E, H, L o W.

5 A9: R o L.

A14: E o D.

A15: A o T.

A16: M.

A17: D o F.

10 A18: R, L, I, D o V.

A21: G o A.

B3: A, R, H, I, L, M, F, W, Y, S o T.

B10: D o E.

B25: Y, H o desB25.

15 B26: Q, E, S o desB26.

B27: H, L, M, W o Y.

B28: D o E.

En otra realización preferida la insulina original de la invención contiene las mutaciones A4A o A4Q.

En otra realización preferida la insulina original de la invención contiene la mutación A5L.

20 En otra realización preferida la insulina original de la invención contiene la mutación A8L, A8N, A8Q, A8E, A8H, A8L o A8W. En otra realización preferida la insulina original de la invención contiene la mutación A8H.

En otra realización preferida la insulina original de la invención contiene la mutación A9R o A9L. En otra realización preferida la insulina original de la invención contiene la mutación A9L.

## ES 2 548 304 T3

En otra realización preferida la insulina original de la invención contiene la mutación A14E o A14D.

En otra realización preferida la insulina original de la invención contiene la mutación A15A o A15T.

En otra realización preferida la insulina original de la invención contiene la mutación A16M.

En otra realización preferida la insulina original de la invención contiene la mutación A17D o A17F.

- 5 En otra realización preferida la insulina original de la invención contiene la mutación A18R, A18L, A18I, A18D o A18V. En otra realización preferida la insulina original de la invención contiene la mutación A18L o A18V. En otra realización preferida la insulina original de la invención contiene la mutación A18I.

En otra realización preferida la insulina original de la invención contiene la mutación A21G o A21A.

- 10 En otra realización preferida la insulina original de la invención contiene la mutación B3A, B3R, B3H, B3I, B3L, B3M, B3F, B3W, B3Y, B3S o B3T.

En otra realización preferida la insulina original de la invención contiene la mutación B10D o B10E.

En otra realización preferida la insulina original de la invención contiene la mutación B25Y, B25H o desB25.

En otra realización preferida la insulina original de la invención contiene la mutación B26Q, B26E, B26S o desB26.

- 15 En otra realización preferida la insulina original de la invención contiene la mutación B27H, B27L, B27M, B27W o B27Y. En otra realización preferida la insulina original de la invención contiene la mutación B27W o B27Y.

En otra realización preferida la insulina original de la invención contiene la mutación B28D o B28E.

En otra realización preferida la insulina original de la invención contiene la mutación A21Q, B1Q, desB1, B3Q, B3S, B3T, B13Q o desB27.

- 20 Los ejemplos específicos no limitantes de los análogos de la insulina original que pueden estar presentes en los análogos de la insulina acilados de esta invención comprenden los siguientes, en los que se indican las desviaciones de la insulina humana:

A22K, B29R, desB30
A14E, A22K, B25H, B29R, desB30
A8H, A22K, B29R, desB30
A18L, A22K, B29R, desB30



# ES 2 548 304 T3

A18I, A22K, B29R, desB30

A18D, A22K, B29R, desB30

A5L, A22K, B29R, desB30

A8H, A18L, A22K, B29R, desB30

A8H, A18L, A22K, B10E, B29R, desB30

A5L, A8H, A17D, A18L, A22K, B10E, B29R, desB30

A8H, A22K, B10E, B29R, desB30

A5L, A8H, A17D, A22K, B10E, B29R, desB30

A22K, B27Y, B29R, desB30

A9L, A22K, B29R, desB30

A4A, A22K, B29R, desB30

A4Q, A22K, B29R, desB30

A16L, A22K, B29R, desB30

A17F, A22K, B29R, desB30

A17D, A22K, B29R, desB30

A18V, A22K, B29R, desB30

A22K, B10D, B29R, desB30

A22K, B10E, B29R, desB30

# ES 2 548 304 T3

A22K, B27W, B29R, desB30

A22K, B27Y, B29R, desB30

A22K, B28E, B29R, desB30

A22K, B27Y, B28E, B29R, desB30

A8H, A22K, B28E, B29R, desB30

A22K, desB26, B28E, B29R, desB30

A22K, desB25, B29R, desB30

A22K, desB26, B29R, desB30

A22K, B28E, B29R, desB30

A22K, B28D, B29R, desB30

A9L, A22K, B28E, B29R, desB30

A4A, A22K, B28E, B29R, desB30

A4Q, A22K, B28E, B29R, desB30

A5L, A22K, B28E, B29R, desB30

A16L, A22K, B28E, B29R, desB30

A17F, A22K, B28E, B29R, desB30

A17D, A22K, B28E, B29R, desB30

A18V, A22K, B28E, B29R, desB30

# ES 2 548 304 T3

A22K, B10D, B28E, B29R, desB30

A22K, B10E, B28E, B29R, desB30

A22K, B27W, B28E, B29R, desB30

A22G, A23K, B29R, desB30

A22G, A23G, A24K, B29R, desB30

A22G, A23G, A24G, A25K, B29R, desB30

A21Q, A22G, A23G, A24K, B29R, desB30

A21G, A22G, A23G, A24K, B29R, desB30

A21Q, A22G, A23G, A24G, A25K, B29R, desB30

A21G, A22G, A23G, A24G, A25K, B29R, desB30

A21G, A22K, B29R, desB30 insulina humana

A21G, A22G, A23K, B29R, desB30

A21G, A22G, A23G, A24K, B29R, desB30

A21G, A22G, A23G, A24G, A25K, B29R, desB30

A21Q, A22K, B29R, desB30

A21Q, A22G, A23K, B29R, desB30

A21Q, A22G, A23G, A24K, B29R, desB30

A21Q, A22G, A23G, A24G, A25K, B29R, desB30

# ES 2 548 304 T3

A14E, A21Q, A22K, B25H, B29R, desB30

A14E, A21G, A22K, B25H, B29R, desB30

A14E, A21Q, A22G, A23K, B25H, B29R, desB30

A14E, A21G, A22G, A23K, B25H, B29R, desB30

A14E, A21Q, A22G, A23G, A24K, B25H, B29R, desB30

A14E, A21G, A22G, A23G, A24K, B25H, B29R, desB30

A14E, A21Q, A22G, A23G, A24G, A25K, B25H, B29R, desB30

A14E, A21G, A22G, A23G, A24G, A25K, B25H, B29R, desB30

A22K, B3Q, B29R, desB30

A22K, B3S, B29R, desB30

A22K, B3T, B29R, desB30

A22K, B1Q, B29R, desB30

A18Q, A22K, B29R, desB30

A22K, desB1, B3Q, B29R, desB30

A22K, B28D, B29R, desB30

A22K, desB27, B28E, B29R, desB30

A22K, B28R, desB29, desB30

A22K, B3Q, B28E, B29R, desB30

A22K, B13Q, B29R, desB30

A22K, desB1, B29R, desB30

A21Q, A22G, A23K, B29R, desB30

A21Q, A22G, A23G, A24K, B29R, desB30

A21Q, A22G, A23G, A24G, A25K, B29R, desB30

A21A, A22K, B29R, desB30

A21A, A22G, A23K, B29R, desB30

A21G, A22G, A23K, B29R, desB30

A21A, A22G, A23G, A24K, B29R, desB30

A21G, A22G, A23G, A24K, B29R, desB30

A21G, A22G, A23G, A24G, A25K, B29R, desB30

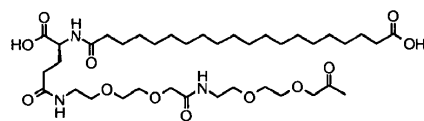
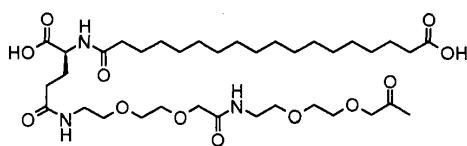
A21A, A22G, A23G, A24G, A25K, B29R, desB30

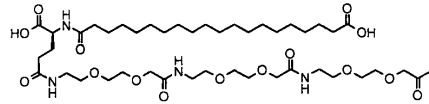
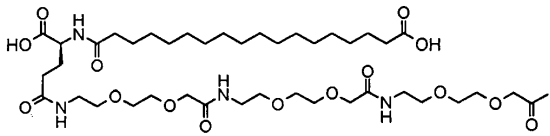
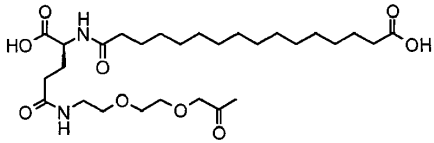
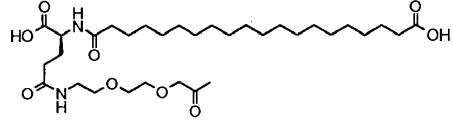
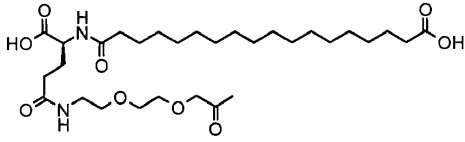
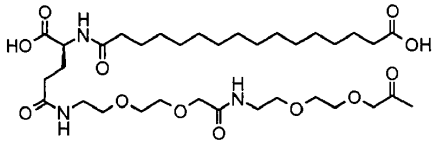
A21Q, A22K, B3Q, B29R, desB30

A21A, A22K, B3Q, B29R, desB30

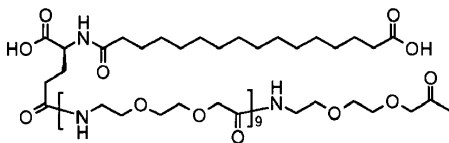
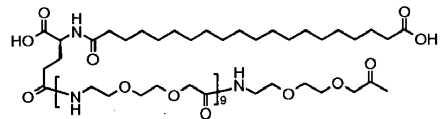
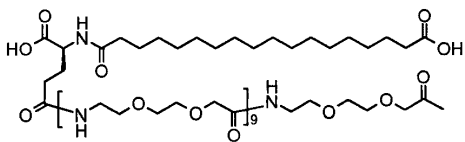
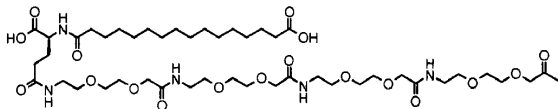
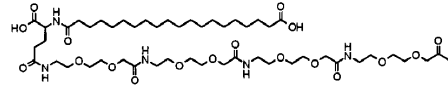
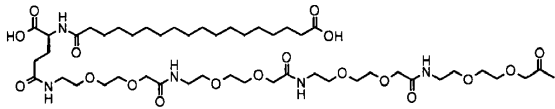
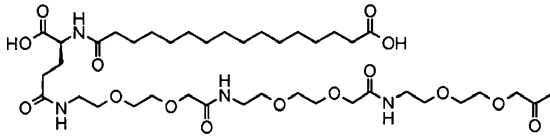
A21G, A22K, B3Q, B29R, desB30

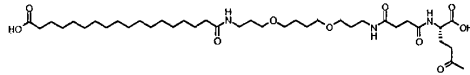
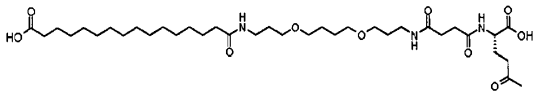
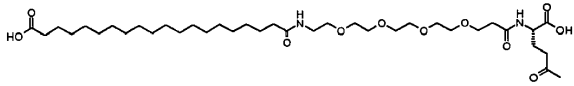
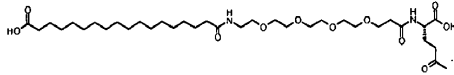
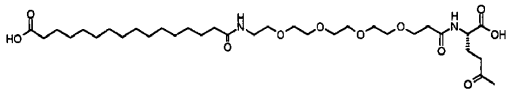
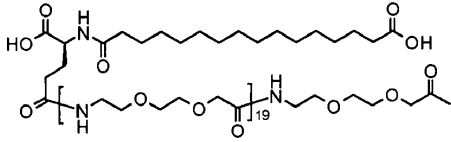
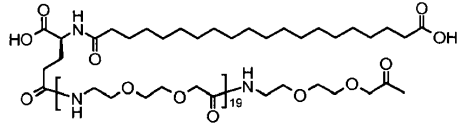
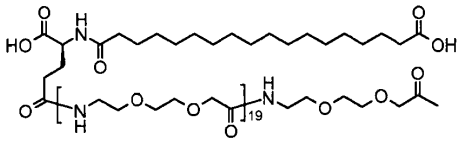
Los ejemplos específicos no limitantes de las fracciones acilo de fórmula  $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$  que pueden estar presentes en los análogos de la insulina acilados de esta invención son los siguientes:



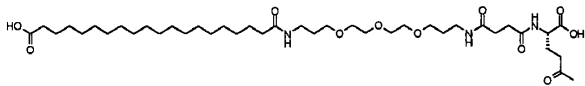
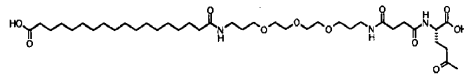
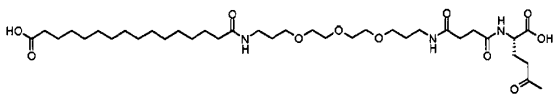
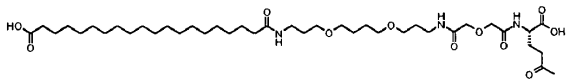
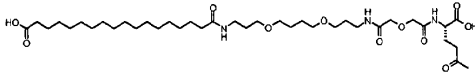
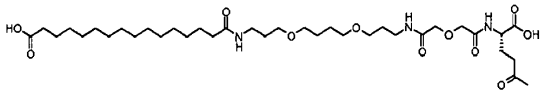
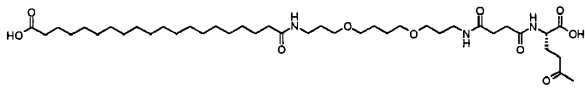


5

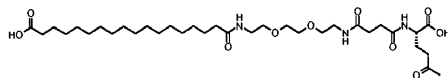
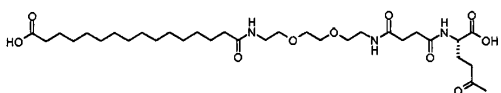


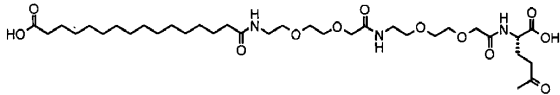
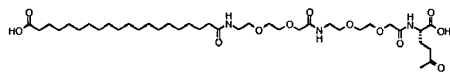
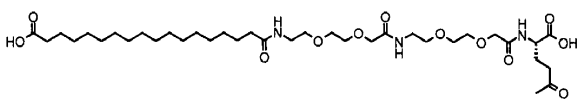
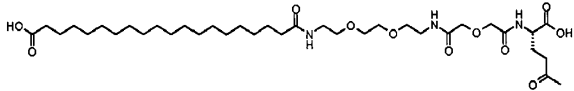
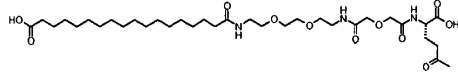
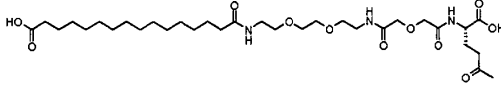
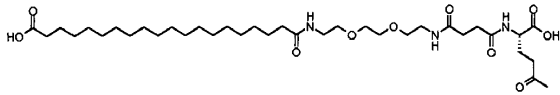


5

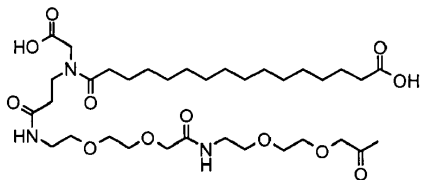
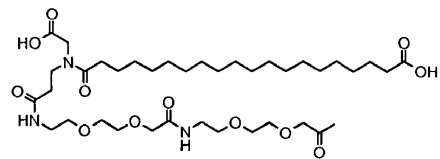
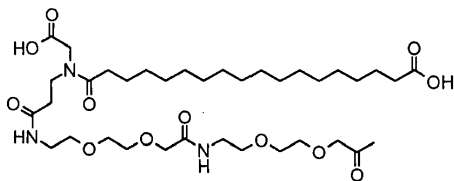
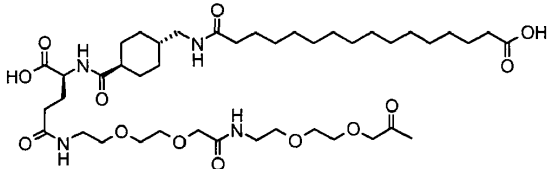
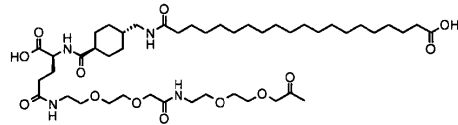
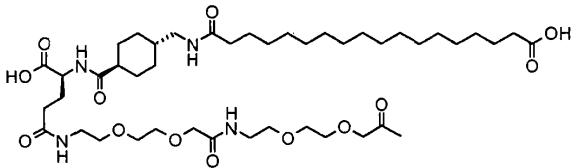


10



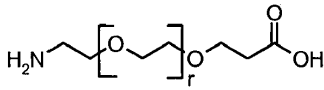
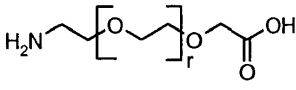
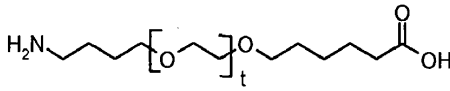
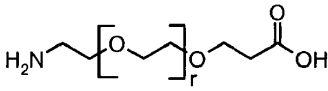
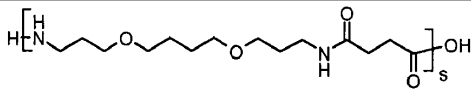


5



10 En una realización, la fracción denominada AA3 se elige entre los compuestos siguientes de los cuales se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino y se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxi:



 <p>en el que r es un número entero en el intervalo 1-100, preferentemente 1-10, más preferentemente 3.</p>	 <p>en el que r es un número entero en el intervalo 1-100, preferentemente 1-10, más preferentemente 1.</p>
 <p>en el que t es un número entero en el intervalo 1-150, preferentemente 20-70, más preferentemente 43.</p>	 <p>en el que r es un número entero en el intervalo 1-100, preferentemente 1-10, más preferentemente 5-7.</p>
 <p>en el que s es un número entero en el intervalo 1-30, preferentemente 1-10, más preferentemente 1.</p>	

Cualquiera de los ejemplos específicos no limitantes anteriores de fracciones acilo de fórmula  $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$  puede estar unido a un grupo épsilon-amino de un residuo de lisina presente en cualquiera de los ejemplos específicos no limitantes anteriores de análogos de la insulina dando por consiguiente otros ejemplos específicos de análogos de la insulina acilados de esta invención.

- 5 Las insulinas originales se pueden preparar de manera conocida *per se*. Por ejemplo, se pueden producir expresando una secuencia de ADN que codifique la insulina de cadena única en cuestión, en una célula huésped adecuada, por técnicas bien conocidas como la dada a conocer, por ej., en EP 1,246,845. La insulina se expresa en una célula huésped transformada como una molécula precursora que es convertida en la molécula de insulina deseada por procesos enzimáticos y químicos *in vitro* como los dados a conocer, por ej., en EP 163,529 y EP 214,826. La molécula precursora se puede expresar con una extensión N-terminal que posteriormente es escindida como se da a conocer, por ej., en EP 1246,845. Los ejemplos de extensiones N-terminales del tipo adecuado en la presente invención son, por ej., los dados a conocer en la patente de Estados Unidos N° 5,395,922 y en la patente EP N° 765,395. Más específicamente, se puede hacer referencia a WO 2006/082205, desde la página 37, línea 31, hasta la página 39, línea 29.
- 10
- 15 El análogo de la insulina original se puede convertir en un análogo de la insulina acilado de esta invención introduciendo el grupo deseado de fórmula  $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$  en el residuo de lisina del análogo de la insulina. El grupo deseado de fórmula  $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$  se puede introducir mediante cualquier método conveniente y muchos métodos se dan a conocer en el estado anterior de la técnica para dichas reacciones. Aparecen más detalles en los ejemplos siguientes.
- 20 Los análogos de la insulina acilados de esta invención se pueden proporcionar en forma de compuestos esencialmente exentos de zinc o en forma de complejos de zinc. Cuando se proporcionan complejos de zinc de un análogo de la insulina acilado de esta invención, dos iones  $\text{Zn}^{2+}$ , tres iones  $\text{Zn}^{2+}$  o cuatro iones  $\text{Zn}^{2+}$  pueden estar unidos a cada hexámero de insulina. Las soluciones de complejos de zinc de los análogos de la insulina acilados de esta invención contendrán mezclas de dichas especies.
- 25 En otro aspecto, esta invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un análogo de la insulina acilado de esta invención junto con un portador farmacéuticamente aceptable, que se puede utilizar para el tratamiento de la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 y

otras afecciones que causan hiperglucemia en pacientes que necesitan dicho tratamiento. Un análogo de la insulina acilado de esta invención se puede emplear para la fabricación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 y otras afecciones que causan hiperglucemia. Dichas composiciones se preparan de manera conocida *per se*.

- 5 En otro aspecto de esta invención, se proporciona una composición farmacéutica para tratar la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 y otras afecciones que causan hiperglucemia en un paciente que necesita dicho tratamiento, que consiste en una cantidad terapéuticamente eficaz de un análogo de la insulina acilado de esta invención mezclado con una insulina o un análogo de la insulina que tenga un inicio de acción rápido, junto con portadores y aditivos farmacéuticamente aceptables.
- 10 En otro aspecto, esta invención se refiere a una aplicación pulmonar para tratar la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 y otras afecciones que causan hiperglucemia en un paciente que necesita dicho tratamiento, que consiste en una cantidad terapéuticamente eficaz de un análogo de la insulina acilado de esta invención, opcionalmente mezclado con una insulina o un análogo de la insulina que tenga un inicio de acción rápido, junto con portadores y aditivos farmacéuticamente aceptables.
- 15 En un aspecto, esta invención proporciona una composición farmacéutica que es una mezcla de un análogo de la insulina acilado de esta invención y un análogo de la insulina de rápida acción elegido del grupo que consiste en AspB28 insulina humana; LysB28 ProB29 insulina humana y LysB3 GluB29 insulina humana.

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

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

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

- 30 En otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de la diabetes en un paciente que necesita dicho tratamiento, que consiste en una cantidad terapéuticamente eficaz de un análogo de la insulina acilado de esta invención mezclado con una insulina o un análogo de la insulina que tenga un inicio de acción rápido, junto con un portador farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto de la invención se proporciona una composición farmacéutica según la invención destinada a la administración pulmonar.

- 35 En otro aspecto, la presente invención se refiere a insulinas aciladas de esta invención que tienen afinidades de unión al receptor de la insulina como las descritas aquí, medidas en presencia de HSA (por ejemplo en presencia de 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4% o 4.5% de HSA), que son >3%, más preferentemente >5%, más preferentemente >10%, más preferentemente >15%, más preferentemente >20%, más preferentemente >30%, más preferentemente >40%, más preferentemente >50%, más preferentemente >60% medidas en relación con la insulina humana.

- 40 En otro aspecto, la presente invención se refiere a análogos de la insulina acilados de esta invención que tienen una hidrofobicidad general que es esencialmente similar a la de la insulina humana.

- 45 En otro aspecto, los análogos de la insulina acilados de esta invención tienen un índice hidrofóbico,  $K'_{rel}$ , en el intervalo entre aproximadamente 0.02 y aproximadamente 10, entre aproximadamente 0.1 y aproximadamente 5; entre aproximadamente 0.5 y aproximadamente 5; entre aproximadamente 0.2 y aproximadamente 2; entre aproximadamente 0.2 y aproximadamente 1; entre aproximadamente 0.1 y aproximadamente 2; o entre

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

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene un análogo de la insulina acilado de esta invención que es soluble a valores de pH fisiológicos.

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

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

15 En otro aspecto, la invención se refiere a insulinas con acción hepatoselectiva o hepatopreferencial.

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

### Uso de los compuestos de esta invención

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

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

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

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

40 Más precisamente, una preparación de insulina de esta invención, por ejemplo una solución o suspensión, se puede preparar disolviendo un compuesto de esta invención en un medio acuoso en condiciones ligeramente ácidas, por ejemplo, en una concentración en el intervalo entre aproximadamente 240 y aproximadamente 1200 nmol/ml. El medio acuoso se hace isotónico, por ejemplo, con cloruro de sodio o glicerol. Además, el medio acuoso puede contener iones de zinc en concentraciones de hasta aproximadamente 20  $\mu$ g de  $Zn^{++}$  por unidad de actividad de la

insulina, tampones como de acetato y citrato, y conservantes como m-cresol o fenol. El valor de pH de la solución se ajusta hacia la neutralidad sin llegar demasiado cerca del punto isoeléctrico del compuesto de esta invención para evitar la precipitación. El valor de pH de la preparación de insulina final depende del número de cargas que, opcionalmente, hayan sido cambiadas en el compuesto de esta invención, la concentración de iones zinc, la concentración del compuesto de esta invención y el compuesto de la invención elegido. La preparación de insulina se esteriliza, por ejemplo, mediante esterilización por filtración.

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

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

### Composiciones farmacéuticas

Los análogos de la insulina acilados de esta invención se pueden administrar por vía subcutánea, oral o pulmonar.

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

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

Los análogos de la insulina acilados de esta invención se pueden administrar por inhalación para lograr una absorción lenta y/o una menor depuración sistémica de éstos. 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.

Los análogos de la insulina acilados de esta invención se pueden administrar mediante cualquiera de una serie de dispositivos de inhalación conocidos en el área para la administración de un agente terapéutico por inhalación. Estos dispositivos incluyen inhaladores de dosis fija, nebulizadores, generadores de polvo seco, pulverizadores y similares. Preferentemente, los análogos de la insulina acilados 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 los análogos de la insulina acilados 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 similares.

Como reconocerán los expertos, la formulación de los análogos de la insulina acilados 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 los análogos de la insulina acilados en el aerosol. Por ejemplo, a mayores concentraciones de los análogos de la insulina acilados en la solución del nebulizador se pueden usar períodos más breves de administración. Los dispositivos como los inhaladores de dosis fija pueden producir mayores concentraciones de aerosol y se pueden operar durante períodos de tiempo más breves para suministrar la cantidad deseada de un análogo de la insulina acilado de esta invención. 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 análogos de la insulina acilados de esta invención en una determinada cantidad del polvo determina la dosis suministrada en una única administración.

El tamaño de partícula de los análogos de la insulina acilados 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, los análogos de la insulina acilados de esta invención se formulan de manera que al menos aproximadamente 10% de los análogos de la insulina acilados suministrados se depositen en el pulmón, preferentemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20%, o más. Las partículas del análogo de la insulina acilado suministrado 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 del análogo de la insulina acilado se elige para obtener el tamaño de partícula deseado en el dispositivo de inhalación elegido.

De manera ventajosa para la administración como un polvo seco, un análogo de la insulina acilado 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 un análogo de la insulina acilado de esta invención y otros ingredientes deseados. Se conocen otros métodos también adecuados para generar partículas útiles para la invención actual.

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

Las formulaciones de análogos de la insulina acilados 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 similares. Se pueden incluir aditivos en una formulación en polvo seco de un análogo de la insulina acilado, 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 propósitos semejantes. Convenientemente, el aditivo no afecta adversamente a las vías respiratorias del paciente. El análogo de la insulina acilado se puede mezclar con un aditivo a nivel molecular o la formulación sólida puede incluir partículas de un análogo de la insulina acilado mezclado o recubierto 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 similares. 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.

Se puede producir un aerosol que contenga los análogos de la insulina acilados de esta invención forzando a presión una suspensión o solución de un análogo de la insulina acilado 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 la 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  $\mu\text{m}$ .

5 Las formulaciones de análogos de la insulina acilados de esta invención adecuados para utilizar con un pulverizador contendrán habitualmente los análogos de la insulina acilados en una solución acuosa a una concentración entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 500 mg de un análogo de la insulina acilado por ml de solución. Dependiendo del análogo de la insulina acilado elegido 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 del análogo de la insulina acilado por ml de solución. La formulación puede contener agentes como un excipiente, un tampón, un agente de isotonicidad, un conservante, un surfactante, y preferentemente, zinc. La formulación también puede contener un excipiente o un estabilizante del análogo de la insulina acilado, como un tampón, un reductor, una proteína incrementadora del volumen o un carbohidrato. Las proteínas incrementadoras del volumen útiles en la formulación de conjugados de la insulina incluyen albúmina, protamina o similares. Los carbohidratos útiles en la formulación del análogo de la insulina acilado incluyen sacarosa, manitol, lactosa, trehalosa, glucosa o similares. La formulación de los análogos de la insulina acilados también puede contener un surfactante, que puede reducir o prevenir la agregación inducida por la superficie del conjugado de la 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.

20 Las composiciones farmacéuticas que contienen un análogo de la insulina acilado de esta invención también se pueden administrar por vía parenteral a los pacientes que necesitan 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.

25 Las composiciones inyectables de los análogos de la insulina acilados de esta invención se pueden preparar usando las técnicas convencionales de la industria farmacéutica que implican disolver y mezclar los ingredientes según sea apropiado para dar el producto final deseado. Por lo tanto, según un procedimiento, un análogo de la insulina acilado 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.

35 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.

40 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, 19<sup>a</sup> Edición, 1995.

50 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.

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

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

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

Las composiciones que contienen análogos de la insulina acilados 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 la 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 del análogo de la insulina acilado de esta invención sea determinada por los expertos para cada paciente en particular de manera similar que para las composiciones de insulina conocidas.

### 35 **Características importantes de esta invención**

En resumen, algunas características de esta invención son las siguientes:

1. Un análogo de la insulina acilado donde dicho análogo de la insulina contiene un residuo de lisina unido C-terminalmente al residuo de aminoácido A21 o a un residuo peptídico de hasta 4 residuos de aminoácidos que comprende un residuo de lisina, donde dicho residuo peptídico está unido C-terminalmente al residuo de aminoácido A21, caracterizado porque una fracción acilo que contiene una fracción alquilenglicol está unida al residuo de lisina en la posición A22 o unida al residuo de lisina presente en el residuo peptídico que está unido al extremo C terminal del residuo de aminoácido A21 y donde hay una sola lisina (K, Lys) en el análogo de la insulina.

2. Un análogo de la insulina acilado, de acuerdo con la cláusula 1, en el que la fracción acilo tiene la fórmula general I:

$\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p\text{-}$  (I),

en la que

n es 0 o un número entero en el intervalo 1-3,

m es 0 o un número entero en el intervalo 1-6,

5 p es 1, 2 o 3,

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

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

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

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

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

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

20 la unión a la insulina original puede ser a partir del extremo C-terminal de un residuo AA1, AA2 o AA3 de la fracción acilo de fórmula (I) o a partir de la o las cadenas laterales de un residuo AA2 presente en la fracción de fórmula (I).

3. Un análogo de la insulina acilado donde dicho análogo de la insulina contiene un residuo de lisina unido C-terminalmente al residuo de aminoácido A21 o a un residuo peptídico de hasta 4 residuos de aminoácidos que comprende un residuo de lisina donde dicho residuo peptídico está unido C-terminalmente al residuo de aminoácido A21, caracterizado porque una fracción acilo que contiene una fracción alquilenglicol está unida al residuo de lisina en la posición A22 o unida a un residuo de lisina presente en el residuo peptídico que está unido al extremo C terminal del residuo de aminoácido A21 y donde hay una sola lisina (K, Lys) en el análogo de la insulina y donde la fracción acilo que contiene una fracción alquilenglicol tiene la fórmula general I:  $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p\text{-}$  (I), en la que n es 0 o un número entero en el intervalo 1-3, m es 0 o un número entero en el intervalo 1-6, p es 1, 2 o 3, Acy es un ácido graso o un diácido graso que contiene aproximadamente 8-24 átomos de carbono del cual, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxilo o de uno de los grupos carboxilo, AA1 es un aminoácido cíclico neutro del cual, formalmente, se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino y se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxilo, AA2 es un aminoácido ácido del cual, formalmente, se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino y se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxilo, AA3 es un aminoácido que contiene alquilenglicol neutro, del cual, formalmente, se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino y se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxilo, el orden en el cual aparecen AA1, AA2 y AA3 en la fórmula puede ser intercambiado de manera independiente, las uniones entre Acy, AA1, AA2 y/o AA3 son enlaces amida (peptídicos), y la unión a la insulina original puede ser desde el extremo C-terminal de un residuo AA1, AA2 o AA3 de la fracción acilo de fórmula (I) o desde la cadena



o cadenas laterales del residuo AA2 presente en la fracción de fórmula (I).

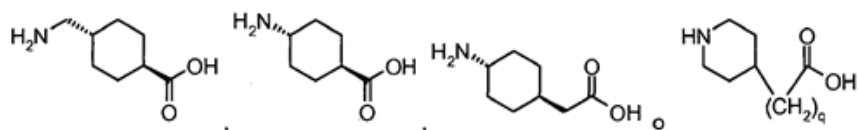
5 4. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que Acy se origina a partir de un ácido graso o un diácido graso con 14 a 20 átomos de carbono, preferentemente 16 a 20 átomos de carbono, más preferentemente 16 a 18 átomos de carbono, alternativamente 18 a 20 átomos de carbono y específicamente 8, 10, 12, 14, 16, 17, 18, 20, 22 o 24 átomos de carbono.

5. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que Acy se origina a partir de un ácido de carboxílico.

10 6. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que Acy es ácido tetradecanodioico, ácido pentadecanodioico, ácido hexadecanodioico, ácido heptadecanodioico, ácido octadecanodioico o ácido eicosanodioico del cual se ha eliminado un grupo hidroxilo.

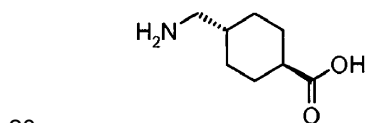
7. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que Acy es ácido hexadecanodioico, ácido octadecanodioico o ácido eicosanodioico del cual se ha eliminado un grupo hidroxilo.

15 8. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que AA1 se elige entre:



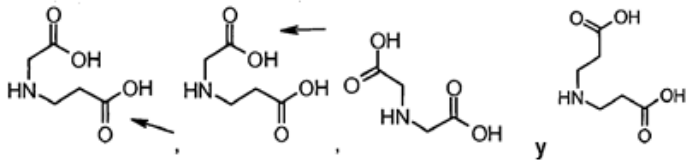
en el que q es 0, 1, 2, 3 o 4, y del cual, formalmente, se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino y se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxilo.

9. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las cláusulas precedentes, en el que AA1 es



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

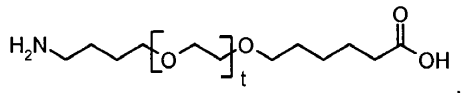
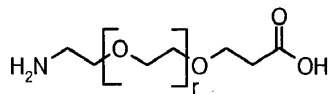
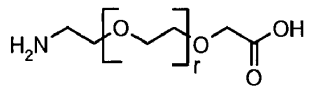
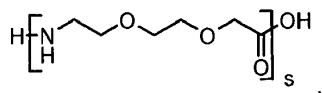
10. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que AA2 se elige entre Glu, Asp, D-Glu, D-Asp, γGlu, γAsp, γ-D-Glu, γ-D-Asp o cualquiera de los compuestos siguientes:



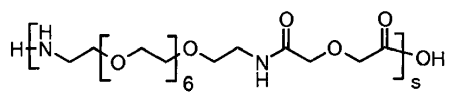
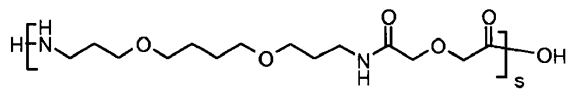
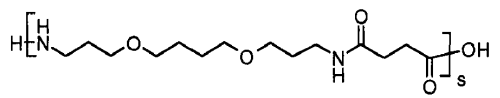
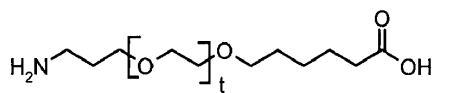
en el que las flechas indican el punto de unión al grupo amino de AA1, AA2 o AA3 y del cual, formalmente, se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino y se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxi.

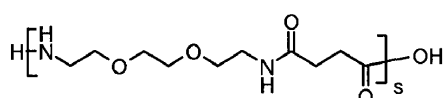
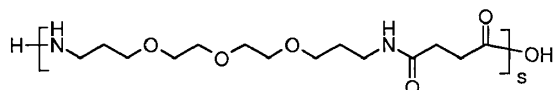
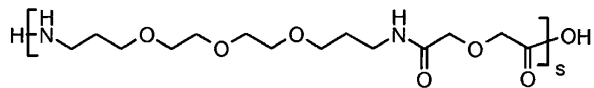
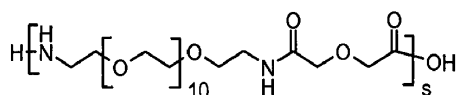
11. Un análogo de la insulina acilado, según las cláusulas precedentes, en el que AA2 es  $\gamma$ Glu.

5 12. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que AA3 se elige entre cualquiera de los compuestos siguientes:

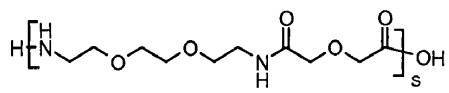


10





5 y



r es un número entero en el intervalo 1-100, preferentemente 1-10,

s es un número entero en el intervalo 1-30, preferentemente 1-10,

t es un número entero en el intervalo 1-150, preferentemente 20-70,

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

13. Un análogo de la insulina acilado, según la cláusula precedente, en el que r es 1, 2, 3, 4, 5, 7, 11, 23 o 27.

14. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que s es 1, 2, 3, 4, 10, 20 o 30.

15 15. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el número entero t se elige de modo que el peso molecular promedio de la fórmula anterior en la que aparece el número entero t sea 2000 Da, 3400 Da o 5000 Da.

20 16. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que la fracción acilo de fórmula  $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$ , en la que Acy, AA1, AA2, AA3, n, m y p son los definidos antes, está unida a un residuo de lisina en la posición A22.

17. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que la fracción acilo de fórmula  $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$ , en la que Acy, AA1, AA2, AA3, n, m y p son los definidos antes,

está unida a un residuo de lisina en la posición A23.

18. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que la fracción acilo de fórmula  $Acy-AA1_n-AA2_m-AA3_p-$ , en la que Acy, AA1, AA2, AA3, n, m y p son los definidos antes, está unida a un residuo de lisina en la posición A24.

5 19. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que la fracción acilo de fórmula  $Acy-AA1_n-AA2_m-AA3_p-$ , en la que Acy, AA1, AA2, AA3, n, m y p son los definidos antes, está unida a un residuo de lisina en la posición A25.

20. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el análogo de la insulina contiene 52 residuos de aminoácidos.

10 21. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el análogo de la insulina contiene 51 residuos de aminoácidos.

22. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el análogo de la insulina contiene 53 residuos de aminoácidos.

15 23. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el análogo de la insulina contiene 54 residuos de aminoácidos.

24. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el análogo de la insulina contiene 50 residuos de aminoácidos.

25. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el análogo de la insulina contiene 49 residuos de aminoácidos.

20 26. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que sólo uno de los residuos de aminoácidos en las posiciones A1-A21 y B1-B30 del análogo de la insulina se aparta de los residuos de aminoácidos presentes en la insulina humana.

25 27. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que sólo dos de los residuos de aminoácidos en las posiciones A1-A21 y B1-B30 del análogo de la insulina se apartan de los residuos de aminoácidos presentes en la insulina humana.

28. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que sólo tres de los residuos de aminoácidos en las posiciones A1-A21 y B1-B30 del análogo de la insulina se apartan de los residuos de aminoácidos presentes en la insulina humana.

30 29. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que sólo cuatro de los residuos de aminoácidos en las posiciones A1-A21 y B1-B30 del análogo de la insulina se apartan de los residuos de aminoácidos presentes en la insulina humana.

35 30. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes en el que no hay ningún residuo de aminoácido unido al extremo N terminal de los residuos de aminoácidos presentes en la posición A1 o B1 ni ningún residuo de aminoácido unido al extremo C terminal de los residuos de aminoácidos presentes en la posición B30.

31. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el

residuo de aminoácido en la posición A14 del análogo de la insulina es E.

32. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el residuo de aminoácido en la posición A18 del análogo de la insulina es Q.

5 33. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el residuo de aminoácido en la posición A21 del análogo de la insulina es A, G o Q.

34. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el residuo de aminoácido en la posición A22 del análogo de la insulina es K o G.

35. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el residuo de aminoácido en la posición A22 del análogo de la insulina es K.

10 36. Un análogo de la insulina acilado, según la cláusula precedente, en el que el residuo de aminoácido en la posición A22 del análogo de la insulina es K y en el que no hay ningún residuo de aminoácido unido al extremo C terminal de dicho residuo de aminoácido A22K.

37. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el residuo de aminoácido en la posición A23 del análogo de la insulina es K o G.

15 38. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el residuo de aminoácido en la posición A24 del análogo de la insulina es K o G.

39. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el residuo de aminoácido en la posición A25 del análogo de la insulina es K.

20 40. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el residuo de aminoácido en la posición B1 del análogo de la insulina es Q o está ausente.

41. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el residuo de aminoácido en la posición B3 del análogo de la insulina es Q o T.

42. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el residuo de aminoácido en la posición B13 del análogo de la insulina es Q.

25 43. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el residuo de aminoácido en la posición B25 del análogo de la insulina es H.

44. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el residuo de aminoácido en la posición B27 del análogo de la insulina está ausente.

30 45. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el residuo de aminoácido en la posición B28 del análogo de la insulina es D, E o R.

46. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el residuo de aminoácido en la posición B28 es R y el residuo de aminoácido en la posición B29 es P.

47. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el

residuo de aminoácido en la posición B29 del análogo de la insulina es R.

48. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el residuo de aminoácido en la posición B30 del análogo de la insulina está ausente.

5 49. Un análogo de la insulina acilado según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que el  
 residuo de aminoácido en la posición A14 del análogo de la insulina es Y o E, el residuo de aminoácido en la  
 posición A18 del análogo de la insulina es N o Q, el residuo de aminoácido en la posición A21 del análogo de la  
 insulina es N, A, G o Q, el residuo de aminoácido en la posición A22 del análogo de la insulina es K o G, el  
 residuo de aminoácido en la posición A23 del análogo de la insulina está ausente, es K o G, el residuo de  
 aminoácido en la posición A24 del análogo de la insulina está ausente, es K o G, el residuo de aminoácido en la posición B1 del  
 10 análogo de la insulina es F, Q o está ausente, el residuo de aminoácido en la posición B3 del análogo de la  
 insulina es N, Q o T, el residuo de aminoácido en la posición B13 del análogo de la insulina es E o Q, el residuo  
 de aminoácido en la posición B25 del análogo de la insulina es F o H, el residuo de aminoácido en la posición  
 B27 del análogo de la insulina es T o está ausente, el residuo de aminoácido en la posición B28 del análogo de  
 15 la insulina es P, D, E o R, el residuo de aminoácido en la posición B29 del análogo de la insulina es K o R y el  
 residuo de aminoácido en la posición B30 del análogo de la insulina es T o está ausente.

50. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que todos los residuos de aminoácidos del análogo de la insulina son residuos de aminoácidos codificables.

20 51. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que AA2 es gGlu.

52. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, en el que la fracción acilo de fórmula general  $\text{Acy-AAI}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p\text{-}$  tiene una de las fórmulas generales  $\text{Acy-AA3-}$ ,  $\text{Acy-AA2-AA3-}$ ,  $\text{Acy-AA2-AA3-AA2-}$ ,  $\text{Acy-AA2-(AA3)}_2\text{-}$ ,  $\text{Acy-AA2-(AA3)}_2\text{-AA2}$  o  $\text{Acy-AA3-AA2-}$  en las que Acy, AA2 y AA3 son, cada uno, los definidos en este documento.

25 53. Un análogo de la insulina acilado, según cualquiera de las posibles cláusulas precedentes, que es cualquiera de los compuestos mencionados específicamente en este documento, por ej., los compuestos descritos en los ejemplos específicos del mismo.

54. Un compuesto según cualquiera de las posibles cláusulas de producto precedentes para usar como un medicamento o para usar en un medicamento.

30 55. Un compuesto según cualquiera de las posibles cláusulas de producto precedentes, para tratar la diabetes o el uso de un compuesto según cualquiera de las posibles reivindicaciones del producto precedentes para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de la diabetes.

## Ejemplos

### Procedimientos generales:

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

40 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 la 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.

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

10 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 0

15 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

20 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*

25 transformada con plásmidos de expresión se cultivó en YPD durante 72 h a 30 °C.

#### Producción, purificación y caracterización de los análogos de la insulina acilados de esta invención

Los ejemplos siguientes se refieren a compuestos intermedios y productos finales identificados en la memoria y en los ejemplos. La preparación de los análogos de la insulina acilados de esta invención se describe en detalle utilizando los ejemplos siguientes, pero las reacciones químicas y los esquemas de purificación descritos se dan a

30 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,

35 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 utilizando métodos conocidos *per se*. Todas las temperaturas se indican en grados Celsius y a menos que

40 se indique lo contrario, todas las partes y porcentajes son en peso cuando se refieren a cantidades y todas las partes son en volumen cuando se refieren a solventes y eluyentes.

Los análogos de la insulina acilados 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

45 perfil de impurezas, la solubilidad de las insulinas en cuestión, etcétera, estas modificaciones pueden ser reconocidas y realizadas fácilmente por un técnico con experiencia.

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



en la que Acy, AA1, AA2, AA3, n, m y p son los definidos antes y Act es el grupo saliente de un éster activo, como ésteres de *N*-hidroxisuccinimida (OSu), o 1-hidroxibenzotriazol, y donde los ácidos carboxílicos dentro de la fracción acilo son protegidos como ésteres *tert*-butílicos.

5 Los compuestos de fórmula general (II) según la invención se pueden sintetizar sobre un soporte sólido usando procedimientos muy conocidos por los técnicos de síntesis de péptidos en fase sólida. Este procedimiento comprende la unión de un aminoácido protegido con Fmoc a una resina de 2-clorotritilcloruro de poliestireno. La unión se puede llevar a cabo, por ej., utilizando el aminoácido *N*-protegido libre en presencia de una amina terciaria, como trietilamina o *N,N*-diisopropiletilamina (véanse las referencias más adelante). El extremo C-terminal (que está unido a la resina) de este aminoácido está en el extremo de la secuencia de síntesis que se está acoplado a las  
10 insulinas originales de la invención. Luego de la unión del aminoácido-Fmoc a la resina, el grupo Fmoc es eliminado empleando, por ej., aminas secundarias, como piperidina o dietilamina, seguido del acoplamiento de otro (o el mismo) aminoácido protegido con Fmoc y eliminación. Esta secuencia de síntesis se termina acoplado ( $\alpha$ ,  $\omega$ )-diácidos grasos protegidos con mono-*tert*-butilo como ésteres mono-*tert*-butílicos de los ácidos hexadecanodioico, heptadecanodioico, octadecanodioico o eicosanodioico. La escisión de los compuestos de la resina se lleva a cabo usando ácidos diluidos como 0.5-5% de TFA/DCM (ácido trifluoroacético en diclorometano), ácido acético (por ej. 10% en DCM, o HOAc/trifluoro-etanol/DCM 1:1:8), o hexafluoroisopropanol en DCM (véase por ej. "Organic Synthesis on Solid Phase", F.Z. Dörwald, Wiley-VCH, 2000. ISBN 3-527-29950-5, "Peptides: Chemistry and Biology", N. Sewald & H.-D. Jakubke, Wiley-VCH, 2002, ISBN 3-527-30405-3 o "The Combinatorial Chemistry Catalog" 1999, Novabiochem AG, y las referencias citadas allí). Esto asegura que los ésteres *tert*-butílicos presentes en los  
15 compuestos como grupos protectores del ácido carboxílico no sean eliminados. Finalmente, el grupo carboxi C-terminal (liberado de la resina) se activa, por ej., como el éster de *N*-hidroxisuccinimida (OSu) y se usa directamente, o después de la purificación, como reactivo de acoplamiento en la unión a las insulinas originales de la invención. Este procedimiento se ilustra en el Ejemplo 4.

20 Alternativamente, los reactivos de acilación de fórmula general (II) anteriores se pueden preparar por síntesis en fase en solución como se describe más adelante.

Los diácidos grasos protegidos con mono-*tert*-butilo, como los ésteres mono-*tert*-butílicos del ácido hexadecanodioico, heptadecanodioico, octadecanodioico o eicosanodioico se activan como por ej. ésteres-OSu según se describe más adelante o como cualquier otro éster activado conocido por los técnicos como ésteres-HOBt o HOAt-. Este éster activo se acopla con uno de los aminoácidos AA1, AA2 protegido con mono-*tert*-butilo o AA3 en un solvente adecuado como THF, DMF, NMP (o una mezcla de solventes) en presencia de una base adecuada como DIPEA o trietilamina. El producto intermedio se aísla por ejemplo por procedimientos extractivos o por procedimientos cromatográficos. El producto intermedio resultante se somete nuevamente a activación (como se describió antes) y a acoplamiento con uno de los aminoácidos AA1, AA2 protegido con mono-*tert*-butilo o AA3 como se describió antes. Este procedimiento se repite hasta que se obtiene el producto intermedio protegido deseado Acy-AA1<sub>n</sub>-AA2<sub>m</sub>-AA3<sub>p</sub>-OH. Éste es activado a su vez para obtener los reactivos de acilación de fórmula general (II) Acy-AA1<sub>n</sub>-AA2<sub>m</sub>-AA3<sub>p</sub>-Act. Este procedimiento se ilustra en el Ejemplo 9.

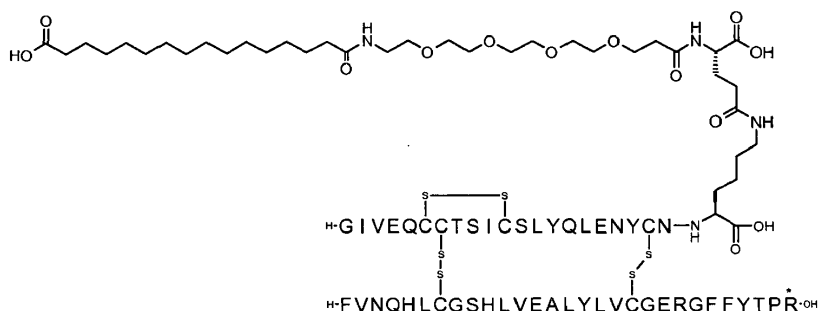
*Procedimiento general (A) para la preparación de análogos de la insulina acilados de esta invención*

El procedimiento general (A) se describe a continuación y se ilustra en los primeros ejemplos:

#### **Ejemplo 1, Procedimiento general (A):**

40 A22K(*N*<sup>ε</sup>-Hexadecanodioil-(3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi)etoxi)propionil- $\gamma$ Glu), B29R, desB30 insulina humana



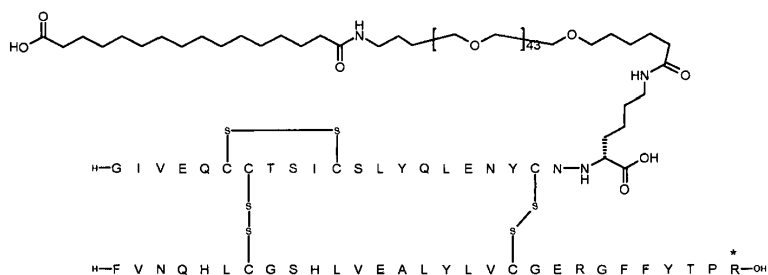


Esta insulina se preparó de manera similar a la insulina descrita en WO 2006/082205, ejemplo 3, usando A22K, B29R desB30 insulina humana en vez de desB30 insulina humana.

LC-MS (electronebulización); m/z: 1627 (M+4)<sup>+</sup>/4; 1302 (M+5)<sup>+</sup>/5.

### 5 Ejemplo 2, Procedimiento general (A):

A22K(N<sup>ε</sup>-Hexadecanodioil-(2-aminoetil-PEG2000-ilacetil)), B29R desB30 insulina humana



#### Paso 1:

10 Se disolvió 2,5-dioxopirrolidin-1-il éster tert-butil éster del ácido hexadecanodioico (218 mg, 0.497 mmol) en DCM (10 mL), se agregó propilamina-PEG-ácido carboxílico PM 2000 (SUNBRIGHT® PA-20HC de NOF coporation, 1000 mg, aproximadamente 0.497 mmol) y la mezcla se agitó en atmósfera de nitrógeno toda la noche. La mezcla de reacción se transfirió a una columna de gel de sílice y se eluyó con DCM con un gradiente de etanol (0-10 %), para obtener el producto intermedio tert-butilhexadecanodioilpropilamina-PEG-ácido carboxílico (PM 2000).

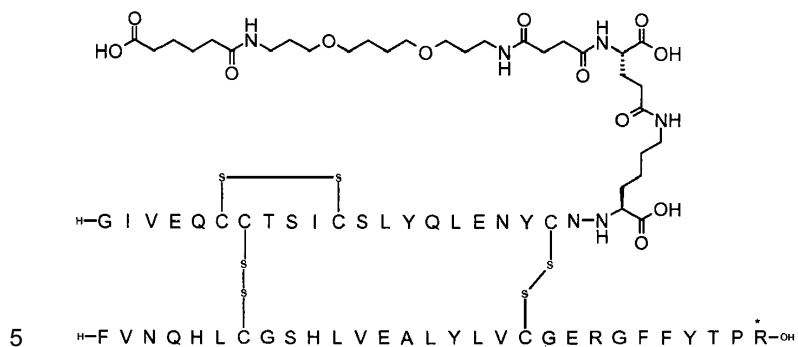
Paso 2: Síntesis de A22K(N<sup>ε</sup>-Hexadecanodioil-(2-aminoetil-PEG2000-ilacetil)), B29R desB30 insulina humana.

15 Se disolvió tert-Butilhexadecanodioilpropilamina-PEG-ácido carboxílico (PM 2000) (72 mg, 0.031 mmol) en THF (4 mL), DIPEA (6.3 μL, 0.037 mmol) y TSTU (11.1 mg, 0.037 mmol) y la mezcla se agitó toda la noche en atmósfera de nitrógeno, se agregó DMSO (1 mL) y la mezcla se agregó a una solución de A22K, B29R desB30 insulina humana (180 mg, 0.031 mmol) disuelta junto con trietilamina (43 μL, 0.31 mmol) en DMSO (2 mL). La mezcla se enfrió en hielo y se le agregó agua (15 mL), el pH se ajustó primero a 5.2 con HCl 1 N y después se volvió a juntar a pH 7-8  
20 con amoníaco al 1% en agua. La mezcla se purificó en HPLC preparativa usando un gradiente de 35-75% de acetonitrilo en agua que contenía 0.1% de TFA. Las fracciones se analizaron en LC-MS y las fracciones que contenían el producto deseado se juntaron, y el solvente se eliminó al vacío seguido de liofilización. El material liofilizado se trató con TFA/agua 95:5 durante 30 minutos y el solvente se eliminó al vacío. El producto crudo se purificó usando cromatografía de intercambio aniónico (columna Ressource Q, 1 ml (Amersham Biosciences) y elución con un gradiente de acetato de amonio (0.25% a 1.25% en 25 CV) en 42.5% de EtOH, 0.25% de TRIS, pH  
25 7.5, seguido de HPLC preparativa empleando una columna Jupiter C4, de 5 μ eluida con un gradiente de 30-70% de acetonitrilo/agua que contenía 0.1% de TFA, en 90 minutos, para dar el compuesto del título. HPLC-MS: m/z

alrededor de 1360 (M<sup>+</sup>/6).

**Ejemplo 3, Procedimiento general (A):**

A22K(N<sup>f</sup>-3-(3-{4-[3-(5-Carboxipentanoilamino)propoxi]butoxi}propilcarbamoil)propionil-γGlu), B29R, desB30 insulina humana

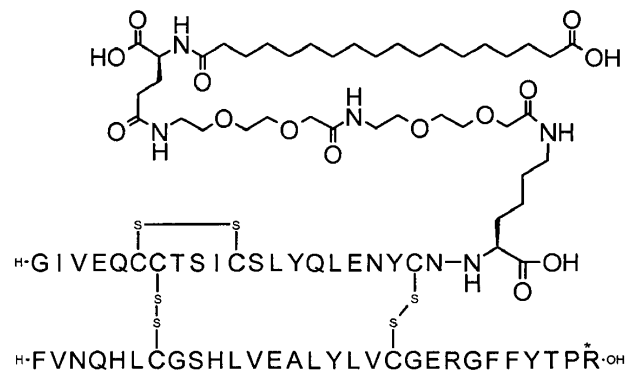


Esta insulina se preparó de manera similar a la insulina descrita en WO 2006/082205, ejemplo 8, usando A22K, B29R desB30 insulina humana en vez de desB30 insulina humana y usando éster mono-tert-butílico del ácido hexanodioico en vez de éster mono-tert-butílico del ácido octanodioico.

MALDI-TOF MS (matriz: ácido sinapínico); m/z: 6411.

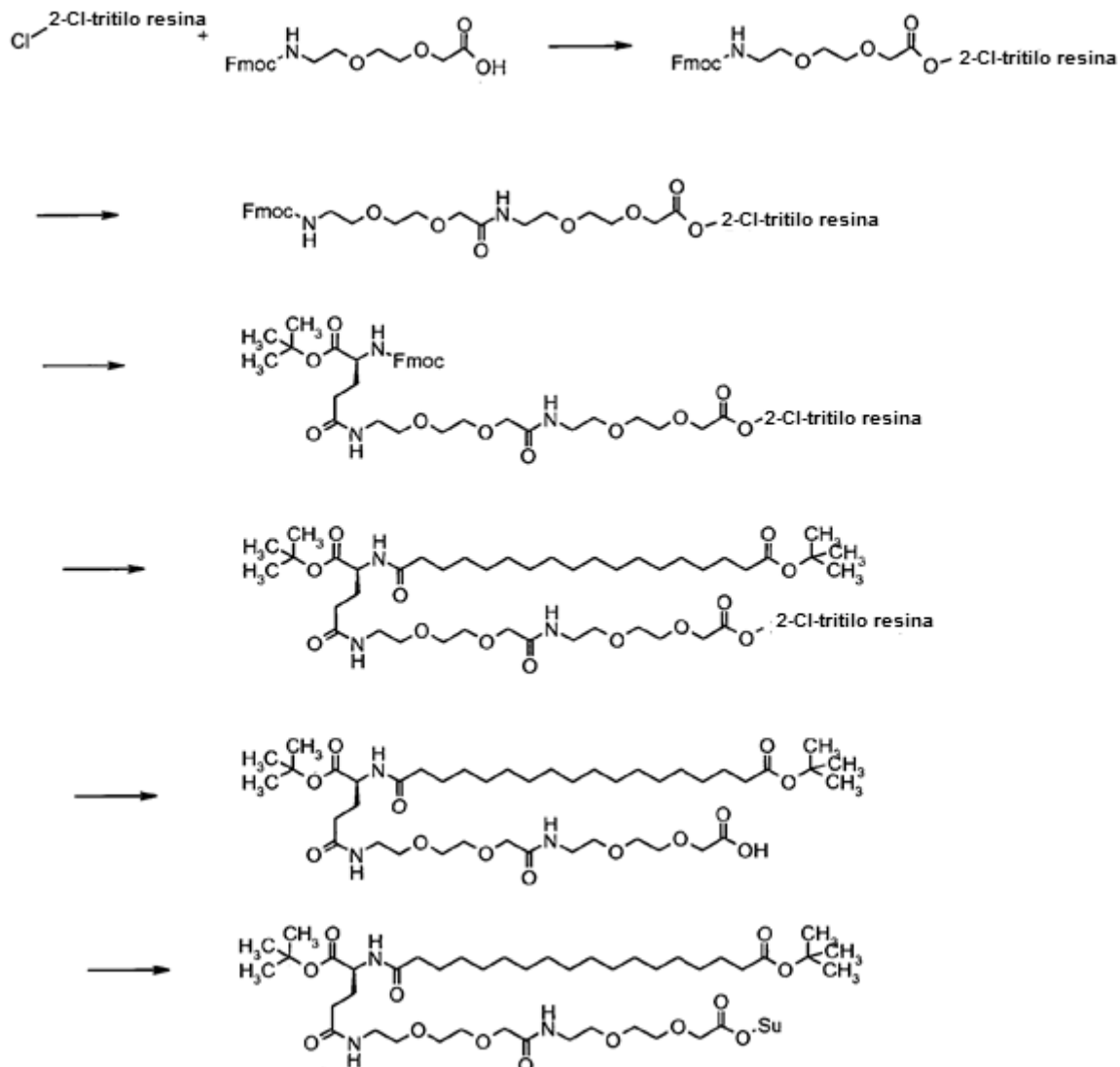
**10 Ejemplo 4, Procedimiento general (A):**

A22K(N<sup>E</sup>-[2-(2-[2-(2-[2-(Octadecanodioil-γGlu)amino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil]), B29R, desB30 insulina humana



MALDI-TOF MS (matriz: ácido sinapínico); m/z: 6581.

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



Resina de partida: resina de 2-clorotritilo, 1.60 mmol/g

Se hinchó 1.0 g de la resina durante 30 minutos en DCM (10 ml).

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

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

Se agregó piperidina al 20%/NMP (8 ml), se dejó en reposo durante 10 min, se repitió una vez.

- 10 Se filtró y se lavó con NMP (2 x 8 ml), DCM (3 x 8 ml) y NMP (5 x 8 ml).

Una prueba TNBS positiva dio resinas coloreadas de rojo.

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

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

Una prueba TNBS positiva dio resinas incoloras.

Se agregó piperidina al 20%/NMP (10 ml), se dejó en reposo durante 10 min, se repitió una vez.

10 Se filtró y se lavó con NMP (2 x 8 ml), DCM (3 x 8 ml) y NMP (5 x 8 ml).

Una prueba TNBS positiva dio resinas coloreadas de rojo.

**Acilación con Fmoc-Glu-OtBu:**

15 Se disolvió 0.86 g (2 eq, 2.0 mmol) de Fmoc-Glu-OtBu en NMP/DCM 1:1 (10 ml). Se le agregó 0.32 g (2.2 eq, 2.4 mmol) de HOBt seguido de la adición de 0.37 ml (2.2 eq, 2.4 mmol) de DIC. La mezcla de reacción se dejó en reposo durante 20 min y después se transfirió a la resina y finalmente se le agregó 0.407 ml (2.2 eq) de DIEA. La mezcla se agitó en vórtex durante 16 horas, se filtró y se lavó con NMP (2 x 8 ml), DCM (3 x 8 ml) y NMP (5 x 8 ml).

Una prueba TNBS positiva dio resinas incoloras.

Se agregó piperidina al 20%/NMP (10 ml), se dejó en reposo durante 10 min, se repitió una vez.

Se filtró y se lavó con NMP (2 x 8 ml), DCM (3 x 8 ml) y NMP (5 x 8 ml).

20 Una prueba TNBS positiva dio resinas coloreadas de rojo.

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

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

**Escisión con TFA:**

30 Se agregaron 8 ml de TFA al 5%/DCM a la resina y la mezcla de reacción se agitó en vórtex durante 2 horas, se filtró y se recogió el filtrado. Se agregó más TFA al 5%/DCM (8 ml) a la resina, y la mezcla se agitó en vórtex durante 10 min, se filtró y la resina se lavó con DCM (2 x 10 ml). Se ajustó el pH de los filtrados y los lavados combinados a un pH básico utilizando 800 µl de DIEA. La mezcla se evaporó al vacío produciéndose un aceite (3.5 g). Se agregó éter dietílico (30 ml) y el aceite no disuelto se separó por decantación y se evaporó al vacío. Esto produjo 1.1 g de éster *tert*-butílico del ácido 17-*(S)*-1-*tert*-butoxicarbonil-3-[2-(2-*(2-*

carboximetoxietoxi]etilcarbamoil]metoxi}etoxi]etilcarbamoil]-propilcarbamoil}heptadecanoico (nombre alternativo: octadecanodioil-Glu(OEG-OEG-OH)-OTBU) de *tert*-butilo como un aceite.

LC-MS (Sciex100 API):  $m/z = 846.6 (M+1)^+$ .

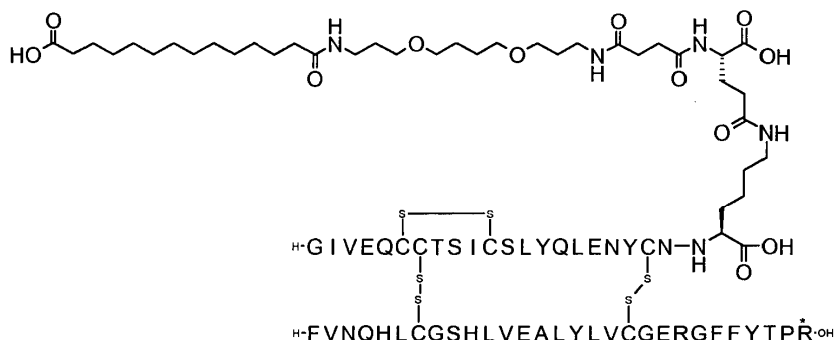
**Activación de OSu:**

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

LC-MS:  $m/z = 943.4 (M+1)^+$ .

**Ejemplo 5, Procedimiento general (A):**

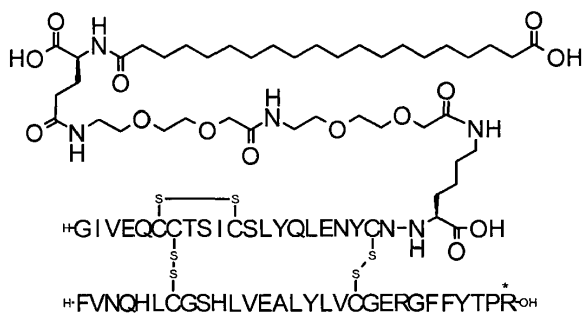
- 15 A22K(N<sup>ε</sup>-3-(3-{4-[3-(13-Carboxitridecanoilamino)propoxi]butoxi}propilcarbamoil)propionil-γGlu), B29R, desB30 insulina humana



LC-MS (electronebulización):  $m/z = 1630, (M + 4)^+/4$

**Ejemplo 6, Procedimiento general (A):**

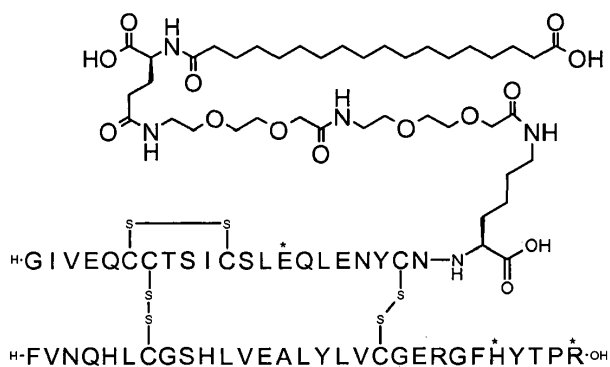
- 20 A22K(N<sup>ε</sup>-[2-(2-[2-(2-[2-(Eicosanodioil-γGlu)amino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil]), B29R, desB30 insulina humana



MALDI-MS (matriz: ácido sinapínico); m/z: 6606.

#### Ejemplo 7, Procedimiento general (A):

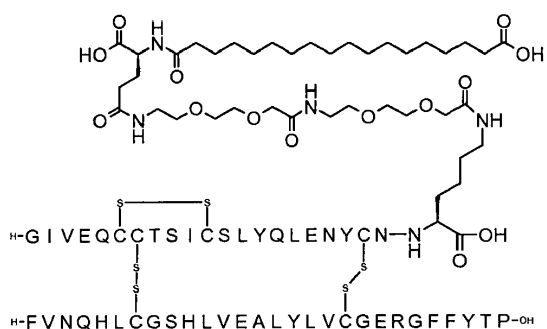
5 A14E, A22K(N<sup>ε</sup>-[2-(2-[2-(2-[2-(Octadecanodioil-γGlu)amino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi)-acetil]), B25H, B29R, desB30 insulina humana



LC-MS (electronebulización): m/z = 1634, (M+4)<sup>+</sup>/4

#### Ejemplo 8, Procedimiento general (A):

10 A22K(N<sup>ε</sup>-Octadecanodioil-γGlu-[2-(2-[2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)etoxi]acetil), desB29, desB30 insulina humana



Se disolvieron 63 mg de A22K(N<sup>ε</sup>-octadecanodioil-γGlu-[2-(2-[2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)etoxi]-acetil), B29R, desB30 insulina humana (ejemplo 4) en tampón Tris, pH 8 (50 mM, 10 mL), y se le agregó carboxipeptidasa B inmovilizada en gel de sefarosa en tampón Tris, pH 8 (50 mM, 0.2 mL) que contenía 20% de etanol y la mezcla se

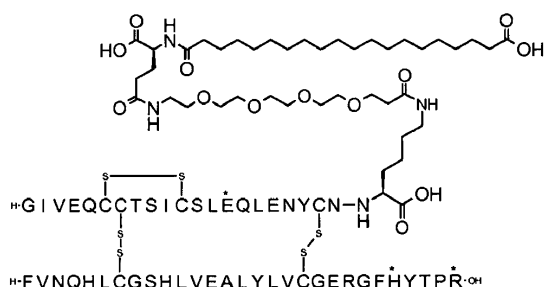
agitó suavemente durante 16 horas a temperatura ambiente. Se agregó más carboxipeptidasa B inmovilizada en gel de sefarosa en tampón Tris, pH 8 (50 mM, 0.8 mL) que contenía 20% de etanol y la mezcla se agitó suavemente durante 24 horas. La mezcla se filtró y el filtro se lavó con tampón Tris, pH 8 (50 mM, 0.8 mL) que contenía 20% de etanol. Los filtrados y los lavados combinados se liofilizaron. El residuo se purificó por HPLC para dar la insulina del título

5

MALDI-TOF MS: m/z = 6424

**Ejemplo 9, Procedimiento general (A):**

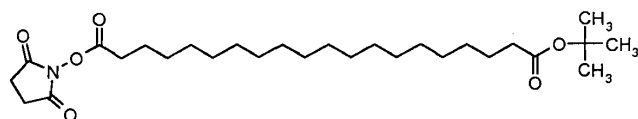
A14E, A22K(N<sup>ε</sup>-Eicosanodioil-γGlu-(3-(2-(2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi)etoxi)propionil)), B25H, B29R, desB30 insulina humana



10

Preparación del reactivo de acilación *N*-hidroxisuccinimidil éster *tert*-butil éster del ácido 19-{1-*tert*-butoxicarbonil-3-[2-(2-{2-[2-(2-carboxietoxi)etoxi]-etoxi]etoxi]etilcarbamoil}propilcarbamoil}nonadecanoico y acoplamiento a la insulina original:

*N*-hidroxisuccinimida éster *tert*-butil éster del ácido eicosanodioico:



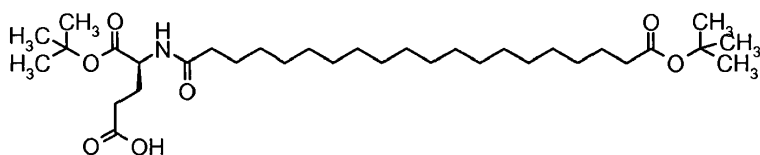
15

Se mezclaron éster *tert*-butílico del ácido eicosanodioico ( 5 g , 12.54 mmol) y TSTU (4.53 g, 15.05 mmol) en THF (50 mL), se agregó DIPEA (2.62 mL) y la mezcla turbia resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 h, después se agregó DMF ( 30 mL) que resultó en una solución transparente que luego se agitó durante toda la noche. La mezcla resultante se evaporó casi hasta sequedad y el residuo se mezcló con acetonitrilo frío lo que resultó en la precipitación de un precipitado. Éste se separó por filtración y se secó al vacío durante toda la noche, produciendo 6.01 g (97 %) de *N*-hidroxisuccinimidil éster *tert*-butil éster del ácido eicosanodioico.

20

MS (electronebulización): m/z: 440 (M-56 (tBu)).

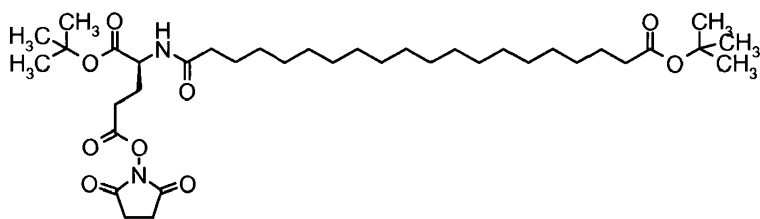
Éster 1-*tert*-butílico del ácido 2-(19-*tert*-butoxicarbonilnonadecanoilamino)pentanodioico



5 Se disolvió 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster *tert*-butil éster del ácido eicosanodioico (6.01 g, 12.124 mmol) en THF (150 mL) y se mezcló con una suspensión de H-Glu-OtBu (2.71 g, 13.33 mmol) en DMF/agua (1/1, 40 mL). Esto resultó en una solución tipo gel que se calentó para dar una solución transparente que se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Después la solución se evaporó, se agregaron 100 mL de agua y la mezcla se calentó a 60 °C lo que resultó en una solución que cristalizó al enfriar. El precipitado se recrystalizó de acetonitrilo y los cristales se secaron al vacío. Rendimiento 6.82 g (96%).

MS (electronebulización): m/z 584 (M+1).

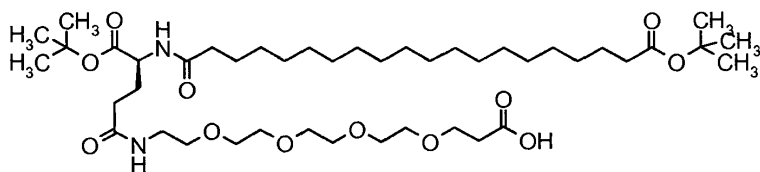
5-(2,5-Dioxo-pirrolidina-1-il) éster 1-*tert*-butil éster del ácido 2-(19-*tert*-butoxicarbonilnonadecanoilamino)pentanodioico



15 Se disolvió éster 1-*tert*-butílico del ácido 2-(19-*tert*-butoxicarbonilnonadecanoilamino)pentanodioico (6.52 g, 11.17 mmol) en THF (100 mL), se agregó DIPEA (2.14 mL) seguido de una solución de TSTU (3.70 g, 12.29 mmol) en acetonitrilo (25 mL). La mezcla se agitó toda la noche a temperatura ambiente, luego se evaporó, lo que resultó en un residuo amarillado que se recrystalizó de acetonitrilo. Después de enfriar toda la noche a 5 °C se formó un polvo. Éste se disolvió en THF, se secó con MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó hasta sequedad para obtener 6.17 g (81 %) del compuesto del título.

MS (electronebulización): m/z 681 (M+1).

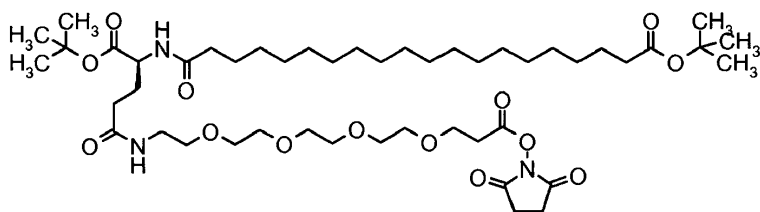
Éster *tert*-butílico del ácido 19-{1-*tert*-butoxicarbonil-3-[2-(2-[2-(2-carboxietoxi)etoxi]etoxi)etoxi]etilcarbamoil]propilcarbamoil}nonadecanoico



25 Se disolvió 5-(2,5-Dioxo-pirrolidin-1-il) éster 1-*tert*-butil éster del ácido 2-(19-*tert*-butoxicarbonilnonadecanoilamino)pentanodioico (0.56 g, 0.822 mmol) en THF (20 mL), se agregó ácido 3-(2-[2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]etoxi]etoxi)propiónico (0.22 g, 0.82 mmol) en THF (20 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. El análisis por LCMS indicó que la reacción había finalizado (MS: m/z 831 (M+1)) y la mezcla de reacción se usó directamente para la reacción siguiente con TSTU.

Éster *tert*-butílico del ácido 19-(1-*tert*-butoxicarbonil-3-[2-[2-(2-[2-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-iloxycarbonil)etoxi]etoxi]etoxi)-etoxi]etilcarbamoil]propilcarbamoil}nonadecanoico





5 Se mezclaron éster tert-butílico del ácido 19-(1-*tert*-butoxicarbonil-3-[2-(2-[2-(2-carboxietoxi)etoxi]etoxi)etoxi]etilcarbamoil}propilcarbamoil}nonadecanoico (0.68 g de solución cruda en THF 40 mL, 0.82 mmol) y TSTU (0.296 g, 0.982 mmol), se ajustó el pH por adición de DIPEA (0.171 mL) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente toda la noche. Esto resultó en una solución transparente que se evaporó hasta sequedad y se trató con éter dietílico, lo que produjo 1.2 g de compuesto del título como una masa cerosa que se usó sin purificación adicional.

MS (electronebulización): m/z 816 ( M-2 tBu) ( calc. 816).

10 Acoplamiento del éster *tert*-butílico del ácido 19-(1-*tert*-butoxicarbonil-3-[2-[2-(2-[2-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilyloxycarbonyl)etoxi]etoxi)etoxi]-etoxi]etilcarbamoil}propilcarbamoil}nonadecanoico a A14E, A22K, B25H, B29R, desB30 insulina humana:

15 Se disolvió A14E, A22K, B25H, B29R, desB30 insulina humana (0.3 g, 0.052 mmol) en una mezcla de acetonitrilo (4 mL) y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.1 M, 10 mL), se ajustó el pH a 10.6 con NaOH (1 M). Se agregó a la solución éster *tert*-butílico del ácido 19-(1-*tert*-butoxicarbonil-3-[2-[2-(2-[2-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilyloxycarbonyl)etoxi]etoxi)etoxi]etoxi]-etilcarbamoil}propilcarbamoil}nonadecanoico (0.048 g, 0.052 mmol) en acetonitrilo (4 mL), y la mezcla se agitó suavemente a temperatura ambiente durante 1 h. Se agregaron 5 gotas de solución de metilamina (40% en MeOH) y la mezcla se agitó durante otros 5 min. Después se agregó ácido acético (glacial, 5 mL) en una porción y la mezcla resultante se purificó por HPLC preparativa (columna C18, 3 cm, gradiente 0-7 min 20% de acetonitrilo, 7-32 min 20-100% de acetonitrilo, 32-37 min 100% de acetonitrilo).

20 Las fracciones puras se juntaron y se liofilizaron.

El compuesto resultante se disolvió en TFA (30 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h, después se agregaron acetonitrilo (20 mL) y agua (20 mL) y la mezcla se purificó por HPLC preparativa (columna C18, 3 cm, gradiente 0-7 min 20% de acetonitrilo, 7-32 min 20-60% de acetonitrilo, 32-37 min 60% de acetonitrilo).

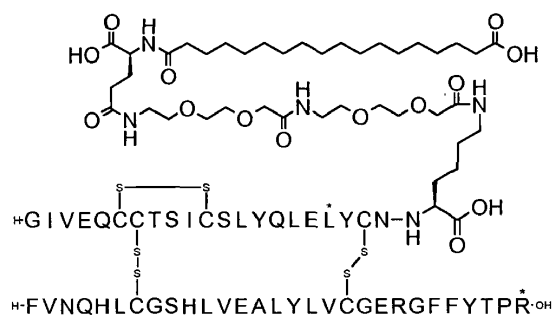
Las fracciones puras se juntaron y se liofilizaron.

25 Repurificación por HPLC (columna C18, 3 cm, gradiente 0-7 min 25% de acetonitrilo, 7-47 min 25-60% de acetonitrilo, 47-52 min 60% de acetonitrilo), las fracciones puras se juntaron y se liofilizaron. Esto dio 13 mg de producto final.

MS (electronebulización): m/z 6520 (calc.6520).

#### Ejemplo 10, Procedimiento general (A):

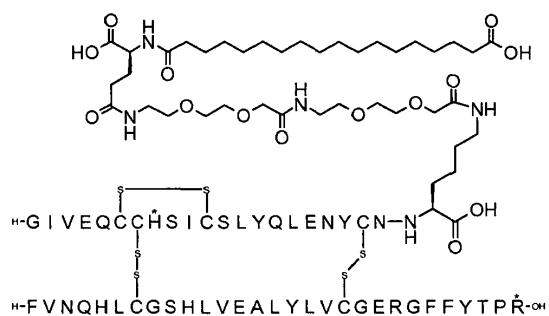
30 A18L, A22K(*N*<sup>ε</sup>-Octadecanodioil-γGlu-[2-(2-[2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana



MS (electronebulización): m/z: 6578 (Calc.: 6578).

#### Ejemplo 11, Procedimiento general (A):

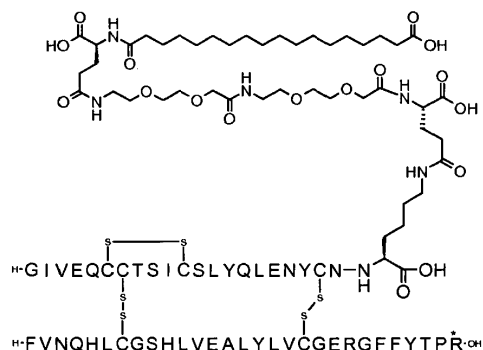
5 A8H, A22K(N<sup>ε</sup>-Octadecanodioil-γGlu-[2-(2-[2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana



MALDI-TOF MS: m/z: 6615 (Calc.: 6615).

#### Ejemplo 12, Procedimiento general (A):

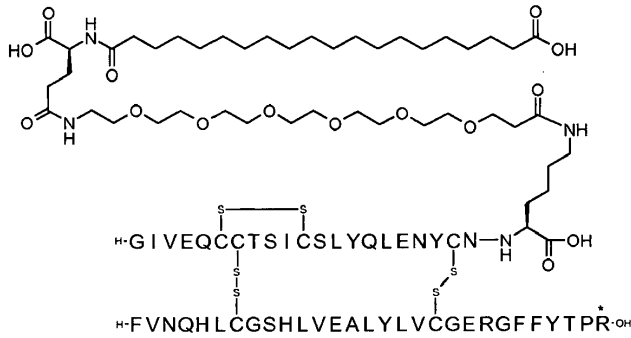
10 A22K(N<sup>ε</sup>-Octadecanodioil-γGlu-[2-(2-[2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)etoxi]acetil-γGlu), B29R, desB30 insulina humana



MS (electronebulización): m/z = 1677 (m+4)/4.

**Ejemplo 13, Procedimiento general (A):**

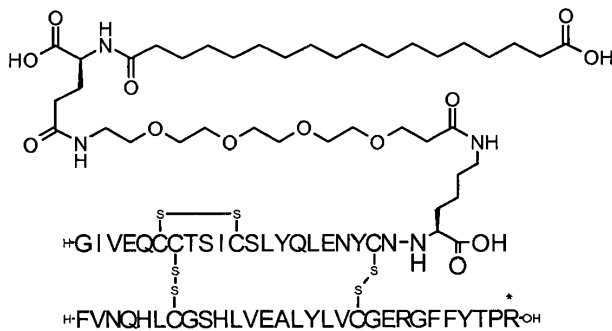
A22K(*N*<sup>ε</sup>-Eicosanodioil-γGlu-(3-[2-[2-(2-[2-(2-amino-etoxi)etoxi]etoxi)etoxi]etoxi]etoxi)propionil)), B29R, desB30 insulina humana



5 MS (electronebulización):  $m/z = 6653$  (Calc.: 6653).

**Ejemplo 14, Procedimiento general (A):**

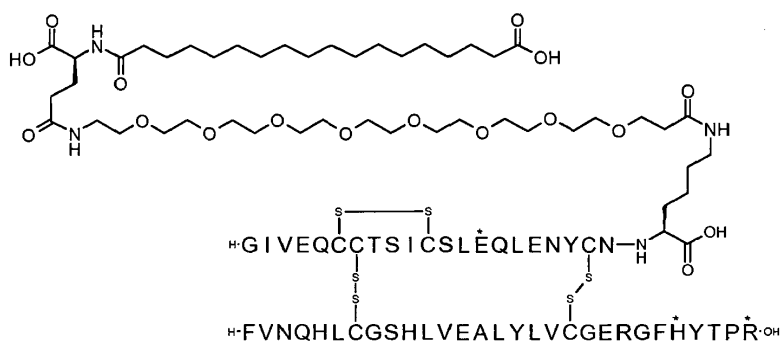
A22K(*N*<sup>ε</sup>-Octadecanodioil-γGlu-(3-[2-[2-(2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi)etoxi]etoxi]etoxi)propionil)), B29R, desB30 insulina humana



MALDI-TOF MS:  $m/z = 6535$  (Calc.: 6535)

10 **Ejemplo 15, Procedimiento general (A):**

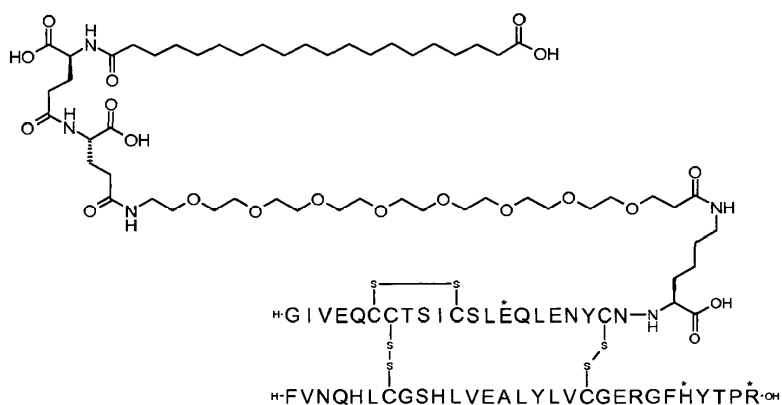
A14E, A22K(*N*<sup>ε</sup>-Octadecanodioil-γGlu-(3-[2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi)etoxi]etoxi)etoxi]propionil)), B25H, B29R, desB30 insulina humana



MS (electronebulización):  $m/z = 1667.9 (m+4)/4$ .

### Ejemplo 16, Procedimiento general (A):

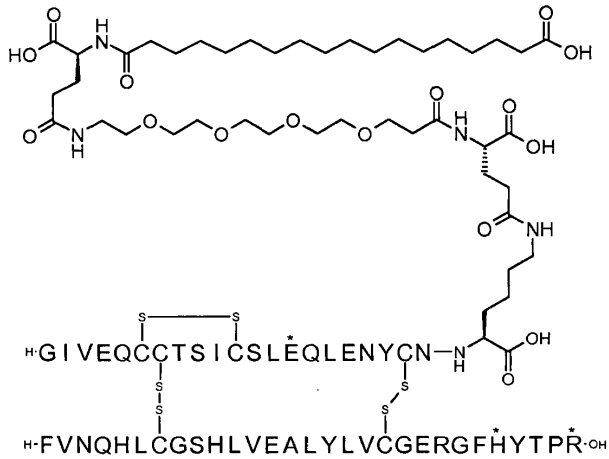
5 A14E, A22K( $\text{N}^{\text{E}}$ -Eicosanodioil- $\gamma$ Glu- $\gamma$ Glu-(3-[2-(2-{2-[2-(2-{2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propionil)), B25H, B29R, desB30 insulina humana



MALDI-TOF MS:  $m/z = 6824$  (Calc.: 6825)

### Ejemplo 17, Procedimiento general (A):

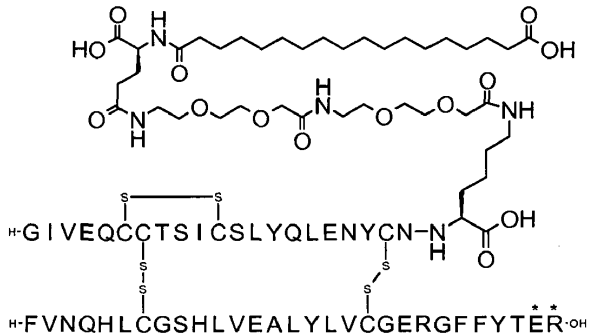
10 A14E, A22K( $\text{N}^{\text{E}}$ -Octadecanodioil- $\gamma$ Glu-(3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi]etoxi]propionil)- $\gamma$ Glu), B25H, B29R, desB30 insulina humana



MALDI-TOF MS: m/z = 6620 (Calc.: 6621)

**Ejemplo 18, Procedimiento general (A):**

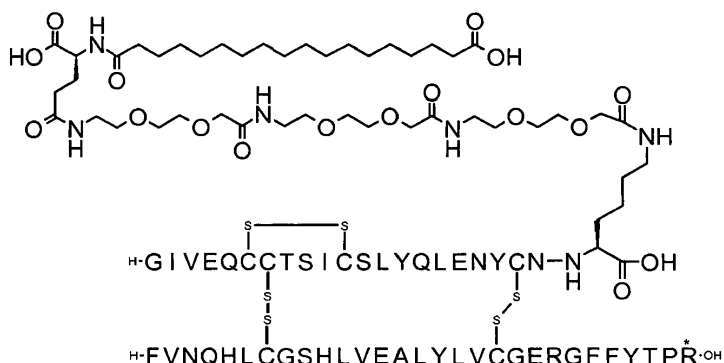
5 A22K(*N*<sup>ε</sup>-Octadecanodioil-γGlu-[2-(2-[2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil), B28E, B29R, desB30 insulina humana



MALDI-TOF MS: m/z = 6610 (Calc.: 6610)

**Ejemplo 19, Procedimiento general (A):**

10 A22K(*N*<sup>ε</sup>-Octadecanodioil-γGlu-[2-(2-[2-[2-(2-[2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]-acetilamino)etoxi]etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana



MALDI-TOF MS: m/z = 6724 (Calc.: 6724)

Las insulinas de los ejemplos siguientes se pueden preparar usando procedimientos similares:

**Ejemplo 20:**

- 5 A14E, A22K(*N*<sup>ε</sup>-[2-(2-[2-(2-(Eicosanodioil-γGlu)amino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi)-acetil]), B25H, B29R, desB30 insulina humana

**Ejemplo 21:**

A22K(*N*<sup>ε</sup>-Octadecanodioil-(3-(2-[2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi)etoxi)propionil-γGlu), B29R, desB30 insulina humana

**Ejemplo 22:**

- 10 A22K(*N*<sup>ε</sup>-Eicosanodioil-(3-(2-[2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi)etoxi)propionil-γGlu), B29R, desB30 insulina humana

**Ejemplo 23:**

A22K(*N*<sup>ε</sup>-Octadecanodioil-(2-aminoetil-PEG2000-ilacetil)), B29R desB30 insulina humana

**Ejemplo 24:**

A22K(*N*<sup>ε</sup>-Eicosanodioil-(2-aminoetil-PEG2000-ilacetil)), B29R desB30 insulina humana

- 15 **Ejemplo 25:**

A22K(*N*<sup>ε</sup>-3-(3-{4-[3-(15-Carboxipentadecanoilamino)propoxi]butoxi}propilcarbamoil)propionil-γGlu), B29R, desB30 insulina humana

**Ejemplo 26:**

A22K(*N*<sup>ε</sup>-3-(3-{4-[3-(17-Carboxiheptadecanoilamino)propoxi]butoxi}propilcarbamoil)propionil-γGlu), B29R desB30

insulina humana

**Ejemplo 27:**

A22K(N<sup>ε</sup>-Tetradecanodioil-(3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi)etoxi)propionil-γGlu), B29R, desB30 insulina humana

**Ejemplo 28:**

5 A8H, A22K(N<sup>ε</sup>-Octadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]-acetilamino)etoxi]etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana

**Ejemplo 29:**

A18L, A22K(N<sup>ε</sup>-Octadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]-etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana

10 **Ejemplo 30:**

A22K(N<sup>ε</sup>-Octadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)-etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana

**Ejemplo 31:**

15 A8H, A22K(N<sup>ε</sup>-Octadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)-etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana

**Ejemplo 32:**

A18L, A22K(N<sup>ε</sup>-Octadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)-etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana

**Ejemplo 33:**

20 A8H, A22K(N<sup>ε</sup>-Eicosanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]-etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana

**Ejemplo 34:**

A8H, A22K(N<sup>ε</sup>-Eicosanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]-etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana

25 **Ejemplo 35:**

A18L, A22K(N<sup>ε</sup>-Eicosanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]-etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana

**Ejemplo 36:**

A22K(N<sup>ε</sup>-Eicosanodioil-γGlu-[2-(2-[2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)-etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana

5 **Ejemplo 37:**

A8H, A22K(N<sup>ε</sup>-Eicosanodioil-γGlu-[2-(2-[2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana

**Ejemplo 38:**

10 A18L, A22K(N<sup>ε</sup>-Eicosanodioil-γGlu-[2-(2-[2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana

**Ejemplo 39:**

A8H, A22K(N<sup>ε</sup>-Hexadecanodioil-γGlu-[2-(2-[2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana

**Ejemplo 40:**

15 A8H, A22K(N<sup>ε</sup>-Hexadecanodioil-γGlu-[2-(2-[2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana

**Ejemplo 41:**

A18L, A22K(N<sup>ε</sup>-Hexadecanodioil-γGlu-[2-(2-[2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana

20 **Ejemplo 42:**

A22K(N<sup>ε</sup>-Hexadecanodioil-γGlu-[2-(2-[2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana

**Ejemplo 43:**

25 A8H, A22K(N<sup>ε</sup>-Hexadecanodioil-γGlu-[2-(2-[2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana

**Ejemplo 44:**

A18L, A22K(N<sup>ε</sup>-Hexadecanodioil-γGlu-[2-(2-[2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana



**Ejemplo 45:**

A22K(N<sup>ε</sup>-Hexadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana

**Ejemplo 46:**

5 A8H, A22K(N<sup>ε</sup>-Hexadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]-acetil), B29R, desB30 insulina humana

**Ejemplo 47:**

A18L, A22K(N<sup>ε</sup>-Hexadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana

10 **Ejemplo 48:**

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

15 La afinidad de los análogos de la insulina acilados de esta invención por el receptor de la insulina humana se determinó mediante un ensayo de captura de anticuerpo en una placa de microtitulación de ensayo SPA (Ensayo de centelleo por proximidad). Se mezclaron perlas de unión al anticuerpo SPA-PVT y reactivo anti-ratón (Amersham Biosciences, Cat No. PRNQ0017) con 25 ml de tampón de unión (HEPES 100 mM pH 7.8; cloruro de sodio 100 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, Tween-20 al 0.025%). La mezcla de reactivo para una única placa Optiplate Packard (Packard No. 6005190) estuvo compuesta por 2.4 μl de receptor de 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 Optiplate Packard y se preparó una serie de diluciones del derivado de la insulina en la Optiplate de las muestras apropiadas. Después las muestras se incubaron durante 16 horas mientras se agitaban suavemente. Luego las fases se separaron por centrifugación durante 1 min y las placas se contaron en un Topcounter. Los datos de unión se ajustaron usando el algoritmo de regresión no lineal en el GraphPad Prism 2.01 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Afinidades por el receptor de la insulina de las insulinas seleccionadas de la invención:

Ej. N°	Afinidad por RI-A (0% de HSA)	Afinidad por RI-A (4.5% de HSA)	Modificación	Insulina original (todas desB30 insulina humana)
	100%	100%		desB30 insulina humana
	102%	ND		A22K, B29R
	24.7%	ND		A14E, A22K, B25H, B29R
	9.2%	0.16%	C18-gGlu	desB30

ES 2 548 304 T3

Ej. N°	Afinidad por RI-A (0% de HSA)	Afinidad por RI-A (4.5% de HSA)	Modificación	Insulina original (todas desB30 insulina humana)
	168%	2.8%	C18-gGlu	A22K, B29R
4	161 %	14.0%	C18-gGlu-OEG-OEG	A22K, B29R
19	ND	30%	C18-gGlu-OEG-OEG-OEG	A22K, B29R
	149%	1.4%	C20-gGlu	A22K, B29R
6	148%	14.9%	C20-gGlu-OEG-OEG	A22K, B29R
18	162%	13.4%	C18-gGlu-OEG-OEG	A22K, B28E, B29R
10	339%	23.6%	C18-gGlu-OEG-OEG	A18L, A22K, B29R
11	417%	63%	C18-gGlu-OEG-OEG	A8H, A22K, B29R
7	22.4%	5.0%	C18-gGlu-OEG-OEG	A14E, A22K, B25H, B29R
8	132%	ND	C18-gGlu-OEG-OEG	A22K
12	190%	ND	C18-gGlu-OEG-OEG-gGlu	A22K, B29R
14	145%	27%	C18-gGlu-PEG3	A22K, B29R
17	23%	ND	C18-gGlu-PEG3-gGlu	A14E, A22K, B25H, B29R
15	28%	ND	C18-gGlu-PEG7	A14E, A22K, B25H, B29R
9	ND	5.2%	C20-gGlu-PEG3	A14E, A22K, B25H, B29R
13	175%	10.9%	C20-gGlu-PEG5	A14E, A22K, B25H, B29R

Ej. N°	Afinidad por RI-A (0% de HSA)	Afinidad por RI-A (4.5% de HSA)	Modificación	Insulina original (todas desB30 insulina humana)
16	25%	ND	C20-gGlu-gGlu-PEG7	A14E, A22K, B25H, B29R

**Ejemplo 49:**

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

5 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.

10 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 concentración de glucosa plasmática media (media ± SEM) para cada dosis y cada compuesto.

15 **Ejemplo 50:**

Potencia de los análogos de la insulina acilados de esta invención con respecto a la insulina humana

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.

20 **Protocolo experimental:**

25 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 Anorphin (0.06 mg/rata, s.c.) durante la anestesia y Rimadyl (1.5 mg/kg, s.c.) luego de la recuperación total de la anestesia (2-3 h) y nuevamente una vez por día durante 2 días.

30 A las 7 am del día del experimento, después de una noche en ayunas (desde las 3 pm del día anterior) las ratas se pesaron y se conectaron a las jeringas de extracción de muestras y al sistema de infusión (bombas básicas Harvard 22, Harvard, y jeringa hipodérmica de vidrio Perfectum, Aldrich) y después se colocaron en jaulas para clamp individuales, donde permanecieron durante casi 45 minutos antes del inicio del experimento. Las ratas pudieron moverse libremente en su lecho de paja habitual durante todo el experimento y tuvieron acceso libre a agua para beber. Después de un período basal de 30 min durante el cual se midieron los niveles de glucosa plasmática a intervalos de 10 min, se infundieron (*i.v.*) el derivado de la insulina a analizar y de la 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.

5 Cada día de experimento, se tomaron muestras de las soluciones de los derivados de la 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 la 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.

### Ejemplo 51:

#### Administración pulmonar de derivados de la insulina a ratas

10 La sustancia de prueba se dosificó pulmonarmente por el método de instilación de gotas. En resumen, se anestesiaron ratas Wistar machos (aprox. 250 g) con aproximadamente 60 ml de fentanilo/deshidrodenezperidol/dormicum administrados como una dosis de preparación s.c. de 6.6 ml/kg y seguido de 3 dosis de mantenimiento de 3.3 ml/kg s.c. 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  
15 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  
20 mantuvieron anestesiadas durante la prueba (se extrajeron muestras de sangre por hasta 4 u 8 h) y se sacrificaron luego del experimento.

#### Listado de secuencias

25 SEQ ID N°: 1 es la cadena A1-A21 de los ejemplos 1-6, 8, 12-14, 18 y 19. SEQ ID N°: 2 es la cadena B1-B29 de los ejemplos 1-6, 10-14 y 19. SEQ ID N°: 3 es la cadena A1-A21 de los ejemplos 7, 9 y 15-17. SEQ ID N°: 4 es la cadena B1-B29 de los ejemplos 7, 9 y 15-17. SEQ ID N°: 5 es la cadena A1-A21 del ejemplo 10. SEQ ID N°: 6 es la cadena A1-A21 del ejemplo 11. SEQ ID N°: 7 es la cadena B1-B29 del ejemplo 18. SEQ ID N°: 8 es la cadena B1-B28 del ejemplo 8.

#### Organización solicitante

Calle:

30 Ciudad:

Estado:

País:

Código postal:

Número de teléfono:

35 Número de fax:

Dirección de correo electrónico:

<110> Nombre de la organización: Novo Nordisk A/S

**Proyecto de la solicitud**

<120> Título: Análogos de la insulina con una fracción acilo y alquilenglicol

5 <130> Referencia del archivo de la solicitud: 7701.204-WO

<140> Número actual de la solicitud:

<141> Fecha actual de presentación: \_-\_-

Secuencia

<213> Nombre del organismo : Artificial

10 <400> Cadena presecuencia :

GIVEQCCTSI CSLYQLENYC N 21

<212> Tipo : PRT

<211> Longitud : 21 Nombre de la secuencia : 1 Descripción de la secuencia :

Secuencia

15 <213> Nombre del organismo : Artificial

<400> Cadena presecuencia :

FVNQHLCGSH LVEALYLVCG ERGFFYTPR 29

<212> Tipo : PRT

<211> Longitud : 29

20 Nombre de la secuencia : 2

Descripción de la secuencia :

Secuencia

<213> Nombre del organismo : Artificial

<400> Cadena presecuencia :

GIVEQCCTSI CSLEQLENYC N 21

5 <212> Tipo : PRT

<211> Longitud : 21

Nombre de la secuencia : 3

Descripción de la secuencia :

Secuencia

10 <213> Nombre del organismo : Artificial

<400> Cadena presecuencia :

FVNQHLCGSH LVEALYLVCG ERGFHYTPR 29

<212> Tipo : PRT

<211> Longitud : 29

15 Nombre de la secuencia : 4

Descripción de la secuencia :

Secuencia

<213> Nombre del organismo : Artificial

<400> Cadena presecuencia :

20 GIVEQCCTSI CSLYQLELYC N 21

<212> Tipo : PRT

<211> Longitud : 21

Nombre de la secuencia : 5

Descripción de la secuencia :

Secuencia

5 <213> Nombre del organismo : Artificial

<400> Cadena presecuencia :

GIVEQCCHSI CSLYQLENYC N 21

<212> Tipo : PRT

<211> Longitud : 21

10 Nombre de la secuencia : 6

Descripción de la secuencia :

Secuencia

<213> Nombre del organismo : Artificial

<400> Cadena presecuencia :

15 FVNQHLCGSH LVEALYLVCG ERGFFYTER 29

<212> Tipo : PRT

<211> Longitud : 29

Nombre de la secuencia : 7

Descripción de la secuencia :

20 Secuencia

<213> Nombre del organismo : Artificial

<400> Cadena presecuencia :

FVNQHLCGSH LVEALYLVCG ERGFFYTP 28

<212> Tipo : PRT

<211> Longitud : 28

5 Nombre de la secuencia : 8

Descripción de la secuencia :



**REIVINDICACIONES**

1. Un análogo de la insulina acilado que contiene:

un residuo de lisina unido C-terminalmente al residuo de aminoácido en la posición A21; o

5 hasta 4 residuos de aminoácidos que comprenden un residuo de lisina, donde dichos residuos peptídicos están unidos C-terminalmente al residuo de aminoácido en la posición A21; y

donde dicho análogo de la insulina se caracteriza porque una fracción acilo que contiene una fracción alquilenglicol está unida al residuo de lisina en la posición A22, o unido a hasta 4 residuos de aminoácidos que comprenden el residuo de lisina que está unido al extremo C terminal del residuo de aminoácido en la posición A21;

10 donde hay un solo residuo de lisina (K, Lys) en el análogo de la insulina; y

donde el residuo de aminoácido en la posición B30 del análogo de la insulina está ausente.

2. El análogo de la insulina acilado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la fracción acilo tiene la fórmula general I:



15 en la que

n es 0 o un número entero en el intervalo 1-3;

m es 0 o un número entero en el intervalo 1-6;

p es 1, 2 o 3;

20 Acy es un ácido graso o un diácido graso que contiene entre 8 y 24 átomos de carbono de los cuales se ha eliminado un grupo hidroxilo de un grupo carboxilo del ácido graso o de uno de los grupos carboxilo del diácido graso;

AA1 es un aminoácido cíclico neutro del cual se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino y se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxilo;

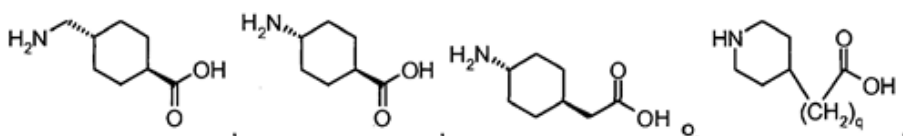
25 AA2 es un aminoácido ácido del cual se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino y se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxilo;

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

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

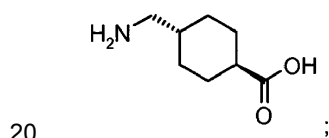
las uniones entre Acy, AA1, AA2 y/o AA3 son enlaces amida (peptídicos), y la unión a la insulina original puede ser desde el extremo C-terminal del residuo AA1, AA2 o AA3 en la fracción acilo de fórmula (I), o desde una de las cadenas laterales del residuo AA2 presente en la fracción acilo de fórmula (I).

- 5 3. El análogo de la insulina acilado de acuerdo con la reivindicación 2, en el que Acy es un ácido graso o un diácido graso que contiene entre 14 y 20 átomos de carbono, del cual se ha eliminado un grupo hidroxilo de un grupo carboxi del ácido graso o de uno de los grupos carboxi del diácido graso.
4. El análogo de la insulina acilado de acuerdo con la reivindicación 2, en el que Acy es un ácido dicarboxílico del cual se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxi del ácido graso o de uno de los grupos carboxi del diácido graso.
- 10 5. El análogo de la insulina acilado de acuerdo con la reivindicación 2, en el que Acy es ácido tetradecanodioico, ácido pentadecanodioico, ácido hexadecanodioico, ácido heptadecanodioico, ácido octadecanodioico o ácido eicosanodioico, del cual se ha eliminado un grupo hidroxilo.
6. El análogo de la insulina acilado de acuerdo con la reivindicación 2, en el que Acy es ácido hexadecanodioico, ácido octadecanodioico o ácido eicosanodioico, del cual se ha eliminado un grupo hidroxilo.
- 15 7. El análogo de la insulina acilado de acuerdo con la reivindicación 2, en el que AA1 se elige entre:



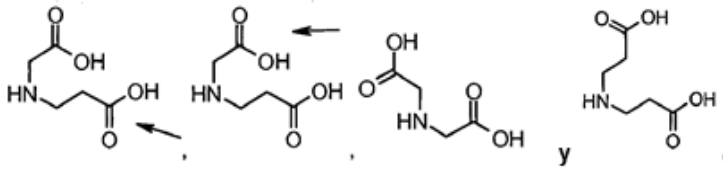
del cual se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino y se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxi, y en el que q es 0, 1, 2, 3 o 4.

8. El análogo de la insulina acilado de acuerdo con la reivindicación 7, en el que AA1 es:



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

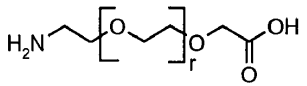
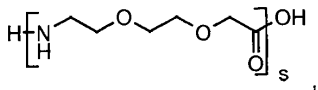
9. El análogo de la insulina acilado de acuerdo con la reivindicación 2, en el que AA2 se elige entre  $\gamma$ Glu,  $\beta$ Asp o cualquiera de los compuestos siguientes:



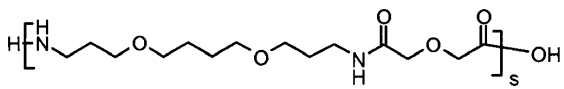
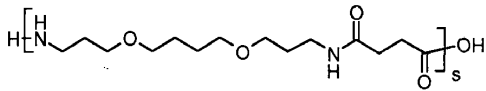
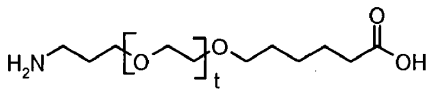
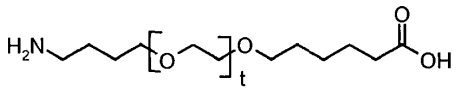
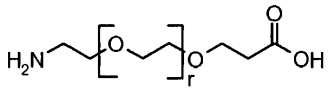
del cual se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino y se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxilo, y donde las flechas indican el punto de unión al grupo amino de AA1, AA2 o AA3.

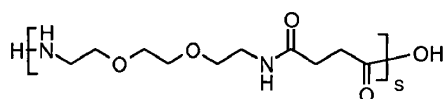
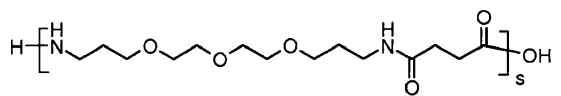
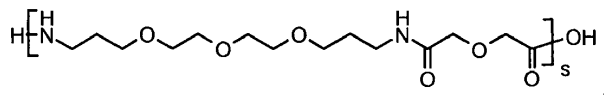
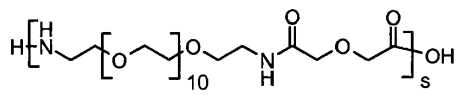
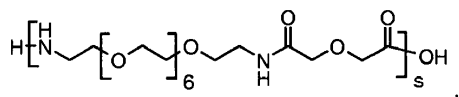
5 10. El análogo de la insulina acilado de acuerdo con la reivindicación 9, en el que AA2 es  $\gamma$ Glu, del cual se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino y se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxilo.

11. El análogo de la insulina acilado de acuerdo con la reivindicación 2, en el que AA3 se elige entre cualquiera de los compuestos siguientes:



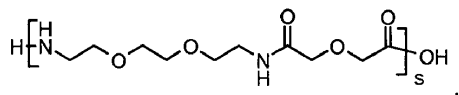
10





5

y



r es un número entero en el intervalo 1-100;

s es un número entero en el intervalo 1-30;

10 t es un número entero en el intervalo 1-150;

y del cual se ha eliminado un átomo de hidrógeno del grupo amino y se ha eliminado un grupo hidroxilo del grupo carboxilo.

12. El análogo de la insulina acilado de acuerdo con la reivindicación 11, en el que r es 1, 2, 3, 4, 5, 7, 11, 23 o 27.

13. El análogo de la insulina acilado de acuerdo con la reivindicación 11, en el que s es 1, 2, 3, 4, 10, 20 o 30.

15 14. El análogo de la insulina acilado de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la fracción acilo de fórmula  $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$ , en la que Acy, AA1, AA2, AA3, n, m y p son los definidos antes, está unida a un residuo de lisina en la posición A22.

15. El análogo de la insulina acilado de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la fracción acilo de fórmula  $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$ , en la que Acy, AA1, AA2, AA3, n, m y p son los definidos antes, está unida a un residuo de lisina

en la posición A23.

16. El análogo de la insulina acilado de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la fracción acilo de fórmula  $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$ , en la que Acy, AA1, AA2, AA3, n, m y p son los definidos antes, está unida a un residuo de lisina en la posición A24.

5 17. El análogo de la insulina acilado de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la fracción acilo de fórmula  $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$ , en la que Acy, AA1, AA2, AA3, n, m y p son los definidos antes, está unida a un residuo de lisina en la posición A25.

18. El análogo de la insulina acilado de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el residuo de aminoácido en la posición A14 del análogo de la insulina es E.

10 19. El análogo de la insulina acilado de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el residuo de aminoácido en la posición A22 del análogo de la insulina es K o G.

20. El análogo de la insulina acilado de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el residuo de aminoácido en la posición A22 del análogo de la insulina es K.

15 21. El análogo de la insulina acilado de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el residuo de aminoácido en la posición A22 del análogo de la insulina es K y en el que no hay ningún residuo de aminoácido unido al extremo C terminal de dicho residuo de aminoácido A22K.

22. El análogo de la insulina acilado de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el residuo de aminoácido en la posición B28 del análogo de la insulina es D, E o R.

20 23. El análogo de la insulina acilado de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el residuo de aminoácido en la posición B29 del análogo de la insulina es R.

24. El análogo de la insulina acilado de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la fracción acilo de fórmula general  $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$  tiene una de las fórmulas generales  $\text{Acy-AA3}_p$ ,  $\text{Acy-AA2-AA3}_p$ ,  $\text{Acy-AA2-AA3-AA2}_p$ ,  $\text{Acy-AA2-(AA3)}_2$ ,  $\text{Acy-AA2-(AA3)}_2\text{-AA2}$  o  $\text{Acy-AA3-AA2}_p$ , en las que Acy, AA2 y AA3 son, cada uno, los definidos en la reivindicación 2.

25 25. El análogo de la insulina acilado de acuerdo con la reivindicación 1, que es cualquiera de los compuestos siguientes:

$\text{A22K(N}^\epsilon\text{-hexadecanodioil-(3-(2-[2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi)etoxi)propionil-\gamma\text{Glu))}$ , B29R, desB30 insulina humana;

$\text{A22K(N}^\epsilon\text{-hexadecanodioil-(2-aminoetil-PEG2000-ilacetil))}$ , B29R, desB30 insulina humana;

30  $\text{A22K(N}^\epsilon\text{-3-(3-[4-[3-(5-carboxipentanoilamino)propoxi]butoxi]propilcarbamoil)propionil-\gamma\text{Glu))}$ , B29R, desB30 insulina humana;

$\text{A22K(N}^\epsilon\text{-[2-(2-[2-(2-[2-(octadecanodioil-\gamma\text{Glu)amino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]-etoxi]acetil))}$ , B29R, desB30 insulina humana;

$\text{A22K(N}^\epsilon\text{-3-(3-[4-[3-(13-carboxitridecanoilamino)propoxi]butoxi]propilcarbamoil)-propionil-\gamma\text{Glu))}$ , B29R,

- desB30 insulina humana;
- A22K(N<sup>f</sup>-[2-(2-[2-(2-[2-(eicosanodioil-γGlu)amino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil)), B29R, desB30 insulina humana;
- 5 A14E, A22K(N<sup>f</sup>-[2-(2-[2-(2-[2-(octadecanodioil-γGlu)amino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]-acetil)), B25H, B29R, desB30 insulina humana
- A22K(N<sup>f</sup>-octadecanodioil-γGlu-[2-(2-[2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)-etoxi]acetil), desB29, desB30 insulina humana;
- A14E, A22K(N<sup>f</sup>-eicosanodioil-γGlu-(3-(2-[2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi)etoxi]propionil)), B25H, B29R, desB30 insulina humana;
- 10 A18L, A22K(N<sup>f</sup>-octadecanodioil-γGlu-[2-(2-[2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)-etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana;
- A8H, A22K(N<sup>f</sup>-octadecanodioil-γGlu-[2-(2-[2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)-etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana;
- 15 A22K(N<sup>f</sup>-octadecanodioil-γGlu-[2-(2-[2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)-etoxi]acetil-γGlu), B29R, desB30 insulina humana;
- A22K(N<sup>f</sup>-eicosanodioil-γGlu-(3-[2-[2-(2-[2-(2-amino-etoxi)etoxi]etoxi)etoxi]etoxi]etoxi]-propionil)), B29R, desB30 insulina humana;
- A22K(N<sup>f</sup>-octadecanodioil-γGlu-(3-(2-[2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi)etoxi]propionil)), B29R, desB30 insulina humana;
- 20 A14E, A22K(N<sup>f</sup>-octadecanodioil-γGlu-(3-[2-(2-[2-[2-(2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi]etoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]propionil)), B25H, B29R, desB30 insulina humana;
- A14E, A22K(N<sup>f</sup>-eicosanodioil-γGlu-γGlu-(3-[2-(2-[2-[2-(2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi]etoxi)etoxi]etoxi]etoxi]propionil)), B25H, B29R, desB30 insulina humana;
- 25 A14E, A22K(N<sup>f</sup>-octadecanodioil-γGlu-(3-(2-[2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi)etoxi]-propionil)-γGlu), B25H, B29R, desB30 insulina humana;
- A22K(N<sup>f</sup>-octadecanodioil-γGlu-[2-(2-[2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)-etoxi]acetil), B28E, B29R, desB30 insulina humana;
- A22K(N<sup>f</sup>-octadecanodioil-γGlu-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)-etoxi]etoxi]-acetilamino)etoxi]etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana;
- 30 A14E, A22K(N<sup>f</sup>-[2-(2-[2-(2-[2-(eicosanodioil-γGlu)amino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]-acetil)), B25H, B29R, desB30 insulina humana;
- A22K(N<sup>f</sup>-octadecanodioil-(3-(2-[2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi)etoxi]propionil-γGlu), B29R, desB30 insulina

humana;

A22K(N<sup>f</sup>-eicosanodioil-(3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi}etoxi)propionil-γGlu), B29R, desB30 insulina humana;

A22K(N<sup>f</sup>-octadecanodioil-(2-aminoetil-PEG2000-ilacetil)), B29R, desB30 insulina humana;

5 A22K(N<sup>f</sup>-eicosanodioil-(2-aminoetil-PEG2000-ilacetil)), B29R, desB30 insulina humana;

A22K(N<sup>f</sup>-3-(3-{4-[3-(15-carboxipentadecanoilamino)propoxi]butoxi}propilcarbamoil)propionil-γGlu), B29R, desB30 insulina humana;

A22K(N<sup>f</sup>-3-(3-{4-[3-(17-carboxiheptadecanoilamino)propoxi]butoxi}propilcarbamoil)propionil-γGlu), B29R, desB30 insulina humana;

10 A22K(N<sup>f</sup>-tetradecanodioil-(3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi}etoxi)propionil-γGlu), B29R, desB30 insulina humana;

A8H, A22K(N<sup>f</sup>-octadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]-acetilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana;

15 A18L, A22K(N<sup>f</sup>-octadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana;

A22K(N<sup>f</sup>-octadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]-acetilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana;

20 A8H, A22K(N<sup>f</sup>-octadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]-acetilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana;

A18L, A22K(N<sup>f</sup>-octadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]-acetilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana;

25 A8H, A22K(N<sup>f</sup>-eicosanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]-acetilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana;

A8H, A22K(N<sup>f</sup>-eicosanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]-acetilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana;

30 A18L, A22K(N<sup>f</sup>-eicosanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]-acetilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana;

A22K(N<sup>f</sup>-eicosanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetil-amino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana;

A8H, A22K(N<sup>f</sup>-eicosanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]-

- acetilamino}etoxi}etoxi]acetilamino}etoxi}etoxi]acetilamino}etoxi}etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana;
- 5 A18L, A22K(*N*<sup>ε</sup>-eicosanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]-acetilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana;
- A8H, A22K(*N*<sup>ε</sup>-hexadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]-acetilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana;
- A8H, A22K(*N*<sup>ε</sup>-hexadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetil-amino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana;
- 10 A18L, A22K(*N*<sup>ε</sup>-hexadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana;
- 15 A22K(*N*<sup>ε</sup>-hexadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]-acetilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana; A8H, A22K(*N*<sup>ε</sup>-hexadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]-acetilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana;
- A18L, A22K(*N*<sup>ε</sup>-hexadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]-acetilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana;
- 20 A22K(*N*<sup>ε</sup>-hexadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)-etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana;
- A8H, A22K(*N*<sup>ε</sup>-hexadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino}etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana; y
- 25 A18L, A22K(*N*<sup>ε</sup>-hexadecanodioil-γGlu-[2-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino}-etoxi)etoxi]acetil), B29R, desB30 insulina humana.

26. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 para usar como un medicamento.

27. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, para la preparación de un medicamento destinado el tratamiento de la diabetes.