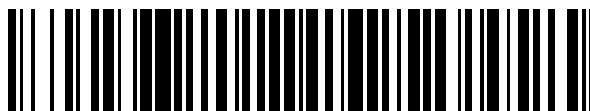


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 154**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 14/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2007 E 07728892 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 2024390**

54 Título: **Derivado de la insulina**

30 Prioridad:

09.05.2006 EP 06113711

01.08.2006 EP 06118254

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.12.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**JONASSEN, IB;
GARIBAY, PATRICK WILLIAM y
KODRA, JANOS TIBOR**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 553 154 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Derivado de la insulina

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a nuevos derivados de la insulina humana que son solubles a valores de pH fisiológico y tienen un perfil de acción prolongada. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen dichos derivados, a métodos para tratar la diabetes y la hiperglucemia empleando los derivados de la insulina de la invención, y al uso de dichos derivados de la insulina en el tratamiento de la diabetes y la hiperglucemia.

Antecedentes de la invención

- 10 En la actualidad, el tratamiento de la diabetes, tanto de la diabetes tipo 1 como de la diabetes tipo 2, se basa en una medida cada vez mayor en el denominado tratamiento intensivo con insulina. De acuerdo con este régimen, los pacientes se tratan con múltiples inyecciones diarias de insulina que comprenden una o dos inyecciones diarias de una insulina de acción prolongada para cubrir el requerimiento de insulina basal complementadas con inyecciones en bolo de una insulina de acción rápida para cubrir el requerimiento de insulina relacionado con las comidas.

- 15 Las composiciones de insulina de acción prolongada son bien conocidas en el área. Así, un tipo principal de composiciones de insulina de acción prolongada comprende suspensiones acuosas inyectables de cristales de insulina o insulina amorfa. En estas composiciones, los compuestos de insulina utilizados generalmente son insulina protamina, insulina zinc o insulina protamina con zinc.

- 20 Ciertos inconvenientes se asocian con el uso de suspensiones de insulina. Por lo tanto, para asegurar una dosificación exacta, las partículas de insulina se deben suspender homogéneamente mediante agitación suave antes de que un volumen definido de la suspensión sea extraído de un vial o expelido desde un cartucho. Asimismo, para el almacenamiento de las suspensiones de insulina, la temperatura se debe mantener dentro de límites más estrechos que para las soluciones de insulina a fin de evitar la formación de grumos o la coagulación.

- 25 WO 95/07931 (Novo Nordisk A/S) da a conocer derivados de la insulina humana en los que el grupo ϵ -amino de la Lys^{B29} tiene un sustituyente lipófilo. Estos derivados de la insulina tienen un perfil de acción prolongada y son solubles a valores de pH fisiológico.

La solicitud de patente internacional publicada con el número WO 2005/012347 (Novo Nordisk A/S) se refiere a derivados de la insulina que tienen una cadena lateral unida o bien al grupo α -amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B o al grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B.

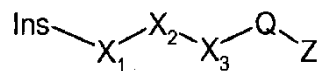
- 30 La solicitud de patente internacional N° EP2006/050593 (Novo Nordisk A/S) da a conocer derivados de la insulina que tienen al menos un grupo aromático en la cadena lateral.

La solicitud de patente US3528960 (Eli Lilly, Co.) da a conocer un derivado de la insulina que tiene una cadena lateral que contiene un grupo aromático.

- 35 No obstante, todavía existe la necesidad de una insulina que tenga un perfil de acción más prolongada que los derivados de la insulina conocidos hasta el momento.

Resumen de la invención

La invención se refiere a un derivado de la insulina que tiene una fórmula



- 40 en la que Ins es una molécula de insulina original y X₁-X₂-X₃-Q-Z es un sustituyente y en la que Ins está unida al sustituyente a través de un enlace amida entre el grupo α -amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B de Ins o un grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena A o B de Ins y un grupo CO en X₁, X₂ o X₃ del sustituyente;

X₁ es:

- -CO-(CH₂)_n donde n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6;
- 45 • -CO-((CR⁶R⁷)_q-NR-CO)₁₋₄, donde R⁶ y R⁷ independientemente uno de otro e independientemente para cada valor de q pueden ser hidrógeno, C₁₋₆-alquilo, C₂₋₆-alqueniilo, C₂₋₆-alquinilo, -(CH₂)₁₋₆-COOH; -(CH₂)₁₋₆-CONH₂; -(CH₂)₁₋₆-SO₃H; -(CH₂)₁₋₆-PO₃H₂; -(CH₂)₁₋₆-O-SO₃H₂; -(CH₂)₁₋₆-O-PO₃H, q es 1-6 y R es hidrógeno, -(CH₂)₁₋₆-COOH; -(CH₂)₁₋₆-CONH₂; -(CH₂)₁₋₆-SO₃H; -(CH₂)₁₋₆-PO₃H₂; -(CH₂)₁₋₆-O-SO₃H₂; -(CH₂)₁₋₆-O-PO₃H₂; C₁₋₆-alquilo, C₂₋₆-alqueniilo; C₂₋₆-alquinilo o arilo o CH₂-arilo, donde el grupo arilo puede estar sustituido con 1 o 2 grupos

elegidos del grupo que consiste en $-\text{COOH}$, $-\text{CH}_3$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{-SO}_3\text{H}$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$, $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{-O-PO}_3\text{H}_2$, tetrazo-5-lilo o CONH_2 , C_{1-6} -alquilo, C_{2-6} -alqueno, C_{2-6} -alquino, hidrógeno, halógeno, $-\text{CN}$, $-\text{CF}_3$, $-\text{OCF}_3$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{CF}_3$, $-\text{SCF}_3$, $-\text{NO}_2$, $-\text{OR}^2$, $-\text{SR}^2$, $-\text{NR}^2\text{S}(\text{O})_2\text{R}^3$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^2\text{R}^3$, $-\text{S}(\text{O})\text{NR}^2\text{R}^3$, $-\text{S}(\text{O})\text{R}^2$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^2$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^2\text{R}^3$, $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}^2\text{R}^3$, $-\text{NR}^2\text{C}(\text{O})\text{R}^3$, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NR}^2\text{R}^3$, $-\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})\text{NR}^2\text{R}^3$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^2$, $-\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})\text{R}^2$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^2$ o $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^2$ o $-\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})\text{OR}^2$, donde R^2 y R^3 son independientemente hidrógeno, C_{1-6} -alquilo, C_{2-6} -alqueno o C_{2-6} -alquino,

- 5
- un residuo de aminoácido amida de un aminoácido con ácido carboxílico en la cadena lateral, o un aminoácido con una cadena lateral no cargada, o un aminoácido con una cadena lateral cargada negativamente, donde dicho residuo forma, con su grupo ácido carboxílico, un enlace amida junto con el grupo α -amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B de Ins o junto con el grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena A o B de Ins,

10

 - una cadena compuesta de dos, tres o cuatro residuos unidos entre sí mediante enlaces amida donde los residuos se eligen del grupo que consiste en: residuos de α -aminoácidos amida y residuos de aminoácidos como los especificados antes, donde la cadena está unida mediante un enlace amida al grupo α -amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B de Ins o al grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena A o B de Ins, o

15

 - un enlace

X_2 es:

- $-\text{CO}-$

20

 - $-\text{COCH}(\text{R}^8)-;$
 - $-\text{COCH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{R}^8)-;$
 - $-\text{COCH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{R}^8)\text{COCH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{R}^8)-;$
 - $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{R}^8)-;$
 - $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{R}^8)\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{R}^8)-;$

25

 - $-\text{COCH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{R}^8)-;$
 - $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{R}^8)-;$ donde R^8 puede ser COOH o CONH_2
 - $-\text{CO}-((\text{CH}_2)_{2-6}\text{-NH-CO})_{1-4}-;$
 - $-(\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2-6}\text{-CO-NH})_{1-4}-;$

30

 - $-(\text{CO}-(\text{CR}^9\text{R}^{10})_{1-6}\text{-CO-NH})_{1-4}-$, donde R^9 puede ser H, $-\text{COOH}$, $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{COOH}$, CH_3 , $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{CH}_3$ o CONH_2 y R^{10} puede ser H, $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{COOH}$, CH_3 o $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{CH}_3$;
 - un enlace

siempre que si una amina en X_1 o X_2 forma un enlace con el resto del sustituyente, la amina debe estar unida al resto del sustituyente a través de un grupo carbonilo.

X_3 es $-\text{C}=\text{O}$, siempre que X_3 sólo esté presente si X_1 y X_2 son enlaces.

35 Q es

una cadena de fórmula $-(\text{CH}_2)_{s1}\text{-Q}_1\text{-(CH}_2)_{s2}\text{-Q}_2\text{-(CH}_2)_{s3}\text{-Q}_3\text{-(CH}_2)_{s4}\text{-Q}_4\text{-(CH}_2)_{s5}\text{-}$; en la que Q_1 , Q_2 y Q_3 son todos enlaces, Q_4 es C_6H_4 , s_2 , s_3 y s_4 son todos uno, s_1 es 5, 6, 7 u 8 y s_5 es 0, 1 o 2,

y

Z es:

- 40
- $-\text{COOH};$
 - $-\text{CO-Asp};$
 - $-\text{CO-Glu};$
 - $-\text{CO-Gly};$

-CO-Sar;
 -CH(COOH)₂;
 -N(CH₂COOH)₂;
 -SO₃H
 5 -PO₃H₂;
 O-SO₃H;
 O-PO₃H₂; o
 tetrazo-5-lilo;

y cualquier complejo de Zn²⁺ de éstos.

10 Definiciones

Por "análogo de la insulina" según se usa en este documento se quiere dar a entender un polipéptido que tiene una estructura molecular que formalmente puede ser derivada de la estructura de una insulina de origen natural, por ej., la de la insulina humana, eliminando y/o sustituyendo al menos un residuo de aminoácido presente en la insulina natural y/o agregando al menos un residuo de aminoácido. Los residuos de aminoácidos agregados y/o sustituidos
 15 pueden ser residuos de aminoácidos codificables u otros residuos de origen natural o residuos de aminoácidos puramente sintéticos. En aspectos de la invención se modificaron un máximo de 17 aminoácidos. Los análogos de la insulina pueden ser aquellos en los que la posición 28 de la cadena B se puede modificar del residuo Pro natural a uno de Asp, Lys o Ile. En otro aspecto Lys en la posición B29 se modifica a Pro. Asimismo, Asn en la posición A21 se puede modificar a Ala, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, en particular a Gly, Ala, Ser o Thr y preferentemente a Gly. Además, Asn en la posición B3 se puede modificar a Lys o Asp. Otros ejemplos de análogos de la insulina son des(B30) insulina humana; análogos de la des(B30) insulina humana; análogos de la insulina en los que PheB1 ha sido eliminado; análogos de la insulina en los que la cadena A y/o la cadena B tienen una extensión N-terminal y análogos de la insulina en los que la cadena A y/o la cadena B tienen una extensión C-terminal. Por lo tanto se pueden agregar una o dos Arg en la posición B1.

25 En aspectos de la invención se modificaron un máximo de 15 aminoácidos. En aspectos de la invención se modificaron un máximo de 10 aminoácidos. En aspectos de la invención se modificaron un máximo de 8 aminoácidos. En aspectos de la invención se modificaron un máximo de 7 aminoácidos. En aspectos de la invención se modificaron un máximo de 6 aminoácidos. En aspectos de la invención se modificaron un máximo de 5 aminoácidos. En aspectos de la invención se modificaron un máximo de 4 aminoácidos. En aspectos de la invención
 30 se modificaron un máximo de 3 aminoácidos. En aspectos de la invención se modificaron un máximo de 2 aminoácidos. En aspectos de la invención se modificó 1 aminoácido.

Con "desB30 insulina", "desB30 insulina humana" se quiere dar a entender una insulina natural o un análogo de ésta que carece del residuo de aminoácido B30. De manera similar, "desB29desB30 insulina" o "desB29desB30 insulina humana" significa una insulina natural o un análogo de ésta que carece de los residuos de aminoácidos B29 y B30.

35 Con "B1", "A1" etc. se quiere dar a entender el residuo de aminoácido en la posición 1 de la cadena B de la insulina (contando desde el extremo N-terminal) y el residuo de aminoácido en la posición 1 de la cadena A de la insulina (contando desde el extremo N-terminal), respectivamente. El residuo de aminoácido en una posición específica también se puede indicar como, por ejemplo, PheB1 que significa que el residuo de aminoácido en la posición B1 es un residuo de fenilalanina.

40 Con "insulina" según se usa en este documento se quiere dar a entender insulina humana, insulina porcina o insulina bovina con puentes disulfuro entre CysA7 y CysB7 y entre CysA20 y CysB19, y un puente disulfuro interno entre CysA6 y CysA11.

Por "insulina original" se quiere dar a entender una insulina de origen natural como la insulina humana o la insulina porcina. Alternativamente, la insulina original puede ser un análogo de la insulina.

45 La expresión "no cargada" significa que no hay presentes un grupo ni más grupos que asumirían una carga en el intervalo de pH entre 4 y 9. Por ejemplo no hay presentes ácidos carboxílicos libres.

La expresión "cargado(a) negativamente" significa que hay al menos un grupo presente que asumiría una carga negativa en el intervalo de pH entre 4 y 9.

50 Cuando se indica que un derivado de la insulina según la invención es "soluble a valores de pH fisiológico" significa que el derivado de la insulina se puede usar para preparar composiciones de insulina que se disuelven completamente a valores de pH fisiológico. Dicha solubilidad favorable se puede deber a propiedades inherentes al

derivado de la insulina solo o como resultado de una interacción favorable entre el derivado de la insulina y uno o más ingredientes contenidos en el vehículo.

"Residuo de aminoácido amida" significa la alfa-carboxi amida de un aminoácido, o si el aminoácido contiene un ácido carboxílico en la cadena lateral, "aminoácido amida" significa la amida del grupo alfa-carboxi, o la amida del grupo carboxi de la cadena lateral, según se especifique.

El término "arileno" según se usa en este documento pretende incluir sistemas de anillo aromáticos carbocíclicos divalentes como fenileno, bifenilileno, naftileno, antracencileno, fenantrenileno, fluorenileno, indenileno, pentalenileno, azulencileno y similares. Arileno también pretende incluir los derivados parcialmente hidrogenados de los sistemas carbocíclicos enumerados antes. Los ejemplos no limitantes de dichos derivados parcialmente hidrogenados son 1,2,3,4-tetrahidronaftileno, 1,4-dihidronaftileno y similares. En una realización de la presente invención "arileno" representa fenileno.

El término "heteroarileno" según se usa en este documento pretende incluir sistemas de anillos heterocíclicos aromáticos que contienen uno o más heteroátomos elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre como furilo, tienilo, pirrolilo, oxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, isoxazolilo, isotiazolilo, 1,2,3-triazolilo, 1,2,4-triazolilo, piranilo, piridilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, 1,2,3-triazinilo, 1,2,4-triazinilo, 1,3,5-triazinilo, 1,2,3-oxadiazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo, 1,2,5-oxadiazolilo, 1,3,4-oxadiazolilo, 1,2,3-tiadiazolilo, 1,2,4-tiadiazolilo, 1,2,5-tiadiazolilo, 1,3,4-tiadiazolilo, tetrazolilo, tiadiazinilo, indolilo, isoindolilo, benzofurilo, benzotienilo, indazolilo, bencimidazolilo, benzotiazolilo, bencisotiazolilo, benzoxazolilo, bencisoxazolilo, purinilo, quinazolinilo, quinolizínico, quinolinilo, isoquinolinilo, quinoxalinilo, naftiridinilo, pteridinilo, carbazolilo, azepinilo, diazepinilo, acridinilo y similares. Heteroarileno también pretende incluir los derivados parcialmente hidrogenados de los sistemas heterocíclicos enumerados antes. Los ejemplos no limitantes de dichos derivados parcialmente hidrogenados son 2,3-dihidrobenzofuranilo, benzodioxanilo, benzoxanilo, metilendioxibenceno, óxido de difenileno, pirrolinilo, pirazolinilo, indolinilo, oxazolidinilo, oxazolinilo, oxazepinilo y similares.

En una realización de la presente invención el término "heteroarilo" representa furilo, tienilo, tiazolilo, tetrazolilo, piridilo, oxazolilo, 2,3-dihidrobenzofuranilo, benzodioxanilo, benzoxanilo, metilendioxibenceno, óxido de difenileno, pirrolinilo, pirazolinilo, indolinilo, oxazolidinilo, oxazolinilo, oxazepinilo.

"Halógeno" designa un átomo elegido del grupo que consiste en F, Cl, Br y I.

La expresión "C₁₋₆-alquilo" según se usa en este documento representa un grupo hidrocarburo saturado, lineal o ramificado, que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos representativos incluyen, pero no exclusivamente, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, *tert*-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, *tert*-pentilo, n-hexilo, isohexilo y similares.

La expresión "C₂₋₆-alqueno" según se usa en este documento representa un grupo hidrocarburo, lineal o ramificado, que tiene de 2 a 6 átomos de carbono y al menos un doble enlace. Los ejemplos de dichos grupos incluyen, pero no exclusivamente, vinilo, 1-propenilo, 2-propenilo, *iso*-propenilo, 1,3-butadienilo, 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo, 2-metil-1-propenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-pentenilo, 4-pentenilo, 3-metil-2-butenilo, 1-hexenilo, 2-hexenilo, 3-hexenilo, 2,4-hexadienilo, 5-hexenilo y similares.

La expresión "C₂₋₆-alquino" según se usa en este documento representa un grupo hidrocarburo, lineal o ramificado, que tiene de 2 a 6 átomos de carbono y al menos un triple enlace. Los ejemplos de dichos grupos incluyen, pero no exclusivamente, etinilo, 1-propinilo, 2-propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 3-butinilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo, 3-pentinilo, 4-pentinilo, 1-hexinilo, 2-hexinilo, 3-hexinilo, 4-hexinilo, 5-hexinilo, 2,4-hexadinilo y similares.

Se han empleado las abreviaturas siguientes en la memoria y los ejemplos:

CV:	volumen de la columna
EDTA:	ácido etilendiaminotetraacético
HI:	insulina humana
HPLC:	cromatografía líquida de alta resolución
HAS:	seroalbúmina humana
LC:	cromatografía líquida
MALDI:	Desorción/Ionización por impacto Láser Asistida por Matriz
MS:	espectrometría de masas
NMP:	N-metil-2-pirrolidona

	RT:	temperatura ambiente
	SEC:	cromatografía de exclusión por tamaño
	SPA:	Ensayo de Centelleo por Proximidad
	Tris:	tris(hidroximetil)aminometano
5	vol%:	porcentaje de volumen
	O.D.:	densidad óptica = absorbancia
	Monómero X2:	AspB9 GluB27 insulina humana
	hGlu:	ácido homo glutámico
	Aad:	ácido alfa-amino-adípico (ácido homoglutámico)
10	Bzl = Bn:	bencilo
	DIEA:	N,N-diisopropiletilamina
	DMF:	N,N-dimetilformamida
	IDA:	ácido iminodiacético
	Sar:	sarcosina (N-metil-glicina)
15	tBu:	<i>tert</i> -butilo
	HSTU:	hexafluorofosfato de O-(N-succinimidil)-1,1,3,3-tetrametiluronio
	TSTU:	tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-1,1,3,3-tetrametiluronio
	THF:	tetrahidrofurano
	EtOAc:	acetato de etilo
20	DIPEA:	diisopropiletilamina
	HOAt:	1-hidroxi-7-azabenzotriazol
	TEA:	triethylamina
	Su:	N-succinimidilo= 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo
	TFA:	ácido trifluoroacético
25	DCM:	diclorometano
	DMSO:	dimetilsulfóxido
	TLC:	cromatografía en capa delgada
	RT:	temperatura ambiente

30 Todos los títulos y subtítulos se usan en este documento sólo a efectos de conveniencia y no deben ser tomados como limitantes de la invención en modo alguno.

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

35 Citar e incorporar documentos de patente en esta memoria se hace sólo por conveniencia y no refleja ninguna visión de la validez, patentabilidad ni aplicabilidad de dichos documentos de patente.

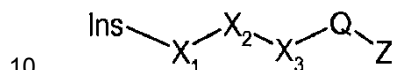
Descripción de la invención

La presente invención se basa en el reconocimiento de que tener un grupo aromático terminal en un sustituyente de una molécula derivada de una insulina, desempeña un papel importante en la duración de la acción *in vivo* de las

insulinas de acción prolongada, y en la capacidad de mezcla de las insulinas de acción prolongada con insulinas de acción rápida sin inhibición/embotamiento.

5 Ventajosamente, los derivados de la insulina de acuerdo con la invención son solubles a valores de pH fisiológico, tienen una potencia que es comparable con la de la insulina humana, y se pueden mezclar con insulinas de acción rápida sin inhibición. Los perfiles de acción individuales de las insulinas basal y en bolo mezcladas son retenidos en las formulaciones que contienen concentraciones de Zn(II) menores o iguales a aproximadamente 3 Zn(II) por hexámero de insulina lo que limita el riesgo de precipitaciones en la formulación, en comparación con las formulaciones que contienen más de 3 Zn (II) por hexámero de insulina.

La invención se refiere a un derivado de la insulina que tiene una fórmula



en la que Ins es una molécula de insulina original y X₁-X₂-X₃-Q-Z es un sustituyente y en la que Ins está unida al sustituyente a través de un enlace amida entre el grupo α-amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B de Ins o un grupo ε-amino de un residuo de Lys presente en la cadena A o B de Ins y un grupo CO en X₁, X₂ o X₃ del sustituyente;

15 X₁ es:

- -CO-(CH₂)_n donde n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6;
- -CO-((CR⁶R⁷)_q-NR-CO)₁₋₄-, donde R⁶ y R⁷ independientemente uno de otro e independientemente para cada valor de q pueden ser hidrógeno, C₁₋₆-alquilo, C₂₋₆-alquenoilo, C₂₋₆-alquinilo, -(CH₂)₁₋₆-COOH; -(CH₂)₁₋₆-CONH₂; -(CH₂)₁₋₆-SO₃H; -(CH₂)₁₋₆-PO₃H₂; -(CH₂)₁₋₆-O-SO₃H₂; -(CH₂)₁₋₆-O-PO₃H; q es 1-6 y R is hidrógeno, -(CH₂)₁₋₆-COOH; -(CH₂)₁₋₆-CONH₂; -(CH₂)₁₋₆-SO₃H; -(CH₂)₁₋₆-PO₃H₂; -(CH₂)₁₋₆-O-SO₃H₂; -(CH₂)₁₋₆-O-PO₃H₂; C₁₋₆-alquilo, C₂₋₆-alquenoilo; C₂₋₆-alquinilo o arilo o CH₂-arilo, donde el grupo arilo se puede sustituir con 1 o 2 grupos elegidos del grupo que consiste en -COOH, -CH₃, -SO₃H, -(CH₂)₁₋₆-SO₃H, -PO₃H₂, -(CH₂)₁₋₆-O-PO₃H₂, tetrazo-5-lilo o CONH₂, C₁₋₆-alquilo, C₂₋₆-alquenoilo, C₂₋₆-alquinilo, hidrógeno, halógeno, -CN, -CF₃, -OCF₃, -S(O)₂CF₃, -SCF₃, -NO₂, -OR², -SR², -NR²S(O)₂R³, -S(O)₂NR²R³, -S(O)NR²R³, -S(O)R², -S(O)₂R², -C(O)NR²R³, -OC(O)NR²R³, -NR²C(O)R³, -CH₂C(O)NR²R³, -OCH₂C(O)NR²R³, -OC(O)R², -OCH₂C(O)R², -C(O)R² o -C(O)OR² o -OCH₂C(O) OR², donde R² y R³ son independientemente hidrógeno, C₁₋₆-alquilo, C₂₋₆-alquenoilo o C₂₋₆-alquinilo,
- un residuo de aminoácido amida de un aminoácido con ácido carboxílico en la cadena lateral, o un aminoácido con una cadena lateral no cargada, o un aminoácido con una cadena lateral cargada negativamente, donde dicho residuo forma, con su grupo ácido carboxílico, un enlace amida junto con el grupo α-amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B de Ins o junto con el grupo ε-amino de un residuo de Lys presente en la cadena A o B de Ins,
- una cadena compuesta de dos, tres o cuatro residuos unidos entre sí mediante enlaces amida donde los residuos se eligen del grupo que consiste en: residuos de α-aminoácidos amida y residuos de aminoácidos como los especificados antes, donde la cadena está unida mediante un enlace amida al grupo α-amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B de Ins o al grupo ε-amino de un residuo de Lys presente en la cadena A o B de Ins, o
- un enlace

X₂ es:

- 40
- -CO-
 - -COCH(R⁸)-;
 - -COCH₂N(CH₂R⁸)-;
 - -COCH₂N(CH₂R⁸)COCH₂N(CH₂R⁸)-;
 - -COCH₂CH₂N(CH₂CH₂R⁸)-;
 - 45 • -COCH₂CH₂N(CH₂CH₂R⁸)-COCH₂CH₂N(CH₂CH₂R⁸)-,
 - -COCH₂N(CH₂CH₂R⁸)-;
 - -COCH₂CH₂N(CH₂R⁸)-; donde R⁸ puede ser COOH o CONH₂

- $-\text{CO}-((\text{CH}_2)_{2-6}-\text{NH}-\text{CO})_{1-4}-$;
- $-(\text{CO}-((\text{CH}_2)_{2-6}-\text{CO}-\text{NH}))_{1-4}-$;
- $-(\text{CO}-((\text{CR}^9\text{R}^{10}))_{1-6}-\text{CO}-\text{NH}))_{1-4}-$, donde R^9 puede ser H, $-\text{COOH}$, $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{COOH}$, CH_3 , $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{CH}_3$ o CONH_2 y R^{10} puede ser H, $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{COOH}$, CH_3 o $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{CH}_3$;

5 • un enlace

siempre que si una amina en X_1 o X_2 forma un enlace con el resto del sustituyente, la amina debe estar unida al resto del sustituyente a través de un grupo carbonilo.

X_3 es $-\text{C}=\text{O}$, siempre que X_3 sólo esté presente si X_1 y X_2 son enlaces.

Q es

10 una cadena de fórmula $-(\text{CH}_2)_{s1}-\text{Q}_1-(\text{CH}_2)_{s2}-\text{Q}_2-(\text{CH}_2)_{s3}-\text{Q}_3-(\text{CH}_2)_{s4}-\text{Q}_4-(\text{CH}_2)_{s5}-$; en la que Q_1 , Q_2 y Q_3 son todos enlaces, Q_4 es C_6H_4 , s_2 , s_3 y s_4 son todos uno, s_1 es 5, 6, 7 u 8 y s_5 es 0, 1 o 2 y

Z es:

$-\text{COOH}$;

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

15 $-\text{CO}-\text{Glu}$;

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

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

$-\text{CH}(\text{COOH})_2$;

$-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$;

20 $-\text{SO}_3\text{H}$

$-\text{PO}_3\text{H}_2$;

$\text{O}-\text{SO}_3\text{H}$;

$\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$; o

tetrazo-5-lilo;

25 y cualquier complejo de Zn^{2+} de éstos.

En un aspecto el derivado de la insulina según la invención se elige del grupo que consiste en:

$\text{N}^{\text{B29}}-(12-(4\text{-carboxifenil})\text{dodecanoil}-\gamma\text{-Glu})$ desB30 insulina,

$\text{N}^{\text{B29}}-(11-(4\text{-carboxifenil})\text{undecanoil } \gamma\text{-Glu})$ desB30 insulina,

$\text{N}^{\text{B29}}-(12-(3\text{-carboxifenil})\text{dodecanoil } \gamma\text{-Glu})$ desB30 insulina,

30 $\text{N}^{\text{B29}}-(9-[4-(2\text{-carboxietil})\text{fenil}]\text{nonanoil } \gamma\text{-Glu})$ desB30 insulina,

$\text{N}^{\text{B29}}-(4-[11-(4\text{-carboxifenil})\text{undecanoilamino}]\text{butiril})$ desB30 insulina,

$\text{N}^{\text{B29}}-[12-(5\text{-carboxitiofen-2-il})\text{dodecanoil}]$ desB30 insulina o

$\text{N}^{\text{B29}}-[12-(5\text{-carboxitiofen-2-il})\text{dodecanoil}-\gamma\text{-Glu}]$ desB30 insulina.

También se describen:

35 1. Un derivado de la insulina que comprende una insulina original y un sustituyente, en el que el sustituyente tiene un grupo terminal que está cargado negativamente al pH fisiológico; un grupo aromático que tiene 0, 1 o 2 átomos de carbono entre el grupo aromático y el grupo terminal; una cadena alifática que tiene al menos 4 grupos CH_2 ; y un conector, donde la cadena alifática está unida a la insulina original a través del conector, con la condición de que si el grupo aromático es C_6H_4 entonces no está unido a la

40 cadena alifática a través de un azufre.

3. Un derivado de la insulina según el párrafo 1 o 2, en el que el sustituyente contiene más de un grupo aromático.

4. Un derivado de la insulina según el párrafo 2, en el que el grupo terminal es -COOH.

5 10. Un derivado de la insulina según los párrafos 1-10, en el que el conector contiene 1-4 residuos unidos entre sí a través de enlaces amida elegidos entre los siguientes: un residuo de aminoácido amida de un aminoácido con ácido carboxílico en la cadena lateral, o un aminoácido con una cadena lateral no cargada o un aminoácido con una cadena lateral cargada negativamente.

11. Un derivado de la insulina según el párrafo 10, en el que el conector se elige del grupo que consiste en β-D-Asp-amida, β-L-Asp-amida, γ-L-Glu-amida y γ-D-Glu-amida.

10 12. Un derivado de la insulina según los párrafos 1-11, en el que el conector contiene 1-4 residuos de aminoácidos unidos entre sí a través de enlaces amida.

13. Un derivado de la insulina según el párrafo 12, en el que el conector tiene al menos un grupo ácido carboxílico libre o un grupo que está cargado negativamente a pH neutro.

15 14. Un derivado de la insulina según los párrafos 1-11, en el que el conector contiene 1-4 residuos de aminoácidos amida, unidos entre sí a través de enlaces amida.

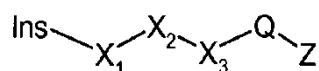
15. Un derivado de la insulina según el párrafo 1-11, en el que el conector contiene una amida.

20 16. Un derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos 1-11, en el que el conector contiene una amida o una amida N-sustituida de fórmula $-\text{CONR}^4\text{R}^5$, $-\text{SONR}^4\text{R}^5$ o ${}_2\text{NR}^4\text{R}^5$, donde R^4 y R^5 , independientemente uno de otro pueden ser hidrógeno, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_{1-6}\text{CH}_3$, C_{1-6} -alquilo, C_{2-6} -alquenilo o C_{2-6} -alquinilo y cuando R^4 y R^5 están unidos al mismo átomo de nitrógeno pueden, junto con dicho átomo de nitrógeno, formar un anillo heterocíclico de 3 a 8 miembros que contiene opcionalmente uno o dos heteroátomos adicionales elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre, y que contiene opcionalmente uno o dos dobles enlaces .

17. Un derivado de la insulina según el párrafo 16, en el que R^4 y R^5 son hidrógeno.

25 18. Un derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos precedentes, en el que el sustituyente está unido al grupo ε-amino de la LysB29.

20. Un derivado de la insulina que tiene la fórmula



30 en la que Ins es una molécula de insulina original y $\text{X}_1\text{-X}_2\text{-X}_3\text{-Q-Z}$ es un sustituyente y en la que Ins está unida al sustituyente a través de un enlace amida entre el grupo α-amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B de Ins o un grupo ε-amino de un residuo de Lys presente en la cadena A o B de Ins y un grupo CO en X_1 , X_2 o X_3 del sustituyente;

X_1 es:

- $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_n$ donde n es 1,2,3,4,5 o 6;
- 35 • $-\text{CO}-((\text{CR}^6\text{R}^7)_q\text{-NR-CO})_{1-4}$, donde R^6 y R^7 independientemente uno de otro e independientemente para cada valor de q pueden ser hidrógeno, C_{1-6} -alquilo, C_{2-6} -alquenilo, C_{2-6} -alquinilo, $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{-COOH}$; $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{-CONH}_2$; $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{-SO}_3\text{H}$; $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{-PO}_3\text{H}_2$; $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{-O-SO}_3\text{H}_2$; $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{-O-PO}_3\text{H}$, q es 1-6 y R is hidrógeno, $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{-COOH}$; $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{-CONH}_2$; $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{-SO}_3\text{H}$; $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{-PO}_3\text{H}_2$; $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{-O-SO}_3\text{H}_2$; $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{-O-PO}_3\text{H}_2$; C_{1-6} -alquilo, C_{2-6} -alquenilo; C_{2-6} -alquinilo o arilo o CH_2 -arilo, donde el grupo arilo se puede sustituir con 1 o 2 grupos elegidos del grupo que consiste en $-\text{COOH}$, $-\text{CH}_3$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{-SO}_3\text{H}$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$, $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{-O-PO}_3\text{H}_2$, tetrazo-5-lilo or CONH_2 , C_{1-6} -alquilo, C_{2-6} -alquenilo, C_{2-6} -alquinilo, hidrógeno, halógeno, $-\text{CN}$, $-\text{CF}_3$, $-\text{OCF}_3$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{CF}_3$, $-\text{SCF}_3$, $-\text{NO}_2$, $-\text{OR}^2$, $-\text{SR}^2$, $-\text{NR}^2\text{S}(\text{O})_2\text{R}^3$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^2\text{R}^3$, $-\text{S}(\text{O})\text{NR}^2\text{R}^3$, $-\text{S}(\text{O})\text{R}^2$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^2$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^2\text{R}^3$, $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}^2\text{R}^3$, $-\text{NR}^2\text{C}(\text{O})\text{R}^3$, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NR}^2\text{R}^3$, $-\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})\text{NR}^2\text{R}^3$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^2$, $-\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})\text{R}^2$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^2$ o $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^2$ o $-\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})\text{OR}^2$, donde R^2 y R^3 son independientemente hidrógeno, C_{1-6} -alquilo, C_{2-6} -alquenilo o C_{2-6} -alquinilo,
- 40 • un residuo de aminoácido amida de un aminoácido con ácido carboxílico en la cadena lateral, o un aminoácido con una cadena lateral no cargada, o un aminoácido con una cadena lateral cargada negativamente, donde dicho residuo forma, con su grupo ácido carboxílico, un enlace amida junto con el grupo α-amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B de Ins o junto con el grupo ε-amino de un residuo de Lys presente en la cadena A o B de Ins,

- una cadena compuesta por dos, tres o cuatro residuos unidos entre sí mediante enlaces amida donde los residuos se eligen del grupo que consiste en: residuos de α -aminoácidos amida y residuos de aminoácidos como los especificados antes, donde la cadena está unida mediante un enlace amida al grupo α -amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B de Ins o al grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena A o B de Ins, o

5

- un enlace

X_2 es:

- -CO-
- -COCH(R⁸)-;
- 10 • -COCH₂N(CH₂R⁸)-;
- -COCH₂N(CH₂R⁸)COCH₂N(CH₂R⁸)-;
- -COCH₂CH₂N(CH₂CH₂R⁸)-;
- -COCH₂CH₂N(CH₂CH₂R⁸)-COCH₂CH₂N(CH₂CH₂R⁸)-,
- -COCH₂N(CH₂CH₂R⁸)-;
- 15 • -COCH₂CH₂N(CH₂R⁸)-; donde R⁸ puede ser COOH o CONH₂
- -CO-((CH₂)₂₋₆-NH-CO)₁₋₄-;
- -(CO-(CH₂)₂₋₆-CO-NH)₁₋₄-;
- -(CO-(CR⁹R¹⁰)₁₋₆-CO-NH)₁₋₄-; donde R⁹ puede ser H, -COOH, -(CH₂)₁₋₆COOH, CH₃-(CH₂)₁₋₆CH₃ o CONH₂ y R¹⁰ puede ser H, -(CH₂)₁₋₆COOH, CH₃ o -(CH₂)₁₋₆CH₃;
- 20 • un enlace

siempre que si una amina en X_1 o X_2 forma un enlace con el resto del sustituyente, la amina debe estar unida al resto del sustituyente a través de un grupo carbonilo.

X_3 es -C=O, siempre que X_3 sólo esté presente si X_1 y X_2 son enlaces.

Q es

- 25 una cadena de fórmula -(CH₂)_{s1}-Q₁-(CH₂)_{s2}-Q₂-(CH₂)_{s3}-Q₃-(CH₂)_{s4}-Q₄-(CH₂)_{s5}-; en la que Q₁, Q₂ y Q₃ son todos enlaces, Q₄ es C₆H₄, s₂, s₃ y s₄ son todos uno, s₁ es 5, 6, 7 u 8 y s₅ es 0, 1 o 2 y

Z es:

- COOH;
- CO-Asp;
- 30 -CO-Glu;
- CO-Gly;
- CO-Sar;
- CH(COOH)₂;
- N(CH₂COOH)₂;
- 35 -SO₃H
- PO₃H₂;
- O-SO₃H;
- O-PO₃H₂; o
- tetrazo-5-lilo;

y cualquier complejo de Zn^{2+} de éstos.

21. Un derivado de la insulina según el párrafo 19-20, en el que X_1 es un residuo de aminoácido amino de un aminoácido con ácido carboxílico en la cadena lateral.
- 5 22. Un derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos 19-21, en el que X_1 se elige del grupo que consiste en β -D-Asp-amida, α -L-Asp-amida, γ -L-Glu-amida y γ -D-Glu-amida.
23. Un derivado de la insulina según el párrafo 19-20, en el que X_1 es una cadena compuesta de dos, tres o cuatro residuos de aminoácidos amida de aminoácidos con ácidos carboxílicos en su cadena lateral.
- 10 24. Un derivado de la insulina según los párrafos 19-20 o 23, en el que X_1 es una cadena de dos residuos de aminoácidos amida elegidos del grupo que consiste en β -L-Asp-amida- β -L-Asp-amida, β -L-Asp-amida- γ -L-Glu-amida, γ -L-Glu-amida- γ -L-Glu-amida, γ -L-Glu-amida- α -L-Asp-amida, β -L-Asp-amida- β -D-Asp-amida, β -L-Asp-amida- γ -D-Glu-amida, γ -L-Glu-amida- γ -D-Glu-amida, γ -L-Glu-amida- β -D-Asp-amida, β -D-Asp-amida- β -L-Asp-amida, β -D-Asp-amida- γ -L-Glu-amida, γ -D-Glu-amida- γ -L-Glu-amida, γ -D-Glu-amida- β -L-Asp-amida, β -D-Asp-amida- β -D-Asp-amida, β -D-Asp-amida- γ -D-Glu-amida, γ -D-Glu-amida- γ -D-Glu-amida, γ -D-Glu-amida- β -D-Asp-amida.
- 15 25. Un derivado de la insulina según el párrafo 19-20, en el que X_1 es un residuo de aminoácido que tiene de 2 a 10 átomos de carbono.
26. Un derivado de la insulina según el párrafo 25, en el que X_1 se elige del grupo que consiste en α -Asp, β -Asp, α -Glu, γ -Glu, α -hGlu y δ -hGlu.
27. Un derivado de la insulina según el párrafo 25, en el que X_1 es γ -Glu.
- 20 28. Un derivado de la insulina según el párrafo 19-20, en el que X_1 es una cadena compuesta de dos, tres o cuatro residuos elegidos del grupo que consiste en un residuo de aminoácido amida de un aminoácido con ácido carboxílico en la cadena lateral, un aminoácido con una cadena lateral no cargada y un aminoácido con una cadena lateral cargada negativamente.
- 25 29. Un derivado de la insulina según el párrafo 28, en el que X_1 es una cadena compuesta de dos residuos de α -aminoácido de los cuales uno tiene de 4 a 10 átomos de carbono y un grupo ácido carboxílico libre mientras el otro tiene de 2 a 11 átomos de carbono pero no tiene grupo ácido carboxílico libre.
- 30 30. Un derivado de la insulina según el párrafo 29, en el que X_1 se elige del grupo que consiste en α -Asp-Gly; Gly- α -Asp; β -Asp-Gly; Gly- β -Asp; α -Glu-Gly; Gly- α -Glu; γ -Glu-Gly; Gly- γ -Glu; α -hGlu-Gly; Gly- α -hGlu; δ -hGlu-Gly; y Gly- δ -hGlu.
- 30 31. Un derivado de la insulina según el párrafo 28, en el que X_1 es una cadena compuesta de dos residuos de α -aminoácidos que tienen independientemente de 4 a 10 átomos de carbono y ambos tienen un grupo ácido carboxílico libre.
- 35 32. Un derivado de la insulina según el párrafo 31, en el que X_1 se elige del grupo que consiste en α -Asp- α -Asp; α -Asp- α -Glu; α -Asp- α -hGlu; α -Asp- β -Asp; α -Asp- γ -Glu; α -Asp- δ -hGlu; β -Asp- α -Asp; β -Asp- α -Glu; β -Asp- α -hGlu; β -Asp- β -Asp; β -Asp- γ -Glu; β -Asp- δ -hGlu; α -Glu- α -Asp; α -Glu- α -Glu; α -Glu- α -hGlu; α -Glu- β -Asp; α -Glu- γ -Glu; α -Glu- δ -hGlu; γ -Glu- α -Asp; γ -Glu- α -Glu; γ -Glu- α -hGlu; α -Glu- β -Asp; γ -Glu- γ -Glu; γ -Glu- δ -hGlu; α -hGlu- α -Asp; α -hGlu- α -Glu; α -hGlu- α -hGlu; α -hGlu- β -Asp; α -hGlu- γ -Glu; α -hGlu- δ -hGlu; δ -hGlu- α -Asp; δ -hGlu- α -Glu; δ -hGlu- α -hGlu; δ -hGlu- β -Asp; δ -hGlu- γ -Glu; y δ -hGlu- δ -hGlu.
- 40 33. Un derivado de la insulina según el párrafo 19-20, en el que X_1 es $-\text{CO}-((\text{CR}^6\text{R}^7)_q\text{NR}-\text{CO})_{1-4}-$, donde R^6 y R^7 independientemente uno de otro e independientemente para cada valor de q pueden ser hidrógeno, C_{1-6} -alquilo, C_{2-6} -alquenoilo, C_{2-6} -alquinoilo, $-(\text{CH}_2)_{1-6}-\text{COOH}$; $-(\text{CH}_2)_{1-6}-\text{CONH}_2$; $-(\text{CH}_2)_{1-6}-\text{SO}_3\text{H}$; $-(\text{CH}_2)_{1-6}-\text{PO}_3\text{H}_2$; $-(\text{CH}_2)_{1-6}-\text{O}-\text{SO}_3\text{H}_2$; $-(\text{CH}_2)_{1-6}-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}$, q es 1-6 y R es hidrógeno, $-(\text{CH}_2)_{1-6}-\text{COOH}$; $-(\text{CH}_2)_{1-6}-\text{CONH}_2$; $-(\text{CH}_2)_{1-6}-\text{SO}_3\text{H}$; $-(\text{CH}_2)_{1-6}-\text{PO}_3\text{H}_2$; $-(\text{CH}_2)_{1-6}-\text{O}-\text{SO}_3\text{H}_2$; $-(\text{CH}_2)_{1-6}-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$; C_{1-6} -alquilo, C_{2-6} -alquenoilo; C_{2-6} -alquinoilo o arilo o CH_2 -arilo, en el cual el grupo arilo puede estar sustituido con 1 o 2 grupos elegidos del grupo que consiste en $-\text{COOH}$, $-\text{CH}_3$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-(\text{CH}_2)_{1-6}-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$, $-(\text{CH}_2)_{1-6}-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$, tetrazo-5-lilo o CONH_2 , C_{1-6} -alquilo, C_{2-6} -alquenoilo, C_{2-6} -alquinoilo, hidrógeno, halógeno, $-\text{CN}$, $-\text{CF}_3$, $-\text{OCF}_3$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{CF}_3$, $-\text{SCF}_3$, $-\text{NO}_2$, $-\text{OR}^2$, $-\text{SR}^2$, $-\text{NR}^2\text{S}(\text{O})_2\text{R}^3$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^2\text{R}^3$, $-\text{S}(\text{O})\text{NR}^2\text{R}^3$, $-\text{S}(\text{O})\text{R}^2$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^2$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^2\text{R}^3$, $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}^2\text{R}^3$, $-\text{NR}^2\text{C}(\text{O})\text{R}^3$, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NR}^2\text{R}^3$, $-\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})\text{NR}^2\text{R}^3$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^2$, $-\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})\text{R}^2$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^2$ o $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^2$ o $-\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})\text{OR}^2$, donde R^2 y R^3 son independientemente hidrógeno, C_{1-6} -alquilo, C_{2-6} -alquenoilo o C_{2-6} -alquinoilo,
- 50 34. Un derivado de la insulina según el párrafo 33, en el que X_1 es
- $\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-(\text{CH COOH})-\text{NH}-\text{CO}-$.
35. Un derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos 19-34, en el que X_2 es un enlace.
36. Un derivado de la insulina según el párrafo 19-20, en el que X_2 es:

- -CO-
 - -COCH₂N(CH₂R⁸)-;
 - -COCH₂N(CH₂R⁸)COCH₂N(CH₂R⁸)-;
 - -COCH₂CH₂N(CH₂CH₂R⁸)-;
 - 5 • -COCH₂CH₂N(CH₂CH₂R⁸)-COCH₂CH₂N(CH₂CH₂R⁸)-;
 - -COCH₂N(CH₂CH₂R⁸)-;
 - -COCH₂CH₂N(CH₂R⁸)-; donde R⁸ puede ser COOH o CONH₂
 - -CO-((CH₂)₂₋₆-NH-CO)₁₋₄-;
 - -(CO-(CH₂)₂₋₆-CO-NH)₁₋₄-;
 - 10 • -(CO-(CR⁹R¹⁰)₁₋₆-CO-NH)₁₋₄-, donde R⁹ puede ser H, -COOH, -(CH₂)₁₋₆COOH, CH₃-(CH₂)₁₋₆CH₃ o CONH₂ y R¹⁰ puede ser H, -(CH₂)₁₋₆COOH, CH₃ o -(CH₂)₁₋₆CH₃;
 - un enlace
37. Un derivado de la insulina según el párrafo 36, en el que X₂ se elige del grupo que consiste en -(CO-(CH₂)₂-NH-CO)₁- o -(CO-(CH₂)₃-NH-CO)₁-.
- 15 38. Un derivado de la insulina según el párrafo 36, en el que X₂ es -CO-.
39. Un derivado de la insulina según los párrafos 36-38, en el que X₁ es un enlace.
68. Un derivado de la insulina según los párrafos 19-39, en el que Z es -COOH.
69. Un derivado de la insulina según los párrafos 19-39, en el que Z es -CO-Asp.
70. Un derivado de la insulina según los párrafos 19-39, en el que Z es -CO-Glu.
- 20 71. Un derivado de la insulina según los párrafos 19-39, en el que Z es -CO-Gly.
72. Un derivado de la insulina según los párrafos 19-39, en el que Z es -CO-Sar.
73. Un derivado de la insulina según los párrafos 19-39, en el que Z es -CH(COOH)₂.
74. Un derivado de la insulina según los párrafos 19-39, en el que Z es -N(CH₂COOH)₂.
75. Un derivado de la insulina según los párrafos 19-39, en el que Z es -SO₃H.
- 25 76. Un derivado de la insulina según los párrafos 19-39, en el que Z es -PO₃H₂.
77. Un derivado de la insulina según los párrafos 19-39, en el que Z es O-SO₃H.
78. Un derivado de la insulina según los párrafos 19-39, en el que Z es O-PO₃H₂.
79. Un derivado de la insulina según los párrafos 19-39, en el que Z es tetrazo-5-lilo.
- 30 80. Un derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos 1-79, en el que la insulina original es insulina humana o insulina porcina o un análogo de la insulina.
81. Un derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos 79-80, en el que el residuo de aminoácido en la posición B30 de la insulina original es Lys o ha sido eliminado.
82. Un derivado de la insulina según el párrafo 81, en el que la insulina original es desB30 insulina humana.
83. Un derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos 79-82, en el que el residuo de aminoácido en la posición B1 de la insulina original ha sido eliminado.
- 35 84. Un derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos 79-83, en el que el residuo de aminoácido en la posición A21 de la insulina original es Gly o Asn.
85. Un derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos 79-84, en el que el residuo de aminoácido en la posición B3 de la insulina original es Lys.

86. Un derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos 79-85, en el que el residuo de aminoácido en la posición B28 de la insulina original es Asp o Lys.
87. Un derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos 79-86, en el que el residuo de aminoácido en la posición B29 de la insulina original es Pro o Thr.
- 5 88. Un derivado de la insulina según el párrafo 86, en el que la insulina original es AspB28 insulina humana.
89. Un derivado de la insulina según el párrafo 84, en el que la insulina original es GlyA21 insulina humana o GlyA21desB30 insulina humana o GlyA21ArgB31ArgB32 insulina humana.
90. Un derivado de la insulina según el párrafo 85, en el que la insulina original es LysB3GluB29 insulina humana.
- 10 91. Un derivado de la insulina según el párrafo 86-87, en el que la insulina original es LysB28ProB29 insulina humana.
92. Un derivado de la insulina según el párrafo 81 y 87, en el que la insulina original es ThrB29LysB30 insulina humana.
- 15 93. Un complejo de zinc de un derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos precedentes en el que el derivado de la insulina se une a dos iones zinc, tres iones zinc, cuatro iones zinc, cinco iones zinc, seis iones zinc, siete iones zinc, ocho iones zinc, nueve iones zinc o diez iones zinc por cada 6 derivados de la insulina.
94. 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 derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos precedentes junto con un portador farmacéuticamente aceptable.
- 20 95. 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 derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos precedentes mezclado con una insulina o un análogo de la insulina con un inicio de acción rápido, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.
- 25 96. Un método para tratar la diabetes en un paciente que necesita dicho tratamiento, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos precedentes junto con un portador farmacéuticamente aceptable.
97. Un método para tratar la diabetes en un paciente que necesita dicho tratamiento, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos precedentes mezclado con una insulina o un análogo de la insulina con un inicio de acción rápido, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.
- 30 98. Un método según los párrafos 98 o 99 para el tratamiento pulmonar de la diabetes.
99. Una mezcla de un derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos 1-95 y un análogo de la insulina de acción rápida elegido del grupo que consiste en AspB28 insulina humana; LysB28ProB29 insulina humana y LysB3GluB29 insulina humana.
100. Un derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos 1-95 elegido del grupo que consiste en
- 35 $N^{\epsilon B29}$ -(12-(4-carboxifenil)dodecanoil- γ -Glu) desB30 insulina,
 $N^{\epsilon B29}$ -(11-(4-carboxifenil)undecanoil γ -Glu) desB30 insulina,
 $N^{\epsilon B29}$ -(12-(3-carboxifenil)dodecanoil γ -Glu) desB30 insulina,
 $N^{\epsilon B29}$ -(9-[4-(2-carboxietil)fenil]nonanoil) γ -Glu) desB30 insulina, o
 $N^{\epsilon B29}$ -(4-[11-(4-carboxifenil)undecanoilamino]butiril) desB30 insulina.
- 40 101. Un derivado de la insulina como el que se describe en los ejemplos.
- En un aspecto de la invención X_1 es una cadena compuesta de dos, tres o cuatro residuos elegidos del grupo que consiste en un residuo de aminoácido amida de un aminoácido con ácido carboxílico en la cadena lateral, un aminoácido con una cadena lateral no cargada y un aminoácido con una cadena lateral cargada negativamente. X_1 puede ser un residuo de aminoácido amida de un aminoácido con un ácido carboxílico en la cadena lateral. X_1
- 45 también puede ser una cadena compuesta de dos, tres o cuatro residuos de aminoácidos amida de aminoácidos que tienen ácidos carboxílicos en su cadena lateral. Por lo tanto, X_1 se puede elegir, por ejemplo, del grupo que consiste en β -D-Asp-amida, β -L-Asp-amida, γ -L-Glu-amida y γ -D-Glu-amida.

5 En un aspecto de la invención, X_1 es una cadena compuesta de tres residuos de aminoácidos, que tienen independientemente de 4 a 10 átomos de carbono, donde al menos uno de los residuos de aminoácidos de la cadena se elige del grupo de residuos que tienen una amida. La combinación de los tres aminoácidos amida puede ser cualquier combinación de β -D-Asp-amida, β -L-Asp-amida, γ -L-Glu-amida y γ -D-Glu-amida, lo que significa que son posibles 64 combinaciones diferentes.

10 En otro aspecto, X_1 es una cadena compuesta de cuatro residuos de aminoácidos, que tienen independientemente de 4 a 10 átomos de carbono, en los que al menos uno de los residuos de aminoácidos de la cadena se elige del grupo de residuos que tienen una amida. La combinación de los cuatro aminoácidos amida puede ser cualquier combinación de β -D-Asp-amida, β -L-Asp-amida, γ -L-Glu-amida y γ -D-Glu-amida, lo que significa que son posibles 256 combinaciones diferentes.

En un aspecto de la invención, X_1 es un residuo de aminoácido que tiene de 4 a 10 átomos de carbono. 2 residuos de aminoácidos se pueden elegir del grupo que consiste en α -Asp, β -Asp, α -Glu, γ -Glu, α -hGlu y δ -hGlu. En un aspecto X_1 es γ -Glu.

En un aspecto X_1 es una cadena de residuos de aminoácidos.

15 El producto de partida para la acilación, la insulina original o un análogo de la insulina o un precursor de éstos se puede producir por síntesis peptídica bien conocida o por producción recombinante bien conocida en microorganismos transformados adecuados. Por lo tanto, el producto de partida de la insulina se puede producir por un método que consiste en cultivar una célula huésped que contenga una secuencia de ADN que codifique el polipéptido y sea capaz de expresar el polipéptido en un medio nutritivo adecuado en las condiciones que permiten la expresión del péptido, tras lo cual se recupera el péptido resultante del cultivo.

20 El medio utilizado para el cultivo de las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para multiplicar las células huésped, como medios mínimos o complejos que contengan los complementos adecuados. Los medios adecuados se pueden adquirir a proveedores comerciales o se pueden preparar según fórmulas publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection). El péptido producido por las células se puede recuperar después del medio de cultivo mediante procedimientos convencionales que incluyen la separación de las células huésped del medio por centrifugación o filtración, la precipitación de los componentes proteicos del sobrenadante o del filtrado por medio de una sal, por ejemplo, sulfato de amonio, la purificación por diversos procedimientos cromatográficos, por ej., cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad o similares, dependiendo del tipo de péptido en cuestión.

30 La secuencia de ADN que codifica la insulina original puede ser adecuadamente de origen genómico o de ADNc, obtenida por ejemplo preparando una genoteca genómica o de ADNc y detectando las secuencias de ADN que codifican todo o parte del polipéptido mediante hibridación con sondas de oligonucleótidos sintéticos de conformidad con las técnicas estándar (véase, por ejemplo, Sambrook, J, Fritsch, EF y Maniatis, T, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1989). La secuencia de ADN que codifica la insulina original también se puede preparar sintéticamente por métodos estándar establecidos, por ej. el método de la fosfoamidita descrito por Beaucage y Caruthers, Tetrahedron Letters 22 (1981), 1859 - 1869, o el método descrito por Matthes et al., EMBO Journal 3 (1984), 801 - 805. La secuencia de ADN también se puede preparar por reacción en cadena de la polimerasa empleando cebadores específicos, por ejemplo los descritos en US 4,683,202 o Saiki et al., Science 239 (1988), 487 - 491.

40 La secuencia de ADN se puede insertar en cualquier vector que pueda ser sometido convenientemente a procedimientos de recombinación del ADN, y la elección del vector dependerá a menudo de la célula huésped en la cual se va a introducir. Por lo tanto, el vector puede ser un vector que se replica autónomamente, es decir, un vector, que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica junto con el cromosoma o los cromosomas en los que ha sido integrado.

50 El vector es por ejemplo un vector de expresión en el que la secuencia de ADN que codifica la insulina original está unida operablemente a segmentos adicionales necesarios para la transcripción del ADN, como un promotor. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que tenga actividad transcripcional en la célula huésped de elección y se pueda derivar de genes que codifican proteínas homólogas o heterólogas a la célula huésped. Los ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción del ADN que codifica la insulina original en diversas células huésped son muy conocidos en el área, cf. por ejemplo Sambrook *et al.*, supra.

55 La secuencia de ADN que codifica la insulina original también puede, si es necesario, ser conectada operablemente a un terminador adecuado, señales de poliadenilación, secuencias potenciadoras de la transcripción y secuencias potenciadoras de la traducción. El vector recombinante de la invención puede además contener una secuencia de ADN que permita al vector replicarse en la célula huésped en cuestión.

El vector también puede contener un marcador seleccionable, por ejemplo un gen cuyo producto complemente un defecto en la célula huésped o uno que le confiera resistencia a un fármaco, por ej. ampicilina, kanamicina, tetraciclina, cloranfenicol, neomicina, higromicina o metotrexato.

5 Para dirigir un péptido de la presente invención a la vía secretora de las células huésped, se debe proporcionar una secuencia señal secretora (también conocida como una secuencia líder, preprosecuencia o presecuencia) en el vector recombinante. La secuencia señal secretora se une a la secuencia de ADN que codifica el péptido en el marco de lectura correcto. Las secuencias señal secretoras comúnmente se ubican 5' respecto a la secuencia de ADN que codifica el péptido. La secuencia señal secretora puede ser la que normalmente se asocia al péptido o puede ser de un gen que codifica otra proteína segregada.

10 Los procedimientos usados para ligar las secuencias de ADN que codifican la insulina original, el promotor y opcionalmente el terminador y/o la secuencia de señal secretora, respectivamente, y para insertarlos en vectores adecuados que contienen la información necesaria para la replicación, son bien conocidos por los expertos en el área (cf., por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra*).

15 La célula huésped en la cual se introduce la secuencia de ADN o el vector recombinante puede ser cualquier célula que sea capaz de producir el péptido de la presente e incluye bacterias, levaduras, hongos y células eucariotas superiores. Los ejemplos de células huésped adecuadas conocidas y usadas en el área son, sin limitación, *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* o líneas celulares BHK o CHO de mamíferos. La molécula de insulina original se convierte después en los derivados de la insulina de la invención introduciendo el sustituyente pertinente en la posición B1 o en la posición de Lys escogida en la cadena A o B. El sustituyente se puede introducir por cualquier método conveniente y muchos métodos se dan a conocer en el estado anterior de la técnica para la acilación de un grupo amino. Aparecerán más detalles en los ejemplos siguientes.

20 En un aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de la insulina o un complejo de zinc del derivado de la insulina según la invención opcionalmente junto con un portador farmacéuticamente aceptable y/o un aditivo farmacéuticamente aceptable, donde dicha composición se puede proporcionar para el tratamiento de la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 y otros estados que causan hiperglucemia en pacientes que necesitan un tratamiento de ese tipo.

25 En un aspecto de la invención, se proporciona un método para tratar la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 y otros estados que causan hiperglucemia en un paciente que necesita dicho tratamiento, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que contiene el derivado de la insulina o un complejo de zinc del derivado de la insulina según la invención, opcionalmente junto con un portador farmacéuticamente aceptable y/o aditivos farmacéuticamente aceptables.

30 En un aspecto de la invención, se proporciona un método para la fabricación de una composición farmacéutica destinada al uso en el tratamiento de la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 y otros estados que causan hiperglucemia, donde la composición contiene un derivado de la insulina o un complejo de zinc del derivado de la insulina según la invención opcionalmente junto con un portador farmacéuticamente aceptable y/o aditivos adicionales farmacéuticamente aceptables.

35 En un aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica para tratar la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 y otros estados que causan hiperglucemia en un paciente que necesita dicho tratamiento, que consiste en una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de la insulina o un complejo de zinc del derivado de la insulina según la invención mezclado con una insulina o un análogo de la insulina con un inicio de acción rápido, opcionalmente junto con portadores y/o aditivos farmacéuticamente aceptables.

40 En un aspecto de la invención, se proporciona un método para tratar la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 y otros estados que causan hiperglucemia en un paciente que necesita dicho tratamiento, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que contiene el derivado de la insulina o un complejo de zinc del derivado de la insulina según la invención mezclado con una insulina o un análogo de la insulina con un inicio de acción rápido, opcionalmente junto con un portador farmacéuticamente aceptable y/o aditivos farmacéuticamente aceptables.

45 En un aspecto de la invención, se proporciona un método para la fabricación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 y otros estados que causan hiperglucemia, donde la composición contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de la insulina o un complejo de zinc del derivado de la insulina según la invención mezclado con una insulina o un análogo de la insulina con un inicio de acción rápido, opcionalmente junto con un portador farmacéuticamente aceptable y/o aditivos farmacéuticamente aceptables.

50 En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que es una mezcla de un derivado de la insulina o un complejo de zinc del derivado de la insulina según la invención y un análogo de la insulina de acción rápida elegido del grupo que consiste en AspB28 insulina humana; LysB28ProB29 insulina humana y LysB3GluB29 insulina humana.

5 Un aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de la insulina o un complejo de zinc del derivado de la insulina según la invención, opcionalmente junto con un portador farmacéuticamente aceptable y/o un aditivo farmacéuticamente aceptable, que se puede proporcionar para el tratamiento pulmonar de la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 y otros estados que causan hiperglucemia en pacientes que necesitan un tratamiento de ese tipo.

10 En un aspecto la invención se refiere a una aplicación de una composición farmacéutica para el tratamiento pulmonar de la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 y otros estados que causan hiperglucemia en un paciente que necesita dicho tratamiento, donde la composición farmacéutica contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de la insulina o un complejo de zinc del derivado de la insulina según la invención mezclado con una insulina o un análogo de la insulina con un inicio de acción rápido, junto con portadores y/o aditivos farmacéuticamente aceptables.

15 En un aspecto de la invención, se proporciona un método para la fabricación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 y otros estados que causan hiperglucemia, donde la composición se usa por vía pulmonar y contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de la insulina o un complejo de zinc del derivado de la insulina según la invención opcionalmente mezclado con una insulina o un análogo de la insulina con un inicio de acción rápido, junto con un portador farmacéuticamente aceptable y/o aditivos farmacéuticamente aceptables.

20 El derivado de la insulina según la invención y el análogo de la insulina de rápida acción se pueden mezclar en una proporción de aproximadamente 90/10%; aproximadamente 70/30% o aproximadamente 50/50%.

En un aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene un derivado de la insulina según la invención que es soluble a valores de pH fisiológico.

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

25 En un aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica con un perfil de acción prolongada que contiene un derivado de la insulina según la invención.

30 En un 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 según la invención o de una mezcla del derivado de la insulina según la invención junto con un análogo de la insulina de acción rápida.

Composiciones farmacéuticas

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

35 Para la administración subcutánea, los compuestos de la fórmula se formulan de manera semejante a las formulaciones de insulinas conocidas. Además, para la administración subcutánea, los compuestos de la fórmula se administran de manera semejante a la administración de las insulinas conocidas y, en general, los médicos están familiarizados con este procedimiento.

40 Los derivados de la insulina 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 del derivado de la insulina de esta invención de más de aproximadamente 0.5 µg/kg a aproximadamente 50 µg/kg. 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.

45 La administración por inhalación puede resultar en una farmacocinética comparable a la administración subcutánea de las insulinas. 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.

50 Según la invención, el derivado de la insulina de esta invención se puede administrar mediante cualquiera de una serie de dispositivos de inhalación conocidos en el área para la administración por inhalación de un agente terapéutico. Estos dispositivos incluyen inhaladores de dosis fija, nebulizadores, generadores de polvo seco, pulverizadores y similares. El derivado de la insulina de esta invención se puede administrar mediante un inhalador de polvo seco o un pulverizador. Existen una serie de características deseables en un dispositivo de inhalación para la administración del derivado de la insulina de esta invención. Por ejemplo, la administración mediante el dispositivo
55 de inhalación es ventajosamente confiable, reproducible y exacta. El dispositivo de inhalación debe administrar

partículas pequeñas, 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 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 del derivado de la insulina 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 del conjugado de la insulina en el aerosol. Por ejemplo, a mayores concentraciones del conjugado de la insulina en la solución del nebulizador se pueden usar períodos más breves de administración. Los dispositivos como los inhaladores de dosis fija pueden producir concentraciones más altas de aerosol y se pueden operar durante períodos de tiempo más cortos para suministrar la cantidad deseada del conjugado de la insulina. Los dispositivos como los inhaladores de polvo suministran el principio activo hasta que se expelle una determinada carga del fármaco desde el dispositivo. En este tipo de inhalador, la cantidad del derivado de la insulina de esta invención en una cantidad dada del polvo determina la dosis suministrada en una única administración.

El tamaño de partícula del derivado de la insulina 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 a las vías respiratorias inferiores o los alveolos. El derivado de la insulina de esta invención se puede formular de modo que al menos aproximadamente 10% del conjugado de la insulina suministrado se deposite en el pulmón, por ejemplo entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20%, o más. Se sabe que la máxima eficiencia de depósito pulmonar para la respiración por boca en los seres humanos se obtiene con tamaños de partícula entre aproximadamente 2 μm y aproximadamente 3 μm . Cuando el tamaño de las partículas es superior a aproximadamente 5 μm , el depósito pulmonar disminuye sustancialmente. Tamaños de partícula inferiores a aproximadamente 1 μm causan que el depósito pulmonar disminuya, y se torna difícil administrar partículas con masa suficiente para que sean terapéuticamente eficaces. Por lo tanto, las partículas del derivado de la insulina administrado por inhalación tienen un tamaño de partícula menor de aproximadamente 10 μm , más preferentemente en el intervalo entre aproximadamente 1 μm y aproximadamente 5 μm . La formulación del derivado de la insulina 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 derivado de la insulina de esta invención se prepara en forma particulada con un tamaño de partícula menor de aproximadamente 10 μm , por ejemplo entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5 μm . El tamaño de partícula es eficaz para la administración en los alveolos del pulmón del paciente. 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 μm . Dichas formulaciones se pueden lograr mediante secado por aspersión, molienda o punto de condensación crítico de una solución que contiene el conjugado de la insulina 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 los derivados de la insulina de esta invención para administración desde un inhalador de polvo seco incluyen generalmente un polvo seco finamente dividido que contiene el derivado, pero el polvo también puede incluir un incrementador de volumen, un portador, un excipiente, otro aditivo o análogos. Se pueden incluir aditivos en una formulación en polvo seco de un conjugado de la insulina, 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 a la formulación, para facilitar la dispersión del polvo desde el dispositivo de inhalación, para estabilizar la formulación (por ejemplo, antioxidantes o tampones), para proporcionar sabor a la formulación, o similares. Convenientemente, el aditivo no afecta adversamente a las vías respiratorias del paciente. El derivado de la insulina se puede mezclar con un aditivo a nivel molecular o la formulación sólida puede incluir partículas del conjugado de la insulina, mezcladas o recubiertas 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 derivados de la insulina de esta invención forzando a presión una suspensión o solución del conjugado de la insulina 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 ejemplo, 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 μm , por ejemplo en el intervalo entre aproximadamente 1 μm y aproximadamente 5 μm .

Las formulaciones de los derivados de la insulina de esta invención, adecuadas para utilizar con un pulverizador, contendrán generalmente los derivados de la insulina en una solución acuosa a una concentración entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 20 mg del conjugado de la insulina por ml de solución. La formulación puede contener agentes como un excipiente, un tampón, un agente de isotonicidad, un conservante, un surfactante, y, por ejemplo, zinc. La formulación también puede contener un excipiente o un estabilizante del derivado de la insulina, como un tampón, un reductor, una proteína incrementadora de volumen o un carbohidrato. Las proteínas incrementadoras de volumen útiles en la formulación de conjugados de la insulina incluyen albúmina, protamina o similares. Los carbohidratos típicos útiles en la formulación de conjugados de la insulina incluyen sacarosa, manitol, lactosa, trehalosa, glucosa o similares. La formulación de los derivados de la insulina 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.

Las composiciones farmacéuticas que contienen un derivado de la insulina según la presente 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. Otras opciones son administrar la insulina por vía nasal o pulmonar, por ejemplo en composiciones, polvos o líquidos, específicamente diseñados con ese fin.

Las composiciones inyectables de los derivados de la insulina de la 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 derivado de la insulina según la invención se disuelve en una cantidad de agua 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 ej., ácido clorhídrico, o una base, por ej., hidróxido de sodio acuoso, según sea necesario. Finalmente, el volumen de la solución se ajusta con agua para dar la concentración deseada de los ingredientes.

En otro aspecto de la 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 un aspecto alternativo de la invención.

En otro aspecto de la 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 (3p-clorofenoxipropano-1,2-diol) o sus mezclas. En otro aspecto de la invención el conservante está presente en una concentración entre 0.1 mg/ml y 20 mg/ml. En otro aspecto de la invención el conservante está presente en una concentración entre 0.1 mg/ml y 5 mg/ml. En otro aspecto de la invención el conservante está presente en una concentración entre 5 mg/ml y 10 mg/ml. En otro aspecto de la invención el conservante está presente en una concentración entre 10 mg/ml y 20 mg/ml. Cada uno de estos conservantes específicos constituye un aspecto alternativo de la invención. El uso de un conservante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª Edición, 1995.

En otro aspecto de la 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 alcohol de azúcar, un aminoácido (por ej. glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (por ej. glicerol (glicerina), 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol, 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, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, hidroxietil almidón y carboximetilcelulosa de sodio. En un aspecto, 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 ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabitol. En un aspecto, el aditivo alcohol de

azúcar es manitol. Los azúcares o alcoholes de azúcares mencionados antes se pueden utilizar individualmente o en combinación. No existe límite fijo para la cantidad empleada, en tanto el azúcar o el alcohol de azúcar sean solubles en la preparación líquida y no afecten adversamente los efectos estabilizantes logrados utilizando los métodos de la invención. En un aspecto, la concentración de azúcar o alcohol de azúcar es entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml. En otro aspecto de la invención el agente isotónico está presente en una concentración entre 1 mg/ml y 50 mg/ml. En otro aspecto de la invención el agente isotónico está presente en una concentración entre 1 mg/ml y 7 mg/ml. En otro aspecto de la invención el agente isotónico está presente en una concentración entre 8 mg/ml y 24 mg/ml. En otro aspecto de la invención el agente isotónico está presente en una concentración entre 25 mg/ml y 50 mg/ml. Cada uno de estos agentes isotónicos específicos constituye un aspecto alternativo de la invención. El uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª Edición, 1995.

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

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

Una composición para administración nasal de un derivado de la insulina según la presente invención puede, por ejemplo, prepararse como se describe en la patente europea N° 272097 (para Novo Nordisk A/S).

Las composiciones que contienen los derivados de la insulina de esta invención se pueden usar en el tratamiento de estados 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 derivado de la insulina de esta invención sea determinada por los expertos para cada paciente en particular de manera similar que para las composiciones de insulina conocidas.

Cuando sea oportuno, los derivados de la insulina de esta invención se pueden usar mezclado con otros tipos de insulina, por ej. análogos de la insulina con un inicio de acción más rápido. Los ejemplos de dichos análogos de la insulina se describen por ej. en las solicitudes de patentes europeas N° EP 214826 (Novo Nordisk A/S), EP 375437 (Novo Nordisk A/S) y EP 383472 (Eli Lilly & Co.).

También se describen:

1a. Un derivado de la insulina que comprende una insulina original y un sustituyente, en el que el sustituyente tiene un grupo terminal que está cargado negativamente al pH fisiológico; un grupo aromático que tiene 0, 1 o 2 átomos de carbono entre el grupo aromático y el grupo terminal; una cadena alifática que tiene al menos 4 grupos CH₂; y un conector, donde la cadena alifática está unida a la insulina original a través del conector, con la condición de que si el grupo aromático es C₆H₄ entonces no está unido a través de un azufre.

3a. Un derivado de la insulina según el párrafo 1a, en el que el sustituyente contiene más de un grupo aromático.

12a. Un derivado de la insulina según los párrafos 1a-11a, en el que el conector contiene 1-4 residuos de aminoácidos unidos entre sí a través de enlaces amida.

13a. Un derivado de la insulina según el párrafo 12a, en el que el conector tiene al menos un grupo ácido carboxílico libre o un grupo que está cargado negativamente a pH neutro.

14a. Un derivado de la insulina según los párrafos 1a-11a, en el que el conector contiene 1-4 residuos de aminoácidos amida unidos entre sí a través de enlaces amida.

15a. Un derivado de la insulina según el párrafo 1a-11a, en el que el conector contiene una amida.

16a. Un derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos 1a-11a, en el que el conector contiene una amida o una amida N-sustituida de fórmula -CONR⁴R⁵, -SONR⁴R⁵ o ₂NR⁴R⁵, donde R⁴ y R⁵, independientemente uno de otro pueden ser hidrógeno, , -CH₃, -CH₁₋₆CH₃, -(CH₂)₁₋₆-O-PO₃H₂, CONH₂, C₁₋₆-alquilo, C₂₋₆-alqueno o C₂₋₆-alquino y cuando R⁴ y R⁵ están unidos al mismo átomo de nitrógeno pueden, junto con dicho átomo de nitrógeno, formar un anillo heterocíclico de 3 a 8 miembros que contenga opcionalmente uno o dos heteroátomos adicionales elegidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre, y que contenga opcionalmente uno o dos dobles enlaces .

17a. Un derivado de la insulina según el párrafo 16a, en el que R⁴ y R⁵ son hidrógeno.

- 18a. Un derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos precedentes, en el que sustituyente está unido al grupo ϵ -amino de la LysB29.
- 81a. Un derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos 1a-80a, en el que la insulina original es insulina humana o insulina porcina.
- 5 82a. Un derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos 1a-80a, en el que la insulina original es un análogo de la insulina.
- 83a. Un derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos 81a-82a, en el que el residuo de aminoácido en la posición B30 de la insulina original es Lys o ha sido eliminado.
- 84a. Un derivado de la insulina según el párrafo 83a, en el que la insulina original es desB30 insulina humana.
- 10 85a. Un derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos 81a-84a, en el que el residuo de aminoácido en la posición B1 de la insulina original ha sido eliminado.
86. Un derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos 81-85, en el que el residuo de aminoácido en la posición A21 de la insulina original es Gly o Asn.
- 15 87a. Un derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos 81a-86a, en el que el residuo de aminoácido en la posición B3 de la insulina original es Lys.
- 88a. Un derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos 81a-87a, en el que el residuo de aminoácido en la posición B28 de la insulina original es Asp o Lys.
- 89a. Un derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos 81a-88a, en el que el residuo de aminoácido en la posición B29 de la insulina original es Pro o Thr.
- 20 90a. Un derivado de la insulina según el párrafo 88a, en el que la insulina original es AspB28 insulina humana.
- 91a. Un derivado de la insulina según el párrafo 86a, en el que la insulina original es GlyA21 insulina humana o GlyA21desB30 insulina humana o GlyA21ArgB31ArgB32 insulina humana.
- 92a. Un derivado de la insulina según el párrafo 87a, en el que la insulina original es LysB3GluB29 insulina humana.
- 25 93a. Un derivado de la insulina según el párrafo 88a-89a, en el que la insulina original es LysB28ProB29 insulina humana.
- 94a. Un derivado de la insulina según el párrafo 83a y 89a, en el que la insulina original es ThrB29LysB30 insulina humana.
- 30 95a. Un complejo de zinc de un derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos precedentes en el que cada hexámero de insulina se une a dos iones zinc, tres iones zinc, cuatro iones zinc, cinco iones zinc o seis iones zinc.
- 96a. 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 derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos precedentes junto con un portador farmacéuticamente aceptable.
- 35 97a. 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 derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos precedentes mezclada con una insulina o un análogo de la insulina con un inicio de acción rápido, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.
- 40 98a. Un método para tratar la diabetes en un paciente que necesita dicho tratamiento, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos precedentes junto con un portador farmacéuticamente aceptable.
- 99a. Un método para tratar la diabetes en un paciente que necesita dicho tratamiento, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos precedentes mezclado con una insulina o un análogo de la insulina con un inicio de acción rápido, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.
- 45 100a. Un método según los párrafos 98a o 99a para el tratamiento pulmonar de la diabetes.
- 101a. Una mezcla de un derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos 1a-95a y un análogo de la insulina de acción rápida elegido del grupo que consiste en AspB28 insulina humana; LysB28ProB29 insulina humana y LysB3GluB29 insulina humana.

102a. Un derivado de la insulina según cualquiera de los párrafos 1a-95a elegido del grupo que consiste en

- N^{εB29}-(12-(4-carboxifenil)dodecanoil-gamma-Glu) desB30 insulina,
- B29N N^{εB29}-(11-(4-carboxifenil)undecanoil-gamma-Glu) desB30 insulina,
- N^{εB29}-(12-(3-carboxifenil)dodecanoil-gamma-Glu) desB30 insulina,
- 5 N^{εB29}-(9-[4-(2-carboxietil)fenil]nonanoil)gamma-Glu) desB30 insulina, o
- N^{εB29}-(4-[11-(4-carboxifenil)undecanoilamino]butiril) desB30 insulina

103a. Un derivado de la insulina como el que se describe en los ejemplos.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos siguientes los cuales, no obstante, no deben considerarse limitantes del alcance de la protección.

10 Ejemplos

HPLC-MS (Método A):

Se usó el equipamiento siguiente:

Hewlett Packard serie 1100 G1312A bomba binaria

Hewlett Packard serie 1100 compartimiento de columna

15 Hewlett Packard serie 1100 G1315A DAD detector de arreglo de diodo

Hewlett Packard serie 1100 MSD

Sedere 75 detector evaporativo de dispersión de la luz

El instrumento se controló mediante el software HP Chemstation.

La bomba de HPLC se conectó a dos recipientes de eluyente que contenían:

A:	0.05% de TFA en agua
B:	0.05% de TFA en acetonitrilo

20

El análisis se realiza a 40 °C inyectando un volumen adecuado de la muestra (preferentemente 1 µl) en la columna que se eluye con un gradiente de acetonitrilo.

Las condiciones de HPLC, parámetros del detector y parámetros del espectrómetro de masas utilizados se indican en la tabla siguiente:

Columna:	Waters Xterra MS C-18 X 3 mm di 5 µm
Gradiente:	5% - 95% de acetonitrilo lineal durante 3 min a 2.7 ml/min
Detección:	210 nm (salida análoga del DAD) ELS (salida análoga del ELS)

25

Después del DAD el flujo se dividió dando aproximadamente 1 ml/min al ELS y 0.5 ml/min al MS.

HPLC-MS (Método B):

Este método es el mismo que el de HPLC-MS (Método A), excepto que el gradiente corre de 50-99% de acetonitrilo.

HPLC-MS (Método C):

30 Se usó el equipamiento siguiente:

Hewlett Packard serie 1100 G1312A bomba binaria

ES 2 553 154 T3

Hewlett Packard serie 1100 G13 15A DAD detector de arreglo de diodo

Sciex 3000 espectrómetro de masas triple cuadrupolo

Gilson 215 microinyector

Sedex 55 detector evaporativo de dispersión de la luz

- 5 Las bombas y los detectores se controlan mediante el software MassChrom 1.1.1 corriendo en una computadora Macintosh G3. Gilson Unipoint Versión 1.90 controla el autoinyector.

La bomba de HPLC se conecta a dos recipientes de eluyente que contienen:

A:	0.01% de TFA en agua
B:	0.01% de TFA en acetonitrilo

- 10 El análisis se realiza a temperatura ambiente inyectando un volumen adecuado de la muestra (preferentemente 10 µl) en la columna, que se eluye con un gradiente de acetonitrilo. El eluido de la columna se pasa a través del detector UV para encontrar un divisor de flujo, el cual pasa aproximadamente 30 µl/min (1/50) a través de la interfase de electronebulización iónica con turbo API del espectrómetro API 3000. Los restantes 1.48 ml/min (49/50) se pasan a través del detector de ELS.

Las condiciones de HPLC, parámetros del detector y parámetros del espectrómetro de masas utilizados se indican en la tabla siguiente.

Columna	Waters X-Terra C18, 5 µ, 50 mm x 3 mm de di
Gradiente	5% - 90% de acetonitrilo linealmente durante 7.5 min a 1.5 ml/min
Detección	210 nm (salida análoga del DAD)
MS	ionización modo API con fuente de electronebulización iónica con turbo
ELS	Ganancia 8 y 40 °C

- 15 HPLC (Método A):

Tampón A: tris 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 15 mM, pH ajustado a 7.3 con H₂SO₄ 4 N, acetonitrilo al 20% v/v

Tampón B: acetonitrilo al 80% v/v

Flujo: 1.5 ml/min

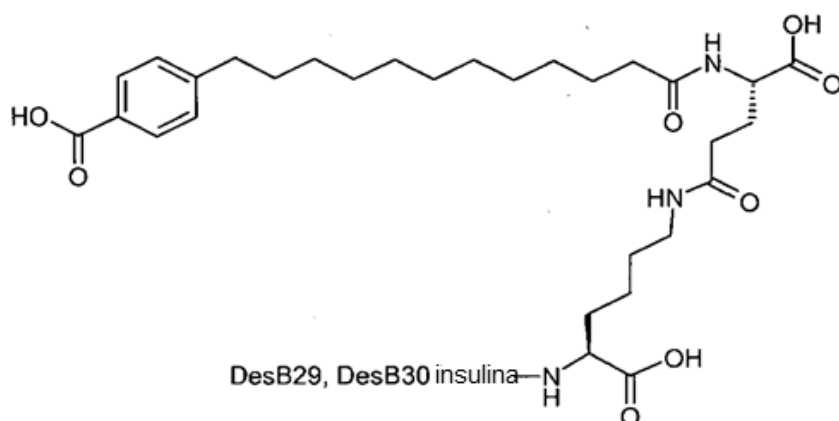
Gradiente: 0-20 min 10-50% de B

- 20 Columna: Phenomenex, Jupiter 4.6 mm x 150 mm, C₄, 5 µ, 300 Å

Temperatura de la columna: 40 °C.

Ejemplo 1

N^{εB29}-(12-(4-carboxifenil)dodecanoil-γ-Glu) desB30 insulina



Procedimiento general (A): Protección de ácidos carboxílicos con *tert*-butilo

Paso 1: Éster *tert*-butílico del ácido 4-yodobenzoico

5 Se disolvió ácido 4-yodobenzoico (10 g, 40.3 mmol) en tolueno seco (100 ml, secado en tamices moleculares). La solución se calentó a 70 °C bajo flujo de nitrógeno. Se agregó una solución de *N,N'*-dimetilformamida di-*tert*-butil acetal (24.6 g, 121 mmol) en tolueno (25 ml) en alrededor de 30 min. La reacción se mezcló durante 16 h. En algún punto la unidad de calentamiento falló, de modo que la reacción se enfrió de 70 °C hasta temperatura ambiente. La solución se calentó a 70 °C y se mezcló durante 5 h. la muestra se concentró al vacío y se le agregó AcOEt (400 ml).
 10 Después la solución se lavó con NaHCO₃ sat./agua 1:1 (150 ml), y NaHCO₃ sat., agua y NaCl sat. (75 ml de cada uno). La fase orgánica se secó (MgSO₄) y se concentró al vacío para producir un aceite marrón claro.

HPLC-MS (Método A): m/z: 327 (M+23), T_R = 2.43 min.

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.77 (d, 2H), 7.69 (d, 2H), 1.58 (s, 9H).

Procedimiento general (B): Protección de ácidos carboxílicos con éster metílico

Paso 2: Éster metílico del ácido 12-bromododecanoico

15 Se agitó ácido 12-bromododecanoico (10 g, 35.8 mmol) con metanol (60 ml) y tolueno (180 ml). Se agregaron ortoformiato de trimetilo (38 g, 358 mmol) y Amberlyst A-15 (alrededor de 1 g). La reacción se mezcló durante 16 h. En algún punto la unidad de calentamiento falló, de modo que la reacción se enfrió de 70 °C hasta temperatura ambiente. La solución se calentó a 70 °C y se mezcló durante 24 h. Una TLC (heptano/AcOEt 2:1) indicó que la reacción estaba incompleta. Se agregaron ortoformiato de trimetilo (38 g, 358 mmol) y Amberlyst A-15 (1.4 g), y la solución se agitó a 70 °C durante 16 h. La muestra se concentró al vacío para producir un aceite marrón (9.87 g).
 20 Estas se combinaron y se disolvieron en AcOEt (100 ml) y se lavaron con NaHCO₃ sat. (2 x 40 ml), se secaron en MgSO₄ y se concentraron al vacío. El aceite se disolvió en AcOEt/TEA 20:1 (10 ml) y se agregó a un lecho de sílice (3 cm x 7.5 cm dia). La columna se eluyó con AcOEt/TEA 20:1 (200 ml) y el filtrado se concentró al vacío. El aceite se disolvió en AcOEt (100 ml) y se lavó con HCl 1 N (2 x 40 ml), se secó en MgSO₄ y se concentró al vacío para producir un aceite incoloro (7.52 g, 72% de rendimiento).

HPLC-MS (Método B): m/z: 293 y 295 (M, M+2), T_R = 1.64 min.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 3.67 (s, 3H), 3.41 (t, 2H), 2.30 (t, 2H), 1.80-1.90 (m, 2H), 1.52-1.71 (m, 2H), 1.37-1.52 (m, 2H), 1.28 (s, 12H).

30 Procedimiento general (C): Intercambio Br-I

Paso 3: Éster metílico del ácido 12-yodododecanoico

35 Se disolvió éster metílico del ácido 12-bromododecanoico (5.65 g, 19.3 mmol) en acetona (50 ml). Se le agregó yoduro de sodio (14.4 g, 96 mmol) y la reacción se calentó a reflujo bajo nitrógeno durante 20 h. La muestra se concentró al vacío. Se agregó agua (100 ml) y la mezcla se extrajo con AcOEt (2 x 100 ml). Se combinaron los extractos orgánicos y se lavaron con agua más una pequeña cantidad de NaCl sat. y NaCl sat. (100 ml de cada uno), se secaron en MgSO₄ y se concentraron para producir un aceite amarillo claro (6.37 g, 97%).

HPLC-MS (Método B): m/z: 341 (M+1), T_R = 1.88 min.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 3.67 (s, 3H), 3.19 (t, 2H), 2.30 (t, 2H), 1.77-1.87 (m, 2H), 1.53-1.68 (m, 2H), 1.18-1.45 (m, 14H).

Procedimiento general (D): Acoplamiento C-C

Paso 4: Éster *tert*-butilico del ácido 4-(11-metoxicarbonilundecil)benzoico

5 Todo el material de vidrio se secó antes de usarlo. El THF se secó en tamices moleculares. El LiCl se secó a 150 °C durante 1 h y después se almacenó en un frasco cerrado. Todas las soluciones de reacción se prepararon en atmósfera de nitrógeno, y las soluciones se transfirieron mediante una jeringa. Se disolvió éster *tert*-butilico del ácido 4-yodobenzoico (3 g, 9.9 mmol) en THF (7.5 ml), y se enfrió entre -20 y -30 °C. Se le agregó cloruro de isopropil magnesio (10.9 mmol, 2 M en THF) en el transcurso de 5 min, y la solución se agitó durante 30 min. Se agregó una solución de CuCN (0.97 g, 10.9 mmol) y LiCl (0.92 g, 21.7 mmol) en 7.5 ml de THF. La reacción se retiró del baño de enfriamiento y se permitió que alcanzara la temperatura ambiente. Después de 15 min, se le agregó trimetilfosfito (0.62 ml). Después de agitar durante 5 min se agregó éster metílico del ácido -yodododecanoico (2.69 g, 7.89 mmol) en una solución de THF (5 ml). Después de agitar durante 16 h, la reacción se enfrió con NH₄Cl sat. (6 ml). Se agregó agua (100 ml) y la solución se extrajo con AcOEt (3 x 100 ml). Se combinaron los extractos orgánicos y se lavaron con agua (100 ml) (se agregó algo de NaCl sat. y MeOH para ayudar a la separación de fases) y NaCl sat. (100 ml), se secaron en MgSO₄ y se concentraron al vacío para producir un residuo en dos fases (5.85 g). El residuo se disolvió en AcOEt y se agregó gota a gota a un lecho de sílice en un filtro de vidrio (7.5 cm día x 3 cm). Se lavó con 200 ml de AcOEt a través de la sílice y el filtrado se concentró para producir un residuo. Éste se disolvió en DCM (10 ml) y se purificó mediante cromatografía por desorción súbita (15 cm x 40 mm, eluyente heptano/AcOEt 9:1). Las fracciones pertinentes se combinaron y se concentraron al vacío. Esto se disolvió en heptano/AcOEt 9:1 (7 ml) y se purificó nuevamente mediante cromatografía por desorción súbita (15 cm x 40 mm, eluyente heptano/AcOEt 9:1) para producir un aceite incoloro (185 mg).

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.90 (d, 2H), 7.21 (d, 2H), 3.66 (s, 3H), 2.64 (t, 2H), 2.30 (t, 2H), 1.53-1.68 (m, 13H), 1.12-1.37 (m, 14H).

Procedimiento general (E): Saponificación

Paso 5: Ácido 4-(11-metoxicarbonilundecil)benzoico

25 Se disolvió éster *tert*-butilico del ácido 4-(11-metoxicarbonilundecil)benzoico (185 mg, 0.47 mmol) en THF (2 ml), y se le agregó NaOH 1 N (0.497 mmol) en el transcurso de 1 min. La mezcla se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. Se agregó AcOEt (50 ml) y la solución se lavó con AcOH al 5% (2 x 25 ml), se secó en MgSO₄ y se concentró al vacío para obtener el producto (153 mg).

HPLC-MS (Método A): m/z: 399 (M+23), T_R = 2.86 min.

30 ¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.90 (d, 2H), 7.21 (d, 2H), 2.64 (t, 2H), 2.35 (t, 2H), 1.54-1.70 (m, 13H), 1.15-1.40 (m, 16H (14H teórico)).

Procedimiento general (F): Formación de amida con EDAC

Paso 6: 5-Bencil éster 1-*tert*-butil éster del ácido (S)-2-[12-(4-*tert*-butoxicarbonilfenil)dodecanoilamino]pentanodioico

35 Se disolvió ácido 4-(11-metoxicarbonilundecil)benzoico (153 mg, 0.41 mmol) en DMF (3 ml). Se agregaron HOBt (60 mg, 0.45 mmol), EDAC (86 mg, 0.45 mmol) y DIEA (172 mg, 1.34 mmol), y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 30 min en atmósfera de nitrógeno. Se agregó clorhidrato de H-Glu-(OBzl)-OtBu (141 mg, 0.43 mmol) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La muestra se concentró al vacío. Se agregó AcOEt (50 ml) y la solución se lavó una vez con agua y dos veces con AcOH al 5% y NaHCO₃ sat. (25 ml de cada uno), se secó en MgSO₄ y se concentró al vacío para producir un aceite ligeramente amarillo (249 mg). El producto se purificó mediante cromatografía por desorción súbita (7.5 cm x 40 mm, eluyente AcOEt/heptano 1:2) para producir un residuo incoloro (177 mg).

HPLC-MS (Método B): m/z: 652 (M+1), T_R = 2.68 min.

45 ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.89 (d, 2H), 7.35 (s, 5H), 7.21 (d, 2H), 6.06 (d, 1H), 5.11 (s, 2H), 4.52 (m, 1H), 2.64 (t, 2H), 2.30-2.54 (m, 2H), 2.13-2.27 (m, 3H), 1.90-2.03 (m, 1H), 1.53-1.67 (m, 19H (13H+agua), 1.46 (s, 9H), 1.18-1.36 (m, 14H).

Procedimiento general (G): Eliminación del éster bencilico

Paso 7: Éster 1-*tert*-butilico del ácido (S)-2-[12-(4-*tert*-butoxicarbonilfenil)dodecanoilamino]pentanodioico

50 Se disolvió 5-bencil éster 1-*tert*-butil éster del ácido (S)-2-[12-(4-*tert*-butoxicarbonilfenil)dodecanoilamino]pentanodioico (175 mg, 0.27 mmol) en THF y se colocó en atmósfera de nitrógeno. Se agregó paladio al 10% sobre carbón (alrededor de 20 mg) y el matraz se evacuó y se llenó con nitrógeno tres veces. El matraz se equipó con un balón lleno con hidrógeno y se agitó a temperatura ambiente toda la noche. La solución se filtró a través de celite y se lavó con THF. El filtrado se concentró al vacío para producir un aceite (0.15 g).

HPLC-MS (Método B): m/z: 584 (M+23), T_R = 1.95 min.

Procedimiento general (H): Activación de ácido carboxílico con HSTU

Paso 8: 1-(2,5-Dioxopirrolidin-1-il) éster 5-*tert*-butil éster del ácido (S)-2-[12-(4-*tert*-butoxicarbonilfenil)dodecanoilamino]pentanodioico

- 5 Se disolvió 1-*tert*-butil éster del ácido (S)-2-[12-(4-*tert*-butoxicarbonilfenil)dodecanoilamino]pentanodioico (158 mg, 0.28 mmol) en THF (6 ml). Se agregó DIEA (48 μ l, 0.28 mmol) y la solución se colocó en un baño de hielo. Se le agregó HSTU (101 mg, 0.28 mmol) y la solución se agitó durante 16 h y se calentó lentamente hasta temperatura ambiente. El solvente se eliminó al vacío y el residuo se particionó entre AcOEt (25 ml) y AcOH al 5% (15 ml). La fase orgánica se lavó con AcOH al 5% (2 x 15 ml) y NaHCO₃ saturado, se secó y se concentró al vacío para producir un aceite (0.16 g).

HPLC-MS (Método B): m/z: 681 (M+23), T_R = 2.17 min.

Procedimiento general (I): Modificación de la insulina y desprotección de los grupos funcionales

Paso 9: B29N(éps)-12-(4-carboxifenil)dodecanoil-gamma-Glu desB30 insulina

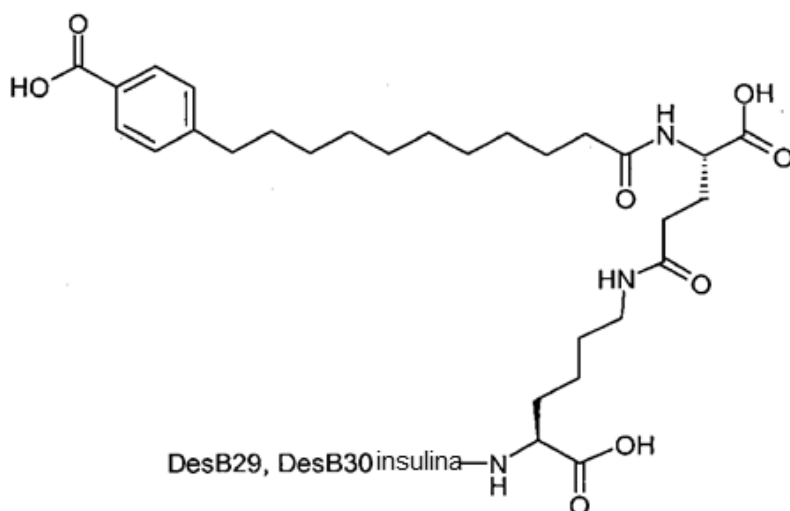
- 15 Se disolvió des-B30 insulina (126 mg, 0.022 mmol) agregando Na₂CO₃ 100 mM (1.5 ml) y acetonitrilo (1.5 ml) en un balón de 10 ml. Se agregó 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) éster 5-*tert*-butil éster del ácido (S)-2-[12-(4-*tert*-butoxicarbonilfenil)dodecanoilamino]pentanodioico (17 mg, 0.026 mmol) en acetonitrilo (750 μ l) y se agregó Na₂CO₃ (750 μ l) para que el volumen final fuera Na₂CO₃ 100 mM/acetonitrilo 50:50. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La solución se transfirió a un tubo de centrifuga de 15 ml lavando con agua Milli-Q (6 ml). La solución se enfrió en hielo y el pH se ajustó a 5.1 agregando HCl 1 N, lo que condujo a la precipitación. El tubo se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min a 10 °C. El solvente se separó por decantación del sólido. Se agregó TFA/agua 95:5 (2.5 ml) al sólido. La solución se vertió en un matraz de RB, lavando con más TFA/agua 95:5 (2.5 ml). La solución se agitó durante 30 min a temperatura ambiente y se concentró al vacío. Se agregó y se extrajo DCM dos veces, y el matraz se secó al vacío a temperatura ambiente. El producto se purificó por HPLC preparativa (columna C₁₈ 2 cm dia., acetonitrilo/agua/ 0.05% de TFA). Se combinaron las fracciones pertinentes (dos lotes) y se diluyeron con agua 1:1. Las soluciones se enfriaron en hielo y se indujo la precipitación ajustando el pH a alrededor de 5 con NaOH 1 N. Se centrifugaron las muestras (5000 rpm, 10 min, 5 °C). El líquido se separó por decantación y los sedimentos se liofilizaron para producir un sólido blanco (25.9 mg + 6.7 mg). Los 25.9 mg se purificaron posteriormente empleando HPLC preparativa (columna C₄ 1 cm dia., acetonitrilo/agua/ 0.05% de TFA) para producir un sólido blanco (13 mg).

- 30 HPLC (Método A): T_R = 4.62 min.

MALDI-MS: (CHCA) m/z: 6140 (M = 6138).

Ejemplo 2

N^{B29}-(-11-(4-carboxifenil)undecanoil γ -Glu) desB30 insulina



- 35 Paso 1: Ester metílico del ácido 11-yodoundecanoico

Se disolvió éster metílico del ácido 11-bromoundecanoico (20.2 g, 72.3 mmol) en acetona (200 ml). Se agregó yoduro de sodio (54 g, 361 mmol) y la reacción se calentó a reflujo en atmósfera de nitrógeno durante 16 h. Después de enfriar hasta temperatura ambiente las sales se separaron por filtración. El filtrado se concentró al vacío y se agregó agua (200 ml). La solución se extrajo con AcOEt (2 x 100 ml) agregando algo de NaCl sat. para ayudar a la separación de fases. Se combinaron los extractos orgánicos y se lavaron con agua (100 ml) con una pequeña cantidad de NaCl sat. y NaCl sat. (50 ml). Se secó en MgSO₄. La solución fue de un color anaranjado rojizo. Se agregaron tres cucharaditas de carbón activado. Después de mezclar, la solución se filtró a través de un lecho de celite. El filtrado se concentró al vacío para producir un aceite amarillo claro (20.96 g, 89%).

HPLC-MS (Método B): m/z: 327 (M+1), T_R = 1.59 min.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 3.67 (s, 3H), 3.19 (t, 2H), 2.30 (t, 2H), 1.74-1.89 (m, 2H), 1.53-1.70 (m, 2H), 1.34-1.46 (m, 2H), 1.28 (a, 10H).

Procedimiento general (D2): Acoplamiento C-C con tratamiento con piperidina

Paso 2: Éster *tert*-butílico del ácido 4-(10-metoxicarbonildecil)benzoico

Todo el material de vidrio se secó antes de usarlo. El THF se secó en tamices moleculares. El LiCl se secó a 150 °C durante 1 h y después se almacenó en un frasco cerrado. Todas las soluciones de reacción se hicieron en atmósfera de nitrógeno, y las soluciones se transfirieron mediante una jeringa. Se disolvió éster *tert*-butílico del ácido 4-yodobenzoico (1.2 g, 3.95 mmol) en THF (3 ml), y se enfrió a -30 °C. Se le agregó cloruro de isopropil magnesio (4.34 mmol, 2 M en THF) en el transcurso de 5 min, y la solución se agitó durante 1 h a una temperatura entre -18 °C y -25 °C. La solución se enfrió a -22 °C y después se le agregó una mezcla de CuCN (0.389 g, 4.34 mmol) y LiCl (0.368 g, 8.68 mmol) en THF (4.2 ml). El recipiente de la reacción se retiró del enfriamiento y se permitió que alcanzara la temperatura ambiente (alrededor de 10 min). Se agregó trimetilfosfito (0.95 ml) y después de agitar durante 5 min a temperatura ambiente se le agregó una solución de éster metílico del ácido 11-yodoundecanoico (1.0 g, 3.16 mmol) en THF (3 ml). La solución se mezcló a temperatura ambiente durante 16 h. Se le agregó NH₄Cl sat. (3 ml) y la solución se vertió en agua (60 ml). La solución se extrajo con AcOEt (3 x 35 ml). Los extractos orgánicos se combinaron y se lavaron con agua (30 ml) empleando algo de NaCl sat. para ayudar a la separación de fases. El solvente se eliminó al vacío para producir un residuo bifásico. Se agregó AcOEt (alrededor de 2 ml) y el matraz se balanceó suavemente. No todo el residuo blanco denso se disolvió. La porción que se disolvió se agregó a una columna de sílice (50 g) y se eluyó con AcOEt:heptano 1:11. Las fracciones apropiadas se concentraron al vacío para producir un aceite (1.25 g). El aceite se disolvió en acetona (30 ml) y se le agregó piperidina (1 ml). Se agregó NaI (0.8 g) y la mezcla se agitó y se calentó a reflujo durante 16 h. La mezcla se concentró al vacío y se particionó entre AcOEt (50 ml) y HCl 1 N (25 ml). La fase orgánica se lavó con HCl 1 N (2 x 25 ml), se secó en MgSO₄ y se concentró al vacío para producir un aceite incoloro (1.1 g). El producto se purificó mediante cromatografía por desorción súbita (eluyente: AcOEt:heptano 1:11, 150 g de sílice) para producir un aceite incoloro (0.72 g, 61%).

HPLC-MS (Método B): m/z: 399 (M+23), T_R = 2.46 min.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.90 (d, 2H), 7.21 (d, 2H), 3.66 (s, 3H), 2.64 (t, 2H), 2.30 (t, 2H), 1.48-1.70 (m, 13H), 1.27 (a, 12H).

Los pasos restantes se llevaron a cabo de manera análoga a la del ejemplo 1.

Paso 3: Éster *tert*-butílico del ácido 4-(10-carboxidecil)benzoico

El compuesto se preparó de manera análoga al procedimiento general (E) para producir un sólido blanco (0.68 g).

HPLC-MS (Método B): m/z: 385 (M+23), T_R = 2.02 min.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.90 (d, 2H), 7.21 (d, 2H), 2.64 (t, 2H), 2.34 (t, 2H), 1.53-1.71 (m, 13H), 1.28 (a, 12H).

Paso 4: 5-Bencil éster 1-*tert*-butil éster del ácido (S)-2-[11-(4-*tert*-butoxicarbonilfenil)undecanoilamino]pentanodioico

El compuesto se preparó de manera análoga al procedimiento general (F) para producir un aceite incoloro (303 mg).

HPLC-MS (Método B): m/z: 660 (M+23), T_R = 2.44 min.

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.89 (d, 2H), 7.35 (m, 5H), 7.21 (d, 2H), 6.05 (d, 1 H), 5.11 (s, 2H), 4.52 (m, 1H), 2.63 (t, 2H), 2.30-2.53 (m, 2H), 2.12-2.26 (m, 3H), 1.89-2.03 (m, 1 H), 1.52-1.67 (m, 13H), 1.46 (s, 9H), 1.26 (a, 12H).

Paso 5: Éster 1-*tert*-butílico del ácido (S)-2-[11-(4-*tert*-butoxicarbonilfenil)undecanoilamino]pentanodioico

El compuesto se preparó de manera análoga al procedimiento general (G) para producir un aceite incoloro (260 mg).

HPLC-MS (Método B): m/z: 570 (M+23), T_R = 1.71 min.

Paso 6: 1-(2,5-Dioxopirrolidin-1-il) éster 5-*tert*-butil éster del ácido (S)-2-[11-(4-*tert*-butoxicarbonilfenil)undecanoilamino]pentanodioico

El compuesto se preparó de manera análoga al procedimiento general (H).

HPLC-MS (Método B): m/z: 667 (M+23), T_R = 1.93 min.

- 5 $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.89 (d, 2H), 7.21 (d, 2H), 6.20 (d, 1H), 4.60 (m, 1H), 2.84 (s, 4H), 2.67-2.78 (m, 1 H), 2.56-2.67 (m, 3H), 2.26-2.40 (m, 1 H), 2.21 (t, 2H), 2.05-2.15 (m, 1H), 1.54-1.67 (m, 13H), 1.48 (s, 9H), 1.26 (a, 14H, teórico 12H +AcOEt).

Paso 7: $\text{N}^{\text{B}29}$ -(11-(4-carboxifenil)undecanoil gamma-Glu) desB30 insulina

El compuesto se preparó de manera análoga al procedimiento general (I).

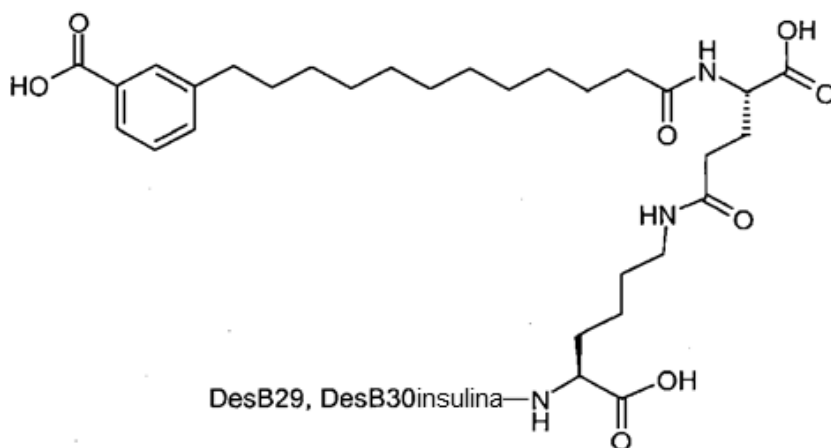
- 10 HPLC (Método A): T_R = 6.19 min.

MALDI-MS: (CHCA) m/z: 6132 (M = 6124, el estándar de referencia (M = 5706) mostró m/z = 5712).

HPLC-MS (Método C): m/z: 1532.4 ((M+4)/4 = 1532), T_R = 3.44 min.

Ejemplo 3

$\text{N}^{\text{B}29}$ -(12-(3-carboxifenil)dodecanoil γ -Glu) desB30 insulina,



- 15 -

Paso 1: Éster *tert*-butílico del ácido 3-yodobenzoico:

El compuesto se preparó de manera análoga al procedimiento general (A) para producir un aceite marrón claro (1.8 g).

HPLC-MS (Método A): m/z: 327 (M+23), T_R = 2.42 min.

- 20 $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 8.31 (s, 1 H), 7.95 (d, 1 H), 7.85 (d, 1 H), 7.16 (t, 1 H), 1.59 (s, 9H).

Paso 2: Éster *tert*-butílico del ácido 3-(11-metoxicarbonilundecil)benzoico

El compuesto se preparó de manera análoga el procedimiento general (D).

HPLC-MS (Método B): m/z: 413 (M+23), T_R = 2.54 min.

- 25 $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.78-7.82 (m, 2H), 7.28-7.36 (m, 2H), 3.66 (s, 3H), 2.63 (t, 2H), 2.30 (t, 2H), 1.58-1.71 (m, 13H), 1.21-1.37 (m, 14H).

Paso 3: Éster *tert*-butílico del ácido 3-(11-carboxiundecil)benzoico

El compuesto se preparó de manera análoga al procedimiento general (E) para producir 290 mg.

HPLC-MS (Método B): m/z: 399 (M+23), T_R = 1.89 min.

- 30 $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7.73-7.88 (m, 2H), 7.27-7.38 (m, 2H), 2.64 (t, 2H), 2.35 (t, 2H), 1.54-1.70 (m, 13H), 1.20-1.41 (m, 14H).

Paso 4: 5-Bencil éster 1-*tert*-butil éster del ácido (S)-2-[12-(3-*tert*-butoxicarbonilfenil)dodecanoilamino]pentanodioico

El compuesto se preparó de manera análoga al procedimiento general (F) para producir 400 mg.

HPLC-MS (Método B): m/z: 652 (M+1), T_R = 2.56 min.

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7.74-7.85 (m, 2H), 7.27-7.41 (m, 7H), 6.06 (d, 1H), 5.11 (s, 2H), 4.45-4.58 (m, 1H), 2.63 (t, 2H), 2.30-2.55 (m, 2H), 2.12-2.27 (m, 3H), 1.89-2.04 (m, 1H), 1.52-1.67 (m, 13H), 1.46 (s, 9H), 1.15-1.37 (m, 14H).

5 Paso 5: 1-*tert*-butil éster del ácido (S)-2-[12-(3-*tert*-butoxicarbonilfenil)dodecanoilamino]pentanodioico

El compuesto se preparó de manera análoga al procedimiento general (G) para producir 370 mg.

HPLC-MS (Método B): m/z: 584 (M+23), T_R = 1.86 min.

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.77-7.83 (m, 2H), 7.28-7.37 (m, 2H), 6.25 (d, 1H), 4.45-4.63 (m, 1 H), 2.63 (t, 2H), 2.32-2.54 (m, 2H), 2.14-2.32 (m, 3H), 1.87-1.97 (m, 1 H), 1.56-1.68 (m, 13H), 1.47 (s, 9H), 1.19-1.37 (m, 14H).

10 Paso 6: 1-(2,5-Dioxopirrolidin-1-il) éster 5-*tert*-butil éster del ácido (S)-2-[12-(3-*tert*-butoxicarbonilfenil)dodecanoilamino]pentanodioico

El compuesto se preparó de manera análoga al procedimiento general (H) para producir 390 mg.

HPLC-MS (Método B): m/z: 681 (M+23), T_R = 2.06 min.

Paso 7: $\text{N}^{\text{EB}29}$ -(11-(4-carboxifenil)undecanoil gamma-Glu) desB30 insulina

15 El compuesto se preparó de manera análoga al procedimiento general (I) para producir 51 mg.

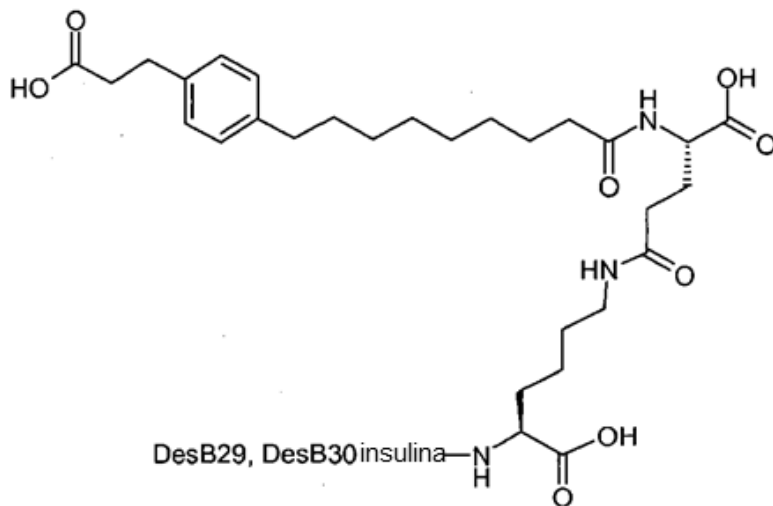
HPLC (Método A): T_R = 6.25 min.

MALDI-MS: (CHCA) m/z: 6142 (M = 6138, el estándar de referencia (M = 5706) mostró m/z = 5711).

HPLC-MS (Método C): m/z: 1535.7 ((M+4)/4 = 1535.5), T_R = 3.22 min.

Ejemplo 4

20 $\text{N}^{\text{EB}29}$ -(9-[4-(2-carboxietil)fenil]nonanoil) γ -Glu) desB30 insulina,



Paso 1: Éster *tert*-butilico del ácido 3-(4-yodofenil)propiónico

El compuesto se preparó de manera análoga al procedimiento general (A) para producir 3.97 g.

HPLC-MS (Método A): m/z: 355 (M+23), T_R = 2.39 min.

25 $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7.60 (d, 2H), 6.96 (d, 2H), 2.84 (t, 2H), 2.50 (t, 2H), 1.41 (s, 9H).

Paso 2: Éster metílico del ácido 9-bromononanoico

El compuesto se preparó de manera análoga al procedimiento general (B) para producir un aceite incoloro (6.56 g).

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 3.67 (s, 3H), 3.40 (t, 2H), 2.31 (t, 2H), 1.78-1.93 (m, 2H), 1.56-1.70 (m, 2H), 1.36-1.50 (m, 2H), 1.26-1.36 (m, 6H).

Paso 3: Ester metílico del ácido 9-yodononanoico

El compuesto se preparó de manera análoga al procedimiento general (C) para producir un aceite (5.48 g).

5 HPLC-MS (Método B): m/z: 299 (M+1), T_R = 1.19 min.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 3.67 (s, 3H), 3.18 (t, 2H), 2.31 (t, 2H), 1.73-1.93 (m, 2H), 1.54-1.72 (m, 2H), 1.24-1.47 (m, 8H).

Paso 4: Éster metílico del ácido 9-[4-(2-*tert*-butoxicarboniletil)fenil]nonanoico

El compuesto se preparó de manera análoga al procedimiento general (D2) para producir 590 mg.

10 HPLC-MS (Método B): m/z: 399 (M+23), T_R = 2.10 min.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.09 (m, 4H), 3.66 (s, 3H), 2.87 (t, 2H), 2.47-2.60 (m, 4H), 2.29 (t, 2H), 1.50-1.68 (m, 4H), 1.42 (s, 9H), 1.26-1.36 (s a, 8H).

Paso 5: Ácido 9-[4-(2-*tert*-butoxicarboniletil)fenil]nonanoico

El compuesto se preparó de manera análoga al procedimiento general (E) para producir un sólido blanco (270 mg).

15 HPLC-MS (Método B): m/z: 385 (M+23), T_R = 1.44 min.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.09 (m, 4H), 2.87 (t, 2H), 2.47-2.61 (m, 4H), 2.34 (t, 2H), 1.49-1.73 (m, 4H), 1.41 (s, 9H), 1.23-1.37 (s a, 8H).

Paso 6: 5-Bencil éster 1-*tert*-butil éster del ácido (S)-2-{9-[4-(2-*tert*-butoxicarboniletil)fenil]nonanoilamino}pentanodioico

20 El compuesto se preparó de manera análoga al procedimiento general (F) para producir 340 mg.

HPLC-MS (Método B): m/z: 660 (M+23), T_R = 2.28 min.

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.29-7.42 (m, 5H), 7.09 (m, 4H), 6.06 (d, 1H), 5.11 (s, 2H), 4.45-4.61 (m, 1 H), 2.87 (t, 2H), 2.30-2.61 (m, 6H), 2.10-2.28 (m, 3H), 1.88-2.03 (m, 1 H), 1.49-1.74 (m, 5H, Teórico 4H+agua), 1.46 (s, 9H), 1.42 (s, 9H), 1.22-1.36 (s a, 8H).

25 Paso 7: Éster 1-*tert*-butilico del ácido (S)-2-{9-[4-(2-*tert*-butoxicarboniletil)fenil]nonanoilamino}pentanodioico

El compuesto se preparó de manera análoga al procedimiento general (G) para producir 330 mg.

HPLC-MS (Método B): m/z: 547 (M+1), T_R = 1.46 min.

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.09 (m, 4H), 6.25 (d, 1 H), 4.49-4.58 (m, 1 H), 2.87 (t, 2H), 2.47-2.60 (m, 4H), 2.30-2.47 (m, 2H), 2.14-2.26 (m, 3H), 1.82-1.99 (m, 1H), 1.51-1.68 (m, 4H), 1.47 (s, 9H), 1.41 (s, 9H), 1.25-1.36 (s a, 8H).

30 Paso 8: 5-(2,5-Dioxopirrolidin-1-il) éster 1-*tert*-butil éster del ácido (S)-2-{9-[4-(2-*tert*-butoxicarboniletil)fenil]nonanoilamino}pentanodioico

El compuesto se preparó de manera análoga al procedimiento general (H) para producir 270 mg.

HPLC-MS (Método B): m/z: 667 (M+23), T_R = 1.71 min.

Paso 9: N^{εB29}-(9-[4-(2-carboxietil)fenil]nonanoil) gamma-Glu) desB30 insulina

35 El compuesto se preparó de manera análoga al procedimiento general (I) para producir 26 mg.

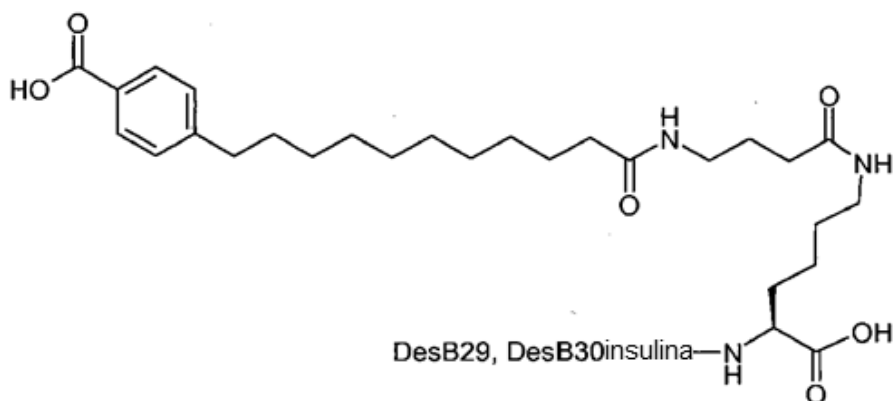
HPLC (Método A): T_R = 5.80 min.

MALDI-MS: (CHCA) m/z: 6129 (M = 6124, el estándar de referencia (M = 5706) mostró m/z = 5711).

HPLC-MS (Método C): m/z: 1531.8 ((M+4)/4 = 1532), T_R = 2.96 min.

Ejemplo 5

40 N^{εB29}-(4-[11-(4-carboxifenil)undecanoilamino]butiril) desB30 insulina



Paso 1: Éster *tert*-butílico del ácido 4-[10-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxicarbonil)decil]benzoico

El compuesto se preparó de manera análoga al procedimiento general (H), pero se usó TSTU en vez de HSTU.

HPLC-MS (Método B): m/z: 482 (M+23), T_R = 2.22 min.

- 5 $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.89 (d, 2H), 7.21 (d, 2H), 2.76-2.93 (m, 4H), 2.54-2.68 (m, 2H), 1.67-1.81 (M, 2H), 1.52-1.66 (m, 11 H), 1.35-1.43 (M, 2H), 1.19-1.35 (a, 10H).

Paso 2: Éster *tert*-butílico del ácido 4-[10-(3-carboxi-propilcarbamoil)decil]benzoico

- 10 Se disolvió éster *tert*-butílico del ácido 4-[10-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxicarbonil)decil]benzoico (300 mg, 0.65 mmol) en DMF (3 ml) y ácido 4-amino butírico (67 mg, 0.65 mmol). La mezcla se agitó durante 16 h en atmósfera de nitrógeno. El solvente se eliminó al vacío y se agregó AcOEt (35 ml). La solución se lavó con HCl 0.2 N y agua (15 ml de cada uno). Se agregó NaHCO_3 sat. (no previsto) a la fase orgánica. Se agregó DCM (50 ml). Se eliminó algo de la fase orgánica y se agregó DCM (100 ml) a la fase acuosa que se dejó en reposo toda la noche. La mezcla se enfrió en hielo y el pH se ajustó a 1.9 con HCl 4 N. La fase orgánica se aisló, se secó en MgSO_4 y se concentró al vacío para producir un aceite (220 mg, 76% de rendimiento).

- 15 HPLC-MS (Método C): m/z: 470 (M+23), T_R = 5.74 min.

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.89 (d, 2H), 7.21 (d, 2H), 5.79 (a, 1 H), 3.27-3.40 (m, 2H), 2.64 (t, 2H), 2.40 (t, 2H), 2.18 (t, 2H), 1.78-1.91 (m, 2H), 1.51-1.61 (m, 13H), 1.35-1.43 (M, 2H), 1.17-1.36 (a, 12H).

Paso 3: Éster *tert*-butílico del ácido 4-[10-(3-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxicarbonil)propilcarbamoil)decil]benzoico

- 20 El compuesto se preparó de manera análoga al procedimiento general (H), pero se usó TSTU en vez de HSTU. La precipitación (DCM/heptano) produjo cristales blancos (180 mg, 70% de rendimiento).

HPLC-MS (Método B): m/z: 568 (M+23), T_R = 1.60 min.

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7.89 (d, 2H), 7.21 (d, 2H), 5.83 (a, 1 H), 3.30-3.43 (m, 2H), 2.85 (a, 4H), 2.57-2.73 (m, 4H), 2.15 (t, 2H), 1.92-2.07 (m, 2H), 1.56-1.64 (m, 13H), 1.18-1.36 (a, 12H).

Paso 4: $\text{N}^{\text{B}29}$ -[4-[11-(4-carboxifenil)undecanoilamino]butiril] desB30 insulina

- 25 El compuesto se preparó de manera análoga al procedimiento general (I) para producir 30 mg.

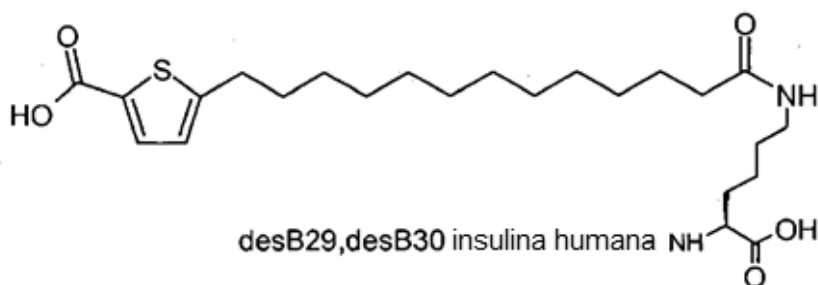
HPLC (Método A): T_R = 7.88 min.

MALDI-MS: (CHCA) m/z: 6067 (M = 6080, el estándar de referencia (M = 5706) mostró M-13).

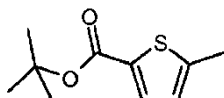
HPLC-MS (Método C): m/z: 1520.9 ((M+4)/4 = 1521), T_R = 3.54 min.

Ejemplo 6

- 30 $\text{N}^{\text{B}29}$ -[12-(5-carboxitiofen-2-il)dodecanoil] desB30 insulina



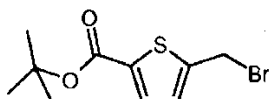
Paso 1: Síntesis de éster *tert*-butílico del ácido 5-metil-tiofen-2-carboxílico



5 Al ácido 5-metiltiofen-2-carboxílico (2 g, 14 mmol) se le agregó tolueno (60 mL) y la suspensión se calentó hasta 80 °C. Se le agregaron *N,N*-dimetilformamida-ditertbutilacetil (16.8 mL, 70.3 mmol) y la mezcla se calentó a 80 °C toda la noche. La mezcla se concentró al vacío hasta alrededor de 10 mL de volumen total y se agregó a éter dietílico (100 mL). La fase orgánica se lavó con agua (2 x 50 mL) seguido de lavado con NaHCO₃ acuoso (10%, 2 x 50 mL). La fase orgánica se secó (MgSO₄) y el solvente se eliminó al vacío para producir 1.3 g de éster *tert*-butílico del ácido 5-metil-tiofen-2-carboxílico.

10 ¹H RMN (CDCl₃): δ 7.52 (d, 1 H), 6.73 (d, 1 H), 2.50 (s, 3H), 3.60 (c, 2H), 1.56 (s, 9H)

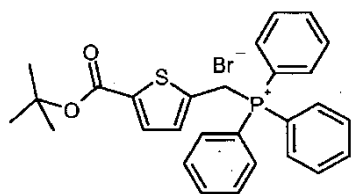
Paso 2: Síntesis de éster *tert*-butílico del ácido 5-bromometiltiofen-2-carboxílico



15 Al éster *tert*-butílico del ácido 5-metil-tiofen-2-carboxílico (10.8 g, 54.5 mmol) se le agregó ciclohexano (100 mL) y *N*-bromosuccinimida (9.7 g, 54.5 mmol) y se calentó a reflujo toda la noche. La suspensión se agregó a acetato de etilo (200 mL) y la solución orgánica se lavó con agua (4 x 100 mL). El solvente se eliminó al vacío para producir 14.9 g de éster *tert*-butílico del ácido 5-bromometiltiofen-2-carboxílico.

¹H RMN (CDCl₃): δ 7.61 (d, 1H), 7.02 (d, 1H), 4.66 (s, 2H), 1.67 (s, 9H).

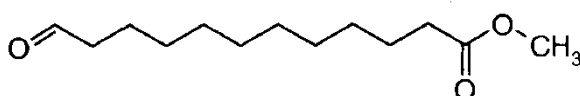
Paso 3: Síntesis de bromuro de (5-*tert*-butoxicarbonil-tiofen-2-ilmetil)-trifenilfosfonio



20 Al éster *tert*-butílico del ácido 5-bromometiltiofen-2-carboxílico (14.9 mmol, 43.8 mmol) se le agregó tolueno (300 mL) y trifenilfosfina (14.1 g, 53.8 mmol). La mezcla se calentó a 70 °C durante toda la noche. El solvente se eliminó al vacío para dar bromuro de (5-*tert*-butoxicarbonil-tiofen-2-ilmetil)-trifenilfosfonio

HPLC-MS (Método C): *m/z* = 459 ; *T_R* = 4.65 min.

Paso 4: Síntesis de éster metílico del ácido 12-oxo-dodecanoico

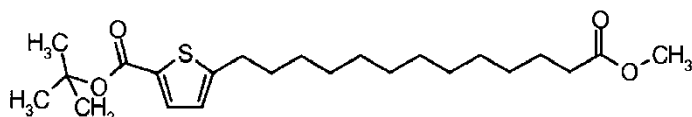


25 Se disolvió ácido 12-hidroxidecanoico (15.25 g, 0.07 mol) en metanol (700 mL), se le agregó HCl acuoso (1 N, 10 mL) y la mezcla se agitó en atmósfera de nitrógeno durante 16 h, el pH se ajustó a 7.2 con NaOH acuoso (1 N). El solvente se eliminó al vacío y el compuesto remanente se separó entre acetato de etilo (150 mL) y NaHCO₃ acuoso (5%, 150 mL). La fase orgánica se aisló, se secó y el solvente se eliminó al vacío para dar éster metílico del ácido

12-hidroxicanoico como un compuesto sólido. Se mezcló cloruro de oxalilo (6.5 mL, 75 mmol) con DCM (160 mL), se enfrió hasta -60 °C con hielo seco/acetona. Se mezcló DMSO (10.7 mL, 151 mmol) con DCM (20 mL) y eso se agregó gota a gota en el transcurso de 10 minutos. Se disolvió el éster metílico del ácido 12-hidroxicanoico en DCM (50 mL) y se agregó gota a gota en el transcurso de 45 minutos. Se agregó gota a gota trietilamina (47.8 mL, 343 mmol) y se observó una precipitación. Luego de la adición de trietilamina se permitió que la mezcla de reacción alcanzara la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lavó con agua (200 mL) y la fase acuosa se lavó con DCM (3 x 200 mL) se recogieron y se lavaron todas las fases orgánicas con NaCl acuoso saturado (300 mL), se secaron en (MgSO₄) y el solvente se eliminó al vacío. El aceite remanente se purificó en sílice y se eluyó con acetato de etilo/heptano (20:80) para producir 11.7 g de éster metílico del ácido 12-oxo-dodecanoico.

10 ¹H RMN (CDCl₃): δ 9.76 (s, 1 H), 3.66 (s, 3H), 2.42 (t, 2H), 2.30 (t, 2H), 1.66-1.54 (m, 4H), 1.37-1.24 (s a, 14 H).

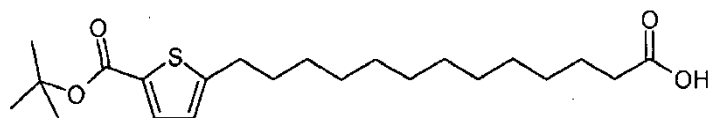
Paso 5: Síntesis de éster *tert*-butílico del ácido 5-(12-metoxicarbonil-dodecil)-tiofen-2-carboxílico.



Se disolvieron éster metílico del ácido 12-oxo-dodecanoico (14.5 g, 63.4 mmol) y bromuro de (5-*tert*-butoxicarbonil-tiofen-2-ilmetil)-trifenilfosfonio (29.1 g, 63.4 mmol) en DMF (350 mL). Se agregó DBU y la mezcla se calentó a 80 °C durante 35 minutos. Se permitió que la mezcla alcanzara la temperatura ambiente y se separó entre éter dietílico (3 x 500 mL) y agua (2000 mL). Se recogieron las fases orgánicas y se lavaron con agua (1 x 500 mL). La fase orgánica se secó (MgSO₄) y el solvente se eliminó al vacío. Al material crudo remanente se le agregó heptano (300 mL) y se agitó durante 30 minutos, se filtró y el solvente se eliminó al vacío para producir 13.6 g de material crudo de una mezcla E/Z de éster *tert*-butílico del ácido 5-(12-metoxicarbonil-dodec-1-enil)tiofen-2-carboxílico. Esta mezcla se disolvió en metanol (200 mL). Se agregaron 2 g de paladio al 10% sobre carbón (50% humedecido con agua) y la mezcla se agitó en atmósfera de hidrógeno con 10 bar de presión durante 90 minutos, se filtró y el solvente se eliminó al vacío para producir 11.6 g de éster *tert*-butílico del ácido 5-(12-metoxicarbonil-dodecil)-tiofen-2-carboxílico.

¹H RMN (CDCl₃): δ 7.54 (d, 1 H), 6.74 (d, 1 H), 3.66 (s, 3H), 2.80 (t, 2H), 2.30 (t, 2H), 1.63 (m, 4H), 1.56 (s, 9H), 1.27 (m, 16H).

25 Paso 6: Síntesis de éster *tert*-butílico del ácido 5-(12-carboxidodecil)-tiofen-2-carboxílico.



Se disolvió éster *tert*-butílico del ácido 5-(12-metoxicarbonil-dodecil)-tiofen-2-carboxílico (75 mg, 0.13 mmol) en metanol (2 mL). Se le agregó una solución de NaOH al 20% en agua (0.36 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se agregó agua (10 mL) y la mezcla se acidificó por adición de 2 mL de una solución de NaHSO₄ al 10% en agua. El precipitado se aisló por centrifugación y se secó al vacío para producir éster *tert*-butílico del ácido 5-(12-carboxidodecil)-tiofen-2-carboxílico, que contaminado con algo de material de partida se usó en el paso siguiente sin purificación adicional.

HPLC-MS (Método C): m/z = 396; T_R = 6.77 min.

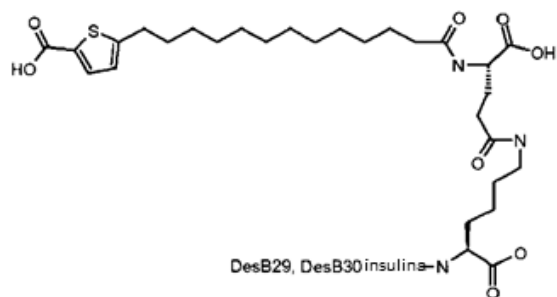
Paso 7: Síntesis de B29N(éps)[12-(5-carboxitiofen-2-il)dodecanoil] desB30 insulina

35 Se activó éster *tert*-butílico del ácido 5-(12-carboxidodecil)-tiofen-2-carboxílico con TSTU y se aciló en DesB30 insulina humana seguido de la eliminación del grupo protector *tert*-butilo con TFA y la subsiguiente purificación empleando procedimientos similares a los descritos en el ejemplo 7.

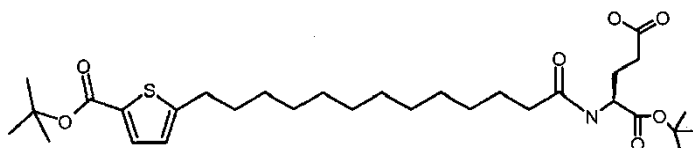
HPLC-MS (Método C): m/z = 1508 (m/4); T_R = 4.88 min.

Ejemplo 7

40 N^εB29-[12-(5-carboxitiofen-2-il)dodecanoil-γ-Glu] desB30 insulina



Paso 1: Síntesis de éster 1-*tert*-butílico del ácido (S)-2-[13-(5-*tert*-butoxicarboniltiofen-2-il)tridecanoilamino]pentanodioico



- 5 Se trató éster *tert*-butílico del ácido 5-(12-carboxidodecil)-tiofen-2-carboxílico (31 mg, 0.078 mmol) con TSTU (28.2 mg, 0.094 mmol) y DIPEA (0.016 mL, 0.094 mmol) en THF (1.3 mL) durante 2 ½ horas a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno. El solvente se eliminó al vacío y se agregaron a la mezcla NMP (1 mL) y H-Glu-OtBu (31.3 mg, 0.154 mmol) y DIPEA (0.027 mL). La mezcla se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. La mezcla se separó entre éter dietílico (10 mL) y NaHSO₄ al 10% acuoso (2 x 10 mL), y la fase orgánica se aisló y el solvente se eliminó al vacío para dar éster *tert*-butílico del ácido (S)-2-[13-(5-*tert*-butoxicarboniltiofen-2-il)tridecanoilamino]pentanodioico crudo que se usó en el paso siguiente sin purificación adicional
- 10

HPLC-MS (Método C): m/z = 582 ; T_R = 8.1 min.

Paso 2: Síntesis de N^εB29-[12-(5-carboxitiofen-2-il)dodecanoil-γ-Glu] desB30 insulina

- 15 Se disolvió DesB30 insulina humana (294 mg, 0.051 mmol) en DMSO (3.5 mL). Se le agregó trietilamina (0.071 mL, 0.51 mmol).

- El éster 1-*tert*-butílico del ácido (S)-2-[13-(5-*tert*-butoxicarboniltiofen-2-il)tridecanoilamino]pentanodioico (45.4 mg, 0.078 mmol) se activó con TSTU análogamente a como se describió antes. Se disolvió en DMSO (0.5 mL) y se agregó a la solución de insulina. Esta mezcla se agitó cuidadosamente durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se enfrió con un baño de hielo (la solución se congeló). Se agregaron 8 mL de agua y la solución se dejó en reposo hasta que la mezcla congelada se disolvió. El pH se ajustó a 5.3 con HCl acuoso 1 N y el precipitado se aisló por centrifugación. El compuesto aislado se trató con una mezcla de TFA al 97.5% y tiofeno al 2.5% durante 30 minutos, y se vertió en éter dietílico (50 mL). El producto crudo se aisló por filtración y se purificó de manera análoga a la descrita antes.
- 20

HPLC-MS (Método C): m/z = 1549 (m/4); 1232 (m/5) T_R = 3.5 min.

- 25 Ejemplo 8

Hidrofobicidad, afinidad por el receptor, afinidad por la albúmina y autoasociación

Análisis de las propiedades de autoasociación de los derivados de la insulina de la invención. La capacidad de los derivados de la insulina de la invención para autoasociarse en complejos grandes pero solubles se analiza usando SEC (cromatografía de exclusión por tamaño):

- 30 Columna: Superose™ 6 PC 3.2/30, CV = 2.4 ml (Amerham Biosciences)
- Temperatura: 37 °C
- Tampón SEC: NaCl 140 mM, TrisHCl 10 mM, NaN₃ al 0.01%, pH 7.5
- Volumen de inyección: 20 µl
- Flujo: 0.05 ml/min
- 35 Tiempo de la corrida: 60 min y equilibrado de otros 100 min

Para este análisis los derivados de la insulina de la invención están en una solución que consiste en derivado 0.6 mM, 2.1 Zn²⁺/hexámero, fenol 16 mM, fosfato 7 mM pH 7.8. El tiempo de retención del derivado se compara después con los tiempos de retención de las moléculas estándar siguientes:

Estándar I:	Dímero HSA+HSA	(66.4 kDa+133 kDa)
	Hexámero de insulina Co(III)	(35.0 kDa)
	Monómero de insulina X2	(5.9 kDa)
	Estándar II:	
	Azul dextrano	(1.5 MDa)
	Tiroglobulina	(669 kDa)
	Ferritina	(440 kDa)
	Aldolasa	(158 kDa)
	Ovoalbúmina	(44.5 kDa)
	Ribonucleasa	(13.7 kDa)

la ecuación siguiente se usa para determinar la K_{av} para el derivado:

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

en la que t es el tiempo de retención para un determinado pico, t₀ es el tiempo de retención para azul dextrano, V_t es el volumen total de la columna (en este caso 2.4 ml), f es el flujo (en este caso 0.04 ml/min), y t_d es el tiempo de retención para el azul dextrano sin la columna en el sistema.

El valor de K_{av} indica el grado de autoasociación de un derivado, es decir una K_{av} grande similar a la K_{av} para el hexámero de insulina Co(III) y el monómero de insulina X2 no muestra propensión o muestra baja propensión del derivado a formar grandes complejos autoasociados, mientras que una K_{av} muy pequeña, próxima a cero o incluso negativa muestra gran propensión del derivado a la autoasociación en complejos solubles grandes.

Datos de hidrofobicidad de los derivados de la insulina según la invención.

La hidrofobicidad (índice hidrófobo) de los derivados de la insulina de la invención respecto a la insulina humana, k'_{rel}, se midió en una columna de HPLC LiChrosorb RP18 (5 μm, 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 acetonitrilo al 10%, y B) acetonitrilo al 50% en agua como eluyentes. La elución se monitoreó siguiendo la absorción UV del eluido a 214 nm. El tiempo de evacuación, t₀, se encontró inyectando nitrato de sodio 0.1 mM. El tiempo de retención para la insulina humana, t_{humana}, se ajustó a al menos 2t₀ variando la proporción entre las soluciones A y B. k'_{rel} = (t_{derivado}-t₀)/(t_{humana}-t₀). El valor de k'_{rel} encontrado para una cantidad de derivados de la insulina según la invención se muestra en la tabla 1.

Ensayo de afinidad por la seroalbúmina humana

Constante de unión relativa del análogo ¹²⁵I-TyrA14 a la seroalbúmina humana inmovilizado en partículas de Minileak y medida a 23 °C (detemir =1 solución salina tamponada)

Compuesto	Hidrofobicidad respecto a la insulina humana	Afinidad por el receptor de la insulina respecto a la insulina humana	Afinidad por la seroalbúmina humana respecto a la insulina detemir	Autoasociación: K _{av} (% del área del pico)
Ejemplo 1	+++	++	n.a.	+++
	0.73	17%		0 (95%)

Compuesto	Hidrofobicidad respecto a la insulina humana	Afinidad por el receptor de la insulina respecto a la insulina humana	Afinidad por la seroalbúmina humana respecto a la insulina detemir	Autoasociación: K_{av} (% del área del pico)
Ejemplo 2	+++	++	+	+++
	0.52	44%	0.21	0.02 (58%)
Ejemplo 3	+++	++	++	++
	0.72	18%	0.82	0.15 (64%)
Ejemplo 4	+++	++	++	+++
	0.44	37%	0.84	0.04 (76%)
Ejemplo 5	++	++	+	++
	1.8	43	0.33	0.26 (48%)
Ejemplo 6	++	++	n.a.	n.a.
	2.8	29		

Hidrofobicidad respecto a la insulina humana: $k_{rel} < 1$: +++, 1-10: ++, >10: + (HI = 1)

Afinidad por el receptor de la insulina respecto a la insulina humana: <5%: +, 5-50%: ++, >50%: +++

Afinidad por la seroalbúmina humana respecto a la insulina detemir: <0.5: +, 0.5-2: ++, > 2: +++

Autoasociación: $K_{av} < 0.1$: +++, $K_{av} < 0.55$: ++ y $K_{av} \geq 0.55$: +

$K_{av} = 0.55$ para la seroalbúmina humana, $K_{av} = 0.63$ para el hexámero de insulina humana Co(III),

$K_{av} = 0.72$ para el análogo de la insulina monomérico X2.

n.a = no se analizó.

Métodos farmacológicos

Ensayo (I)

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

5 La afinidad de los análogos de la insulina de la 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, $MgSO_4$ 10 mM, Tween-20 al 0.025%). La mezcla de reactivo para una única placa Optiplat Packard (Packard N° 6005190) estuvo compuesta por 2.4 μ l de receptor de la insulina humana recombinante purificado – exón 11, diluido 1:5000, 10 una cantidad de solución madre de A14Tyr^{[125]I}-insulina humana correspondiente a 5000 cpm por 100 μ l de mezcla de reactivo, 12 μ l de una dilución 1:1000 de anticuerpo F12, 3 ml de perlas de SPA y tampón de unión hasta un total de 12 ml. Se agregó un total de 100 μ l y se prepararon diluciones seriadas de las muestras apropiadas. Después a 15 las diluciones seriadas se les agregó 100 μ l de mezcla de reactivo y las muestras se incubaron durante 16 horas con agitación suave. 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).

Preparación de anticuerpos mIR monoclonales

Se produjeron anticuerpos específicos (F12) por técnica monoclonal. Se inmunizaron ratones RBF mediante inyección de 50 μ g de mIR purificado en FCA por vía subcutánea, seguido de dos inyecciones de 20 μ g de mIR en

FIA. Los ratones que respondieron bien recibieron un refuerzo intravenoso de 25 µg de mIR y se les extrajeron los bazo luego de 3 días. Las células de los bazo se fusionaron con la línea celular de mieloma Fox (Köhler, G & Milstein C. (1976), *European J. Immunology*, 6:511-19; Taggart RT et al (1983), *Science* 219:1228-30). Se determinó la producción de anticuerpo en los sobrenadantes con un ELISA específico para mIR. Los pocillos positivos se clonaron y se analizaron en inmunotransferencia western.

Ensayo (II)

Potencia de los derivados de la insulina de la 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.

Protocolo experimental:

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) que 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.

La técnica de clamp empleada se adaptó de (1). 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 e insulina humana (un nivel de dosis por rata, n = 6-7 por nivel de dosis) a una velocidad constante durante 300 min. Los niveles de glucosa plasmática se midieron a intervalos de 10 min de principio a fin y la infusión de glucosa acuosa al 20% se ajustó concordantemente para mantener la euglucemia. Se juntaron las muestras de eritrocitos resuspendidos de cada rata y se les retornaron en volúmenes de aproximadamente ½ ml a través del catéter carotideo.

Cada día de experimento, se tomaron muestras de las soluciones de los derivados de insulina individuales a analizar y de la solución de insulina humana, antes y al final de los experimentos de clamp, y las concentraciones de los péptidos se confirmaron por HPLC. Las concentraciones plasmáticas de péptido C e insulina de rata así como del derivado de 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.

Compuestos de prueba y dosis: Las insulinas que se iban a probar se diluyeron de una solución madre que contenía 97 µM del derivado de la insulina en fosfato 5 mM pH 7.7. La concentración final de la solución pronta para usar fue de 0.45 µM del derivado de la insulina, 5 mM de fosfato, 100 mM de cloruro de sodio, 0.007% de polisorbato 20. El pH fue 7.7 y la velocidad de infusión i.v. fue de 15 y 20 pmol·min⁻¹·kg⁻¹.

Una solución madre de insulina humana que se usó como compuesto de referencia se formuló en un medio similar y se infundió i.v. a 6, 15 o 30 pmol·min⁻¹·kg⁻¹.

Ambas soluciones madre se almacenaron a -20 °C y se descongelaron toda la noche a 4 °C antes de usarlas. Las soluciones se voltearon suavemente varias veces 15 min antes de ser transferidas a las jeringas de infusión.

Ensayo (III)

Determinación en cerdas de T_{50%} de los derivados de la insulina de la invención

T_{50%} es el tiempo en el que 50% de una cantidad inyectada del derivado marcado A14 Tyr^{[125]I} de una insulina que se va a probar ha desaparecido del sitio de inyección medida con un contador y externo.

Se siguen los principios de cuidado de animales de laboratorio, se usan cerdas no diabéticas, LYYD exentas de patógenos específicos, cruce de razas de Danish Landrace, Yorkshire y Duroc (Holmenlund, Haarloev, Denmark) para los estudios de farmacocinética y farmacodinámica. Las cerdas están conscientes, tienen 4-5 meses de edad y pesan 70-95 kg. Los animales se dejan en ayunas durante 18 horas antes del experimento.

Las preparaciones formuladas de los derivados de la insulina marcados en Tyr^{A14} con ¹²⁵I se inyectan por vía sc. en las cerdas como se describió previamente (Ribel, U., Jørgensen, K, Brange, J, y Henriksen, U. *The pig as a model*

for subcutaneous insulin absorption in man. Serrano-Rios, M y Lefèbvre, P. J. 891-896. 1985. Amsterdam; Nueva York; Oxford, Elsevier Science Publishers. 1985 (Conference Proceeding)).

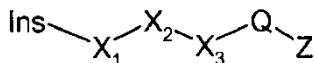
5 Al comienzo de los experimentos se inyecta una dosis de 60 nmol del derivado de la insulina según la invención (compuesto de prueba) y una dosis de 60 nmol de insulina detemir (ambas marcadas con ¹²⁵I en Tyr A14) en 2 sitios diferentes en el cuello de cada cerda.

10 La desaparición del marcador radioactivo del sitio de la inyección s.c. se monitorea empleando una modificación del método tradicional de recuento gamma externo (Ribel, U. Subcutaneous absorption of insulin analogues. Berger, M. y Gries, F. A. 70-77 (1993). Stuttgart; Nueva York, Georg Thime Verlag (Conference Proceeding)). Con este método modificado es posible medir continuamente la desaparición de la radioactividad de un depósito subcutáneo durante varios días usando un dispositivo portable inalámbrico (Scancys Laboratorieteknik, Værløse, DK-3500, Dinamarca). Las mediciones se realizan a intervalos de 1 min, y los valores de recuento se corrigen por la actividad de fondo.

La presente invención se refiere a nuevos derivados de la insulina humana que son solubles a valores de pH fisiológico y tienen un perfil de acción prolongada.

REIVINDICACIONES

1. Un derivado de la insulina que tiene la fórmula



en la que Ins es una molécula de insulina original y $\text{X}_1\text{-X}_2\text{-X}_3\text{-Q-Z}$ es un sustituyente y en la que Ins está unida al sustituyente a través de un enlace amida entre el grupo α -amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B de Ins o un grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena A o B de Ins y un grupo CO en X_1 , X_2 o X_3 del sustituyente;

X_1 es:

• $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_n$ donde n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6;

• $-\text{CO}-((\text{CR}^6\text{R}^7)_q\text{-NR-CO})_{1-4}$, donde R^6 y R^7 independientemente uno de otro e independientemente para cada valor de q pueden ser hidrógeno, C_{1-6} -alquilo, C_{2-6} -alqueno, C_{2-6} -alquino, $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{-COOH}$; $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{-CONH}_2$; $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{-SO}_3\text{H}$; $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{-PO}_3\text{H}_2$; $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{-O-SO}_3\text{H}_2$; $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{-O-PO}_3\text{H}$, q es 1-6 y R es hidrógeno, $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{-COOH}$; $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{-CONH}_2$; $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{-SO}_3\text{H}$; $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{-PO}_3\text{H}_2$; $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{-O-SO}_3\text{H}_2$; $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{-O-PO}_3\text{H}_2$; C_{1-6} -alquilo, C_{2-6} -alqueno; C_{2-6} -alquino o arilo o CH_2 -arilo, donde el grupo arilo puede estar sustituido con 1 o 2 grupos elegidos del grupo que consiste en $-\text{COOH}$, $-\text{CH}_3$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{-SO}_3\text{H}$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$, $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{-O-PO}_3\text{H}_2$, tetrazo-5-ilo o CONH_2 , C_{1-6} -alquilo, C_{2-6} -alqueno, C_{2-6} -alquino, hidrógeno, halógeno, $-\text{CN}$, $-\text{CF}_3$, $-\text{OCF}_3$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{CF}_3$, $-\text{SCF}_3$, $-\text{NO}_2$, $-\text{OR}^2$, $-\text{SR}^2$, $-\text{NR}^2\text{S}(\text{O})_2\text{R}^3$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^2\text{R}^3$, $-\text{S}(\text{O})\text{NR}^2\text{R}^3$, $-\text{S}(\text{O})\text{R}^2$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^2$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^2\text{R}^3$, $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}^2\text{R}^3$, $-\text{NR}^2\text{C}(\text{O})\text{R}^3$, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NR}^2\text{R}^3$, $-\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})\text{NR}^2\text{R}^3$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^2$, $-\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})\text{R}^2$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^2$ o $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^2$ o $-\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})\text{OR}^2$, donde R^2 y R^3 son independientemente hidrógeno, C_{1-6} -alquilo, C_{2-6} -alqueno o C_{2-6} -alquino,

• un residuo de aminoácido amida de un aminoácido con ácido carboxílico en la cadena lateral, o un aminoácido con una cadena lateral no cargada, o un aminoácido con una cadena lateral cargada negativamente, donde dicho residuo forma, con su grupo ácido carboxílico, un enlace amida junto con el grupo α -amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B de Ins o junto con el grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena A o B de Ins,

• una cadena compuesta de dos, tres o cuatro residuos unidos entre sí mediante enlaces amida donde los residuos se eligen del grupo que consiste en: residuos de α -aminoácidos amida y residuos de aminoácidos como los especificados antes, en los cuales la cadena está unida mediante un enlace amida al grupo α -amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B de Ins o al grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena A o B de Ins, o

• un enlace

X_2 es:

• $-\text{CO}-$

• $-\text{COCH}(\text{R}^8)-$;

• $-\text{COCH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{R}^8)-$;

• $-\text{COCH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{R}^8)\text{COCH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{R}^8)-$;

• $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{R}^8)-$;

• $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{R}^8)\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{R}^8)-$;

• $-\text{COCH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{R}^8)-$;

• $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{R}^8)-$; donde R^8 puede ser COOH o CONH_2

• $-\text{CO}-((\text{CH}_2)_{2-6}\text{-NH-CO})_{1-4}$;

• $-(\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2-6}\text{-CO-NH})_{1-4}$;

• $-(\text{CO}-(\text{CR}^9\text{R}^{10})_{1-6}\text{-CO-NH})_{1-4}$, donde R^9 puede ser H, $-\text{COOH}$, $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{COOH}$, CH_3 , $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{CH}_3$ o CONH_2 y R^{10} puede ser H, $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{COOH}$, CH_3 o $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{CH}_3$;

• un enlace

siempre que si una amina de X_1 o X_2 forma un enlace con el resto del sustituyente, la amina debe estar unida al resto del sustituyente a través de un grupo carbonilo.

X_3 es $-C=O$, siempre que X_3 sólo esté presente si X_1 y X_2 son enlaces.

Q es

- 5 una cadena de fórmula $-(CH_2)_{s1}-Q_1-(CH_2)_{s2}-Q_2-(CH_2)_{s3}-Q_3-(CH_2)_{s4}-Q_4-(CH_2)_{s5}-$; en la que Q_1 , Q_2 y Q_3 son todos enlaces, Q_4 es C_6H_4 , s_2 , s_3 y s_4 son todos uno, s_1 es 5, 6, 7 u 8 y s_5 es 0, 1 o 2,

y

Z es:

- 10 $-COOH$;
 $-CO-Asp$;
 $-CO-Glu$;
 $-CO-Gly$;
 $-CO-Sar$;
 $-CH(COOH)_2$;
15 $-N(CH_2COOH)_2$;
 $-SO_3H$
 $-PO_3H_2$;
 $O-SO_3H$;
 $O-PO_3H_2$; o
20 tetrazo-5-lilo;

y cualquier complejo de Zn^{2+} de éstos.

2. Un derivado de la insulina de acuerdo con la reivindicación 1, en el que X_1 se elige del grupo que consiste en β -D-Asp-amida, β -L-Asp-amida, γ -L-Glu-amida y γ -D-Glu-amida.

3. Un derivado de la insulina de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, en el que X_2 es un enlace.

- 25 4. Un derivado de la insulina de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, en el que X_2 se elige del grupo que consiste en $-(CO-(CH_2)_2-NH-CO)_{1-}$ o $-(CO-(CH_2)_3-NH-CO)_{1-}$, $-CO-$ o $-COCH(COOH)-$.

5. Un derivado de la insulina de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 4, en el que X_1 es un enlace.

6. Un derivado de la insulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que Z es $-COOH$.

- 30 7. Un derivado de la insulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la insulina original es desB30 insulina humana.

8. 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 derivado de la insulina según cualquiera de las reivindicaciones precedentes opcionalmente junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

- 35 9. La composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 8 destinada al tratamiento pulmonar de la diabetes.

10. Un derivado de la insulina de acuerdo con la reivindicación 1 elegido del grupo que consiste en

- $N^{\epsilon B29}$ -(12-(4-carboxifenil)dodecanoil- γ -Glu) desB30 insulina,
 $N^{\epsilon B29}$ -(11-(4-carboxifenil)undecanoil γ -Glu) desB30 insulina,
 $N^{\epsilon B29}$ -(12-(3-carboxifenil)dodecanoil γ -Glu) desB30 insulina,
40 $N^{\epsilon B29}$ -(9-[4-(2-carboxietil)fenil]nonanoil) γ -Glu) desB30 insulina, o

N^{εB29}-(4-[11-(4-carboxifenil)undecanoilamino]butiril) desB30 insulina.