(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 558 930**

(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: **12.08.2008** **E 08787148 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015** **EP 2178909**

(54) Título: **Análogos de la insulina de acción rápida**

(30) Prioridad:

13.08.2007 EP 07114215

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.02.2016

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

OLSEN, HELLE BIRK;
KJELDSEN, THOMAS BØRGLUM;
BALSCHMIDT, PER;
GLENDORF, TINE y
HAVELUND, SVEND

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 558 930 T3

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

DESCRIPCIÓN

Análogos de la insulina de acción rápida

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a análogos de la insulina de acción rápida y a composiciones farmacéuticas que comprenden los análogos de la insulina de acción rápida y a composiciones farmacéuticas que comprenden los análogos de la insulina de acción rápida en mezcla con análogos de la insulina de acción prolongada.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La insulina es una hormona polipeptídica secretada por las células β del páncreas y que consta de dos cadenas de polipéptidos, A y B, que están unidas por dos puentes disulfuro intercatenarios. Por otra parte, la cadena A presenta un puente disulfuro intracatenario.

La hormona se sintetiza como un precursor de una sola cadena de proinsulina (preproinsulina) que consiste en un prepéptido de 24 aminoácidos seguido de proinsulina que contiene 86 aminoácidos con la configuración: prepéptido B - Arg Arg - C - Lys Arg - A, en donde C es un péptido de conexión de 31 aminoácidos. Arg-Arg y Lys-Arg son sitios de escisión para escindir el péptido de conexión de las cadenas A y B para formar la molécula de insulina de dos cadenas. La insulina es esencial para mantener una regulación metabólica normal.

La hormona se secreta como hexámeros definidos que se disocian mediante dilución, en primer lugar en dímeros y en segundo lugar en monómeros. La hormona activa es el monómero de insulina. La desestabilización del hexámero de insulina y/o del dímero de insulina da como resultado insulinas de acción rápida, tales como la insulina humana B28 Asp que se describe en el documento EP 214826.

En la actualidad, el tratamiento de la diabetes, tanto la diabetes de tipo 1 como la diabetes de tipo 2, se basa cada vez más en el llamado tratamiento intensivo con insulina. De acuerdo con este régimen, los pacientes son tratados 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, complementado por inyecciones en bolo de una insulina de acción rápida para cubrir el requerimiento de insulina relacionado con las comidas.

Dado que los pacientes diabéticos son tratados con múltiples inyecciones diarias que incluyen insulina de acción prolongada compensada con múltiples inyecciones de una insulina de acción rápida, una combinación de insulina de acción rápida y de acción prolongada en una inyección, podría ahorrar potencialmente muchas inyecciones. El documento WO 2003/094951 describe mezclas de un análogo de insulina de acción rápida aspart (insulina humana B28Asp) e insulina detemir (insulina humana Lys^{B29} (N^{ε}-tetradecanoilo) desB30). Sin embargo, las mezclas de análogos de insulina de acción rápida y de acción prolongada pueden tener una miscibilidad limitada que hace que la insulina de acción rápida tenga una acción menos rápida y la insulina de acción prolongada tenga una acción menos prolongada.

El objeto de la presente invención es proporcionar insulinas de acción rápida mejoradas que tienen propiedades acrecentadas sobre las insulinas de acción rápida conocidas, con respecto a la miscibilidad con análogos de insulina de acción prolongada solubles.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a análogos de insulina de acción rápida que pueden formar mezclas solubles (premezcladas o automezcladas) con análogos de insulina de acción prolongada. La acción rápida se logra a través de sustituciones/deleciones monomerizantes en el extremo C-terminal de la cadena B de la insulina humana y la miscibilidad con análogos de la insulina de acción prolongada se logra a través de una sustitución de la His que se une a Zn en la posición B10 de la insulina humana, por un residuo de aminoácido Gln.

Los análogos de la insulina de acción rápida se definen por las reivindicaciones.

En una realización, los residuos de aminoácidos en posición B26 y B30, se han eliminado.

En otra realización, los residuos de aminoácidos en posición B25 y B30, se han eliminado.

En aún otra realización, los residuos de aminoácidos en posición B27 y B30, se han eliminado.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de los análogos de insulina de acuerdo con la invención para el tratamiento de la diabetes.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende los análogos de la insulina de acción rápida de la invención y opcionalmente uno o varios agentes adecuados para la estabilización, conservación o isotonicidad, por ejemplo, iones de zinc, fenol, cresol, un parabeno, cloruro de sodio, glicerol o manitol. El contenido en zinc de las formulaciones puede estar entre 0 y aproximadamente 4 átomos de zinc por

hexámero de insulina.

Por lo tanto, en una realización, la presente invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende los análogos de la insulina de acción rápida de la invención, junto con adyuvantes y aditivos adecuados tales como uno o varios agentes adecuados para la estabilización, conservación o isotonicidad, por ejemplo, iones de zinc, fenol, cresol, un parabeno, cloruro de sodio, glicerol o manitol.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende los análogos de la insulina de acción rápida de la invención, junto con adyuvantes y aditivos adecuados tales como uno o varios agentes adecuados para la estabilización, conservación o isotonicidad, por ejemplo, iones de zinc, fenol, cresol, un parabeno, cloruro de sodio, glicerol o manitol.

La invención también proporciona composiciones solubles que son mezclas de análogos de la insulina de acción rápida de acuerdo con la presente invención y análogos o derivados de la insulina de acción prolongada, en donde la tasa de desaparición *in vivo* del análogo de insulina de acción rápida y del análogo o derivado de la insulina de acción prolongada desde el sitio de la inyección, es la misma o sustancialmente la misma que cuando se inyectan en composiciones distintas.

Por tanto, en otro aspecto, la presente invención se refiere a una formulación farmacéutica soluble que comprende un análogo de insulina humana de acción rápida según la presente invención en mezcla con un análogo o derivado de insulina humana de acción prolongada junto con adyuvantes y aditivos adecuados tales como uno o varios agentes adecuados para la estabilización, conservación o isotonicidad, por ejemplo, iones de zinc, fenol, cresol, un parabeno, cloruro de sodio, glicerol o manitol.

El contenido en zinc puede ser desde 0 hasta aproximadamente 4 átomos de zinc por hexámero de insulina. El pH de la preparación farmacéutica puede ser desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 8,5, desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 5 o desde aproximadamente 6,5 hasta aproximadamente 7,5.

En una realización, la invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende el análogo de insulina de acción rápida de la invención, en mezcla con un análogo o derivado de insulina humana de acción prolongada junto con adyuvantes y aditivos adecuados tales como uno o varios agentes adecuados para la estabilización, conservación o isotonicidad, por ejemplo, iones de zinc, fenol, cresol, un parabeno, cloruro de sodio, glicerol o manitol.

En otra realización, la invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende el análogo de insulina de acción rápida de la invención, en mezcla con un análogo o derivado de insulina humana de acción prolongada junto con adyuvantes y aditivos adecuados tales como uno o varios agentes adecuados para la estabilización, conservación o isotonicidad, por ejemplo, iones de zinc, fenol, cresol, un parabeno, cloruro de sodio, glicerol o manitol.

En una realización de la invención, el derivado de la insulina humana de acción prolongada es un derivado acilado de la insulina humana. Los derivados acilados de la insulina pueden ser del tipo en los que un grupo lipofílico está fijado al residuo de lisina en la posición B29 o B1. Representantes ilustrativos de insulinas aciladas se describen en el documento de patente EP nº 792290. Un producto comercial es Levemir® que comprende la insulina humana Lys^{B29}(N^{ε}-tetradecanoil) des(B30) (insulina detemir) como componente activo.

Por lo tanto, en una realización adicional, la invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende el análogo de insulina de acción rápida de la invención, en mezcla con derivados acilados de insulina humana de acción prolongada, junto con adyuvantes y aditivos adecuados, tales como uno o varios agentes adecuados para la estabilización, conservación o isotonicidad, por ejemplo, iones de zinc, fenol, cresol, un parabeno, cloruro de sodio, glicerol o manitol.

Otros ejemplos de insulinas de acción prolongada son aquellas que comprenden aminoácidos cargados positivamente, tales como Arg fijada al extremo C-terminal de la cadena B, como se describe en el documento US 5656722. Un producto comercial es Lantus® que comprende insulina humana A21Gly, B31Arg, B32Arg (insulina glargina).

Por lo tanto, en una realización adicional, la invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende el análogo de insulina de acción rápida de la invención, en mezcla con un análogo de insulina de acción prolongada que tiene una o dos cargas positivas adicionales, en comparación con la insulina humana, junto con adyuvantes y aditivos adecuados tales como uno o varios agentes adecuados para la estabilización, conservación o isotonicidad, por ejemplo, iones de zinc, fenol, cresol, un parabeno, cloruro de sodio, glicerol o manitol.

Por lo tanto, en una realización adicional, la invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende el análogo de insulina de acción rápida de la invención, en mezcla con un análogo de insulina de acción prolongada que tiene una o dos cargas positivas adicionales en comparación con la insulina humana, junto con adyuvantes y aditivos adecuados tales como uno o varios agentes adecuados para la estabilización, conservación o isotonicidad, por ejemplo, iones de zinc, fenol, cresol, un parabeno, cloruro de sodio, glicerol o manitol.

En una realización adicional, la invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende el análogo de insulina de acción rápida de la invención, en mezcla con un análogo o derivado de insulina humana de acción pro-

longada, en donde después de meclar el análogo o el derivado de insulina de acción prolongada con el análogo de insulina de acción rápida no se produce una reducción o sustancialmente una reducción.

En una realización adicional, la invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende el análogo de insulina de acción rápida de la invención, en mezcla con un análogo o derivado de insulina humana de acción prolongada, en donde después de mezclar el análogo o derivado de insulina de acción prolongada con el análogo de insulina de acción rápida no se produce una reducción o sustancialmente una reducción.

En una realización, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un análogo de insulina de acción rápida según la invención, en mezcla con insulina humana Lys^{B29}(N^{ε}-tetradecanoil) des(B30) (insulina detemir).

En otra realización, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un análogo de insulina de acción rápida según la invención, en mezcla con insulina humana Lys^{B29}(N^{ε}-(N-litocolil-γ-glutamil)) des(B30).

En una realización adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un análogo de insulina de acción rápida según la invención, en mezcla con insulina humana $N^{\varepsilon B29}$-(N^{α}-(HOOC$(CH_2)_{14}$CO)-γ-Glu) des(B30).

En una realización adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un análogo de insulina de acción rápida según la invención, en mezcla con insulina humana A21Gly, B31Arg, B32Arg (insulina glargina).

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de los análogos de la insulina de acción rápida según la presente invención, para la preparación de una preparación farmacéutica para la reducción del nivel de glucosa en sangre en mamíferos, en particular para el tratamiento de la diabetes opcionalmente en mezcla con un análogo o derivado de la insulina humana de acción prolongada.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** muestra la solubilidad en equilibrio de la insulina aspart (insulina humana B28Asp) y la insulina glargina (insulina humana A21Lys, B31Arg, B32Arg). Panel A: solubilidad en preparaciones individuales en agua pura. Panel B: solubilidad en una preparación mixta de insulina aspart 0,3 mM e insulina glargina 0,3 mM que comprende Zn^{2+} 0,3 mM, m-cresol 16 mM, fenol 16 mM y 1,6% de glicerol. Panel C: solubilidad en una preparación mixta de insulina aspart 0,3 mM con insulina glargina 0,3 mM que comprende NaCl 120 mM, 1,6% de glicerol. En cada panel la solubilidad de la insulina aspart está representada por marcadores de color gris y la solubilidad de la insulina glargina está representada por marcadores negros, las líneas que conectan los puntos de medición individuales se ofrecen como orientación visual.

La **Figura 2** muestra la solubilidad en equilibrio de la insulina humana B10Q, desB26, B28E, desB30 y la insulina glargina. Panel A: solubilidad en preparaciones individuales en agua pura. Panel B: solubilidad en una preparación mixta de insulina B10Q,desB26,B28E,desB30 0,3 mM e insulina glargina 0,3 mM que comprende Zn^{2+} 0,3 mM, m-cresol 16 mM, fenol 16 mM y 1,6% de glicerol. Panel C: solubilidad en una preparación mixta de insulina B10Q,desB26,B28E,desB30 0,3 mM e insulina glargina 0,3 mM que comprende NaCl 120 mM, 1,6% de glicerol. En cada panel la solubilidad de la insulina B10Q,desB26,B28E,desB30 está representada por marcadores de color gris y la solubilidad de la insulina glargina está representada por marcadores negros, las líneas que conectan los puntos de medición individuales se ofrecen como orientación visual.

La **Figura 3** muestra la solubilidad en equilibrio de la insulina B10Q, desB25, B28E, desB30 y de la insulina glargina. Panel A: solubilidad en preparaciones individuales en agua pura. Panel B: solubilidad en una preparación mixta de insulina B10Q,desB25,B28E,desB30 0,3 mM e insulina glargina 0,3 mM que comprende Zn^{2+} 0,3 mM, m-cresol 16 mM, fenol 16 mM y 1,6% de glicerol. Panel C: solubilidad en una preparación mixta de insulina B10Q,desB25,B28E,desB30 0,3 mM e insulina glargina 0,3 mM que comprende NaCl 120 mM, 1,6% de glicerol. En cada panel la solubilidad de la insulina B10Q,desB25,B28E,desB30 está representada por marcadores de color gris y la solubilidad de la insulina glargina está representada por marcadores negros, las líneas que conectan los puntos de medición individuales se ofrecen como orientación visual.

La **Figura 4** muestra la solubilidad en equilibrio de la insulina A21G, B10Q, B25H, B28E, desB30 y de la insulina glargina. Panel A: solubilidad en preparaciones individuales en agua pura. Panel B: solubilidad en una preparación mixta de insulina A21G,B10Q,B25H,B28E,desB30 0,3 mM e insulina glargina 0,3 mM que comprende Zn^{2+} 0,3 mM, m-cresol 16 mM, fenol 16 mM y 1,6% de glicerol. Panel C: solubilidad en una preparación mixta de insulina A21G,B10Q,B25H,B28E,desB30 0,3 mM e insulina glargina 0,3 mM que comprende NaCl 120 mM, 1,6% de glicerol. En cada panel la solubilidad de la insulina A21G,B10Q,B25H,B28E,desB30 está representada por marcadores de color gris y la solubilidad de la insulina glargina está representada por marcadores negros, las líneas que conectan los puntos de medición individuales se ofrecen como orientación visual.

La **Figura 5** muestra una comparación de la utilización de glucosa en cerdos después de una inyección sub-

cutánea, ya sea con inyecciones distintas de B10Q,desB26,B28E,desB30 0,6 mM, fenol 19 mM, m-cresol 19 mM, 1,6% de glicerol, pH = 3,2 (un total de 90 nmol del análogo de insulina) y Lantus® (insulina glargina) (un total de 210 nmol de insulina glargina), datos que se muestran en negro, o con una sola inyección de una preparación 30:70 mezclada previamente (base molar) de las dos insulinas mencionados anteriormente (un total de 300 nmol de los dos análogos de insulina), datos que se muestran en gris. La tasa de infusión de glucosa (GIR) se expresa como medias ± SE.

La **Figura 6** muestra la desaparición del depósito subcutáneo (modelo en cerdo) de preparaciones de insulina. Las curvas representan la desaparición de la insulina humana B10Q, desB26, B28E, desB30 en tres formulaciones diferentes a), b) y c) y la desaparición de la insulina aspart en una formulación d) de NovoRapid®. La $T_{50\%}$ es la siguiente, a) 0,9 ± 0,2, b) 1,3 ± 0,2 y c) 1,1 ± 0,3, d) 0,9 ± 0,3.

a) es una preparación que comprende insulina humana B10Q,desB26,B28E,desB30 0,6 mM, fenol 19 mM, m-cresol 19 mM y 1,6% de glicerol, pH 3,23

b) es una mezcla 3:7 de a) y Lantus®, pH = 3,74

c) es una mezcla que comprende insulina humana B10Q,desB26,B28E,desB30 0,18 mM e insulina detemir 1,68 mM y Zn 0,84 mM, fenol 19 mM, m-cresol 19 mM, 1,6% de glicerol y NaCl 10 mM, pH 7,39, y

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Las insulinas de acuerdo con la presente invención se modifican en ciertas posiciones en la molécula de insulina, lo que tiene un impacto sobre la formación de dímeros y hexámeros, y los análogos de la insulina de acuerdo con la presente invención se caracterizan por la posibilidad de formar formulaciones mixtas solubles (premezcladas o automezcladas) con análogos de la insulina de acción prolongada. La acción rápida se logra a través de sustituciones/deleciones monomerizantes en el extremo C-terminal de la cadena B y la miscibilidad con análogos de insulina de acción prolongada se logra a través de una sustitución de la His que se une a Zn en la posición B10.

Las sustituciones de uno o varios de los residuos de aminoácidos en el extremo C-terminal de la cadena B de la insulina humana para obtener un análogo monomérico de la insulina y por lo tanto de acción rápida, son bien conocidas, por ejemplo, a partir del documento EP 214826.

En una realización, los análogos de insulina de acuerdo con la presente invención se seleccionan a partir del grupo que consiste en insulina humana B10Q, des B27, B28E, desB30; insulina humana B10Q, des B26, B28E, desB30; e insulina humana B10Q, des B25, B28E, desB30.

Los análogos de la insulina de acción rápida según la invención se pueden mezclar con análogos o derivados de la insulina de acción prolongada sin un efecto reductor. Por reductor se entiende que el perfil de la actividad de la insulina de acción rápida y de acción prolongada, respectivamente, se cambian en la mezcla de modo que la insulina de acción rápida se vuelve más lenta y la insulina de acción prolongada se vuelve más rápida.

Por lo tanto, la expresión "sin reducción" tal como se usa en esta memoria, significa que cuando se formulan en una formulación, tanto la insulina de acción rápida como la insulina de acción prolongada presentan un perfil de acción que es idéntico o sustancialmente idéntico al perfil de acción de cuando se administran en formulaciones distintas.

El término "miscible" se utiliza para caracterizar mezclas de la insulina de acción rápida y de acción prolongada en las que sustancialmente no tiene lugar una reducción.

Por insulina de "acción rápida" se entiende una insulina que tiene un inicio de la acción más rápido que la insulina humana normal o regular y por "insulina de acción prolongada" se entiende una insulina que tiene una duración de la acción más prolongada que la insulina humana normal o regular.

Un grupo de insulinas de acción prolongada son derivados acilados de insulina. La insulina humana tiene tres grupos amino fundamentales: el grupo N-terminal de la cadena A y de la cadena B y el grupo ε-amino del residuo de lisina en la posición B29. Los derivados solubles de insulina que contienen sustituyentes lipófilos ligados al grupo ε-amino de un residuo de lisina en la posición B29, se describen, por ejemplo, en el documento WO 95/07931 y WO 2005/1234.

El grupo acilo será un grupo lipófilo y será típicamente un resto de ácido graso que comprende desde aproximadamente 6 a aproximadamente 32, más típicamente de 6 a 24, de 8 a 20, de 12 al 20, de 12-16, de 10-16 de 10-20, de 14-18 o de 14-16 átomos de carbono. Ejemplos de ácidos grasos son ácido cáprico, ácido láurico, ácido tetradecanoico (ácido mirístico), ácido pentadecanoico, ácido palmítico, ácido heptadecanoico, ácido esteárico, ácido dodecanoico, ácido tridecanoico y ácido tetradecanoico. El grupo acilo se puede obtener también a partir de un ácido graso dicarboxílico o puede ser un ácido litocólico.

El grupo acilo puede estar fijado directamente al grupo amino libre en cuestión. Sin embargo, el grupo acilo también puede estar fijado a través de enlaces amida con un enlazador que une entre sí el grupo amino libre en la molécula de insulina y el grupo acilo en cuestión.

La insulina acilada puede tener una o dos cargas netas negativas adicionales, en comparación con la insulina humana. La carga negativa adicional puede estar proporcionada por un grupo ácido carboxílico libre en el ácido graso o por el grupo enlazador que puede comprender uno o varios residuos de aminoácidos, de los cuales al menos uno contendrá un ácido carboxílico libre o un grupo que está cargado negativamente a pH neutro.

Ejemplos no limitantes de análogos acilados de insulina son insulina humana Lys^{B29}(N^{ε}-tetradecanoil) des(B30), insulina humana Lys^{B29}(N^{ε}-hexadecanoil) des(B30); insulina humana Lys^{B29}(N^{ε}-tetradecanoilo); insulina humana Lys^{B29}(N^{ε}-hexadecanoilo); insulina humana Lys^{B29}(N^{ε}-(N-hexa-decanoil-γ-Glu) des(B30); insulina humana Lys^{B29}(N^{ε}-(N-litocolil-γ-Glu)) des(B30); insulina humana Lys^{B29}(N^{ε}-(ω-carboxiheptadecanoil))-des(B30); insulina humana Lys^{B29}(N^{ε}-(ω-carboxi-heptadecanoilo)), insulina humana $N^{\varepsilon B29}$-(N^{α}-(HOOC$(CH_2)_{13}$CO)-γ-Glu) des(B30); insulina humana $N^{\varepsilon B29}$-(N^{α}-(HOOC$(CH_2)_{14}$CO)-γ-Glu) des(B30); insulina humana $N^{\varepsilon B29}$-(N^{α}-(HOOC$(CH_2)_{15}$CO)-γ-Glu) des(B30); insulina humana $N^{\varepsilon B29}$-(N^{α}-(HOOC$(CH_2)_{16}$CO)-γ-Glu) des(B30); insulina humana $N^{\varepsilon B29}$-(N^{α}-(HOOC$(CH_2)_{17}$CO)-γ-Glu) des(B30); insulina humana $N^{\varepsilon B29}$-(N^{α}-(HOOC$(CH_2)_{18}$CO)-γ-Glu) des(B30); insulina humana ($N^{\varepsilon B29}$-(N^{α}-(HOOC$(CH_2)_{13}$CO)-γ-Asp) des(B30); e insulina humana $N^{\varepsilon B29}$-(N^{α}-(HOOC$(CH_2)_{14}$CO)-γ-Asp) des(B30).

Un tipo adicional de análogos de la insulina de acción prolongada se describe en el documento EP 368.187, que describe análogos de la insulina que tienen grupos cargados, por ejemplo, Arg fijada al grupo C-terminal B30, tal como la insulina glargina.

La miscibilidad de los dos componentes se ha demostrado mediante mezclas de análogos de la insulina de acción rápida según la presente invención, con una insulina acilada de acción prolongada Lys^{B29}(N^{ε}-tetradecanoil) des(B30) (insulina detemir) y el análogo de la insulina de acción prolongada, insulina glargina.

Las insulinas de acción rápida se producen mediante la expresión de una secuencia de ADN que codifica la insulina de cadena sencilla en cuestión, en una célula hospedadora adecuada mediante una técnica bien conocida, tal como se describe, por ejemplo, en el documento EP 1.246.845. La insulina se expresa en una célula hospedadora transformada como una molécula precursora que se convierte en la molécula de insulina deseada mediante procesos enzimáticos y químicos *in vitro*, tal y como se describe en los documentos EP 163.529 y EP 214.826. La molécula precursora se puede expresar con una prolongación N-terminal que más tarde se escinde, como se describe en el documento EP 1246.845. Ejemplos de prolongaciones N-terminales del tipo adecuado en la presente invención se describen en el documento de patente de EE.UU. nº 5.395.922 y la patente EP nº 765.395.

Por "insulina" tal y como se emplea en el presente documento, se entiende la insulina humana que tiene la estructura de dos cadenas de la insulina humana con puentes disulfuro entre Cys^{A7} y Cys^{B7} y entre Cys^{A20} y Cys^{B19} y un puente disulfuro interno entre Cys^{A6} y Cys^{A11}, la insulina porcina y la insulina bovina.

La cadena B se refiere a la cadena B de la insulina humana con 30 residuos de aminoácidos y la cadena A se refiere a la cadena A de la insulina humana con 21 residuos de aminoácidos. Tanto la cadena B como la cadena A en los análogos de la insulina de acuerdo con la presente invención, pueden comprender mutaciones adicionales, además de las mutaciones de acuerdo con la invención, siempre que la molécula de insulina resultante todavía tenga las propiedades deseadas.

Por "desB30 o B(1-29)" se entiende una cadena B de insulina natural o un análogo de la misma que carece del residuo de aminoácido B30, y "A(1-21)" significa la cadena A de la insulina natural o un análogo o un derivado de la misma.

Por un "análogo de insulina" se entiende una molécula que difiere de la molécula natural por una o varias sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos y cualquier combinación de las mismas.

Por un "derivado de insulina" se entiende una molécula de insulina que tiene un grupo químico fijado a uno o a varios de los residuos de aminoácidos de la cadena principal.

La numeración de las posiciones en los análogos de acuerdo con la invención se basa en la molécula de insulina humana. Por tanto, por "B27" se entiende el residuo de aminoácido en la posición 27 de la cadena B de la insulina humana (contado desde el extremo N-terminal) y por "A1" se entiende el residuo de aminoácido en la posición 1 de la cadena A de la insulina humana (contado desde el extremo N-terminal), respectivamente. Este sistema de numeración se conserva incluso si se han delecionado uno o varios de los residuos de aminoácidos naturales. Por lo tanto, el análogo de insulina denominado "insulina humana B10Q, desB25, B28E, desB30" tendrá la secuencia C-terminal Thr-Asp-Lys en la cadena B.

Los residuos de aminoácidos se indican con el código de aminoácidos de tres letras o el código de aminoácidos de una letra. Salvo que se indique explícitamente, los aminoácidos mencionados en esta memoria son L-aminoácidos. Además, los extremos izquierdo y derecho de una secuencia de aminoácidos de un péptido son, respectivamente, los extremos N-terminal y C-terminal, a menos que se especifique lo contrario.

La expresión "insulina monomérica", cuando se emplea en esta memoria, se refiere a análogos de la insulina humana que son menos propensos a la autoasociación (en dímeros y hexámeros) que la insulina humana.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

Las composiciones que contienen insulinas de acción rápida de esta invención, opcionalmente en mezcla con un análogo o un derivado de la insulina de acción prolongada, se pueden usar en el tratamiento de estados que son sensibles a la insulina. Por lo tanto, se pueden utilizar en el tratamiento de la diabetes de tipo 1, la diabetes de tipo 2 y la hiperglucemia, por ejemplo, como a veces se observa en personas gravemente heridas y personas que se han sometido a una cirugía de importancia. El nivel de dosis óptima para cualquier paciente dependerá de una variedad de factores que incluyen la eficacia del análogo o derivado de insulina específico empleado, la edad, el peso corporal, la actividad física y la dieta del paciente, de una posible combinación con otros fármacos, y de la gravedad del estado que se va a tratar. Se recomienda que la dosificación diaria del análogo de insulina o de las mezclas de esta invención sea determinada para cada paciente individual por los expertos en la técnica, de una manera similar a la de las composiciones de insulina conocidas.

Por lo general, la composición farmacéutica de esta invención se administra por vía subcutánea. Sin embargo, la composición también se puede utilizar con bombas de insulina y se puede formular para una administración pulmonar.

La composición farmacéutica contendrá adyuvantes y aditivos habituales y se formulan preferiblemente como una solución acuosa. El medio acuoso se hace isotónico, por ejemplo, con cloruro de sodio, acetato de sodio o glicerol. Además, el medio acuoso puede contener iones de zinc, tampones y conservantes. El valor del pH de la composición se ajusta al valor deseado y puede estar entre aproximadamente 3 a aproximadamente 8,5, preferiblemente entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5 o aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5, dependiendo del punto isoeléctrico, pI, de la insulina en cuestión.

El análogo de la insulina de acción rápida y la insulina de acción prolongada se pueden mezclar en una relación de aproximadamente 10/90%, de aproximadamente 30/70% o de aproximadamente 50/50%. En una realización, la relación molar entre la insulina de acción prolongada y la insulina de acción rápida es mayor que 2/1.

El tampón utilizado en la preparación farmacéutica según la presente invención se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrógeno fosfato sódico, hidrógeno fosfato disódico, fosfato sódico y tris(hidroximetil)-aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas de los mismos.

Los conservantes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica. Para facilitar, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

El agente de isotonicidad se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en una sal (por ejemplo, cloruro de sodio), un azúcar o un alcohol de azúcar, un aminoácido o un alditol (por ejemplo, glicerol (glicerina)). El uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas es bien conocido por la persona experta Para facilitar, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995. El agente isotónico está presente típicamente en una concentración de 1 mg/ml a 50 mg/ml. En una realización adicional, el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/ml a 7 mg/ml, de 8 mg/ml a 24 mg/m o de 25 mg/ml a 50 mg/ml.

La presente invención se describe con más detalle en los siguientes ejemplos que no pretenden en modo alguno limitar el alcance de la invención tal y como se reivindica. Las Figuras adjuntas se consideran como partes integrales de la memoria descriptiva y la descripción de la invención. Todas las referencias, incluyendo las publicaciones, solicitudes de patente y patentes, citadas en esta memoria, se incorporan como referencia en su totalidad y en la misma medida, como si cada referencia se indicara de forma individual y específica para ser incorporada como referencia y se expusiera en su totalidad en este documento (en el grado máximo que permite la ley).

Todos los títulos y subtítulos se usan en este documento para facilitar y no se deben interpretar como limitantes de la invención en ningún modo.

El uso de cualquiera y de todos los ejemplos, o del lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como") proporcionado en este documento, pretende meramente clarificar mejor la invención y no plantea una limitación del alcance de la invención, salvo que se reivindique lo contrario. Ninguna expresión en la memoria descriptiva debería interpretarse como una indicación de que cualquier elemento no reivindicado sea esencial para la puesta en práctica de la invención.

La cita y la incorporación de documentos de patentes en este documento se hacen solo por conveniencia y no reflejan ningún punto de vista de la validez, la patentabilidad y/o la aplicabilidad de tales documentos de patente.

EJEMPLOS

Procedimientos Generales

Todos los plásmidos de expresión son del tipo C-POT, similares a los descritos en el documento EP 171.142, que se caracterizan porque contienen el gen de la triosa fosfato isomerasa (POT) de *Schizosaccharomyces pombe*, con el

fin de seleccionar y estabilizar plásmidos en *S. cerevisiae.* Los plásmidos también contienen el promotor y el terminador de la triosa fosfato isomerasa de *S. cerevisiae*. Estas secuencias son similares a las secuencias correspondientes en el plásmido pKFN1003 (descrito en el documento WO 90/100075) ya que todas son secuencias, excepto la secuencia del fragmento *Eco*RI-*Xba*I, que codifican la proteína de fusión del líder y del producto insulina. Con el fin de expresar diferentes proteínas de fusión, el fragmento *Eco*RI-*Xba*I de pKFN1003 se sustituye simplemente por un fragmento *Eco*RI-*Xba*I que codifica la fusión líder-insulina de interés. Tales fragmentos *Eco*RI-*Xba*I se pueden sintetizar utilizando oligonucleótidos sintéticos y PCR, de acuerdo con técnicas convencionales.

Los transformantes de levadura se prepararon mediante transformación de la cepa hospedadora MT663 de *S. cerevisiae* (*MATa*/*MAT*α *pep4*-3/*pep4*-3 *HIS4*/*his4 tpi::LEU2*/*tpi::LEU2* Cir^+). La cepa de levadura MT663 se depositó en la "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen" en conexión con la presentación del documento WO 92/11378 y se le otorgó el número de depósito DSM 6278.

MT663 creció sobre YPGaL (1% de extracto de levadura Bacto, 2% de Bacto peptona, 2% de galactosa, 1% de lactato) hasta una D.O. a 600 nm de 0,6. Se recogieron 100 ml de cultivo por centrifugación, se lavaron con 10 ml de agua, se centrifugaron de nuevo y se resuspendieron en 10 ml de una solución que contenía sorbitol 1,2 M, Na_2EDTA 25 mM pH = 8,0 y 6,7 mg/ml de ditiotreitol. La suspensión se incubó a 30°C durante 15 minutos, se centrifugó y las células se resuspendieron en 10 ml de una solución que contenía sorbitol 1,2 M, Na_2EDTA 10 mM, citrato de sodio 0,1 M, pH 0 5,8, y 2 mg de Novozym®234. La suspensión se incubó a 30°C durante 30 minutos, las células se recogieron por centrifugación, se lavaron en 10 ml de sorbitol 1,2 M y 10 ml de CAS (sorbitol 1,2 M, $CaCl_2$10 mM, Tris HCl 10 mM (Tris = Tris(hidroximetil)aminometano) pH = 7,5) y se resuspendieron en 2 ml de CAS. Para la transformación, 1 ml de células suspendidas en CAS se mezcló con aprox. 0,1 mg de ADN de plásmido y se dejó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió 1 ml de (20% de polietilenglicol 4000, $CaCl_2$ 10 mM, Tris HCl 10 mM, pH = 7,5) y se dejó la mezcla durante otros 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó y el sedimento se resuspendió en 0,1 ml de SOS (sorbitol 1,2 M, 33% v/v de YPD, $CaCl_2$ 6,7 mM) y se incubó a 30°C durante 2 horas. A continuación, la suspensión se centrifugó y el sedimento se resuspendió en 0,5 ml de sorbitol 1,2 M. A continuación, se añadieron 6 ml de agar superior (el medio SC de Sherman et al. (1982) Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory) que contenían sorbitol 1,2 M más 2,5% de agar) a 52°C y la suspensión se vertió en la parte superior de las placas que contenían el mismo medio de agar solidificado, que contenía sorbitol.

La cepa MT663 de *S. cerevisiae* transformada con los plásmidos de expresión, se cultivó en YPD durante 72 horas a 30°C.

EJEMPLO 1

<u>Solubilidad en equilibrio de las formulaciones de insulina</u>

Se prepararon soluciones madre de un análogo de insulina de acción rápida o de una mezcla de un análogo de insulina de acción rápida y una insulina de acción prolongada (insulina glargina) que contenían concentraciones de Zn^{2+}, fenol y glicerol cercanas a los productos comercializados o NaCl 120 mM, y se ajustó el pH al valor deseado, correspondiente al punto final alcalino del perfil de la solubilidad del pH. A partir de estas soluciones madre se retiraron muestras, se ajustó el pH al valor deseado en el intervalo de pH 3-8 y 0,3 ml de muestras se incubaron a 23°C durante al menos 4 días. Después de la centrifugación (20.000 g durante 20 minutos a 23ºC) de cada muestra, se midió el pH y la solubilidad se determinó mediante cuantificación del contenido en insulina en el sobrenadante, mediante análisis de HPLC de fase inversa en una columna XTerra RP8 Guard (Waters), de 50 x 20 mm, 5 micras de tamaño de partícula, eluida a 2 ml/minuto a 35°C o en una columna Gemini 3u C18 110A (Phenomenex), de 50 x 2,0 mm, tamaño de partícula 3 micras, eluida a 0,8 ml/minuto a 35°C. La insulina se eluye con un tampón de fosfato, pH = 7,2, partiendo de aproximadamente 7% (p/p) de acetonitrilo, seguido de una etapa de gradiente con un aumento de acetonitrilo a una concentración de aproximadamente 65% (p/p).

La solubilidad en equilibrio frente al pH de varios análogos de insulina de la presente invención (insulina aspart mostrada como referencia) en agua pura o en formulaciones mixtas con insulina glargina, se muestra en las figuras 1-4. En cada panel de las figuras, A representa la solubilidad en formulaciones no mixtas en agua frente al pH de cada análogo de insulina, en comparación con la de la insulina glargina. Los paneles B y C son solubilidades de cada insulina en formulaciones mixtas, ya sea en una preparación próxima a la formulación farmacéutica (panel B: análogo de insulina 0,3 mM mezclado con insulina glargina 0,3 mM y Zn^{2+} 0,3 mM, m-cresol 16 mM, fenol 16 mM y 1,6 % de glicerol) o en NaCl 120 mM, 1,6% de glicerol (panel C: análogo de insulina 0,3 mM e insulina glargina 0,3 mM que comprende 1,6% de glicerol, NaCl 120 mM), NaCl 120 mM se compara con la fuerza iónica presente en la hipodermis.

En la Tabla 1 estas solubilidades se indican como "+" en la columna con el título "Miscibilidad de la insulina Lantus® (insulina glargina)", cuando la solubilidad del análogo de insulina individual a pH neutro no se ve comprometida cuando se mezcla, en comparación con la solubilidad en preparaciones distintas. En otros términos, cuando la insulina glargina precipita a pH neutro, mientras que el análogo de la insulina de la presente invención es totalmente soluble, esperamos que los dos análogos se puedan mezclar y esto se marca con "+" en la Tabla 1.

EJEMPLO 2

Utilización de glucosa en las preparaciones de insulina humana B10Q, desB26, B28E, desB30 e insulina glargina

El efecto de la utilización de glucosa después de una inyección subcutánea de las preparaciones de insulina de la presente invención, se caracterizó utilizando un modelo de abrazadera de cerdo tal y como se describe en Kurtzhals y Ribel, Diabetes 44, 1381-85, (1995).

La Figura 5 compara la utilización de glucosa en cerdos después de una inyección subcutánea, ya sea con inyecciones distintas de B10Q,desB26,B28E,desB30 0,6 mM, fenol 19 mM, m-cresol 19 mM, 1,6% de glicerol, pH = 3,2 (un total de 90 nmol del análogo de insulina) e insulina glargina (un total de 210 nmol de insulina glargina) o con una sola inyección de una preparación premezclada 30:70 (base molar) de las dos insulinas mencionados anteriormente (un total de 300 nmol de los dos análogos de insulina). La utilización de la glucosa después de una inyección de una preparación mixta en comparación con la que sigue a las inyecciones por separado, es indistinguible dentro de la incertidumbre experimental.

EJEMPLO 3

Las propiedades de PK de una serie de análogos de insulina de la presente invención en diferentes formulaciones, se caracterizan por la tasa de desaparición desde el depósito subcutáneo después de inyecciones subcutáneas en cerdos. $T_{50\%}$ es el tiempo transcurrido hasta que desaparece el 50% de la insulina A14 Tyr(^{125}I) del sitio de la inyección, tal como se mide con un contador γ externo (Ribel et al., The Pig as a Model for Subcutaneous Absorption in Man. En: M. Serrano-Rios y P.J. Lefebre (compiladores): Diabetes (1985) Proceedings of the 12th congress of the International Diabetes Federation, Madrid, España, 1985 (Excerpta Medica, Amsterdam (1986), 891-896) Los valores de $T_{50\%}$ de una serie de análogos de la insulina de la presente invención se presentan en la tabla 1 y ejemplos de curvas de desaparición se ilustran en la Figura 6. Sirviendo como referencia la insulina aspart (insulina humana B28D) en una formulación de NovoRapid®, que se ha incluido en todos los estudios.

Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 1, en donde

(1) se refiere a un ensayo de métodos bioquímicos (II),

(2) se refiere a un ensayo de métodos bioquímicos (III),

(3) se refiere a un ensayo de métodos bioquímicos (IV),

(4) se refiere a formulaciones de análogo de insulina 0,6 mM, fenol 19 mM, m-cresol 19 mM, 1,6% de glicerol, pH entre 3,0 y 4,0 medidas como se describe en el Ejemplo 3.

(5) se refiere a formulaciones de análogo de insulina 0,18 mM, insulina detemir 1,68 mM, Zn 0,84 mM, fenol 19 mM, m-cresol 19 mM, 1,6% de glicerol, NaCl 10 mM, pH 7,4 - análogo de insulina 0,3 mM, insulina detemir 1,2 mM, Zn 0,84 mM, fenol 19 mM, m-cresol 19 mM, 1,6% de glicerol, NaCl 10 mM pH ~ 7,4 medidas como se describe en el Ejemplo 3,

(6) se refiere a mezclas de la formulación de (4) con Lantus®, relación molar como se indica. Medidas como se describe en el Ejemplo 3,

(7) se refiere a la solubilidad de las especies individuales de insulina, medida como se describe en el Ejemplo 1,

(8) se refiere a la miscibilidad medida por cromatografía de exclusión por tamaño, ensayo de métodos bioquímicos (I). Se indica la distribución medida sobre el material de elución como monómero y hexámero, respectivamente, y entre paréntesis la distribución teórica calculada a partir de la relación molar. La insulina detemir en este sistema eluye en parte como monómero y en parte como hexámero, y

(9) se refiere a un método NUV-CD, ensayo de métodos bioquímicos (VI).

TABLA 1

Sustituciones	Unión de hIR (%) (1)	Potencia de rFFC (%) (2)	Unión de hIGF-1R (%) (3)	$T_{50\%}$ de desap. (horas) (4)	$T_{50\%}$ de desap. (horas), mezcla con Levemir® (5)	$T_{50\%}$ de desap. (horas), mezcla con Lantus® (6)	Miscibilidad con Lantus (7)	Miscibilidad de la insulina detemir. Medida (teórica) (8)	Monómero→ 1 nM (NUV-CD) (9)
B28D							÷	11:89 **(36:64)**	
A18, B10Q, B28E, desB30								37:63 (36:64)	
B10Q, B28E, desB30	124	144	47				÷		+
B10Q, des-B27, B28E, desB30	115	141	26	0,8 ± 0,2; 0,6 ± 0,2; 0,8 ± 0,1	1,1 ± 0,2 (0,3: 1,2 mm)	1,1 ± 0,3 (0,3: 0,3 mM); 1,3 ± 0,3 (0,18: 0,42 M M)	+		+
B10Q, B22E, B28E, desB30		90	7				+		+
B10Q, des-B26, B28E, desB30	47	85	4	0,9 ± 0,2	1,1 ± 0,3 (0,18: 1,68 M)	1,3 ± 0,2 (0,18: 0,42 M M)	+		+
B10Q, B26E, B28E, desB30	163		10						+
B10Q, des-B25, B28E, desB30	105	158	34				+		+
B10Q, B25H, B28E, desB30	45		7	0,8 ± 0,3; 0,7 ± 0,1	1,0 ± 0,2 (0,3: 1,2 mm)	2,1 ± 0,2 (0,3: 0,3)	÷	25:a5 (25:75)	+
A21G, desB1, B3T, B10Q, B28D, B29P, B30K	85	88	44				÷	25:75 (25:75)	+
A21G, B10Q, desB27, B28E, desB30	72		39						+
A21G, B10Q, B25H, B28E, desB30	33	83					÷	25:75 (25:75)	+
A21G, desB1, B3Q, B10Q, B28E, desB30	91		48				÷		+
A21G, desB1, B3Q, B10Q, B25H, B28E, desB30	32	71					÷		+
A22K, B3T, B10Q, desB27, B28E, desB30	96	59	76				÷		+

MÉTODOS FARMACOLÓGICOS

Ensayo (I)

La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) se realizó esencialmente como se describe en Havelund et al. 2004 Pharmaceutical research, 21, 1498-1504. El sistema cromatográfico era una columna 6 HR PC 6/30 de Superosa (GE Healthcare) eluida con solución salina isotónica tamponada con Tris (NaCl 140 mM, Tris/HCl 10 mM, 0,01% de NaN_3, pH 7,5 a 37°C, inyectando 1% del volumen de columna y empleando un flujo de 90 min por volumen de columna y detección con UV a 276 nm Las referencias eran una insulina monómera estable X2 (insulina humana AspB9, GluB27, exenta de zinc), una insulina hexámera estable: insulina Co(III), albúmina (HSA), y albúmina covalente (formada en solución).

Ensayo (II)

Unión del receptor de insulina

La afinidad de los análogos de insulina hacia el receptor de la insulina humana se puede determinar mediante un ensayo de captura de anticuerpos en placa de microtitulación con ensayo SPA (ensayo de proximidad del centelleo). Se mezclan perlas que se unen a anticuerpo SPA-PVT, reactivo anti-ratón (Amersham Biosciences, nº de Cat. PRNQ0017) con 25 ml de tampón de unión (HEPES 100 mM pH 7,8; cloruro de sodio 100 mM, $MgSO_4$ 10 mM, 0,025% de Tween-20). La mezcla de reactivos para una sola Optiplaca de Packard (Packard nº 6005190) se compone de 2,4 µl de un receptor de insulina humana recombinante purificado, diluido 1:5000 - exón 11, una cantidad de una solución madre de insulina humana A14 Tyr[125I] correspondiente a 5000 cpm por cada 100 µl de mezcla de reactivos, 12 µl de una dilución 1:1000 de anticuerpo F12, 3 ml de perlas de SPA y tampón de unión hasta un total de 12 ml. A continuación se añade un total de 100 µl y se realiza una serie de diluciones a partir de muestras apropiadas. A la serie de diluciones se añaden entonces 100 µl de mezcla de reactivos y las muestras se incuban durante 16 horas con agitación suave. Las fases se separan después por centrifugación durante 1 min y se hace un recuento de las placas en un Top-counter. Los datos de la unión se ajustan utilizando el algoritmo de regresión no lineal en GraphPad Prism 2.01 (programa informático GraphPad, San Diego, CA).

Ensayo (III)

Potencia biológica de los análogos de insulina, ensayo en adipocitos liberados de ratas

Las ratas se sacrifican y las almohadillas grasas epididimales se retiran y se colocan en tampón de degradación. La degradación se lleva a cabo a 37°C con agitación fuerte durante 1 h. La suspensión celular se filtra con el fin de eliminar los restos de tejido, y los adipocitos se lavan dos veces y se resuspenden en tampón de incubación. Se incuban 0,1 ml de suspensión celular a 37°C con agitación suave, con 10 µl de una solución de glucosa y 10 µl de insulina u otro compuesto durante dos horas. La incubación se detiene mediante la adición de 150 µl de centelleo y se hace un recuento.

El cálculo de la potencia se realiza mediante una comparación de la CE50 de un patrón interno y la muestra desconocida. El ajuste de las curvas es un modelo logístico de cuatro parámetros que espera una respuesta constante mínima y máxima.

Ensayo (IV)

Unión de los análogos de insulina al receptor del factor de crecimiento-1 similar a la insulina humana (hIGF-1R)

La afinidad de los análogos de insulina hacia el receptor del factor de crecimiento-1 similar a la insulina humana (hIGF-1R) se puede determinar un ensayo de captura de anticuerpos en placa de microtitulación con SPA (ensayo de proximidad del centelleo). Perlas anti-ratón PVT SPA (500 mg, GE Life Sciences nº RPNQ0017) se mezclan con 25 ml de tampón de unión (HEPES 100 mM, NaCl 100 mM, $MgSO_4$ 10 mM, 0,025% de Tween-20, pH = 7,8). La mezcla de reactivos para una sola placa de microtitulación de 96 pocillos (Optiplate-96 Perkin-Elmer nº 6005190) se compone de 40 µl de hIGF-1R recombinante purificado (Novo Nordisk A/S), 12 µl de una dilución 1:16 de anticuerpo monoclonal contra hIGF-1R (clon 24-31), 3 ml de suspensión de perlas SPA y tampón de unión hasta un total de 12 ml. A 25 µl de una serie de diluciones de IGF-1, insulina o análogo de insulina se añade después 100 µl de mezcla de reactivos y 25 µl de una dilución de [125I]A14Tyr-IGF-1 humana correspondiente a 10.000 cpm. Las muestras se incuban durante 16 horas a temperatura ambiente con agitación suave. La placa se centrifuga a continuación durante 1 min a 1000 rpm antes de realizar un recuento en un Packard TopCount NXT. Los datos de la unión se ajustan utilizando el algoritmo de regresión no lineal de cuatro parámetros (dosis-respuesta sigmoidea) en GraphPad Prism 4.03 (programa informático GraphPad, San Diego, CA).

Ensayo (V)

Miscibilidad de análogos de la insulina con análogos de acción prolongada, método basado en RMN.

Las señales procedentes de proteínas y péptidos en espectros de RMN son muy sensibles al entorno químico local.

Como resultado podemos usar señales de RMN para analizar la miscibilidad de las insulinas. Para la insulina des-B30 marcada con ^{15}N, las posiciones de señales procedentes de grupos NH en un espectro de RMN ^{1}H-^{15}N HSQC son conocidas. Se pueden supervisar los cambios en los espectros de RMN ^{1}H-^{15}N cuando se mezcla insulina des-B30 marcada con ^{15}N con un análogo no marcado. Los espectros de RMN ^{1}H-^{15}N HSQC de la insulina desB30 y un espectro de RMN de desB30 mezclada con un análogo, se comparan. Si aparecen nuevos picos en el espectro de ^{1}H-^{15}N HSQC de desB30 ^{15}N cuando un análogo está presente en la mezcla, indica cambios en el entorno local de un grupo NH en la insulina desB30 ^{15}N. Esto demuestra una vez más que se han formado dímeros/hexámeros mezclados, lo que significa que los dos componentes no son miscibles.

Los espectros de RMN ^{1}H-^{15}N HSQC se registraron en un espectrómetro Varian Inova 600 NMR equipado con una sonda fría. Todos los datos se registraron a una temperatura de 37ºC. Las insulinas (desB30 ^{15}N y un análogo seleccionado) se disolvieron por separado en agua, se mezclaron y el sistema de disolvente final era: fenol-d 30 mM, NaCl 10 mM, 14 mg/ml de propilenglicol-d y tampón fosfato 8 mM pH 7,4, Zn 0,1 mM, 90% de H_2O/10% de D_2O.

Las concentraciones de insulina eran desB30 ^{15}N 0,2 mM y 0,05 mM del análogo de insulina seleccionado. Para comparar, un espectro de RMN de desB30 ^{15}N se registró con condiciones idénticas de los disolventes.

Cuando se sometían a ensayo los análogos de insulina de acuerdo con la presente invención en este ensayo, la mayoría de los análogos resultaba ser miscible con la insulina desB30, lo que indica que también se podrían mezclar con la insulina detemir que tiene la misma composición de aminoácidos en esta área de la molécula que la insulina desB30, excepto para el grupo acilo añadido en B29.

Ensayo (VI)

Determinación del equilibrio monómero/dímero, método basado en NUV-CD.

Monomerización de análogos de la insulina, NUV-CD

El espectro NUV-CD (dicroísmo circular cercano a UV) en el intervalo de 350-250 nm refleja el entorno de los cromóforos de tirosina y es muy sensible a la agregación y, por lo tanto, es útil como una información del equilibrio entre el monómero y dímero/agregados superiores, el valor numérico comienza bajo para las especies monoméricas (baja concentración) y más alto para las especies diméricas (compárese con la insulina humana a las concentraciones más altas).

Los espectros NUV CD se registraron a 20ºC utilizando un espectropolarímetro Jasco J-715 calibrado con ácido (+)-10-canforsulfónico. El CD se expresa como Δε (M-1cm-1) normalizado a la concentración molar de proteína en el intervalo cercano al UV (250-350 nm), y la señal en 276 nm frente a la concentración, se usa como una información de la monomerización.

En la Figura 7 un "+" en la columna con el título "Monómero -> 1 mM (NUV-CD)" indica que el análogo de insulina sometido a ensayo estaba predominantemente en forma monomérica.

REIVINDICACIONES

1. Un análogo de acción rápida de la insulina humana, en el que

el residuo de aminoácido en la posición 28 de la cadena B es Glu (E);
el residuo de aminoácido en la posición 10 de la cadena B es Gln (Q);
el residuo de aminoácido en la posición B30 se elimina; y
el residuo de aminoácido en la posición B25, B26 o B27 ha sido eliminado.

2. El análogo de la insulina de acción rápida según la reivindicación 1, que es la insulina humana B10Q, des-B25, B28E, desB30.

3. El análogo de la insulina de acción rápida según la reivindicación 1, que es la insulina humana B10Q, des-B26, B28E, desB30.

4. El análogo de la insulina de acción rápida según la reivindicación 1, que es la insulina humana B10Q, des-B27, B28E, desB30.

5. El análogo de la insulina de acción rápida según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para el uso como un medicamento para el tratamiento de la diabetes.

6. Una formulación farmacéutica que comprende un análogo de la insulina de acción rápida según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en mezcla con un análogo o un derivado de la insulina de acción prolongada seleccionado a partir de insulina humana $Lys^{B29}(N^{\varepsilon}$-tetradecanoil) des(B30) (insulina detemir); e insulina humana A21Gly, B31Arg, B32Arg (insulina glargina).

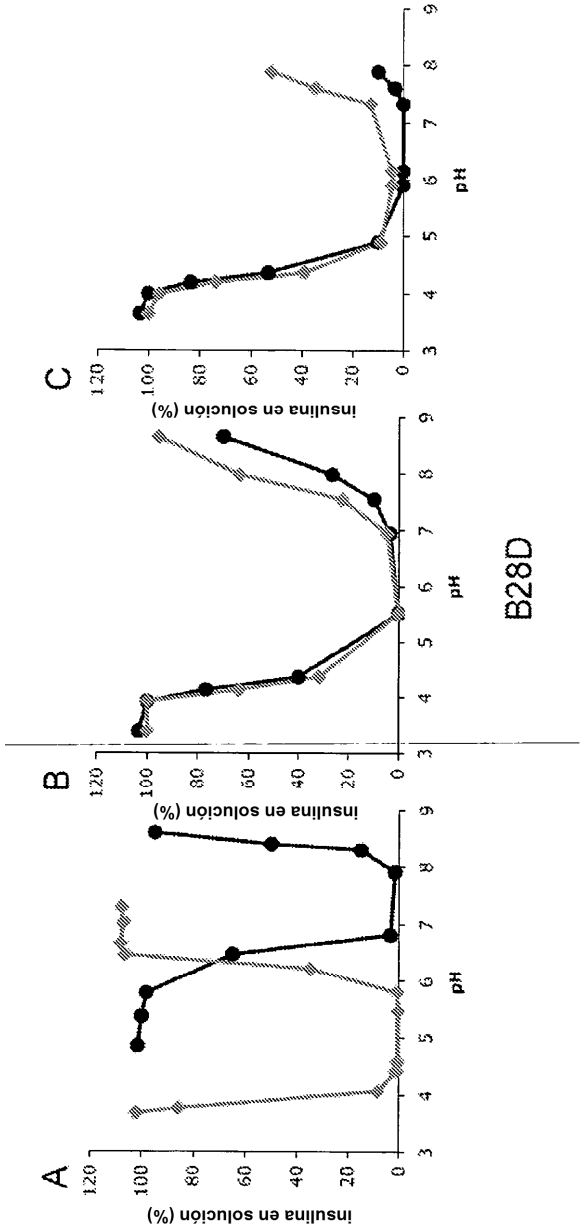

Fig. 1

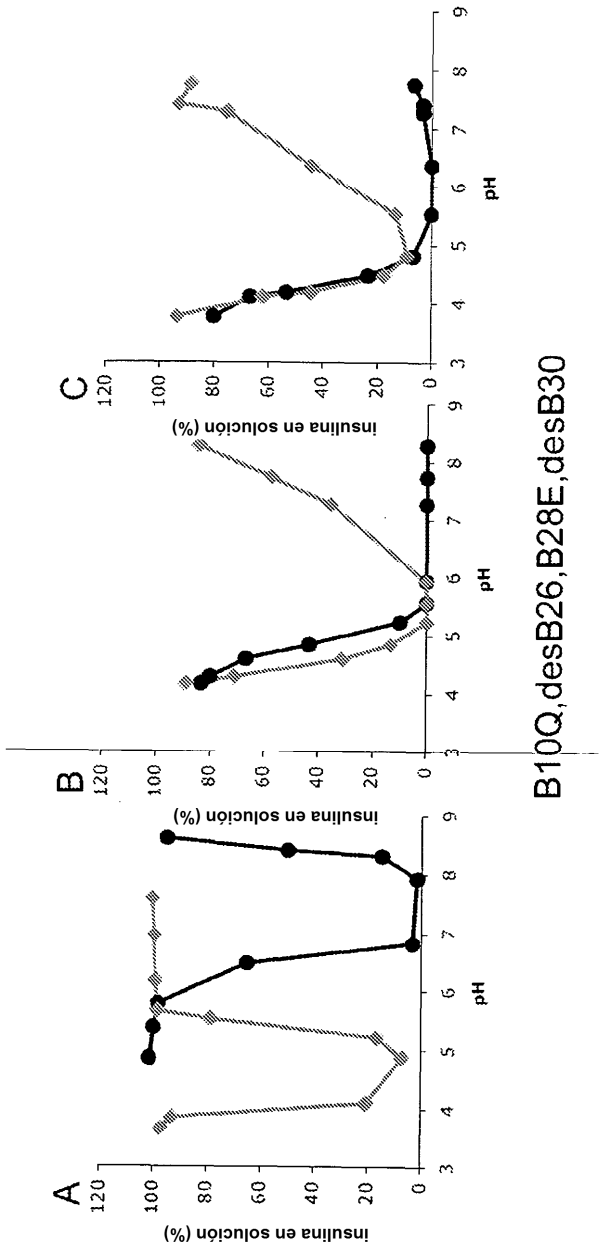

Fig. 2

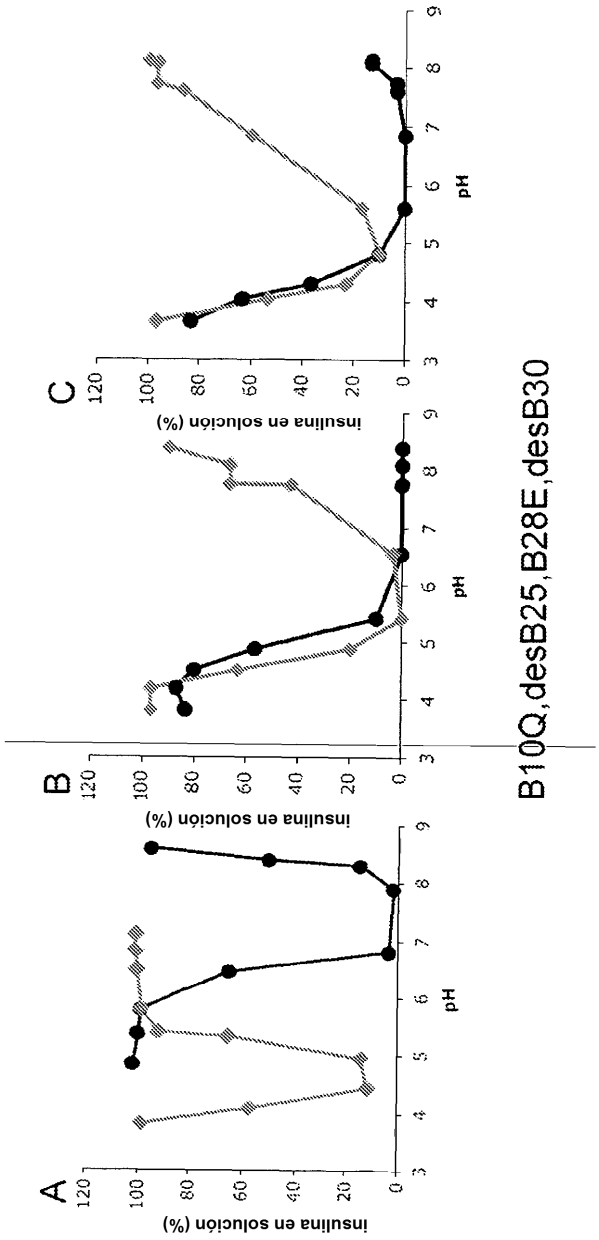

Fig. 3

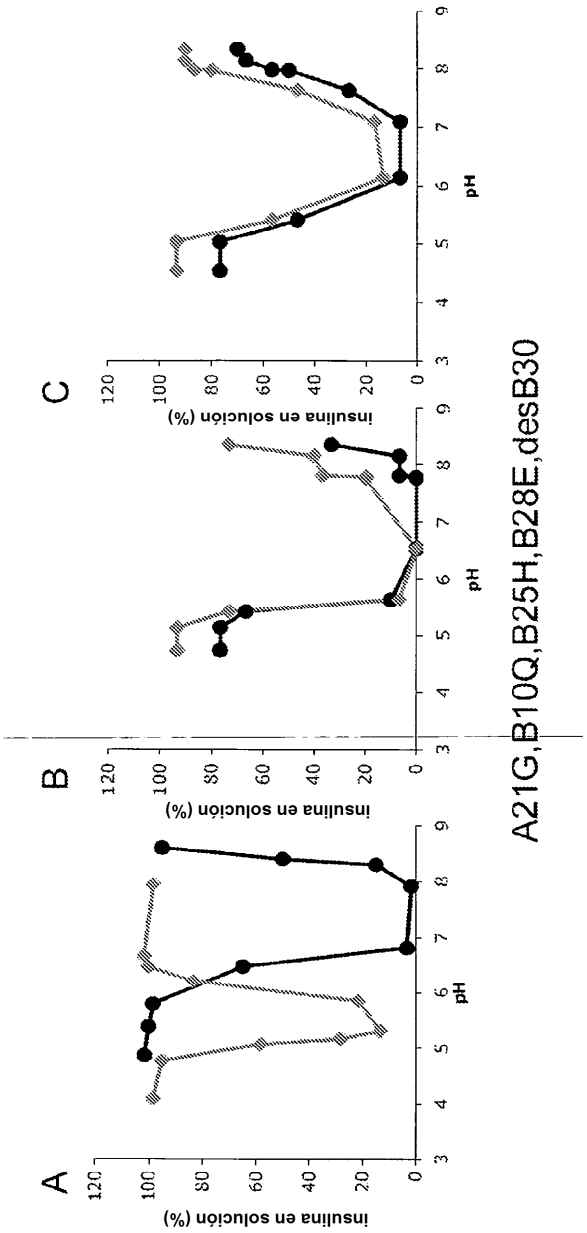

Fig. 4

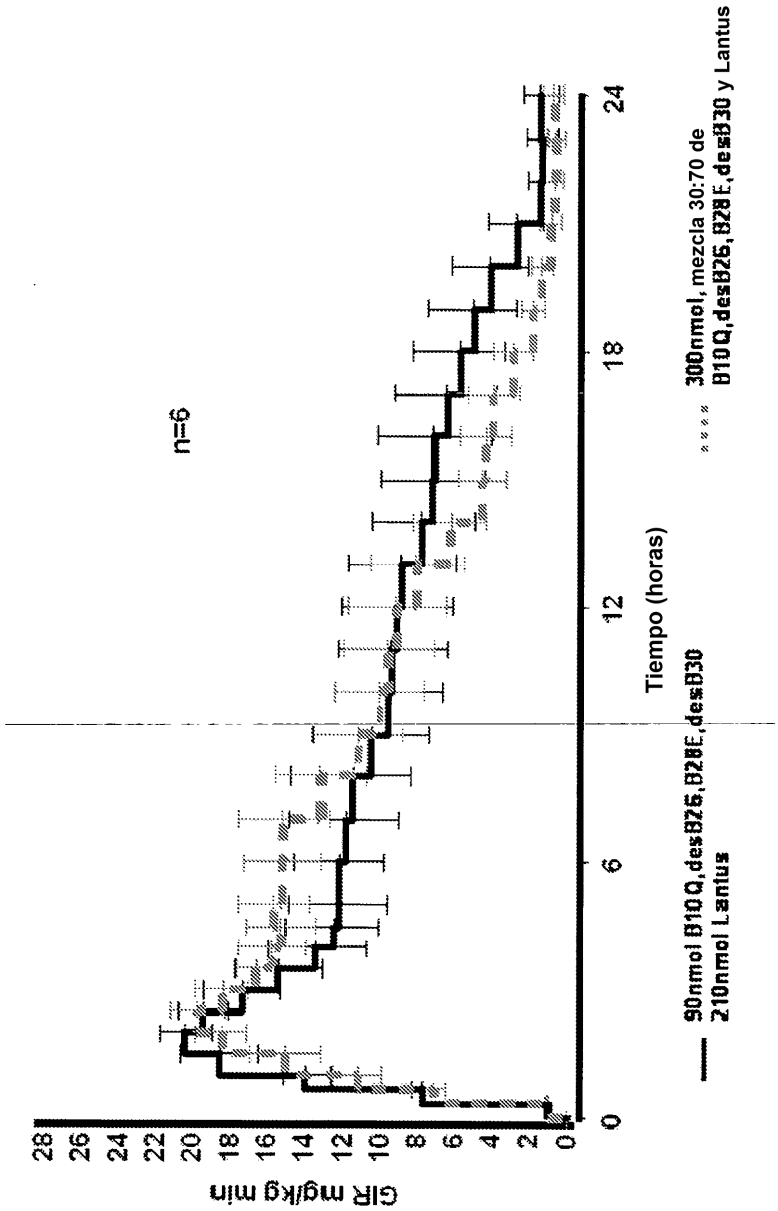
GIR mg/kg min
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
n=6
0
6
12
18
24
Tiempo (horas)
90nmol B10Q,desB26,B28E,desB30
210nmol Lantus
300nmol, mezcla 30:70 de
B10Q,desB26,B28E,desB30 y Lantus

Fig. 5

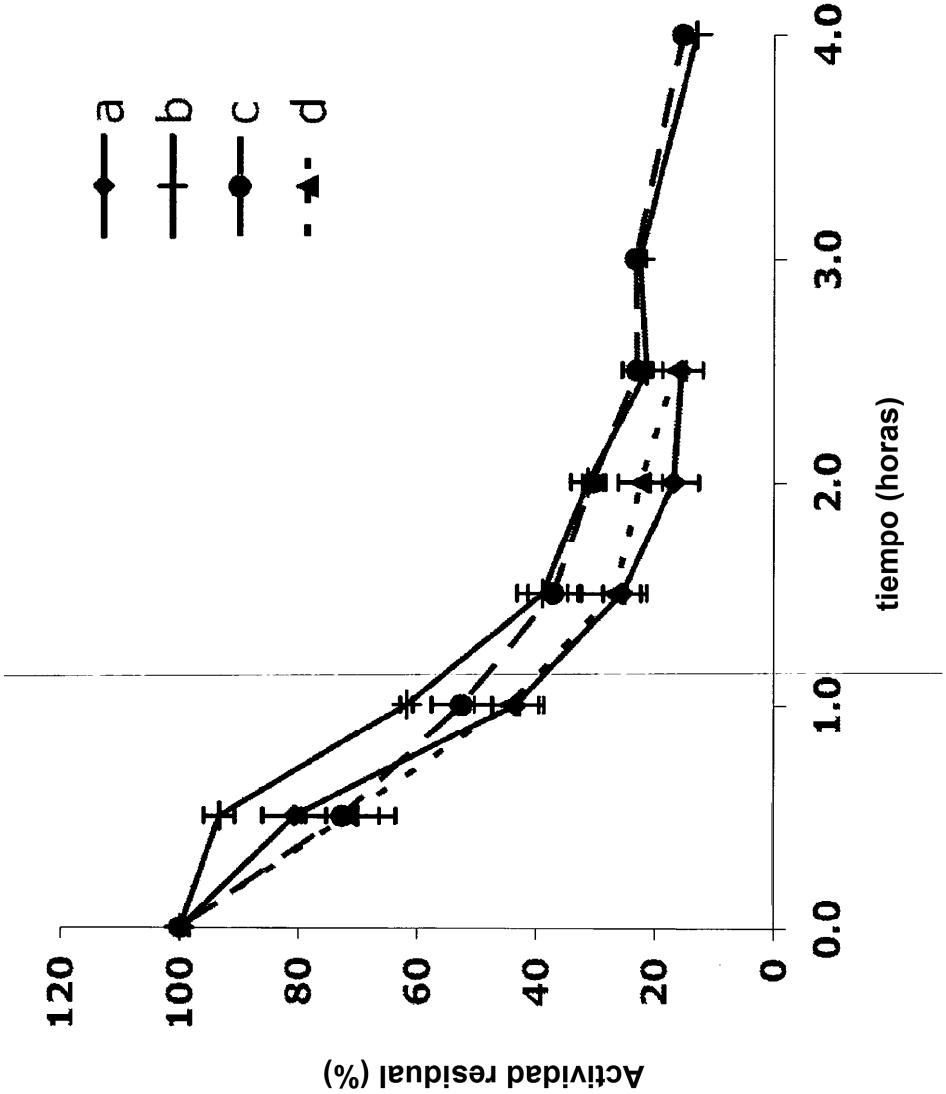
a
b
c
d
120
100
80
60
40
20
0
Actividad residual (%)
0.0
1.0
2.0
3.0
4.0
tiempo (horas)

Fig. 6