

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 563 553**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 14/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2009 E 09727247 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 2262539**

54 Título: **Conjugados de insulina-albúmina**

30 Prioridad:

01.04.2008 EP 08103284

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

15.03.2016

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)

**Novo Allé
2880 Bagsværd, DK**

72 Inventor/es:

**TAGMOSE, TINA MØLLER;
MADSEN, PETER y
KJELDSEN, THOMAS BØRGLUM**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

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

ES 2 563 553 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

Conjugados de insulina-albúmina

Campo de esta invención

5 La presente invención proporciona nuevos conjugados de insulina-albúmina para utilizar como medicamentos, en particular para el tratamiento de la diabetes.

Antecedentes de esta invención

10 La diabetes mellitus (diabetes tipo 1 y tipo 2) es un trastorno metabólico en el cual se perdió parcial o totalmente la capacidad para utilizar la glucosa. Alrededor del 5% de todas las personas sufren de diabetes y el trastorno se acerca a proporciones epidémicas. Desde el descubrimiento de la insulina en la década de 1920, se han hecho continuos esfuerzos para mejorar el tratamiento de la diabetes mellitus. Puesto que las personas que sufren de diabetes están sujetas a tratamiento crónico durante varias décadas, existe una importante necesidad de productos terapéuticos a base de insulina que mejoren la seguridad, la conveniencia y la calidad de vida.

15 La insulina humana consta de dos cadenas polipeptídicas, las denominadas cadena S A y B que contienen 21 y 30 residuos de aminoácidos. Un análogo de la insulina es insulina humana en la que uno o más aminoácidos han sido intercambiados por otros aminoácidos. Algunas de las formulaciones de insulina disponibles en el comercio se caracterizan por un inicio rápido de la acción y otras formulaciones tienen un inicio relativamente lento pero muestran una acción más o menos prolongada.

20 El tratamiento de la diabetes tipo 1 y tipo 2 incluye generalmente el tratamiento con una insulina basal de acción prolongada entre las comidas y el control nocturno de la glucemia junto con el tratamiento con insulina en bolo preprandial de acción corta para la hiperglucemia estimulada por las comidas. El objetivo del tratamiento es el mantenimiento a largo plazo del control próximo a la normoglucemia.

25 La conjugación de un péptido o proteína terapéuticos, como por ejemplo la insulina, a la seroalbúmina humana o sus derivados, resulta en la protección del péptido o la proteína terapéuticos contra las proteasas. El mayor tamaño del producto terapéutico resulta en una menor depuración. La conjugación da lugar por lo tanto a un tiempo de residencia prolongado del conjugado (véanse WO 01/77137 y WO 2006/012346). La conjugación de la insulina a la albúmina resulta en un perfil de acción prolongada y por lo tanto en una reducción de la frecuencia de inyección. El mantenimiento próximo a la normoglucemia resulta en un menor riesgo de hipoglucemia (véanse Diabetes 2005, vol 54, 251-258, y Bioconjugate Chem. 2005, vol 16, 1000-1008).

30 La reivindicación 7 DE WO 00/69900 se refiere a un método para proteger un péptido terapéutico de la actividad de la peptidasa que comprende, por ej. formar un conjugado de péptido-componente sanguíneo en el que el componente sanguíneo según la reivindicación 14 es albúmina. Ninguno de los ejemplos específicos de WO 00/69900 trata con insulina.

35 La reivindicación 1 de WO 2005/012346 se refiere a un derivado de la insulina que comprende una molécula de insulina y un grupo reactivo para unir covalentemente un componente sanguíneo. Según la reivindicación 2 de ese documento, el grupo reactivo se acopla a un aminoácido de la molécula de insulina, es decir, la insulina humana, en una posición elegida entre las posiciones Gly A1, Phe B1 y Lys B29.

La reivindicación 1 de WO 2005/103087 se refiere a un método para separar el conjugado de albúmina de la albúmina sin conjugar. Las insulinas ejemplificadas en WO 2005/103087 son insulina humana e insulinas que tienen extensiones en A1, B1 o B29, y todas contienen A21Asn (A21 N).

40 La reivindicación 1 de WO 2007/071068 se refiere a un proceso para la preparación de un conjugado que comprende albúmina unida covalentemente a un compuesto. La insulina se menciona en la página 9, línea 16, de ese documento. No se dan ejemplos específicos en WO 2007/071068.

Normalmente, las formulaciones de insulina se administran mediante inyección subcutánea.

Aspectos de esta invención

45 Un aspecto de esta invención se refiere a la provisión de derivados de la insulina los cuales, cuando se administran por vía subcutánea, proporcionan casi una normoglucemia durante al menos aproximadamente 6 horas.

Un aspecto de esta invención se refiere a la provisión de derivados de la insulina los cuales, cuando se administran por vía subcutánea, proporcionan casi una normoglucemia durante al menos aproximadamente 12 horas.

50 Un aspecto de esta invención se refiere a la provisión de derivados de la insulina los cuales, cuando se administran por vía subcutánea, proporcionan casi una normoglucemia durante al menos aproximadamente 18 horas.

Un aspecto de esta invención se refiere a la provisión de derivados de la insulina los cuales, cuando se administran por vía subcutánea, proporcionan casi una normoglucemia durante al menos aproximadamente 24 horas.

Un aspecto de esta invención se refiere a la provisión de derivados de la insulina los cuales, cuando se administran por vía subcutánea, proporcionan casi una normoglucemia durante al menos aproximadamente 36 horas.

- 5 Un aspecto de esta invención se refiere a la provisión de derivados de la insulina los cuales, cuando se administran por vía subcutánea, proporcionan casi una normoglucemia durante al menos aproximadamente 48 horas.

Un aspecto de esta invención se refiere a la provisión de derivados de la insulina los cuales, cuando se administran por vía pulmonar, proporcionan casi una normoglucemia durante al menos aproximadamente 6 horas.

- 10 Un aspecto de esta invención se refiere a la provisión de derivados de la insulina los cuales, cuando se administran por vía pulmonar, proporcionan casi una normoglucemia durante al menos aproximadamente 12 horas.

Un aspecto de esta invención se refiere a la provisión de derivados de la insulina los cuales, cuando se administran por vía pulmonar, proporcionan casi una normoglucemia durante al menos aproximadamente 18 horas.

Un aspecto de esta invención se refiere a la provisión de derivados de la insulina los cuales, cuando se administran por vía pulmonar, proporcionan casi una normoglucemia durante al menos aproximadamente 24 horas.

- 15 Un aspecto de esta invención se refiere a la provisión de derivados de la insulina los cuales, cuando se administran por vía pulmonar, proporcionan casi una normoglucemia durante al menos aproximadamente 36 horas.

Un aspecto de esta invención se refiere a la provisión de derivados de la insulina los cuales, cuando se administran por vía pulmonar, proporcionan casi una normoglucemia durante al menos aproximadamente 48 horas.

- 20 Un aspecto de esta invención se refiere a la provisión de derivados de la insulina los cuales, cuando se administran por vía oral, proporcionan casi una normoglucemia durante al menos aproximadamente 24 horas.

Un aspecto de esta invención se refiere a la provisión de derivados de la insulina los cuales, cuando se administran por vía oral, proporcionan casi una normoglucemia durante al menos aproximadamente 36 horas.

Un aspecto de esta invención se refiere a la provisión de derivados de la insulina los cuales, cuando se administran por vía oral, proporcionan casi una normoglucemia durante al menos aproximadamente 48 horas.

- 25 Otro aspecto de esta invención se refiere a la provisión de derivados de la insulina que sólo se administran una vez al día para proporcionar un control basal satisfactorio de la glucemia.

Otro aspecto de esta invención se refiere a la provisión de derivados de la insulina que no dan lugar, o lo hacen sólo en pequeña medida, a un aumento de peso durante el tratamiento.

- 30 Otro aspecto de esta invención se refiere a la provisión de derivados de la insulina que dan lugar a pérdida de peso durante el tratamiento.

Otro aspecto de esta invención se refiere a la provisión de derivados de la insulina que no dan lugar, o lo hacen sólo en pequeña medida, a sucesos de hipoglucemia.

Otro aspecto de esta invención se refiere a la provisión de derivados de la insulina que son hepatoselectivos.

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

Definiciones

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

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

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

En este documento, la expresión análogo insulínico (o análogo de la insulina) abarca un polipéptido que tiene una estructura molecular que formalmente puede ser derivada de la estructura de una insulina de origen natural, por ej.,

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

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

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

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

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

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

En este documento, el término albúmina abarca las seroalbúminas de diversas especies por ej. humana (HSA, seroalbúmina humana), de rata (RSA, seroalbúmina de rata), de ratón (MSA, seroalbúmina de ratón), de cerdo (PSA, seroalbúmina de cerdo), bovina (BSA, seroalbúmina bovina), de perro (CSA, seroalbúmina canina) y de conejo (RaSA, seroalbúmina de conejo), albúmina recombinante, por ej., Albagen que es seroalbúmina humana recombinante con eliminación del residuo N-terminal (Asp) y albúmina de una fuente genómica.

La numeración de las posiciones en la albúmina se hace de manera que el compuesto original sea la seroalbúmina humana. El término como Cys34, indica una Cys en la posición 34. En Albagen, que es seroalbúmina humana recombinante que carece del primer aminoácido, la Cys libre se indica como Cys34.

En este documento, la expresión aceptores de Michael abarca pero no exclusivamente porciones carbonilo α,β -insaturadas, grupos maleimido y grupos vinil sulfona.

En este documento, la expresión grupos reactivos tiol abarca pero no exclusivamente grupos yodoacetamida, disulfuros asimétricos en los que el conector bifuncional (según se define en este documento) proporciona una de las funciones mercapto en el disulfuro asimétrico y la otra función como grupo saliente. Son ejemplos de dichos disulfuros asimétricos los piridilsulfuros, (metoxi o etoxicarbonil)disulfuros y (o-nitrofenil)disulfuros.

Por conjugado de insulina-albúmina que tiene actividad de insulina se quiere dar a entender un conjugado de insulina-albúmina que tiene o bien la capacidad de reducir la glucemia en mamíferos, medida en un modelo animal adecuado, que puede ser un modelo de rata, conejo, perro o cerdo, después de la administración adecuada por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea o pulmonar, o bien afinidad de unión por el receptor de la insulina.

En este documento, el término hepatoselectivo cubre la selectividad de la acción de la insulina en el hígado respecto a la acción de la insulina en los tejidos periféricos como en el músculo y/o la grasa. La acción en el hígado es preferentemente más de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% más potente con respecto a la acción de la insulina en los tejidos periféricos como el músculo y/o la grasa. La selectividad de acción se puede medir, por ejemplo, midiendo los períodos de tiempo de fosforilación del receptor de la insulina (es decir la activación) en diversos tejidos luego de la administración del conjugado de insulina-albúmina. Alternativamente, la hepatoselectividad se puede medir mediante técnicas de clamp (pinzamiento) midiendo la Ra (velocidad de aparición de la glucosa, es decir, producción de glucosa hepática) y la Rd (velocidad de eliminación de la glucosa, es decir, absorción de la glucosa en el músculo y la grasa).

Un polipéptido con afinidad por el receptor de la insulina y afinidad por el receptor de IGF-1 es un polipéptido capaz de interactuar con un receptor de la insulina y un receptor de IGF-1 humano en un ensayo de unión adecuado. Dichos ensayos de receptores son bien conocidos en el área y se describen con más detalle en los ejemplos. El conjugado de insulina-albúmina de la presente no se unirá al receptor de IGF-1 o tendrá una afinidad más bien baja por dicho receptor. Más precisamente, los conjugados de insulina-albúmina de esta invención tendrán una afinidad por el receptor de IGF-1 de prácticamente la misma magnitud o menor que la de la insulina humana.

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

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

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

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

A menos que se indique explícitamente, los aminoácidos mencionados en este documento son L-aminoácidos. Además, los extremos izquierdo y derecho de una secuencia de aminoácidos de un péptido son, respectivamente, el extremo N-terminal y el extremo C-terminal, a menos que se especifique lo contrario.

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

Las abreviaturas utilizadas en este documento son las siguientes: h es hora, AcCN es acetonitrilo, DCM es diclorometano, DIPEA es diisopropiletilamina, DMF es dimetilformamida, DMSO es dimetilsulfóxido, EtOAc es acetato de etilo, TFA es ácido trifluoroacético, THF es tetrahidrofurano y TSTU es tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio, HOSu es N-hidroxisuccinimida, HOAt es 1-hidroxi-7-aza-benzotriazol, HOBT es 1-hidroxibenzotriazol, MWCO es corte de peso molecular, VC es volumen de la columna.

Resumen de la invención

Se encontró, sorprendentemente que la conjugación de albúmina a insulina en un residuo de lisina en el extremo C-terminal de la cadena A da lugar a un conjugado de insulina-albúmina con una afinidad relativamente mayor por el receptor de la insulina humana que la afinidad relativa de un conjugado insulina-albúmina similar, acoplado convencionalmente a través de la lisina B29. La invención requiere la síntesis de un conector bifuncional. Una función conjuga un extremo del conector a la molécula de insulina y la otra función conjuga el otro extremo del conector a la albúmina.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la dependencia de la glucemia (mmol/l) con el tiempo (horas) luego de la administración subcutánea del conjugado de insulina-albúmina del ejemplo 1 (87.3 nmol/kg) así como del vehículo, a ratas ZDF conscientes, alimentadas, de 16 semanas de vida. El resultado fue que la depuración de la glucosa por el conjugado de insulina-albúmina del ejemplo 1 es rápida, eficaz y prolongada.

Las figuras 2a, 2b y 2c muestran la fosforilación por el conjugado de insulina-albúmina del ejemplo 1 de los receptores de insulina del hígado (Fig. 2a), y de los tejidos periféricos representados por el músculo y la grasa (figs. 2b y 2c, respectivamente). El resultado de esta prueba fue que este conjugado muestra hepatoselectividad representada por la mayor activación de los receptores de la insulina hepáticos y menor activación de los receptores de la insulina en los tejidos muscular y grasa.

Descripción detallada de esta invención

5 Formalmente, los conjugados de insulina-albúmina de esta invención constan de un análogo de la insulina, un conector bifuncional y albúmina. En una realización, el análogo de la insulina es A22K, B29R, desB30 insulina humana, el conector es 8-[3-(2,5-dioxopirrolidin-1-il)propionilamino]octanoilo y la albúmina es Albagen, véase el ejemplo 1 más adelante.

10 El análogo de la insulina que es una parte de los conjugados de insulina-albúmina de esta invención se puede ilustrar formalmente como insulina humana que tiene un residuo de lisina en el extremo C-terminal de la cadena A, incluido el extremo C-terminal de una extensión de la cadena A, donde dicha extensión, comparada con el residuo de aminoácido A21, consta de un solo residuo de aminoácido que es un residuo de lisina; o un residuo de lisina en el extremo C-terminal de una extensión de aminoácidos en la cadena A que consta de 2-5 residuos de aminoácidos; y, opcionalmente, donde hasta seis de los residuos de aminoácidos en las posiciones A1-A21 y B1-B30 de la insulina han sido eliminados o sustituidos por otro residuo de aminoácido.

15 Según la nomenclatura, el residuo de aminoácido unido C-terminalmente al residuo de aminoácido en la posición A21 está en la posición A22. Análogamente, los residuos de aminoácidos presentes del residuo peptídico unido C-terminalmente al residuo de aminoácido en la posición A21 están en las posiciones A22, A23, A24, A25, etc. El análogo de la insulina tiene un residuo de lisina en el extremo C-terminal de la cadena A (A21 K) o el residuo de lisina está en el extremo C-terminal de una extensión de aminoácidos de la cadena A, en comparación con la cadena A de la insulina humana dicha extensión de la cadena A está en el extremo C-terminal de ésta.

20 Un extremo del conector bifuncional estará unido a la lisina C-terminal de la cadena A. El otro extremo del conector bifuncional estará unido a la albúmina.

La unión del conector bifuncional a la albúmina será a la Cys libre en la posición 34.

En este primer aspecto la invención proporciona un compuesto de fórmula II: $M-Z_n-Y_o-Ins$, o de fórmula III: $Alb-M'-Z_n-Y_o-Ins$;

en dichas fórmulas Ins representó un análogo de la insulina, donde dicho análogo de la insulina tiene

25 un residuo de lisina en el extremo C-terminal de la cadena A, incluido el extremo C-terminal de una extensión de la cadena A, donde dicha extensión, comparada con el residuo de aminoácido A21, consta de un único residuo de aminoácido que es lisina; o

un residuo de lisina en el extremo C-terminal de una extensión de aminoácidos de la cadena A que consta de 2-5 residuos de aminoácidos; y, opcionalmente,

30 donde en dicho análogo de la insulina hasta seis de los residuos de aminoácidos en las posiciones A1-A21 y B1-B30 de la insulina humana han sido eliminados o sustituidos por otro residuo de aminoácido; y

M' representa el grupo reactivo tiol denominado M después de la reacción con un grupo tiol de Alb (albúmina);

M representa un aceptor de Michael representado por un grupo malimido, una vinilsulfona, un grupo reactivo tiol representado por yoduro, piridildisulfuro, metoxi o etoxicarbonil disulfuro y o-nitrofenildisulfuro;

35 donde M y M' están unidos, a través del conector Z_n-Y_o , al grupo épsilon-amino del residuo de lisina C-terminal de la cadena A, donde de dicho grupo épsilon-amino se ha eliminado un átomo de hidrógeno;

Z es un enlace covalente, o representa una porción de una de las seis fórmulas siguientes: $-NH-(CH_2-CH_2-O)_p-CH_2-CO-$; $-NH-(CH_2)_q-CH_2-CO-$; $-NH-(CH_2-CH_2-O).CH_2-CH_2-CO-$; $-HN-CH_2-CH_2-NH-CO-$; $-NH-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-NH-CO-CH_2-CH_2-CO-$; y $-NH-C_6H_4-CO-$; en las que

40 p es 0 (cero) o un número entero en el intervalo entre 1 y 24;

q es 0 (cero) o un número entero en el intervalo entre 1 y 24;

r es 0 (cero) o un número entero en el intervalo entre 1 y 24; y

$-C_6H_4-$ es para-fenileno;

n representa un número entero en el intervalo entre 1 y 10;

45 Y tiene uno de los significados indicados para Z;

o es 0 a 10; y

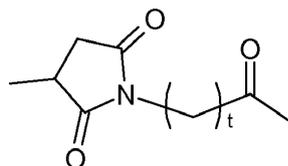
Alb se elige del grupo que consiste en Albagen y seroalbúmina humana.

La insulina con el conector unido (insulina de fórmula II) puede después, si se desea, hacerse reaccionar con albúmina. Esta reacción se puede realizar *ex-vivo* (es decir, *in vitro*) o *in vivo*. El tiol libre de un residuo de cisteína de la albúmina reacciona con el grupo funcional reactivo tiol M del conector unido a la insulina (por ej. en una reacción de Michael o en una reacción de sustitución) para formar el conjugado de insulina-albúmina representado por la fórmula general (III).

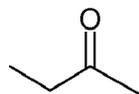
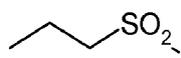
5

Alb es albúmina según se definió en este documento, y está unida a través de un grupo tiol libre de un residuo de Cys, preferentemente el residuo Cys-34.

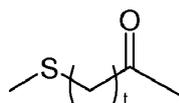
En una realización, M' es uno de los cuatro grupos de las fórmulas generales siguientes:



10

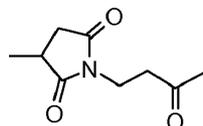


o



donde t es el definido antes.

15 En otra realización, M' se elige del grupo que consiste en



y $-CH_2-CO-$ (es decir metilcarbonilo).

20

El grupo ilustrado por el símbolo Ins se origina a partir de un compuesto de fórmula general Ins-H en el que Ins es la definida antes. Los compuestos de fórmula general Ins-H en los que Ins es la definida antes, son o bien compuestos conocidos o bien compuesto que se pueden preparar análogamente a la preparación de compuestos conocidos.

25

En otra realización, la insulina original presente en los compuestos de esta invención puede, aparte de cualquier lisina en la posición A22 y aparte de cualquier residuo peptídico unido C terminalmente al residuo de aminoácido A21 y aparte de las mutaciones B29R y/o desB30, comprender una o más de las mutaciones siguientes. En este documento, se indica primero la posición en la cadena A o B, y después, se indican el posible o los posibles residuos de aminoácidos como códigos de una letra. En una realización, hay 6 mutaciones, en otra realización, hay 5 mutaciones, en otra realización, hay 4 mutaciones, en otra realización, hay 3 mutaciones, en otra realización, hay 2 mutaciones, en otra realización, hay 1 mutación y en otra realización, no hay ninguna mutación, aparte de cualquier lisina en la posición A22 y aparte de cualquier residuo peptídico unido C terminalmente al residuo de aminoácido A21 y aparte de las mutaciones B29R y/o desB30:

30

A4: A o Q.

A5: L.

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

A9: R o L.

A14: E o D.

- A15: A o T.
- A16: M.
- A17: D o F.
- A18: R, L, o V.
- 5 A21: G, A o K.
- B3: A, R, H, I, L, M, F, W, Y, S o T.
- B10: D o E.
- B25: Y, H o desB25.
- B26: Q, E, S o desB26.
- 10 B27: H, L, M, W o Y.
- B28: D o E.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- 35 Los ejemplos específicos de análogos de la insulina original que pueden estar presentes en los conjugados de insulina-albúmina de esta invención y que son un aspecto de esta invención comprenden los siguientes:

A21K, B29R, desB30 insulina humana;

A22K, B29R, desB30 insulina humana

ES 2 563 553 T3

A14E, A22K, B25H, B29R, desB30 insulina humana
A8H, A22K, B29R, desB30 insulina humana
A18L, A22K, B29R, desB30 insulina humana
A5L, A22K, B29R, desB30 insulina humana
A8H, A18L, A22K, B29R, desB30 insulina humana
A8H, A18L, A22K, B10E, B29R, desB30 insulina humana
A8H, A22K, B10E, B29R, desB30 insulina humana
A22K, B27Y, B29R, desB30 insulina humana
A9L, A22K, B29R, desB30 insulina humana
A4A, A22K, B29R, desB30 insulina humana
A4Q, A22K, B29R, desB30 insulina humana
A16L, A22K, B29R, desB30 insulina humana
A17F, A22K, B29R, desB30 insulina humana
A17D, A22K, B29R, desB30 insulina humana
A18V, A22K, B29R, desB30 insulina humana
A22K, B10D, B29R, desB30 insulina humana
A22K, B10E, B29R, desB30 insulina humana
A22K, B27W, B29R, desB30 insulina humana
A22K, B27Y, B29R, desB30 insulina humana
A22K, B28E, B29R, desB30 insulina humana
A22K, B27Y, B28E, B29R, desB30 insulina humana
A8H, A22K, B28E, B29R, desB30 insulina humana
A22K, desB26, B28E, B29R, desB30 insulina humana
A22K, desB25, B29R, desB30 insulina humana
A22K, desB26, B29R, desB30 insulina humana
A22K, B28E, B29R, desB30 insulina humana
A22K, B28D, B29R, desB30 insulina humana

ES 2 563 553 T3

A9L, A22K, B28E, B29R, desB30 insulina humana
A4A, A22K, B28E, B29R, desB30 insulina humana
A4Q, A22K, B28E, B29R, desB30 insulina humana
A5L, A22K, B28E, B29R, desB30 insulina humana
A16L, A22K, B28E, B29R, desB30 insulina humana
A17F, A22K, B28E, B29R, desB30 insulina humana
A17D, A22K, B28E, B29R, desB30 insulina humana
A18V, A22K, B28E, B29R, desB30 insulina humana
A22K, B10D, B28E, B29R, desB30 insulina humana
A22K, B10E, B28E, B29R, desB30 insulina humana
A22K, B27W, B28E, B29R, desB30 insulina humana
A22G, A23K, B29R, desB30 insulina humana
A22G, A23G, A24K, B29R, desB30 insulina humana
A22G, A23G, A24G, A25K, B29R, desB30 insulina humana
A21Q, A22G, A23G, A24K, B29R, desB30 insulina humana
A21G, A22G, A23G, A24K, B29R, desB30 insulina humana
A21G, A22K, B29R, desB30 insulina humana
A21G, A22G, A23K, B29R, desB30 insulina humana
A21Q, A22K, B29R, desB30 insulina humana
A21Q, A22G, A23K, B29R, desB30 insulina humana
A21Q, A22G, A23G, A24K, B29R, desB30 insulina humana
A14E, A21Q, A22K, B25H, B29R, desB30 insulina humana
A14E, A21G, A22K, B25H, B29R, desB30 insulina humana
A22K, B3Q, B29R, desB30 insulina humana
A22K, B3S, B29R, desB30 insulina humana
A22K, B3T, B29R, desB30 insulina humana
A22K, B1Q, B29R, desB30 insulina humana

A18Q, A22K, B29R, desB30 insulina humana
A22K, desB1, B3Q, B29R, desB30 insulina humana
A22K, B28D, B29R, desB30 insulina humana
A22K, desB27, B28E, B29R, desB30 insulina humana
A22K, B28R, desB29, desB30 insulina humana
A22K, B3Q, B28E, B29R, desB30 insulina humana
A22K, B13Q, B29R, desB30 insulina humana
A22K, desB1, B29R, desB30 insulina humana
A21Q, A22G, A23K, B29R, desB30 insulina humana
A21Q, A22G, A23G, A24K, B29R, desB30 insulina humana
A21A, A22K, B29R, desB30 insulina humana
A21A, A22G, A23K, B29R, desB30 insulina humana
A21G, A22G, A23K, B29R, desB30 insulina humana
A21A, A22G, A23G, A24K, B29R, desB30 insulina humana
A21G, A22G, A23G, A24K, B29R, desB30 insulina humana
A21Q, A22K, B3Q, B29R, desB30 insulina humana
A21A, A22K, B3Q, B29R, desB30 insulina humana
A21G, A22K, B3Q, B29R, desB30 insulina humana

5 Las insulinas originales se pueden preparar de manera conocida *per se*. Por ejemplo, se pueden producir expresando una secuencia de ADN que codifique la insulina de cadena única en cuestión, en una célula huésped adecuada, por técnicas bien conocidas como la dada a conocer, por ej., en EP 1,246,845. La insulina se expresa en una célula huésped transformada como una molécula precursora que es convertida en la molécula de insulina deseada por procesos enzimáticos y químicos in vitro como los dados a conocer, por ej., en EP 163,529 y EP 214,826. La molécula precursora se puede expresar con una extensión N-terminal que posteriormente es escindida como se da a conocer, por ej., en EP 1246,845. Los ejemplos de extensiones N-terminales del tipo adecuado en la presente invención son, por ej., los dados a conocer en la patente de Estados Unidos N° 5,395,922 y en la patente EP N° 765,395. Más específicamente, se puede hacer referencia a WO 2006/082205, desde la página 37, línea 31, hasta la página 39, línea 29.

15 Cuando se administra un compuesto de la fórmula general II anterior a un ser humano, se conjuga con la seroalbúmina humana formando un compuesto de la fórmula general III anterior. Por consiguiente, tanto los compuestos de la fórmula general II anterior como los compuestos de la fórmula general III anterior se pueden usar como un medicamento, por ejemplo en el tratamiento de la diabetes. Los compuestos de fórmula general II y los compuestos de la fórmula general III pueden, colectivamente, ser ilustrado por la fórmula general IV:



en la que A tiene el mismo significado que M y Alb-M' colectivamente, y Z, n, Y, o, Ins, M, Alb y M' son, cada uno, los definidos en este documento.

Composiciones farmacéuticas

Los compuestos de esta invención se pueden administrar por vía subcutánea, nasal, oral o pulmonar.

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

10 Los compuestos de esta invención se pueden administrar por inhalación en una dosis eficaz para aumentar los niveles de insulina circulante y/o para disminuir los niveles de glucosa circulante. Dicha administración puede ser eficaz para tratar trastornos como la diabetes o la hiperglucemia. Lograr dosis eficaces de insulina requiere la administración de una dosis inhalada de más de aproximadamente 5 µg/kg a aproximadamente 500 µg/kg de los compuestos de esta invención. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser determinada por un facultativo con conocimientos que tendrá en cuenta factores que incluyen el nivel de insulina, la glucemia, el estado físico del paciente, el estado pulmonar del paciente o aspectos similares.

15 Los compuestos de esta invención se pueden administrar por inhalación para lograr una absorción lenta y/o una menor depuración sistémica de éstos. Los diferentes dispositivos de inhalación proporcionan habitualmente una farmacocinética similar cuando se comparan partículas de tamaños semejantes y niveles de depósito en los pulmones semejantes.

20 Los compuestos de esta invención se pueden administrar mediante cualquiera de una serie de dispositivos de inhalación conocidos en el área para la administración de un agente terapéutico por inhalación. Estos dispositivos incluyen inhaladores de dosis fija, nebulizadores, generadores de polvo seco, pulverizadores y similares. Preferentemente, los compuestos de esta invención se administran mediante un inhalador de polvo seco o un pulverizador. Existen una serie de características deseables en un dispositivo de inhalación para la administración de los compuestos de esta invención. Por ejemplo, la administración mediante el dispositivo de inhalación es ventajosamente confiable, reproducible y exacta. El dispositivo de inhalación debe administrar partículas pequeñas o aerosoles, por ej., menores de aproximadamente 10 µm, por ejemplo de aproximadamente 1-5 µm, para una buena respirabilidad. Algunos ejemplos específicos de dispositivos de inhalación comerciales adecuados para la práctica de esta invención son 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.

35 Como reconocerán los expertos, la formulación de los compuestos de esta invención, la cantidad de la formulación administrada y la duración de la administración de una dosis única, dependen del tipo de dispositivo de inhalación empleado. Para algunos sistemas de suministro de aerosol, como los nebulizadores, la frecuencia de administración y el tiempo durante el cual el sistema está activado dependerán principalmente de la concentración de los compuestos en el aerosol. Por ejemplo, a mayores concentraciones de los compuestos 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 de los compuestos. 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 de compuestos de esta invención en una cantidad dada del polvo determina la dosis suministrada en una única administración.

45 El tamaño de partícula de los compuestos de esta invención en la formulación suministrada mediante el dispositivo de inhalación es fundamental con respecto a la capacidad de la insulina para llegar a los pulmones, y preferentemente a las vías respiratorias inferiores o los alveolos. Preferentemente, los compuestos de esta invención se formulan de manera que al menos aproximadamente 10% de los compuestos suministrados se deposite en el pulmón, preferentemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20%, o más. Se sabe que la máxima eficiencia de depósito pulmonar para la respiración por boca en los seres humanos se obtiene con tamaños de partícula entre aproximadamente 2 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 consiguiente, las partículas de los compuestos administrados por inhalación tienen un tamaño de partícula preferentemente menor de aproximadamente 10 µm, más preferentemente en el intervalo entre aproximadamente 1 µm y aproximadamente 5 µm. La formulación de los compuestos se elige para obtener el tamaño de partícula deseado en el dispositivo de inhalación elegido.

55 De manera ventajosa para la administración como un polvo seco, un compuesto de esta invención se prepara en forma particulada con un tamaño de partícula menor de aproximadamente 10 µm, preferentemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5 µm. El tamaño de partícula preferido es eficaz para la administración en los alveolos del pulmón del paciente. Preferentemente, el polvo seco está compuesto en gran medida por partículas producidas de modo que la mayoría tengan un tamaño de partícula en el intervalo deseado. Ventajosamente, al

menos aproximadamente 50% del polvo seco consiste en partículas que tienen un diámetro menor de aproximadamente 10 μm . Dichas formulaciones se pueden lograr mediante secado por aspersión, molienda o punto de condensación crítico de una solución que contenga el compuesto de esta invención y otros ingredientes deseados. Se conocen otros métodos también adecuados para generar partículas útiles para la invención actual.

- 5 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.
- 10 Las formulaciones de los compuestos 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 compuesto, por ej., para diluir el polvo según sea necesario para el suministro desde el inhalador de polvo particular, para facilitar el procesamiento de la formulación, para proporcionar propiedades del polvo ventajosas para la formulación, para facilitar la dispersión del polvo desde el dispositivo de inhalación, para estabilizar la formulación (por ejemplo, antioxidantes o tampones), para proporcionar sabor a la formulación, o similares. Convenientemente, el aditivo no afecta adversamente a las vías respiratorias del paciente. El compuesto se puede mezclar con un aditivo a nivel molecular o la formulación sólida puede incluir partículas del compuesto mezcladas con, o depositadas sobre, 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.
- 15
20
25

Se puede producir un aerosol que contenga los compuestos de esta invención forzando a presión una suspensión o solución del compuesto a través de una boquilla. El tamaño y la configuración de la boquilla, la presión aplicada y la velocidad de alimentación del líquido se pueden elegir para lograr la salida y el tamaño de partícula deseados. Se puede producir una electronebulización, por ej., mediante un campo eléctrico conectado a una alimentación capilar o por boquilla. Convenientemente, las partículas del conjugado de la insulina suministradas por un pulverizador tienen un tamaño de partícula menor de aproximadamente 10 μm , preferentemente en el intervalo entre aproximadamente 1 μm y aproximadamente 5 μm .

30

Las formulaciones de los compuestos de esta invención, adecuadas para utilizar con un pulverizador, contendrán generalmente los compuestos en una solución acuosa a una concentración entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 500 mg del compuesto por ml de solución. Dependiendo del compuesto elegido y de otros factores conocidos por el asesor médico, el límite superior puede ser menor de, por ej., 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 120, 100 o 50 mg del compuesto por ml de solución. La formulación puede contener agentes como un excipiente, un tampón, un agente de isotonicidad, un conservante, un surfactante, y preferentemente, zinc. La formulación también puede contener un excipiente o un estabilizante del compuesto, como un tampón, un reductor, una proteína incrementadora del volumen o un carbohidrato. Las proteínas incrementadoras del volumen útiles en la formulación de conjugados de la insulina incluyen albúmina, protamina o similares. Los carbohidratos típicos útiles en la formulación del compuesto incluyen sacarosa, manitol, lactosa, trehalosa, glucosa, ciclodextrina o análogos. La formulación de los compuestos 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.

35
40
45

Las composiciones farmacéuticas que contienen un compuesto de esta invención también se pueden administrar por vía parenteral a los pacientes que necesitan un tratamiento de ese tipo. La administración parenteral se puede realizar por inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa en forma de lapicera. Alternativamente, la administración parenteral se puede realizar por medio de una bomba de infusión.

50

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

55
60

En otra realización de esta invención el tampón se elige del grupo que consiste en acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, fosfato ácido de sodio, fosfato disódico, fosfato monosódico, y tris(hidroxi metil)-aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico, ácido acético y otros ácidos orgánicos o sus sales, o mezclas de éstos. Cada uno de estos tampones específicos constituye una realización alternativa de esta invención.

En otra realización de esta invención la formulación contiene además un conservante farmacéuticamente aceptable que se puede elegir del grupo que consiste en fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, p-hidroxibenzoato de butilo, 2-feniletanol, alcohol bencílico, clorobutanol y timerosal, bronopol, ácido benzoico, imidurea, clorhexidina, deshidroacetato de sodio, clorocresol, p-hidroxibenzoato de etilo, cloruro de bencetonio, clorfenesina (3-(4-clorofenoxi)-1,2-propanodiol) o sus mezclas. En otra realización de esta invención el conservante está presente en una concentración entre aproximadamente 0.1 mg/ml y 20 mg/ml. En otra realización de esta invención el conservante está presente en una concentración entre aproximadamente 0.1 mg/ml y 5 mg/ml. En otra realización de esta invención el conservante está presente en una concentración entre aproximadamente 5 mg/ml y 10 mg/ml. En otra realización de esta invención el conservante está presente en una concentración entre aproximadamente 10 mg/ml y 20 mg/ml. Cada uno de estos conservantes específicos constituye una realización alternativa de esta invención. El uso de un conservante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª Edición, 1995.

En otra realización de esta invención, la formulación contiene además un agente isotónico que se puede elegir del grupo que consiste en una sal (por ej., cloruro de sodio), un azúcar o un alcohol de azúcar, un aminoácido (por ejemplo, L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano o treonina), un alditol (por ej. glicerol (glicerina), 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol o 1,3-butanodiol), polietilenglicol (por ej., PEG400) o sus mezclas. Se puede emplear cualquier azúcar como mono, di o polisacáridos, o glucanos solubles en agua, incluidos por ejemplo fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, hidroxietil almidón y carboximetilcelulosa de sodio. En una realización, el aditivo azúcar es sacarosa. El alcohol de azúcar se define como un hidrocarburo C4-C8 que tiene al menos un grupo -OH e incluye, por ej., manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabitól. En una realización, el aditivo alcohol de azúcar es manitol. Los azúcares o alcoholes de azúcares mencionados antes se pueden utilizar individualmente o en combinación. No existen límites fijos para la cantidad empleada, en tanto el azúcar o el alcohol de azúcar sea soluble en la preparación líquida y no afecte adversamente los efectos estabilizantes logrados utilizando los métodos de esta invención. En una realización, la concentración del azúcar o del alcohol de azúcar es entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml. En otra realización de esta invención el agente isotónico está presente en una concentración entre aproximadamente 1 mg/ml y 50 mg/ml. En otra realización de esta invención el agente isotónico está presente en una concentración entre aproximadamente 1 mg/ml y 7 mg/ml. En otra realización de esta invención el agente isotónico está presente en una concentración entre aproximadamente 8 mg/ml y 24 mg/ml. En otra realización de esta invención el agente isotónico está presente en una concentración entre aproximadamente 25 mg/ml y 50 mg/ml. Cada uno de estos agentes isotónicos específicos constituye una realización alternativa de esta invención. El uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª Edición, 1995.

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

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

Una composición para la administración nasal de un compuesto de esta invención se puede preparar, por ej., como se describe en la patente europea N° 272,097.

Las composiciones que contienen los compuestos de esta invención se pueden usar en el tratamiento de afecciones que sean sensibles a la insulina. Por lo tanto, se pueden emplear en el tratamiento de la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 y la hiperglucemia, por ejemplo como se ha visto a veces en personas seriamente lesionadas y en personas que han sido sometidas a una cirugía mayor. El nivel de dosificación óptimo para cualquier paciente dependerá de diversos factores que incluyen la eficacia del derivado de la insulina específico empleado, la edad, el peso corporal, la actividad física y la dieta del paciente, de una posible combinación con otros fármacos y de la gravedad de la afección a tratar. Se recomienda que la dosis diaria del compuesto de esta invención sea determinada por los expertos para cada paciente en particular de manera similar que para las composiciones de insulina conocidas.

Características preferidas de esta invención

En resumen y para complementar las afirmaciones de este documento, las características de esta invención son las siguientes:

1. Un compuesto de fórmula II: M-Z_n-Y_o-Ins, o de fórmula III: Alb-M'-Z_n-Y_o-Ins; en la que

- Ins representa insulina o un análogo de la insulina según se definió en este documento (del cual, formalmente, se ha eliminado un átomo de hidrógeno de un grupo amino presente en el residuo de lisina C-terminal de la cadena A);
- un residuo de lisina en el extremo C-terminal de la cadena A, incluido el extremo C-terminal de una extensión de la cadena A, donde dicha extensión, comparada con el residuo de aminoácido A21, consta de un único residuo de aminoácido que es lisina; o
- un residuo de lisina en el extremo C-terminal de una extensión de aminoácidos en la cadena A que consta de 2-5 residuos de aminoácidos; y, opcionalmente,
- donde en dicho análogo de la insulina hasta seis de los residuos de aminoácidos en las posiciones A1-A21 y B1-B30 de la insulina humana han sido eliminados o sustituidos por otro residuo de aminoácido; y
- M' representa el grupo reactivo tiol denominado M después de la reacción con un grupo tiol de Alb (albúmina),
- M representa un aceptor de Michael representado por un grupo malimido, una vinilsulfona o similar, un grupo reactivo tiol representado por yoduro, piridildisulfuro, metoxi o etoxicarbonildisulfuro y o-nitrofenildisulfuro;
- donde M y M' están unidos, a través del conector Z_n-Y_o , al grupo épsilon-amino del residuo de lisina C-terminal de la cadena A, donde de dicho grupo épsilon-amino se ha eliminado un átomo de hidrógeno;
- Z es un enlace covalente o representa una porción de una de las seis fórmulas siguientes:
- NH-(CH₂-CH₂-O)_p-CH₂-CO-;
- NH-(CH₂)_q-CH₂-CO-;
- NH-(CH₂-CH₂-O)-CH₂-CH₂-CO-;
- HN-CH₂-CH₂-NH-CO-;
- NH-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-NH-CO-CH₂-CH₂-CO-; y
- NH-C₆H₄-CO-;
- p es 0 (cero) o un número entero en el intervalo entre 1 y 24;
- q es 0 (cero) o un número entero en el intervalo entre 1 y 24;
- r es 0 (cero) o un número entero en el intervalo entre 1 y 24;
- C₆H₄- es para-fenileno;
- n representa un número entero en el intervalo entre 1 y 10, o más preferentemente 1 o 2
- Y tiene uno de los significados indicados para Z;
- o es 0 a 10, o más preferentemente 0, 1 o 2; y
- Alb representa albumina según se definió en este documento.
2. Un compuesto según cualquiera de las cláusulas precedentes en la medida de lo posible en el que el residuo de aminoácido en la posición A22 de Ins es el residuo de aminoácido C-terminal y el residuo de aminoácido A22 es K (Lys).
3. Un compuesto según cualquiera de las cláusulas precedentes en la medida de lo posible en el que el residuo de aminoácido en la posición A22 de Ins es el residuo de aminoácido C-terminal y el residuo de aminoácido A22 es K (Lys) y A18 es L (Leu).
4. Un compuesto según cualquiera de las cláusulas precedentes en la medida de lo posible en el que el residuo de aminoácido en la posición A23 de Ins es el residuo de aminoácido C-terminal y el residuo de aminoácido A23 es K (Lys).
5. Un compuesto según la cláusula 1, en el que el residuo de aminoácido en la posición A22 es G.
6. Un compuesto según cualquiera de las cláusulas precedentes en el que residuo de aminoácido en la posición B29 es R (Arg).
7. Un compuesto según cualquiera de las cláusulas precedentes en el que se elimina el residuo de aminoácido en la posición B30.

8. Un compuesto de acuerdo con la cláusula 1, en el que Ins es

A22K, B29R, desB30 insulina humana;

A22G, A23K, B29R, desB30 insulina humana;

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

5 A22G, A23G, A24G, A25K, B29R, desB30 insulina humana .

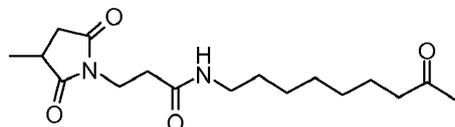
9. Un compuesto según la cláusula 8, en el que el residuo de aminoácido en la posición A21 de Ins es el residuo de aminoácido C-terminal y el residuo de aminoácido A21 es K (Lys).

10. Un compuesto según la cláusula 8, en el que el residuo de aminoácido en la posición A18 de Ins es L (Leu).

10 11. Un conjugado de insulina-albúmina según la cláusula 8, en el que el residuo de aminoácido en la posición A21 de Ins es el residuo de aminoácido C-terminal y el residuo de aminoácido A21 es K (Lys) y A18 es L (Leu).

12. Un compuesto según la cláusula 8, en el que el residuo de aminoácido en la posición A5 de Ins es L (Leu).

13. Un conjugado de insulina-albúmina según cualquiera de las cláusulas 1-12, en el que M' es



14. Un conjugado de insulina-albúmina según cualquiera de las cláusulas 1-12, en el que M' es -CH₂-CO-.

15 15. Un compuesto según cualquiera de las cláusulas 1-14, en el que Z es la porción -NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CO-.

16. Un compuesto según cualquiera de las cláusulas 1-14, en el que Z es la porción -NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CO-.

17. Un compuesto según cualquiera de las cláusulas precedentes, en el que n es 1.

20 18. Un compuesto según cualquiera de las cláusulas 1-17, en el que Y es un enlace covalente.

19. Un compuesto según cualquiera de las cláusulas 1-17, en el que Y es NH-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CO-.

20. Un compuesto según cualquiera de las cláusulas precedentes, en el que o es 2.

21. Un compuesto según cualquiera de las cláusulas precedentes, en el que Alb es seroalbúmina humana o Albagen (seroalbúmina humana con eliminación del residuo N-terminal (Asp)).

25 22. Un compuesto de fórmula general II:



en el que M, Z, n, Y, o e Ins son, cada uno, los definidos en este documento.

23. El uso de un compuesto según la invención para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de la diabetes.

30 24. El uso de un compuesto según la invención para la preparación de una composición farmacéutica que se puede administrar por vía subcutánea para el tratamiento de la diabetes.

25. El uso de un compuesto según la invención para la preparación de una composición farmacéutica que se puede administrar por vía subcutánea para el tratamiento de la diabetes y que produce un efecto de acción prolongada.

35 26. El uso de un compuesto según la invención para la preparación de una composición farmacéutica que se puede administrar por vía pulmonar para el tratamiento de la diabetes.

27. El uso de un compuesto según la invención para la preparación de una composición farmacéutica que se puede administrar por vía pulmonar para el tratamiento de la diabetes y que produce un efecto de acción prolongada.

28. El uso de un compuesto según la invención para la preparación de una composición farmacéutica en polvo que se puede administrar por vía pulmonar para el tratamiento de la diabetes.

29. El uso de un compuesto según la invención para la preparación de una composición farmacéutica líquida que se puede administrar por vía pulmonar para el tratamiento de la diabetes.

30. El uso de un compuesto según la invención para la preparación de una composición farmacéutica que se puede administrar por vía oral para el tratamiento de la diabetes.

5 31. Una composición que contiene insulina humana así como un compuesto según la invención.

32. Una composición que contiene insulina aspart así como un compuesto según la invención.

33. Una composición que contiene insulina Lispro así como un compuesto según la invención.

34. Una composición que contiene insulina Glulisina así como un compuesto según la invención.

10 35. Una composición farmacéutica que contiene una cantidad biológicamente activa del compuesto según la invención, y un portador farmacéuticamente aceptable.

36. El uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un análogo de la insulina según la invención para la preparación de una formulación farmacéutica destinada al tratamiento o la prevención de hiperglucemia, diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 1, obesidad, síndrome X o dislipidemia.

Ejemplos

15 Métodos generales

Método LCMS

Se utilizó un espectrómetro de masas Waters Micromass ZQ para identificar la masa de la muestra luego de la elución de un sistema de HPLC Waters Alliance HT.

Eluyentes:

20 A: ácido trifluoroacético al 0.1 % en agua

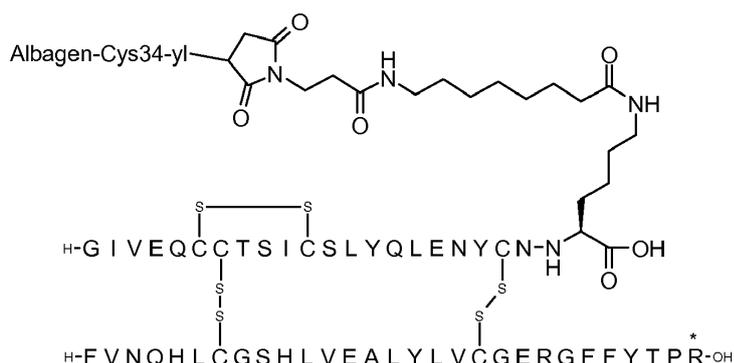
B: ácido trifluoroacético al 0.1 % en acetonitrilo

Columna: Phenomenex, Jupiter C4 50 X 4.60 mm di 5 µm

Gradiente: 10% - 90% de B en 7.5 min a 1.0 ml/min

Ejemplo 1

25 A22K[N^ε-8-[3-(Albagen-Cys34-il-2,5-dioxopirrolidin-1-il)propionilamino]octanoil], B29R, desB30 insulina humana



Paso 1: A22K(N^ε-8-[3-(2,5-Dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propionilamino]octanoil), B29R, desB30 insulina humana

30 Se disolvió A22K, B29R, desB30 insulina humana (WO 2007096431) (1.00 g) en DMSO (80 ml) y trietilamina (0.50 ml). Se le agregó éster 2,5-(dioxopirrolidin-1-ílico del ácido 8-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propionilamino]octanoico (84 mg) disuelto en THF (8.35 ml). Después de 165 min se agregaron unas pocas gotas de TFA, tampón A y tampón B (véase más adelante) para dar 150 ml a pH 5-6.

Purificación por HPLC preparativa: columna C18, 3 cm (Gemini), tampón A: 0.1% de TFA en agua MiliQ, tampón B: 0.1% de TFA en AcCN, flujo 20 ml/min, gradiente 20-40% de B en 60 min. Rendimiento 117 mg, MALDI: 6152.89.

35 *Paso 2: A22K[N^ε-8-[3-(Albagen-Cys34-il-2,5-dioxopirrolidin-1-il)propionilamino]octanoil], B29R, desB30 insulina humana*

Se disolvió Albagen (vial de 200 mg hecho por encargo por New Century Pharmaceuticals, Inc. recombinante no estabilizada, deshidratada por congelación) en tampón de reacción (Na_2HPO_4 0.15 M pH 6.5, manitol al 2%, 5 ml). Se agregó bajo precipitación una solución de A22K-(N^{ϵ} -8-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propionilamino]octanoil) B29R, desB30 insulina humana (18.5 mg) en ácido acético al 10% (0.50 ml). Se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 1 N para dar una mezcla de reacción casi transparente. La mezcla se agitó lentamente a temperatura ambiente durante 4-6 h. Se le agregó sulfato de amonio (1 g) y la mezcla se filtró a través de un filtro Millex de 0.22 μm . La purificación se realizó en un purificador Äkta usando una columna HIC-ISO (25 ml). Tampón A, Na_2HPO_4 0.05 M, sulfato de amonio 2 M, pH 7, manitol al 2%; tampón B, Na_2HPO_4 0.05 M, pH 7, manitol al 2%. Gradiente 0-100% de B en 20 VC. Flujo 10 ml/min. Las fracciones que contenían el conjugado se combinaron y se concentraron por centrifugación usando tubos Vivaspin 20, 30000 MWCO a 3000 g. El producto concentrado se desalinizó usando una columna HiPrep 26/10 y tampón B. Las fracciones recogidas se concentraron una vez más por ultrafiltración usando tubos Vivaspin 20, 30000 MWCO a 3000 g. El producto se almacenó en el tampón, en el congelador. La concentración se determinó por medición de la absorbancia usando el coeficiente de extinción: 41479. LC-MS, M/z: 1960.0 (M+37), combinado: 72478.

15 **Éster 2,5-dioxopirrolidin-1-ílico del ácido 8-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propionilamino]octanoico**
Paso 1: Éster 2,5-dioxopirrolidin-1-ílico del ácido 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propiónico

Se disolvió ácido malimidopropiónico (500 mg) en THF seco (15 ml). Se le agregaron TSTU (790 mg) y DIPEA (0.62 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno toda la noche. La suspensión espesa de color amarillo se concentró. El residuo se disolvió en DCM y se extrajo con HCl 0.1 N (2 veces) y solución saturada de cloruro de sodio (1 vez). La capa orgánica se secó (Na_2SO_4) y se concentró para dar un sólido blanco. LC-MS, M/z: 267.26 (M+1).

Paso 2: Ácido 8-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propionilamino]octanoico

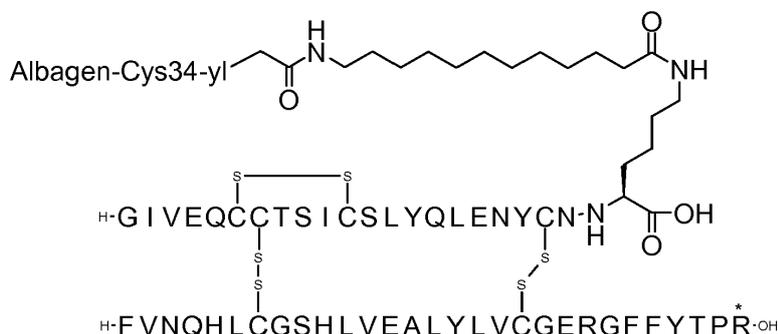
Se disolvió éster 2,5-(dioxopirrolidin-1-ílico del ácido 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propiónico (787 mg, crudo) en DMF (15 ml). Se agregaron ácido 8-aminooctanoico (350 mg) y DIPEA (0.45 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno toda la noche. La mezcla se concentró. El residuo se disolvió en EtOAc y se extrajo con HCl 0.1 N (2 veces). La separación de fases no fue fácil. La capa orgánica se lavó con solución saturada de cloruro de sodio (2 veces), se secó (Na_2SO_4) y se concentró para dar un sólido blanco. LC-MS, M/z: 311.34 (M+1).

Paso 3: Éster 2,5-dioxopirrolidin-1-ílico del ácido 8-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propionilamino]octanoico

30 A una solución de ácido 8-[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidropirrol-1-il)propionilamino]octanoico (917 mg, crudo) en THF seco (15 ml) se le agregaron TSTU (1.07 mg) y DIPEA (0.65 ml). La mezcla se agitó en atmósfera de nitrógeno toda la noche. La mezcla se concentró. Al residuo se le agregó EtOAc y el precipitado se separó por filtración. El filtrado se extrajo con HCl 0.1 N (2 veces) y solución saturada de cloruro de sodio (1 vez), se secó (Na_2SO_4) y se concentró para dar un sólido blancuzco. Rendimiento global 37% (444 mg). LC-MS, M/z: 408.39 (M+1).

35 Ejemplo 2

A22K[N^{ϵ} -12-{2-(Albagen-Cys34-ilacetilamino)}dodecanoil] B29R, desB30 insulina humana



Paso 1: A22K(N^{ϵ} -12-(2-Yodoacetilamino)dodecanoil), B29R, desB30 insulina humana

40 A una solución de A22K, B29R, desB30 insulina humana (WO 2007096431) (1.00 g) en carbonato de sodio 0.1 M (20 ml) y etanol (10 ml), pH 10.6, se le agregó una solución de éster 2,5-dioxopirrolidin-1-ílico del ácido 12-(2-yodoacetil-amino)dodecanoico (99 mg) en THF (0.5 ml). El pH de la mezcla de reacción se mantuvo en 10.6. Después de agitar suavemente durante 30 min, se agregó agua (50 ml) y el pH se ajustó a 5.5 con HCl 1 N para producir la precipitación. El producto se centrifugó a 3000 g durante 10 min. El sobrenadante se descartó y el producto sólido se purificó por HPLC preparativa: columna C18, 3 cm (Gemini), tampón A: 0.1% de TFA en agua
 45 MiliQ, tampón B: 0.1% de TFA en AcCN, flujo 25 ml/min, gradiente 25-60% de B en 45 min. Rendimiento 330 mg, MALDI: 6228.21.

Paso 2: A22K[N^ε-12-[[2-Albagen-Cys34-ilacetilamino]dodecanoil] B29R, desB30 insulina humana

Se disolvió Albagen (vial de 200 mg hecho por encargo por New Century Pharmaceuticals, Inc. recombinante no estabilizada, deshidratada por congelación) en tampón de reacción (Na₂HPO₄ 0.15 M pH 7.0, manitol al 2%, 3 ml). Se le agregó una solución de A22K(N^ε-12-(2-yodoacetilamino)dodecanoil), B29R, desB30 insulina humana (20 mg) en tampón de reacción/acetonitrilo 1:1 (2.0 ml) para dar una solución. El pH fue de 7.3. La mezcla se agitó lentamente a temperatura ambiente en oscuridad toda la noche. Se le agregó sulfato de amonio (1 g) y la mezcla se filtró a través de un filtro Millex de 0.22 μm. La purificación se realizó como se describe en el ejemplo 1. El producto se almacenó en tampón B en el congelador. La concentración se determinó por medición de la absorbancia usando el coeficiente de extinción: 41479. LC-MS, M/z: 1542.29 (M+47), combinado: 72430.

10 Éster 2,5-dioxopirrolidin-1-ílico del ácido 12-(2-yodoacetilamino)dodecanoico Paso 1: Ácido 12-(2-yodoacetilamino)dodecanoico

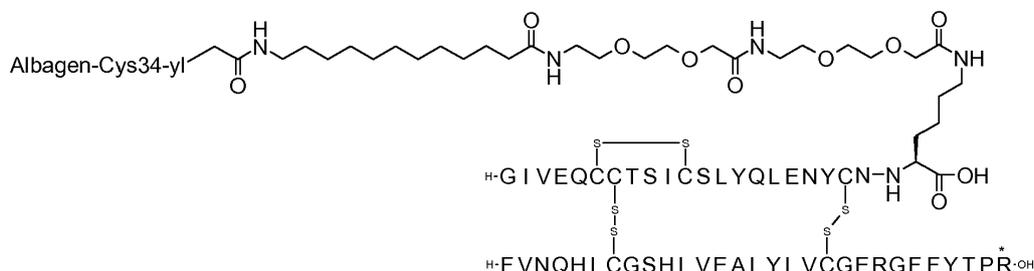
Se disolvió ácido yodoacético (1.00 g) en diclorometano y se mantuvo en la oscuridad. Se le agregaron TSTU (1.62 g) y DIPEA (1.03 ml). Después de agitar durante 45 min se le agregó una suspensión de ácido 12-aminododecanoico (1.14 g) en NMP (10 ml) y DIPEA (1.03 ml). Después de agitar durante 4 h la mezcla se vertió en HCl 0.5 N (300 ml) y se extrajo con diclorometano. La capa orgánica se lavó con HCl 0.1 N, se secó con sulfato de magnesio y se concentró para dar un aceite. El residuo se disolvió en una mezcla de éter dietílico y acetato de etilo, se lavó con agua, se secó con sulfato de magnesio y se concentró para dar un sólido. Este sólido se trituró en éter dietílico y se filtró para dar un polvo. Rendimiento 1.05 g, 50%. LC-MS, M/z: 384.2 (M+1).

Paso 2: Éster 2,5-dioxopirrolidin-1-ílico del ácido 12-(2-yodoacetilamino)dodecanoico

20 A una solución de ácido 12-(2-yodoacetilamino)dodecanoico (460 mg) en THF (10 ml) se le agregaron TSTU (415 mg) y DIPEA (0.315 ml). Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 h, la mezcla se vertió en HCl 0.5 N (200 ml) y se extrajo con acetato de etilo (2 × 200 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con HCl 0.1 N y solución saturada de cloruro de sodio, se secaron con sulfato de magnesio y se concentraron. El residuo se usó sin purificación adicional. Rendimiento 99% (575 mg). LC-MS, M/z: 481.2 (M+1).

25 Ejemplo 3

A22K[N^ε-{2-[2-(2-[2-(2-[2-(12-[2-Albagen-Cys-34-ilacetilamino]dodecanoilamino)etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil] B29R, desB30 insulina humana



30 Paso 1: A22K[N^ε-{2-[2-(2-[2-(2-[2-(12-[2-Yodoacetilamino]dodecanoilamino)etoxi]etoxi]acetilamino)-etoxi]etoxi]acetil] B29R, desB30 insulina humana

A una solución de A22K, B29R, desB30 insulina humana (WO 2007096431) (0.800 g) en carbonato de sodio 0.1 M (16 ml) a pH 10.5, se le agregó una solución de éster 2,5-dioxopirrolidin-1-ílico del ácido (2-[2-[2-(2-[2-(12-(2-yodoacetilamino)-dodecanoilamino]etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acético (105 mg) en acetonitrilo/etanol 1:1 (10 ml). El pH de la mezcla de reacción se mantuvo en 10.6. Después de agitar suavemente durante 30 min, se agregó agua (50 ml) y el pH se ajustó a 5.5 con HCl 1 N para producir la precipitación. El producto se centrifugó a 3000 g durante 10 min. El sobrenadante se descartó y el producto sólido se purificó por HPLC preparativa: columna C18, 3 cm (Gemini), tampón A: 0.1 % de TFA en agua MilliQ, tampón B: 0.1 % de TFA en AcCN, flujo 20 ml/min, gradiente 5-80% de B en 60 min. Rendimiento 280 mg, LC-MS, M/z: 1630.23 (M+4).

40 Paso 2: A22K[N^ε-{2-[2-(2-[2-(2-[2-(12-[2-Albagen-Cys-34-ilacetilamino]dodecanoilamino)etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil] B29R, desB30 insulina humana

Se disolvió Albagen (vial de 200 mg hecho por encargo por New Century Pharmaceuticals, Inc. recombinante no estabilizada, deshidratada por congelación) en tampón de reacción (Na₂HPO₄ 0.15 M pH 7.0, manitol al 2%, 3 ml). Se le agregó una solución de A22K[N^ε-{2-[2-(2-[2-(2-[2-(12-{{2-yodoacetilamino}-dodecanoilamino)etoxi]etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil] B29R, desB30 insulina humana (20 mg) en tampón de reacción/acetonitrilo 1:1 (2.0 ml) para dar una solución. El pH fue de 7.3. La mezcla se agitó lentamente a temperatura ambiente en oscuridad toda la noche. Se le agregó sulfato de amonio (1 g) y la mezcla se filtró a través de un filtro Millex de 0.22 μm. La purificación se realizó como se describe en el ejemplo 1. El producto se almacenó

en tampón B en el congelador. La concentración se determinó por medición de la absorbancia usando el coeficiente de extinción: 41479. LC-MS, M/z: 1774.71 (M+31), 1732 (M+32), 1548 (M+47).

Éster 2,5-dioxopirrolidin-1-ílico del ácido (2-{2-[2-(2-{2-[12-(2-yodoacetilamino)dodecanoilamino]etoxi]etoxi]acetilamino]etoxi]etoxi)-acético

5 Paso 1: *Ácido (2-{2-[2-(2-{2-[12-(2-yodoacetilamino)dodecanoilamino]etoxi]etoxi]acetilamino]etoxi]-etoxi]acético*

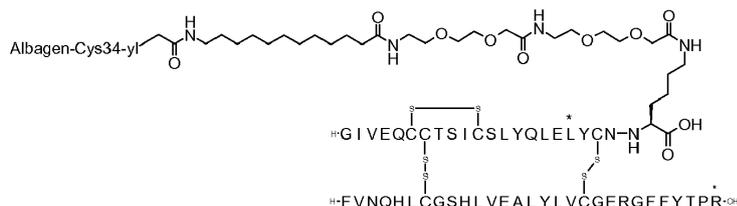
10 A una solución de ácido [2-(2-[2-(2-aminoetoxi]etoxi]acetilamino]etoxi]etoxi]acético (194 mg) en carbonato de sodio 0.1 M se le agregó acetonitrilo (5 ml) seguido de una solución de éster 2,5-dioxopirrolidin-1-ílico del ácido 12-(2-yodoacetilamino)dodecanoico (260 mg) en acetonitrilo (6 ml). Después de agitar durante 45 min, se ajustó el pH a 4 con HCl 1 N y la mezcla se purificó por HPLC preparativa: columna C18, 3 cm (Gemini), tampón A: 0.1% de TFA en agua MiliQ, tampón B: 0.1% de TFA en AcCN, flujo 20 ml/min, gradiente 10-80% de B en 30 min. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron para dar el compuesto del título con un rendimiento de 49% (180 m). LC-MS, M/z: 674.3 (M+1).

Paso 2: *Éster 2,5-dioxopirrolidin-1-ílico del ácido (2-{2-[2-(2-{2-[12-(2-yodoacetilamino)dodecanoilamino]etoxi]etoxi]acetilamino]etoxi]-etoxi]acético*

15 A una solución de ácido (2-{2-[2-(2-{2-[12-(2-yodoacetilamino)dodecanoilamino]etoxi]etoxi]acetilamino]etoxi]etoxi]acético (50 mg) en etanol (1.5 ml) se le agregaron TSTU (24 mg) y DIPEA (0.020 ml). Después de agitar a temperatura ambiente toda la noche, la mezcla se usó directamente para acilación de los derivados de la insulina, sin procesamiento ni purificación.

Ejemplo 4

20 A18L, A22K[N^F-{2-[2-(2-{2-[2-(12-{2-Albagen-Cys-34-il-acetilamino)dodecanoilamino]etoxi]etoxi]-acetilamino]etoxi]etoxi]acetil] B29R, desB30 insulina humana



Paso 1: A18L, A22K[N^F-{2-[2-(2-{2-[2-(12-{2-yodoacetilamino)dodecanoilamino]etoxi]etoxi]-acetil] B29R, desB30 insulina humana

25 A una solución de A18L, A22K, B29R, desB30 insulina humana (0.300 g) en carbonato de sodio 0.1 M (4 ml) y etanol (3 ml) a pH 10.7, se le agregó una solución de éster 2,5-dioxopirrolidin-1-ílico del ácido (2-{2-[2-(2-{2-[12-(2-yodoacetilamino)dodecanoilamino]etoxi]etoxi]acetilamino]etoxi]etoxi]acético (55 mg) en etanol (1.5 ml). El pH de la mezcla de reacción se mantuvo en 10.7. Después de agitar suavemente durante 60 min, se agregó agua (40 ml) y el pH se ajustó a 5.5 con HCl 1 N para producir la precipitación. El producto se centrifugó a 3000 g durante 10 min. El sobrenadante se descartó y el producto sólido se purificó por HPLC preparativa: columna C18, 3 cm (Gemini), tampón A: 0.1% de TFA en agua MiliQ, tampón B: 0.1% de TFA en AcCN, flujo 20 ml/min, gradiente 10-70% de B en 45 min. Rendimiento 72 mg, LC-MS, M/z: 1304.6 (M+5).

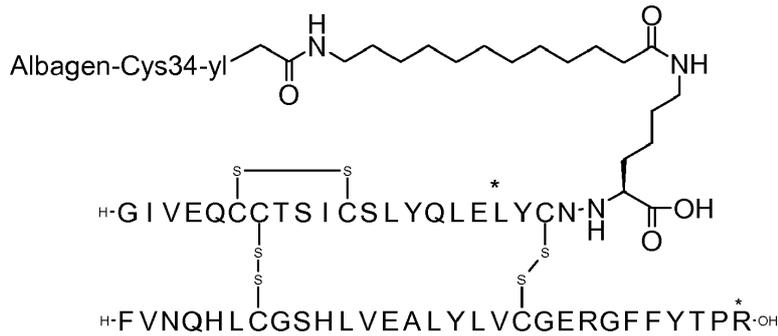
Paso 2: A18L, A22K[N^F-{2-[2-(2-{2-[2-(12-{2-Albagen-Cys-34-il-acetilamino)dodecanoilamino]etoxi]etoxi]acetil] B29R, desB30 insulina humana

35 Se disolvió Albagen (vial de 200 mg hecho por encargo por New Century Pharmaceuticals, Inc. recombinante no estabilizada, deshidratada por congelación) en tampón de reacción (Na₂HPO₄ 0.15 M pH 7.0, manitol al 2%, 3 ml). Se agregó una solución de A18L, A22K[N^F-{2-[2-(2-{2-[2-(12-{2-yodoacetilamino)dodecanoilamino]etoxi]etoxi]acetilamino]etoxi]etoxi]acetil] B29R, desB30 insulina humana (18.3 mg) en tampón de reacción/acetonitrilo 1:1 (2.0 ml) para dar una solución. El pH se elevó a 7.4 con NaOH 1 N. La mezcla se agitó lentamente a temperatura ambiente en oscuridad toda la noche. Se le agregó sulfato de amonio (1 g) y la mezcla se filtró a través de un filtro Millex de 0.22 µm. La purificación se realizó como se describe en el ejemplo 1. El producto se almacenó en tampón B en el congelador. La concentración se determinó por medición de la absorbancia usando el coeficiente de extinción: 41479. LC-MS, M/z: 72716.18

El conjugado de albúmina-insulina de la invención de los ejemplos siguientes se puede preparar de manera similar.

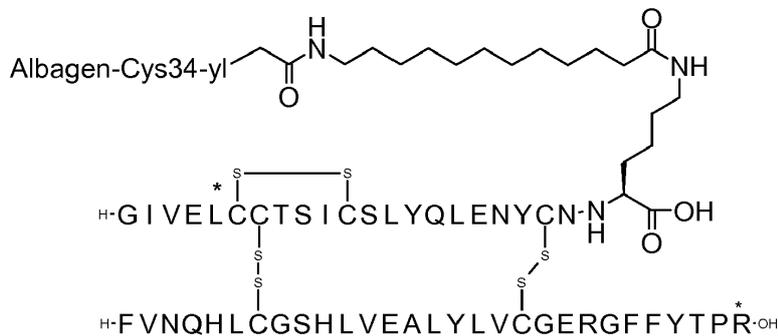
45 **Ejemplo 5**

A18L, A22K[N^F-12-{2-(Albagen-Cys34-il)acetilamino]dodecanoil] B29R, desB30 insulina humana



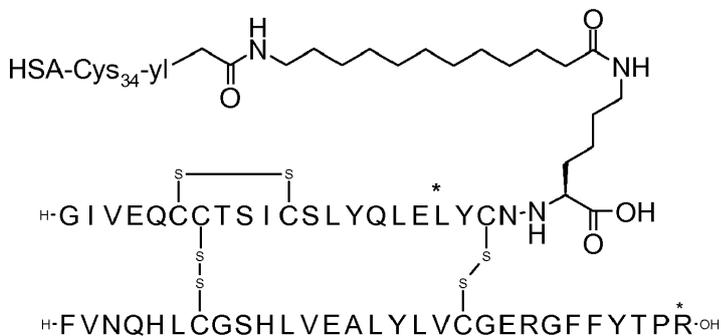
Ejemplo 6

A5L, A22K[N^ε-12-{2-(Albagen-Cys34-il)acetilamino}dodecanoil] B29R, desB30 insulina humana



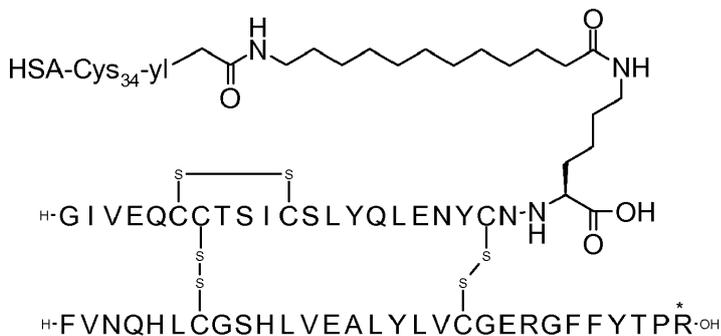
5 **Ejemplo 7**

A18L, A22K[N^ε-12-{2-(seroalbúmina humana-Cys34-il)acetilamino}dodecanoil] B29R, desB30 insulina humana



Ejemplo 8

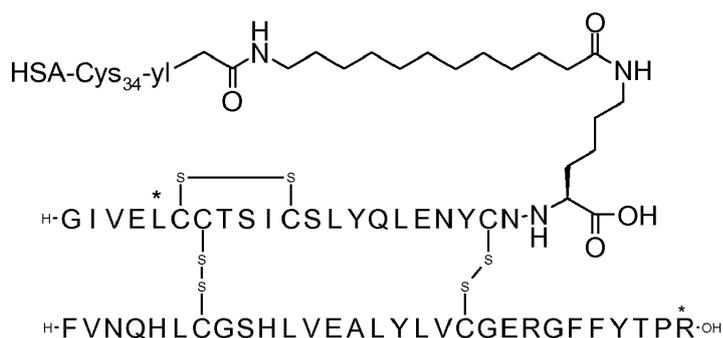
A22K[N^ε-12-{2-(seroalbúmina humana-Cys34-il)acetilamino}dodecanoil] B29R, desB30 insulina humana



10

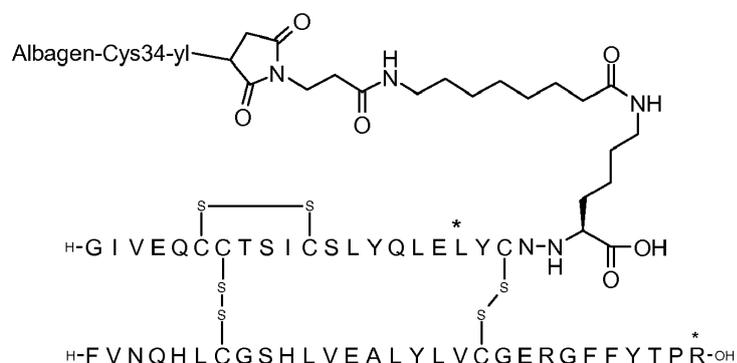
Ejemplo 9

A5L, A22K[N^ε-12-{2-(seroalbúmina humana-Cys34-ilacetilamino)}dodecanoil] B29R, desB30 insulina humana



Ejemplo 10

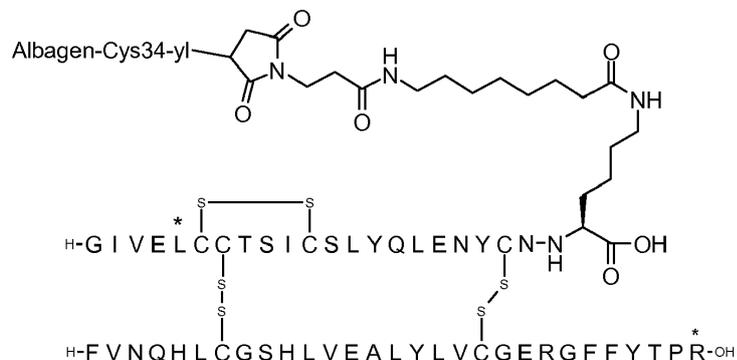
A18L, A22K[N^ε-8-{3-(Albagen-Cys34-il-2,5-dioxopirrolidin-1-il)propionilamino}octanoil], B29R, desB30 insulina humana



5

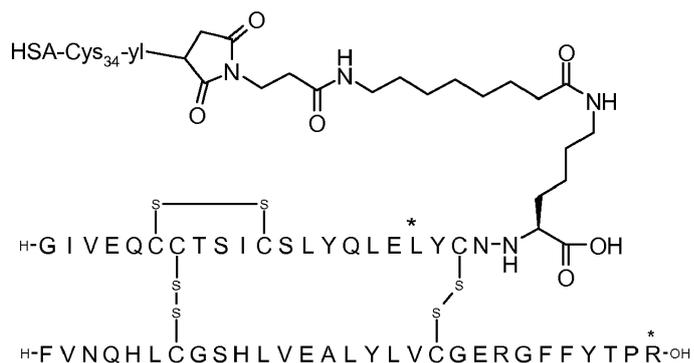
Ejemplo 11

A5L, A22K[N^ε-8-{3-(Albagen-Cys34-il-2,5-dioxopirrolidin-1-il)propionilamino}octanoil], B29R, desB30 insulina humana



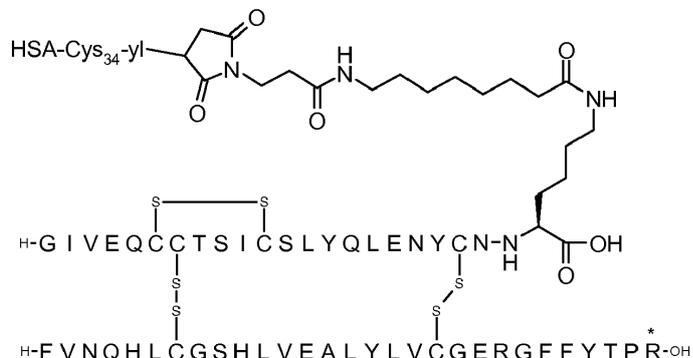
Ejemplo 12

10 A18L, A22K[N^ε-8-{3-(seroalbúmina humana-Cys34-il-2,5-dioxopirrolidin-1-il)propionil-amino}octanoil], B29R, desB30 insulina humana



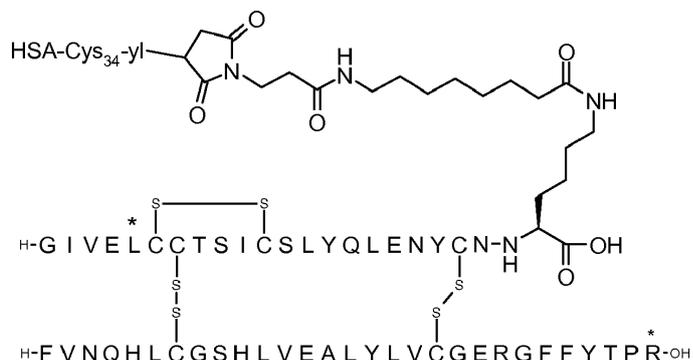
Ejemplo 13

A22K[N^ε-8-{3-(seroalbúmina humana-Cys34-il-2,5-dioxopirrolidin-1-il)propionilamino}octanoil], B29R, desB30 insulina humana



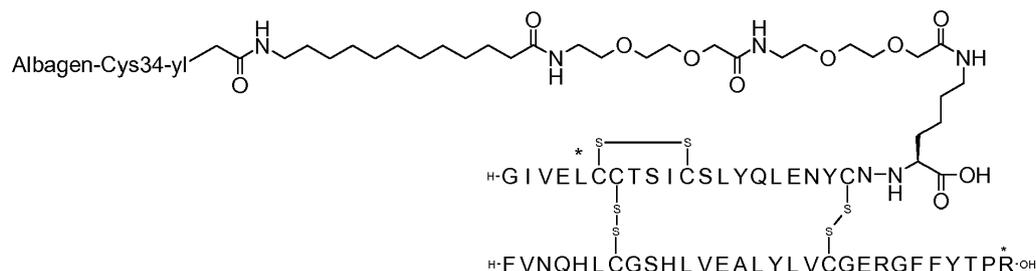
5 Ejemplo 14

A5L, A22K[N^ε-8-{3-(seroalbúmina humana-Cys34-il-2,5-dioxopirrolidin-1-il)propionilamino}octanoil], B29R, desB30 insulina humana



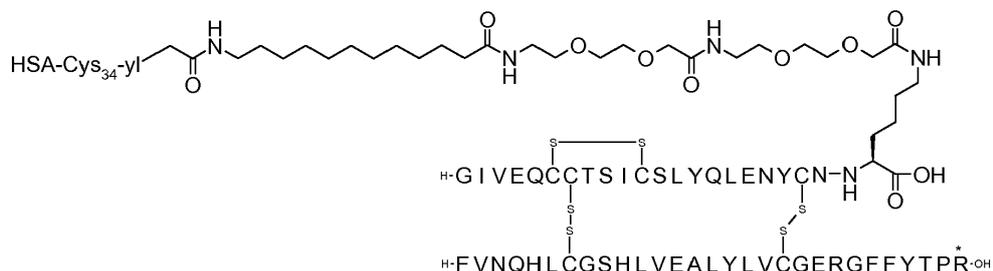
Ejemplo 15

10 A5L, A22K[N^ε-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[12-(2-{Albagen-Cys34-il}acetilamino)dodecanoilamino]etoxi)-etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil]] B29R, desB30 insulina humana



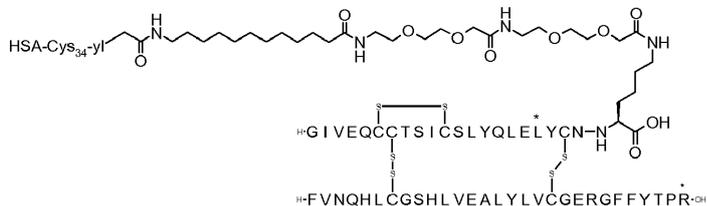
Ejemplo 16

15 A22K[N^ε-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[12-(2-{seroalbúmina humana-Cys34-il}acetilamino)dodecanoilamino]-etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil]] B29R, desB30 insulina humana



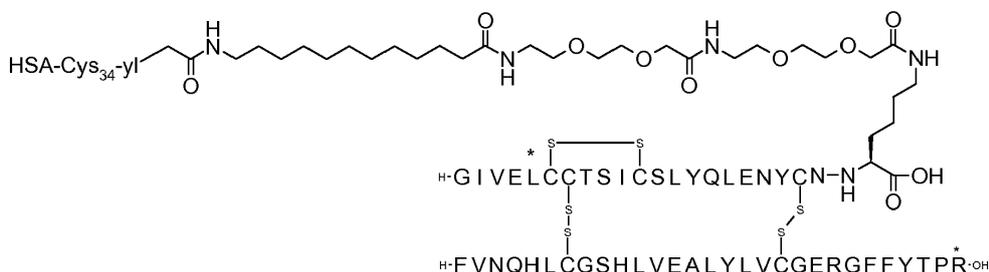
Ejemplo 17

A18L, A22K[N^ε-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[12-(2-{seroalbúmina humana-Cys34-il})acetilamino)dodecanoilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil]] B29R, desB30 insulina humana



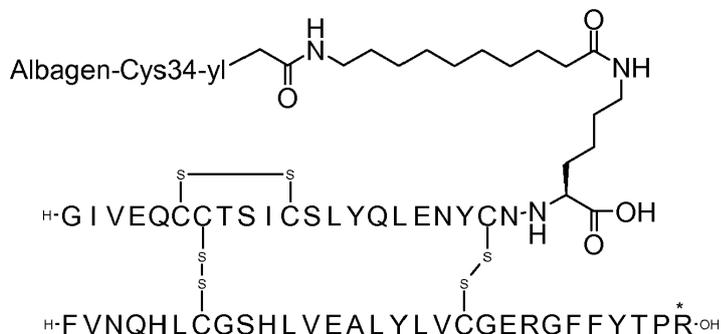
5 Ejemplo 18

A5L, A22K[N^ε-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[12-(2-{seroalbúmina humana-Cys34-il})acetilamino)dodecanoilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil]] B29R, desB30 insulina humana



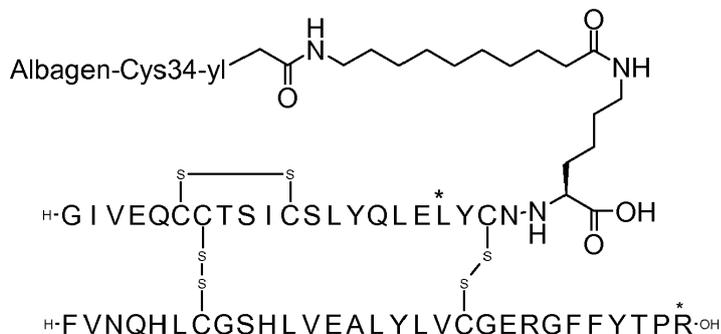
Ejemplo 19

10 A22K[N^ε-10-{2-(Albagen-Cys34-il)acetilamino}decanoil] B29R, desB30 insulina humana



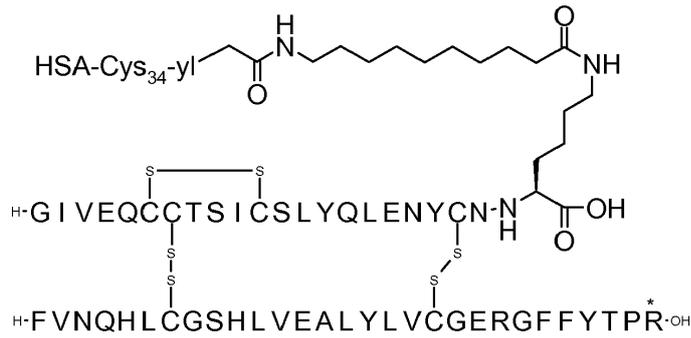
Ejemplo 20

A18L, A22K[N^ε-10-{2-(Albagen-Cys34-il)acetilamino}decanoil] B29R, desB30 insulina humana



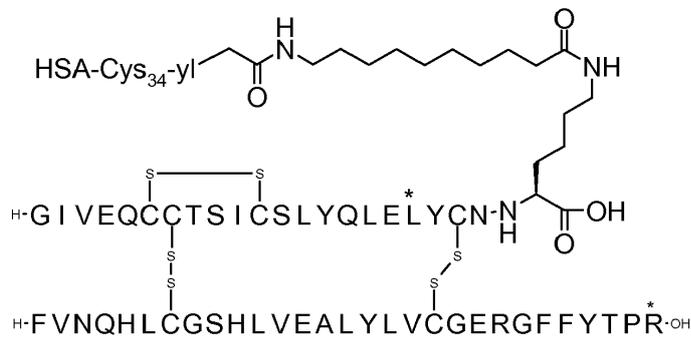
15 Ejemplo 21

A22K[N^ε-10-{2-(seroalbúmina humana-Cys34-il)acetilamino}decanoil] B29R, desB30 insulina humana



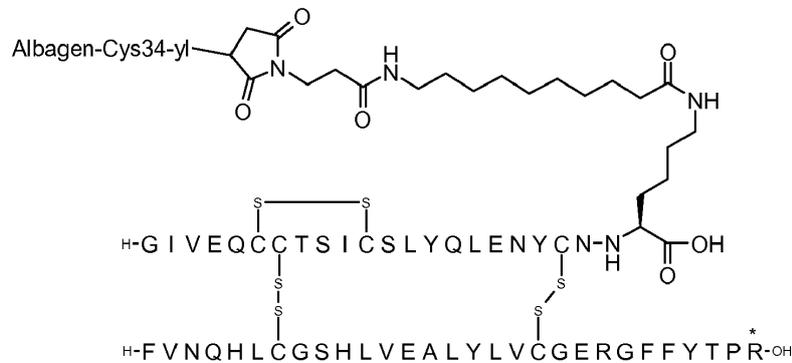
Ejemplo 22

A18L, A22K[N^ε-10-{2-(seroalbúmina humana-Cys34-il)acetilamino}decanoil] B29R, desB30 insulina humana



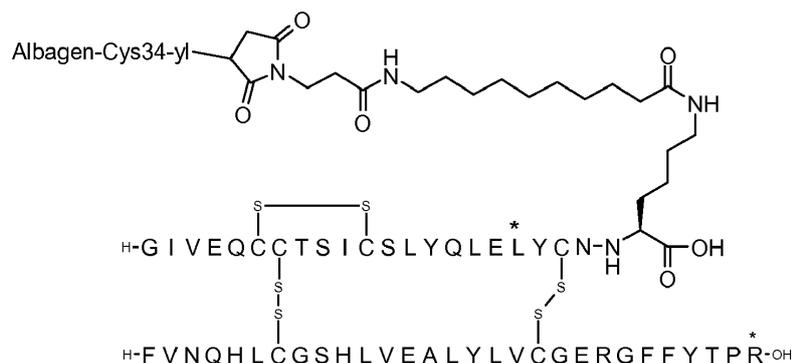
5 Ejemplo 23

A22K[N^ε-10-{3-(Albagen-Cys34-il-2,5-dioxopirrolidin-1-il)propionilamino}decanoil], B29R, desB30 insulina humana



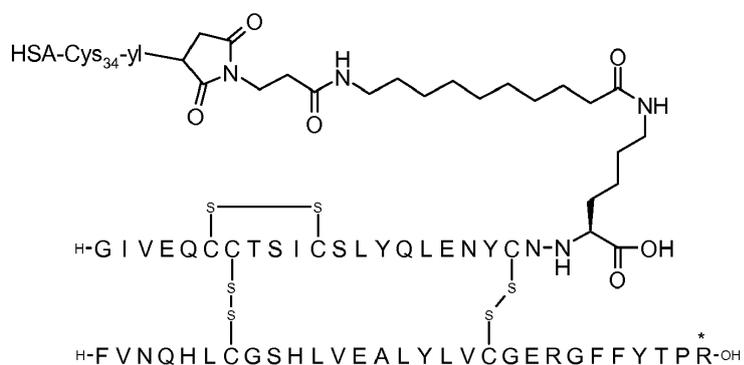
Ejemplo 24

10 A18L, A22K[N^ε-10-{3-(Albagen-Cys34-il-2,5-dioxopirrolidin-1-il)propionilamino}decanoil], B29R, desB30 insulina humana



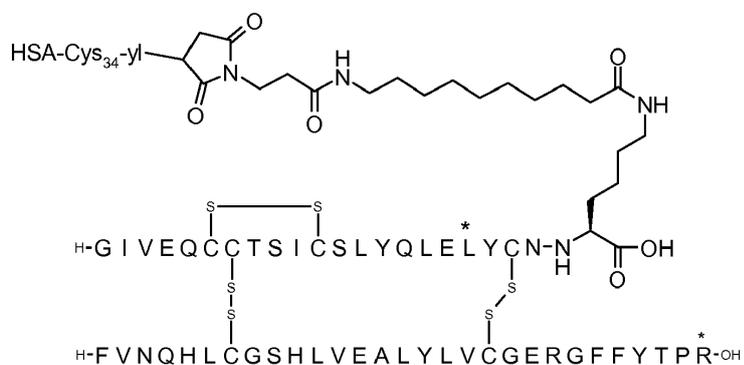
Ejemplo 25

A22K[N^ε-10-{3-(seroalbúmina humana-Cys34-il-2,5-dioxopirrolidin-1-il)propionilamino}decanoil], B29R, desB30 insulina humana



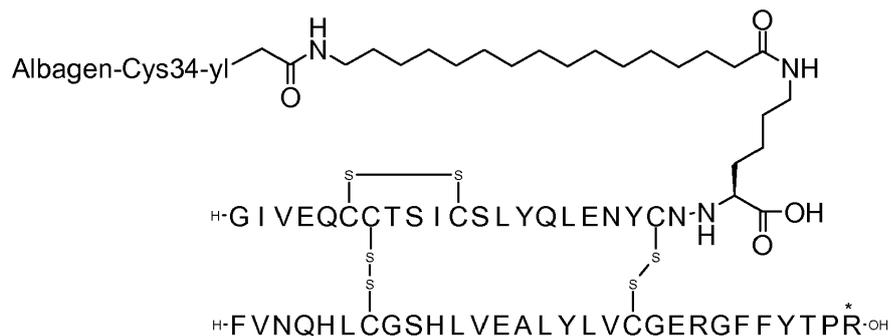
Ejemplo 26

5 A18L, A22K[N^ε-10-{3-(seroalbúmina humana-Cys34-il-2,5-dioxopirrolidin-1-il)propionilamino}-decanoil], B29R, desB30 insulina humana



Ejemplo 27

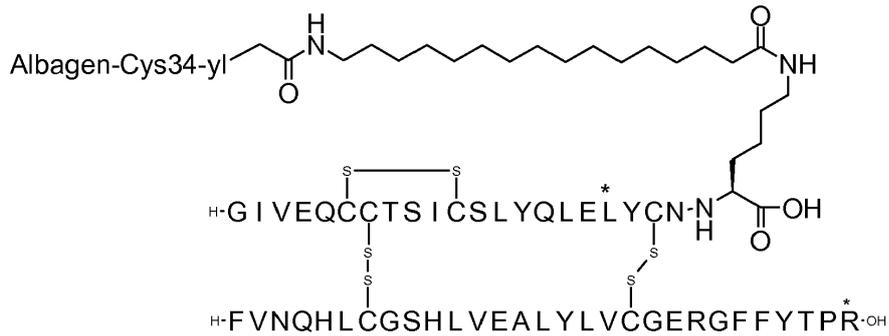
A22K[N^ε-16-{2-(Albagen-Cys34-il)acetilamino}hexadecanoil] B29R, desB30 insulina humana



10

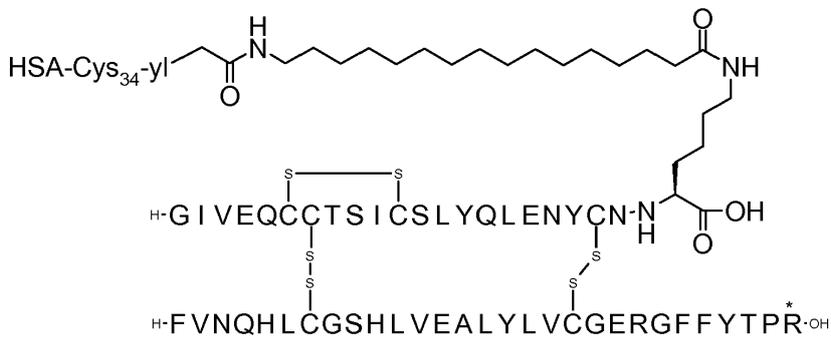
Ejemplo 28

A18L, A22K[N^ε-16-{2-(Albagen-Cys34-il)acetilamino}hexadecanoil] B29R, desB30 insulina humana



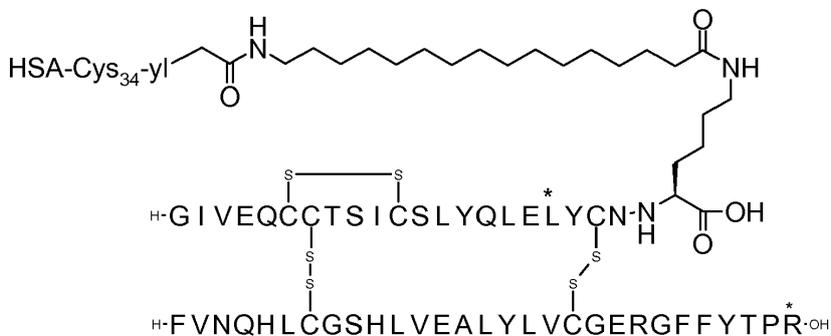
Ejemplo 29

A22K[N^ε-16-{2-(seroalbúmina humana-Cys34-il)acetilamino}hexadecanoil] B29R, desB30 insulina humana



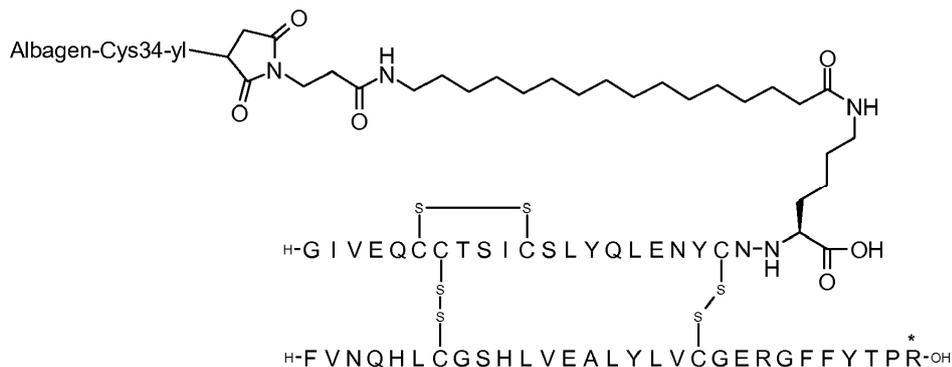
5 Ejemplo 30

A18L, A22K[N^ε-16-{2-(seroalbúmina humana-Cys34-il)acetilamino}hexadecanoil] B29R, desB30 insulina humana



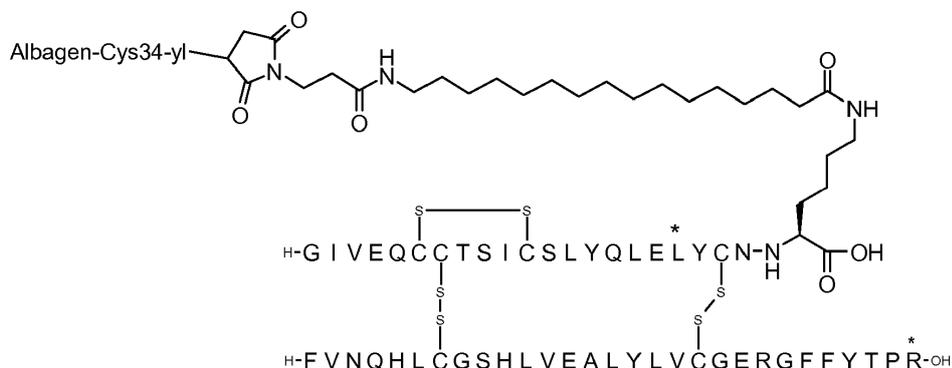
Ejemplo 31

10 A22K[N^ε-16-{3-(Albagen-Cys34-il-2,5-dioxopirrolidin-1-il)propionilamino}hexadecanoil], B29R, desB30 insulina humana



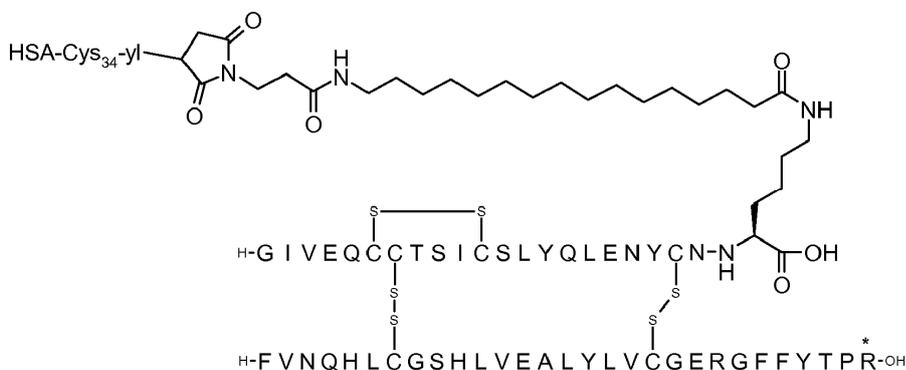
Ejemplo 32

A18L, A22K[N^ε-16-{3-(Albagen-Cys34-il-2,5-dioxopirrolidin-1-il)propionilamino}hexadecanoil], B29R, desB30 insulina humana



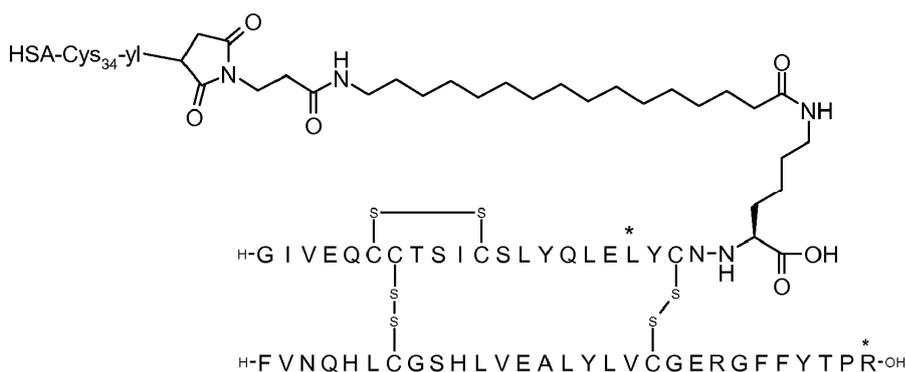
Ejemplo 33

5 A22K[N^ε-16-{3-(seroalbúmina humana-Cys34-il-2,5-dioxopirrolidin-1-il)propionilamino}hexadecanoil], B29R, desB30 insulina humana



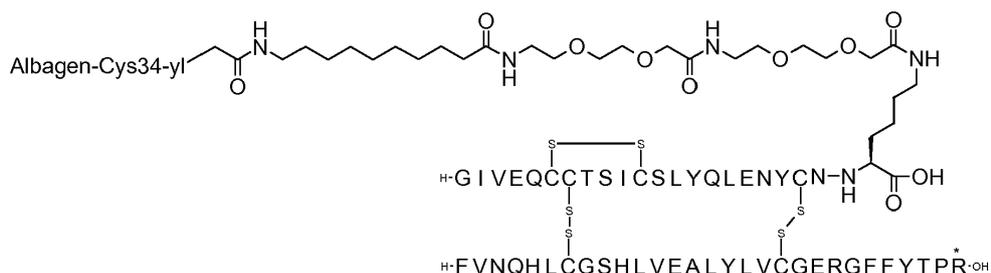
Ejemplo 34

10 A18L, A22K[N^ε-16-{3-(seroalbúmina humana-Cys34-il-2,5-dioxopirrolidin-1-il)propionilamino}hexadecanoil], B29R, desB30 insulina humana



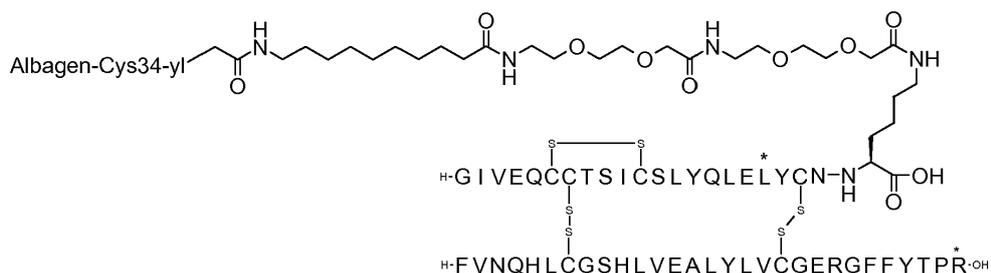
Ejemplo 35

A22K[N^ε-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[10-(2-{Albagen-Cys34-il}acetilamino)decanoilamino]etoxi)etoxi)acetil-amino]etoxi)etoxi)acetil]] B29R, desB30 insulina humana



Ejemplo 36

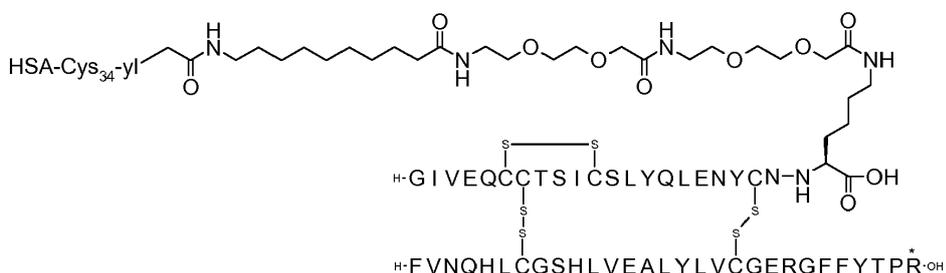
A18L, A22K[N^ε-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[10-(2-{Albagen-Cys34-il}acetilamino)decanoilamino)]etoxi)-etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil]] B29R, desB30 insulina humana



5

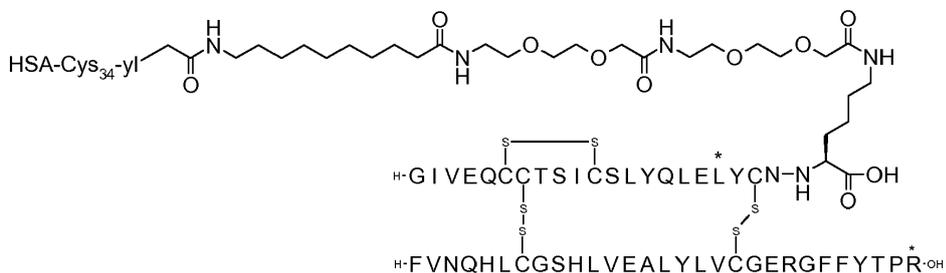
Ejemplo 37

A22K[N^ε-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[10-(2-{seroalbúmina humana-Cys34-il}acetilamino)decanoilamino]-etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil]] B29R, desB30 insulina humana



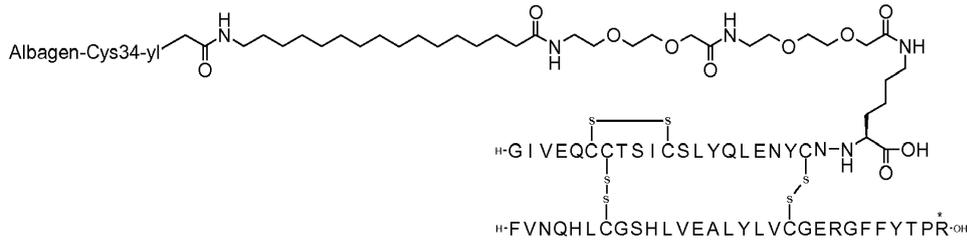
Ejemplo 38

A18L, A22K[N^ε-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[10-(2-{seroalbúmina humana-Cys34-il}acetilamino)decanoilamino]-etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil]] B29R, desB30 insulina humana



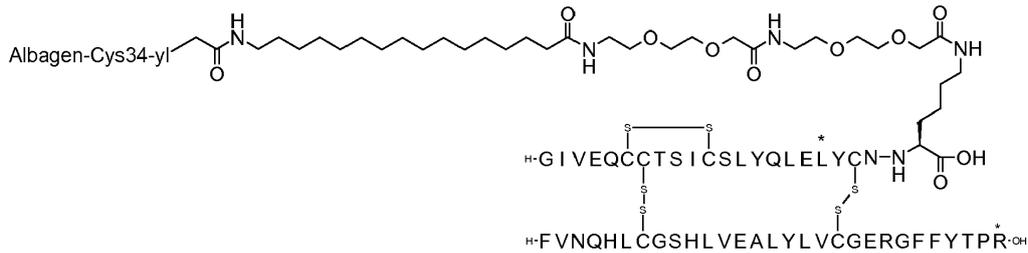
Ejemplo 39

15 A22K[N^ε-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[16-(2-{Albagen-Cys34-il}acetilamino)hexadecanoilamino)]etoxi)etoxi)-acetilamino]etoxi)etoxi)acetil]] B29R, desB30 insulina humana



Ejemplo 40

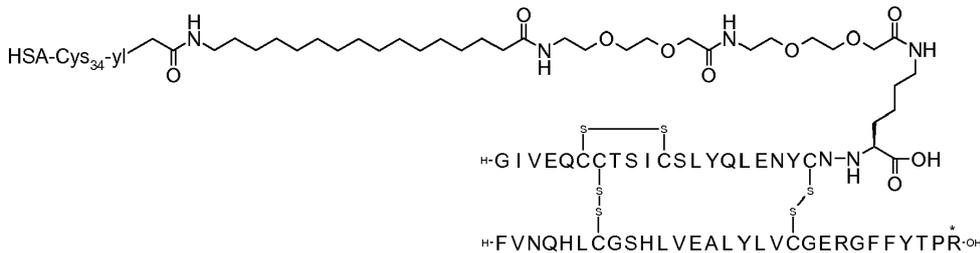
A18L, A22K[N^f-[2-(2-{2-[2-(2-[16-(2-{Albagen-Cys34-il}acetilamino)hexadecanoilamino]etoxi)-etoxi)acetilamino]etoxi]etoxi] B29R, desB30 insulina humana



5

Ejemplo 41

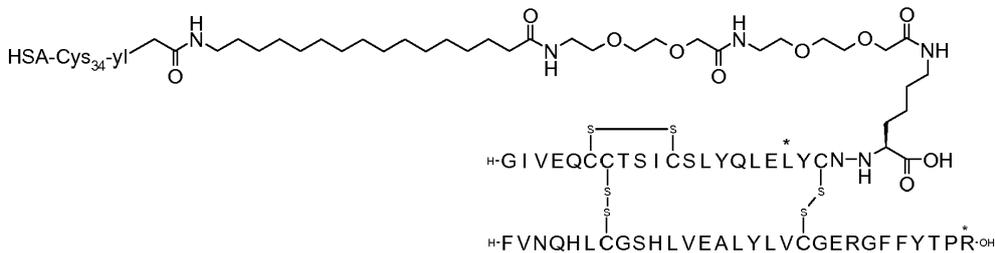
A22K[N^f-[2-(2-{2-[2-(2-[16-(2-{seroalbúmina humana-Cys34-il}acetilamino)hexadecanoilamino]-etoxi)etoxi]acetilamino]etoxi]etoxi] B29R, desB30 insulina humana



10

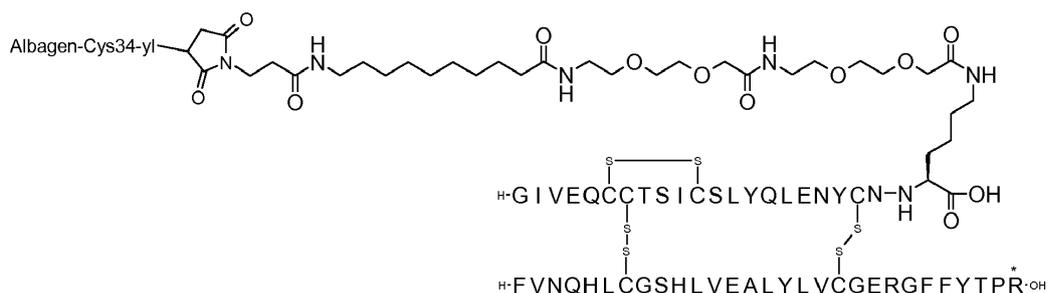
Ejemplo 42

A18L, A22K[N^f-[2-(2-{2-[2-(2-[16-(2-{seroalbúmina humana-Cys34-il}acetilamino)hexadecanoil-amino]-etoxi)etoxi]acetilamino]etoxi]etoxi] B29R, desB30 insulina humana



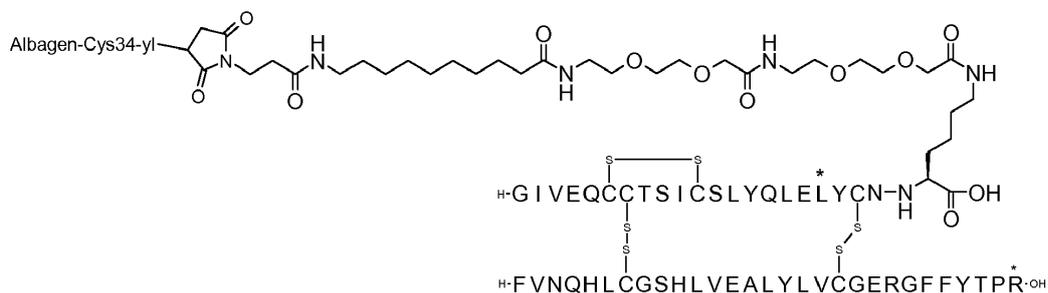
Ejemplo 43

15 A22K[N^f-[2-(2-{2-[2-(2-[10-(3-{(Albagen-Cys34-il)2,5-dioxopirrolidin-1-il}propionilamino)decanoil-amino]etoxi]etoxi]acetilamino]etoxi]etoxi] B29R, desB30 insulina humana



Ejemplo 44

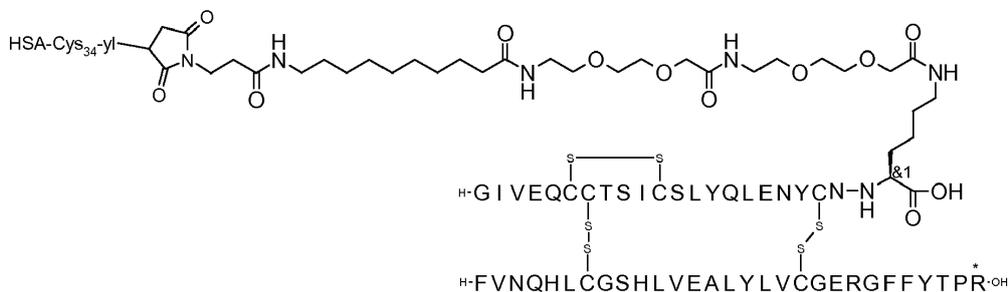
A18L, A22K[N^ε-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[10-(3-((Albagen-Cys34-il)2,5-dioxopirrolidin-1-il)propionilamino)-decanoilamino])etoxi]etoxi)acetilamino]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi] B29R, desB30 insulina humana



5

Ejemplo 45

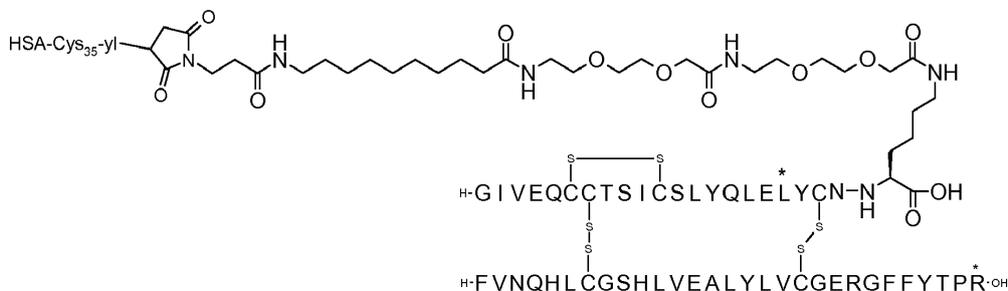
A22K[N^ε-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[10-(3-((seroalbúmina humana-Cys34-il)2,5-dioxopirrolidin-1-il)propionil-amino)decanoilamino])etoxi]etoxi)acetilamino]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi] B29R, desB30 insulina humana



10

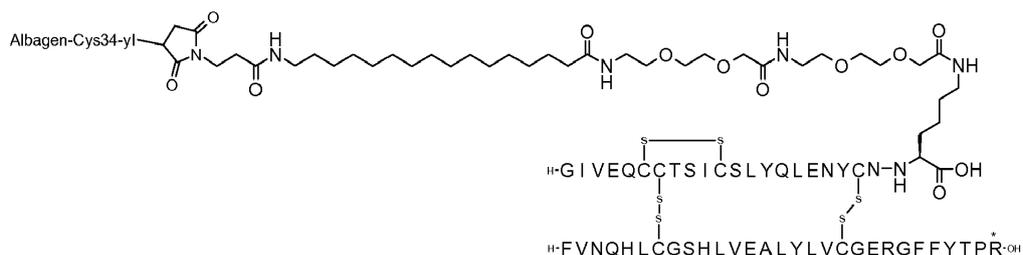
Ejemplo 46

A18L, A22K[N^ε-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[10-(3-((seroalbúmina humana-Cys35-il)2,5-dioxopirrolidin-1-il)-propionilamino)decanoilamino])etoxi]etoxi)acetilamino]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi] B29R, desB30 insulina humana



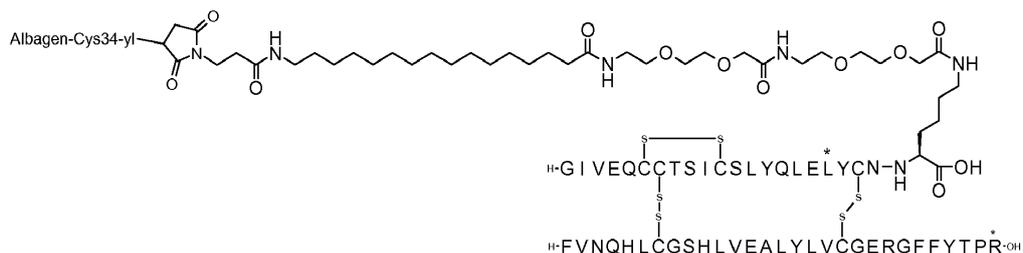
Ejemplo 47

15 A22K[N^ε-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[16-(3-((Albagen-Cys34-il)2,5-dioxopirrolidin-1-il)propionilamino))hexadecanoilamino]etoxi]etoxi)acetilamino]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi] B29R, desB30 insulina humana



Ejemplo 48

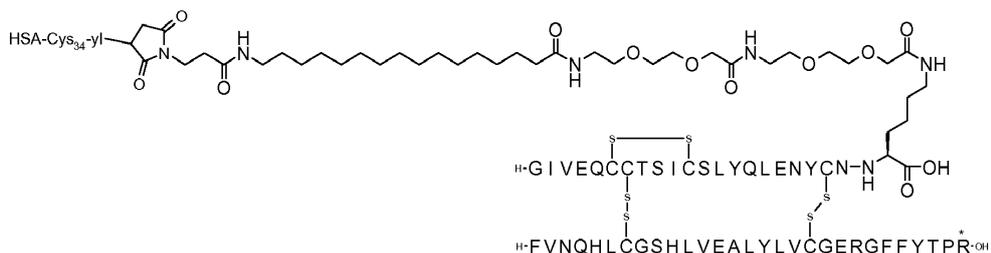
A18L, A22K[N^F-[2-(2-[2-[2-(2-[2-[16-(3-((Albagen-Cys34-il)2,5-dioxopirrolidin-1-il)propionilamino]-hexadecanoilamino)etoxi]etoxi]acetilamino]etoxi]etoxi]acetil]] B29R, desB30 insulina humana



5

Ejemplo 49

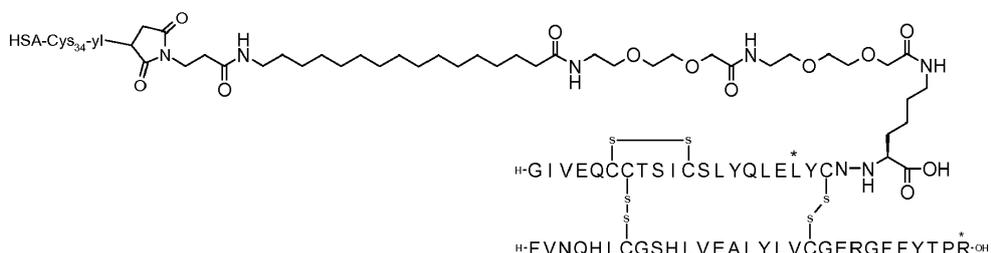
A22K[N^F-[2-(2-[2-[2-(2-[2-[16-(3-((seroalbúmina humana-Cys34-il-2,5-dioxopirrolidin-1-il)propionil-amino)hexadecanoilamino]etoxi]etoxi]acetilamino]etoxi]etoxi]acetil]] B29R, desB30 insulina humana



10

Ejemplo 50

A18L, A22K[N^F-[2-(2-[2-[2-(2-[2-[16-(3-((seroalbúmina humana-Cys34-il-2,5-dioxopirrolidin-1-il)-propionilamino]hexadecanoilamino)etoxi]etoxi]acetilamino]etoxi]etoxi]acetil]] B29R, desB30 insulina humana



Ejemplo 51

15 Administración s.c. del conjugado de insulina-Albagen del ejemplo 1 a ratas ZDF

16 ratas ZDF machos de 16 semanas de vida alimentadas (aprox. 400 g) se dividieron en 2 grupos. La alimentación se retiró cuando se comenzó el experimento. Un grupo se dosificó con vehículo, el otro grupo se dosificó con el conjugado de insulina del ejemplo 1, 87.3 nmol/kg en el tiempo t = 0. se extrajeron muestras de sangre de la vena de la cola a los tiempos t = 30, 60, 90, 120, 180 y 240 minutos y a los tiempos t = 5, 6, 7, 8, 9 y 10 horas.

Ejemplo 52

Señalización intracelular estimulada por insulina en tejidos sensibles a la insulina en ratones normales

Veintiún ratones NMRI machos que no estaban en ayunas (30-40 g) se dividieron en 7 grupos: un grupo basal, 3 grupos para el tratamiento con insulina humana (IH) y 3 grupos para el tratamiento con el conjugado de insulina-albúmina del ejemplo 1. La alimentación se retiró cuando comenzó el experimento. Se extrajo una muestra de sangre para medición de la glucosa de todos los ratones antes de la dosificación. Después se sacrificó (por dislocación cervical) al grupo basal (sin tratar) y se les extrajeron los tejidos para determinar los valores basales. Los otros ratones se dosificaron por vía intravenosa con IH (6 nmol/kg) o el conjugado de insulina-HSA del ejemplo 1 (9.9 nmol/kg). Se logró una reducción similar de la glucemia en ambos grupos. Después de cada uno de los tiempos 5, 15 y 120 minutos, se extrajo una muestra de sangre de la punta de la cola de un grupo tratado con IH y un grupo tratado con el ejemplo 1, luego de lo cual esos animales fueron sacrificados y se les extrajeron los tejidos. Se midieron las moléculas de fosforilación del receptor de la insulina en el hígado, los músculos inferiores de la pata y la grasa del epidídimo mediante BioSource ELISA.

Ejemplo 53

Unión al receptor de la insulina de los conjugados de insulina-albúmina de esta invención

La afinidad de los conjugados de insulina-albúmina de esta invención por el receptor de la insulina humana se determinó mediante un ensayo de captura de anticuerpo en una placa de microtitulación de ensayo SPA (Ensayo de centelleo por proximidad). Se mezclaron perlas de unión al anticuerpo SPA-PVT y reactivo anti-ratón (Amersham Biosciences, Cat No. PRNQ0017) con 25 ml de tampón de unión (HEPES 100 mM pH 7.8; cloruro de sodio 100 mM, MgSO₄ 10 mM, Tween-20 al 0.025%). La mezcla de reactivo para una única placa Optiplate Packard (Packard No. 6005190) estuvo compuesta por 2.4 µl de receptor de la insulina humana recombinante purificado, diluido 1:5000 (con o sin exón 11), una cantidad de solución madre de A14Tyr[¹²⁵I]-insulina humana correspondiente a 5000 cpm por 100 µl de mezcla de reactivo, 12 µl de una dilución 1:1000 de anticuerpo F12, 3 ml de perlas de SPA y tampón de unión hasta un total de 12 ml. Después se agregó un total de 100 µl de mezcla de reactivo a cada pocillo de la placa Optiplate Packard y se preparó una serie de diluciones del derivado de la insulina en la Optiplate de las muestras apropiadas. Después las muestras se incubaron durante 16 horas mientras se agitaban suavemente. Luego las fases se separaron por centrifugación durante 1 min y las placas se contaron en un Topcounter. Los datos de unión se ajustaron usando el algoritmo de regresión no lineal en el GraphPad Prism 2.01 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Afinidades por el receptor de la insulina de dos insulinas conocidas y cuatro insulinas elegidas de la invención:

Ejemplo N°	Afinidad por RI-A (0% de HSA)	Insulina original (todas desB30 insulina humana)
	100%	desB30 insulina humana (sin conjugar)
	102%	A22K, B29R (sin conjugar)
1	13.0%	A22K, B29R
2	13.6%	A22K, B29R
3	20.0%	A22K, B29R
4	44.1 %	A18L, A22K, B29R

LISTADO DESECUENCIAS

En los ejemplos, las cadenas A siguientes con las desviaciones siguientes respecto a la insulina humana se indican como ID SEQ N° 1-3, respectivamente: A5L, A22K; A18L, A22K; y A22K, y la cadena B siguiente con las desviaciones siguientes respecto a la insulina humana se indica cómo ID SEQ N° 4: B29R, desB30.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Novo Nordisk A/S
- <120> Conjugados de insulina-albúmina
- <130> 7666.204-WO

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 22

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena A modificada

<400> 1

Gly Ile Val Glu Leu Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
1 5 10 15

10 Glu Asn Tyr Cys Asn Lys
20

<210> 2

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Cadena A modificada

<400> 2

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
1 5 10 15

Glu Leu Tyr Cys Asn Lys
20

<210> 3

20 <211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena A modificada

25 <400> 3

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
1 5 10 15

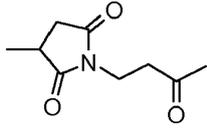
Glu Asn Tyr Cys Asn Lys
20

<210> 4

<211> 29

<212> PRT

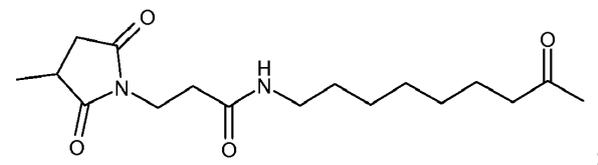
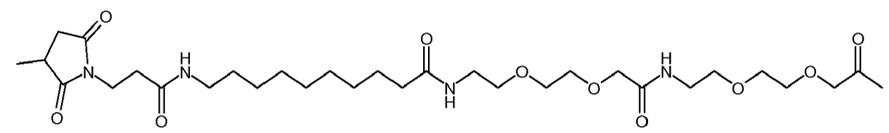
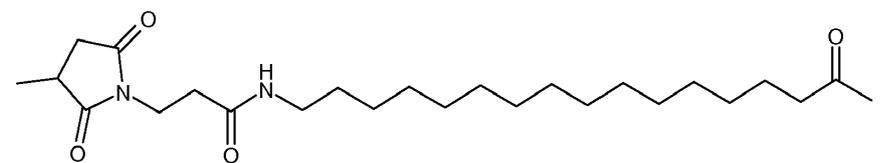
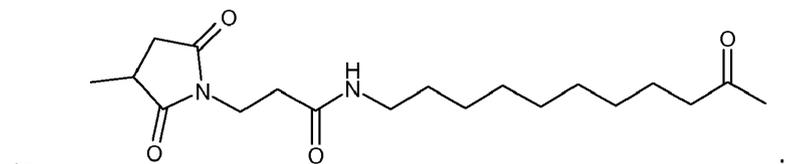
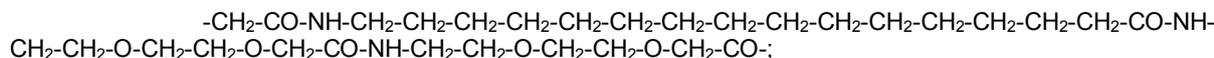
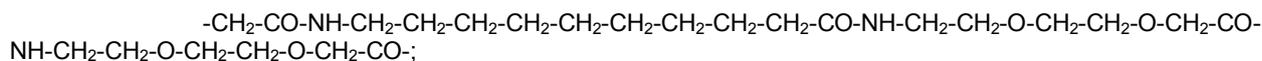
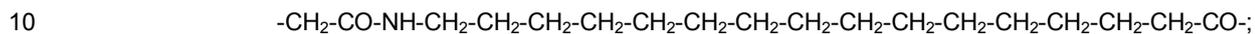
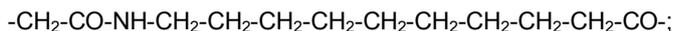
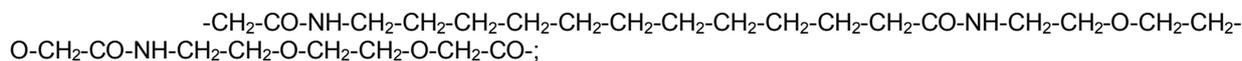
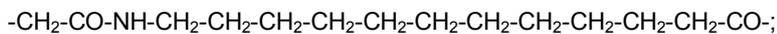
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula II: $M-Z_n-Y_o-Ins$, o de fórmula III: $Alb-M'-Z_n-Y_o-Ins$;
 en dichas fórmulas Ins representa un análogo de la insulina, donde dicho análogo de la insulina tiene
 un residuo de lisina en el extremo C-terminal de la cadena A, incluido el extremo C-terminal de una extensión de la
 cadena A, donde dicha extensión, comparada con el residuo de aminoácido A21, consta de un único residuo de
 aminoácido que es lisina; o
 un residuo de lisina en el extremo C-terminal de una extensión de aminoácidos en la cadena A que consta de 2-5
 residuos de aminoácidos; y, opcionalmente,
 donde en dicho análogo de la insulina hasta seis residuos de aminoácidos en las posiciones A1-A21 y B1-B30 de la
 insulina humana han sido eliminados o sustituidos por otro residuo de aminoácido; y M' representa el grupo reactivo
 tiol denominado M después de la reacción con un grupo tiol de Alb (albúmina);
 M representa un aceptor de Michael representado por un grupo malimido, una vinilsulfona, un grupo reactivo tiol
 representado por yoduro, piridildisulfuro, metoxi o etoxicarbonil disulfuro y o-nitrofenildisulfuro;
 donde M y M' están unidos, a través del conector Z_n-Y_o , al grupo épsilon-amino del residuo de lisina C-terminal de la
 cadena A, donde de dicho grupo épsilon-amino se ha eliminado un átomo de hidrógeno;
 Z es un enlace covalente, o representa una porción de una de las seis fórmulas siguientes: $-NH-(CH_2-CH_2-O)_p-CH_2-$
 $CO-$; $-NH-(CH_2)_q-CH_2-CO-$; $-NH-(CH_2-CH_2-O)_r-CH_2-CH_2-CO-$; $-HN-CH_2-CH_2-NH-CO-$; $-NH-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-NH-$
 $CO-CH_2-CH_2-CO-$; y $-NH-C_6H_4-CO-$; en las que
 p es 0 (cero) o un número entero en el intervalo entre 1 y 24;
 q es 0 (cero) o un número entero en el intervalo entre 1 y 24;
 r es 0 (cero) o un número entero en el intervalo entre 1 y 24; y
 $-C_6H_4-$ es para-fenileno;
 n representa un número entero en el intervalo entre 1 y 10;
 Y tiene uno de los significados indicados para Z;
 o es 0 a 10; y
 Alb se elige del grupo que consiste en Albagen y seroalbúmina humana.
2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que n representa 1 o 2.
3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que o es 0, 1 o 2.
4. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el grupo denominado Ins se
 elige del grupo que consiste en A5L, A22K, B29R, desB30 insulina humana; A18L, A22K, B29R, desB30 insulina
 humana y A22K, B29R, desB30 insulina humana del cual se ha eliminado un hidrógeno del grupo épsilon amino
 presente en el residuo de aminoácido Lys(A22).
5. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el grupo denominado M' se elige
 del grupo que consiste en
- 
- y $-CH_2-CO-$ (es decir metilcarbonil).
6. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el grupo denominado Z_n se elige
 del grupo que consiste en
- $-NH-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CO-$;
 $-NH-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CO-$;
 $-NH-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CO-$ y

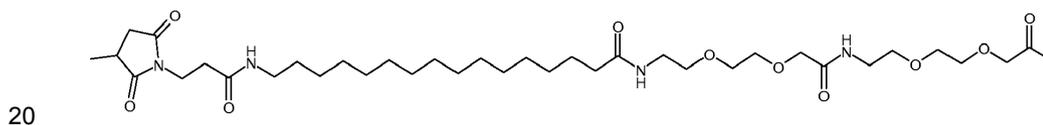


7. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el grupo denominado Z_n o Y_o es -NH-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CO-

8. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la porción denominada - M'-Z_n-Y_o- se elige del grupo que consiste en las once fórmulas siguientes:



y



9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho compuesto se elige del grupo que consiste en:

A22K[N^ε-3-(albagen-Cys34-il-2,5-dioxopirrolidin-1-il)propionilamino]octanoil], B29R, desB30 insulina humana;

A22K[N^ε-12-{2-(albagen-Cys34-ilacetilamino)}dodecanoil] B29R, desB30 insulina humana;

25 A22K[N^ε-{2-[2-(2-[2-(12-{2-albagen-Cys-34-ilacetilamino}dodecanoilamino)etoxi]etoxi)acetilamino)etoxi]etoxi]acetil] B29R, desB30 insulina humana;

A18L,

A22K[N^ε-{2-[2-(2-[2-(12-{2-albagen-Cys34-il-acetilamino}dodecanoil-amino)etoxi]etoxi)acetilamino)etoxi]etoxi]acetil] B29R, desB30 insulina humana;

- A18L, A22K[N^ε-12-{2-(albagen-Cys34-il)acetilamino}dodecanoil] B29R, desB30 insulina humana;
- A5L, A22K[N^ε-12-{2-(albagen-Cys34-il)acetilamino}dodecanoil] B29R, desB30 insulina humana;
- A18L, A22K[N^ε-12-{2-(seroalbúmina humana-Cys34-il)acetilamino}dodecanoil] B29R, desB30 insulina humana;
- A22K[N^ε-12-{2-(seroalbúmina humana-Cys34-il)acetilamino}dodecanoil] B29R, desB30 insulina humana;
- 5 A5L, A22K[N^ε-12-{2-(seroalbúmina humana-Cys34-il)acetilamino}dodecanoil] B29R, desB30 insulina humana;
- A18L, A22K[N^ε-8-{3-(albagen-Cys34-il-2,5-dioxopirrolidin-1-il)propionilamino}octanoil], B29R, desB30 insulina humana;
- A5L, A22K[N^ε-8-{3-(albagen-Cys34-il-2,5-dioxopirrolidin-1-il)propionilamino}octanoil], B29R, desB30 insulina humana;
- A18L, A22K[N^ε-8-{3-(seroalbúmina humana-Cys34-il-2,5-dioxopirrolidin-1-il)-propionilamino} octanoil],
- 10 B29R, desB30 insulina humana; A22K[N^ε-8-{3-(seroalbúmina humana-Cys34-il-2,5-dioxopirrolidin-1-il)propionilamino}octanoil], B29R, desB30 insulina humana;
- A5L, A22K[N^ε-8-{3-(seroalbúmina humana-Cys34-il-2,5-dioxopirrolidin-1-il)propionilamino}octanoil], B29R, desB30 insulina humana;
- A5L, A22K[N^ε-[2-(2-{2-[2-(2-[12-(2-{albagen-Cys34-il)acetilamino}-dodecanoilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi]acetil]] B29R, desB30 insulina humana;
- 15 A22K[N^ε-[2-(2-{2-[2-(2-[12-(2-{seroalbúmina humana-Cys34-il}acetilamino)dodecanoilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi]acetil]] B29R, desB30 insulina humana;
- A18L, A22K[N^ε-[2-(2-{2-[2-(2-[12-(2-{seroalbúmina humana-Cys34-il}acetilamino)dodecanoilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi]acetil]] B29R, desB30 insulina humana;
- 20 A5L, A22K[N^ε-[2-(2-{2-[2-(2-[12-(2-{seroalbúmina humana-Cys34-il}acetilamino)dodecanoilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi]acetil]] B29R, desB30 insulina humana;
- A22K[N^ε-10-{2-(albagen-Cys34-il)acetilamino}decano il] B29R, desB30 insulina humana
- A18L, A22K[N^ε-10-{2-(albagen-Cys34-il)acetilamino}decanoil] B29R, desB30 insulina humana;
- A22K[N^ε-10-{2-(seroalbúmina humana-Cys34-il)acetilamino}decanoil] B29R, desB30 insulina humana;
- 25 A18L, A22K[N^ε-10-{2-(seroalbúmina humana-Cys34-il)acetilamino}decanoil] B29R, desB30 insulina humana;
- A22K[N^ε-10-{3-(albagen-Cys34-il-2,5-dioxopirrolidin-1-il)propionilamino}decanoil], B29R, desB30 insulina humana;
- A18L, A22K[N^ε-10-{3-(albagen-Cys34-il-2,5-dioxopirrolidin-1-il)propionilamino}decanoil], B29R, desB30 insulina humana;
- 30 A22K[N^ε-10-{3-(seroalbúmina humana-Cys34-il-2,5-dioxopirrolidin-1-il)-propionilamino}decanoil], B29R, desB30 insulina humana;
- A18L, A22K[N^ε-10-{3-(seroalbúmina humana-Cys34-il-2,5-dioxopirrolidin-1-il)-propionilamino}decanoil], B29R, desB30 insulina humana;
- A22K[N^ε-16-{2-(albagen-Cys34-il)acetilamino}hexadecanoil] B29R, desB30 insulina humana;
- A18L, A22K[N^ε-16-{2-(albagen-Cys34-il)acetilamino}hexadecanoil] B29R, desB30 insulina humana;
- 35 A22K[N^ε-16-{2-(seroalbúmina humana-Cys34-il)acetilamino}hexadecanoil] B29R, desB30 insulina humana;
- A18L, A22K[N^ε-16-{2-(seroalbúmina humana-Cys34-il)acetilamino}hexadecanoil] B29R, desB30 insulina humana;
- A22K[N^ε-16-{3-(albagen-Cys34-il-2,5-dioxopirrolidin-1-il)propionilamino}-hexadecanoil], B29R, desB30 insulina humana;
- A18L, A22K[N^ε-16-{3-(albagen-Cys34-il-2,5-dioxopirrolidin-1-il)propionilamino}hexadecanoil], B29R, desB30 insulina humana;
- 40 A22K[N^ε-16-{3-(seroalbúmina humana-Cys34-il-2,5-dioxopirrolidin-1-il)-propionil-amino}hexadecanoil], B29R, desB30 insulina humana;

- A18L, A22K[N^ε-16-{3-(seroalbúmina humana-Cys34-il-2,5-dioxopirrolidin-1-il)-propionilamino}hexadecanoil], B29R, desB30 insulina humana;
- A22K[N^ε-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[10-(2-{albagén-Cys34-il})acetilamino)decanoilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil]] B29R, desB30 insulina humana;
- 5 A18L, A22K[N^ε-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[10-(2-{albagén-Cys34-il})acetilamino)decanoilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil]] B29R, desB30 insulina humana;
- A22K[N^ε-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[10-(2-{seroalbúmina humana-Cys34-il})acetilamino)decanoilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil]] B29R, desB30 insulina humana;
- 10 A18L, A22K[N^ε-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[10-(2-{seroalbúmina humana-Cys34-il})acetilamino)decanoilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil]] B29R, desB30 insulina humana;
- A22K[N^ε-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[16-(2-{albagén-Cys34-il})acetilamino)hexadecanoilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil]] B29R, desB30 insulina humana;
- A18L, A22K[N^ε-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[16-(2-{albagén-Cys34-il})acetilamino)hexadecanoilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil]] B29R, desB30 insulina humana;
- 15 A22K[N^ε-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[16-(2-{seroalbúmina humana-Cys34-il})acetilamino)hexadecanoilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil]] B29R, desB30 insulina humana;
- A18L, A22K[N^ε-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[16-(2-{seroalbúmina humana-Cys34-il})acetilamino)hexadecanoilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil]] B29R, desB30 insulina humana;
- 20 A22K[N^ε-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[10-(3-{(albagén-Cys34-il)2,5-dioxopirrolidin-1-il})propionilamino)decanoilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil]] B29R, desB30 insulina humana;
- A18L, A22K[N^ε-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[10-(3-{(albagén-Cys34-il)-2,5-dioxopirrolidin-1-il})propionilamino)decanoilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil]] B29R, desB30 insulina humana;
- A22K[N^ε-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[10-(3-{(seroalbúmina humana-Cys34-il)2,5-dioxopirrolidin-1-il})propionilamino)decanoilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil]] B29R, desB30 insulina humana;
- 25 A18L, A22K[N^ε-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[10-(3-{(seroalbúmina humana-Cys34-il)2,5-dioxopirrolidin-1-il})propionilamino)decanoilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil]] B29R, desB30 insulina humana;
- A22K[N^ε-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[16-(3-{(albagén-Cys34-il)2,5-dioxopirrolidin-1-il})propionilamino)hexadecanoilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil]] B29R, desB30 insulina humana;
- 30 A18L, A22K[N^ε-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[16-(3-{(albagén-Cys34-il)2,5-dioxopirrolidin-1-il})propionilamino)hexadecanoilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil]] B29R, desB30 insulina humana;
- A22K[N^ε-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[16-(3-{(seroalbúmina humana-Cys34-il)-2,5-dioxo-pirrolidin-1-il})propionilamino)hexadecanoilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil]] B29R, desB30 insulina humana; y
- A18L, A22K[N^ε-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[16-(3-{(seroalbúmina humana-Cys34-il)-2,5-dioxo-pirrolidin-1-il})propionilamino]hexadecanoilamino]etoxi)etoxi)acetil-amino]etoxi)etoxi)acetil]] B29R, desB30 insulina humana.
- 35 10. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para usar como un medicamento.
11. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para usar en el tratamiento de la diabetes.
12. El uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un análogo de la insulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para la preparación de una formulación farmacéutica destinada al tratamiento o la prevención de hiperglucemia, diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 1, obesidad, síndrome X o dislipidemia.
- 40

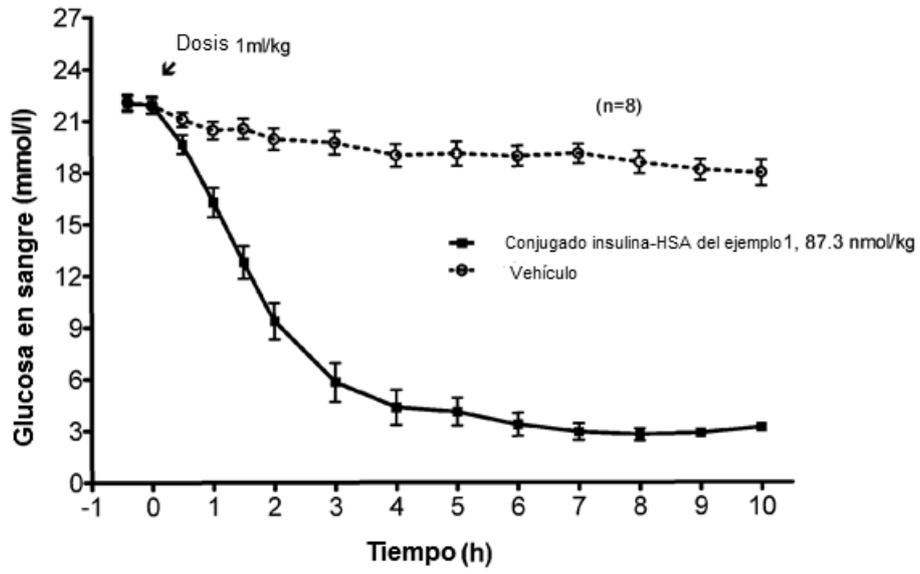


Fig. 1

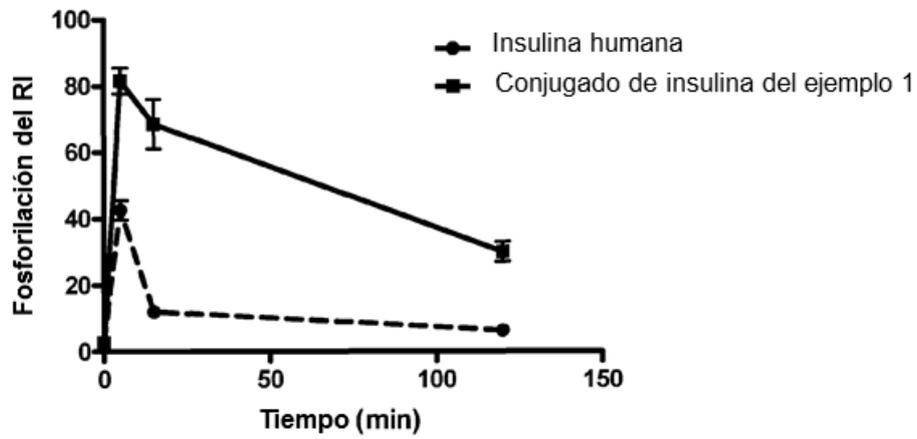


Fig. 2a

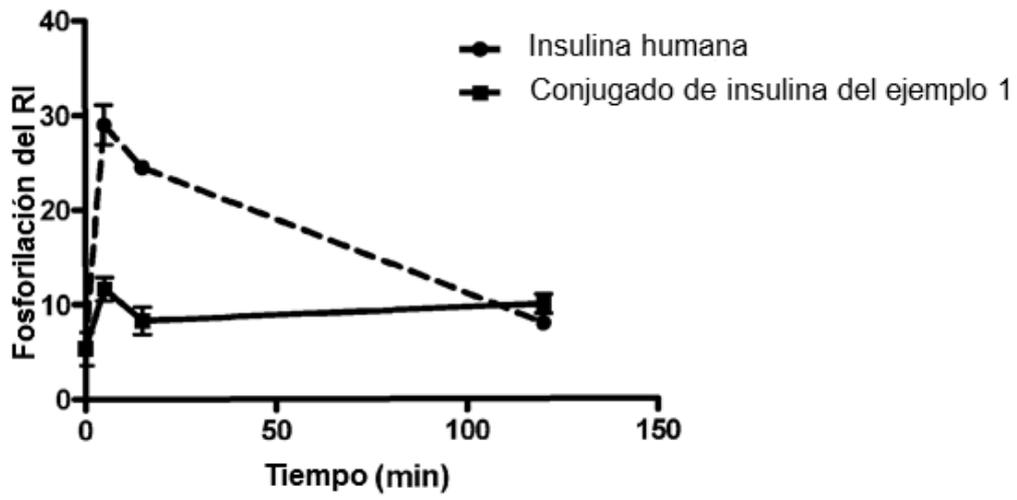


Fig. 2b

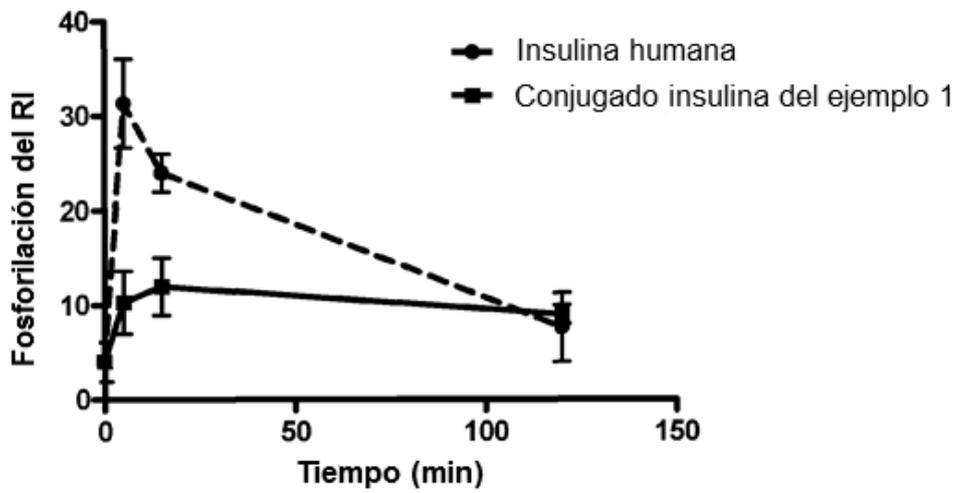


Fig. 2c