

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 839**

51 Int. Cl.:

A61K 38/28 (2006.01)

C07K 14/62 (2006.01)

C12N 15/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.09.2007 PCT/EP2007/059990**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.03.2008 WO08034881**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2007 E 07820423 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2074141**

54 Título: **Análogos de insulina resistentes a proteasas**

30 Prioridad:

22.09.2006 EP 06121113

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

16.02.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**NIELSEN, PETER KRESTEN;
HUBALEK, FRANTISEK;
LAUTRUP-LARSEN, INGER;
LUDVIGSEN, SVEND;
RIBEL-MADSEN, ULLA;
BALSCHMIDT, PER;
NØRGAARD, PER y
HAVELUND, SVEND**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

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

ES 2 601 839 T3

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

DESCRIPCIÓN

Análogos de insulina resistentes a proteasas

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere a análogos de insulina novedosos que exhiben resistencia frente a una proteasa, a un método para la preparación de tales análogos de insulina, a preparados de insulina que contienen los análogos de insulina de la invención y a un método para tratar la diabetes mellitus utilizando estos análogos de insulina.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 La vía oral es la vía utilizada de forma más generalizada con diferencia para la administración de fármacos y es, en general, muy bien aceptada por los pacientes, especialmente para las terapias crónicas. A pesar de ello, la administración de proteínas o péptidos terapéuticos se suele limitar a vías parenterales en lugar de la administración oral preferida, debido a varias barreras tales como la degradación enzimática en el aparato gastrointestinal (GI), bombas de flujo de fármaco, una absorción variable e insuficiente desde la mucosa intestinal, así como también el metabolismo de primer paso en el hígado. La insulina humana es degradada por varias enzimas digestivas que se encuentran en el estómago (pepsina), en el lumen intestinal (quimotripsina, tripsina, elastasa, carboxipeptidasas, etc.) y en superficies mucosas del aparato GI (aminopeptidasas, carboxipeptidasas, enteropeptidasas, dipeptidilpeptidasas, endopeptidasas, etc.).

15 Es una lástima que así sea, ya que se ha demostrado que muchos péptidos y muchas proteínas son eficaces clínicamente y se podrían utilizar de forma mucho más generalizada si se pudieran administrar con facilidad y fueran aceptadas por los receptores.

20 La diabetes mellitus es un trastorno metabólico en el que la capacidad para utilizar glucosa se pierde parcial o completamente. Aproximadamente un 5% de todas las personas padecen diabetes y el trastorno se acerca a proporciones epidémicas. Desde la introducción de la insulina en los años 20, se ha intentado de forma continuada mejorar el tratamiento de la diabetes mellitus. Debido a que la gente que padece diabetes se somete a un tratamiento crónico durante varias décadas, se necesita en gran medida disponer de formulaciones de insulina seguras, convenientes y que mejoren la calidad de vida.

25 En el tratamiento de la diabetes mellitus, se han sugerido y utilizado muchas variedades de formulaciones de insulina, tales como insulina normal, insulina isofánica (denominada NPH), suspensiones de insulina y zinc (tales como Semilente[®], Lente[®] y Ultralente[®]) e insulina isofánica bifásica. Algunas de las formulaciones de insulina disponibles en el mercado se caracterizan por un inicio de acción rápido y otras formulaciones presentan un inicio relativamente lento pero muestran una acción más o menos prolongada. Las formulaciones de insulina de acción rápida son normalmente soluciones de insulina, mientras que las formulaciones de insulina de acción retardada pueden ser suspensiones que contengan la insulina en forma cristalina y/o amorfa precipitada mediante la adición de sales de zinc solas o mediante la adición de protamina o mediante una combinación de ambas.

30 La insulina humana está constituida por dos cadenas polipeptídicas, las cadenas A y B, que contienen 21 y 30 residuos aminoácidos, respectivamente. Las cadenas A y B están interconectadas mediante dos puentes de disulfuro. La insulina de la mayoría de las demás especies es similar, pero puede contener sustituciones de aminoácidos en algunas posiciones. En la última década, se han desarrollado una serie de análogos de insulina humana. Están diseñados para unos perfiles de acción particulares, es decir, acción rápida o acción prolongada. Los productos que se pueden adquirir en el mercado que comprenden tales análogos de insulina incluyen Levemir[®], NovoRapid[®], Humalog[®], Apidra[®] y Lantus[®].

35 El documento EP 0 214 826 describe análogos de insulina humana de acción rápida con una o más mutaciones. Schilling R J *et al.* describen en *Pharmaceutical Research* vol. 8, n.º 6, 1991, páginas 721-727 la degradación de la insulina por parte de la tripsina y la alfa-quimotripsina.

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

45 Sin embargo, la administración mediante la vía oral sería beneficiosa debido a su seguridad, conveniencia y conformidad del paciente.

50 La administración oral de fármacos proteicos tales como la insulina suele dar como resultado una biodisponibilidad muy baja, debido a barreras enzimáticas y de absorción. La estrategia general para el suministro de proteínas y péptidos es la administración parenteral, la cual es invasiva e inconveniente. Por consiguiente, cada vez se investigan más las vías no invasivas como el suministro oral de productos farmacéuticos basados en proteínas. Los diseños de formulación recientes para el suministro oral de proteínas/péptidos incluyen coformulaciones con inhibidores de proteasas, potenciadores de la permeación, sistemas de suministro basados en polímeros y conjugados de insulina. Estos últimos incluyen el monoconjugado de hexilo-insulina 2 (HIM2) (Nobex Cooperation y GSK), un análogo de insulina humana con un grupo PEG 7-hexilo unido a B29. En, por ejemplo, los documentos US

7.030.082, US 6.867.183 y US 6.770.625, se ha descrito que el HIM2 oral presenta una estabilidad proteolítica y una biodisponibilidad mayores en comparación con la insulina.

COMPENDIO DE LA INVENCION

5 La invención se refiere a análogos de insulina con una estabilidad proteolítica mejorada y que conservan la actividad biológica de la insulina.

En una realización de la invención, se proporciona un análogo de insulina que está estabilizado frente a la degradación por parte de una o más enzimas seleccionadas del grupo constituido por: pepsina, quimotripsina, tripsina, enzima degradadora de insulina (IDE, por sus siglas en inglés), elastasa, carboxipeptidasa, aminopeptidasa y catepsina D respecto a la insulina humana, donde el aminoácido en la posición A14 es Glu, Asp o His, el aminoácido en la posición B25 es His y que comprende además opcionalmente una o más mutaciones adicionales, y donde T $\frac{1}{2}$ se incrementa al menos dos veces con relación a la insulina original.

10 La presente invención también se refiere a secuencias de ácido nucleico que codifican el prepro péptido de los análogos de insulina reivindicados. En una realización adicional, la presente invención se refiere a vectores que contienen tales secuencias de ácido nucleico y a células huésped que contienen tales vectores o secuencias de ácido nucleico.

15 También se proporciona un proceso para obtener un análogo de insulina de acuerdo con la invención y el uso de este como un producto farmacéutico.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20 Fig. 1: Estabilidad proteolítica de la insulina humana (IH) y de los análogos de insulina frente a la quimotripsina medida como el porcentaje de insulina (análogo de insulina) intacta a 37 °C.

Fig. 2: Estabilidad proteolítica de la insulina humana (IH) y de los análogos de insulina frente a la pepsina medida como el porcentaje de insulina (análogo de insulina) intacta a 25 °C.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

25 Un análogo de insulina de acuerdo con la invención es una molécula de insulina que tiene dos o más mutaciones de las cadenas aminoacídicas A y/o B respecto a la molécula de insulina original.

Se ha descubierto que, al sustituir dos o más aminoácidos hidrófobos en dos o más sitios de proteasas o cerca de ellos en una insulina con aminoácidos hidrófilos, se obtiene un análogo de insulina que es proteolíticamente estable en comparación con la insulina original.

30 A continuación se presenta una lista no limitante de realizaciones, la cual se describe adicionalmente en otras partes de la presente:

Realización 1. Un análogo de insulina donde al menos dos aminoácidos hidrófobos se han sustituido con aminoácidos hidrófilos respecto a la insulina original, donde las sustituciones se encuentran en dos o más sitios de escisión de proteasas de la insulina original o cerca de ellos y donde tal análogo de insulina comprende además opcionalmente una o más mutaciones adicionales.

35 Realización 2. Un análogo de insulina de acuerdo con la realización 1, donde se obtiene un incremento de la solubilidad respecto a la insulina original.

Realización 3. Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-2, donde la cadena A del análogo de insulina comprende al menos una mutación y la cadena B del análogo de insulina comprende al menos una mutación respecto a la insulina original.

40 Realización 4. Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-3, donde el análogo de insulina comprende además al menos una sustitución de un aminoácido en un sitio de proteasas de un primer análogo de insulina modificado, donde dicha sustitución de un aminoácido, al menos una, es tal que al menos un aminoácido hidrófobo se ha sustituido con al menos un aminoácido hidrófilo.

Realización 5. Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-4, donde

45 el aminoácido en la posición A12 es Glu o Asp y/o el aminoácido en la posición A13 es His, Asn, Glu o Asp y/o el aminoácido en la posición A14 es Asn, Gln, Glu, Arg, Asp, Gly o His y/o el aminoácido en la posición A15 es Glu o Asp; y

50 el aminoácido en la posición B24 es His y/o el aminoácido en la posición B25 es His y/o el aminoácido en la posición B26 es His, Gly, Asp o Thr y/o el aminoácido en la posición B27 es His, Glu, Lys, Gly o Arg y/o el aminoácido en la posición B28 es His, Gly o Asp; y

el cual comprende además opcionalmente una o más mutaciones adicionales.

Realización 6. Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-5, donde el aminoácido en la posición A14 es Glu, Asp o His, el aminoácido en la posición B25 es His y el cual comprende además opcionalmente una o más mutaciones adicionales.

- 5 Realización 7. Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-6, donde el aminoácido en la posición A14 es Glu, Asp o His, el aminoácido en la posición B25 es His y el aminoácido en la posición B30 se ha eliminado.

Realización 8. Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-6, donde el aminoácido en la posición A14 es Glu, Asp o His y el aminoácido en la posición B25 es His.

- 10 Realización 9. Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-6, donde la o las mutaciones adicionales se seleccionan de un grupo constituido por: A(-3)Gly, A(-2)Gly, A(-1)Pro, A(0)Pro, A8His, A18Gln, A18Gln, A21Gln, A21Gly, B(-3)Gly, B(-2)Gly, B(-1)Pro, B(0)Pro, B1Glu, B1Gln, ro, B1Glu, B1Gln, B3Gln, B10Pro, B14Thr, B16Glu, B17Ser, B26Asp, DesB26, DesB27, B27Glu, B27Glu, B28Asp, desB28, desB29, desB30, B31Leu, B32Glu.

- 15 Realización 10. Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-6 o 9, donde la mutación adicional es desB30.

Realización 11. Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-10, donde A14 es Glu.

Realización 12. Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-11, el cual presenta una mayor estabilidad frente a una o más enzimas de tipo proteasa respecto a la proteína original.

- 20 Realización 13. Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-12, el cual presenta una mayor estabilidad frente a dos o más enzimas de tipo proteasa respecto a la proteína original.

Realización 14. Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-13, donde la insulina original se selecciona de un grupo constituido por:

insulina humana;

- 25 un análogo de insulina de la insulina humana donde el residuo aminoacídico en la posición B28 es Pro, Asp, Lys, Leu, Val o Ala y el residuo aminoacídico en la posición B29 es Lys o Pro y opcionalmente el residuo aminoacídico en la posición B30 se ha eliminado;

insulina humana des(B26-B30), insulina humana des(B27-B30), insulina humana des(B28-B30), insulina humana des(B29-B30), insulina humana des(B27) o insulina humana des(B30);

- 30 un análogo de insulina de la insulina humana donde el residuo aminoacídico en la posición B3 es Lys y el residuo aminoacídico en la posición B29 es Glu o Asp;

un análogo de insulina de la insulina humana donde el residuo aminoacídico en la posición A21 es Gly y donde el análogo de insulina se ha extendido adicionalmente en el extremo C con dos residuos de Arg;

- 35 un derivado de insulina donde el residuo aminoacídico en la posición B30 se ha sustituido con un éster metílico de la treonina; y

un derivado de insulina donde se ha unido una cadena de tetradecanoílo a la posición Nε de la lisina en la posición B29 de insulina humana des(B30).

Realización 15. Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-6, 9 u 11-14, donde la o las mutaciones adicionales se seleccionan para mejorar la estabilidad química de la insulina.

- 40 Realización 16. Un análogo de insulina de acuerdo con la realización 15, donde la o las mutaciones adicionales se seleccionan de un grupo constituido por: A18Gln, A21Gln, A21GLy y B3Gln.

Realización 17. Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-4 o 12-14 que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena A de fórmula 1:

$Xaa_{A(-2)}-Xaa_{A(-1)}-Xaa_{A(0)}-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Xaa_{A(8)}-Ser-Ile-Cys-Xaa_{A(12)}$

$Xaa_{A(13)}-Xaa_{A(14)}-Xaa_{A(15)}-Leu-Glu-Xaa_{A(18)}-Tyr-Cys-Xaa_{A(21)}-Xaa_{A(22)}$

Fórmula (1) (SEQ ID No:1)

y una secuencia de aminoácidos de la cadena B de fórmula 2:

Xaa_{B(-2)}-Xaa_{B(-1)}-Xaa_{B0}-Xaa_{B1}-Xaa_{B2}-Xaa_{B3}-Xaa_{B4}-His-Leu-Cys-Gly-Ser-Xaa_{B10}-Leu-
Val-Glu-Ala-Leu-Xaa_{B16}-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Xaa_{B24}-Xaa_{B25}-Xaa_{B26}-Xaa_{B27}-
Xaa_{B28}-Xaa_{B29}-Xaa_{B30}-Xaa_{B31}-Xaa_{B32}

Fórmula (2) (SEQ ID No:2)

donde

- Xaa_{A(-2)} está ausente o es Gly;
 - 5 Xaa_{A(-1)} está ausente o es Pro;
 - Xaa_{A0} está ausente o es Pro;
 - Xaa_{A8} se selecciona independientemente entre Thr e His;
 - Xaa_{A12} se selecciona independientemente entre Ser, Asp y Glu;
 - Xaa_{A13} se selecciona independientemente entre Leu, Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser y Glu;
 - 10 Xaa_{A14} se selecciona independientemente entre Tyr, Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser y Glu;
 - Xaa_{A15} se selecciona independientemente entre Gln, Asp y Glu;
 - Xaa_{A18} se selecciona independientemente entre Asn, Lys y Gln;
 - Xaa_{A21} se selecciona independientemente entre Asn y Gln;
 - Xaa_{A22} está ausente o es Lys;
 - 15 Xaa_{B(-2)} está ausente o es Gly;
 - Xaa_{B(-1)} está ausente o es Pro;
 - Xaa_{B0} está ausente o es Pro;
 - Xaa_{S1} está ausente o se selecciona independientemente entre Phe y Glu;
 - Xaa_{B2} está ausente o es Val;
 - 20 Xaa_{B3} está ausente o se selecciona independientemente entre Asn y Gln;
 - Xaa_{B4} se selecciona independientemente entre Gln y Glu;
 - Xaa_{B10} se selecciona independientemente entre His, Asp, Pro y Glu;
 - Xaa_{B16} se selecciona independientemente entre Tyr, Asp, Gln, His, Arg y Glu;
 - Xaa_{B24} se selecciona independientemente entre Phe e His;
 - 25 Xaa_{B25} se selecciona independientemente entre Phe e His;
 - Xaa_{B26} está ausente o se selecciona independientemente entre Tyr, His, Thr, Gly y Asp;
 - Xaa_{B27} está ausente o se selecciona independientemente entre Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser y Glu;
 - Xaa_{B28} está ausente o se selecciona independientemente entre Pro, His, Gly y Asp;
 - Xaa_{B29} está ausente o se selecciona independientemente entre Lys y Gln;
 - 30 Xaa_{B30} está ausente o es Thr;
 - Xaa_{B31} está ausente o es Leu;
 - Xaa_{B32} está ausente o es Glu;
- el extremo C se puede derivatizar opcionalmente como una amida;

donde la secuencia de aminoácidos de la cadena A y la secuencia de aminoácidos de la cadena B están conectadas mediante puentes de disulfuro entre las cisteínas en la posición 7 de la cadena A y la cisteína en la posición 7 de la cadena B, y entre la cisteína en la posición 20 de la cadena A y la cisteína en la posición 19 de la cadena B y donde las cisteínas en la posición 6 y 11 de la cadena A están conectadas mediante un puente de disulfuro;

- 5 donde opcionalmente la secuencia de aminoácidos del extremo N de la cadena A está conectada a la secuencia de aminoácidos del extremo C de la cadena B mediante una secuencia de aminoácidos que comprende 3-7 aminoácidos para formar una molécula de insulina monocatenaria, donde opcionalmente el extremo N de la cadena B se extiende con 1-10 aminoácidos;

donde si Xaa_{A8} es Thr y Xaa_{A12} es Ser y Xaa_{A13} es Leu y Xaa_{A14} es Tyr, entonces Xaa_{A15} es Glu o Asp; y

- 10 donde si Xaa_{B24} es Phe y Xaa_{B25} es Phe y Xaa_{B26} es Tyr y Xaa_{B27} es Thr y Xaa_{B28} es Pro, entonces Xaa_{B29} es Gln.

Realización 18. Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-4 o 12-14 que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena A de fórmula 3:

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Xaa_{A8}-Ser-Ile-Cys-Xaa_{A12}-Xaa_{A13}-Xaa_{A14}-Xaa_{A15}-Leu-
Glu-Xaa_{A18}-Tyr-Cys-Xaa_{A21}

Fórmula (3) (SEQ ID No:3)

y una secuencia de aminoácidos de la cadena B de fórmula 4:

Xaa_{B1}-Val-Xaa_{B3}-Xaa_{B4}-His-Leu-Cys-Gly-Ser-Xaa_{B10}-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Xaa_{B16}-
Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Xaa_{B24}-His-Xaa_{B26}-Xaa_{B27}-Xaa_{B28}-Xaa_{B29}-Xaa_{B30}

- 15 Fórmula (4) (SEQ ID No:4)

donde

Xaa_{A8} se selecciona independientemente entre Thr e His;

Xaa_{A12} se selecciona independientemente entre Ser, Asp y Glu;

Xaa_{A13} se selecciona independientemente entre Leu, Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser y Glu;

- 20 Xaa_{A14} se selecciona independientemente entre Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser y Glu;

Xaa_{A15} se selecciona independientemente entre Gln, Asp y Glu;

Xaa_{A18} se selecciona independientemente entre Asn, Lys y Gln;

Xaa_{A21} se selecciona independientemente entre Asn y Gln;

Xaa_{B1} se selecciona independientemente entre Phe y Glu;

- 25 Xaa_{B3} se selecciona independientemente entre Asn y Gln;

Xaa_{B4} se selecciona independientemente entre Gln y Glu;

Xaa_{B10} se selecciona independientemente entre His, Asp, Pro y Glu;

Xaa_{B16} se selecciona independientemente entre Tyr, Asp, Gln, His, Arg y Glu;

Xaa_{B24} se selecciona independientemente entre Phe e His;

- 30 Xaa_{B26} está ausente o se selecciona independientemente entre Tyr, His, Thr, Gly y Asp;

Xaa_{B27} está ausente o se selecciona independientemente entre Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser y Glu;

Xaa_{B28} está ausente o se selecciona independientemente entre Pro, His, Gly y Asp;

Xaa_{B29} está ausente o se selecciona independientemente entre Lys y Gln;

Xaa_{B30} está ausente o es Thr;

- 35 el extremo C se puede derivatizar opcionalmente como una amida;

donde la secuencia de aminoácidos de la cadena A y la secuencia de aminoácidos de la cadena B están conectadas mediante puentes de disulfuro entre las cisteínas en la posición 7 de la cadena A y la cisteína en la posición 7 de la cadena B, y entre la cisteína en la posición 20 de la cadena A y la cisteína en la posición 19 de la cadena B y donde las cisteínas en la posición 6 y 11 de la cadena A están conectadas mediante un puente de disulfuro.

- 5 Realización 19. Un análogo de insulina de acuerdo con la realización 18, donde
- Xaa_{A8} se selecciona independientemente entre Thr e His;
 - Xaa_{A12} se selecciona independientemente entre Ser y Glu;
 - Xaa_{A13} se selecciona independientemente entre Leu, Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser y Glu;
 - Xaa_{A14} se selecciona independientemente entre Asp, His y Glu;
- 10 Xaa_{A15} se selecciona independientemente entre Gln y Glu;
- Xaa_{A18} se selecciona independientemente entre Asn, Lys y Gln;
 - Xaa_{A21} se selecciona independientemente entre Asn y Gln;
 - Xaa_{B1} se selecciona independientemente entre Phe y Glu;
 - Xaa_{B3} se selecciona independientemente entre Asn y Gln;
- 15 Xaa_{B4} se selecciona independientemente entre Gln y Glu;
- Xaa_{B10} se selecciona independientemente entre His, Asp, Pro y Glu;
 - Xaa_{B16} se selecciona independientemente entre Tyr, Asp, Gln, His, Arg y Glu;
 - Xaa_{B24} se selecciona independientemente entre Phe e His;
 - Xaa_{B26} se selecciona independientemente entre Tyr, Thr, Gly y Asp;
- 20 Xaa_{B27} se selecciona independientemente entre Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg y Glu;
- Xaa_{B28} se selecciona independientemente entre Pro, Gly y Asp;
 - Xaa_{B29} se selecciona independientemente entre Lys y Gln;
 - Xaa_{B30} está ausente o es Thr;
- el extremo C se puede derivatizar opcionalmente como una amida;
- 25 donde la secuencia de aminoácidos de la cadena A y la secuencia de aminoácidos de la cadena B están conectadas mediante puentes de disulfuro entre las cisteínas en la posición 7 de la cadena A y la cisteína en la posición 7 de la cadena B, y entre la cisteína en la posición 20 de la cadena A y la cisteína en la posición 19 de la cadena B y donde las cisteínas en la posición 6 y 11 de la cadena A están conectadas mediante un puente de disulfuro.
- 30 Realización 20. Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-16, donde el extremo C de la cadena B está conectado al extremo N de la cadena A con 3-15 aminoácidos o 3-7 aminoácidos, para formar una molécula de insulina monocatenaria, donde opcionalmente el extremo N de la cadena B se extiende con 1-10 aminoácidos.
- Realización 21. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad biológicamente activa del análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-20 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 35 Realización 22. Una composición farmacéutica que comprende dos o más análogos de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-20, donde cada análogo se define por tener al menos una mutación, la cual está ausente en al menos una de las demás variantes.
- Realización 23. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 11-20, que comprende además un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente un adyuvante.
- 40 Realización 24. Un método para el tratamiento de la diabetes mellitus en un sujeto que comprende administrar a un sujeto un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-20 o una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 21-23.
- Realización 25. Un método para reducir el nivel de glucosa en sangre en mamíferos mediante la administración a un paciente que necesite dicho tratamiento de una dosis terapéuticamente activa de un análogo de insulina de acuerdo

con cualquiera de las realizaciones 1-20 o una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 21-23.

Realización 26. El método de acuerdo con la realización 24 o 25 que es una administración oral.

Realización 27. El método de acuerdo con la realización 24 o 25 que es una administración parenteral.

5 Realización 28. El método de acuerdo con la realización 24 o 25 que es una administración intratraqueal.

Realización 29. Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-20 para su uso como un producto farmacéutico en el tratamiento o la prevención de la hiperglucemia, diabetes de tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes de tipo 1, obesidad, síndrome X y dislipidemia.

10 Realización 30. Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-20 para su uso como un producto farmacéutico con el fin de retrasar o prevenir la evolución de la enfermedad en la diabetes de tipo 2.

Realización 31. Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-20 para su uso como un producto farmacéutico con el fin de reducir el consumo de alimentos, reducir la apoptosis de las células β , incrementar la función de las células β y la masa de las células β , y/o restablecer la sensibilidad a la glucosa en las células β .

15 Realización 32. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-20, un derivado de esta, una secuencia parcial de esta, una secuencia degenerada de esta o una secuencia que se hibrida con esta en condiciones rigurosas.

20 Realización 33. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un precursor de un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-20, un derivado de esta, una secuencia parcial de esta, una secuencia degenerada de esta o una secuencia que se hibrida con esta en condiciones rigurosas.

Realización 34. Un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la realización 32 o 33.

Realización 35. Una célula huésped que comprende un vector de expresión de acuerdo con la realización 34.

25 Realización 36. Un método para producir un análogo de insulina que comprende el paso de cultivar la célula huésped de la realización 35.

Realización 37. Un método para preparar un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-20, donde la sustitución de aminoácidos se lleva a cabo mediante mutagénesis dirigida al sitio.

30 Realización 38. Un proceso para preparar una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 21-23, que comprende mezclar un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-20 con sustancias y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Realización 39. Una composición farmacéutica que se puede obtener mediante el proceso de acuerdo con la realización 38.

35 La insulina es una hormona polipeptídica secretada por las células β del páncreas. La insulina está constituida por dos cadenas polipeptídicas, A y B, las cuales están unidas mediante dos puentes de disulfuro intercatenarios. Además, la cadena A se caracteriza por contener un puente de disulfuro intracatenario.

La hormona se sintetiza como un precursor monocatenario, la proinsulina (preproinsulina), el cual está constituido por un prepéptido de 24 aminoácidos y a continuación proinsulina, que contiene 86 aminoácidos en la siguiente configuración: prepéptido-B-Arg Arg-C-Lys Arg-A, donde C es un péptido conector de 31 aminoácidos. Arg-Arg y Lys-Arg son sitios de escisión para escindir el péptido conector de las cadenas A y B.

40 Los análogos de insulina de acuerdo con la invención pueden comprender mutaciones adicionales. Una mutación en una molécula de insulina puede adoptar la forma de una sustitución, una delección o una adición de un residuo aminoacídico en la cadena A y/o B de la molécula de insulina de origen natural.

45 El término "desB30" o "B(1-29)" se refiere a una cadena B de insulina natural que carece del residuo aminoacídico B30 y el término "A(1-21)" se refiere a la cadena A de insulina natural. El minipéptido C y su secuencia de aminoácidos se indican con el código de aminoácidos de tres letras.

En la presente, términos como A1, A2, A3, etc. indican la posición 1, 2 y 3, respectivamente, en la cadena A de insulina (contando desde el extremo N). De forma similar, términos como B1, B2, B3, etc. indican la posición 1, 2 y 3, respectivamente, en la cadena B de insulina (contando desde el extremo N). Utilizando los códigos de una letra para los aminoácidos, términos como A21A, A21G y A21Q designan que el aminoácido en la posición A21 es A, G y Q,

respectivamente. Utilizando los códigos de tres letras para los aminoácidos, las expresiones correspondientes son A21Ala, A21Gly y A21Gln, respectivamente.

5 En la presente, los términos A(0) o B(0) indican las posiciones en el extremo N que se encuentran cercanas a A1 o B1, respectivamente. Los términos A(-1) o B(-1) indican las posiciones de los primeros aminoácidos en el extremo N respecto a A(0) o B(0), respectivamente. De este modo, A(-2) y B(-2) indican las posiciones en el extremo N respecto a A(-1) y B(-1), respectivamente, A(-3) y B(-3) indican las posiciones en el extremo N respecto a A(-2) y B(-2), respectivamente, etc.

La expresión "péptido conector" engloba una cadena peptídica que puede conectar el residuo aminoacídico del extremo C de la cadena B con el residuo aminoacídico del extremo N de la cadena A en la insulina.

10 El término "propéptido" se refiere a una secuencia polipeptídica cuya función consiste en permitir que el polipéptido expresado se dirija desde el retículo endoplasmático hacia el aparato de Golgi y posteriormente hacia una vesícula secretora para su secreción en el medio de cultivo (es decir, la exportación del polipéptido a través de la pared celular o al menos a través de la membrana celular hacia el espacio periplásmico de la célula de levadura). El propéptido puede ser el propéptido del factor α de la levadura, remítase a US 4.546.082 y 4.870.008. Como alternativa, el propéptido puede ser un propéptido sintético, lo cual quiere decir que es un propéptido que no se encuentra en la naturaleza. Algunos propéptidos sintéticos adecuados son los que se describen en US 5.395.922, 5.795.746, 5.162.498 y WO 98/32867. El propéptido contendrá preferentemente un sitio de procesamiento de endopeptidasas en el extremo C, tal como una secuencia de Lys-Arg o cualquier análogo funcional de esta.

15

El término "diabetes" incluye diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 y otros estados que provocan hiperglucemia.

20 El término "tratamiento" de una enfermedad incluye el tratamiento, la prevención o el alivio de la enfermedad.

En una realización de la invención, el análogo de insulina es particularmente adecuado para la administración oral.

En la presente, se debe sobreentender que los aminoácidos hidrófobos son los aminoácidos de origen natural triptófano (Trp, W), fenilalanina (Phe, F), valina (Val, V), isoleucina (Ile, I), leucina (Leu, L) y tirosina (Tyr, Y) (con la abreviación de tres letras y de una letra entre paréntesis).

25 En la presente, se debe sobreentender que los aminoácidos hidrófilos son los aminoácidos naturales que no son aminoácidos hidrófobos de acuerdo con la definición anterior. En una realización, los aminoácidos hidrófilos de acuerdo con la invención se seleccionan del grupo constituido por: ácido glutámico (Glu, E), ácido aspártico (Asp, D), histidina (His, H), glutamina (Gln, Q), asparagina (Asn, N), serina (Ser, S), treonina (Thr, T), prolina (Pro, P), glicina (Gly, G), lisina (Lys, K) y arginina (Arg, R). En una realización adicional, los aminoácidos hidrófilos de acuerdo con la invención se seleccionan del grupo constituido por: ácido glutámico (Glu, E), ácido aspártico (Asp, D), histidina (His, H), glutamina (Gln, Q), asparagina (Asn, N), lisina (Lys, K) y arginina (Arg, R).

30

En la presente se debe sobreentender que "una insulina" de acuerdo con la invención se refiere a insulina humana, un análogo de insulina o un derivado de insulina.

35 Se pretende que la expresión "insulina original", tal como se utiliza en la presente, se refiera a la insulina antes de que se le hayan aplicado cualesquiera mutaciones de acuerdo con la invención. Algunos ejemplos no limitantes de insulinas originales son, p. ej., una insulina de origen natural tal como la insulina humana o insulina porcina, un análogo de insulina humana o un derivado de insulina humana o un análogo de insulina tal como insulina humana o un análogo de insulina que se haya PEGilado o acilado.

En una realización, una insulina original de acuerdo con la invención se selecciona del grupo constituido por:

40 insulina humana,

un análogo de insulina de la insulina humana donde el residuo aminoacídico en la posición B28 es Pro, Asp, Lys, Leu, Val o Ala y el residuo aminoacídico en la posición B29 es Lys o Pro y opcionalmente el residuo aminoacídico en la posición B30 se ha eliminado,

45 un análogo de insulina que es insulina humana des(B28-B30), insulina humana des(B27) o insulina humana des(B30),

un análogo de insulina de la insulina humana donde el residuo aminoacídico en la posición B3 es Lys y el residuo aminoacídico en la posición B29 es Glu o Asp,

un análogo de insulina de la insulina humana donde el residuo aminoacídico en la posición A21 es Gly y donde el análogo de insulina se ha extendido adicionalmente en el extremo C con dos residuos de arginina,

50 un derivado de insulina donde el residuo aminoacídico en la posición B30 se ha sustituido con un éster metílico de la treonina, y

un derivado de insulina donde se ha unido una cadena de tetradecanoílo a la posición Nε de la lisina en la posición B29 de insulina humana des(B30).

En una realización, una insulina original de acuerdo con la invención se selecciona del grupo constituido por:

insulina humana;

5 insulina humana desB30;

insulina humana AspB28;

insulina humana AspB28,desB30;

insulina humana LysB3,GluB29;

insulina humana LysB28,ProB29;

10 insulina humana GlyA21, ArgB31, ArgB32; e

insulina humana desB30, ArgB31, ArgB32.

La expresión "análogo de insulina", tal como se utiliza en la presente, se refiere a una insulina modificada, donde se han sustituido uno o más residuos aminoacídicos de la insulina por otros residuos aminoacídicos y/o donde se han eliminado uno o más residuos aminoacídicos de la insulina y/o donde se han añadido uno o más residuos aminoacídicos a la insulina.

En una realización, un análogo de insulina comprende menos de 8 modificaciones (sustituciones, deleciones, adiciones) respecto a la insulina original. En una realización, un análogo de insulina comprende menos de 7 modificaciones (sustituciones, deleciones, adiciones) respecto a la insulina original. En una realización, un análogo de insulina comprende menos de 6 modificaciones (sustituciones, deleciones, adiciones) respecto a la insulina original. En otra realización, un análogo de insulina comprende menos de 5 modificaciones (sustituciones, deleciones, adiciones) respecto a la insulina original. En otra realización, un análogo de insulina comprende menos de 4 modificaciones (sustituciones, deleciones, adiciones) respecto a la insulina original. En otra realización, un análogo de insulina comprende menos de 3 modificaciones (sustituciones, deleciones, adiciones) respecto a la insulina original. En otra realización, un análogo de insulina comprende menos de 2 modificaciones (sustituciones, deleciones, adiciones) respecto a la insulina original.

La expresión "derivado de insulina", tal como se utiliza en la presente, se refiere a una insulina original modificada químicamente o un análogo de esta, donde al menos un sustituyente no está presente en la proteína original o un análogo de esta, es decir, una proteína original que se ha modificado covalentemente. Las modificaciones típicas son amidas, carbohidratos, grupos alquilo, grupos acilo, ésteres, PEGilaciones y similares. Algunos ejemplos de derivados de insulina humana de acuerdo con la invención son insulina humana éster metílico de la treonina-B30, insulina humana Nε-B29-tetradecanoílo des(B30), insulina humana Nε-B29-tetradecanoílo GlnB3 des(B30), insulina humana Nε-B29-tridecanoílo, insulina humana Nε-B29-tetradecanoílo, insulina humana Nε-B29-decanoílo e insulina humana Nε-B29-dodecanoílo.

La expresión "insulina humana", tal como se utiliza en la presente, se refiere a la hormona humana cuya estructura y propiedades son muy conocidas. La insulina humana contiene dos cadenas polipeptídicas que están conectadas mediante puentes de disulfuro entre los residuos de cisteína, a saber la cadena A y la cadena B. La cadena A es un péptido de 21 aminoácidos y la cadena B es un péptido de 30 aminoácidos, estando las dos cadenas conectadas mediante tres puentes de disulfuro: uno entre las cisteínas en la posición 6 y 11 de la cadena A, el segundo entre la cisteína en la posición 7 de la cadena A y la cisteína en la posición 7 de la cadena B, y el tercero entre la cisteína en la posición 20 de la cadena A y la cisteína en la posición 19 de la cadena B.

Las mutaciones en la molécula de insulina se denominan indicando la cadena (A o B), la posición y el código de tres letras para el aminoácido que sustituye al aminoácido nativo. El término "desB30" se refiere a una cadena B de insulina natural o un análogo de esta que carece del aminoácido B30. De este modo, la insulina humana A21Gly, B28Asp, desB30 es un análogo de la insulina humana en el que la posición 21 en la cadena A se ha mutado para obtener glicina, la posición 28 en la cadena B se ha mutado para obtener ácido aspártico y la posición 30 en la cadena B se ha eliminado.

Una "proteasa" o una "enzima de tipo proteasa" es una enzima digestiva que degrada proteínas y péptidos y la cual se encuentra en varios tejidos del cuerpo humano tales como, p. ej., el estómago (pepsina), el lumen intestinal (quimotripsina, tripsina, elastasa, carboxipeptidasas, etc.) o superficies mucosas del aparato GI (aminopeptidasas, carboxipeptidasas, enteropeptidasas, dipeptidilpeptidasas, endopeptidasas, etc.), el hígado (enzima degradadora de insulina, catepsina D, etc.) y en otros tejidos.

En la presente, se debe sobreentender que un análogo de insulina proteolíticamente estable es un análogo de insulina que experimenta una degradación más lenta por parte de una o más proteasas en comparación con la

insulina humana. En una realización, un análogo de insulina proteolíticamente estable de acuerdo con la invención experimenta una degradación más lenta por parte de una o más proteasas en comparación con la insulina original. En una realización adicional de la invención, un análogo de insulina de acuerdo con la invención está estabilizado frente a la degradación por parte de una o más enzimas seleccionadas del grupo constituido por: pepsina (tal como, p. ej., las isoformas pepsina A, pepsina B, pepsina C y/o pepsina F), quimotripsina (tal como, p. ej., las isoformas quimotripsina A, quimotripsina B y/o quimotripsina C), tripsina, enzima degradadora de insulina (IDE), elastasa (tal como, p. ej., las isoformas elastasa pancreática I y/o II), carboxipeptidasa (p. ej., las isoformas carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa A2 y/o carboxipeptidasa B), aminopeptidasa, catepsina D y otras enzimas presentes en extractos intestinales derivados de rata, cerdo o de ser humano.

En una realización, un análogo de insulina de acuerdo con la invención está estabilizado frente a la degradación por parte de una o más enzimas seleccionadas del grupo constituido por: quimotripsina, tripsina, enzima degradadora de insulina (IDE), elastasa, carboxipeptidasas, aminopeptidasas y catepsina D. En una realización adicional, un análogo de insulina de acuerdo con la invención está estabilizado frente a la degradación por parte de una o más enzimas seleccionadas del grupo constituido por: quimotripsina, carboxipeptidasas e IDE. En una realización adicional más, un análogo de insulina de acuerdo con la invención está estabilizado frente a la degradación por parte de una o más enzimas seleccionadas entre: quimotripsina y carboxipeptidasas.

Se puede determinar $T_{1/2}$ según se describe en los Ejemplos como una medida de la estabilidad proteolítica de un análogo de insulina de acuerdo con la invención frente a enzimas tipo proteasa tales como quimotripsina, pepsina y/o carboxipeptidasa A. En una realización de la invención $T_{1/2}$ se incrementa al menos 2 veces respecto a la insulina original. En una realización adicional más, $T_{1/2}$ se incrementa al menos 3 veces respecto a la insulina original. En una realización adicional más, $T_{1/2}$ se incrementa al menos 4 veces respecto a la insulina original. En una realización adicional más, $T_{1/2}$ se incrementa al menos 5 veces respecto a la insulina original. En una realización adicional más, $T_{1/2}$ se incrementa al menos 10 veces respecto a la insulina original.

Se debe sobreentender que los sitios de escisión de proteasas (también denominados en la presente sitios de proteasas) son residuos aminoacídicos que son reconocidos por proteasas y/o residuos aminoacídicos cuyo enlace peptídico es escindido por proteasas. Los sitios de escisión de proteasas se pueden determinar estableciendo los "puntos clave" de escisión mediante análisis de HPLC, MS o LC-MS y/o mediante predicción basada en la especificidad enzimática de la enzima de tipo proteasa para la cual se ha de determinar el sitio de escisión de proteasas. Un experto en la técnica sabrá cómo determinar los sitios de escisión de proteasas, por ejemplo, basándose en las especificidades enzimáticas como, por ejemplo, se describe en *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 2.^a ed., editores Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F., Elsevier Academic Press 2004. Por ejemplo, se predice que la quimotripsina escindirá enlaces peptídicos en el extremo C respecto a residuos aromáticos (Trp, Tyr, Phe o Leu), que no vayan seguidos de Pro. De forma similar, se predice que la tripsina escindirá enlaces peptídicos en el extremo C respecto a residuos básicos de Lys o Arg que no vayan seguidos de Pro, se predice que la elastasa escindirá residuos en el extremo C respecto a Ala, Val, Gly o Ser y que la carboxipeptidasa A eliminará cualquier aminoácido en el extremo C que no sea Arg, Lys o Pro. Se predice que la enzima degradadora de insulina (IDE) escindirá las siguientes posiciones de la insulina humana: B9-10, B10-11, B13-14, B14-15, B24-25, B25-26, A13-14 y A14-15.

En la presente, la expresión "sustituir (un) aminoácido en un sitio de escisión de proteasas o cerca de él" se utiliza para indicar la sustitución de un aminoácido en una posición de la insulina original que se ha determinado que es un sitio de escisión de proteasas o cerca de ella. En una realización, se sustituyen dos o más aminoácidos hidrófobos en dos o más sitios de proteasas o cerca de ellos en una insulina, donde dichos aminoácidos hidrófobos se sustituyen con aminoácidos hidrófilos. En una realización adicional, dos o más aminoácidos hidrófobos en dos o más sitios de proteasas en una insulina se sustituyen con aminoácidos hidrófilos. En otra realización adicional, dos o más aminoácidos hidrófobos situados a continuación de dos o más sitios de proteasas en una insulina se sustituyen con aminoácidos hidrófilos. En una realización adicional más, dos o más aminoácidos hidrófobos situados dos aminoácidos más allá de dos o más sitios de proteasas en una insulina se sustituyen con aminoácidos hidrófilos. En otra realización adicional, dos o más aminoácidos hidrófobos situados tres aminoácidos más allá de dos o más sitios de proteasas en una insulina se sustituyen con aminoácidos hidrófilos. En una realización adicional más, dos o más aminoácidos hidrófobos situados hasta cuatro aminoácidos más allá de dos o más sitios de proteasas en una insulina se sustituyen con aminoácidos hidrófilos. En otra realización adicional, dos o más aminoácidos hidrófobos situados uno, dos o tres aminoácidos más allá de o en dos o más sitios de proteasas en una insulina se sustituyen con aminoácidos hidrófilos. En una realización adicional más, dos o más aminoácidos hidrófobos situados uno o dos aminoácidos más allá de o en dos o más sitios de proteasas en una insulina se sustituyen con aminoácidos hidrófilos. En otra realización adicional, dos o más aminoácidos hidrófobos situados a continuación de o en dos o más sitios de proteasas en una insulina se sustituyen con aminoácidos hidrófilos.

Un análogo de insulina de acuerdo con la invención puede tener una carga neta diferente a la carga neta de la insulina original. En una realización, la carga neta de un análogo de insulina de acuerdo con la invención es más positiva que la carga neta de la insulina original. En una realización, la carga neta de un análogo de insulina de acuerdo con la invención es más negativa que la carga neta de la insulina original. En una realización, la carga neta positiva media de un análogo de insulina de acuerdo con la invención está comprendida entre 0.5 y 5 cuando se mide en una solución acuosa. En una realización, la carga neta positiva media de un análogo de insulina de acuerdo

con la invención está comprendida entre 1 y 5. En una realización, la carga neta positiva media de un análogo de insulina de acuerdo con la invención está comprendida entre 1 y 4. En una realización, la carga neta positiva media de un análogo de insulina de acuerdo con la invención está comprendida entre 1 y 3. En una realización, la carga neta positiva media de un análogo de insulina de acuerdo con la invención está comprendida entre 2 y 3. En una realización, la carga neta negativa media de un análogo de insulina de acuerdo con la invención está comprendida entre -0.5 y -5 cuando se mide en una solución acuosa. En una realización, la carga neta negativa media de un análogo de insulina de acuerdo con la invención está comprendida entre -1 y -5. En una realización, la carga neta negativa media de un análogo de insulina de acuerdo con la invención está comprendida entre -1 y -4. En una realización, la carga neta negativa media de un análogo de insulina de acuerdo con la invención está comprendida entre -1 y -3. En una realización, la carga neta negativa media de un análogo de insulina de acuerdo con la invención está comprendida entre -2 y -3.

En una realización, un análogo de insulina de acuerdo con la invención puede presentar un incremento de la solubilidad respecto a la insulina humana. En una realización adicional, un análogo de insulina de acuerdo con la invención presenta un incremento de la solubilidad respecto a la insulina humana a un pH de 3-9. En otra realización adicional, un análogo de insulina de acuerdo con la invención presenta un incremento de la solubilidad respecto a la insulina humana a un pH de 4-8.5. En una realización adicional más, un análogo de insulina de acuerdo con la invención presenta un incremento de la solubilidad respecto a la insulina humana a un pH de 4-8. En otra realización adicional, un análogo de insulina de acuerdo con la invención presenta un incremento de la solubilidad respecto a la insulina humana a un pH de 4.5-8. En una realización adicional, un análogo de insulina de acuerdo con la invención presenta un incremento de la solubilidad respecto a la insulina humana a un pH de 5-8. En otra realización adicional, un análogo de insulina de acuerdo con la invención presenta un incremento de la solubilidad respecto a la insulina humana a un pH de 5.5-8. En una realización adicional, un análogo de insulina de acuerdo con la invención presenta un incremento de la solubilidad respecto a la insulina humana a un pH de 6-8.

En una realización, un análogo de insulina de acuerdo con la invención presenta un incremento de la solubilidad respecto a la insulina humana a un pH de 2-4.

En una realización, un análogo de insulina de acuerdo con la invención puede presentar un incremento de la solubilidad respecto a la insulina original. En una realización adicional, un análogo de insulina de acuerdo con la invención presenta un incremento de la solubilidad respecto a la insulina original a un pH de 3-9. En otra realización adicional, un análogo de insulina de acuerdo con la invención presenta un incremento de la solubilidad respecto a la insulina original a un pH de 4-8.5. En una realización adicional más, un análogo de insulina de acuerdo con la invención presenta un incremento de la solubilidad respecto a la insulina original a un pH de 4-8. En otra realización adicional, un análogo de insulina de acuerdo con la invención presenta un incremento de la solubilidad respecto a la insulina original a un pH de 4.5-8. En una realización adicional más, un análogo de insulina de acuerdo con la invención presenta un incremento de la solubilidad respecto a la insulina original a un pH de 5-8. En otra realización adicional, un análogo de insulina de acuerdo con la invención presenta un incremento de la solubilidad respecto a la insulina original a un pH de 5.5-8. En una realización adicional, un análogo de insulina de acuerdo con la invención presenta un incremento de la solubilidad respecto a la insulina original a un pH de 6-8.

En una realización, un análogo de insulina de acuerdo con la invención presenta un incremento de la solubilidad respecto a la insulina original a un pH de 2-4.

La expresión "un incremento de la solubilidad a un pH determinado" se refiere a que se disuelve una concentración más elevada de un análogo de insulina de la invención en una solución acuosa o tampón al pH de la solución respecto a la insulina con la que se compara, es decir, insulina humana o la insulina original. Los métodos para determinar si la insulina contenida en una solución se ha disuelto son conocidos en la técnica.

En una realización, la solución se puede someter a una centrifugación durante 20 minutos a 30 000 g y a continuación se puede determinar la concentración de insulina en el sobrenadante mediante RP-HPLC. Si esta concentración es igual, dentro del error experimental, a la concentración de insulina utilizada originalmente para preparar la composición, entonces la insulina es totalmente soluble en la composición de la invención.

En otra realización, la solubilidad de la insulina en una composición de la invención se puede determinar simplemente examinando visualmente el envase en el cual está contenida la composición. La insulina es soluble si la solución se ve transparente cuando se examina visualmente y no se observa materia particulada suspendida ni precipitada en las paredes laterales/el fondo del envase.

Un análogo de insulina de acuerdo con la invención puede presentar un incremento de la potencia y/o biodisponibilidad respecto a la insulina original cuando se compara después de su medición.

Los ensayos estándar para medir la potencia o biodisponibilidad de la insulina son conocidos por el experto en la técnica e incluyen, entre otros, (1) ensayos de radioreceptores de insulina, donde la potencia relativa de una insulina se define como la relación de insulina respecto a análogo de insulina requerida para desplazar un 50% de ¹²⁵I-insulina unida específicamente a receptores de insulina presentes en membranas celulares, p. ej., una fracción de membrana plasmática de hígado de rata; (2) ensayos de lipogénesis, realizados, p. ej., con adipocitos de rata, donde

la potencia relativa de la insulina se define como la relación de insulina respecto a análogo de insulina requerida para conseguir un 50% de la conversión máxima de $[3\text{-}^3\text{H}]$ glucosa en material orgánico extraíble (es decir, lípidos); (3) ensayos de oxidación de glucosa en células grasas aisladas, donde la potencia relativa del análogo de insulina se define como la relación de insulina respecto a análogo de insulina para conseguir un 50% de la conversión máxima de glucosa-1- $[^{14}\text{C}]$ en $[^{14}\text{CO}_2]$; (4) ensayos radioinmunológicos de insulina, que pueden determinar la inmunogenicidad de los análogos de insulina midiendo la eficacia con la que la insulina o un análogo de insulina compite con ^{125}I -insulina para unirse a anticuerpos anti-insulina específicos; y (5) otros ensayos que miden la unión de la insulina o un análogo de insulina a anticuerpos en muestras de plasma sanguíneo animal, tales como ensayos ELISA que poseen anticuerpos contra la insulina específicos.

Los análogos de insulina de acuerdo con la invención se pueden analizar opcionalmente para detectar sitios de proteasas adicionales que se puedan someter a sustituciones adicionales de uno o más aminoácidos hidrófobos con aminoácidos hidrófilos. Un análogo de insulina de acuerdo con la invención puede ser un análogo de insulina que tenga al menos dos ácidos hidrófilos en sitios de proteasas en comparación con la insulina original, la primera insulina modificada, y que tenga además al menos una sustitución de un aminoácido en un sitio de proteasas nuevo de la primera insulina modificada, donde al menos un aminoácido hidrófobo se ha sustituido con al menos un aminoácido hidrófilo.

En una realización, se proporciona un análogo de insulina donde el extremo C de la cadena B está conectado al extremo N de la cadena A con 3-15 aminoácidos. Un análogo de insulina de este tipo se denomina en la presente "insulina monocatenaria" o "SCI" (por sus siglas en inglés) y presenta la estructura general B-C-A donde B es la cadena B de insulina humana o un análogo o derivado de esta, A es la cadena A de insulina humana o un análogo o derivado y C es la cadena de péptido conector de 3-15 residuos aminoacídicos que conecta normalmente B30 con A1. Si la cadena B es una cadena desB30, el péptido conector conectará B29 con A1. La insulina monocatenaria contendrá puentes de disulfuro (tres) situados en las posiciones correctas como en la insulina humana, es decir, entre CysA7 y CysB7 y entre CysA20 y CysB19 y un puente de disulfuro interno entre CysA6 y CysA11. En una realización, se proporciona un análogo de insulina donde el extremo C de la cadena B está conectado al extremo N de la cadena A con 3-7 aminoácidos.

La presente invención también se refiere a secuencias de ácido nucleico que codifican los análogos de insulina reivindicados. En una realización adicional, la presente descripción se refiere a vectores que contienen tales secuencias de ácido nucleico y a células huésped que contienen tales vectores o secuencias de ácido nucleico.

En una parte adicional más de la descripción, la invención se refiere a un proceso para producir un análogo de insulina que comprende (i) cultivar una célula huésped que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un precursor de insulina; (ii) aislar el precursor de insulina del medio de cultivo y (iii) convertir el precursor de insulina en un análogo de insulina de la invención mediante una conversión enzimática *in vitro*.

En una parte adicional más de la descripción, la invención se refiere a un proceso para producir un análogo de insulina que comprende (i) cultivar una célula huésped que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un precursor de insulina; (ii) aislar el precursor de insulina del medio de cultivo y (iii) convertir el precursor de insulina en un análogo de insulina de la invención.

En una realización de la presente descripción, la célula huésped es una célula huésped de levadura y en una realización adicional la célula huésped de levadura se selecciona del género *Saccharomyces*. En una realización adicional, la célula huésped de levadura se selecciona de la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

La expresión "análogo de insulina", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un polipéptido derivado de la estructura primaria de una insulina de origen natural, por ejemplo, de la insulina humana, mediante la delección y/o sustitución de al menos un residuo aminoacídico que se encuentre en la insulina de origen natural y/o mediante la adición de al menos un residuo aminoacídico. Los residuos aminoacídicos añadidos y/o sustituidos pueden ser o bien residuos aminoacídicos que puedan ser codificados o bien otros residuos aminoacídicos de origen natural.

Los análogos de insulina de acuerdo con la presente invención pueden ser insulina humana o un análogo de esta mutado en una o más posiciones. En una realización, los análogos de insulina se diseñan para obtener una estabilidad mejorada frente a proteasas basándose en los sitios de escisión de proteasas identificados.

En una realización, al menos un sitio de escisión sometido a mutación se encuentra en una posición seleccionada del grupo constituido por: B2-3, B6-7, B9-10, B10-11, B13-14, B14-15, B16-17, B22-23, B24-25, B25-26, A13-14, A14-15 y A19-20 de la insulina humana.

En una realización, al menos un sitio de escisión sometido a mutación se encuentra en una posición seleccionada del grupo constituido por: B2-3, B6-7, B16-17, B22-23, B24-25 y/o A19-20 de la insulina humana.

En una realización, al menos un sitio de escisión sometido a mutación se encuentra en la posición B22-23.

En una realización, al menos un sitio de escisión sometido a mutación se encuentra en una posición seleccionada del grupo constituido por: B9-10, B10-11, B13-14, B14-15, B24-25, B25-26, A13-14, A14-15.

En una realización, los sitios de escisión sometidos a mutación se encuentran en dos o más posiciones seleccionadas del grupo constituido por: B2-3, B6-7, B9-10, B10-11, B13-14, B14-15, B16-17, B22-23, B24-25, B25-26, A13-14, A14-15 y A19-20 de la insulina humana.

5 En una realización, los sitios de escisión sometidos a mutación se encuentran en dos o más posiciones seleccionadas del grupo constituido por: B2-3, B6-7, B16-17, B22-23, B24-25 y/o A19-20 de la insulina humana.

En una realización, los sitios de escisión sometidos a mutación se encuentran en dos o más posiciones seleccionadas del grupo constituido por: B9-10, B10-11, B13-14, B14-15, B24-25, B25-26, A13-14, A14-15.

10 En una realización, se obtiene un análogo de insulina de acuerdo con la invención, donde la cadena A del análogo de insulina comprende al menos una mutación y la cadena B del análogo de insulina comprende al menos una mutación respecto a la insulina original, donde la o las mutaciones en la cadena A se encuentran en uno o más sitios de escisión seleccionados del grupo constituido por: A13-14, A14-15 y A19-20, y la o las mutaciones en la cadena B se encuentran en uno o más sitios de escisión seleccionados del grupo constituido por: B2-3, B6-7, B9-10, B10-11, B13-14, B14-15, B16-17, B22-23, B24-25 y B25-26.

15 En una realización, se obtiene un análogo de insulina de acuerdo con la descripción, donde la cadena A del análogo de insulina comprende al menos una mutación y la cadena B del análogo de insulina comprende al menos una mutación respecto a la insulina original, donde la o las mutaciones en la cadena A se encuentran en uno o más sitios de escisión seleccionados del grupo constituido por: A13-14 y A14-15, y la o las mutaciones en la cadena B se encuentran en uno o más sitios de escisión seleccionados del grupo constituido por: B9-10, B10-11, B13-14, B14-15, B24-25 y B25-26.

20 Los residuos aminoacídicos adecuados para la sustitución se seleccionan con el objetivo de eliminar los sitios de escisión. En una realización, los aminoácidos se seleccionan con el objetivo adicional de incrementar la solubilidad. En una realización adicional, el incremento de la solubilidad se produce en el intervalo de pH de 3-9. En otra realización adicional, el incremento de la solubilidad se produce en el intervalo de pH de 4-8. La insulina o el análogo de insulina puede presentar una sustitución en una o más posiciones con cualquier aminoácido natural o se puede
25 añadir cualquier aminoácido natural a la insulina original o al análogo de insulina original. Para su conveniencia, a continuación se indican los nombres de los aminoácidos naturales que pueden ser codificados, con los códigos de tres letras habituales y los códigos de una letra entre paréntesis: glicina (Gly y G), prolina (Pro y P), alanina (Ala y A), valina (Val y V), leucina (Leu y L), isoleucina (Ile e I), metionina (Met y M), cisteína (Cys y C), fenilalanina (Phe y F), tirosina (Tyr y Y), triptófano (Trp y W), histidina (His y H), lisina (Lys y K), arginina (Arg y R), glutamina (Gln y Q),
30 asparagina (Asn y N), ácido glutámico (Glu y E), ácido aspártico (Asp y D), serina (Ser y S) y treonina (Thr y T). Si, debido a errores tipográficos, se producen desviaciones de los códigos utilizados habitualmente, los códigos utilizados habitualmente prevalecerán. Los aminoácidos presentes en las insulinas de esta invención son, preferentemente, aminoácidos que pueden ser codificados por un ácido nucleico. En una realización, la insulina o análogo de insulina presenta una sustitución con Gly, Glu, Asp, His, Gln, Asn, Ser, Thr, Lys, Arg y/o Pro, y/o se
35 añade Gly, Glu, Asp, His, Gln, Asn, Ser, Thr, Lys, Arg y/o Pro a la insulina o análogo de insulina. En una realización, la insulina o análogo de insulina presenta una sustitución con Glu, Asp, His, Gln, Asn, Lys y/o Arg, y/o se añade Glu, Asp, His, Gln, Asn, Lys y/o Arg a la insulina o análogo de insulina.

40 Los análogos de insulina pueden ser aquellos en los que la posición 25 de la cadena B puede estar modificada respecto al residuo de Phe natural con His, junto con una sustitución de la Tyr natural en la posición A14 con Glu, Asp o His. Una o más mutaciones adicionales pueden incluir desB30 y los análogos de insulina se podrían modificar adicionalmente mediante la extensión del extremo N o la extensión del extremo C de la cadena A y/o la cadena B tal como, p. ej., la extensión del extremo N de la cadena A y/o B del análogo de insulina con GGP, GGPP, GP o GPP. Otros ejemplos incluyen, sin carácter limitante, mutaciones adicionales en las que se pueden añadir uno o dos
45 residuos de Pro a las posiciones A0 y/o B0, se puede añadir Leu a la posición B31 y/o se puede añadir Glu a la posición B32. Se pueden seleccionar una o más mutaciones adicionales entre: la posición A8 modificada con His, la posición A21 con Gly, la posición B1 con Glu o Gln, la posición B16 con Glu, la posición B26 con Asp, la posición B27 con Glu y/o la posición B28 con Asp.

En una realización, un análogo de insulina de acuerdo con la invención se selecciona del grupo constituido por:

insulina humana A14E, B25H, desB30;

50 insulina humana A14H, B25H, desB30;

insulina humana A14E, B1 E, B25H, desB30;

insulina humana A14E, B16E, B25H, desB30;

insulina humana A14E, B25H, B28D, desB30;

insulina humana A14E, B25H, B27E, desB30;

ES 2 601 839 T3

- insulina humana A14E, B1 E, B25H, B27E, desB30;
insulina humana A14E, B1 E, B16E, B25H, B27E, desB30;
insulina humana A8H, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A8H, A14E, B25H, B27E, desB30;
- 5 insulina humana A8H, A14E, B1E, B25H, desB30;
insulina humana A8H, A14E, B1E, B25H, B27E, desB30;
insulina humana A8H, A14E, B1E, B16E, B25H, B27E, desB30;
insulina humana A8H, A14E, B16E, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B26D, desB30;
- 10 insulina humana A14E, B1 E, B27E, desB30;
insulina humana A14E, B27E, desB30;
insulina humana A14E, B28D, desB30;
insulina humana A14D, B25H, desB30;
insulina humana A(-1)P, A(0)P, A14E, B25H, desB30;
- 15 insulina humana A14E, B(-1)P, B(0)P, B25H, desB30;
insulina humana A(-1)P, A(0)P, A14E, B(-1)P, B(0)P, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B30T, B31L, B32E;
insulina humana A14E, B25H;
insulina humana A14E, B16H, B25H, desB30;
- 20 insulina humana A14E, B10P, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B10E, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B4E, B25H, desB30;
insulina humana A14H, B16H, B25H, desB30;
insulina humana A14H, B10E, B25H, desB30;
- 25 insulina humana A14E, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30;
insulina humana A13H, A14E, B10E, B25H, desB30;
insulina humana A13H, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A14E, A18Q, B3Q, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B24H, B25H, desB30;
- 30 insulina humana A8H, A14E, B10D, B25H, B26G, desB27, desB28, desB29, desB30;
insulina humana A8H, A14E, B10D, B25H-amida, desB26, desB27, desB28, desB29, desB30;
insulina humana A14E, B25H, desB26, desB27, desB28, desB29, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B26G, desB27, desB28, desB29, desB30;
insulina humana A14E, B25H-amida, desB27, desB28, desB29, desB30;
- 35 insulina humana A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30;
insulina humana A14E, B26G, desB27, desB28, desB29, desB30;
insulina humana A14E, B25H, desB26, desB27, desB28, desB29, desB30;

ES 2 601 839 T3

- insulina humana A14E, A18Q, A21Q, B3Q, B25H, desB30;
insulina humana A14E, A18Q, A21Q, B3Q, B25H, B27E, desB30;
insulina humana A14E, A18Q, B3Q, B25H, desB30;
insulina humana A13H, A14E, B1 E, B25H, desB30;
- 5 insulina humana A13N, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A13N, A14E, B1 E, B25H, desB30;
insulina humana A(-2)G, A(-1)P, A(0)P, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B(-2)G, B(-1)P, B(0)P, B25H, desB30;
insulina humana A(-2)G, A(-1)P, A(0)P, A14E, B(-2)G, B(-1)P, B(0)P, B25H, desB30;
- 10 insulina humana A14E, B27R, B28D, B29K, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27R, B28D, B29K, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B26T, B27R, B28D, B29K, desB30;
insulina humana A14E, A18K, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30;
insulina humana A14E, A22K, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30;
- 15 insulina humana A14E, A22K, B25H, desB30;
insulina humana A14E, desB1, desB2, desB3, B25H-amide, desB26, desB27, desB28, desB29, desB30;
insulina humana A14E, desB1, desB2, desB3, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30;
insulina humana A14E, desB1, desB2, desB3, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27R, desB30;
- 20 insulina humana A14E, B25H, B27H, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27R, desB28-B30;
insulina humana A14E, B25H, B27H, desB28-B30;
insulina humana A14E, B25H, B27E, desB28-B30;
insulina humana A14E, B25H, B27K, desB28-B30;
- 25 insulina humana A14E, B27K, desB28-B30;
insulina humana A14E, A18Q, B3Q, B25H, desB30;
insulina humana A13E, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A12E, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A15E, A14E, B25H, desB30;
- 30 insulina humana A14E, B25H, desB27, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B26D, B27E, desB30;
insulina humana EEAEAEAPK-B(1-29)-B25H-AAK-A(1-21)-A14E;
insulina humana EEAEAPK-B(1-29)-B25H-DGK-A(1-21)-A14E;
insulina humana B(1-29)-B25H-AAK-A(1-21)-A14E;
- 35 insulina humana B(1-29)-B1E, B25H-AAK-A(1-21)-A14E;
insulina humana B(1-29)-B25H, B27E-AAK-A(1-21)-A8H, A14E;
insulina humana B(1-29)-B1E, B25H, B27E-AAK-A(1-21)-A8H, A14E;

ES 2 601 839 T3

- insulina humana EEAEAEAPK-B(1-29)-B16E, B25H-AAK-A(1-21)-A8H. A14E;
insulina humana B(1-29)-B25H, B29Q-TGLGGGQ-A(1-21)-A14E;
insulina humana B(1-29)-B16E, B25H, B29Q-TGLGGGQ-A(1-21)-A14E;
insulina humana B(1-29)-B25H, B29Q-TGLGGGQ-A(1-21)-A8H, A14E;
- 5 insulina humana A14E, B25H, B27R, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27N, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27D, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27Q, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27E, desB30;
- 10 insulina humana A14E, B25H, B27G, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27H, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27K, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27P, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27S, desB30;
- 15 insulina humana A14E, B25H, B27T, desB30;
insulina humana A13R, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A13N, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A13D, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A13Q, A14E, B25H, desB30;
- 20 insulina humana A13E, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A13G, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A13H, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A13K, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A13P, A14E, B25H, desB30;
- 25 insulina humana A13S, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A13T, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B16R, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B16D, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B16Q, B25H, desB30;
- 30 insulina humana A14E, B16E, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B16H, B25H, desB30;
insulina humana A14D, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B25H, desB30;
insulina humana A14H, B25H, desB30; y
- 35 insulina humana A8H, A14E, B10E, B25H, desB30.

La insulina es una hormona polipeptídica secretada por las células β del páncreas y está constituida por dos cadenas polipeptídicas, A y B, las cuales están unidas mediante dos puentes de disulfuro intercatenarios. Además, la cadena A se caracteriza por contener un puente de disulfuro intracatenario.

5 La hormona se sintetiza como un precursor monocatenario, la proinsulina (preproinsulina), el cual está constituido por un prepéptido de 24 aminoácidos y a continuación proinsulina, que contiene 86 aminoácidos en la siguiente configuración: prepéptido-B-Arg Arg-C-Lys Arg-A, donde C es un péptido conector de 31 aminoácidos. Arg-Arg y Lys-Arg son sitios de escisión para escindir el péptido conector de las cadenas A y B.

10 Se han utilizado tres métodos principales para la producción de insulina humana en microorganismos. Dos de ellos implican *Escherichia coli*, con o bien la expresión de una proteína de fusión grande en el citoplasma (Frank *et al.* (1981) en *Peptides: Proceedings of the 7th American Peptide Chemistry Symposium* (Rich & Gross, eds.), Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. pág. 729-739) o bien el uso de un péptido señal para hacer posible la secreción en el espacio periplásmico (Chan *et al.* (1981) *PNAS* 78:5401-5404). Un tercer método utiliza *Saccharomyces cerevisiae* para secretar un precursor de insulina en el medio (Thim *et al.* (1986) *PNAS* 83:6766-6770). La técnica anterior describe una serie de precursores de insulina que se expresan en o bien *E. coli* o *Saccharomyces cerevisiae*, remítase a la Patente de EE. UU. N.º 5.962.267, WO 95/16708, EP 0055945, EP 0163529, EP 0347845 y EP 0741188.

20 Los análogos de insulina se producen mediante la expresión de una secuencia de ADN que codifica el análogo de insulina en cuestión en una célula huésped adecuada utilizando técnicas conocidas según se describe en, p. ej., la Patente de EE. UU. N.º 6500645. El análogo de insulina se expresa o bien directamente o como una molécula precursora que presenta una extensión del extremo N en la cadena B. Esta extensión del extremo N puede tener la función de incrementar el rendimiento del producto expresado directamente y puede tener una longitud de hasta 15 residuos aminoácidos. La extensión del extremo N debe ser escindida *in vitro* tras el aislamiento a partir del caldo de cultivo y, por consiguiente, tendrá un sitio de escisión al lado de B1. Las extensiones del extremo N del tipo adecuado en la presente invención se describen en la Patente de EE. UU. N.º 5.395.922, y la Patente Europea N.º 765.395A.

25 El análogo de insulina aislado se puede acilar en la posición deseada utilizando métodos de acilación conocidos y los ejemplos de tales análogos de insulina se describen, p. ej., en las Solicitudes de Patente Europea con N.ºs de publicación EP 214826, EP 375437 y EP 383472.

30 La secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido del análogo de insulina respectivo se puede preparar sintéticamente utilizando métodos estándar establecidos, p. ej., el método de fosfoamidito descrito por Beaucage *et al.* (1981) *Tetrahedron Letters* 22:1859-1869 o el método descrito por Matthes *et al.* (1984) *EMBO Journal* 3:801-805. De acuerdo con el método de fosfoamidito, los oligonucleótidos se sintetizan, por ejemplo, en un sintetizador de ADN automático, se purifican, se forman los dúplex y se ligan para formar el constructo de ADN sintético. Un modo preferido actualmente para preparar el constructo de ADN consiste en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

35 Las secuencias de ácido nucleico también pueden ser de ADNc, genómico mixto y de origen sintético. Por ejemplo, una secuencia de ADNc o genómico que codifique un péptido líder se puede unir a una secuencia de ADNc o genómico que codifique las cadenas A y B, después de lo cual la secuencia de ADN se puede modificar en un sitio insertando oligonucleótidos sintéticos que codifiquen la secuencia de aminoácidos deseada para la recombinación homóloga de acuerdo con procedimientos conocidos o, preferentemente, generando la secuencia deseada mediante PCR utilizando oligonucleótidos adecuados.

40 El vector recombinante capaz de replicarse en la célula huésped o el microorganismo seleccionado y el cual contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido del análogo de insulina en cuestión puede ser un vector que se replique de forma autónoma, es decir, un vector que exista como una entidad extracromosómica, cuya replicación sea independiente de la replicación cromosómica, p. ej., un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para garantizar la autorreplicación. Como alternativa, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica junto con el o los cromosomas en los que se ha integrado. Además, se puede utilizar un único vector o plásmido, o dos o más vectores o plásmidos que contengan de forma conjunta el ADN total que se ha de introducir en el genoma de la célula huésped, o se puede utilizar un transposón. El vector puede ser un plásmido circular cerrado o lineal y contendrá preferentemente uno o más elementos que permitan la integración estable del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

45 En una realización, el vector de expresión recombinante es capaz de replicarse en levadura. Algunos ejemplos de secuencias que hacen posible que el vector se replique en levadura son las del origen de replicación y los genes de replicación REP 1-3 del plásmido de 2 μ m para levadura.

50 Los vectores pueden contener uno o más marcadores seleccionables que permiten una selección sencilla de las células transformadas. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia a virus o

biocidas, resistencia a metales pesados, prototrofia a los auxótrofos y similares. Algunos ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son los genes *dal* de *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*, o marcadores que confieren resistencia a antibióticos tal como resistencia a la ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclinas. Los marcadores seleccionables para su uso en una célula huésped de tipo hongo filamentoso incluyen *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina-carbamoiltransferasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa) y *trpC* (antranilato-sintasa). Algunos marcadores adecuados para células huésped de tipo levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Un marcador seleccionable muy adecuado para levadura es el gen TPI de *Schizosaccharomyces pombe* (Russell (1985) *Gene* 40:125-130).

En el vector, la secuencia de ácido nucleico está conectada de forma operable a una secuencia de un promotor adecuado. El promotor puede ser cualquier secuencia de ácido nucleico que presente actividad de transcripción en la célula huésped seleccionada, incluidos los promotores híbridos, truncados y mutados, y se puede obtener a partir de genes que codifican polipéptidos intracelulares o extracelulares, tanto homólogos como heterólogos respecto a la célula huésped.

Algunos ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción en una célula huésped bacteriana son los promotores obtenidos a partir del operón de *E. coli lac*, el gen de agarasa (*dagA*) de *Streptomyces coelicolor*, el gen de levansucrasa (*sacB*) de *Bacillus subtilis*, el gen de alfa-amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, el gen de amilasa maltogénica (*amyM*) de *Bacillus stearothermophilus*, el gen de alfa-amilasa (*amyQ*) de *Bacillus amyloliquefaciens* y el gen de penicilinas (*penP*) de *Bacillus licheniformis*. Algunos ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción en una célula huésped de tipo hongo filamentoso son los promotores obtenidos a partir de los genes para amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* y alfa-amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*. En un huésped de tipo levadura, algunos promotores útiles son los promotores Ma1, TPI, ADH o PGK de *Saccharomyces cerevisiae*.

El constructo de ácido nucleico normalmente también estará conectado de forma operable a un terminador adecuado. En una levadura, un terminador adecuado es el terminador TPI (Alber *et al.* (1982) *J. Mol. Appl. Genet.* 1:419-434).

Los procedimientos utilizados para ligar las secuencias de ácido nucleico individuales contenidas en el vector de expresión tales como el ADN que codifica el polipéptido del análogo de insulina deseado, el promotor y el terminador, respectivamente, y para insertarlas en un vector adecuado que contenga la información necesaria para la replicación en el huésped seleccionado, son conocidos por los expertos en la técnica. Se sobreentenderá que el vector se puede construir o bien preparando en primer lugar un constructo de ADN que contenga la secuencia entera de ADN que codifica los polipéptidos de los análogos de insulina de la invención e insertando posteriormente este fragmento en un vector de expresión adecuado, o bien insertando de forma secuencial fragmentos de ADN que contengan información genética para los elementos individuales (tales como las cadenas A y B, el péptido conector, propéptido y péptido señal) y a continuación ligándolos.

El vector que comprende tal secuencia de ácido nucleico se introduce en la célula huésped de modo que el vector se mantenga como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autorreplicante según se ha descrito anteriormente. La expresión "célula huésped" abarca cualquier descendencia de una célula progenitora que no sea idéntica a la célula progenitora debido a mutaciones que puedan producirse durante la replicación. La célula huésped puede ser un microorganismo unicelular, p. ej., un procarionta, o un microorganismo que no sea unicelular, p. ej., un eucariota. Algunas células unicelulares útiles son células bacterianas tales como las bacterias grampositivas, que incluyen, sin carácter limitante, una célula de *Bacillus*, una célula de *Streptomyces*, o bacterias gramnegativas tales como *E. coli* y *Pseudomonas* sp. Las células eucariotas pueden ser células de mamífero, insecto, vegetales o fúngicas. En una realización preferida, la célula huésped es una célula de levadura. El organismo de tipo levadura utilizado en el proceso de la invención puede ser cualquier organismo de tipo levadura adecuado que, cuando se cultive, produzca grandes cantidades de la insulina monocatenaria de la invención. Los ejemplos de organismos de tipo levadura adecuados son cepas seleccionadas de las especies de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces uvarum*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia kluyveri*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida* sp., *Candida utilis*, *Candida cacaui*, *Geotrichum* sp. y *Geotrichum fermentans*.

La transformación de las células de levadura se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante la formación de protoplastos seguida de su transformación de un modo conocido *per se*. El medio utilizado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para que crezcan organismos de tipo levadura. El polipéptido del análogo de insulina secretado, una porción significativa del cual estará presente en el medio en una forma correctamente procesada, se puede recuperar a partir del medio utilizando procedimientos convencionales, que incluyen separar las células de levadura del medio mediante centrifugación, filtración o atrapar el precursor de insulina con una matriz de intercambio iónico o con una matriz de absorción de fase inversa, precipitar los componentes proteínicos del sobrenadante o filtrado con una sal, p. ej., sulfato de amonio y a continuación purificar utilizando varios procedimientos cromatográficos, p. ej., cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad o similares.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

Otro objetivo de la presente invención consiste en proporcionar una formulación farmacéutica que comprenda un análogo de insulina de acuerdo con la presente invención, el cual esté presente con una concentración de 0.1 mg/ml a 500 mg/ml, y donde dicha formulación tenga un pH de 2.0 a 10.0. La formulación puede comprender además uno o más inhibidores de proteasas, un sistema tampón, uno o más conservantes, uno o más agentes de tonicidad, uno o más agentes quelantes, estabilizantes y surfactantes. En una realización de la invención, la formulación farmacéutica es una formulación acuosa, es decir, una formulación que comprende agua. Tal formulación es habitualmente una solución o una suspensión. En una realización adicional de la invención, la formulación farmacéutica es una solución acuosa. La expresión "formulación acuosa" se define como una formulación que comprende al menos un 50% p/p de agua. De un modo similar, la expresión "solución acuosa" se define como una solución que comprende al menos un 50% p/p de agua y la expresión "suspensión acuosa" se define como una suspensión que comprende al menos un 50% p/p de agua.

En otra realización, la formulación farmacéutica es una formulación liofilizada, a la cual el médico o el paciente añade disolventes y/o diluyentes antes de su uso.

En otra realización, la formulación farmacéutica es una formulación seca (p. ej., liofilizada o secada por pulverización) lista para usar sin ninguna disolución previa.

En una realización adicional, la invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende una solución acuosa de un análogo de insulina de la presente invención y un tampón, donde dicho análogo de insulina está presente con una concentración de 0.1 mg/ml o superior y donde dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 2.0 a aproximadamente 10.0.

Las formulaciones diseñadas para uso oral se pueden preparar de acuerdo con cualquier método conocido y tales formulaciones pueden contener uno o más agentes seleccionados del grupo constituido por agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes y agentes conservantes con el fin de proporcionar preparados farmacéuticamente elegantes y agradables al paladar. Los comprimidos pueden contener el principio activo mezclado con excipientes farmacéuticamente aceptables atóxicos que sean adecuados para la elaboración de los comprimidos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como manitol, maltodextrina, caolín, carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes desintegrantes y granulantes, por ejemplo, almidón de maíz; agentes aglutinantes, por ejemplo, almidón, gelatina, polímeros o acacia, y agentes lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden estar sin recubrir o se pueden recubrir utilizando técnicas conocidas para retrasar la desintegración o liberación del polipéptido terapéuticamente activo.

Las formulaciones que se pueden administrar por vía oral de la presente invención se pueden preparar y administrar de acuerdo con métodos muy conocidos en la química farmacéutica, remítase a *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17.^a ed. (A. Osol ed., 1985).

En una realización de la invención, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar mediante formas farmacéuticas sólidas tales como comprimidos y cápsulas. Los comprimidos se pueden preparar mediante granulación por vía húmeda, mediante granulación por vía seca, mediante compresión directa o granulación por fusión.

Los comprimidos para esta invención se pueden preparar utilizando técnicas de formación de comprimidos convencionales. Un método general de fabricación implica mezclar un análogo de insulina, un diluyente hidrosoluble, un aglutinante hidrófilo y opcionalmente una porción de un desintegrante. A continuación, esta mezcla se granula con una solución acuosa del aglutinante hidrófilo o una solución acuosa del aglutinante hidrófilo y un surfactante, y se muele si es necesario. Los gránulos se secan y se reducen hasta un tamaño adecuado. Se añaden cualesquiera ingredientes adicionales, tales como lubricantes (p. ej., estearato de magnesio) y desintegrantes adicionales a los gránulos y se mezclan. A continuación, esta mezcla se comprime para obtener una forma y un tamaño adecuados utilizando máquinas de formación de comprimidos convencionales tales como una prensa de comprimidos rotatoria. Los comprimidos se pueden recubrir con una película utilizando técnicas muy conocidas en la materia.

Las formulaciones para uso oral también se pueden presentar como cápsulas de gelatina dura o blanda, donde el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, tal como manitol, maltodextrina, carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, caolín, fosfato de calcio o fosfato de sodio, o una cápsula de gelatina blanda, donde el principio activo se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo, aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

Las cápsulas para esta invención se pueden preparar utilizando métodos convencionales. Un método general de fabricación implica mezclar un péptido terapéuticamente activo, alginato, un diluyente hidrosoluble, un aglutinante hidrófilo y opcionalmente una porción de un desintegrante. A continuación, esta mezcla se granula con una solución acuosa del aglutinante hidrófilo o una solución acuosa del aglutinante hidrófilo y un surfactante en agua, y se muele si es necesario. Los gránulos se secan y se reducen hasta un tamaño adecuado. Se añaden cualesquiera ingredientes adicionales, tales como un lubricante, a los gránulos y se mezclan. A continuación, la mezcla resultante

se introduce en una cápsula de gelatina de cubierta dura y de tamaño adecuado utilizando máquinas de relleno de cápsulas convencionales.

5 En una realización adicional de la descripción, el tampón se selecciona del grupo constituido por acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrogenofosfato de sodio, hidrogenofosfato de disodio, fosfato de sodio y tris(hidroxi metil)aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas de estos. Cada uno de estos tampones específicos constituye una realización alternativa de la invención.

10 En una realización adicional de la descripción, la formulación comprende además un conservante farmacéuticamente aceptable. El conservante está presente en una cantidad suficiente para obtener un efecto conservante. El experto estará familiarizado con la cantidad de conservante en una formulación farmacéutica y esta se puede determinar, p. ej., a partir de la bibliografía de la técnica y/o la o las cantidades conocidas de conservante en, p. ej., productos comerciales. Cada uno de estos conservantes específicos constituye una realización alternativa de la invención.

15 El experto estará familiarizado con el uso de un conservante en las composiciones farmacéuticas. Para su conveniencia, se hace referencia a *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 19.^a edición, 1995.

En una realización adicional de la descripción, la formulación comprende además un agente quelante. El experto estará familiarizado con el uso de un agente quelante en las composiciones farmacéuticas. Para su conveniencia, se hace referencia a *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 19.^a edición, 1995.

20 En una realización adicional de la descripción, la formulación comprende además un estabilizante. El término "estabilizante", tal como se utiliza en la presente, se refiere a agentes químicos añadidos a formulaciones farmacéuticas que contienen un polipéptido con el fin de estabilizar el péptido, es decir, para incrementar la vida útil y/o el periodo de validez de las formulaciones. El experto estará familiarizado con el uso de un estabilizante en las composiciones farmacéuticas. Para su conveniencia, se hace referencia a *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 19.^a edición, 1995.

25 En una realización adicional de la descripción, la formulación comprende además un surfactante. El término "surfactante", tal como se utiliza en la presente, se refiere a cualesquiera moléculas o iones que comprenden una parte hidrosoluble (hidrófila), la cabeza, y un segmento soluble en grasa (lipófilo). Los surfactantes se acumulan preferentemente en las interfases, donde la parte hidrófila se orienta hacia el agua (fase hidrófila) y la parte lipófila hacia la fase hidrófoba u oleosa (es decir, vidrio, aire, aceite, etc.). La concentración en la que los surfactantes empiezan a formar micelas se conoce como concentración micelar crítica o CMC. Además, los surfactantes reducen la tensión superficial de un líquido. Los surfactantes también se conocen como compuestos anfifílicos. El término "detergente" es un sinónimo utilizado para los surfactantes en general. El experto estará familiarizado con el uso de un surfactante en las composiciones farmacéuticas. Para su conveniencia, se hace referencia a *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 19.^a edición, 1995.

35 En una realización adicional de la descripción, la formulación comprende además inhibidores de proteasas.

40 Es posible que haya otros ingredientes presentes en la formulación farmacéutica del análogo de insulina de la presente invención. Tales ingredientes adicionales pueden incluir agentes humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes aglutinantes, modificadores de la tonicidad, agentes quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (p. ej., albúmina de suero humano, gelatina o proteínas) y un zwitterión (p. ej., un aminoácido tal como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Tales ingredientes adicionales, obviamente, no deben afectar de forma adversa a la estabilidad global de la formulación farmacéutica de la presente invención.

45 Las composiciones farmacéuticas que contienen un análogo de insulina de acuerdo con la presente invención se pueden administrar a un paciente que necesite tal tratamiento en varios puntos, por ejemplo, en puntos tópicos, por ejemplo, puntos de mucosas y cutáneos, en puntos en los que no se produzca absorción, por ejemplo, la administración en una arteria, en una vena, en el corazón, y en puntos que impliquen absorción, por ejemplo, la administración en la piel, bajo la piel, en un músculo o en el abdomen.

50 La administración de composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo mediante varias vías de administración, por ejemplo, lingual, sublingual, bucal, en la boca, oral, en el estómago y el intestino, nasal, pulmonar, por ejemplo, a través de los bronquiolos y alveolos o una combinación de estos, epidérmica, dérmica, transdérmica, vaginal, rectal, ocular, por ejemplo, a través de la conjuntiva, uretal y parenteral a pacientes que necesiten un tratamiento de este tipo.

55 Las composiciones de la presente invención se pueden administrar en varias formas farmacéuticas, por ejemplo, como soluciones, suspensiones, emulsiones, microemulsiones, múltiples emulsiones, espumas, pomadas, pastas, yesos, ungüentos, comprimidos, comprimidos recubiertos, enjuagues, cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina dura y cápsulas de gelatina blanda, supositorios, cápsulas rectales, gotas, geles, esprays, polvos, aerosoles, inhalantes, gotas para los ojos, ungüentos oftálmicos, enjuagues oftálmicos, pesarios vaginales, anillos vaginales,

ungüentos vaginales, solución para inyección, soluciones de transformación *in situ*, por ejemplo, gelificación *in situ*, deposición *in situ*, precipitación *in situ*, cristalización *in situ*, solución de infusión e implantes.

5 Además, las composiciones de la invención pueden formar un compuesto con, o estar unidas a, por ejemplo, mediante interacciones covalentes, hidrófobas y electrostáticas, un portador de fármacos, un sistema de suministro de fármacos y un sistema de suministro de fármacos avanzado con el fin de mejorar adicionalmente la estabilidad del compuesto que es un análogo de insulina, incrementar su biodisponibilidad, incrementar su solubilidad, reducir sus efectos adversos, conseguir la cronoterapia con la cual estarán familiarizados los expertos en la técnica e incrementar el cumplimiento del paciente o cualquier combinación de estos factores.

10 Las composiciones de la presente invención son útiles en la formulación de sólidos, semisólidos, polvos y soluciones para la administración pulmonar de un análogo de insulina, utilizando, por ejemplo, un inhalador de dosis controlada, un inhalador de polvo seco y un nebulizador, siendo todos ellos dispositivos muy conocidos por los expertos en la técnica.

15 Las composiciones de la presente invención pueden ser útiles en la formulación de sistemas de suministro farmacológico de liberación controlada, sostenida, prolongada, retardada y lenta. Más concretamente, sin carácter limitante, las composiciones pueden ser útiles en la formulación de sistemas de liberación sostenida y liberación controlada parenteral (implicando ambos sistemas una reducción de varios factores en el número de administraciones), muy conocidos por los expertos en la técnica. Aún más preferentemente, son sistemas de liberación sostenida y liberación controlada administrados por vía subcutánea. Sin limitar el alcance de la invención, algunos ejemplos de composiciones y sistemas de liberación controlada útiles son hidrogeles, geles oleaginosos, 20 cristales líquidos, micelas poliméricas, microesferas, nanopartículas.

Algunos métodos para producir sistemas de liberación controlada útiles para las composiciones de la presente invención incluyen, sin carácter limitante, cristalización, condensación, cocrystalización, precipitación, coprecipitación, emulsificación, dispersión, homogeneización a alta presión, encapsulación, secado por pulverización, microencapsulación, coacervación, separación de fases, evaporación del disolvente para producir microesferas, extrusión y procesos de fluidos supercríticos. Se hace una referencia general a *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release* (Wise, D.L., ed. Marcel Dekker, Nueva York, 2000) y *Drug and the Pharmaceutical Sciences* vol. 99: *Protein Formulation and Delivery* (MacNally, E.J., ed. Marcel Dekker, Nueva York, 2000).

25

La administración parenteral se puede llevar a cabo mediante inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa utilizando una jeringa, opcionalmente una jeringa en forma de bolígrafo. Como alternativa, la administración parenteral se puede llevar a cabo utilizando una bomba de infusión. Otra opción consiste en una composición que puede ser una solución o suspensión para la administración del compuesto que es análogo de insulina en forma de un spray nasal o pulmonar. Como otra opción más, las composiciones farmacéuticas que contienen el compuesto que es un análogo de insulina de la invención también se pueden adaptar para la administración transdérmica, p. ej., mediante una inyección sin aguja o a partir de un parche, opcionalmente un parche iontoforético, o para la administración transmucosa, p. ej., bucal.

30

35

El análogo de insulina de acuerdo con la invención se puede administrar mediante la vía pulmonar en un vehículo, como una solución, suspensión o un polvo seco, utilizando cualquiera de los tipos conocidos de dispositivos adecuados para el suministro farmacológico pulmonar. Los ejemplos de estos comprenden, sin carácter limitante, los tres tipos generales de generadores de aerosoles para el suministro farmacológico pulmonar y pueden incluir nebulizadores ultrasónicos o de chorro, inhaladores de dosis controlada o inhaladores de polvo seco (Cf. Yu J, Chien YW. *Pulmonary drug delivery: Physiologic and mechanistic aspects. Crit Rev Ther Drug Carr Sys* 14(4) (1997) 395-453).

40

En una realización adicional, la formulación se podría aerosolizar mediante cualquier tecnología de aerosolización conocida, tal como la nebulización, para conseguir un MMAD (siglas en inglés correspondientes a *Mass Median Aerodynamic Diameter*, el diámetro aerodinámico de la masa media) de las partículas de aerosol inferior a 10 µm, más preferentemente comprendido entre 1 y 5 µm, y aún más preferentemente comprendido entre 1 y 3 µm. El tamaño de partícula preferido se basa en el tamaño más eficaz para el suministro del fármaco en la parte más profunda del pulmón, donde la proteína se absorbe de forma óptima (cf. Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer A, *Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol* 84(2) (1998) 379-385).

45

50

La deposición en la parte más profunda del pulmón de las formulaciones pulmonares que comprenden el compuesto que es un análogo de insulina se puede optimizar adicionalmente de forma opcional utilizando modificaciones de las técnicas de inhalación, por ejemplo, sin carácter limitante: un flujo de inhalación lento (p. ej., 30 L/min), manteniendo la respiración y programando la activación.

55 La expresión "formulación estabilizada" se refiere a una formulación con un incremento de la estabilidad física, un incremento de la estabilidad química o un incremento de la estabilidad física y química.

La expresión "estabilidad física" de la formulación proteica, tal como se utiliza en la presente, se refiere a la tendencia de la proteína a formar agregados insolubles y/o biológicamente inactivos de la proteína como resultado

- de la exposición de la proteína a estreses termomecánicos y/o a la interacción con interfaces y superficies que son desestabilizantes, tales como superficies e interfaces hidrófobas. La estabilidad física de las formulaciones proteicas acuosas se evalúa mediante una inspección visual y/o mediciones de turbidez después de exponer la formulación introducida en envases adecuados (p. ej., cartuchos o viales) a un estrés mecánico/físico (p. ej., agitación) a diferentes temperaturas durante varios periodos de tiempo. La inspección visual de las formulaciones se lleva a cabo en una luz enfocada nítida con un fondo oscuro. La turbidez de la formulación se caracteriza mediante una puntuación visual que evalúa el grado de turbidez, por ejemplo, en una escala de 0 a 3 (una formulación que no presente turbidez corresponde a una puntuación visual de 0 y una formulación que presente turbidez visual a la luz del día corresponde a una puntuación visual de 3). Una formulación se clasifica como físicamente inestable respecto a la agregación de proteínas cuando presenta turbidez visual a la luz del día. Como alternativa, la turbidez de la formulación se puede evaluar mediante medidas simples de turbidez con las cuales estará familiarizado el experto. La estabilidad física de las formulaciones proteicas acuosas también se puede evaluar utilizando una sonda o agente espectroscópico del estado conformacional de la proteína. La sonda es preferentemente una molécula de bajo peso molecular que se une preferentemente a un conformero no nativo de la proteína. Un ejemplo de una sonda espectroscópica molecular de bajo peso molecular de estructura proteica es la Tioflavina T. La Tioflavina T es un tinte fluorescente que se ha utilizado de forma generalizada para la detección de fibrilos amiloides. En presencia de fibrilos, y quizás de otras configuraciones proteicas también, la Tioflavina T da lugar a un nuevo máximo de excitación a aproximadamente 450 nm y una mayor emisión a aproximadamente 482 nm cuando se une a una forma proteica de los fibrilos. La Tioflavina T no unida es esencialmente no fluorescente en las longitudes de onda.
- Se pueden utilizar otras moléculas de bajo peso molecular como sondas de los cambios en la estructura proteica desde el estado nativo hasta estados no nativos. Por ejemplo, las sondas de "parche hidrófobo", las cuales se unen preferentemente a parches hidrófobos expuestos de una proteína. Los parches hidrófobos están por lo general enterrados en la estructura terciaria de una proteína en su estado nativo, pero quedan expuestos cuando la proteína empieza a desplegarse o desnaturalizarse. Algunos ejemplos de estas sondas espectroscópicas moleculares de bajo peso molecular son tintes hidrófobos y aromáticos tales como el antraceno, la acridina, la fenantrolina o similares. Otras sondas espectroscópicas son complejos de metal-aminoácido tales como complejos del metal cobalto de aminoácidos hidrófobos tales como fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina y valina, o similares.
- La expresión "estabilidad química" de la formulación proteica, tal como se utiliza en la presente, se refiere a cambios químicos covalentes en la estructura de la proteína que llevan a la formación de productos de degradación química con una posible reducción de la potencia biológica y/o un posible incremento de las propiedades inmunogénicas en comparación con la estructura de la proteína nativa. Se pueden formar varios productos de degradación química dependiendo del tipo y la naturaleza de la proteína nativa y del entorno al cual se exponga la proteína. Lo más probable es que la eliminación de la degradación química no se pueda evitar completamente y se suelen observar cantidades cada vez mayores de productos de degradación química durante el almacenamiento y el uso de la formulación proteica, con lo cual estará familiarizado el experto en la técnica. La mayoría de las proteínas tienen tendencia a experimentar desamidación, un proceso en el cual el grupo amida de la cadena lateral en los residuos de glutaminilo o asparaginilo se hidroliza para formar un ácido carboxílico libre. Otras vías de degradación implican la formación de productos de transformación de elevado peso molecular, donde dos o más moléculas proteicas se unen covalentemente entre sí mediante transamidación y/o interacciones de disulfuro, que llevan a la formación de productos de degradación diméricos, oligoméricos y poliméricos unidos covalentemente (*Stability of Protein Pharmaceuticals*, Ahern. T.J. y Manning M.C., Plenum Press, Nueva York 1992). La oxidación (de, por ejemplo, residuos de metionina) se puede mencionar como otra variante de la degradación química. La estabilidad química de la formulación proteica se puede evaluar midiendo la cantidad de los productos de degradación química en varios puntos de evaluación tras la exposición a diferentes condiciones medioambientales (la formación de productos de degradación se puede acelerar a menudo, por ejemplo, incrementando la temperatura). La cantidad de cada producto de degradación individual se suele determinar mediante la separación de los productos de degradación según su tamaño molecular y/o su carga utilizando varias técnicas cromatográficas (p. ej., SEC-HPLC y/o RP-HPLC).
- Por lo tanto, según se ha expuesto anteriormente, una "formulación estabilizada" se refiere a una formulación con un incremento de la estabilidad física, un incremento de la estabilidad química o un incremento de la estabilidad física y química. En general, una formulación debe ser estable durante su uso y almacenamiento (de acuerdo con las condiciones de almacenamiento y uso recomendadas) hasta que se alcance la fecha de caducidad.
- En una realización de la descripción, la formulación farmacéutica que comprende el compuesto que es un análogo de insulina es estable durante más de 6 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.
- En otra realización de la descripción, la formulación farmacéutica que comprende el compuesto que es un análogo de insulina es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.
- En una realización adicional de la descripción, la formulación farmacéutica que comprende el compuesto que es un análogo de insulina es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de dos años de almacenamiento.

En una realización adicional más de la descripción, la formulación farmacéutica que comprende el compuesto que es un análogo de insulina es estable durante más de 2 semanas de uso y durante más de dos años de almacenamiento.

5 Las suspensiones acuosas pueden contener los compuestos activos mezclados con excipientes adecuados para la elaboración de suspensiones acuosas.

10 Las suspensiones oleosas se pueden formular suspendiendo el principio activo en un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral tal como una parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo, cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Se pueden añadir agentes edulcorantes tales como los expuestos anteriormente y agentes saborizantes para proporcionar un preparado oral agradable al paladar. Estas formulaciones se pueden conservar mediante la adición de un antioxidante tal como el ácido ascórbico.

15 Los gránulos y polvos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el compuesto activo mezclado con un agente dispersante o humectante, un agente de suspensión y uno o más conservantes. Los ejemplos de agentes dispersantes o humectantes y de agentes de suspensión adecuados son los que ya se han mencionado anteriormente. También puede haber excipientes adicionales presentes, por ejemplo, agentes edulcorantes, saborizantes y colorantes.

20 Las formulaciones farmacéuticas que comprenden un compuesto para su uso de acuerdo con la presente descripción también pueden adoptar la forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de oliva o aceite de cacahuete, o un aceite mineral, por ejemplo, una parafina líquida, o una mezcla de estos. Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas de origen natural, por ejemplo, goma acacia o goma tragacanto, fosfátidos de origen natural, por ejemplo, semillas de soja, lecitina, y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de sorbitán, y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo, monooleato de sorbitán polioxi-etileno. Las emulsiones también pueden contener agentes edulcorantes y saborizantes.

25 Los jarabes y elixires se pueden formular con agentes edulcorantes, por ejemplo, glicerol, propilenglicol, sorbitol o sacarosa. Tales formulaciones también pueden contener un agente demulcente, conservante, saborizante y colorante.

30 En una realización adicional de la descripción, la formulación comprende además un potenciador de la permeación. Las sales biliares y los ácidos grasos son los que se consideran más a menudo para incrementar la permeabilidad oral de las membranas de bicapa lipídica del revestimiento de las células epiteliales del aparato GI. En general, los potenciadores de la permeación incrementan el transporte paracelular y transcelular de macromoléculas alterando de forma reversible la integridad de la membrana. La sal biliar se selecciona del grupo constituido por colato, desoxicolato, taurocolato, glicocolato, taurodesoxicolato, ursodesoxicolato, tauroursodesoxicolato y quenodesoxicolato. Los ácidos grasos se seleccionan del grupo de ácidos grasos de cadena corta, media y larga, tales como el ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, etc. Otros potenciadores podrían ser surfactantes tales como monoglicéridos, ésteres polioxi-etileno, surfactantes de sorbitán (no iónicos) y sulfatos (aniónicos).

40 En una realización adicional de la descripción, la formulación comprende además un polímero mucoadhesivo. Se puede obtener un contacto íntimo del sistema de suministro farmacológico con la mucosa del aparato gastrointestinal mediante el uso de un polímero mucoadhesivo de este tipo. Un contacto íntimo de la forma farmacéutica con la membrana parece beneficioso, ya que se puede evitar la degradación enzimática del polipéptido terapéuticamente activo en su ruta entre el sistema de suministro y la membrana de absorción. Además, se puede proporcionar un gradiente de concentración por pasos en la membrana de absorción que representa la fuerza conductora para la captación pasiva del fármaco.

45 En una realización adicional de la descripción, la formulación comprende además un inhibidor de una o más enzimas proteolíticas para eludir adicionalmente la barrera enzimática y conseguir el suministro del polipéptido terapéuticamente activo, tal como un inhibidor de aminopeptidasas, amastatina, bestatina, boroleucina y puromicina. Algunos ejemplos de inhibidores de proteasas son glicolato de sodio, mesilato de camostato, bacitracina, inhibidor de la tripsina de la soja y aprotinina.

50 El atrapamiento y la encapsulación constituyen una técnica utilizada en sistemas de suministro farmacológico para polipéptidos terapéuticamente activos que tiene como objetivo optimizar las propiedades de suministro, incluida la protección contra la degradación enzimática. El atrapamiento o encapsulación puede adoptar la forma de sistemas de suministro farmacológico poliméricos tales como hidrogeles y nanocápsulas/microesferas, y sistemas de suministro farmacológico lipídicos tales como liposomas y microemulsiones.

55 Las composiciones de la presente invención se pueden administrar en varias formas farmacéuticas, por ejemplo, como soluciones, suspensiones, micro- y nanosuspensión, emulsiones, microemulsiones, múltiples emulsiones, espumas, pomadas, pastas, ungüentos, comprimidos, comprimidos recubiertos, comprimidos efervescentes, comprimidos sublinguales, comprimidos bucales, cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina dura y cápsulas de

gelatina blanda, polvos, gránulos, soluciones de transformación *in situ*, por ejemplo, gelificación *in situ*, deposición *in situ*, precipitación *in situ*, cristalización *in situ*, una formulación que flote en el estómago tal como una suspensión flotante, un comprimido flotante o similares.

5 En otra realización, la presente invención se refiere a un análogo de insulina de acuerdo con la invención para su uso como un medicamento.

10 En una realización, un análogo de insulina de acuerdo con la descripción se utiliza para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de hiperglucemia, diabetes de tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes de tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, cardiopatía isquémica y otros trastornos cardiovasculares, síndrome intestinal inflamatorio, dispepsia y úlceras gástricas.

En otra realización, un análogo de insulina de acuerdo con la invención se utiliza como un medicamento para retrasar o prevenir la evolución de la enfermedad en la diabetes de tipo 2.

15 En otra realización, un análogo de insulina de acuerdo con la descripción se utiliza como un medicamento para reducir el consumo de alimentos, reducir la apoptosis de las células β , incrementar la función de las células β y la masa de las células β , y/o restablecer la sensibilidad a la glucosa en las células β .

20 En una realización de la descripción, el derivado de acuerdo con la invención es para ser utilizado como un medicamento para el tratamiento o la prevención de hiperglucemia, diabetes de tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes de tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, cardiopatía isquémica y otros trastornos cardiovasculares, accidente cerebrovascular, síndrome intestinal inflamatorio, dispepsia y úlceras gástricas o para retrasar o prevenir la evolución de la enfermedad en la diabetes de tipo 2 o para reducir el consumo de alimentos, reducir la apoptosis de las células β , incrementar la función de las células β y la masa de las células β , y/o restablecer la sensibilidad a la glucosa en las células β .

25 En una realización adicional de la descripción, se proporciona un método para el tratamiento o la prevención de hiperglucemia, diabetes de tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes de tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, cardiopatía isquémica y otros trastornos cardiovasculares, accidente cerebrovascular, síndrome intestinal inflamatorio, dispepsia y úlceras gástricas o para retrasar o prevenir la evolución de la enfermedad en la diabetes de tipo 2 o para reducir el consumo de alimentos, reducir la apoptosis de las células β , incrementar la función de las células β y la masa de las células β , y/o restablecer la sensibilidad a la glucosa en las células β , donde el método comprende administrar a un paciente que necesite tal tratamiento una cantidad eficaz para tal tratamiento de un análogo de insulina de acuerdo con la invención.

35 El tratamiento con un análogo de insulina de acuerdo con la presente invención también se puede combinar con una segunda sustancia farmacológicamente activa o con más sustancias farmacológicamente activas, p. ej., seleccionadas entre agentes antidiabéticos, agentes contra la obesidad, agentes reguladores del apetito, agentes contra la hipertensión, agentes para el tratamiento y/o la prevención de complicaciones resultantes de la diabetes o asociadas con ella y agentes para el tratamiento y/o la prevención de complicaciones y trastornos resultantes de la obesidad o asociados con ella. Algunos ejemplos de estas sustancias farmacológicamente activas son: GLP-1 y derivados y análogos de GLP-1, GLP-2 y derivados y análogos de GLP-2, Exendina-4 y derivados y análogos de Exendina-4, amilina y derivados y análogos de amilina, sulfonilureas, biguanidas, meglitinidas, inhibidores de glucosidasas, antagonistas de glucagón, inhibidores de DPP-IV (dipeptidilpeptidasa-IV), inhibidores de enzimas hepáticas que participan en la estimulación de la gluconeogénesis y/o glicogenólisis, moduladores de la captación de glucosa, compuestos que modifican el metabolismo de los lípidos tales como agentes antihiperlipidémicos como inhibidores de HMG CoA (estatinas), compuestos que reducen el consumo de alimentos, agonistas de RXR y agentes que actúan en el canal de potasio dependiente de ATP de las células β ; Colestiramina, colestipol, clofibrato, gemfibrozil, lovastatina, pravastatina, simvastatina, probucol, dextrotiroxina, neteglinida, repaglinida; bloqueadores β tales como alprenolol, atenolol, timolol, pindolol, propranolol y metoprolol, inhibidores de ACE (enzima convertidora de angiotensina) tales como benazepril, captopril, enalapril, fosinopril, lisinopril, alatriopril, quinapril y ramipril, bloqueadores del canal del calcio tales como nifedipina, felodipina, nicardipina, isradipina, nimodipina, diltiazem y verapamil, y bloqueadores α tales como doxazosina, urapidil, prazosina y terazosina; agonistas de CART (transcrito regulado de cocaína y anfetamina), antagonistas de NPY (neuropéptido Y), agonistas de MC4 (melanocortina 4), antagonistas de orexina, agonistas de TNF (factor de necrosis tumoral), agonistas de CRF (factor liberador de corticotropina), antagonistas de CRF BP (proteína de unión al factor liberador de corticotropina), agonistas de urocortina, agonistas de $\beta 3$, agonistas de MSH (hormona estimuladora de melanocitos), antagonistas de MCH (hormona concentradora de melanocitos), agonistas de CCK (colecistocinina), inhibidores de la recaptación de serotonina, inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina, compuestos noradrenérgicos y de serotonina mixtos, agonistas de 5HT (serotonina), agonistas de bombesina, antagonistas de galanina, hormona del crecimiento, compuestos liberadores de la hormona del crecimiento, agonistas de TRH (hormona liberadora de tireotropina), moduladores de UCP 2 o 3 (proteína desacopladora 2 o 3), agonistas de leptina, agonistas de DA (bromocriptina, doprexina), inhibidores de lipasas/amilasas, moduladores de RXR (receptor retinoide X), agonistas de TR β ; antagonistas de histamina H3, gastrina y análogos y derivados de gastrina.

Se debe sobreentender que cualquier combinación adecuada de los derivados de acuerdo con la invención con uno o más de los compuestos mencionados anteriormente y opcionalmente una o más sustancias farmacológicamente activas adicionales se considera dentro del alcance de la presente invención.

5 *En la presente, todos los títulos y subtítulos se utilizan únicamente para su conveniencia y no se debe interpretar que limiten la invención de ningún modo.*

Se pretende que el uso de todos y cada uno de los ejemplos o del lenguaje ilustrativo (p. ej., "tal como") que se proporciona en la presente sea meramente para clarificar mejor la invención y no supone ninguna limitación del alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ningún lenguaje de la memoria descriptiva se debe interpretar como que indique que algún elemento no reivindicado es esencial para llevar a la práctica la invención.

10 *La citación e incorporación de documentos de patente en la presente se realiza únicamente para su comodidad y no refleja ninguna visión de la validez, patentabilidad y/o aplicabilidad de tales documentos de patente.*

Esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes de la materia en cuestión mencionada en las reivindicaciones adjuntas en la presente en la medida permitida por la ley pertinente.

EJEMPLOS

15 EJEMPLO 1

Comparación de la estabilidad proteolítica (semivida) de B25H, A14E, A14E_B25H e insulina humana frente a pepsina, quimotripsina y carboxipeptidasa A

20 Se evaluó la estabilidad proteolítica de la insulina humana y de análogos de insulina (0.06 mM, 10 µL) frente a quimotripsina o pepsina (0.34-3.4 µg) tras la incubación en NH₄HCO₃ 100 mM, pH de 8.1 o HCl 10 mM, pH de 2.0, respectivamente, y 25 °C con un volumen final de 100 µL. Las muestras se desactivaron en diferentes momentos (0, 5, 15, 30 y 60 min) con un volumen equivalente de TFA al 0.5% o TrisHCl 0.1 M de pH 8.0 (pH final de 7.7) y se transfirieron a 5 °C. La insulina humana y los análogos de insulina se analizaron inmediatamente mediante RP-HPLC a 214 nm y se determinó el área bajo el pico correspondiente a la proteína intacta.

25 Se evaluó la estabilidad de la insulina humana y los análogos de insulina (0.06 mM, 13.9 µg) frente a carboxipeptidasa A (6.8 µL de solución de trabajo, 20 mg/mL, 53 unidades/mg, Sigma C-9268) tras la incubación en NaP 5 mM, NaCl 140 mM, 70 ppm de Tween20, pH de 7.4 y 37 °C con un volumen final de 400 µL. Las muestras se desactivaron en diferentes momentos (5, 15, 30, 60 min) con un volumen equivalente de TFA al 0.2% y se transfirieron a 5 °C. Se prepararon muestras de referencia (0 min) sin añadir enzimas. La insulina humana y los análogos de insulina se analizaron inmediatamente mediante RP-HPLC en un sistema tampón neutro a 214 nm y se determinó el área bajo el pico correspondiente a la proteína intacta. Se observaron tiempos de retención idénticos para la insulina humana y desB30. Se obtuvieron las semividas (T_{1/2}) a partir de las curvas y se calculó el factor de incremento/reducción en comparación con la insulina humana (factor relativo de estabilidad). Se determinaron unas semividas similares para la insulina humana, T_{1/2}= 6.9 min, y la insulina humana desB30, T_{1/2}= 6.7.

Sitio(s) de mutación en la insulina humana	T _{1/2} [min] (factor) para la pepsina	T _{1/2} [min] (factor) para la quimotripsina	T _{1/2} [min] (factor) para la carboxipeptidasa A
B25H	17.8 (16.2)	25.7 (5.1)	25.7 (2.1)
Ninguna	1.1 (1.0)	5.0 (1.0)	6.9 (1.0)
A14E, DESB30	3.7 (3.4)	33.2 (6.6)	15.7 (2.3)
Ninguna	1.1 (1.0)	5.0 (1.0)	6.9 (1.0)
A14E, B25H, DESB30	42.4 (38.5)	62.4 (12.5)	61.9 (9.0)
Ninguna	1.1 (1.0)	5.0 (1.0)	6.9 (1.0)

35 EJEMPLO 2

Identificación de sitios de escisión de proteasas en la insulina mediante análisis de MS y especificidad enzimática

Se llevó a cabo la identificación de sitios de escisión de proteasas mediante un análisis en el transcurso del tiempo de la proteólisis limitada de la insulina y los análogos de insulina por parte de varias enzimas (pepsina, quimotripsina, carboxipeptidasa A) mediante LC-MS. Los fragmentos peptídicos generados se identificaron mediante MS o MS/MS y se cuantificaron a 214 nm con el fin de identificar los sitios de escisión mayoritarios y minoritarios (puntos clave). Se identificaron los siguientes puntos clave para la pepsina (B24-25, B25-26, B26-27) y la quimotripsina (B16-17, B24-25, B25-26, B26-27, A14-15 y A19-20) en la insulina humana. Cabe destacar que los puntos clave se superponen con la enzima degradadora de insulina (IDE), remítase más adelante, y la catepsina D (Hanne Refsgaard, Novo Nordisk A/S, comunicación personal).

También se predijeron los sitios de escisión en la secuencia de insulina basándose en la especificidad enzimática de la quimotripsina, tripsina y enzima degradadora de insulina (IDE) según se muestra más adelante en el ejemplo 3. Los sitios de escisión previstos para la tripsina (residuos básicos, extremo C respecto a Lys, Arg), elastasa (residuos alifáticos, extremo C respecto a Ala, Val, Gly, Ser), carboxipeptidasa A (especificidad amplia, pero no es Arg, Lys ni Pro), pepsina A (residuos aromáticos, extremo N respecto a Trp, Tyr, Phe y Leu y varios residuos más) y quimotripsina (residuos aromáticos, extremo C respecto a Trp, Tyr, Phe y Leu, pero no Xxx-Pro) se describen en varios libros de bioquímica. Recientemente, se han publicado los sitios de escisión para IDE en la insulina: B9-10, B10-11, B13-14, B14-15, B24-25, B25-26, A13-14, A14-15 (Duckworth *et al.*, *Biochemistry*. 21 de marzo de 1989;28(6):2471-7) y se ha demostrado que las siguientes sustituciones inhiben la degradación de la insulina por parte de IDE: B10D y B4E_B16Q_B17F (Bennett *et al.*, *J Endocrinol.*, junio de 2003;177(3):399-405).

EJEMPLO 3

20 Ciclos repetidos de identificación de puntos clave en la insulina humana A14E, B25H, desB30

Se identificaron los puntos clave mayoritarios para la escisión de la quimotripsina (B16-17, B24-25, A19-20) y los sitios de escisión minoritarios (B1-2, B6-7) en la insulina humana A14E, B25H, desB30 de acuerdo con el método descrito en el ejemplo 2. Los análogos de insulina se designaron basándose en los sitios de escisión identificados y los sitios de escisión previstos a partir de la especificidad enzimática. Los residuos aminoacídicos para la sustitución se seleccionaron con el fin de eliminar los sitios de escisión y de aumentar la solubilidad.

Quimotripsina, diseño de análogos basado en puntos clave identificados mediante LC-MS de digestiones de insulina humana A14E, B25H, desB30:

A14X1 B25H desB30X12 HI B1X2 B6X3 B16X6 B24X8 A19X11

X1= E/D/H/Q/N/S/T/M/P

30 X2= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

X3= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

X6= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

X8= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

X11= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

35 X12= desB30/aa nativo

Nota: es probable que la sustitución de B24 y/o A19 en la insulina humana reduzca significativamente la afinidad del receptor.

A14X1 B25P desB30X12 HI B1X2 B6X3 B16X6 B24X8 A19X11

X1= E/D/H/Q/N/S/T/M/P

40 X2= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

X3= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

X6= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

X8= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

X11= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

45 X12= desB30/aa nativo

Nota: es probable que la sustitución de B25 con Pro reduzca significativamente la escisión por parte de la quimotripsina en B24-25.

Quimotripsina, diseño basado en puntos clave identificados y previstos:

A14X1 B25H desB30X12 HI B1X2 B6X3 B11X4 B15X5 B16X6 B17X7 B24X8 A13X9 A16X10 A19X11

X1= E/D/H/Q/N/S/T/M/P

X2= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

5 X3= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

X4= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

X5= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

X6= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

X7= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

10 X8= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

X9= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

X10= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

X11= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

X12= desB30/aa nativo

15 Nota: es probable que la sustitución de B11, B15, B24, A13, A16 y/o A19 en la insulina humana reduzca significativamente la afinidad del receptor.

Quimotripsina + tripsina, diseño basado en puntos clave identificados y previstos:

A14X1 B25H desB30X12 HI B1X2 B6X3 B11X4 B15X5 B16X6 B17X7 B24X8 A13X9 A16X10 A19X11 B22X13

X1= E/D/H/Q/N/S/T/M/P

20 X2= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

X3= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

X4= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

X5= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

X6= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

25 X7= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

X8= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

X9= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

X10= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

X11= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

30 X12= desB30/aa nativo

X13= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

Quimotripsina + tripsina + enzima degradadora de insulina (IDE), diseño basado en puntos clave identificados y previstos:

35 A14X1 B25H desB30X12 HI B1X2 B6X3 B11X4 B15X5 B16X6 B17X7 B24X8 A13X9 A16X10 A19X11 B22X13
B4X14 B9X15 B10X16 B13X17 B14X18

X1= E/D/H/Q/N/S/T/M/P

X2= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

X3= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

- X4= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo
- X5= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo
- X6= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo
- X7= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo
- 5 X8= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo
- X9= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo
- X10= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo
- X11= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo
- X12= desB30/aa nativo
- 10 X13= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo
- X14= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo
- X15= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo
- X16= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo
- X17= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo
- 15 X18= E/D/H/Q/N/S/T/M/P/aa nativo

EJEMPLO 4

Estabilidad proteolítica (semivida) de los análogos de insulina frente a la quimotripsina

20 Se evaluaron los análogos de insulina en ensayos de estabilidad y se identificaron los análogos que exhibieron una mayor resistencia frente a la digestión proteolítica mediante semividas más elevadas de acuerdo con los métodos descritos en el ejemplo 1. Los resultados demuestran el potencial de los análogos de insulina mejorados adicionalmente para presentar una mayor biodisponibilidad debido a su resistencia mejorada frente a la degradación proteolítica y a su solubilidad mejorada.

Se ha evaluado la estabilidad de los siguientes análogos de insulina frente a la quimotripsina respecto a la insulina humana:

Análogos de insulina	Digestión con quimotripsina [factor de estabilidad respecto a la insulina humana]
insulina humana A14E, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30	43.8
insulina humana A8H, A14E, B25H, B27E, desB30	38.9
insulina humana EEAEAEAPK-B(1-29)-B25H-AAK-A(1-21)-A14E	33.2
insulina humana A8H, A14E, B1E, B25H, B27E, desB30	22.8
insulina humana A14E, B25H, B28D, desB30	17.4
insulina humana A14E, B25H, B26D, desB30	16.6
insulina humana A14E, B25H, B27E, desB30	14.1
insulina humana A8H, A14E, B25H, desB30	13.3

Análogos de insulina	Digestión con quimotripsina [factor de estabilidad respecto a la insulina humana]
insulina humana A8H,A14E,B10E,B25H,desB30	12.6
insulina humana A14E, B25H, desB30	12.5
insulina humana A14E, B1E, B25H, B27E, desB30	11.9
insulina humana A8H, A14E, B1E, B25H, desB30	10.2
insulina humana A8H, A14E, B1E, B16E, B25H, B27E, desB30	8.3
insulina humana A14D, B25H, desB30	7.9
insulina humana A14E, B27E, desB30	7.7
insulina humana A14E, B28D, desB30	7.5
insulina humana A8H,B10D,B25H	7.4
insulina humana A14E, B1E, B16E, B25H, B27E, desB30	5.5
insulina humana A14E, B1E, B25H, desB30	4.8
insulina humana A14H, B25H, desB30	4.5
insulina humana A14E, B25H	4.1
insulina humana A14E, B1E, B27E, desB30	3.9
insulina humana A8H, A14E, B16E, B25H, desB30	2.3
insulina humana A14E, B16E, B25H, desB30	2.1
Insulina humana (referencia)	1

EJEMPLO 5**Estabilidad proteolítica de los análogos de insulina frente a extractos de intestino de rata (lumen duodenal)**

5 Se evaluaron los análogos de insulina para determinar su estabilidad frente a la degradación proteolítica en extractos intestinales. Los extractos se prepararon lavando el contenido del lumen de animales en ayuno. Los análogos de insulina se incubaron con extractos diluidos a 37 °C a un pH=7.4 y después de 20 h de incubación se determinó la concentración del compuesto intacto mediante RP-HPLC. Se compararon las cantidades relativas de los análogos de insulina intactos y la insulina humana intacta. Se observó una diferencia de un factor de aproximadamente 5-10 en la estabilidad entre la insulina humana y el análogo de insulina humana A14E B25H desB30.

10

LISTA DE SECUENCIAS

<110> NOVO NORDISK A/S

<120> ANÁLOGOS DE INSULINA RESISTENTES A PROTEASAS

<130> 7484.204-WO

<160> 4
 <170> PatentIn versión 3.4
 <210> 1
 <211> 25
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cadena A de insulina modificada
 <220>
 10 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1) .. (1)
 <223> Xaa está ausente o es Gly
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 15 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa está ausente o es Pro
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (3)..(3)
 20 <223> Xaa está ausente o es Pro
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa es Thr o His
 25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa es Ser, Asp o Glu
 <220>
 30 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (10) .. (16)
 <223> Xaa es Leu, Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser o Glu
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 35 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa es Tyr, Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser o Glu
 <220>

- <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (18) .. (18)
 <223> Xaa es Gln, Asp o Glu
 <220>
- 5 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa es Asn, Lys o Gln
 <220>
- <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 10 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa es Asn o Gln
 <220>
- <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (25)..(25)
- 15 <223> Xaa está ausente o es Lys
 <400> 1
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Xaa | Xaa | Xaa | Gly | Ile | Val | Glu | Gln | Cys | Cys | Xaa | Ser | Ile | Cys | Xaa | Xaa |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
-
- | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Xaa | Xaa | Leu | Glu | Xaa | Tyr | Cys | Xaa | Xaa |
| | | | 20 | | | | | 25 |
- <210> 2
 <211> 35
- 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
- <223> Cadena B de insulina modificada
 <220>
- 25 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1) .. (1)
 <223> Xaa está ausente o es Gly
 <220>
- <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 30 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa está ausente o es Pro
 <220>
- <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (3)..(3)

- <223> Xaa está ausente o es Pro
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (4)..(4)
- 5 <223> Xaa está ausente o es Phe o Glu
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa está ausente o es Val
- 10 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (6) .. (6)
 <223> Xaa está ausente o es Asn o Gln
 <220>
- 15 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (7) .. (7)
 <223> Xaa es Gln o Glu
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
- 20 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa es His, Asp, Pro o Glu
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (19)..(19)
- 25 <223> Xaa es Tyr, Asp, Gln, His, Arg o Glu
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (27) .. (27)
 <223> Xaa es Phe o His
- 30 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (28) .. (28)
 <223> Xaa es Phe o His
 <220>
- 35 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa está ausente o es Tyr, His, Thr, Gly o Asp

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa está ausente o es Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser o Glu

5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa está ausente o es Pro, His, Gly o Asp

<220>
 10 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa está ausente o es Lys o Gln

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 15 <222> (33) .. (33)
 <223> Xaa está ausente o es Thr

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (34)..(34)
 20 <223> Xaa está ausente o es Leu

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (35)..(35)
 <223> Xaa está ausente o es Glu

25 <400> 2
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Leu Cys Gly Ser Xaa Leu Val Glu
 1 5 10 15
 Ala Leu Xaa Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa
 35

<210> 3
 <211> 21
 <212> PRT

30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cadena A de insulina modificada

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (8) .. (8)
 <223> Xaa es Thr o His
 5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa es Ser, Asp o Glu
 <220>
 10 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa es Leu, Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser o Glu
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 15 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa es Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser o Glu
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (15)..(15)
 20 <223> Xaa es Gln, Asp o Glu
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (18) .. (18)
 <223> Xaa es Asn, Lys o Gln
 25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (21) .. (21)
 <223> Xaa es Asn o Gln
 <400> 3
 Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Xaa Ser Ile Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Leu
 1 5 10 15
 30 Glu Xaa Tyr Cys Xaa
 20
 <210> 4
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
<223> Cadena B de insulina modificada
<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
5 <222> (1) .. (1)
<223> Xaa es Phe o Glu
<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (3)..(3)
10 <223> Xaa es Asn o Gln
<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (4)..(4)
<223> Xaa es Gln o Glu
15 <220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (10) .. (10)
<223> Xaa es His, Asp, Pro o Glu
<220>
20 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (16) .. (16)
<223> Xaa es Tyr, Asp, Gln, His, Arg o Glu
<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
25 <222> (24)..(24)
<223> Xaa es Phe o His
<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (26) .. (26)
30 <223> Xaa está ausente o es Tyr, His, Thr, Gly o Asp
<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (27)..(27)
<223> Xaa está ausente o es Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser o Glu
35 <220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (28) .. (28)

<223> Xaa está ausente o es Pro, His, Gly o Asp

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (29)..(29)

5 <223> Xaa está ausente o es Lys o Gln

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (30)..(30)

<223> Xaa está ausente o es Thr

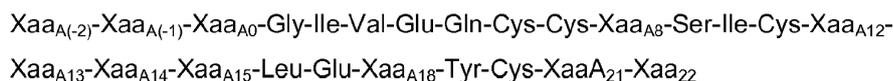
10 <400> 4

Xaa Val Xaa Xaa His Leu Cys Gly Ser Xaa Leu Val Glu Ala Leu Xaa
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Xaa His Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

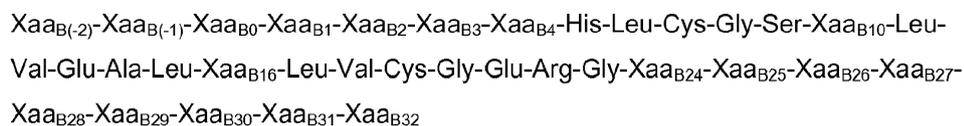
REIVINDICACIONES

1. Un análogo de insulina que está estabilizado frente a la degradación por parte de una o más enzimas seleccionadas del grupo constituido por: pepsina, quimotripsina, tripsina, enzima degradadora de insulina (IDE), elastasa, carboxipeptidasa, aminopeptidasa y catepsina D respecto a la insulina humana,
- 5 donde el aminoácido en la posición A14 es Glu, Asp o His, el aminoácido en la posición B25 es His y que comprende además opcionalmente una o más mutaciones adicionales, y donde T $\frac{1}{2}$ se incrementa al menos dos veces con relación a la insulina original.
2. Un análogo de insulina de acuerdo con la reivindicación 1, donde T $\frac{1}{2}$ se incrementa al menos 3 veces respecto a la insulina original.
- 10 3. Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde T $\frac{1}{2}$ se incrementa al menos 4 veces respecto a la insulina original.
4. Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde T $\frac{1}{2}$ se incrementa al menos 5 veces respecto a la insulina original.
- 15 5. Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde T $\frac{1}{2}$ se incrementa al menos 10 veces respecto a la insulina original.
6. Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además una o más mutaciones adicionales.
7. Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena A de fórmula 1:



20 Fórmula (1) (SEQ ID No:1)

y una secuencia de aminoácidos de la cadena B de fórmula 2:



Fórmula (2) (SEQ ID No:2)

donde

- Xaa_{A(-2)} está ausente o es Gly;
- 25 Xaa_{A(-1)} está ausente o es Pro;
- Xaa_{A0} está ausente o es Pro;
- Xaa_{A8} se selecciona independientemente entre Thr e His;
- Xaa_{A12} se selecciona independientemente entre Ser, Asp y Glu;
- Xaa_{A13} se selecciona independientemente entre Leu, Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser y Glu;
- 30 Xaa_{A14} se selecciona independientemente entre Asp, His y Glu;
- Xaa_{A15} se selecciona independientemente entre Gln, Asp y Glu;
- Xaa_{A18} se selecciona independientemente entre Asn, Lys y Gln;
- Xaa_{A21} se selecciona independientemente entre Asn y Gln;
- Xaa_{A22} está ausente o es Lys;
- 35 Xaa_{B(-2)} está ausente o es Gly;

Xaa_{B(-1)} está ausente o es Pro;

Xaa_{B0} está ausente o es Pro;

Xaa_{B1} está ausente o se selecciona independientemente entre Phe y Glu;

Xaa_{B2} está ausente o es Val;

5 Xaa_{B3} está ausente o se selecciona independientemente entre Asn y Gln;

Xaa_{B4} se selecciona independientemente entre Gln y Glu;

Xaa_{B10} se selecciona independientemente entre His, Asp, Pro y Glu;

Xaa_{B16} se selecciona independientemente entre Tyr, Asp, Gln, His, Arg y Glu;

Xaa_{B24} se selecciona independientemente entre Phe e His;

10 Xaa_{B25} es His;

Xaa_{B26} está ausente o se selecciona independientemente entre Tyr, His, Thr, Gly y Asp;

Xaa_{B27} está ausente o se selecciona independientemente entre Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser y Glu;

Xaa_{B28} está ausente o se selecciona independientemente entre Pro, His, Gly y Asp;

Xaa_{B29} está ausente o se selecciona independientemente entre Lys y Gln;

15 Xaa_{B30} está ausente o es Thr;

Xaa_{B31} está ausente o es Leu;

Xaa_{B32} está ausente o es Glu;

20 donde la secuencia de aminoácidos de la cadena A y la secuencia de aminoácidos de la cadena B están conectadas mediante puentes de disulfuro entre las cisteínas en la posición 7 de la cadena A y la cisteína en la posición 7 de la cadena B, y entre la cisteína en la posición 20 de la cadena A y la cisteína en la posición 19 de la cadena B y donde las cisteínas en la posición 6 y 11 de la cadena A están conectadas mediante un puente de disulfuro.

8. Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena A de fórmula 3:

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-XaaA8-Ser-Ile-Cys-XaaA12-XaaA13-XaaA14-XaaA15-Leu-Glu-XaaA18-Tyr-Cys-XaaA21

Fórmula (3) (SEQ ID No:3)

25 y una secuencia de aminoácidos de la cadena B de fórmula 4:

XaaB1-Val-XaaB3-XaaB4-His-Leu-Cys-Gly-Ser-XaaB10-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-XaaB16-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-XaaB24-His-XaaB26-XaaB27-XaaB28-XaaB29-XaaB30

Fórmula (4) (SEQ ID No:4)

donde

XaaA8 se selecciona independientemente entre Thr e His;

XaaA12 se selecciona independientemente entre Ser, Asp y Glu;

30 XaaA13 se selecciona independientemente entre Leu, Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser y Glu;

XaaA14 se selecciona independientemente entre Asp, His y Glu;

XaaA15 se selecciona independientemente entre Gln, Asp y Glu;

XaaA18 se selecciona independientemente entre Asn, Lys y Gln;

XaaA21 se selecciona independientemente entre Asn y Gln;

35 XaaB1 se selecciona independientemente entre Phe y Glu;

- XaaB3 se selecciona independientemente entre Asn y Gln;
- XaaB4 se selecciona independientemente entre Gln y Glu;
- XaaB10 se selecciona independientemente entre His, Asp, Pro y Glu;
- XaaB16 se selecciona independientemente entre Tyr, Asp, Gln, His, Arg y Glu;
- 5 XaaB24 se selecciona independientemente entre Phe e His;
- XaaB26 está ausente o se selecciona independientemente entre Tyr, His, Thr, Gly y Asp;
- XaaB27 está ausente o se selecciona independientemente entre Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser y Glu;
- XaaB28 está ausente o se selecciona independientemente entre Pro, His, Gly y Asp;
- 10 XaaB29 está ausente o se selecciona independientemente entre Lys y Gln;
- XaaB30 está ausente o es Thr;
- el extremo C se puede derivatizar opcionalmente como una amida;
- donde la secuencia de aminoácidos de la cadena A y la secuencia de aminoácidos de la cadena B están conectadas mediante puentes de disulfuro entre las cisteínas en la posición 7 de la cadena A y la cisteína en la posición 7 de la cadena B, y entre la cisteína en la posición 20 de la cadena A y la cisteína en la posición 19 de la cadena B y donde las cisteínas en la posición 6 y 11 de la cadena A están conectadas mediante un puente de disulfuro.
- 15
- 9.** Un análogo de insulina de acuerdo con la reivindicación 8, donde
- XaaA8 se selecciona independientemente entre Thr e His;
- XaaA12 se selecciona independientemente entre Ser y Glu;
- 20 XaaA13 se selecciona independientemente entre Leu, Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser y Glu;
- XaaA14 se selecciona independientemente entre Asp, His y Glu;
- XaaA15 se selecciona independientemente entre Gln y Glu;
- XaaA18 se selecciona independientemente entre Asn, Lys y Gln;
- XaaA21 se selecciona independientemente entre Asn y Gln;
- 25 XaaB1 se selecciona independientemente entre Phe y Glu;
- XaaB3 se selecciona independientemente entre Asn y Gln;
- XaaB4 se selecciona independientemente entre Gln y Glu;
- XaaB10 se selecciona independientemente entre His, Asp, Pro y Glu;
- XaaB16 se selecciona independientemente entre Tyr, Asp, Gln, His, Arg y Glu;
- 30 XaaB24 se selecciona independientemente entre Phe e His;
- XaaB26 se selecciona independientemente entre Tyr, Thr, Gly y Asp;
- XaaB27 se selecciona independientemente entre Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg y Glu; XaaB28 se selecciona independientemente entre Pro, Gly y Asp;
- XaaB29 se selecciona independientemente entre Lys y Gln;
- 35 XaaB30 está ausente o es Thr;
- el extremo C se puede derivatizar opcionalmente como una amida;
- donde la secuencia de aminoácidos de la cadena A y la secuencia de aminoácidos de la cadena B están conectadas mediante puentes de disulfuro entre las cisteínas en la posición 7 de la cadena A y la cisteína en la posición 7 de la cadena B, y entre la cisteína en la posición 20 de la cadena A y la cisteína en la posición 19 de la cadena B y donde las cisteínas en la posición 6 y 11 de la cadena A están conectadas mediante un puente de disulfuro.
- 40

- 10.** Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-9, donde el extremo C está derivatizado como una amida.
- 11.** Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-10, donde la secuencia de aminoácidos del extremo N de la cadena A está conectada a la secuencia de aminoácidos del extremo C de la cadena B mediante una secuencia de aminoácidos que comprende 3-7 aminoácidos para formar una molécula de insulina monocatenaria.
- 12.** Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-11, donde el extremo N de la cadena B se extiende con 1-10 aminoácidos.
- 13.** Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, donde se obtiene un incremento de la solubilidad respecto a la insulina original.
- 14.** Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, donde el aminoácido en la posición A14 es Glu, Asp o His, el aminoácido en la posición B25 es His y el aminoácido en la posición B30 se ha eliminado.
- 15.** Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, donde el aminoácido en la posición A14 es Glu, Asp o His y el aminoácido en la posición B25 es His.
- 16.** Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, donde la mutación adicional es desB30.
- 17.** Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, donde A14 es Glu.
- 18.** Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, que comprende menos de 8 modificaciones (sustituciones, deleciones, adiciones) respecto a la insulina original.
- 19.** Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, que comprende menos de 7 modificaciones (sustituciones, deleciones, adiciones) respecto a la insulina original.
- 20.** Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, que comprende menos de 6 modificaciones (sustituciones, deleciones, adiciones) respecto a la insulina original.
- 21.** Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, que comprende menos de 5 modificaciones (sustituciones, deleciones, adiciones) respecto a la insulina original.
- 22.** Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, que comprende menos de 4 modificaciones (sustituciones, deleciones, adiciones) respecto a la insulina original.
- 23.** Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, que comprende menos de 3 modificaciones (sustituciones, deleciones, adiciones) respecto a la insulina original.
- 24.** Un análogo de insulina de acuerdo con la reivindicación 1, que se selecciona del grupo constituido por:
- insulina humana A14E, B25H, desB30;
- insulina humana A14H, B25H, desB30;
- insulina humana A14E, B1 E, B25H, desB30;
- insulina humana A14E, B16E, B25H, desB30;
- insulina humana A14E, B25H, B28D, desB30;
- insulina humana A14E, B25H, B27E, desB30;
- insulina humana A14E, B1 E, B25H, B27E, desB30;
- insulina humana A14E, B1E, B16E, B25H, B27E, desB30;
- insulina humana A8H, A14E, B25H, desB30;
- insulina humana A8H, A14E, B25H, B27E, desB30;
- insulina humana A8H, A14E, B1E, B25H, desB30;
- insulina humana A8H, A14E, B1E, B25H, B27E, desB30;
- insulina humana A8H, A14E, B1E, B16E, B25H, B27E, desB30;

- insulina humana A8H, A14E, B16E, B25H, desB30;
 insulina humana A14E, B25H, B26D, desB30;
 insulina humana A14D, B25H, desB30;
 insulina humana A(-1)P, A(0)P, A14E, B25H, desB30;
- 5 insulina humana A14E, B(-1)P, B(0)P, B25H, desB30;
 insulina humana A(-1)P, A(0)P, A14E, B(-1)P, B(0)P, B25H, desB30;
 insulina humana A14E, B25H, B30T, B31L, B32E;
 insulina humana A14E, B25H;
 insulina humana A14E, B16H, B25H, desB30;
- 10 insulina humana A14E, B10P, B25H, desB30;
 insulina humana A14E, B10E, B25H, desB30;
 insulina humana A14E, B4E, B25H, desB30;
 insulina humana A14H, B16H, B25H, desB30;
 insulina humana A14H, B10E, B25H, desB30;
- 15 insulina humana A14E, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30;
 insulina humana A13H, A14E, B10E, B25H, desB30;
 insulina humana A13H, A14E, B25H, desB30;
 insulina humana A14E, A18Q, B3Q, B25H, desB30;
 insulina humana A14E, B24H, B25H, desB30;
- 20 insulina humana A8H, A14E, B10D, B25H, B26G, desB27, desB28, desB29, desB30;
 insulina humana A14E, B25H, desB26, desB27, desB28, desB29, desB30;
 insulina humana A14E, B25H, B26G, desB27, desB28, desB29, desB30;
 insulina humana A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30;
 insulina humana A14E, A18Q, A21Q, B3Q, B25H, desB30;
- 25 insulina humana A14E, A18Q, A21Q, B3Q, B25H, B27E, desB30;
 insulina humana A14E, A18Q, B3Q, B25H, desB30;
 insulina humana A13H, A14E, B1 E, B25H, desB30;
 insulina humana A13N, A14E, B25H, desB30;
 insulina humana A13N, A14E, B1 E, B25H, desB30;
- 30 insulina humana A(-2)G, A(-1)P, A(0)P, A14E, B25H, desB30;
 insulina humana A14E, B(-2)G, B(-1)P, B(0)P, B25H, desB30;
 insulina humana A(-2)G, A(-1)P, A(0)P, A14E, B(-2)G, B(-1)P, B(0)P, B25H, desB30;
 insulina humana A14E, B25H, B27R, B28D, B29K, desB30;
 insulina humana A14E, B25H, B26T, B27R, B28D, B29K, desB30;
- 35 insulina humana A14E, A18K, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30;
 insulina humana A14E, A22K, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30;
 insulina humana A14E, A22K, B25H, desB30;

ES 2 601 839 T3

- insulina humana A14E, desB1, desB2, desB3, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30;
insulina humana A14E, desB1, desB2, desB3, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27R, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27H, desB30;
- 5 insulina humana A14E, B25H, B27R, desB28-B30;
insulina humana A14E, B25H, B27H, desB28-B30;
insulina humana A14E, B25H, B27E, desB28-B30;
insulina humana A14E, B25H, B27K, desB28-B30;
insulina humana A14E, A18Q, B3Q, B25H, desB30;
- 10 insulina humana A13E, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A12E, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A15E, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B25H, desB27, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B26D, B27E, desB30;
- 15 insulina humana EEAEAEAPK-B(1-29)-B25H-AAK-A(1-21)-A14E;
insulina humana EEAEAPK-B(1-29)-B25H-DGK-A(1-21)-A14E;
insulina humana B(1-29)-B25H-AAK-A(1-21)-A14E;
insulina humana B(1-29)-B1E, B25H-AAK-A(1-21)-A14E;
insulina humana B(1-29)-B25H, B27E-AAK-A(1-21)-A8H, A14E;
- 20 insulina humana B(1-29)-B1E, B25H, B27E-AAK-A(1-21).ABH, A14E;
insulina humana EEAEAEAPK-B(1-29)-B16E, B25H-AAK-A(1-21)-A8H. insulina humana A14E;
insulina humana B(1-29)-B25H, B29Q-TGLGGGQ-A(1-21)-A14E;
insulina humana B(1-29)-B16E, B25H, B29Q-TGLGGGQ-A(1-21)-A14E;
insulina humana B(1-29)-B25H, B29Q-TGLGGGQ-A(1-21)-A8H, A14E;
- 25 insulina humana A14E, B25H, B27N, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27D, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27Q, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27G, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27K, desB30;
- 30 insulina humana A14E, B25H, B27P, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27S, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27T, desB30;
insulina humana A13R, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A13N, A14E, B25H, desB30;
- 35 insulina humana A13D, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A13Q, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A13G, A14E, B25H, desB30;

- insulina humana A13H, A14E, B25H, desB30;
 insulina humana A13K, A14E, B25H, desB30;
 insulina humana A13P, A14E, B25H, desB30;
 insulina humana A13S, A14E, B25H, desB30;
 5 insulina humana A13T, A14E, B25H, desB30;
 insulina humana A14E, B16R, B25H, desB30;
 insulina humana A14E, B16D, B25H, desB30;
 insulina humana A14E, B16Q, B25H, desB30;
 insulina humana A14E, B16E, B25H, desB30;
- 10 e
 insulina humana A8H, A14E, B10E, B25H, desB30.
- 25.** Un análogo de insulina de acuerdo con la reivindicación 1, que se selecciona del grupo constituido por:
 insulina humana A14E, B25H, desB30;
 insulina humana A14H, B25H, desB30;
- 15 insulina humana A14E, B1 E, B25H, desB30;
 insulina humana A14E, B16E, B25H, desB30;
 insulina humana A14E, B25H, B28D, desB30;
 insulina humana A14E, B25H, B27E, desB30;
 insulina humana A14E, B1 E, B25H, B27E, desB30;
- 20 insulina humana A14E, B1E, B16E, B25H, B27E, desB30;
 insulina humana A8H, A14E, B25H, desB30;
 insulina humana A8H, A14E, B25H, B27E, desB30;
 insulina humana A8H, A14E, B1E, B25H, desB30;
 insulina humana A8H, A14E, B1E, B25H, B27E, desB30;
- 25 insulina humana A8H, A14E, B1E, B16E, B25H, B27E, desB30;
 insulina humana A8H, A14E, B16E, B25H, desB30;
 insulina humana A14E, B25H, B26D, desB30;
 insulina humana A14D, B25H, desB30;
 insulina humana A(-1)P, A(0)P, A14E, B25H, desB30;
- 30 insulina humana A14E, B(-1)P, B(0)P, B25H, desB30;
 insulina humana A(-1)P, A(0)P, A14E, B(-1)P, B(0)P, B25H, desB30;
 insulina humana A14E, B25H, B30T, B31L, B32E;
 insulina humana A14E, B25H;
 insulina humana A14E, B16H, B25H, desB30;
- 35 insulina humana A14E, B10P, B25H, desB30;
 insulina humana A14E, B10E, B25H, desB30;
 insulina humana A14E, B4E, B25H, desB30;

ES 2 601 839 T3

- insulina humana A14H, B16H, B25H, desB30;
insulina humana A14H, B10E, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30;
insulina humana A13H, A14E, B10E, B25H, desB30;
- 5 insulina humana A13H, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A14E, A18Q, B3Q, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B24H, B25H, desB30;
insulina humana A8H, A14E, B10D, B25H, B26G, desB27, desB28, desB29, desB30;
insulina humana A14E, B25H, desB26, desB27, desB28, desB29, desB30;
- 10 insulina humana A14E, B25H, B26G, desB27, desB28, desB29, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30;
insulina humana A14E, A18Q, A21Q, B3Q, B25H, desB30;
insulina humana A14E, A18Q, A21Q, B3Q, B25H, B27E, desB30;
insulina humana A14E, A18Q, B3Q, B25H, desB30;
- 15 insulina humana A13H, A14E, B1 E, B25H, desB30;
insulina humana A13N, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A13N, A14E, B1 E, B25H, desB30;
insulina humana A(-2)G, A(-1)P, A(0)P, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B(-2)G, B(-1)P, B(0)P, B25H, desB30;
- 20 insulina humana A(-2)G, A(-1)P, A(0)P, A14E, B(-2)G, B(-1)P, B(0)P, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27R, B28D, B29K, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B26T, B27R, B28D, B29K, desB30;
insulina humana A14E, A18K, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30;
insulina humana A14E, A22K, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30;
- 25 insulina humana A14E, A22K, B25H, desB30;
insulina humana A14E, desB1, desB2, desB3, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30;
insulina humana A14E, desB1, desB2, desB3, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27R, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27H, desB30;
- 30 insulina humana A14E, B25H, B27R, desB28-B30;
insulina humana A14E, B25H, B27H, desB28-B30;
insulina humana A14E, B25H, B27E, desB28-B30;
insulina humana A14E, B25H, B27K, desB28-B30;
insulina humana A14E, A18Q, B3Q, B25H, desB30;
- 35 insulina humana A13E, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A12E, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A15E, A14E, B25H, desB30;

- insulina humana A14E, B25H, desB27, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B26D, B27E, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27N, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27D, desB30;
5 insulina humana A14E, B25H, B27Q, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27G, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27K, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27P, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27S, desB30;
10 insulina humana A14E, B25H, B27T, desB30;
insulina humana A13R, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A13N, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A13D, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A13Q, A14E, B25H, desB30;
15 insulina humana A13E, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A13G, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A13H, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A13K, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A13P, A14E, B25H, desB30;
20 insulina humana A13S, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A13T, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B16R, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B16D, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B16Q, B25H, desB30;
25 insulina humana A14E, B16E, B25H, desB30; e
insulina humana A8H, A14E, B10E, B25H, desB30.

26. Un análogo de insulina de acuerdo con la reivindicación 1, que se selecciona del grupo constituido por:

- insulina humana A14E, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B1 E, B25H, desB30;
30 insulina humana A14E, B16E, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B28D, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27E, desB30;
insulina humana A14E, B1 E, B25H, B27E, desB30;
insulina humana A14E, B1E, B16E, B25H, B27E, desB30;
35 insulina humana A8H, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A8H, A14E, B25H, B27E, desB30;
insulina humana A8H, A14E, B1E, B25H, desB30;

ES 2 601 839 T3

- insulina humana A8H, A14E, B1E, B25H, B27E, desB30;
insulina humana A8H, A14E, B1E, B16E, B25H, B27E, desB30;
insulina humana A8H, A14E, B16E, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B26D, desB30;
- 5 insulina humana A(-1)P, A(0)P, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B(-1)P, B(0)P, B25H, desB30;
insulina humana A(-1)P, A(0)P, A14E, B(-1)P, B(0)P, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B30T, B31L, B32E;
insulina humana A14E, B25H;
- 10 insulina humana A14E, B16H, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B10P, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B10E, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B4E, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30;
- 15 insulina humana A13H, A14E, B10E, B25H, desB30;
insulina humana A13H, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A14E, A18Q, B3Q, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B24H, B25H, desB30;
insulina humana A8H, A14E, B10D, B25H, B26G, desB27, desB28, desB29, desB30;
- 20 insulina humana A14E, B25H, desB26, desB27, desB28, desB29, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B26G, desB27, desB28, desB29, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30;
insulina humana A14E, B25H, desB26, desB27, desB28, desB29, desB30;
insulina humana A14E, A18Q, A21Q, B3Q, B25H, desB30;
- 25 insulina humana A14E, A18Q, A21Q, B3Q, B25H, B27E, desB30;
insulina humana A14E, A18Q, B3Q, B25H, desB30;
insulina humana A13H, A14E, B1 E, B25H, desB30;
insulina humana A13N, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A13N, A14E, B1 E, B25H, desB30;
- 30 insulina humana A(-2)G, A(-1)P, A(0)P, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B(-2)G, B(-1)P, B(0)P, B25H, desB30;
insulina humana A(-2)G, A(-1)P, A(0)P, A14E, B(-2)G, B(-1)P, B(0)P, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27R, B28D, B29K, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B26T, B27R, B28D, B29K, desB30;
- 35 insulina humana A14E, A18K, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30;
insulina humana A14E, A22K, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30;
insulina humana A14E, A22K, B25H, desB30;

ES 2 601 839 T3

- insulina humana A14E, desB1, desB2, desB3, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30;
insulina humana A14E, desB1, desB2, desB3, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27R, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27H, desB30;
- 5 insulina humana A14E, B25H, B27R, desB28-B30;
insulina humana A14E, B25H, B27H, desB28-B30;
insulina humana A14E, B25H, B27E, desB28-B30;
insulina humana A14E, B25H, B27K, desB28-B30;
insulina humana A14E, A18Q, B3Q, B25H, desB30;
- 10 insulina humana A13E, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A12E, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A15E, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B25H, desB27, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B26D, B27E, desB30;
- 15 insulina humana A14E, B25H, B27N, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27D, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27Q, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27G, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27K, desB30;
- 20 insulina humana A14E, B25H, B27P, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27S, desB30;
insulina humana A14E, B25H, B27T, desB30;
insulina humana A13R, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A13N, A14E, B25H, desB30;
- 25 insulina humana A13D, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A13Q, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A13G, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A13H, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A13K, A14E, B25H, desB30;
- 30 insulina humana A13P, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A13S, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A13T, A14E, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B16R, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B16D, B25H, desB30;
- 35 insulina humana A14E, B16Q, B25H, desB30;
insulina humana A14E, B16E, B25H, desB30; e
insulina humana A8H, A14E, B10E, B25H, desB30.

27. Un análogo de insulina de acuerdo con la reivindicación 1, que se selecciona del grupo constituido por:

- insulina humana A14E, B25H, desB30;
- insulina humana A14E, B1 E, B25H, desB30;
- insulina humana A14E, B16E, B25H, desB30;
- 5 insulina humana A14E, B25H, B28D, desB30;
- insulina humana A14E, B25H, B27E, desB30;
- insulina humana A8H, A14E, B25H, desB30;
- insulina humana A14E, B25H, B26D, desB30;
- insulina humana A14E, B25H;
- 10 insulina humana A14E, B16H, B25H, desB30;
- insulina humana A14E, B10P, B25H, desB30;
- insulina humana A14E, B10E, B25H, desB30;
- insulina humana A14E, B4E, B25H, desB30;
- insulina humana A13H, A14E, B25H, desB30;
- 15 insulina humana A14E, B24H, B25H, desB30;
- insulina humana A13N, A14E, B25H, desB30;
- insulina humana A14E, A22K, B25H, desB30;
- insulina humana A14E, B25H, B27R, desB30;
- insulina humana A14E, B25H, B27H, desB30;
- 20 insulina humana A13E, A14E, B25H, desB30;
- insulina humana A12E, A14E, B25H, desB30;
- insulina humana A15E, A14E, B25H, desB30;
- insulina humana A14E, B25H, desB27, desB30;
- insulina humana A14E, B25H, B27N, desB30;
- 25 insulina humana A14E, B25H, B27D, desB30;
- insulina humana A14E, B25H, B27Q, desB30;
- insulina humana A14E, B25H, B27G, desB30;
- insulina humana A14E, B25H, B27H, desB30;
- insulina humana A14E, B25H, B27K, desB30;
- 30 insulina humana A14E, B25H, B27P, desB30;
- insulina humana A14E, B25H, B27S, desB30;
- insulina humana A14E, B25H, B27T, desB30;
- insulina humana A13R, A14E, B25H, desB30;
- insulina humana A13N, A14E, B25H, desB30;
- 35 insulina humana A13D, A14E, B25H, desB30;
- insulina humana A13Q, A14E, B25H, desB30;
- insulina humana A13G, A14E, B25H, desB30;

- insulina humana A13H, A14E, B25H, desB30;
 insulina humana A13K, A14E, B25H, desB30;
 insulina humana A13P, A14E, B25H, desB30;
 insulina humana A13S, A14E, B25H, desB30;
 5 insulina humana A13T, A14E, B25H, desB30;
 insulina humana A14E, B16R, B25H, desB30;
 insulina humana A14E, B16D, B25H, desB30;
 insulina humana A14E, B16Q, B25H, desB30;
 insulina humana A14E, B16E, B25H, desB30; e
 10 insulina humana A14E, B25H, desB30.
- 28.** Un análogo de insulina de acuerdo con la reivindicación 1, que se selecciona del grupo constituido por:
 insulina humana A14E, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30
 insulina humana A8H, A14E, B25H, B27E, desB30
 insulina humana EEAEAEAPK-B(1-29)-B25H-AAK-A(1-21)-A14E
 15 insulina humana A8H, A14E, B1E, B25H, B27E, desB30
 insulina humana A14E, B25H, B28D, desB30
 insulina humana A14E, B25H, B26D, desB30
 insulina humana A14E, B25H, B27E, desB30
 insulina humana A8H, A14E, B25H, desB30
 20 insulina humana A8H,A14E,B10E,B25H,desB30
 insulina humana A14E, B25H, desB30
 insulina humana A14E, B1 E, B25H, B27E, desB30
 insulina humana A8H, A14E, B1E, B25H, desB30
 insulina humana A8H, A14E, B1E, B16E, B25H, B27E, desB30
 25 insulina humana A14D, B25H, desB30
 insulina humana A14E, B1E, B16E, B25H, B27E, desB30
 insulina humana A14E, B1 E, B25H, desB30
 insulina humana A14H, B25H, desB30
 insulina humana A14E, B25H
 30 insulina humana A8H, A14E, B16E, B25H, desB30; e
 insulina humana A14E, B16E, B25H, desB30.
- 29.** Un análogo de insulina de acuerdo con la reivindicación 1, que es insulina A14E, B25H, desB30.
30. Un análogo de insulina de acuerdo con la reivindicación 1, que es insulina humana A14E, B16E, B25H, desB30.
31. Un análogo de insulina de acuerdo con la reivindicación 1, que es insulina humana A14E, B16H, B25H, desB30.
 35 **32.** Un análogo de insulina de acuerdo con la reivindicación 1, que es insulina humana A14E, B25H, desB27, desB30.

- 5
- 33.** Una composición farmacéutica que comprende una cantidad biológicamente activa del análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 34.** Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-32 para su uso como un producto farmacéutico en el tratamiento o la prevención de la hiperglucemia, diabetes de tipo 2, intolerancia a la glucosa y diabetes de tipo 1.
- 35.** Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-32 para su uso como un producto farmacéutico con el fin de retrasar o prevenir la evolución de la enfermedad en la diabetes de tipo 2.
- 36.** Una secuencia de ácido nucleico que codifica un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-32.
- 10 **37.** Un proceso para preparar una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 33, que comprende mezclar un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-32 con sustancias y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Estabilidad proteolítica de los análogos de insulina frente a la quimotripsina

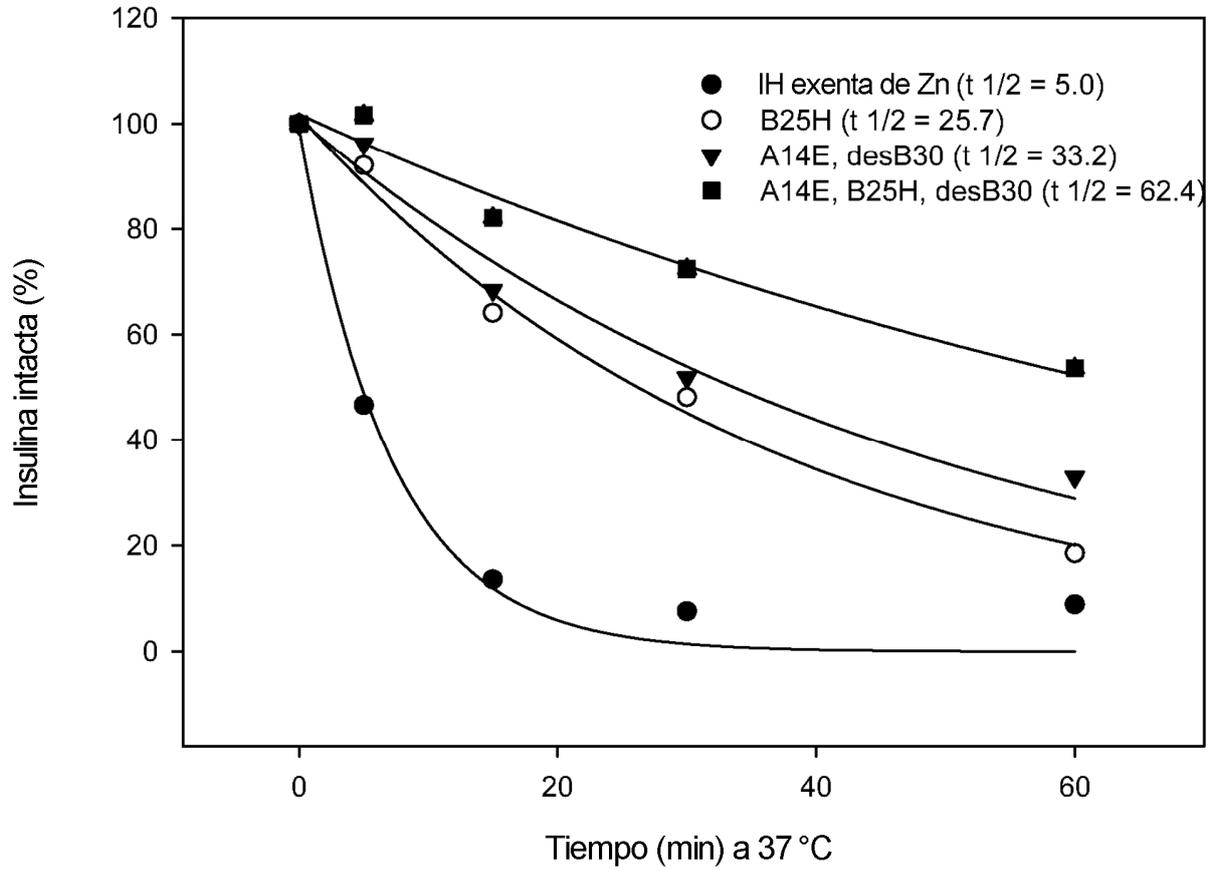


Fig. 1/2

Estabilidad proteolítica de la IH y los análogos de insulina frente a la pepsina

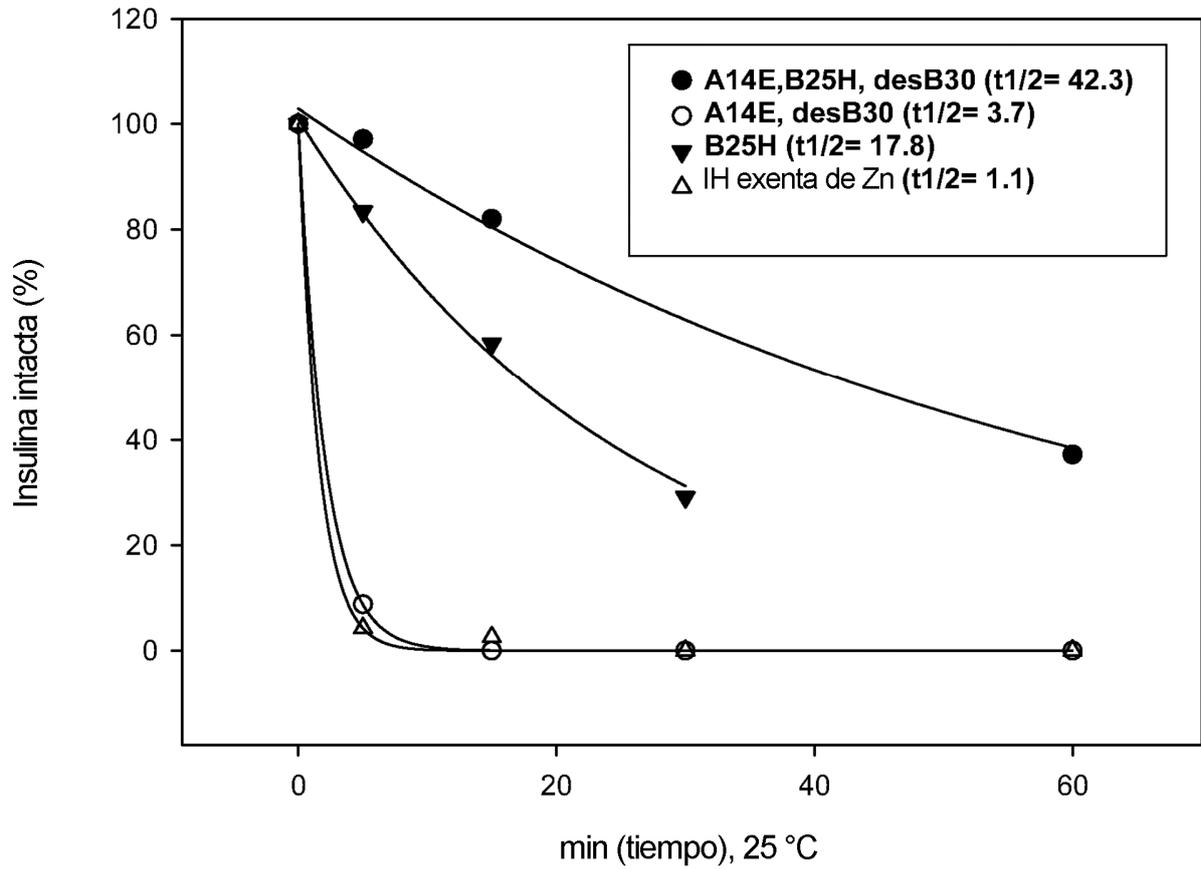


Fig. 2/2