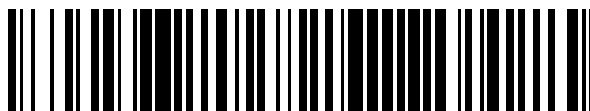


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 007**

51 Int. Cl.:

C07K 14/62 (2006.01)

A61K 38/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2009 E 14198513 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016 EP 2910570**

54 Título: **Análogos de insulina acilada, estabilizados frente a proteasas**

30 Prioridad:

18.03.2008 EP 08102708

28.11.2008 EP 08170231

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

04.05.2017

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)

Corporate Patents Novo Allé

2880 Bagsværd, DK

72 Inventor/es:

HOEG-JENSEN, THOMAS;

TAGMOSE, TINA MØLLER;

KJELDSEN, THOMAS BØRGLUM;

GLENDORF, TINE;

GARIBAY, PATRICK W.;

MADSEN, PETER;

JAKOBSEN, PALLE;

KODRA, JÁNOS TIBOR y

PETERSEN, JACOB STEN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 611 007 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 acilada, estabilizados frente a proteasas

CAMPO DE ESTA INVENCION

- 5 La presente invención se refiere a nuevos análogos de insulina acilada que muestran resistencia frente a proteasas, a un método para la preparación de tales análogos de insulina, a preparaciones de insulina que contienen los análogos de insulina de la invención y a un método de tratamiento de la diabetes mellitus que emplea estos análogos de insulina.

ANTECEDENTES DE ESTA INVENCION

- 10 La diabetes mellitus es un trastorno metabólico en el que se pierde parcial o completamente la capacidad de utilizar glucosa. Aproximadamente el 5% de todas las personas padece diabetes y el trastorno se acerca a proporciones epidémicas. Desde la introducción de la insulina en la década de los años 20, se han realizado esfuerzos continuos para mejorar el tratamiento de la diabetes mellitus. Dado que las personas que padecen diabetes están sometidas a un tratamiento crónico durante varias décadas, existe una gran necesidad de formulaciones de insulina seguras, convenientes y que mejoren la calidad de vida.

- 15 La vía oral es con creces la ruta utilizada más ampliamente para la administración de fármacos y en general está muy bien aceptada por los pacientes, especialmente para terapias crónicas. La administración de péptidos o proteínas terapéuticas se limita, sin embargo, frecuentemente a las vías parenterales en lugar de la administración oral preferida debido a diversas barreras, tales como la degradación enzimática en el tracto gastrointestinal (GI) y la mucosa intestinal, bombas de flujo de fármacos, una absorción insuficiente y variable desde la mucosa intestinal, así como el metabolismo de primer paso en el hígado.

- 20 Normalmente, las formulaciones de insulina se administran mediante inyección subcutánea. Sin embargo, la administración a través de otras vías, por ejemplo, oral o pulmonar, sería ventajosa debido a la aceptación del paciente, la seguridad y la comodidad. Algunas de las formulaciones de insulina disponibles comercialmente se caracterizan por un inicio rápido de la acción y otras formulaciones tienen un inicio relativamente lento, pero muestran una acción más o menos prolongada. Es muy importante para los pacientes diabéticos que haya en el mercado una gran variedad de insulinas con diferentes duraciones de la acción (perfiles de acción). En pocas palabras, las insulinas se pueden clasificar por ser de acción corta, intermedia o prolongada.

25 El documento WO 2008/034881 se refiere a ciertos análogos de insulina en donde al menos dos aminoácidos hidrófobos han sido sustituidos por aminoácidos hidrófilos, en donde estos análogos de insulina no están acilados.

- 30 El documento EP 2008/060733 y EP 2008/060733 se refiere a ciertos análogos de insulina acilada en donde el análogo de insulina comprende una elongación con un residuo de aminoácido o péptido conectado por el extremo C-terminal con el aminoácido A21.

- 35 El documento EP 2008/060734 se refiere a ciertas insulinas aciladas, en donde un resto acilo está fijado a la insulina de origen y en donde dicho resto acilo comprende unidades de repetición de aminoácidos que contienen alquilenglicol.

ASPECTOS DE ESTA INVENCION

Un aspecto se refiere a la provisión de análogos de insulina que, cuando se administran por vía oral, pueden proporcionar un control satisfactorio del nivel de glucosa en sangre.

- 40 Otro aspecto se refiere a la provisión de análogos de insulina que, cuando se administran por vía oral, pueden proporcionar una disminución prolongada del nivel de glucosa

Otro aspecto se refiere a la provisión de análogos de insulina basal que, cuando se administran por vía oral, pueden proporcionar una disminución prolongada del nivel de glucosa

Otro aspecto se refiere a la provisión de análogos de insulina basal que, cuando se administran por vía oral, pueden proporcionar un control satisfactorio del nivel de glucosa en sangre después de una administración tres veces al día.

- 45 Otro aspecto se refiere a la provisión de análogos de insulina basal que, cuando se administran por vía oral, pueden proporcionar un control satisfactorio del nivel de glucosa en sangre después de una administración dos veces al día.

Otro aspecto se refiere a la provisión de análogos de insulina basal que, cuando se administran por vía oral, pueden proporcionar un control satisfactorio del nivel de glucosa en sangre después de una administración una vez al día.

Otro aspecto se refiere a la provisión de análogos de insulina basal que son hidrófilos.

- 50 Otro aspecto se refiere a la provisión de análogos de insulina basal que son más hidrófilos que la insulina humana.

Otro aspecto se refiere a la provisión de análogos de insulina basal que son menos hidrófobos que la insulina humana, según se mide por la hidrofobicidad relativa (k_{rel}) como se describe en el presente documento.

5 Otro aspecto se refiere a la provisión de análogos de insulina basal que son menos hidrófobos que las insulinas de origen no estabilizadas frente a proteasas similares, aciladas con el mismo resto acilo, tal como se mide por la hidrofobicidad relativa (k_{rel}) como se describe en el presente documento. La k_{rel} de los análogos de insulina basal de la invención es preferiblemente menor de 5, más preferiblemente menor de 3, más preferiblemente menor de 2, más preferiblemente menor de 1, más preferiblemente menor de 0,8, más preferiblemente menor de 0,6, más preferiblemente menor de 0,5, más preferiblemente menor de 0,4, más preferiblemente menor de 0,3, más preferiblemente menor de 0,2, más preferiblemente menor de 0,1.

10 Otro aspecto se refiere a la provisión de análogos de insulina basal que, cuando se administran por vía oral, tienen biodisponibilidades satisfactorias. En comparación con las biodisponibilidades de insulinas aciladas similares sin las mutaciones que estabilizan frente a proteasas, proporcionadas en dosis similares, la biodisponibilidad de compuestos preferidos de esta invención es al menos un 10% mayor, preferiblemente un 20% mayor, preferiblemente un 25% mayor, preferiblemente un 30% mayor, preferiblemente un 35% mayor, preferiblemente un 40% mayor, preferiblemente un 45% mayor, preferiblemente un 50% mayor, preferiblemente un 55% mayor, preferiblemente un 60% mayor, preferiblemente un 65% mayor, preferiblemente un 70% mayor, preferiblemente un 80% mayor, preferiblemente un 90% mayor, preferiblemente un 100% mayor, preferentemente más de un 100% mayor que la del comparador no estabilizado frente a proteasas.

20 Otro aspecto se refiere a la provisión de análogos de insulina basal que, cuando se administran por vía oral, tienen biodisponibilidades satisfactorias. Las biodisponibilidades de compuestos preferidos de esta invención (con respecto a una administración *i.v.*) son al menos del 0,3%, preferiblemente >0,5%, preferiblemente >1%, preferiblemente >1,5%, preferiblemente >2%, preferiblemente >2,5%, preferiblemente >3%, preferiblemente >3,5%, preferiblemente >4%, preferiblemente >5%, preferiblemente >6%, preferiblemente >7%, preferiblemente >8%, preferiblemente >9%, preferiblemente >10%.

25 Otro aspecto se refiere a la provisión de análogos de insulina basal, que, cuando se administran mediante infusión intravenosa, tienen potencias satisfactorias. En comparación con la potencia de la insulina humana, las potencias de los análogos de insulina de la invención preferidos estabilizados frente a proteasas, son preferiblemente >5%, preferiblemente >10%, preferiblemente >20%, preferiblemente >30%, preferiblemente >40%, preferiblemente >50%, preferiblemente >75% y preferiblemente >100%.

30 Otro aspecto se refiere a la provisión de análogos de insulina que, cuando se administran por vía pulmonar, pueden proporcionar un control satisfactorio del nivel de glucosa en sangre.

Otro aspecto se refiere a la provisión de análogos de insulina que, cuando se administran por vía pulmonar, pueden proporcionar un control satisfactorio del nivel de glucosa en sangre con un inicio relativamente lento de la acción y/o una acción más o menos prolongada.

35 Otro aspecto se refiere a la provisión de análogos de insulina que tienen una acción prolongada satisfactoria después de la administración por vía pulmonar. En comparación con una insulina acilada similar sin mutaciones que estabilizan frente a proteasas, proporcionada en dosis similares, la duración de la acción de los compuestos preferidos de esta invención es al menos un 10% más larga, preferiblemente un 20% más larga, preferiblemente un 25% más larga, preferiblemente un 30% más larga, preferiblemente un 35% más larga, preferiblemente un 40% más larga, preferiblemente un 45% más larga, preferiblemente un 50% más larga, preferiblemente un 55% más larga, preferiblemente un 60% más larga, preferiblemente un 65% más larga, preferiblemente un 70% más larga, preferiblemente un 80% más larga, preferiblemente un 90% más larga, preferiblemente un 100% más larga, preferiblemente más de un 100% más larga que la del comparador. La duración de la acción se puede medir por el tiempo que se suprime la glucosa en sangre, o midiendo las propiedades farmacocinéticas relevantes, por ejemplo $t_{1/2}$ o TRM (tiempo de residencia medio).

45 Otro aspecto se refiere a la provisión de análogos de insulina que tienen una biodisponibilidad pulmonar satisfactoria. En comparación con la biodisponibilidad de la insulina humana o en comparación con una insulina acilada similar sin mutaciones que estabilicen frente a proteasas, proporcionada en dosis similares, la biodisponibilidad de los compuestos preferidos de esta invención es al menos un 10% superior, preferiblemente un 20% superior, preferiblemente un 25% superior, preferiblemente un 30% superior, preferiblemente un 35% superior, preferiblemente un 40% superior, preferiblemente un 45% superior, preferiblemente un 50% superior, preferiblemente un 55% superior, preferiblemente un 60% superior, preferiblemente un 65% superior, preferiblemente un 70% superior, preferiblemente un 80% superior, preferiblemente un 90% superior, preferiblemente un 100% superior, preferentemente más de 100% superior a la del comparador.

50 Otro aspecto se refiere a la provisión de análogos de insulina que tienen una potencia aparente *in vivo* incrementada.

Otro aspecto se refiere a la provisión de insulinas de acción prolongada con biodisponibilidad oral.

Otro aspecto se refiere a la provisión de análogos de insulina que tienen una mayor estabilidad proteolítica, en comparación con la estabilidad de la insulina humana. En comparación con la insulina humana, la estabilidad proteolítica de compuestos preferidos de esta invención es al menos 2 veces más estable, preferiblemente 3 veces más estable, preferiblemente 4 veces más estable, preferiblemente 5 veces más estable, preferiblemente 6 veces más estable, preferiblemente 7 veces más estable, preferiblemente 8 veces más estable, preferiblemente 9 veces más estable, preferiblemente 10 veces más estable, preferiblemente 12 veces más estable, preferiblemente 14 veces más estable, preferiblemente 16 veces más estable, preferiblemente 18 veces más estable, preferiblemente 20 veces más estable, preferiblemente 25 veces más estable, preferiblemente más de 25 veces más estable que la del comparador. La estabilidad proteolítica se puede medir mediante la exposición de las insulinas a (una mezcla de) enzimas proteolíticas, por ejemplo, un extracto de enzimas intestinales, tal como se describe en el presente documento.

El objeto es superar o mejorar al menos una de las desventajas de la técnica anterior, o proporcionar una alternativa útil.

DEFINICIONES

En este documento, el término **insulina** incluye insulinas que se producen en la naturaleza, por ejemplo, la insulina humana, así como análogos de insulina de la misma. La insulina humana consiste en dos cadenas de polipéptidos, denominadas cadenas A y B que contienen 21 y 30 residuos de aminoácidos, respectivamente, y que están interconectadas por dos puentes disulfuro entre cisteínas.

En este documento, la expresión **residuo de aminoácido** incluye un aminoácido a partir del cual se ha eliminado un átomo de hidrógeno de un grupo amino y/o se ha eliminado un grupo hidroxilo de un grupo carboxi y/o se ha eliminado un átomo de hidrógeno de un grupo mercapto. En general, un residuo de aminoácido se puede designar un aminoácido.

En este documento, **aminoácidos hidrófobos** han de entenderse como 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 abreviatura de tres letras y de una letra entre paréntesis).

En este documento, **aminoácidos hidrófilos** han de entenderse como 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 a partir del grupo que consiste en: 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 a partir del grupo que consiste en: ácido glutámico (Glu, E), ácido aspártico (Asp, D), histidina (His, H), glutamina (Gln, Q), asparagina (Asn, N), lisina (Lys, K) y arginina (Arg, R).

En este documento, la expresión **análogo de insulina** incluye un polipéptido que tiene una estructura molecular que formalmente se puede obtener a partir de la estructura de una insulina de origen natural, por ejemplo, insulina humana, mediante la delección y/o la sustitución (reemplazo) de uno o varios residuos de aminoácidos presentes en la insulina natural y/o mediante la adición de uno o varios residuos de aminoácidos. Los residuos de aminoácidos añadidos y/o sustituidos pueden ser residuos de aminoácidos codificables u otros residuos de aminoácidos de origen natural o residuos de aminoácidos puramente sintéticos. En una realización preferida, el análogo de insulina tiene dos o más mutaciones en comparación con la insulina humana.

En este documento, la expresión **insulina estabilizada frente a proteasas** significa la insulina sin un resto acilo anexo. Dichas insulinas estabilizadas frente a proteasas tienen una estabilidad mejorada frente a la degradación de las proteasas.

En este documento, la expresión **insulina de origen** significa la insulina sin un resto acilo anexo y sin mutaciones para mejorar la estabilidad frente a la degradación de las proteasas. Dichas insulinas de origen tienen opcionalmente mutaciones con respecto a la insulina humana. Las insulinas de origen son por lo tanto también análogos de insulina como se han definido anteriormente. En este documento, las expresiones insulina de origen e **insulina no estabilizada frente a proteasas** incluyen los mismos compuestos.

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

En este documento, la expresión **análogos de la cadena A** y **análogos de las cadenas B** de la insulina humana incluye cadenas A y B de la insulina humana, respectivamente, que tienen una o varias sustituciones, delecciones y/o extensiones (adiciones) de las cadenas de aminoácidos A y B, respectivamente, en relación con las cadenas A y B, respectivamente, de la insulina humana.

En este documento, términos tales como **A1**, **A2**, **A3**, etc. indican la posición 1, 2 y 3, respectivamente, en la cadena A de la insulina (numerada desde el extremo N-terminal). Del mismo modo, términos tales como **B1**, **B2**, **B3**, etc. indican la posición 1, 2 y 3, respectivamente, en la cadena B de la insulina (numerada desde el extremo N-terminal). Al emplear los códigos de una letra para los aminoácidos, términos como A21A, A21G y A21Q designan que el ami-

noácido en la posición A21 es A, G y Q, respectivamente. Con el empleo de los códigos de tres letras para los aminoácidos, las expresiones correspondientes son AlaA21, GlyA21 y GlnA21, respectivamente.

- 5 En este documento, los términos A(0) o B(0) indican las posiciones que son adyacentes N-terminalmente a las posiciones A1 o B1, respectivamente, en las cadenas A o B, respectivamente. Los términos A(-1) o B(-1) indican las posiciones de los primeros aminoácidos N-terminalmente de A(0) o B(0), respectivamente. Por lo tanto A(-2) y B(-2) indican las posiciones N-terminalmente de A(-1) y B(-1), respectivamente, A(-3) y B(-3) indican las posiciones N-terminalmente de A(-2) y B(-2), respectivamente, y así sucesivamente.

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

- 10 En este documento, la expresión "**insulina de acción rápida**" incluye una insulina que tiene un inicio de la acción más rápido que la insulina humana normal o regular.

- 15 En este documento, la expresión "**insulina de acción prolongada**" o la expresión "**insulina basal**" incluye una insulina que tiene una duración de la acción más prolongada que la insulina humana normal o regular. Preferiblemente, el tiempo de acción es superior a 5 u 8 horas, en particular de al menos 9 horas. Preferiblemente, la insulina basal tiene un tiempo de acción de al menos 10 horas. La insulina basal puede, por lo tanto, tener un tiempo de acción en el intervalo desde aproximadamente 8 a 24 horas, preferiblemente en el intervalo desde aproximadamente 9 a aproximadamente 15 horas.

La numeración de las posiciones en los análogos de insulina, en las insulinas y en las cadenas A y B se lleva a cabo de manera que el compuesto de origen es insulina humana con la numeración utilizada en el mismo.

- 20 En este documento, la expresión "**insulina acilada**" incluye la modificación de una insulina mediante la fijación de uno o varios restos acilo a través de un enlazador, a la insulina estabilizada frente a proteasas.

- 25 Por insulina acilada que tiene **actividad de insulina** se entiende una insulina acilada con capacidad de disminuir la glucosa en sangre en mamíferos, tal y como se mide en un modelo animal adecuado, que puede ser, por ejemplo, un modelo de rata, conejo o cerdo, después de una administración adecuada, por ejemplo, mediante administración intravenosa o subcutánea, o una afinidad de unión al receptor de insulina.

En este documento, el término **alquilo** incluye un grupo hidrocarbonado saturado, ramificado o lineal.

En este documento, el término **alcoxi** incluye el radical "alquil-O-". Ejemplos representativos son metoxi, etoxi, propoxi (p. ej., 1-propoxi y 2-propoxi), butoxi (p. ej., 1-butoxi, 2-butoxi y 2-metil-2-propoxi), pentoxi (1-pentoxi y 2-pentoxi), hexoxi (1-hexoxi y 3-hexoxi), y similares.

- 30 En este documento, el término **alquileo** incluye un grupo hidrocarburo bivalente saturado, ramificado o lineal que tiene de 1 a 12 átomos de carbono. Ejemplos representativos incluyen, pero no se limitan a, metileno; 1,2-etileno; 1,3-propileno; 1,2-propileno; 1,3-butileno; 1,4-butileno; 1,4-pentileno; 1,5-pentileno; 1,5-hexileno; 1,6-hexileno; y similares.

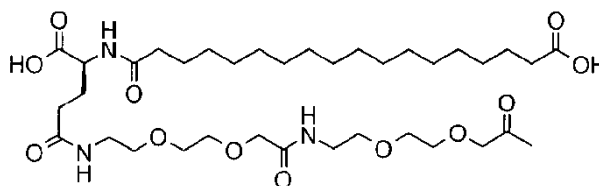
- 35 En este documento, la expresión "**aminoácido lineal neutro**" incluye ejemplos no limitantes de aminoácidos lineales neutros.

En este documento, la expresión "**aminoácido cíclico**" incluye ejemplos no limitantes de aminoácidos cíclicos. En este documento, la expresión "**aminoácidos ácidos**" incluye ejemplos no limitantes de aminoácidos ácidos.

- 40 En este documento, la expresión "**ácido graso**" incluye ácidos carboxílicos alifáticos, lineales o ramificados, que tienen al menos dos átomos de carbono y están saturados o insaturados. Ejemplos no limitativos de ácidos grasos son ácido mirístico, ácido palmítico y ácido esteárico.

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

- 45 En este documento, la denominación de las insulinas se realiza de acuerdo con los siguientes principios: Los nombres se dan como mutaciones y modificaciones (acilaciones) en relación con la insulina humana. Para la denominación del resto acilo, la denominación se realiza de acuerdo con la nomenclatura de la IUPAC y en otros casos como la nomenclatura de péptidos. Por ejemplo, la denominación del resto acilo:



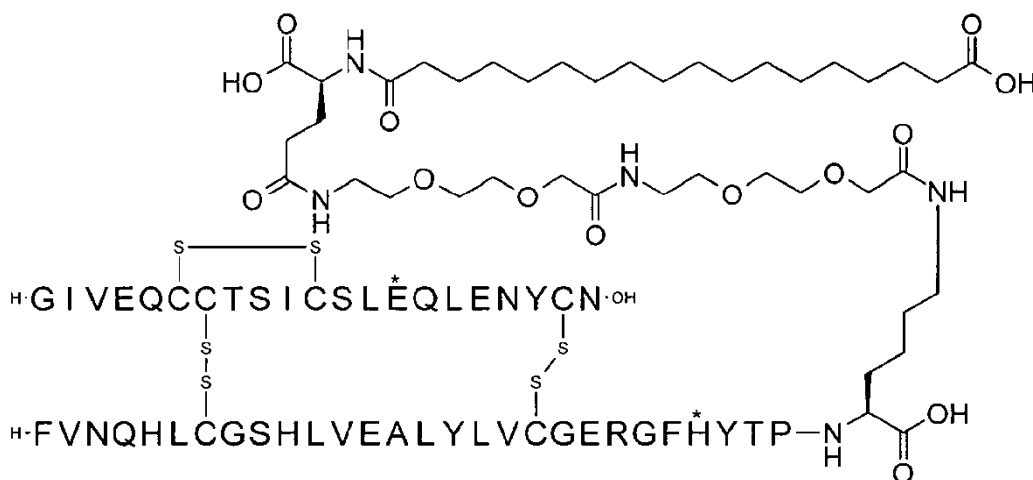
puede ser por ejemplo "octadecanodioil-γGlu-OEG-OEG", o "17-carboxiheptadecanoil-γGlu-OEG-OEG", en donde OEG es la abreviatura del aminoácido $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, γGlu es la abreviatura del aminoácido ácido gamma glutámico.

5 Otras abreviaturas de aminoácidos son, por ejemplo:

PEG3 es $\text{NH}_2((\text{CH}_2)_2\text{O})_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$

PEG7 es $\text{NH}_2((\text{CH}_2)_2\text{O})_8\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$

Por ejemplo, la insulina del ejemplo 9 (con la secuencia/estructura proporcionada a continuación) se denomina "insulina humana A14E, B25H, B29K(N^εOctadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30" para indicar que el aminoácido en la posición A14, Y en la insulina humana, se ha mutado a E, el aminoácido en la posición B25, F en la insulina humana, se ha mutado a H, el aminoácido en la posición B29, K como en la insulina humana, ha sido modificado por acilación en el nitrógeno épsilon en el residuo de lisina de B29, denominado N^ε, por el residuo octadecanodioil-γGlu-OEG-OEG, y el aminoácido en la posición B30, T en la insulina humana, ha sido eliminado. Los asteriscos en la fórmula a continuación indican que el residuo en cuestión es diferente (es decir, está mutado), en comparación con la insulina humana. A lo largo de esta solicitud se proporcionan ambas fórmulas y nombres de las insulinas preferidas de la invención.



En este documento, la expresión "estabilidad química" y "estabilidad química elevada", significan que químicamente, las insulinas de la invención son suficientemente estables en la formulación deseada. Es decir que los productos de degradación química se forman solo en cantidades que no comprometen la vida útil del producto farmacéutico final. Los productos de degradación química incluyen productos de desamidación, formación de iso-aspartato, formación de dímeros, productos de racemización, productos resultantes de procesos de deshidratación, *etcétera*. La estabilidad química se puede medir mediante análisis de HPLC de muestras o formulaciones envejecidas.

En este documento, la expresión "**estabilidad física elevada**" incluye que una tendencia a la fibrilación es menos del 50% de la de la insulina humana. La fibrilación puede ser descrita por el tiempo de retardo antes de que se inicie la formación de fibrillas en determinadas condiciones.

Un polipéptido con **afinidad hacia el receptor de insulina y el receptor de IGF-1** es un polipéptido que es capaz de interactuar con un receptor de insulina y un receptor de IGF-1 humano en un ensayo de unión adecuado. Tales ensayos con receptores son bien conocidos dentro de la técnica y se describen con más detalle en los ejemplos. La presente insulina acilada no se une al receptor de IGF-1 o tendrá una afinidad más bien baja hacia dicho receptor. Más precisamente, las insulinas aciladas de esta invención tendrán una afinidad hacia el receptor de IGF-1 con sustancialmente la misma magnitud o menor que la de la insulina humana.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" tal y como se emplea en la presente memoria, significa adecuado para aplicaciones farmacéuticas normales, es decir, que no produce ningún evento adverso grave en pacientes, etc.

Los términos **tratamiento** y **tratar** tal y como se emplean en la presente memoria, significan el control y el cuidado de un paciente con el fin de combatir una enfermedad, un trastorno o una afección. El término se entiende que incluye el retraso de la progresión de la enfermedad, trastorno o afección, el alivio o la atenuación de los síntomas y complicaciones, y/o la cura o la eliminación de la enfermedad, trastorno o afección. El paciente que se va a tratar es preferiblemente un mamífero, en particular un ser humano.

La expresión **tratamiento de una enfermedad**, tal como se utiliza en la presente memoria, significa el control y el cuidado de un paciente que ha desarrollado la enfermedad, afección o trastorno. El objetivo del tratamiento es combatir la enfermedad, afección o trastorno. El tratamiento incluye la administración de los compuestos activos para eliminar o controlar la enfermedad, afección o trastorno, así como para aliviar los síntomas o complicaciones asociadas a la enfermedad, afección o trastorno.

La expresión **prevención de una enfermedad**, tal y como se emplea en el presente documento, se define como el control y el cuidado de un individuo que tiene riesgo de desarrollar la enfermedad, antes de la aparición clínica de la enfermedad. El objetivo de la prevención es combatir el desarrollo de la enfermedad, afección o trastorno, e incluye la administración de los compuestos activos para prevenir o retrasar la aparición de los síntomas o complicaciones y prevenir o retrasar el desarrollo de enfermedades, afecciones o trastornos relacionados.

La expresión **cantidad eficaz** tal y como se emplea en este documento, significa una dosificación que es suficiente para que el tratamiento del paciente sea eficaz, en comparación con una ausencia de tratamiento.

POT es el gen de la triosa fosfato isomerasa de *Schizosaccharomyces pombe*, y **TPI1** es el gen de la triosa fosfato isomerasa de *S. cerevisiae*.

Por **líder** se entiende una secuencia de aminoácidos que consiste en un pre-péptido (el péptido señal) y un pro-péptido.

La expresión **péptido señal** se entiende que significa un pre-péptido que está presente como una secuencia N-terminal en la forma precursora de una proteína. La función del péptido señal es permitir que la proteína heteróloga facilite la translocación en el retículo endoplásmico. El péptido señal se elimina por escisión normalmente durante el curso de este proceso. El péptido señal puede ser heterólogo u homólogo al organismo de levadura que produce la proteína. Se puede emplear una variedad de péptidos señal en la estructura artificial de ADN, que incluyen el péptido señal de la proteasa aspártica de levadura 3 (YAP3) o cualquier análogo funcional (Egel-Mitani et al. (1990) YE-AST 6:127-137 y el documento de EE.UU. 5.726.038) y la señal del factor α del gen *MFa1* (Thorner (1981) en The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Strathern et al., compiladores, págs. 143-180, Cold Spring Harbor Laboratory, NY y el documento de EE.UU. 4.870.00).

En este documento, el término **"pro-péptido"** incluye una secuencia polipeptídica cuya función es permitir que el polipéptido expresado se dirija desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi y adicionalmente a una vesícula secretora para la secreción al medio de cultivo (es decir, exportación del polipéptido a través de la pared celular o al menos a través de la membrana celular en el espacio periplásmico de la célula de levadura). El pro-péptido puede ser el pro-péptido del factor α de la levadura, véanse los documentos de EE.UU. 4.546.082 y 4.870.008. Como alternativa, el pro-péptido puede ser un pro-péptido sintético, es decir, un pro-péptido no encontrado en la naturaleza. Pro-péptidos sintéticos adecuados son los descritos en los documentos de EE.UU. 5.395.922; 5.795.746; 5.162.498 y WO 98/32867. El pro-péptido contendrá preferiblemente un sitio de procesamiento de endopeptidasa en el extremo C-terminal, tal como una secuencia Lys-Arg o cualquier análogo funcional de la misma.

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

SUMARIO DE LA INVENCION

Se ha descubierto que las insulinas que están estabilizadas frente a la degradación proteolítica (por mutaciones específicas) y que están aciladas en la lisina B29, son eficaces y tienen acción prolongada y poseen un potencial elevado como insulinas de acción prolongada que se pueden administrar por vía oral o pulmonar. La acilación confiere la unión a albúmina sérica, y, en consecuencia, la acción prolongada. Además, las insulinas aciladas de la invención muestran una reducción sustancial de la afinidad hacia receptores de insulina, en comparación con las insulinas aciladas similares que no están estabilizadas frente a una degradación proteolítica. Esta reducción de la afinidad hacia el receptor de insulina de las insulinas unidas a albúmina de la invención, contribuye a la acción prolongada de la insulina acilada en circulación, ya que la insulina se internaliza y se degrada después de la activación del receptor. Por lo tanto, se reduce el aclaramiento de las insulinas de la invención. La reducción de la afinidad hacia el receptor de insulina, probablemente no causa una pérdida de potencia, por ejemplo, tal como se mide en la "clamp" (estado estacionario) hiperinsulinémica euglucémica como se describe en el presente documento. La combinación de una afinidad elevada hacia la unión a albúmina y una afinidad reducida hacia el receptor de insulina es, por lo tanto, beneficiosa para la obtención de una larga duración de la acción de las insulinas (insulinas basales). Además, después de una administración oral, estas insulinas aciladas tienen un mayor grado de biodisponibilidad que las insulinas aciladas conocidas similares, que no están estabilizadas frente a la degradación proteolítica. Por lo

tanto, estos análogos de insulina acilada son valiosos para la administración oral. Del mismo modo, después de una administración por vía pulmonar, estas insulinas aciladas estabilizadas frente a proteasas muestran una mayor potencia y/o biodisponibilidad aparente que las insulinas aciladas conocidas similares, que no están estabilizadas frente a la degradación proteolítica. Por otra parte, estas insulinas aciladas estabilizadas frente a proteasas muestran

5 unos perfiles de acción prolongada temporalmente cuando se administran por vía pulmonar a mamíferos. Por lo tanto, estos análogos de insulina acilada son valiosos para la administración por vía pulmonar.

Las insulinas mencionadas anteriormente que están estabilizadas frente a una degradación proteolítica se denominan en el presente documento insulinas estabilizadas frente a proteasas.

10 La molécula de insulina estabilizada frente a proteasas tiene un número limitado de residuos de aminoácidos de origen natural, sustituidos con otros residuos de aminoácidos, respecto a la insulina humana, tal y como se explica en la parte detallada de la memoria descriptiva.

En una realización, esta descripción se refiere a una insulina acilada, en donde el análogo de insulina estabilizado frente a proteasas se desvía de la insulina humana por una o varias de las siguientes delecciones o sustituciones: Q en la posición A18, A, G o Q en la posición A21, G o Q en la posición B1 o ningún residuo de aminoácido en la posición B1, Q, S o T en la posición B3 o ningún residuo de aminoácido en la posición B3, Q en la posición B13, ningún residuo de aminoácido en la posición B27, D, E o R en la posición B28 y ningún aminoácido en la posición B30.

En todavía un aspecto adicional, esta descripción se refiere a preparaciones farmacéuticas que comprenden la insulina acilada de esta invención y adyuvantes y aditivos adecuados tales como uno o varios agentes adecuados para la estabilización, conservación o isotonización, por ejemplo, iones de zinc, fenol, cresol, un parabeno, cloruro de sodio, glicerol o manitol. El contenido en zinc de las presentes formulaciones puede estar entre 0 y aproximadamente 6 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina. El valor del pH de la preparación farmacéutica puede estar entre aproximadamente 4 y aproximadamente 8,5, entre aproximadamente 4 y aproximadamente 5 o entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5.

En una realización adicional, la descripción se refiere al uso de la insulina acilada como un producto farmacéutico para la reducción de los niveles de glucosa en sangre en mamíferos, en particular para el tratamiento de la diabetes.

En un aspecto adicional, esta descripción se refiere al uso de la insulina acilada para la preparación de una preparación farmacéutica para la reducción del nivel de glucosa en sangre en mamíferos, en particular para el tratamiento de la diabetes.

En una realización adicional, esta descripción se refiere a un método para reducir el nivel de glucosa en sangre en mamíferos mediante la administración de una dosis terapéuticamente activa de una insulina acilada de esta invención a un paciente que requiere tal tratamiento.

En un aspecto adicional, las insulinas aciladas se administran en combinación con una o varias sustancias activas adicionales en cualquier proporción adecuada. Tales agentes activos adicionales se pueden seleccionar a partir de insulina humana, análogos de insulina de acción rápida, agentes antidiabéticos, agentes antihiperlipidémicos, agentes antiobesidad, agentes antihipertensivos y agentes para el tratamiento de complicaciones resultantes o asociadas con la diabetes.

En una realización, los dos componentes activos se administran como una preparación farmacéutica mixta. En otra realización, los dos componentes se administran por separado, ya sea de forma simultánea o secuencial.

En una realización, las insulinas aciladas de esta invención se pueden administrar junto con insulina humana de acción rápida o análogos de insulina humana. Tal análogo de insulina de acción rápida puede ser uno en el que el residuo de aminoácido en la posición B28 es Asp, Lys, Leu, Val o Ala, y el residuo de aminoácido en la posición B29 es Lys o Pro, insulina humana des(B28-B30), insulina humana des(B27) o insulina humana des(B30), y un análogo en el que el residuo de aminoácido en la posición B3 es Lys y el residuo de aminoácido en la posición B29 es Glu o Asp. La insulina acilada de esta invención y la insulina humana de acción rápida o el análogo de insulina humana se pueden mezclar en una proporción desde aproximadamente 90% de la insulina acilada a aproximadamente 10% de la insulina humana de acción rápida o el análogo de insulina humana; preferiblemente desde aproximadamente 70% de la insulina acilada a aproximadamente 30% de la insulina humana de acción rápida o el análogo de insulina humana, y aún más preferentemente desde aproximadamente 50% de la insulina acilada a aproximadamente 50% de la insulina humana de acción rápida o el análogo de insulina humana (siendo el %, porcentaje en peso).

50 Las insulinas aciladas de esta invención también se pueden usar en un tratamiento combinado junto con un agente antidiabético.

Los agentes antidiabéticos incluirán insulina, GLP-1(1-37) (péptido similar a glucagón 1) descrito en los documentos WO 98/08871, WO 99/43706, EE.UU. 5.424.286, WO 00/09666, WO 2006/097537, PCT/EP2008/061755 y PCT/EP2008/061830, GLP-2, exendina-4(1-39), fragmentos insulínotropicos de los mismos, análogos insulínotropicos de los mismos y derivados insulínotropicos de los mismos. Los fragmentos insulínotropicos de GLP-1(1-37) son péptidos insulínotropicos para los que la secuencia completa se puede encontrar en la secuencia de GLP-1 (1-37) y

en donde al menos un aminoácido terminal ha sido delecionado.

Las insulinas aciladas de esta invención también se pueden usar en un tratamiento combinado junto con un agente antidiabético oral tal como una tiazolidindiona, metformina y otra preparación farmacéutica diabética de tipo 2 para tratamiento oral.

- 5 Además, la insulina acilada de esta invención se puede administrar en combinación con uno o varios agentes anti-obesidad o agentes de regulación del apetito.

En una realización, esta descripción se refiere a una preparación farmacéutica pulmonar que comprende la insulina acilada de esta invención y adyuvantes y aditivos adecuados, tales como uno o varios agentes adecuados para la estabilización, conservación o isotonización, por ejemplo, iones de zinc, fenol, cresol, un parabeno, cloruro de sodio, glicerol, propilenglicol o manitol.

Se debe entender que cualquier combinación adecuada de las insulinas aciladas con una dieta y/o ejercicio, uno o varios de los compuestos mencionados anteriormente y opcionalmente una o varias otras sustancias activas, se considera que está dentro del alcance de esta invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

- 15 Las propiedades de estabilidad y solubilidad de la insulina son aspectos subyacentes importantes para la terapia actual con insulina. Esta invención se dirige a estos problemas proporcionando análogos de insulina acilados, estables, en los que la acilación disminuye la flexibilidad molecular y simultáneamente reduce la tendencia a la fibrilación y limita o modifica la zona de precipitación por el pH.

20 Las insulinas aciladas de esta invención están destinadas en particular a la administración por vía pulmonar u oral, debido a su biodisponibilidad relativamente alta en comparación con, por ejemplo, la insulina humana y la insulina humana acilada. Además, las insulinas aciladas tendrán una actividad prolongada de la insulina.

Como se ha mencionado anteriormente, las insulinas que se estabilizan frente a la degradación proteolítica se designan en el presente documento insulinas estabilizadas frente a proteasas. Las insulinas aciladas de esta invención son dichas insulinas estabilizadas frente a proteasas que se han acilado como se describe en el presente documento.

Dichas insulinas estabilizadas frente a proteasas se obtienen a partir de compuestos de insulina, que se denominan en este documento insulinas de origen o insulinas no estabilizadas frente a proteasas.

En una realización, una insulina de origen se selecciona a partir del grupo que consiste en a) insulina humana; b) un análogo de insulina de la insulina humana en donde el residuo de aminoácido en la posición B28 es Pro, Asp, Lys, Leu, Val o Ala, y el residuo aminoácido en la posición B29 es Lys o Pro y, opcionalmente, el residuo de aminoácido en la posición B30 se elimina; c) un análogo de insulina que es insulina humana des(B28-B30), insulina humana des(B27) o insulina humana des(B30); d) un análogo de insulina de la insulina humana en donde el residuo de aminoácido en la posición B3 es Lys y el residuo de aminoácido en la posición B29 es Glu o Asp; e) un análogo de insulina de la insulina humana en donde el residuo de aminoácido en la posición A21 es Gly y en donde el análogo de insulina se extiende adicionalmente en el extremo C-terminal con dos residuos de arginina; f) un derivado de insulina en donde el residuo de aminoácido en la posición B30 se sustituye con un éster metílico de treonina; y g) un derivado de insulina en donde a la posición N_ε de lisina en la posición B29 de la insulina humana des(B30), se fija una cadena de tetradecanoílo. Cada uno de estos grupos es una realización específica.

En otra realización, una insulina de origen se selecciona a partir del grupo que consiste en insulina humana; insulina humana desB30; insulina humana AspB28; insulina humana AspB28, desB30; insulina humana LysB3, GluB29; insulina humana LysB28, ProB29; insulina humana GlyA21, ArgB31, ArgB32; e insulina humana desB30, ArgB31, ArgB32.

Más específicamente, la insulina estabilizada frente a proteasas es una molécula de insulina que tiene dos o más mutaciones de la cadena A y/o B en relación con la insulina de origen. Sorprendentemente, se ha encontrado que mediante la sustitución con aminoácidos hidrófilos de dos o más aminoácidos hidrófobos dentro o en las proximidades de dos o más sitios de proteasa en una insulina, se obtiene un análogo de insulina (es decir, una insulina estabilizada frente a proteasas) que es proteolíticamente más estable en comparación con la insulina de origen. En un aspecto amplio, una insulina estabilizada frente a proteasas es un análogo de insulina en el que al menos dos aminoácidos hidrófobos se han sustituido con aminoácidos hidrófilos, respecto a la insulina de origen, en donde las sustituciones se encuentran dentro o en las proximidades de dos o más sitios de escisión de proteasas de la insulina de origen y en donde tal análogo de insulina comprende además opcionalmente una o varias mutaciones adicionales.

En otra realización, una insulina estabilizada frente a proteasas es un análogo de insulina en el que

- 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

- 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, Gly o Arg y/o el aminoácido en la posición B28 es His, Gly o Asp;

y que comprende opcionalmente además una o varias mutaciones adicionales.

En otra realización, una insulina estabilizada frente a proteasas es un análogo que comprende las mutaciones B25H o B25N en combinación con mutaciones en B27, opcionalmente en combinación con otras mutaciones.

En otra realización una insulina estabilizada frente a proteasas es un análogo que comprende las mutaciones B25H o B25N en combinación con mutaciones en B27, opcionalmente en combinación con otras mutaciones. Las mutaciones en la posición B27 pueden ser, por ejemplo, Glu o Asp.

Estos análogos de insulina acilada estabilizada frente a proteasas que comprenden tanto la mutación B25 como B27, tienen propiedades ventajosas.

En otra realización, una insulina estabilizada frente a proteasas es un análogo de insulina que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena A de fórmula 1:

Xaa_{A(-2)}-Xaa_{A(-1)}-Xaa_{A0}-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 (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)

en donde

Xaa_{A(-2)} está ausente o es Gly;

Xaa_{A(-1)} está ausente o es Pro;

Xaa_{A0} está ausente o es Pro;

Xaa_{A8} se selecciona independientemente a partir de Thr e His;

Xaa_{A12} se selecciona independientemente a partir de Ser, Asp y Glu;

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

Xaa_{A14} se selecciona independientemente a partir de Tyr, Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser y Glu;

Xaa_{A15} se selecciona independientemente a partir de Gln, Asp y Glu;

Xaa_{A18} se selecciona independientemente a partir de Asn, Lys y Gln;

Xaa_{A21} se selecciona independientemente a partir de Asn y Gln;

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 a partir de Phe y Glu;

Xaa_{B2} está ausente o es Val;

Xaa_{B3} está ausente o se selecciona independientemente a partir de Asn y Gln;

Xaa_{B4} se selecciona independientemente a partir de Gln y Glu;

Xaa_{B10} se selecciona independientemente a partir de His, Asp, Pro y Glu;

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

- Xaa_{B24} se selecciona independientemente a partir de Phe e His;
- Xaa_{B25} se selecciona independientemente a partir de Asn, Phe e His;
- Xaa_{B26} está ausente o se selecciona independientemente a partir de Tyr, His, Thr, Gly y Asp;
- 5 Xaa_{B27} está ausente o se selecciona independientemente a partir de Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser y Glu;
- Xaa_{B28} está ausente o se selecciona independientemente a partir de Pro, His, Gly y Asp;
- Xaa_{B29} está ausente o se selecciona independientemente a partir de Lys, Arg y Gln; y, preferiblemente, Xaa_{B29} está ausente o se selecciona independientemente a partir de Lys y Gln;
- Xaa_{B30} está ausente o es Thr;
- 10 Xaa_{B31} está ausente o es Leu;
- Xaa_{B32} está ausente o es Glu;
- el extremo C-terminal puede estar opcionalmente derivatizado como una amida;
- 15 en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena A y la secuencia de aminoácidos de la cadena B están conectadas por puentes 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 en donde las cisteínas en la posición 6 y 11 de la cadena A están conectadas por un puente disulfuro.
- En otra realización, una insulina estabilizada frente a proteasas es un análogo de insulina que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena A de fórmula 3:
- 20 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} Fórmula (4) (SEQ ID No: 4)
- en donde
- 25 Xaa_{A8} se selecciona independientemente a partir de Thr e His;
- Xaa_{A12} se selecciona independientemente a partir de Ser, Asp y Glu;
- Xaa_{A13} se selecciona independientemente a partir de Leu, Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser y Glu;
- Xaa_{A14} se selecciona independientemente a partir de Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser y Glu;
- Xaa_{A15} se selecciona independientemente a partir de Gln, Asp y Glu;
- 30 Xaa_{A18} se selecciona independientemente a partir de Asn, Lys y Gln;
- Xaa_{A21} se selecciona independientemente a partir de Asn y Gln;
- Xaa_{B1} se selecciona independientemente a partir de Phe y Glu;
- Xaa_{B3} se selecciona independientemente a partir de Asn y Gln;
- Xaa_{B4} se selecciona independientemente a partir de Gln y Glu;
- 35 Xaa_{B10} se selecciona independientemente a partir de His, Asp, Pro y Glu;
- Xaa_{B16} se selecciona independientemente a partir de Tyr, Asp, Gln, His, Arg y Glu;
- Xaa_{B24} se selecciona independientemente a partir de Phe e His;
- Xaa_{B26} está ausente o se selecciona independientemente a partir de Tyr, His, Thr, Gly y Asp;
- 40 Xaa_{B27} está ausente o se selecciona independientemente a partir de Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser y Glu;
- Xaa_{B28} está ausente o se selecciona independientemente a partir de Pro, His, Gly y Asp;

Xaa_{B29} está ausente o se selecciona independientemente a partir de Lys, Arg y Gln; y, preferiblemente, Xaa_{B29} está ausente o se selecciona independientemente a partir de Lys y Gln;

Xaa_{B30} está ausente o es Thr;

el extremo C-terminal puede estar opcionalmente derivatizado como una amida;

- 5 en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena A y la secuencia de aminoácidos de la cadena B están conectadas por 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 en donde las cisteínas en la posición 6 y 11 de la cadena A están conectadas por un puente disulfuro.

En otra realización, una insulina estabilizada frente a proteasas es un análogo de insulina en el que

- 10 Xaa_{A8} se selecciona independientemente a partir de Thr e His;

Xaa_{A12} se selecciona independientemente a partir de Ser y Glu;

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

Xaa_{A14} se selecciona independientemente a partir de Asp, His y Glu;

Xaa_{A15} se selecciona independientemente a partir de Gln y Glu;

- 15 Xaa_{A18} se selecciona independientemente a partir de Asn, Lys y Gln;

Xaa_{A21} se selecciona independientemente a partir de Asn y Gln;

Xaa_{B1} se selecciona independientemente a partir de Phe y Glu;

Xaa_{B3} se selecciona independientemente a partir de Asn y Gln;

Xaa_{B4} se selecciona independientemente a partir de Gln y Glu;

- 20 Xaa_{B10} se selecciona independientemente a partir de His, Asp, Pro y Glu;

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

Xaa_{B24} se selecciona independientemente a partir de Phe e His;

Xaa_{B25} se selecciona independientemente a partir de Phe, Asn e His;

Xaa_{B26} se selecciona independientemente a partir de Tyr, Thr, Gly y Asp;

- 25 Xaa_{B27} se selecciona independientemente a partir de Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg y Glu;

Xaa_{B28} se selecciona independientemente a partir de Pro, Gly y Asp;

Xaa_{B29} se selecciona independientemente a partir de Lys y Gln;

Xaa_{B30} está ausente o es Thr;

el extremo C-terminal puede estar opcionalmente derivatizado como una amida;

- 30 en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena A y la secuencia de aminoácidos de la cadena B están conectadas por puentes 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 en donde las cisteínas en la posición 6 y 11 de la cadena A están conectadas por un puente disulfuro.

A continuación se mencionan otras realizaciones de insulinas estabilizadas frente a proteasas.

- 35 Una "proteasa" o una "enzima proteasa" es una enzima digestiva que degrada proteínas y péptidos y que se encuentra en diversos tejidos del cuerpo humano, tales como por ejemplo, el estómago (pepsina), el lumen intestinal (quimotripsina, tripsina, elastasa, carboxipeptidasas, etc.) o superficies de la mucosa del tracto GI (aminopeptidasas, carboxipeptidasas, enteropeptidasas, dipeptidilpeptidasas, endopeptidasas, etc.), el hígado (enzima degradante de insulina, catepsina D, etc.) y en otros tejidos.

- 40 Un análogo de insulina proteolíticamente estable (también denominado una insulina estabilizada frente a proteasas) se entiende en el presente documento como un análogo de insulina, que se somete a una degradación más lenta por una o varias proteasas, con respecto a la insulina humana. En una realización, una insulina estabilizada frente a proteasas se somete a una degradación más lenta por una o varias proteasas, con respecto a la insulina de origen.

En una realización adicional, una insulina estabilizada frente a proteasas se estabiliza frente a la degradación por una o varias enzimas seleccionadas a partir del grupo que consiste en: pepsina (tal como, por ejemplo, las isoformas pepsina A, pepsina B, pepsina C y/o pepsina F), quimotripsina (como, por ejemplo, las isoformas quimotripsina A, quimotripsina B y/o quimotripsina C), tripsina, enzima degradante de insulina (EDI), elastasa (tal como, por ejemplo, las isoformas elastasa pancreática I y/o II), carboxipeptidasa (por ejemplo, las isoformas carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa A2 y/o carboxipeptidasa B), aminopeptidasa, catepsina D y otras enzimas presentes en los extractos intestinales obtenidos a partir de rata, cerdo o ser humano.

En una realización, una insulina estabilizada frente a proteasas se estabiliza frente a la degradación por una o varias enzimas seleccionadas a partir del grupo que consiste en: quimotripsina, tripsina, enzima degradante de insulina (EDI), elastasa, carboxipeptidasas, aminopeptidasas y catepsina D. En una realización adicional, una insulina estabilizada frente a proteasas se estabiliza frente a la degradación por una o varias enzimas seleccionadas a partir del grupo que consiste en: quimotripsina, carboxipeptidasas y EDI. En aún otra realización, una insulina estabilizada frente a proteasas se estabiliza frente a la degradación por una o varias enzimas seleccionadas a partir de: quimotripsina y carboxipeptidasas.

$T_{1/2}$ se puede determinar tal y como se describe en los Ejemplos, como una medida de la estabilidad proteolítica de una insulina estabilizada frente a proteasas, tales como quimotripsina, pepsina y/o carboxipeptidasa A. En una realización, $T_{1/2}$ se incrementa con respecto a la insulina humana. En una realización adicional, $T_{1/2}$ se incrementa con respecto a la insulina de origen. En otra realización adicional, $T_{1/2}$ se incrementa al menos 2 veces con respecto a la insulina de origen. En una realización adicional más, $T_{1/2}$ se incrementa al menos 3 veces con respecto a la insulina de origen. En una realización adicional más, $T_{1/2}$ se incrementa al menos 4 veces con respecto a la insulina de origen. En una realización adicional más, $T_{1/2}$ se incrementa al menos 5 veces con respecto a la insulina de origen. En una realización adicional más, $T_{1/2}$ se incrementa al menos 10 veces con respecto a la insulina de origen.

Una forma alternativa de medir la estabilidad proteolítica es medir la estabilidad relativa frente a un comparador, por ejemplo, insulina humana. La estabilidad relativa se define como $T_{1/2}/T'_{1/2}$ (comparador), en donde $T_{1/2}$ y $T'_{1/2}$ (comparador) son las semividas del análogo y del comparador, respectivamente, en el ensayo de degradación. En la sección de ejemplos, se proporciona la estabilidad relativa de las insulinas seleccionadas de la invención frente a una mezcla de enzimas extraídas a partir del duodeno de ratas (con respecto a la insulina humana, así como con respecto a una insulina sin acilación resistente a proteasas).

Los sitios de escisión de proteasas (en este documento también se mencionan como sitios de proteasas) han de entenderse como residuos de aminoácidos que son reconocidos por proteasas y/o residuos de aminoácidos cuyo enlace peptídico es escindido por proteasas. Los sitios de escisión de proteasas se pueden determinar mediante la determinación de "puntos calientes" de escisión, a través de análisis HPLC, MS o LC-MS y/o mediante una predicción basada en la especificidad enzimática de la enzima proteasa para la cual se va a 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, tal y como se describe, por ejemplo, en Handbook of Proteolytical Enzymes, 2ª ed., Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F. compiladores, Elsevier Academic Press 2004. Por ejemplo, se prevé que la quimotripsina escinda enlaces peptídicos C-terminales a residuos aromáticos (Trp, Tyr, Phe o Leu), que no están seguidos por Pro. Del mismo modo, se prevé que la tripsina escinda enlaces peptídicos C-terminales a residuos básicos Lys o Arg, que no están seguidos por Pro, se prevé que la elastasa escinda residuos C-terminales a Ala, Val, Gly o Ser y la carboxipeptidasa A eliminará cualquier aminoácido C-terminal, pero no Arg, Lys o Pro. La enzima degradante de insulina (EDI) se prevé que escinda las siguientes posiciones de la insulina humana B9-10, B10-11, B13-14, B14-15, B24-25, B25-26, A13-14 y A14-15.

El término sustituir (un) aminoácido "dentro o en proximidad" a un sitio de escisión de proteasas, se emplea en la presente memoria para indicar la sustitución de un aminoácido dentro o en proximidad a una posición de la insulina de origen que se ha determinado que es un sitio de escisión de proteasas. En una realización, dos o más aminoácidos hidrófobos dentro o en proximidad a dos o más sitios de proteasas en una insulina, están sustituidos, en donde dichos aminoácidos hidrófobos están sustituidos con aminoácidos hidrófilos. En una realización adicional, dos o más aminoácidos hidrófobos dentro de dos o más sitios de proteasas en una insulina, están sustituidos con aminoácidos hidrófilos. En otra realización adicional, dos o más aminoácidos hidrófobos situados cerca de dos o más sitios de proteasas en una insulina, están sustituidos con aminoácidos hidrófilos. En otra realización adicional, dos o más aminoácidos hidrófobos situados a dos aminoácidos de distancia de dos o más sitios de proteasas en una insulina, están sustituidos con aminoácidos hidrófilos. En otra realización adicional, dos o más aminoácidos hidrófobos situados a tres aminoácidos de distancia de dos o más sitios de proteasas en una insulina, están sustituidos con aminoácidos hidrófilos. En aún otra realización, dos o más aminoácidos hidrófobos situados hasta a cuatro aminoácidos de distancia de dos o más sitios de proteasas en una insulina, están sustituidos con aminoácidos hidrófilos. En otra realización adicional, dos o más aminoácidos hidrófobos situados a uno, dos o tres aminoácidos de distancia o dentro de dos o más sitios de proteasas en una insulina, están sustituidos con aminoácidos hidrófilos. En aún una realización adicional, dos o más aminoácidos hidrófobos situados a uno o dos aminoácidos de distancia o dentro de dos o más sitios de proteasas en una insulina, están sustituidos con aminoácidos hidrófilos. En otra realización adicional, dos o más aminoácidos hidrófobos situados junto o dentro de dos o más sitios de proteasas en una insulina, están sustituidos con aminoácidos hidrófilos.

Una insulina estabilizada frente a proteasas puede tener una carga neta que es diferente de la carga neta de la insulina de origen. En una realización, la carga neta de una insulina estabilizada frente a proteasas es más positiva que la carga neta de la insulina de origen. En una realización, la carga neta de una insulina estabilizada frente a proteasas es más negativa que la carga neta de la insulina de origen. En una realización, la carga neta positiva promedio de una insulina estabilizada frente a proteasas es entre 0,5 y 5 tal y como se mide en una solución acuosa. En una realización, la carga neta positiva promedio de una insulina estabilizada frente a proteasas es entre 1 y 5. En una realización, la carga neta positiva promedio de una insulina estabilizada frente a proteasas es entre 1 y 4. En una realización, la carga neta positiva promedio de una insulina estabilizada frente a proteasas es entre 1 y 3. En una realización, la carga neta positiva promedio de una insulina estabilizada frente a proteasas es entre 2 y 3. En una realización, la carga neta negativa promedio de una insulina estabilizada frente a proteasas es entre -0,5 y -5, tal y como se mide en una solución acuosa. En una realización, la carga neta negativa promedio de una insulina estabilizada frente a proteasas es entre -1 y -5. En una realización, la carga neta negativa promedio de una insulina estabilizada frente a proteasas es entre -1 y -4. En una realización, la carga neta negativa promedio de una insulina estabilizada frente a proteasas es entre -1 y -3. En una realización, la carga neta negativa promedio de una insulina estabilizada frente a proteasas es entre -2 y -3.

En una realización, una insulina estabilizada frente a proteasas puede haber aumentado la solubilidad en relación a la insulina humana. En una realización adicional, una insulina estabilizada frente a proteasas ha aumentado la solubilidad en relación a la insulina humana a pH 3-9. En otra realización adicional, una insulina estabilizada frente a proteasas ha aumentado la solubilidad en relación a la insulina humana a pH 4-8,5. En todavía otra realización adicional, una insulina estabilizada frente a proteasas ha aumentado la solubilidad en relación a la insulina humana a pH 4-8. En otra realización adicional, una insulina estabilizada frente a proteasas ha aumentado la solubilidad en relación a la insulina humana a pH 4,5-8. En una realización adicional, una insulina estabilizada frente a proteasas ha aumentado la solubilidad en relación a la insulina humana a pH 5-8. En otra realización adicional, una insulina estabilizada frente a proteasas ha aumentado la solubilidad en relación a la insulina humana a pH 5,5-8. En una realización adicional, una insulina estabilizada frente a proteasas ha aumentado la solubilidad en relación a la insulina humana a pH 6-8.

En una realización, una insulina estabilizada frente a proteasas ha aumentado la solubilidad en relación a la insulina humana a pH 2-4.

En una realización, una insulina estabilizada frente a proteasas puede haber aumentado la solubilidad con respecto a la insulina de origen. En una realización adicional, una insulina estabilizada frente a proteasas ha aumentado la solubilidad con respecto a la insulina de origen a pH 3-9. En una realización adicional, una insulina estabilizada frente a proteasas ha aumentado la solubilidad con respecto a la insulina de origen a pH 4-8,5. En todavía otra realización adicional, una insulina estabilizada frente a proteasas ha aumentado la solubilidad con respecto a la insulina de origen a pH 4-8. En otra realización adicional, una insulina estabilizada frente a proteasas ha aumentado la solubilidad con respecto a la insulina de origen a pH 4,5-8. En todavía otra realización adicional, una insulina estabilizada frente a proteasas ha aumentado la solubilidad con respecto a la insulina de origen a pH 5-8. En otra realización adicional, una insulina estabilizada frente a proteasas ha aumentado la solubilidad con respecto a la insulina de origen a pH 5,5-8. En una realización adicional, una insulina estabilizada frente a proteasas ha aumentado la solubilidad con respecto a la insulina de origen a pH 6-8.

En una realización, una insulina estabilizada frente a proteasas ha aumentado la solubilidad con respecto a la insulina de origen a pH 2-4.

Por "aumento de la solubilidad a un pH dado" se entiende que se disuelve una mayor concentración de una insulina estabilizada frente a proteasas en una solución acuosa o tampón al pH de la solución, en relación con la insulina de origen. Los métodos para determinar si la insulina contenida en una solución se disuelve, son conocidos en la técnica.

En una realización, la solución puede estar sometida a centrifugación durante 20 minutos a 30.000 g y a continuación, la concentración de insulina en el material sobrenadante se puede determinar por 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 completamente soluble en la composición. En otra realización, la solubilidad de la insulina en una composición se puede determinar simplemente mediante un examen a simple vista del recipiente en el que está contenida la composición. La insulina es soluble si la solución es transparente a simple vista y no hay partículas suspendidas o precipitadas en los lados/parte inferior del recipiente.

Una insulina estabilizada frente a proteasas puede haber aumentado la potencia aparente y/o la biodisponibilidad con respecto a la insulina de origen, cuando se compara después de una medición.

Ensayos convencionales para medir la potencia de la insulina *in vitro* son conocidos por la persona experta en la técnica e incluyen, entre otros (1) ensayos de radiorreceptores de insulina, en donde la potencia relativa de una insulina se define como la relación de insulina frente a análogo de insulina, requerida para desplazar el 50% de insulina ¹²⁵I unida específicamente a receptores de insulina presentes en las membranas celulares, por ejemplo, una fracción de membrana plasmática de hígado de rata; (2) ensayos de lipogénesis, realizados, por ejemplo, con adipo-

- citos de rata, en los que la potencia relativa de una insulina se define como la relación de insulina frente a análogo de insulina, requerida para alcanzar el 50% de conversión máxima de glucosa [$3\text{-}^3\text{H}$] en material orgánico extraíble (es decir, lípidos); (3) ensayos de oxidación de glucosa en adipocitos aislados en los que la potencia relativa del análogo de insulina se define como la relación de insulina frente a análogo de insulina para lograr el 50% de conversión máxima de glucosa-1- ^{14}C en $^{14}\text{CO}_2$; (4) radioinmunoensayos 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 insulina ^{125}I en la unión 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 específicos de insulina.
- El aumento de la potencia aparente *in vivo* se puede estimar/visualizar mediante una comparación de la glucosa en sangre frente a perfiles temporales de la insulina en cuestión, con una insulina similar sin mutaciones que estabilizan frente a proteasas, proporcionada en dosis similares. La insulina de la invención tendrá un efecto reductor de la glucosa en sangre incrementado con respecto al comparador.
- Los ensayos convencionales para medir la biodisponibilidad de la insulina son conocidos por el experto en la técnica e incluyen, entre otros, la medición de las áreas relativas bajo la curva (AUC) para la concentración de la insulina en cuestión administrada por vía pulmonar u oral y por vía intravenosa (*i.v.*) en la misma especie. La cuantificación de las concentraciones de insulina en muestras de sangre (plasma) se puede realizar usando, por ejemplo, ensayos con anticuerpos (ELISA) o por espectrometría de masas. La administración por vía pulmonar se puede realizar por varios medios. Por ejemplo, las insulinas se pueden dosificar a ratas mediante instilación de gotas, o a los cerdos mediante insuflación de polvo seco.
- La insulina estabilizada frente a proteasas se puede analizar opcionalmente en busca de más sitios para proteasas que pueden ser objeto de sustituciones adicionales de uno o varios aminoácidos hidrófobos por aminoácidos hidrófilos. Una insulina estabilizada frente a proteasas puede ser un análogo de insulina que tiene al menos dos ácidos hidrófilos en los sitios de proteasas, en comparación con la insulina de origen, la primera insulina modificada, y que tiene además al menos una sustitución de aminoácidos en un nuevo sitio de proteasas de la primera insulina modificada, en donde al menos un aminoácido hidrófobo se ha sustituido con al menos un aminoácido hidrófilo.
- Por motivo de conveniencia, a continuación se dan los nombres de aminoácidos naturales codificables con los códigos habituales de tres letras 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 e Y), triptófano (Trp y W), histidina (His y H), lisina (Lys y K), arginina (Arg y R), glutamina (Gln y Q), asparagina (Asn y N), ácido glutámico (Glu y E), ácido aspártico (Asp + D), serina (Ser y S) y treonina (Thr y T). Si, debido a errores mecanográficos, hay desviaciones de los códigos utilizados comúnmente, se aplican los códigos de uso común. Los aminoácidos presentes en las insulinas de esta invención son, preferiblemente, aminoácidos que pueden ser codificados por un ácido nucleico. En una realización, una insulina o un análogo de insulina está sustituido con Gly, Glu, Asp, His, Gln, Asn, Ser, Thr, Lys, Arg, y/o Pro y/o Gly, Glu, Asp, His, Gln, Asn, Ser, Thr, Lys, Arg y/o Pro se añade a la insulina o a un análogo de insulina. En una realización, una insulina o un análogo de insulina está sustituido con Glu, Asp, His, Gln, Asn, Lys, y/o Arg, y/o Glu, Asp, His, Gln, Asn, Lys y/o Arg se añade a la insulina o a un análogo de insulina.
- En una realización, una insulina estabilizada frente a proteasas se selecciona a partir del grupo que consiste en los siguientes compuestos: insulina humana A14E, B25H, desB30; insulina humana A14H, B25H, desB30; insulina humana A14E, B1E, B25H, desB30; insulina humana A14E, B16E, B25H, desB30; insulina humana A14E, B25H, B28D, desB30; insulina humana A14E, B25H, B27E, desB30; insulina humana A14E, B1E, 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, desB30; insulina humana A8H, A14E, B16E, B25H, B27E, desB30; insulina humana A14E, B25H, B26D, desB30; insulina humana A14E, B1E, B27E, desB30; insulina humana A14E, B27E, desB30; insulina humana A14E, B28D, desB30; insulina humana A14E, B28E, desB30; insulina humana A14E, B1E, B28E, desB30; insulina humana A14E, B1E, B27E, B28E, desB30; insulina humana A14E, B1E, B25H, B28E, desB30; insulina humana A14E, B1E, B25H, B27E, B28E, desB30; insulina humana A14D, B25H, desB30; insulina humana B25N, B27E, desB30; insulina humana A8H, B25N, B27E, desB30; insulina humana A14E, B27E, B28E, desB30; insulina humana A14E, B25H, B28E, desB30; insulina humana B25H, B27E, desB30; insulina humana B1E, B25H, B27E, desB30; insulina humana A8H, B1E, B25H, B27E, desB30; insulina humana A8H, B25H, B27E, desB30; insulina humana B25N, B27D, desB30; insulina humana B25H, B27D, desB30; insulina humana A8H, B25H, B27D, desB30; 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; 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 A14H, B16H, B25H, desB30; insulina humana A14H, B10E, B25H, 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; insulina humana A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30; insulina humana A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30; insulina humana A14E, A21G, B25H, B26G, B27G, B28G, des-

B30; insulina humana A14E, A21G, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, 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; insulina humana A13H, A14E, B1E, B25H, desB30; insulina humana A13N, A14E, B25H, desB30; insulina humana A13N, A14E, B1E, 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; insulina humana A14E, B27R, B28D, B29K, desB30; insulina humana A14E, B25H, B26T, B27R, B28D, B29K, desB30; insulina humana A14E, B25H, B27R, desB30; insulina humana A14E, B25H, B27H, desB30; 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; insulina humana A13E, B25H, desB30; insulina humana A12E, B25H, desB30; insulina humana A15E, B25H, desB30; insulina humana A14E, B25H, desB27, desB30; insulina humana A14E, B25H, B26D, B27E, desB30; 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; 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; 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; 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; 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; insulina humana A14E, B16E, B25H, desB30; insulina humana A14E, B16H, B25H, desB30; insulina humana A14R, B25H, desB30; insulina humana A14N, B25H, desB30; insulina humana A14D, B25H, desB30; insulina humana A14Q, B25H, desB30; insulina humana A14E, B25H, desB30; insulina humana A14G, B25H, desB30; insulina humana A14H, B25H, desB30; insulina humana A8H, B10D, B25H; e insulina humana A8H, A14E, B10E, B25H, desB30 y esta realización puede comprender, opcionalmente, insulina humana A14E, B25H, B29R, desB30; insulina humana B25H, desB30; e insulina humana B25N, desB30.

En una realización preferida, una insulina estabilizada frente a proteasas se selecciona a partir del grupo que consiste en los siguientes compuestos: insulina humana A14E, B25H, desB30; insulina humana A14E, B16H, B25H, desB30; insulina humana A14E, B16E, B25H, desB30; insulina humana A14E, B25H, B29R, desB30; insulina humana A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30; insulina humana B25H, desB30; e insulina humana A14E, B25H, desB27, desB30.

En una realización preferida, una insulina estabilizada frente a proteasas se selecciona a partir de cualquiera de los grupos anteriores que, además, contiene la mutación desB27.

En una realización preferida, una insulina estabilizada frente a proteasas se selecciona a partir del grupo que consiste en los siguientes compuestos: insulina humana A14E, B25H, desB27, desB30; insulina humana A14E, B16H, B25H, desB27, desB30; insulina humana A14E, B16E, B25H, desB27, desB30; insulina humana A14E, B25H, desB27, B29R, desB30 e insulina humana B25H, desB27, desB30.

En una realización, una insulina estabilizada frente a proteasas se selecciona a partir de cualquiera de los grupos anteriores que, además, contienen las siguientes mutaciones en la posición A21 y/o B3 para mejorar la estabilidad química: A21G, desA21, B3Q o B3G.

En una realización preferida, una insulina estabilizada frente a proteasas se selecciona a partir de las siguientes insulinas estabilizadas frente a proteasas: insulina humana A14E, A21G, B25H, desB30; insulina humana A14E, A21G, B16H, B25H, desB30; insulina humana A14E, A21G, B16E, B25H, desB30; insulina humana A14E, A21G, B25H, desB27, desB30; insulina humana A14E, A21G, B25H, desB27, desB30; insulina humana A14E, A21G, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30; insulina humana A14E, A21G, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30; insulina humana A21G, B25H, desB30; e insulina humana A21G, B25N, desB30 y, preferiblemente, se selecciona a partir de las siguientes insulinas estabilizadas frente a proteasas: insulina humana A14E, A21G, B25H, desB30; insulina humana A14E, A21G, B16H, B25H, desB30; insulina humana A14E, A21G, B16E, B25H, desB30; insulina humana A14E, A21G, B25H, desB27, desB30; insulina humana A14E, A21G, B25H, desB27, desB30; insulina humana A21G, B25H, desB30; e insulina humana A21G, B25N, desB30.

En una realización preferida, una insulina estabilizada frente a proteasas se acila en la posición B29, en la posición del nitrógeno épsilon de B29K.

En una realización preferida, una insulina estabilizada frente a proteasas se acila en la posición A1, en la posición del nitrógeno alfa de A1.

En una realización preferida, una insulina estabilizada frente a proteasas se acila en la posición A1, en la posición del nitrógeno alfa de A1, y la insulina estabilizada frente a proteasas comprende la mutación B29R.

Las insulinas estabilizadas frente a proteasas se producen mediante la expresión de una secuencia de ADN que

codifica la insulina en cuestión en una célula hospedadora adecuada, mediante una técnica bien conocida, tal y como se describe, por ejemplo, en el documento de patente de EE.UU nº 6.500.645. La insulina estabilizada frente a proteasas se expresa ya sea directamente o como una molécula precursora, que tiene una extensión N-terminal en la cadena B. Esta extensión N-terminal puede tener la función de aumentar el rendimiento del producto expresado directamente y puede tener hasta 15 residuos de aminoácidos de longitud. La extensión N-terminal ha de ser escindida *in vitro* después del aislamiento desde el medio de cultivo y, por lo tanto, tendrá un sitio de escisión junto a B1. Las extensiones N-terminales de tipo adecuado en esta invención se describen en los documentos de patente de EE.UU nº 5.395.922 y de patente europea nº 765,395A.

La secuencia de polinucleótidos que codifica la insulina estabilizada frente a proteasas se puede preparar sintéticamente por métodos convencionales establecidos, por ejemplo, el método de fosforamida 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 fosforamida, los oligonucleótidos se sintetizan, por ejemplo, en un sintetizador de ADN automático, se purifican, se duplican y se ligan para formar la estructura artificial de ADN sintético. Una forma actualmente preferida de preparar la estructura artificial de ADN es mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las secuencias de polinucleótidos también pueden ser de origen genómico mixto, de ADNc y de origen sintético. Por ejemplo, una secuencia genómica o de ADNc que codifica un péptido líder se puede unir a una secuencia genómica o de ADNc que codifica las cadenas A y B, después de lo cual, la secuencia de ADN se puede modificar en un sitio, insertando oligonucleótidos sintéticos que codifican la secuencia de aminoácidos deseada para recombinación homóloga, de acuerdo con procedimientos bien conocidos o preferiblemente generando la secuencia deseada por PCR usando oligonucleótidos adecuados.

El método recombinante normalmente hará uso de un vector que es capaz de replicarse en el microorganismo o la célula hospedadora seleccionada y que es portador de una secuencia de polinucleótidos que codifica la insulina estabilizada frente a proteasas. El vector recombinante puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula hospedadora, 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 juntos contienen el ADN total que se va a introducir en el genoma de la célula hospedadora, o un transposón. El vector puede ser lineal o plásmidos circulares cerrados y contendrá preferiblemente uno más elementos que permiten la integración estable del vector en el genoma de la célula hospedadora o la replicación autónoma del vector en la célula, independientemente del genoma.

El vector de expresión recombinante es capaz de replicarse en levadura. Ejemplos de secuencias que permiten al vector replicarse en la levadura son los genes de replicación REP 1-3 del plásmido de levadura de 2 µm y el origen de replicación.

El vector puede contener uno o varios marcadores seleccionables que permiten una selección sencilla de células transformadas. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia biocida o vírica, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos y similares. Ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son los genes *dal* de *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*, o marcadores que confieren resistencia a los antibióticos, tales como resistencia a ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Los marcadores seleccionables para uso en una célula hospedadora filamentosa fúngica incluyen *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina carbamoil-transferasa), *pyrG* (orotidin-5'-fosfato descarboxilasa) y *trpC* (antranilato sintasa). Marcadores adecuados para células hospedadoras de levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Un marcador seleccionable muy adecuado para la levadura es el gen TPI de *Schizosaccharomyces pombe* (Russell (1985) Gene 40:125-130).

En el vector, la secuencia de polinucleótidos está conectada funcionalmente a una secuencia de promotor adecuada. El promotor puede ser cualquier secuencia de ácido nucleico que muestre actividad transcripcional en la célula hospedadora de elección, incluyendo promotores mutantes, truncados e híbridos y se puede obtener a partir de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares, homólogos o heterólogos a la célula hospedadora.

Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción en una célula hospedadora bacteriana, son los promotores obtenidos a partir del operón *lac* de *E. coli*, 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 la amilasa maltogénica (*amyM*) de *Bacillus stearothermophilus*, el gen de la alfa-amilasa (*amyQ*) de *Bacillus amyloliquefaciens* y el gen de la penicilinas (*penP*) de *Bacillus licheniformis*. Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción en una célula hospedadora filamentosa fúngica, son promotores obtenidos a partir de los genes para la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, la proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, la alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* y la alfa-amilasa estable frente a ácidos de *Aspergillus niger*. En un hospedador de levadura, los promotores útiles son los promotores Ma1, TPI, ADH o PGK de *Saccharomyces cerevisiae*.

La secuencia de polinucleótidos que codifica la insulina estabilizada frente a proteasas también está normalmente

conectada funcionalmente a un terminador adecuado. En la levadura, un terminador adecuado es el terminador TPI (Alber et al. (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:419-434).

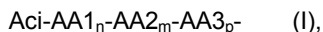
Los procedimientos usados para ligar la secuencia de polinucleótidos que codifica la insulina estabilizada frente a proteasas, el promotor y el terminador, respectivamente, y para insertarlos en un vector adecuado que contiene la información necesaria para la replicación en el hospedador seleccionado, son bien conocidos por las personas expertas en la técnica. Se entenderá que el vector se puede construir o bien preparando primero una estructura artificial de ADN que contiene la secuencia de ADN completa que codifica las insulinas de esta invención, y posteriormente insertando este fragmento en un vector de expresión adecuado, o insertando secuencialmente fragmentos de ADN que contienen información genética para los elementos individuales (tales como la señal, el pro-péptido, el péptido conector, las cadenas A y B) seguido de ligación.

El vector que comprende la secuencia de polinucleótidos que codifica la insulina estabilizada frente a proteasas se introduce en una célula hospedadora, de modo que el vector se mantenga como un vector integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autorreplicante. La expresión "célula hospedadora" incluye cualquier progenie de una célula madre que no es idéntica a la célula madre debido a mutaciones que ocurren durante la replicación. La célula hospedadora puede ser un microorganismo unicelular, por ejemplo, un procariota, o un microorganismo no unicelular, por ejemplo, un eucariota. Células unicelulares útiles son células bacterianas tales como bacterias gram positivas, que incluyen pero no se limitan a, una célula de *Bacillus*, una célula de *Streptomyces*, o bacterias gram negativas tales como *E. coli* y *Pseudomonas* sp. Las células eucariotas pueden ser células de mamífero, insecto, vegetales o fúngicas. En una realización, la célula hospedadora es una célula de levadura. El organismo de la levadura puede ser cualquier organismo de levadura adecuado que, en cultivo, produce grandes cantidades de insulina monocatenaria de la invención. Ejemplos de organismos de levadura adecuados son cepas seleccionadas a partir 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 cacaoi*, *Geotrichum* sp. y *Geotrichum fermentans*.

La transformación de las células de levadura se puede efectuar, por ejemplo, mediante formación de protoplastos seguida de transformación de una manera conocida en sí misma. El medio usado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para el crecimiento de organismos de levadura. La insulina secretada, en donde una proporción significativa de la misma estará presente en el medio en forma procesada correctamente, se puede recuperar del medio por procedimientos convencionales, incluyendo la separación de las células de levadura del medio por centrifugación, filtración o captura del precursor de insulina a través de una matriz de intercambio iónico o a través de una matriz de absorción de fase inversa, precipitación de los componentes proteínicos del material sobrenadante o filtración por medio de una sal, por ejemplo, sulfato de amonio, seguida de purificación mediante una variedad de procedimientos cromatográficos, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, o similares.

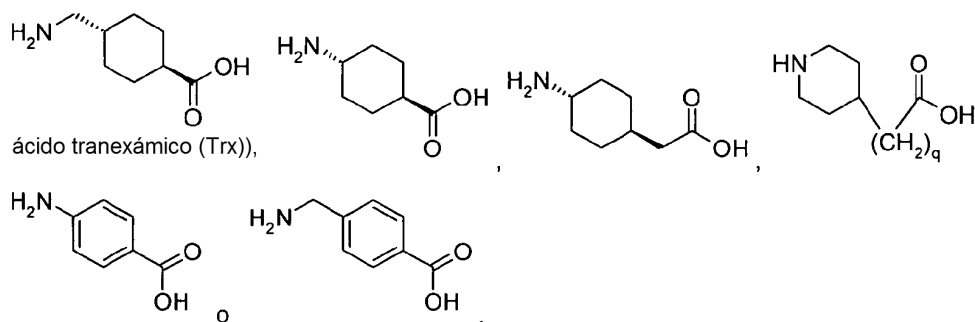
Preferiblemente, las insulinas aciladas de esta invención están monosustituidas, teniendo solo un grupo de acilación fijado a un residuo del aminoácido lisina en la molécula de insulina estabilizada frente a proteasas.

En una realización, el resto acilo fijado a la insulina estabilizada frente a proteasas tiene la fórmula general:



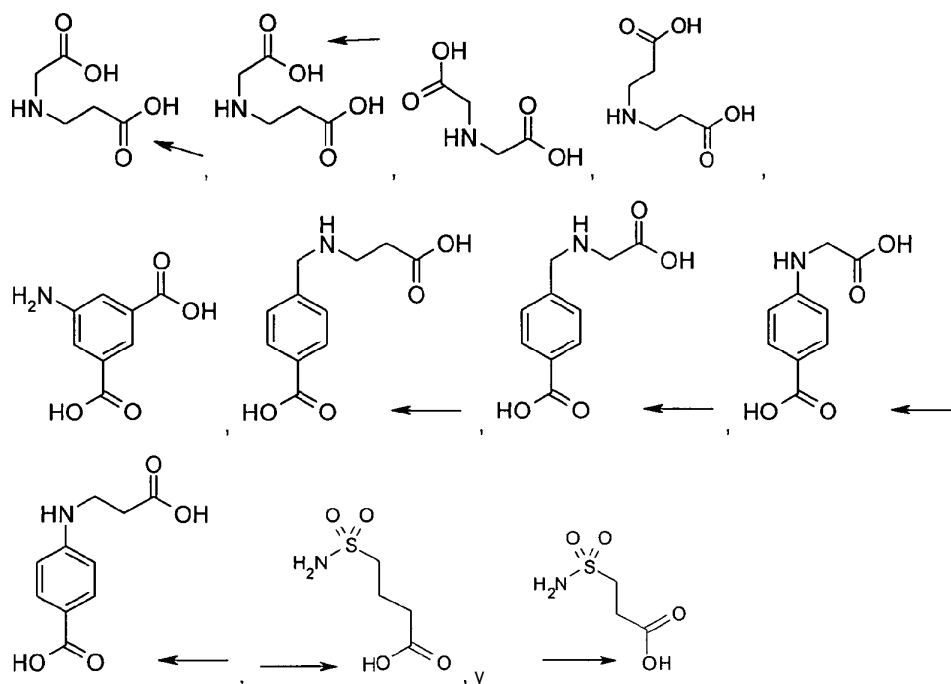
en donde n es 0 o un número entero en el intervalo de 1 a 3; m es 0 o un número entero en el intervalo de 1 a 10; p es 0 o un número entero en el intervalo de 1 a 10; Aci es un ácido graso o un diácido graso que comprende desde aproximadamente 8 a aproximadamente 24 átomos de carbono; AA1 es un residuo de aminoácido lineal neutro o cíclico; AA2 es un residuo de aminoácido ácido; AA3 es un residuo de aminoácido neutro que contiene alquilenglicol; el orden en el que AA1, AA2 y AA3 aparecen en la fórmula se puede intercambiar de forma independiente; AA2 puede aparecer varias veces a lo largo de la fórmula (por ejemplo, Aci-AA2-AA3₂-AA2-); AA2 puede aparecer de forma independiente (= ser diferente) varias veces a lo largo de la fórmula (por ejemplo, Aci-AA2-AA3₂-AA2-); las conexiones entre Aci, AA1, AA2 y/o AA3 son enlaces amida (péptidos) que, formalmente, se pueden obtener mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo (agua) de cada uno de Aci, AA1, AA2 y AA3; y la fijación a la insulina estabilizada frente a proteasas puede ser desde el extremo C-terminal de un residuo AA1, AA2 o AA3 en el resto acilo de la fórmula (I) o desde una de la o las cadenas laterales de un residuo AA2 presente en el resto de fórmula (I).

En otra realización, el resto acilo fijado a la insulina estabilizada frente a proteasas tiene la fórmula general Aci-AA1_n-AA2_m-AA3_p- (I), en donde AA1 se selecciona a partir de Gly, D-Ala o L-Ala, βAla, ácido 4-aminobutírico, ácido 5-aminovalérico, ácido 6-aminohexanoico, D-Glu-α-amida o L-Glu-α-amida, D-Glu-γ-amida o L-Glu-γ-amida, D-Asp-α-amida o L-Asp-α-amida, D-Asp-β-amida o L-Asp-β-amida, o un grupo de una de las fórmulas:



a partir del cual se ha eliminado un átomo de hidrógeno y/o un grupo hidroxilo y en donde q es 0, 1, 2, 3 o 4 y, en esta realización, AA1 puede ser, alternativamente, ácido 7-aminoheptanoico o ácido 8-aminooctanoico.

- 5 En otra realización, el resto acilo fijado a la insulina estabilizada frente a proteasas tiene la fórmula general Aci-AA1_n-AA2_m-AA3_p- (I), en la que AA1 es como se ha definido anteriormente y AA2 se selecciona a partir de L-Glu o D-Glu, L-Asp o D-Asp, L-homoGlu o D-homoGlu o cualquiera de las siguientes:



- 10 a partir de las cuales se ha eliminado un átomo de hidrógeno y/o un grupo hidroxilo y en donde las flechas indican el punto de fijación con el grupo amino de AA1, AA2, AA3, o con el grupo amino de la insulina estabilizada frente a proteasas.

- 15 En un aspecto, el residuo de aminoácido cíclico neutro denominado AA1, es un aminoácido que contiene un anillo carbocíclico saturado de 6 miembros, que contiene opcionalmente un heteroátomo de nitrógeno, y preferiblemente el anillo es un anillo de ciclohexano o un anillo de piperidina. Preferiblemente, el peso molecular de este aminoácido cíclico neutro está en el intervalo desde aproximadamente 100 a aproximadamente 200 Da.
- El residuo de aminoácido ácido denominado AA2 es un aminoácido con un peso molecular de hasta aproximadamente 200 Da que comprende dos grupos de ácido carboxílico y un grupo amino primario o secundario. Alternativamente, el residuo de aminoácido ácido denominado AA2 es un aminoácido con un peso molecular de hasta aproximadamente 250 Da que comprende un grupo de ácido carboxílico y un grupo de sulfonamida primaria o secundaria.

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

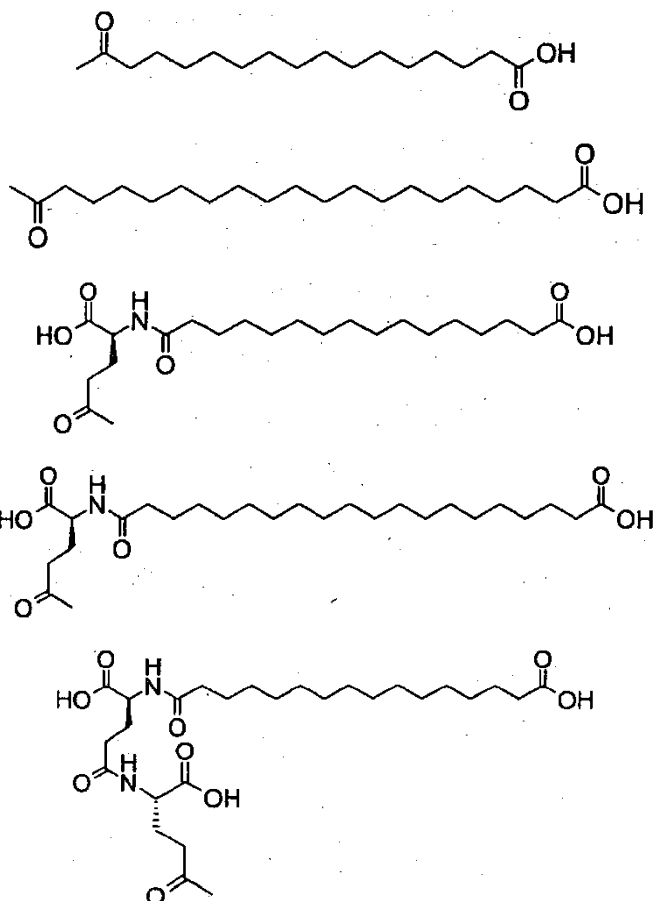
En este documento, la expresión resto de alquilenglicol incluye restos de monoalquilenglicol, así como restos de oligoalquilenglicol. Los monoalquilenglicoles y oligoalquilenglicoles comprenden cadenas a base de monoetilenglicol

y oligoetilenglicol, monopropilenglicol y oligopropilenglicol y monobutilenglicol y oligobutilenglicol, es decir, cadenas que se basan en la unidad de repetición $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ o $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$. El resto de alquilenglicol es monodisperso (con un peso molecular/longitud bien definidos). Los restos de monoalquilenglicol comprenden $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ o $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ que contienen diferentes grupos en cada extremo.

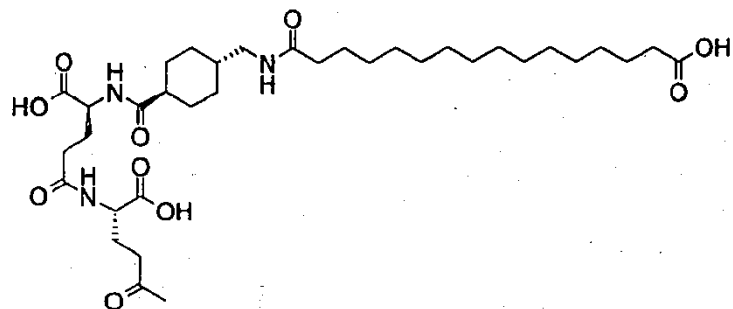
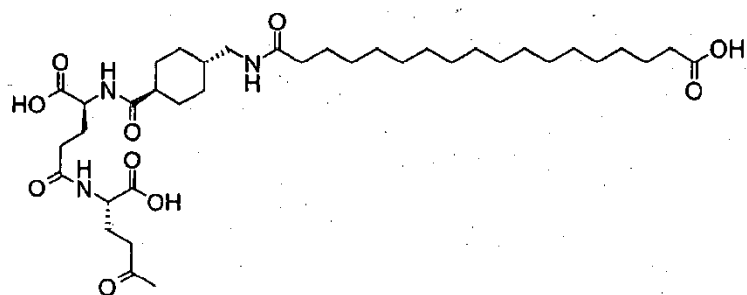
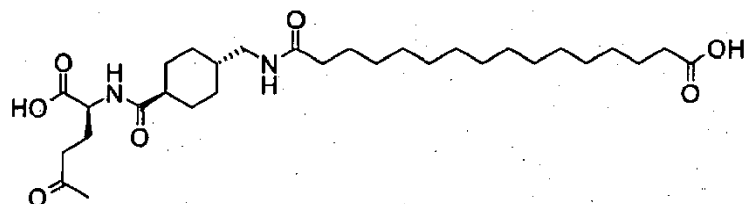
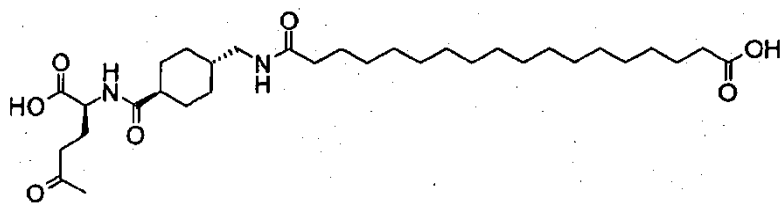
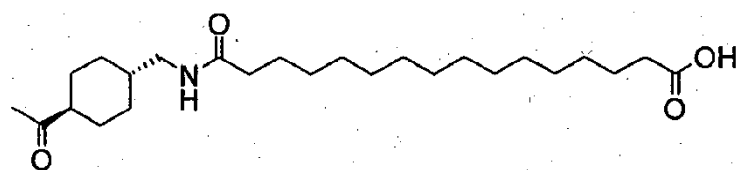
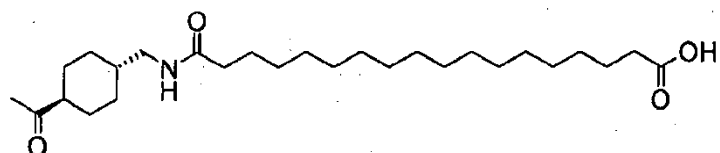
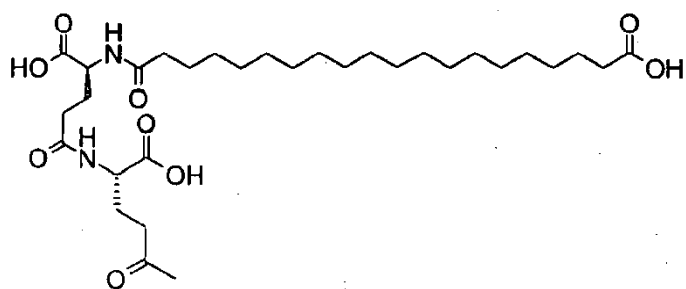
- 5 Como se ha mencionado en el presente documento, el orden en que aparecen AA1, AA2 y AA3 en el resto acilo con la fórmula (I) ($\text{Aci-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$) se puede intercambiar de forma independiente. En consecuencia, la fórmula $\text{Aci-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$ también incluye restos como, por ejemplo, la fórmula $\text{Aci-AA2}_m\text{-AA1}_n\text{-AA3}_p$, la fórmula $\text{Aci-AA2-AA3}_n\text{-AA2-}$ y la fórmula $\text{Aci-AA3}_p\text{-AA2}_m\text{-AA1}_n$, en donde Aci, AA1, AA2, AA3, n, m y p, son como se han definido en el presente documento.
- 10 Como se ha mencionado en el presente documento, las conexiones entre los restos Aci, AA1, AA2 y/o AA3 se obtienen formalmente mediante la formación de un enlace amida (enlace peptídico) ($-\text{CONH}-$), eliminando agua de los compuestos de origen a partir de los cuales se construyen formalmente. Esto significa que con el fin de obtener la fórmula completa para el resto acilo con la fórmula (I) ($\text{Aci-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$, en donde Aci, AA1, AA2, AA3, n, m y p son como se han definido en el presente documento), se tienen que tomar, formalmente, los compuestos dados para los términos Aci, AA1, AA2 y AA3, y eliminar un hidrógeno y/o un hidroxilo de ellos y, formalmente, conectar las unidades estructurales así obtenidas en los extremos libres así obtenidos.
- 15

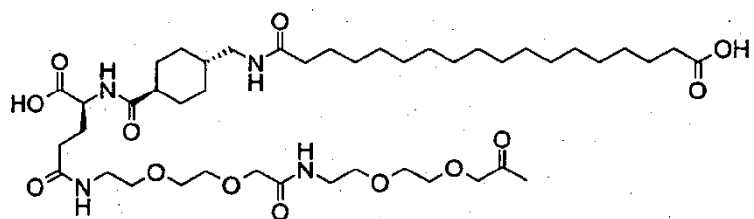
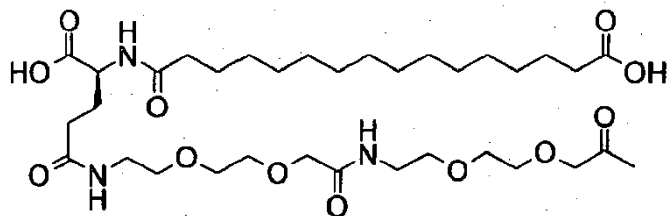
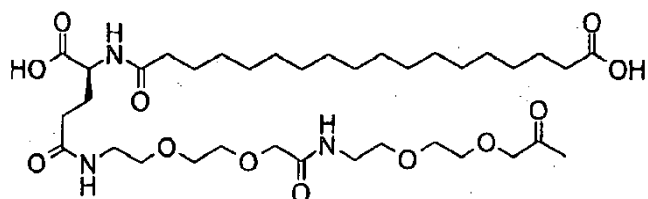
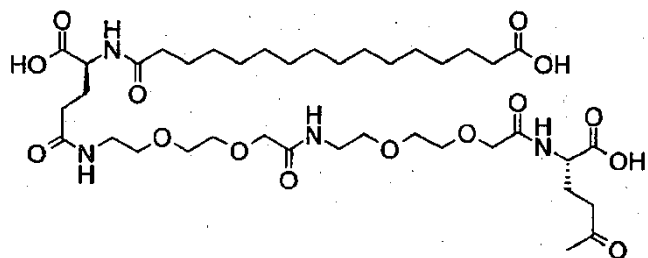
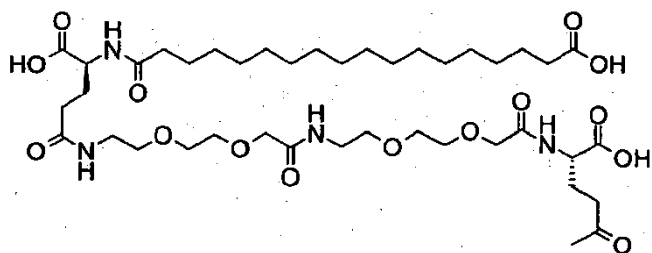
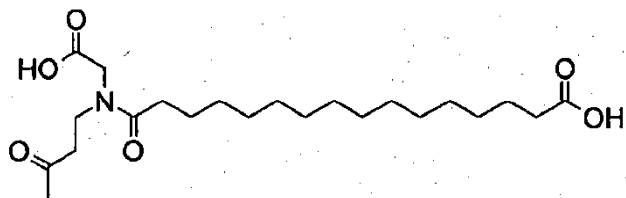
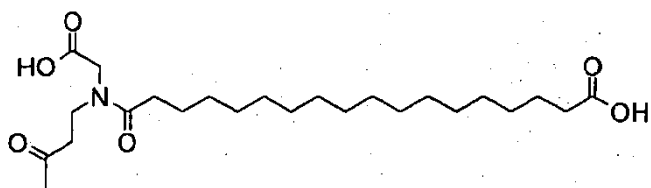
Ejemplos específicos no limitantes de los restos acilo de la fórmula $\text{Aci-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$ que pueden estar presentes en los análogos de insulina acilada de esta invención, son los siguientes:

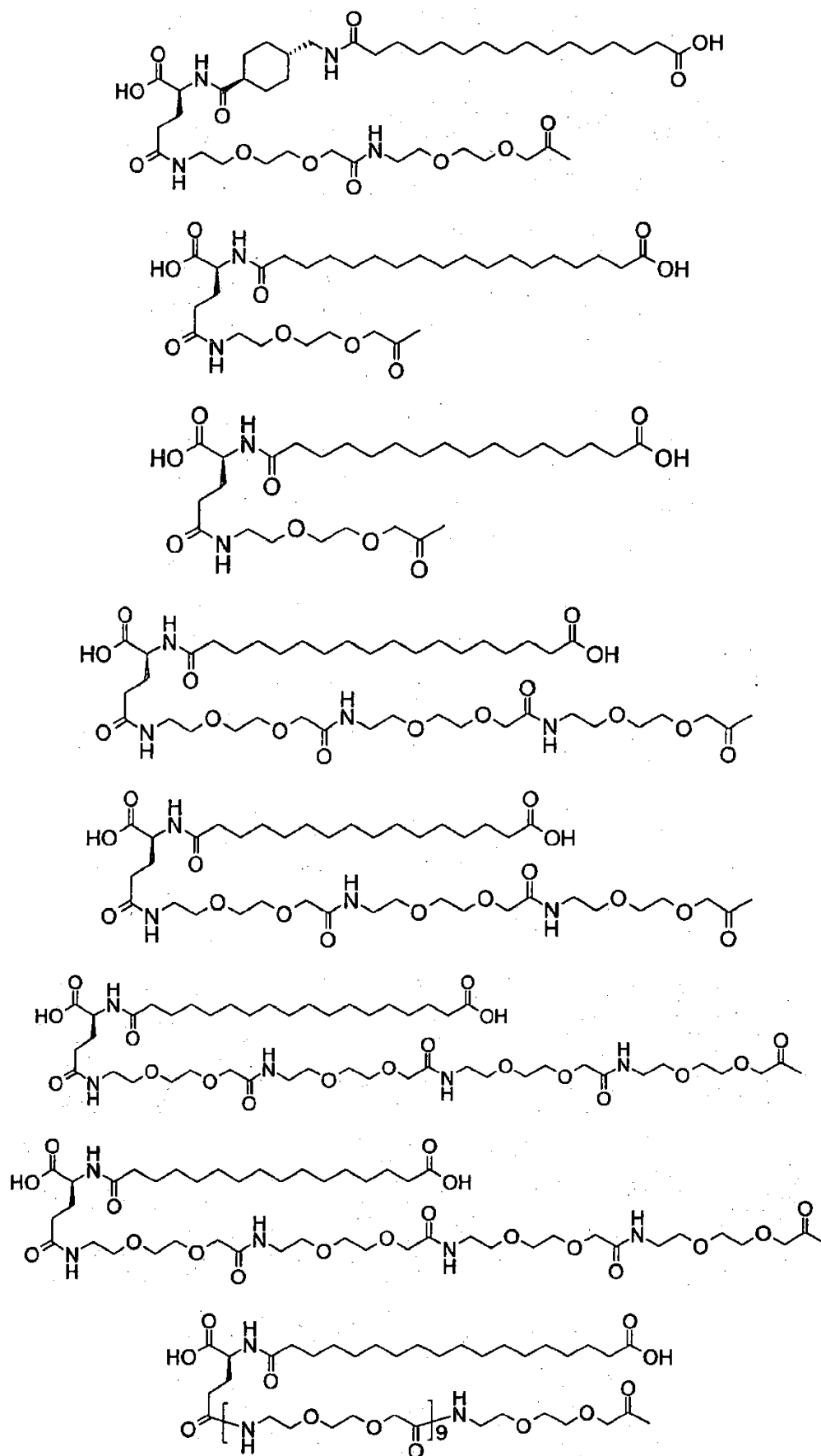
20

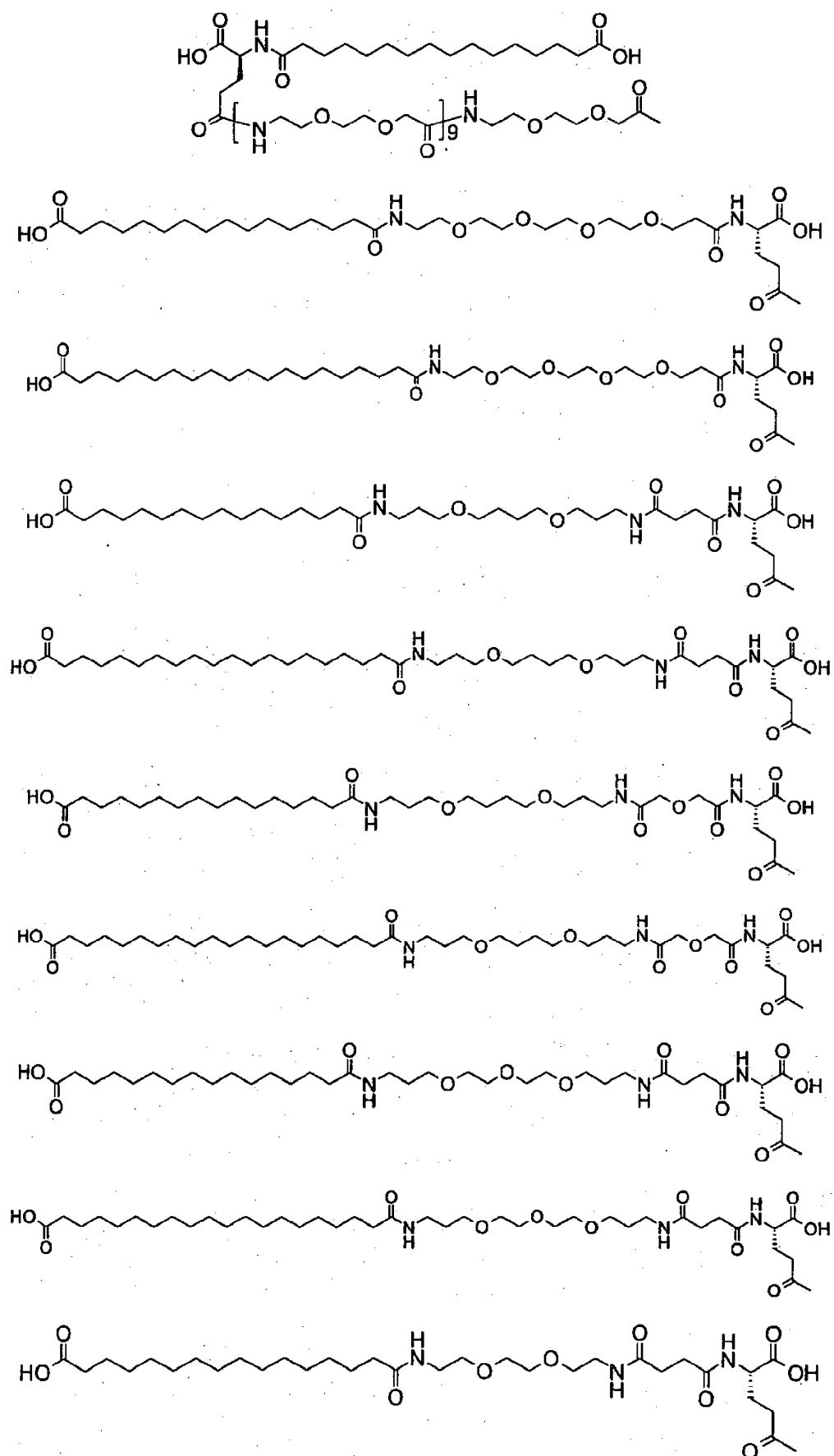


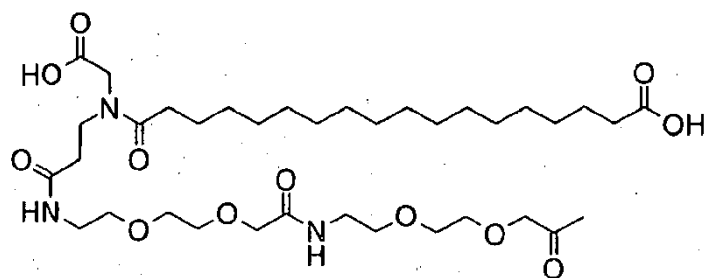
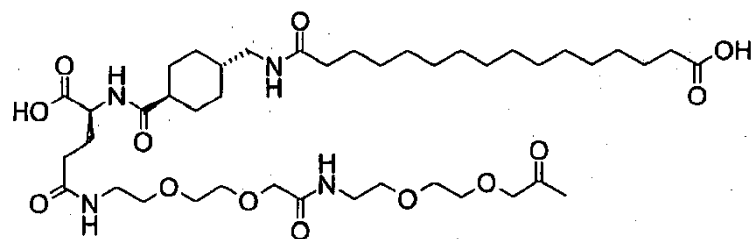
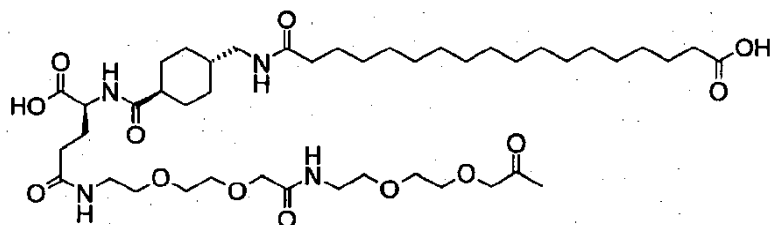
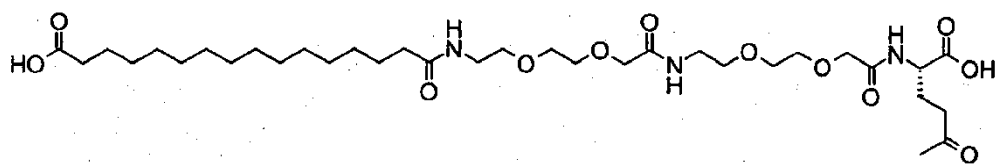
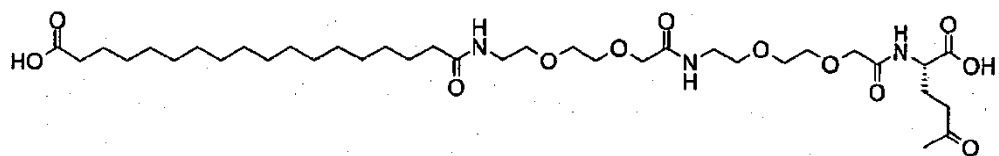
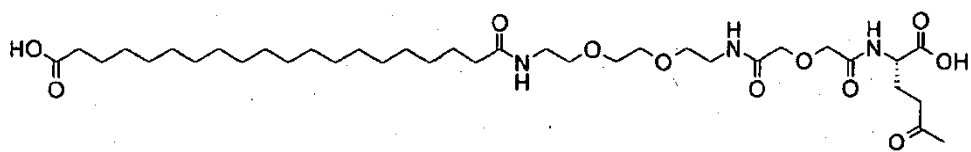
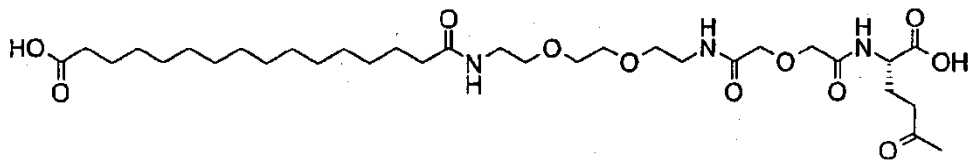
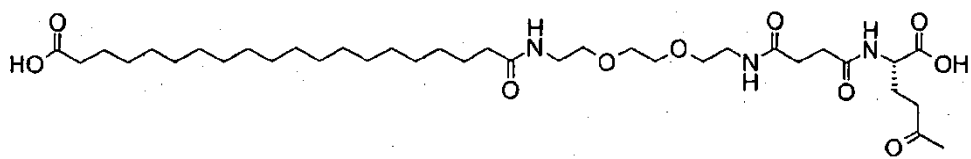
25

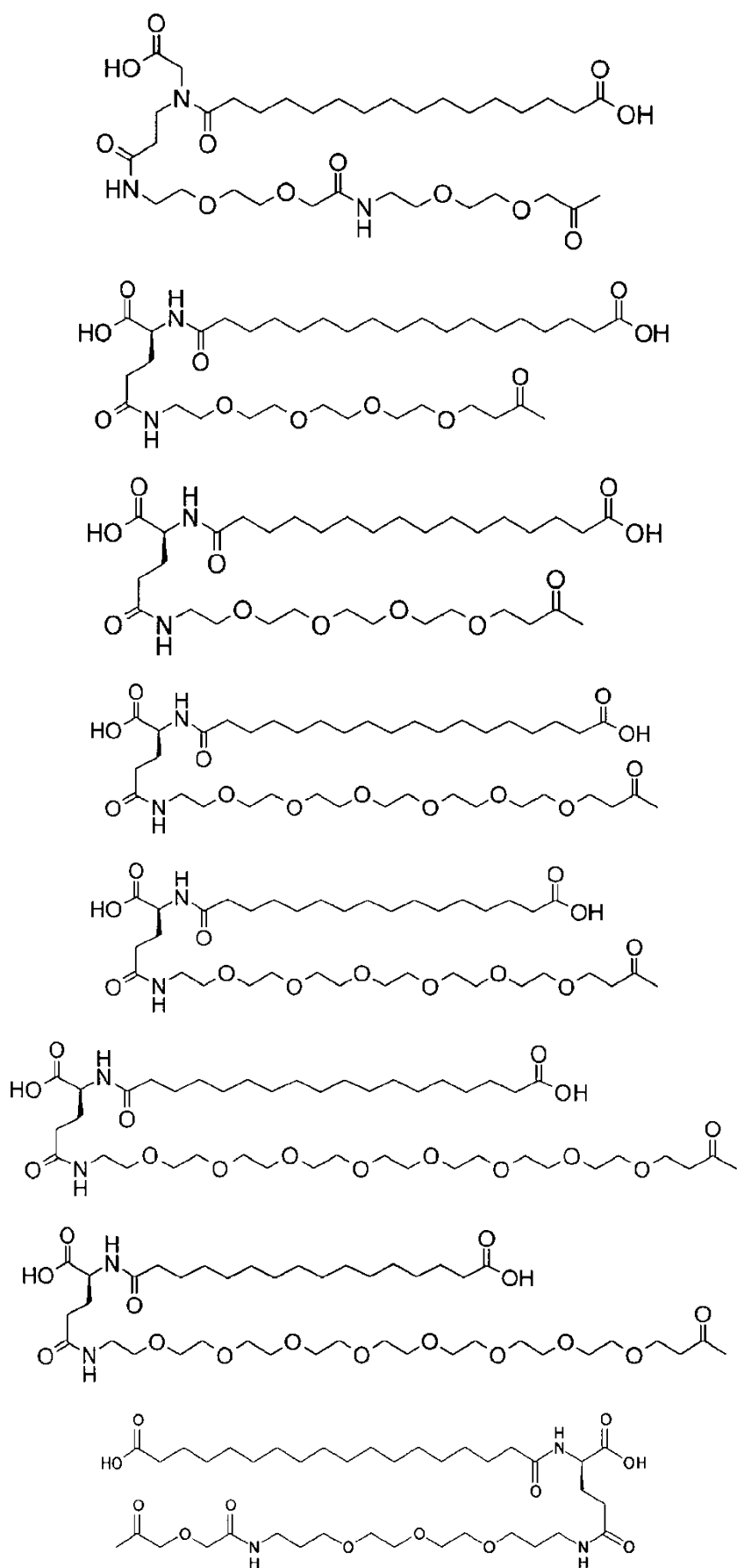


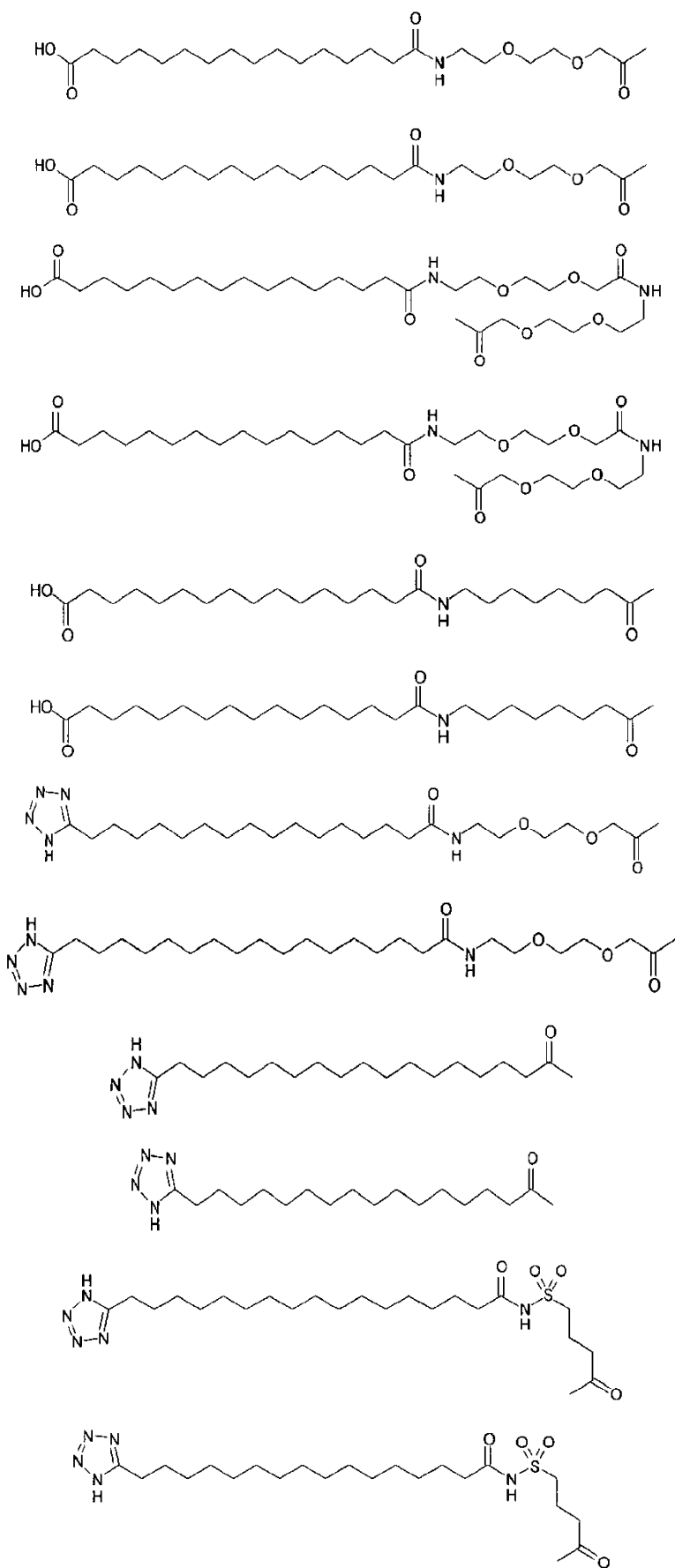


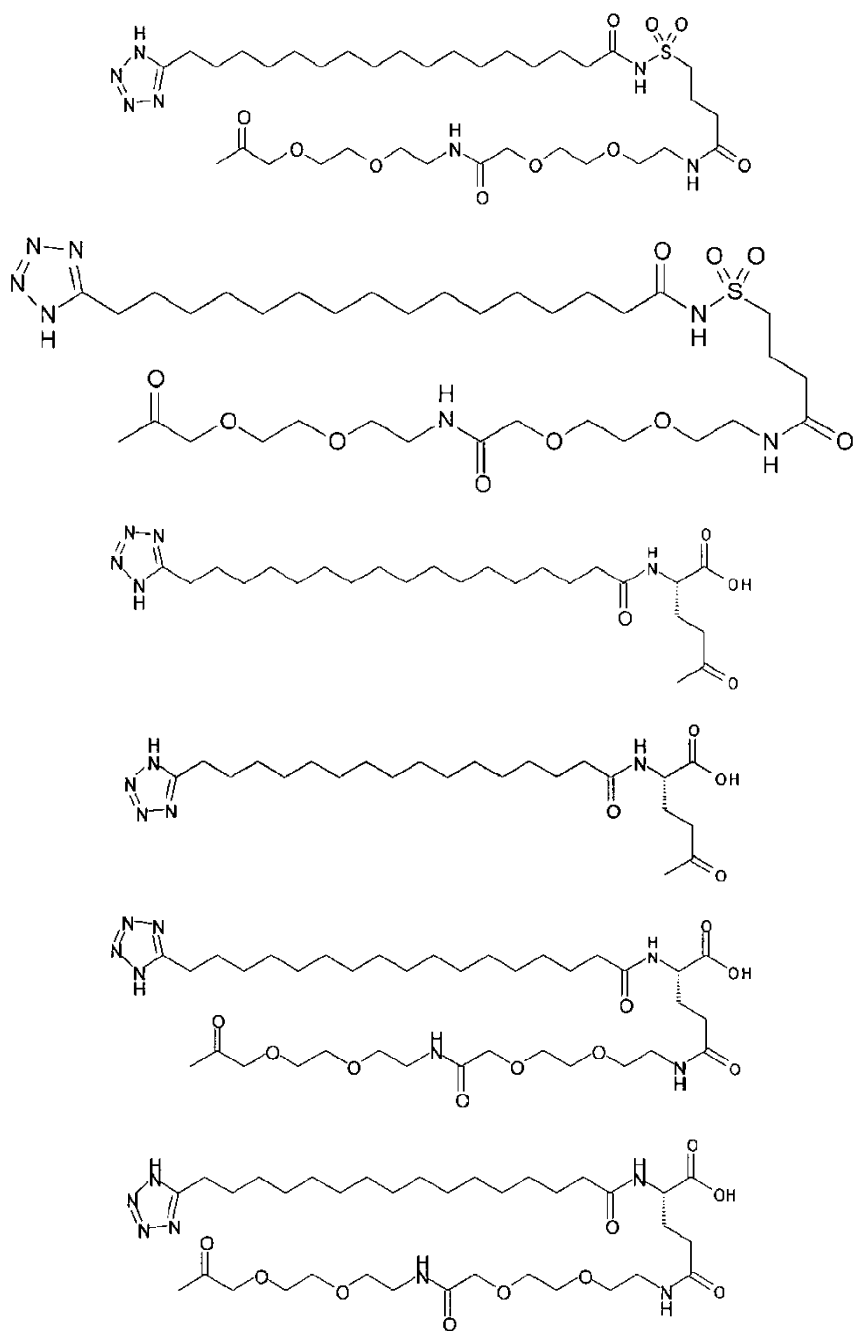


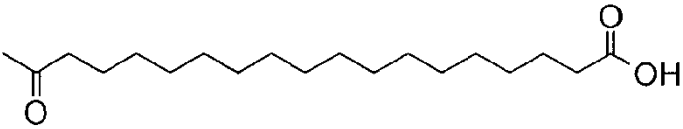
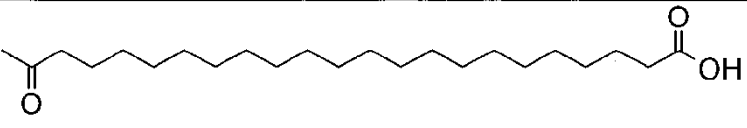
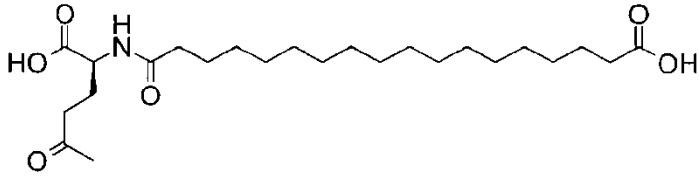
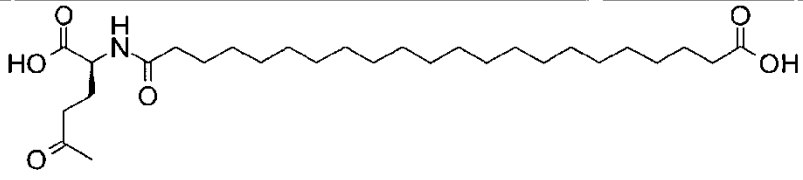


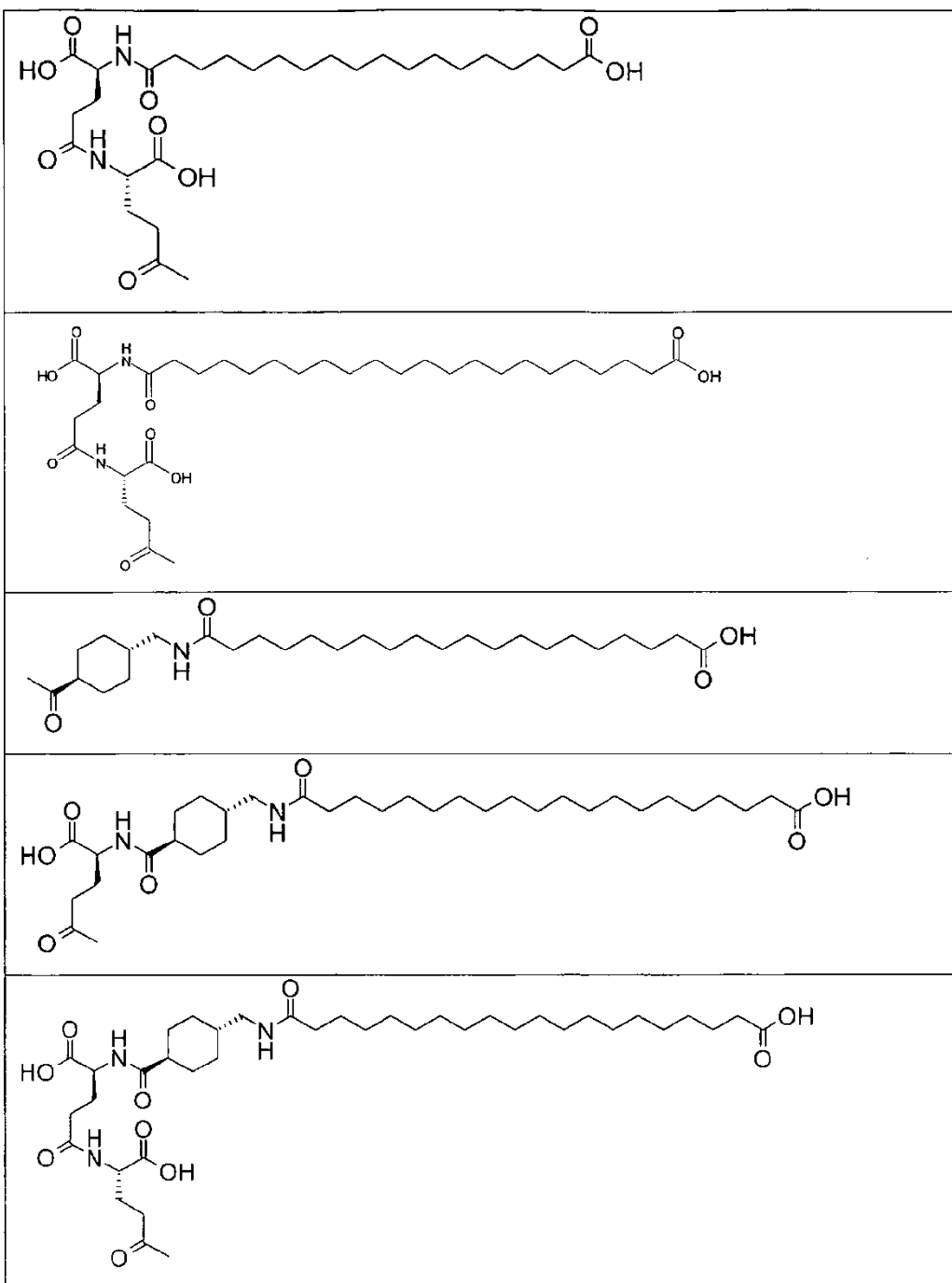


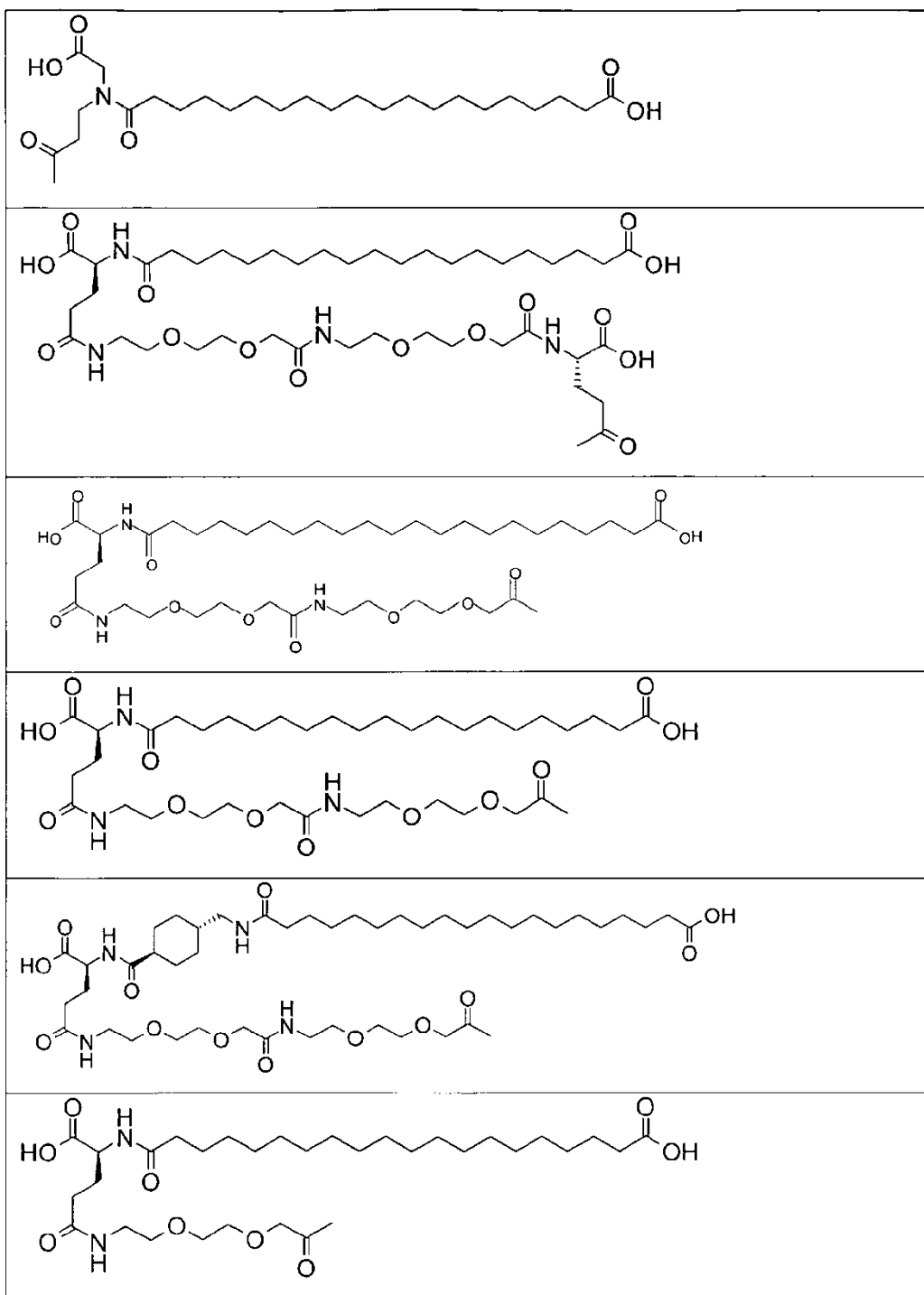


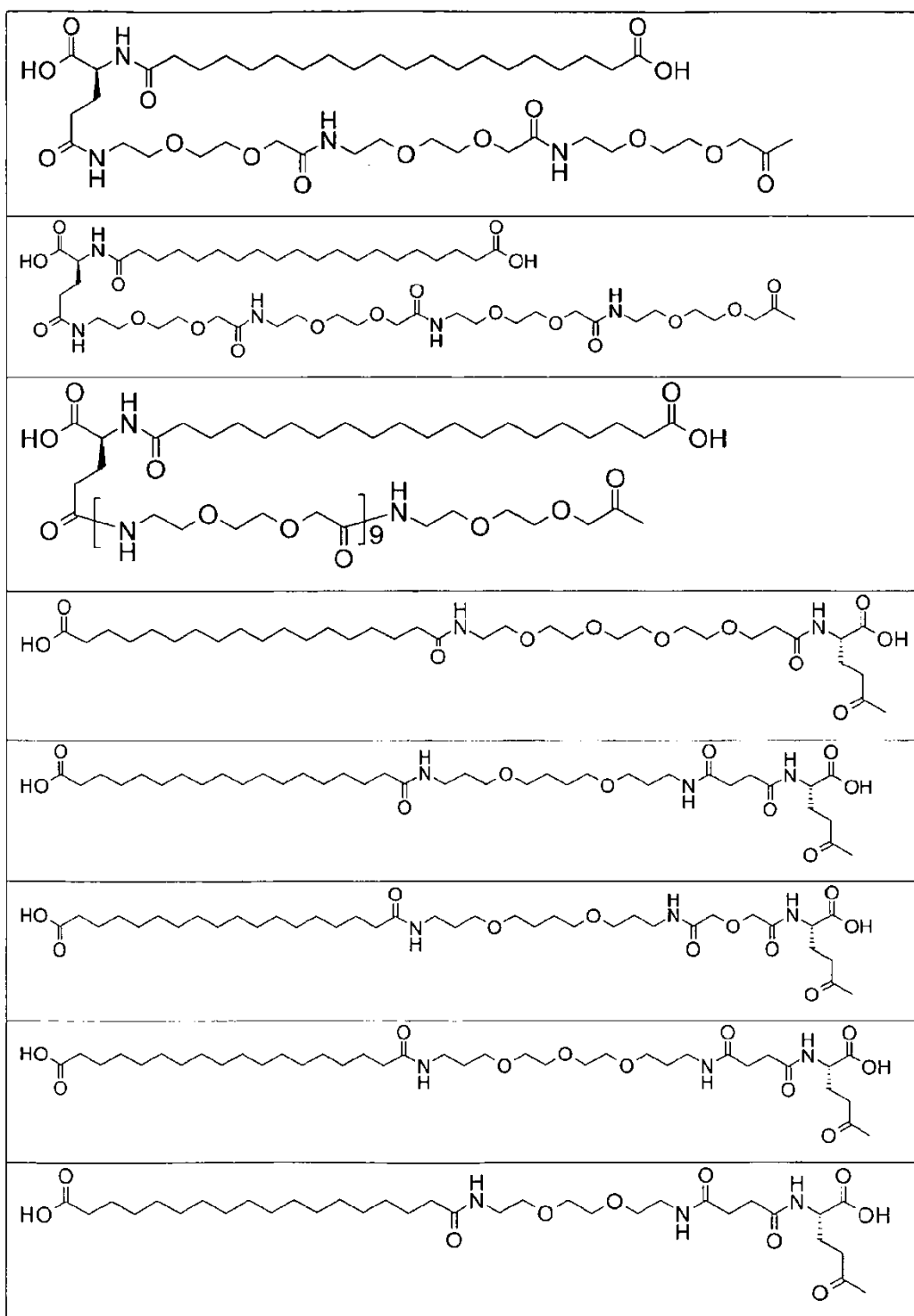


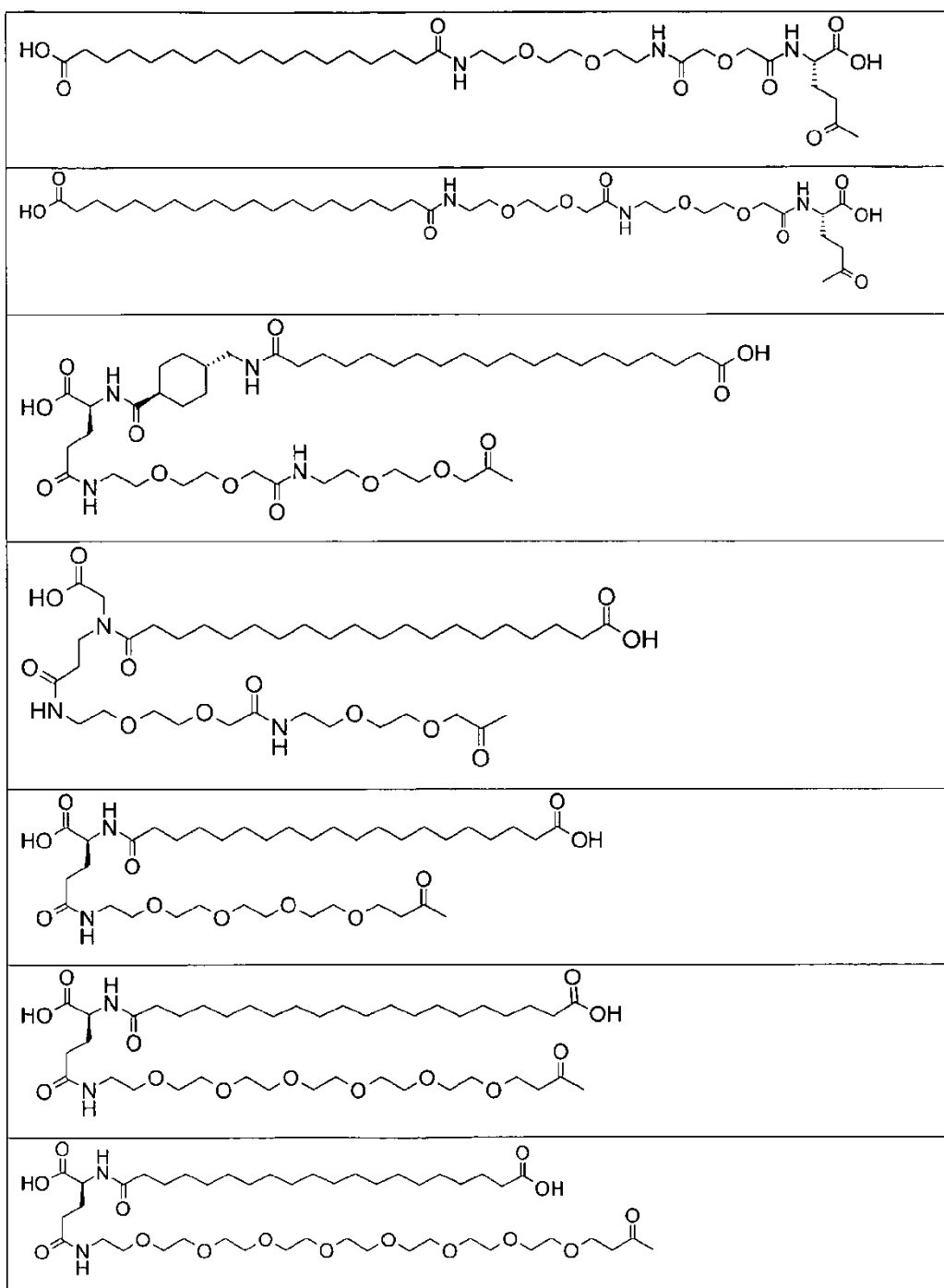


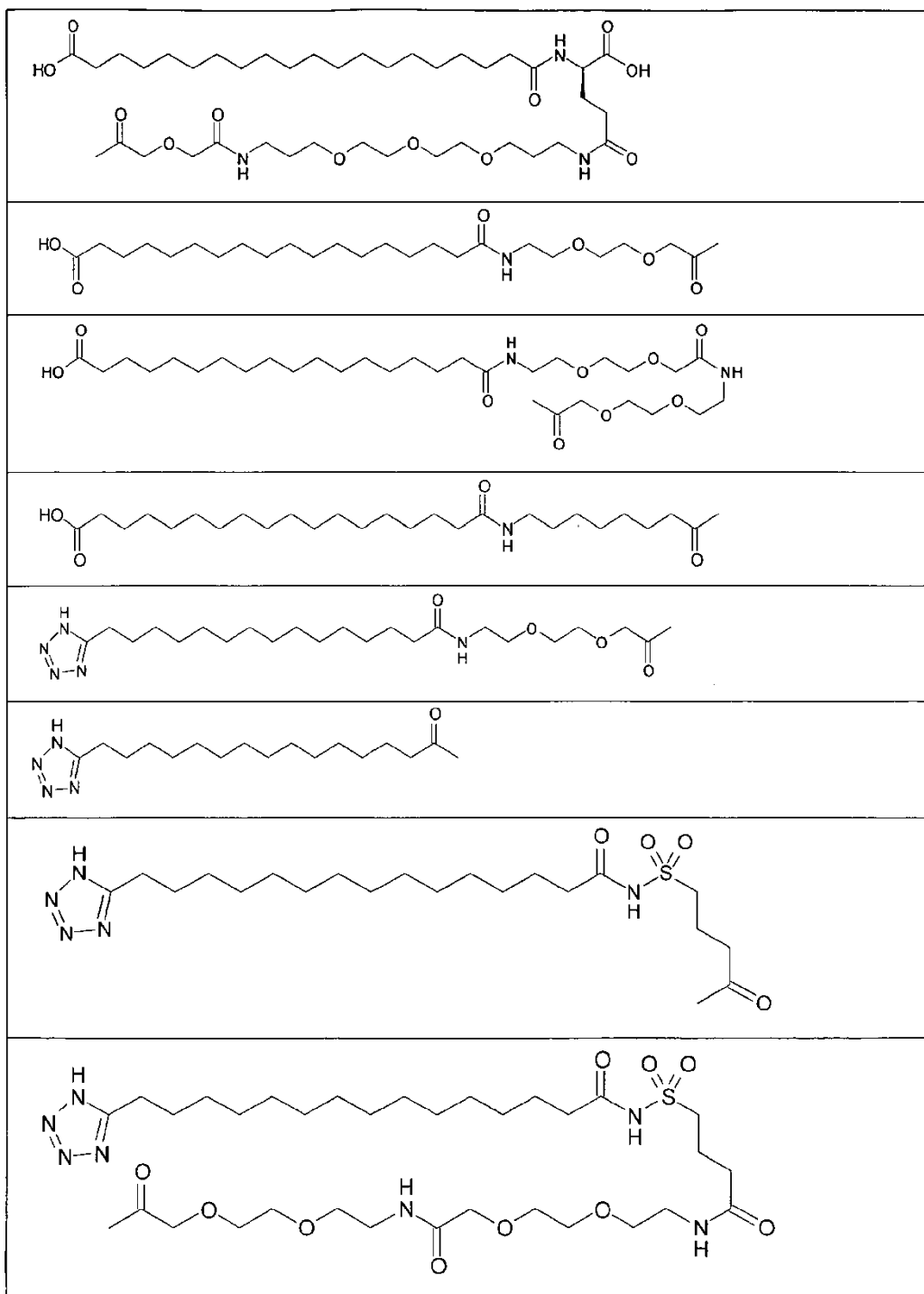





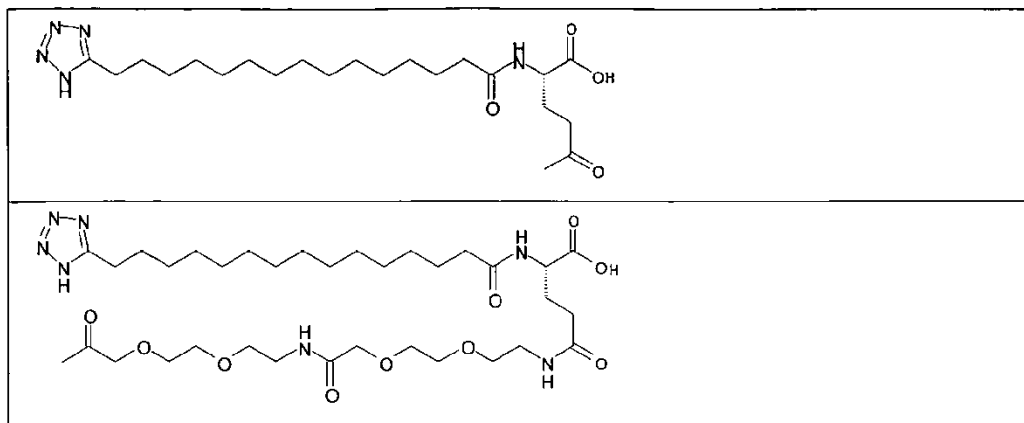












Cualquiera de los anteriores ejemplos no limitativos específicos de restos acilo de la fórmula Aci-AA1_n-AA2_m-AA3_p- puede estar fijado a un grupo amino épsilon de un residuo de lisina presente en cualquiera de los ejemplos específicos no limitativos anteriores de análogos de insulina, proporcionando de este modo ejemplos más específicos de análogos de insulina acilados de esta invención.

Cualquiera de los anteriores ejemplos no limitativos específicos de restos acilo de la fórmula Aci-AA1_n-AA2_m-AA3_p- puede estar fijado a un grupo amino alfa de un residuo de A1 presente en cualquiera de los ejemplos específicos no limitativos anteriores de análogos de insulina, proporcionando de este modo ejemplos más específicos de análogos de insulina acilados de esta invención.

- 10 Las insulinas estabilizadas frente a proteasas se pueden convertir en las insulinas aciladas estabilizadas frente a proteasas de esta invención mediante la introducción del grupo deseado de la fórmula Aci-AA1_n-AA2_m-AA3_p- en el residuo de lisina o en una posición N-terminal en el análogo de insulina. El grupo deseado de la fórmula Aci-AA1_n-AA2_m-AA3_p- se puede introducir por cualquier método conveniente y muchos métodos están descritos en la técnica anterior para tales reacciones. Más detalles aparecen en los ejemplos de esta memoria.
- 15 En una realización, la presente invención no se refiere a los compuestos descritos en el documento EP 07114387.9, es decir, insulinas aciladas en las que un resto acilo está fijado a la insulina de origen y en donde dicho resto acilo comprende unidades de repetición de aminoácidos que contienen alquilenglicol y en donde solo hay un residuo de lisina (K y Lys) en la insulina de origen.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

- 20 Las insulinas aciladas de esta invención se pueden administrar por vía subcutánea, nasal, oral o pulmonar.

Para la administración subcutánea, las insulinas aciladas de esta invención se formulan de forma análoga a la formulación de insulinas conocidas. Además, para la administración subcutánea, las insulinas aciladas de esta invención se administran de forma análoga a la administración de insulinas conocidas y, en general, los médicos están familiarizados con este procedimiento.

- 25 Las insulinas aciladas de esta invención se pueden administrar por inhalación en una dosis eficaz para incrementar los niveles de insulina circulante y/o para reducir los niveles de glucosa circulante. Tal administración puede ser eficaz para el tratamiento de trastornos tales como la diabetes o la hiperglucemia. Conseguir dosis eficaces de insulina requiere la administración de una dosis inhalada superior a desde aproximadamente 0,5 µg/kg a aproximadamente 50 µg/kg de insulinas aciladas de esta invención. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser determinada por un facultativo, que tendrá en cuenta factores como el nivel de insulina, los niveles de glucosa en sangre, la condición física del paciente, el estado pulmonar del paciente o similares.

Las insulinas aciladas de esta invención se pueden administrar por inhalación para lograr una absorción lenta y/o un aclaramiento sistémico reducido de las mismas. Diferentes dispositivos de inhalación suelen proporcionar una farmacocinética similar cuando se comparan tamaños de partícula similares y niveles similares de depósitos pulmonares.

Las insulinas aciladas de esta invención se pueden administrar mediante cualquiera entre una variedad de dispositivos de inhalación conocidos en la técnica para la administración de un agente terapéutico por inhalación. Estos dispositivos incluyen inhaladores de dosis medidas, nebulizadores, generadores de polvo seco, pulverizadores y similares. Preferiblemente, las insulinas aciladas de esta invención son administradas a través de un inhalador de polvo seco o un pulverizador. Hay diversas características deseables de un dispositivo de inhalación para la administración de las insulinas aciladas de esta invención. Por ejemplo, la administración a través del dispositivo de inhalación es ventajosamente fiable, reproducible y precisa. El dispositivo de inhalación debería administrar pequeñas

partículas o aerosoles, por ejemplo, menores de aproximadamente 10 µm, por ejemplo de aproximadamente 1-5 µm, para una buena capacidad de respiración. Algunos ejemplos específicos de dispositivos de inhalación disponibles en el mercado, adecuados para la práctica de esta invención son Turbohaler® (Astra), Rotahaler® (Glaxo), Diskus® (Glaxo), inhalador Spiros® (Dura), dispositivos comercializados por Inhale Therapeutics, AERx® (Aradigm), el nebulizador Ultravent® (Mallinckrodt), el nebulizador Acorn II® (Marquest Medical Products), el inhalador de dosis medida Ventolin® (Glaxo), el inhalador de polvo Spinhaler® (Fisons) o similares.

Como los expertos en la técnica reconocerán, la formulación de insulinas aciladas de esta invención, la cantidad de formulación suministrada y la duración de la administración de una dosis única, dependen del tipo de dispositivo de inhalación empleado. Para algunos sistemas de administración en aerosol, tales como nebulizadores, la frecuencia de la administración y la duración del tiempo durante el cual el sistema se activa, dependerán principalmente de la concentración de las insulinas aciladas en el aerosol. Por ejemplo, períodos más cortos de administración se pueden usar a concentraciones más altas de insulinas aciladas en la solución de nebulizador. Los dispositivos tales como los inhaladores de dosis medida pueden producir concentraciones más altas de aerosol y se pueden utilizar durante períodos más cortos para administrar la cantidad deseada de insulinas aciladas. Dispositivos tales como inhaladores de polvo administran el agente activo hasta que una carga dada de agente es expulsada del dispositivo. En este tipo de inhalador, la cantidad de insulinas aciladas de esta invención en una cantidad dada del polvo, determina la dosis administrada en una sola administración.

El tamaño de partícula de las insulinas aciladas de esta invención en la formulación suministrada por el dispositivo de inhalación es decisivo con respecto a la capacidad de la insulina para llegar a los pulmones, y preferentemente a las vías respiratorias inferiores o alveolos. Preferiblemente, las insulinas aciladas de esta invención se formulan de modo que al menos aproximadamente el 10% de las insulinas aciladas administradas se deposite en el pulmón, preferiblemente desde aproximadamente 10 a aproximadamente 20%, o más. Se sabe que la eficacia máxima del depósito pulmonar para seres humanos que respiran por la boca, se obtiene con tamaños de partícula desde aproximadamente 2 µm a aproximadamente 3 µm. Cuando los tamaños de partícula son superiores a aproximadamente 5 µm, el depósito pulmonar disminuye sustancialmente. Los tamaños de partícula inferiores a aproximadamente 1 µm, causan una disminución del depósito pulmonar, y se hace difícil administrar las partículas con una masa suficiente para que sean terapéuticamente eficaces. Por tanto, las partículas de las insulinas aciladas administradas por inhalación tienen un tamaño de partícula preferiblemente inferior a aproximadamente 10 µm, más preferiblemente en el intervalo desde aproximadamente 1 µm hasta aproximadamente 5 µm. La formulación de las insulinas aciladas se selecciona para alcanzar el tamaño de partícula deseado en el dispositivo de inhalación elegido.

Ventajosamente para la administración como un polvo seco, una insulina acilada de esta invención se prepara en forma de partículas con un tamaño de partícula menor de aproximadamente 10 µm, preferiblemente desde aproximadamente 1 a aproximadamente 5 µm. El tamaño de partícula preferido es eficaz para la administración en los alvéolos de los pulmones del paciente. Preferiblemente, el polvo seco se compone en gran parte de las partículas producidas, de modo que una mayoría de las partículas tienen un tamaño en el intervalo deseado. Ventajosamente, al menos aproximadamente el 50% del polvo seco está formado por partículas que tienen un diámetro menor de aproximadamente 10 µm. Tales formulaciones se pueden conseguir por secado por pulverización, molienda o condensación de punto crítico de una solución que contiene la insulina acilada de esta invención y otros ingredientes deseados. Otros métodos también adecuados para generar partículas útiles en la presente invención, son conocidos en la técnica.

Las partículas están generalmente separadas de una formulación en polvo seco en un recipiente y luego se transportan al pulmón de un paciente por medio de una corriente de aire portador. Normalmente, en los inhaladores de polvo seco actuales, la fuerza para romper el sólido se proporciona solo con la inhalación del paciente. En otro tipo de inhalador, el flujo de aire generado por la inhalación del paciente activa un motor propulsor que desaglomera las partículas.

Las formulaciones de insulinas aciladas de esta invención para administrar desde un inhalador de polvo seco incluyen normalmente un polvo seco finamente dividido que contiene el derivado, pero el polvo también pueden incluir un agente de carga, un vehículo, un excipiente, otro aditivo o similares. Los aditivos se pueden incluir en una formulación de polvo seco de insulina acilada, por ejemplo, para diluir el polvo según sea necesario para la administración desde el inhalador de polvo en particular, para facilitar el procesamiento de la formulación, para proporcionar propiedades ventajosas del polvo a la formulación, para facilitar la dispersión del polvo desde el dispositivo de inhalación, para estabilizar la formulación (por ejemplo, antioxidantes o tampones), para proporcionar sabor a la formulación o similares. Ventajosamente, el aditivo no afecta negativamente a las vías respiratorias del paciente. La insulina acilada se puede mezclar con un aditivo a un nivel molecular o la formulación sólida puede incluir partículas de la insulina acilada mezclada o recubierta sobre las partículas del aditivo. Los aditivos típicos incluyen mono-, di- y polisacáridos; alcoholes de azúcar y otros polioles, tales como, por ejemplo, lactosa, glucosa, rafinosa, melecitosa, lactitol, maltitol, trehalosa, sacarosa, manitol, almidón o combinaciones de los mismos; tensioactivos, tales como sorbitoles, difosfatidicolina o lecitina; o similares. Normalmente un aditivo, tal como un agente de carga, está presente en una cantidad eficaz para un objetivo descrito anteriormente, frecuentemente desde aproximadamente 50% a aproximadamente 90% en peso de la formulación. Agentes adicionales conocidos en la técnica para la formulación de una proteína, tal como una proteína de análogo de insulina, también se pueden incluir en la formulación.

Un aerosol que incluye las insulinas aciladas de esta invención se puede producir forzando una suspensión o solución de la insulina acilada través de una boquilla a presión. El tamaño de la boquilla y la configuración, la presión aplicada y la tasa de alimentación de líquido se pueden elegir para conseguir el tamaño de salida y de partícula deseados. Un electropulverizador se puede producir, por ejemplo, a través de un campo eléctrico en conexión con una alimentación capilar o de boquilla. Ventajosamente, las partículas de conjugado de insulina administradas mediante un pulverizador tienen un tamaño de partícula inferior a aproximadamente 10 μm , preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1 μm hasta aproximadamente 5 μm .

Las formulaciones de insulinas aciladas de esta invención adecuadas para uso con un pulverizador, normalmente incluirán las insulinas aciladas en una solución acuosa a una concentración desde aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg de la insulina acilada por ml de solución. Dependiendo de la insulina acilada elegida y de otros factores conocidos por el asesor médico, el límite superior puede ser menor, por ejemplo, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 120, 100 o 50 mg de la insulina acilada por ml de solución. La formulación puede incluir agentes tales como un excipiente, un tampón, un agente de isotonicidad, un conservante, un agente tensioactivo y, preferiblemente, zinc. La formulación también puede incluir un excipiente o un agente para la estabilización de la insulina acilada, tal como un tampón, un agente reductor, una proteína a granel o un carbohidrato. Las proteínas a granel útiles en la formulación de conjugados de insulina incluyen albúmina, protamina o similares. Los hidratos de carbono típicos, útiles en la formulación de la insulina acilada incluyen sacarosa, manitol, lactosa, trehalosa, glucosa o similares. La formulación de insulinas aciladas también puede incluir un agente tensioactivo, que puede reducir o prevenir la agregación inducida en la superficie del conjugado de insulina, causada por la atomización de la solución en la formación de un aerosol. Se pueden emplear varios tensioactivos convencionales, tales como ésteres y alcoholes polioxietilenados de ácidos grasos y ésteres de ácido graso de polioxietilensorbitol. Las cantidades generalmente variarán entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 4% en peso de la formulación.

Las composiciones farmacéuticas que contienen una insulina acilada de esta invención también se pueden administrar parenteralmente a pacientes que requieren tal tratamiento. La administración parenteral puede realizarse mediante inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa tipo pluma. Alternativamente, la administración parenteral se puede realizar por medio de una bomba de infusión.

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

En una realización adicional, el tampón se selecciona a partir del grupo que consiste en acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, bifosfato de sodio, fosfato disódico, fosfato sódico y tris(hidroximetil)amino-metano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas de los mismos. Cada uno de estos tampones específicos constituye una realización alternativa de esta invención.

En una realización adicional, la formulación comprende además un conservante farmacéuticamente aceptable que se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, p-hidroxibenzoato de butilo, 2-feniletanol, alcohol bencílico, clorobutanol y tiomersal, bronopol, ácido benzoico, imidurea, clorohexidina, deshidroacetato de sodio, clorocresol, p-hidroxibenzoato de etilo, cloruro de bencetonio, clorfenesina (3-(4-clorofenoxi)-1,2-propanodiol) o mezclas de los mismos. En una realización adicional, el conservante está presente en una concentración desde aproximadamente 0,1 mg/ml a 20 mg/ml. En una realización adicional, el conservante está presente en una concentración desde aproximadamente 0,1 mg/ml a 5 mg/ml. En una realización adicional, el conservante está presente en una concentración desde aproximadamente 5 mg/ml a 10 mg/ml. En una realización adicional, el conservante está presente en una concentración desde aproximadamente 10 mg/ml a 20 mg/ml. Cada uno de estos conservantes específicos constituye una realización alternativa. El uso de un conservante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por la persona experta. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

En una realización adicional, la formulación comprende además un agente isotónico que se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en una sal (por ejemplo, cloruro de sodio), un azúcar o alcohol de azúcar, un aminoácido (por ejemplo, L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano o treonina), un alditol (por ejemplo glicerol (glicerina), 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol o 1,3-butanodiol), polietilenglicol (por ejemplo, PEG400) o mezclas de los mismos. Cualquier azúcar, tal como mono-, di- o polisacáridos, o glucanos hidrosolubles, incluyendo, por ejemplo, fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, almidón de hidroxietilo y carboximetilcelulosa-Na, se puede utilizar. En una realización, el aditivo de azúcar es sacarosa. El alcohol de azúcar se define como un hidrocarburo C4-C8 con al menos un grupo -OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol

- y arabitol. En una realización, el aditivo de alcohol de azúcar es manitol. Los azúcares o alcoholes de azúcar mencionados anteriormente se pueden usar individualmente o en combinación. No hay un límite fijo para la cantidad usada, siempre y cuando el azúcar o el alcohol de azúcar sea soluble en la preparación líquida y no afecte negativamente a los efectos estabilizantes logrados utilizando los métodos de esta descripción. En una realización, la concentración de azúcar o alcohol de azúcar está entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml. En una realización adicional, el agente isotónico está presente en una concentración desde aproximadamente 1 mg/ml a 50 mg/ml. En una realización adicional, el agente isotónico está presente en una concentración desde aproximadamente 1 mg/ml a 7 mg/ml. En una realización adicional, el agente isotónico está presente en una concentración desde aproximadamente 8 mg/ml a 24 mg/ml. En una realización adicional, el agente isotónico está presente en una concentración desde aproximadamente 25 mg/ml a 50 mg/ml. Cada uno de estos agentes isotónicos específicos constituye una realización alternativa. El uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas es bien conocido por la persona experta. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science y Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.
- Los agentes isotónicos típicos son cloruro de sodio, manitol, sulfona de dimetilo y glicerol, y los conservantes típicos son fenol, m-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo y alcohol bencílico.
- Ejemplos de tampones adecuados son acetato de sodio, glicilglicina, HEPES (ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinotanosulfónico) y fosfato de sodio.
- Una composición para la administración nasal de una insulina acilada de esta invención se puede preparar, por ejemplo, como se describe en el documento de Patente Europea nº 272.097.
- Las preparaciones orales que contienen una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de esta invención se pueden preparar de una manera conocida por sí misma. Una forma de obtener las preparaciones que contienen una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de esta invención que se puede administrar de forma conveniente por vía oral, es mediante el uso de un procedimiento que es análogo al procedimiento descrito en el documento WO 2008/145728.
- Otra forma de obtener preparaciones orales que contienen una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de esta invención, es preparar composiciones farmacéuticas líquidas o semisólidas exentas de agua que comprenden una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de esta invención (a), al menos un disolvente orgánico polar estabilizado (b) para la insulina acilada estabilizada frente a proteasas, al menos un componente lipófilo (c) y opcionalmente un tensioactivo (d) y/o al menos un componente hidrófilo sólido (e). Esto podría estar en forma de una solución oleosa. Alternativamente, el al menos un componente hidrófilo sólido (d) es al menos un polímero hidrófilo sólido. Alternativamente, la composición farmacéutica que comprende al menos un componente hidrófilo, sólido está exenta de tensioactivos, en donde dicho tensioactivo tiene un valor HLB que es al menos 8, es decir, no hay ningún tensioactivo que tenga un valor de HLB que sea al menos 8, presente en la composición.
- Por ejemplo, una composición farmacéutica que se restringe a una insulina acilada estabilizada frente a proteasas puede ser una solución oleosa exenta de agua y/o una composición farmacéutica SEDDS o SMEDDS.
- Alternativamente, dicha composición farmacéutica es un sistema de administración de fármacos autoemulsionante (de aquí en adelante, denominado SEDDS).
- Se cree que la alta solubilidad de una insulina acilada estabilizada frente a proteasas en el disolvente orgánico polar de la composición farmacéutica que da lugar a una cantidad total relativamente baja de disolvente orgánico polar, necesaria en dicha composición farmacéutica, puede mejorar la compatibilidad de la composición farmacéutica con los materiales de cápsula.
- La composición farmacéutica puede contener un vehículo que comprende un componente lipófilo, un tensioactivo y un disolvente orgánico polar y, opcionalmente, un componente hidrófilo sólido (e). Si está presente un componente hidrófilo sólido, al menos uno de los componentes seleccionados a partir del grupo que consiste en un componente lipófilo y un agente tensioactivo es líquido o semisólido. Si está presente un componente líquido hidrófilo (e), tanto el componente lipófilo como el tensioactivo pueden ser sólidos. Por ejemplo, el tensioactivo es líquido o semisólido. En un aspecto, un componente hidrófilo sólido está presente.
- Tal y como se usa en el presente documento, el término "vehículo" se refiere al vehículo farmacéuticamente aceptable que transporta el polipéptido soluble en agua, terapéuticamente activo a través de la membrana biológica o dentro de un fluido biológico. El vehículo comprende un componente lipófilo y un disolvente orgánico polar y, opcionalmente, un componente hidrófilo sólido y/o un agente tensioactivo. El vehículo es capaz de producir espontáneamente una emulsión o estructuras coloidales, cuando se pone en contacto, se dispersa o se diluye con un medio acuoso, por ejemplo, agua, líquidos que contienen agua o medios *in vivo* en los mamíferos, tales como los jugos gástricos del tracto gastrointestinal. Las estructuras coloidales pueden ser partículas sólidas o líquidas, incluyendo dominios, gotitas, micelas, micelas mixtas, vesículas y nanopartículas.
- Por ejemplo, cuando la composición farmacéutica se pone en contacto con un medio acuoso, se forma espontáneamente una emulsión, tal como una microemulsión. En particular, una emulsión o una microemulsión se forma en el

tracto digestivo de un mamífero cuando el sistema de administración se ingiere por vía oral. Además de los componentes mencionados anteriormente, el preconcentrado dispersable de forma espontánea también puede contener opcionalmente otros excipientes, tales como tampones, ajustadores de pH, estabilizantes y otros adyuvantes reconocidos por un experto ordinario en la técnica por ser apropiados para una utilización farmacéutica de este tipo.

- 5 La expresión "exenta de agua" tal como se utiliza en este documento, se refiere a una composición a la que no se añade agua durante la preparación de la composición farmacéutica. La insulina acilada estabilizada frente a proteasas y/o uno o varios de los excipientes en la composición farmacéutica puede tener pequeñas cantidades de agua unida a ella antes de la preparación de una composición farmacéutica. Por ejemplo, una composición farmacéutica exenta de agua comprende menos de 10% p/p de agua, por ejemplo, menos de 5% p/p de agua, por ejemplo, menos de 4% p/p de agua, por ejemplo, menos de 3% p/p de agua, por ejemplo, menos de 2% p/p de agua, por ejemplo, menos de 1% p/p de agua.

- 10 Tal como se utiliza en este documento, la expresión "preconcentrado de microemulsión" significa una composición que forma espontáneamente una microemulsión, por ejemplo, una microemulsión de aceite-en-agua, en un medio acuoso, por ejemplo, en agua o en los fluidos gastrointestinales, después de la aplicación oral. La composición se autoemulsiona después de la dilución en un medio acuoso, por ejemplo, en una dilución de 1:5, 1:10, 1:50, 1:100 o superior.

Debido a la alta solubilidad de la insulina acilada estabilizada frente a proteasas, la cantidad total de disolvente orgánico polar en los SEDDS se puede mantener baja, lo que por una parte mejora la compatibilidad de la formulación con los materiales de cápsula y, por otra parte proporciona más espacio de diseño para la composición.

- 20 La composición farmacéutica comprende un componente lipófilo y un componente polar orgánico. Los componentes del sistema de administración de fármacos pueden estar presentes en cualquier cantidad relativa. Por ejemplo, el sistema de administración de fármacos puede comprender hasta un 40% de componente orgánico polar en peso de la composición del vehículo, por ejemplo, menos de 30%, 20%, 15% o 10%. En otro aspecto, el sistema de administración de fármacos comprende de 5% a 40% en peso de disolvente orgánico polar de la composición total del vehículo. En aún un aspecto adicional, el sistema de administración de fármacos comprende de 10% a 30% en peso de disolvente orgánico polar de la composición total del vehículo.

La composición farmacéutica puede estar en forma de una composición no en polvo, es decir, en una forma semi-sólida o líquida.

- 30 Tal como se utiliza en este documento, el término "líquido" significa un componente o una composición que está en estado líquido a temperatura ambiente ("TA") y que tiene un punto de fusión, por ejemplo, inferior a 20°C. Tal y como se usa en este documento, la temperatura ambiente (TA) significa aproximadamente 20-25°C.

- 35 Tal como se utiliza en este documento, el término "semisólido" se refiere a un componente o una composición que no es líquida a temperatura ambiente, por ejemplo, que tiene un punto de fusión entre la temperatura ambiente y aproximadamente 40°C. Un semisólido puede tener las cualidades y/o atributos de los estados de materia tanto sólidos como líquidos. Tal y como se emplea en el presente documento, el término "solidificar" significa hacerse sólido o semisólido.

Ejemplos de composiciones semisólidas o líquidas, son composiciones farmacéuticas, por ejemplo, en forma de aceites, soluciones, SMEDDS líquidos o semisólidos y SEDDS líquidos o semisólidos.

- 40 "SMEDDS" (que es una abreviatura para sistemas de administración de fármacos auto-microemulsionantes) se define en este documento como mezclas isotrópicas de un componente hidrófilo, un tensioactivo, opcionalmente un cotensioactivo y un fármaco que forman rápidamente una microemulsión de aceite en agua cuando se exponen a medios acuosos en condiciones de agitación suave o de motilidad digestiva como se puede encontrar en el tracto GI.

- 45 "SEDDS" (que es una abreviatura para sistemas de administración de fármacos autoemulsionantes) se define en este documento como mezclas de un componente hidrófilo, un agente tensioactivo, opcionalmente un cotensioactivo y un fármaco que forman espontáneamente una fina emulsión de aceite en agua cuando se exponen a medios acuosos en condiciones de agitación suave o de motilidad digestiva como se puede encontrar en el tracto GI.

- 50 Tal como se utiliza en este documento, el término "microemulsión" se refiere a una dispersión coloidal clara o translúcida, ligeramente opaca, opalescente, no opaca o sustancialmente no opaca que se forma espontáneamente o de forma sustancialmente espontánea cuando sus componentes se ponen en contacto con un medio acuoso.

Tal como se utiliza en este documento, el término "emulsión" se refiere a una dispersión coloidal ligeramente opaca, opalescente u opaca que se forma espontáneamente o de forma sustancialmente espontánea cuando sus componentes se ponen en contacto con un medio acuoso

- 55 Una microemulsión es termodinámicamente estable y contiene partículas o dominios homogéneamente dispersos, por ejemplo, de un estado sólido o líquido (por ejemplo, partículas líquidas de lípidos o gotitas), con un diámetro

medio menor de aproximadamente 500 nm, por ejemplo, menor de aproximadamente 400 nm o menor de 300 nm, menor de 200 nm, menor de 100 nm y más de aproximadamente 2-4 nm, medido por técnicas convencionales de dispersión de luz, por ejemplo, usando un Malvern Zetasizer Nano ZS. La expresión "tamaño de dominio" tal y como se usa en el presente documento, se refiere a unidades de dispersión repetitivas y se puede medir, por ejemplo, mediante rayos X de ángulo pequeño. En un aspecto, el tamaño del dominio es menor que 400 nm, en otro aspecto, menor que 300 nm y en otro aspecto más, menor que 200 nm.

Tal como se utiliza en este documento, la expresión "dispersable espontáneamente" cuando se refiere a un preconcentrado, se refiere a una composición que es capaz de producir estructuras coloidales tales como microemulsiones, emulsiones y otros sistemas coloidales, cuando se diluye con un medio acuoso cuando los componentes de la composición se ponen en contacto con un medio acuoso, por ejemplo, mediante simple agitación manual durante un corto período de tiempo, por ejemplo, durante diez segundos. En un aspecto, un concentrado dispersable espontáneamente es un SEDDS o SMEDDS.

Tal como se utiliza en este documento, la expresión "componente lipófilo" se refiere a una sustancia, material o ingrediente que es más compatible con aceite que con agua. Un material con propiedades lipófilas es insoluble o casi insoluble en agua, pero es fácilmente soluble en aceite u otros disolventes no polares. La expresión "componente lipófilo" puede comprender una o varias sustancias lipófilas. Los componentes lipófilos múltiples pueden constituir la fase lipófila del preconcentrado dispersable espontáneamente y formar el aspecto de aceite, por ejemplo, en una emulsión o microemulsión de aceite en agua. A temperatura ambiente, el componente lipófilo y la fase lipófila del preconcentrado dispersable espontáneamente puede ser sólido, semisólido o líquido. Por ejemplo, un componente lipófilo sólido puede existir como una pasta, en forma granular, en polvo o en escamas. Si más de un excipiente comprende el componente lipófilo, el componente lipófilo puede ser una mezcla de líquidos, sólidos o de ambos.

En un aspecto, el componente lipófilo está presente en la composición farmacéutica en una cantidad de al menos 20% p/p. En un aspecto adicional, el componente lipófilo está presente en una cantidad de al menos 30%, al menos 50%, al menos 80% o al menos 90% p/p. Por ejemplo, el componente lipófilo puede estar presente desde aproximadamente 5% a aproximadamente 90% en peso de la composición, por ejemplo, desde aproximadamente 15% a aproximadamente 60%, por ejemplo, desde aproximadamente 20% a aproximadamente 40%. Ejemplos de componentes lipófilos sólidos, es decir, componentes lipófilos que son sólidos o semisólidos a temperatura ambiente, incluyen, pero no están limitados a, los siguientes:

1. mezclas de mono-, di- y triglicéridos, tales como cocoglicéridos hidrogenados (punto de fusión (p.f.) desde aproximadamente 33,5°C a aproximadamente 37°C], comercialmente disponibles como WITEPSOL H15 de Sasol Germany (Witten, Alemania); ejemplos de triglicéridos de ácidos grasos, por ejemplo, los triglicéridos de ácidos grasos C10-C22, incluyen aceites naturales e hidrogenados, tales como aceites vegetales;

2. ésteres, tales como estearato de propilenglicol (PG), disponible comercialmente como MONOSTEOL (p.f. desde aproximadamente 33°C a aproximadamente 36°C) de Gattefosse Corp. (Paramus, NJ); estearato de dietilenglicol de palmito, disponible comercialmente como HYDRINE (p.f. desde aproximadamente 44,5°C a aproximadamente 48,5°C) de Gattefosse Corp.;

3. glicéridos saturados poliglicosilados, tales como ésteres de PEG-6 de aceite de palma hidrogenado/semilla de palma (p.f. desde aproximadamente 30,5°C a aproximadamente 38°C), disponibles comercialmente como LABRAFIL M2130 CS de Gattefosse Corp. o Gelucire 33/01;

4. alcoholes grasos, tales como alcohol miristílico (p.f. de aproximadamente 39°C), disponible comercialmente como LANETTE 14 de Cognis Corp. (Cincinnati, OH); ésteres de ácidos grasos con alcoholes grasos, por ejemplo, palmitato de cetilo (p.f. de aproximadamente 50°C); monolaurato de isosorbida, por ejemplo, disponible comercialmente bajo el nombre comercial ARLAMOL ISML de Uniqema (New Castle, Delaware), por ejemplo, que tiene un punto de fusión de aproximadamente 43°C;

5. éter de PEG-alcohol graso, que incluye éter cetílico de polioxietileno (2), por ejemplo, disponible comercialmente como BRIJ 52 de Uniqema, que tiene un punto de fusión de aproximadamente 33°C, o éster estearílico de polioxietileno (2), por ejemplo, disponible comercialmente como BRIJ 72 de Uniqema que tiene un punto de fusión de aproximadamente 43°C;

6. ésteres de sorbitán, por ejemplo, ésteres de ácidos grasos de sorbitán, por ejemplo, monopalmitato de sorbitán o monoestearato de sorbitán, por ejemplo, disponibles comercialmente como SPAN 40 o SPAN 60 de Uniqema y que tienen puntos de fusión desde aproximadamente 43°C a 48°C o desde aproximadamente 53°C a 57°C y 41°C a 54°C, respectivamente; y

7. ésteres de ácidos grasos mono-C6-C14 de glicerilo. Estos se obtienen esterificando glicerol con aceite vegetal seguido por destilación molecular. Los monoglicéridos incluyen, pero no se limitan a, monoglicéridos simétricos (es decir, beta-monoglicéridos), así como monoglicéridos asimétricos (α-monoglicéridos). También incluyen tanto glicéridos uniformes (en los que el constituyente de ácido graso se compone principalmente de un único ácido graso), como glicéridos mixtos (es decir, en los que el constituyente de ácido graso se compone de varios ácidos grasos). El constituyente de ácido graso puede incluir tanto ácidos grasos saturados como insaturados que tienen una longitud

de cadena de, por ejemplo, C8-C14. Son particularmente adecuados, por ejemplo, monolaurato de glicerilo disponible comercialmente como IMWITOR 312 de Sasol North America (Houston, TX), (p.f. de aproximadamente 56°C-60°C); monodicoato de glicerilo, disponible comercialmente como IMWITOR 928 de Sasol (p.f. de aproximadamente 33°C-37°C); citrato de monoglicerilo, disponible comercialmente como IMWITOR 370, (p.f. de aproximadamente 59 a aproximadamente 63°C); o monoestearato de glicerilo, por ejemplo, disponible comercialmente como IMWITOR 900 de Sasol (p.f. de aproximadamente 56°C-61°C); o monoestearato de glicerol autoemulsionante, por ejemplo, disponible comercialmente como IMWITOR 960 de Sasol (p.f. de aproximadamente 56°C-61°C).

Ejemplos de componentes lipófilos líquidos, es decir, componentes lipófilos que son líquidos a temperatura ambiente incluyen, pero no están limitados a los siguientes:

- 10 1. mezclas de mono-, di- y triglicéridos, tales como mono- y diglicéridos de cadena media, caprilato/caprato de glicerilo, comercialmente disponible como CAPMUL MCM de Abitec Corp. (Columbus, OH);
2. éster de ácido mono o digraso de glicerilo, por ejemplo, de ácidos grasos C6-C18, por ejemplo, C6-C16, por ejemplo, C8-C10, por ejemplo, C8, o derivados acetilados de los mismos, por ejemplo MYVACET 9-45 o 9-08 de Eastman Chemicals (Kingsport, TN) o IMWITOR 308 o 312 de Sasol;
- 15 3. éster de ácido mono o digraso de propilenglicol, por ejemplo, de ácidos grasos C8-C20, por ejemplo, C8-C12, por ejemplo, LAUROGLYCOL 90, SEFSOL 218 o CAPRYOL 90 o CAPMUL PG-8 (igual que caprilato de propilenglicol) de Abitec Corp.;
4. aceites, tales como aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de almendras, aceite de cacahuete, aceite de palma, aceite de germen de trigo, aceite de maíz, aceite de ricino, aceite de coco, aceite de semilla de algodón,
- 20 aceite de semilla de soja, aceite de oliva y aceite mineral;
5. ácidos grasos o alcoholes, por ejemplo C8-C20, saturados o mono- o di-insaturados, por ejemplo, ácido oleico, alcohol oleico, ácido linoleico, ácido cáprico, ácido caprílico, ácido caproico, tetradecanol, dodecanol, decanol;
6. triglicéridos de ácidos grasos de cadena media, por ejemplo, C8-C12, por ejemplo, MIGLYOL 812, o triglicéridos de ácidos grasos de cadena larga, por ejemplo, aceites vegetales;
- 25 7. aceites vegetales etoxilados transesterificados, por ejemplo, disponibles comercialmente como LABRAFIL M2125 CS de Gattefosse Corp.;
8. compuestos esterificados de ácido graso y alcohol primario, por ejemplo, ácidos grasos C8-C20 y alcoholes C2-C3, por ejemplo, linoleato de etilo, por ejemplo, disponible comercialmente como NIKKOL VF-E de Nikko Chemicals (Tokio, Japón), butirato de etilo, etilcaprilato oleico, oleato de etilo, miristato de isopropilo y caprilato de etilo;
- 30 9. aceites esenciales, o cualquiera de una clase de aceites volátiles que proporcionan a las plantas sus olores característicos, tales como aceite de menta verde, aceite de clavo, aceite de limón y aceite de menta;
10. fracciones o componentes de los aceites esenciales, tales como mentol, carvacrol y timol;
11. aceites sintéticos, tales como triacetina, tributirina;
12. citrato de trietilo, citrato de acetil trietilo, citrato de tributilo, citrato de acetil tributilo;
- 35 13. ésteres de ácidos grasos de poliglicerol, por ejemplo, monooleato de diglicerina, por ejemplo, DGMO-C, DGMO-90, DGDO de Nikko Chemicals; y
14. ésteres de sorbitán, por ejemplo, ésteres de ácidos grasos de sorbitán, por ejemplo, monolaurato de sorbitán, por ejemplo, disponibles comercialmente como SPAN 20 de Uniqema.
- 40 15. fosfolípidos, por ejemplo, alquil-O-fosfolípidos, ácidos diacil fosfatídicos, diacil fosfatidil colinas, diacil fosfatidil etanolaminas, diacil fosfatidil glicerol, ácidos di-O-alkil fosfatídicos, L-alfa-lisofosfatidilcolinas (LPC), L-alfa-lisofosfatidiletanolaminas (LPE), L-alfa-lisofosfatidilglicerol (LPG), L-alfa-lisofosfatidilinositoles (LPI), ácidos L-alfa-fosfatídicos (PA), L-alfa-fosfatidilcolinas (PC), L-alfa-fosfatidiletanolaminas (PE), L-alfa-fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL), L-alfa-fosfatidilinositoles (PI), L-alfa-fosfatidilserinas (PS), liso-fosfatidilcolinas, liso-fosfatidilglicerol, sn-glicerofosforilcolinas disponibles comercialmente de LARODAN, o fosfolípido de semilla de soja (Lipoid S100)
- 45 disponible comercialmente en Lipoid GmbH.

Por ejemplo, el componente lipófilo es uno o varios seleccionados a partir del grupo que consiste en mono-, di- y triglicéridos. En un aspecto, el componente lipófilo es uno o varios seleccionados a partir del grupo que consiste en mono- y diglicéridos. En aún un aspecto adicional, el componente lipófilo es Capmul MCM o Capmul PG-8. En todavía un aspecto adicional, el componente lipófilo es Capmul PG-8.

- 50 La expresión "disolvente orgánico polar" se refiere, en un aspecto en la presente memoria a un "disolvente orgánico prótico polar", que es un disolvente hidrófilo, miscible en agua que contiene carbono, que contiene un enlace O-H o

N-H, o mezclas de los mismos. La polaridad se refleja en la constante dieléctrica o el momento dipolar de un disolvente. La polaridad de un disolvente determina qué tipo de compuestos es capaz de disolver y con qué otros disolventes o compuestos líquidos es miscible. Normalmente, los disolventes orgánicos polares disuelven compuestos polares mejor y los disolventes no polares disuelven compuestos no polares mejor: "semejante disuelve semejante".

5 Compuestos fuertemente polares como sales inorgánicas (por ejemplo cloruro de sodio) se disuelven solo en disolventes muy polares.

Los disolventes orgánicos polares se pueden seleccionar a partir de disolventes en los que la insulina acilada estabilizada frente a proteasas muestra mejor solubilidad en dichos disolventes orgánicos polares que en otros disolventes.

10 Por lo tanto, la insulina acilada estabilizada frente a proteasas se puede disolver en un alto grado en un disolvente orgánico polar, farmacéuticamente aceptable exento de agua, tal como propilenglicol, glicerol y PEG200. Por ejemplo, al menos 20% (p/p) de la insulina acilada estabilizada frente a proteasas se disuelve en un disolvente orgánico polar, farmacéuticamente aceptable exento de agua, es decir, cuando añadiendo 20% p/p de la insulina acilada estabilizada frente a proteasas al disolvente orgánico polar, se obtiene una solución clara. En otro aspecto, al menos

15 25%, 30%, 40% o 50% (p/p) de la insulina acilada estabilizada frente a proteasas se disuelve en un disolvente orgánico polar, farmacéuticamente aceptable exento de agua.

El disolvente orgánico polar puede, por lo tanto, hacer referencia a un disolvente hidrófilo, miscible en agua que contiene carbono, que contiene un enlace O-H o N-H, o a mezclas de los mismos. La polaridad se refleja en la constante dieléctrica o el momento dipolar de un disolvente. La polaridad de un disolvente determina qué tipo de compuestos es capaz de disolver y con qué otros disolventes o compuestos líquidos es miscible. Normalmente, los disolventes polares disuelven compuestos polares mejor y los disolventes no polares disuelven compuestos no polares mejor: "semejante disuelve semejante". Compuestos fuertemente polares como sales inorgánicas (por ejemplo cloruro de sodio) se disuelven solo en disolventes muy polares.

20 Por ejemplo, el disolvente orgánico polar es un disolvente que tiene una constante dieléctrica superior a 20, preferiblemente en el intervalo de 20-50. Ejemplos de diferentes disolventes orgánicos polares se enumeran en la Tabla 1 junto con agua como referencia.

Tabla 1. Constantes dieléctricas (permisividad estática) de disolventes orgánicos polares seleccionados y agua como referencia (Handbook of Chemistry and Physics, CMC Press, las constantes dieléctricas se miden en campos eléctricos estáticos o a frecuencias relativamente bajas, en donde no ocurre relajación)

Disolvente (temperatura, Kelvin) (°C)	Constante dieléctrica, ϵ^*
Agua (293,2) (20,05)	80,1
Propanotriol [Glicerol] (293,2) (20,05)	46,53
Etanodiol [Etilenglicol] (293,2) (20,05)	41,4
1,3-propanodiol (293,2) (20,05)	35,1
Metanol (293,2) (20,05)	33,0
1,4-butanodiol (293,2) (20,05)	31,9
1,3-butanodiol (293,2) (20,05)	28,8
1,2-propanodiol [propilenglicol] (303,2) (30,05)	27,5
Etanol (293,2) (20,05)	25,3
Isopropanol [2-propanol, alcohol isopropílico] (293,2) (20,05)	20,18

30 En el presente contexto, 1,2-propanodiol y propilenglicol se utilizan indistintamente. En el presente contexto, propanotriol y glicerol se utilizan indistintamente. En el presente contexto, etanodiol y etilenglicol se usan indistintamente.

Por ejemplo, el disolvente orgánico polar se selecciona a partir del grupo que consiste en polioles El término "poliol", tal como se emplea en este documento, se refiere a compuestos químicos que contienen múltiples grupos hidroxilo.

35 En un aspecto, el disolvente orgánico polar se selecciona a partir del grupo que consiste en dioles y trioles. El término "diol", tal como se emplea en este documento, se refiere a compuestos químicos que contienen dos grupos hidroxilo. El término "triol" tal como se emplea en este documento, se refiere a compuestos químicos que contienen tres grupos hidroxilo.

Por ejemplo, el disolvente orgánico polar se selecciona a partir del grupo que consiste en glicerol (propanotriol),

etanodiol (etilenglicol), 1,3-propanodiol, metanol, 1,4-butanodiol, 1,3-butanodiol, propilenglicol (1,2-propanodiol), etanol e isopropanol, o mezclas de los mismos. En una alternativa, el disolvente orgánico polar se selecciona a partir del grupo que consiste en propilenglicol y glicerol. El glicerol es biocompatible incluso a dosificaciones elevadas y tiene una capacidad disolvente elevada para la insulina acilada estabilizada frente a proteasas. Alternativamente, el disolvente orgánico polar se selecciona a partir del grupo que consiste en propilenglicol y etilenglicol. Estos disolventes orgánicos polares tienen una viscosidad baja, son biocompatibles en dosis moderadas, y tienen una capacidad disolvente orgánica polar muy elevada para la insulina acilada estabilizada frente a proteasas.

El disolvente orgánico polar debe tener preferiblemente una pureza elevada con un bajo contenido en, por ejemplo, aldehídos, cetonas y otras impurezas reductoras con el fin de minimizar el deterioro químico del polipéptido solubilizado, debido, por ejemplo, a la reacción de Maillard. Moléculas depuradoras, como glicilglicina y etilendiamina pueden añadirse a las formulaciones que comprenden uno o varios disolventes orgánicos polares, tales como polioles, para reducir el deterioro del polipéptido, mientras que los antioxidantes pueden añadirse para reducir la tasa de formación de otras impurezas reductoras.

En un aspecto, el disolvente orgánico polar está presente en la composición farmacéutica en una cantidad de 1-50% p/p, por ejemplo, 5-40% p/p, por ejemplo, 5-30% p/p. Alternativamente, el disolvente orgánico polar está presente en una cantidad de 10-30% p/p, por ejemplo, 10-25% p/p, por ejemplo, en una cantidad de aproximadamente 20% p/p o de aproximadamente 15% p/p.

Por ejemplo, el disolvente orgánico polar es propilenglicol y está presente en la composición farmacéutica en una cantidad de 1 - 50% p/p, por ejemplo, 5 - 40% p/p, por ejemplo, 10 - 30% p/p, por ejemplo, 10 - 25% p/p, por ejemplo, 10 - 20% p/p, por ejemplo, aproximadamente 20% p/p o aproximadamente 15% p/p.

Por ejemplo, el disolvente orgánico polar se selecciona a partir del grupo que consiste en glicerol, propilenglicol y mezclas de los mismos.

Un componente hidrófilo sólido se puede añadir a la composición farmacéutica con el fin de hacer o ayudar a hacer que la composición farmacéutica esté sólida o semisólida a temperatura ambiente. El componente hidrófilo puede comprender más de un excipiente. Si el componente hidrófilo comprende más de un excipiente, el componente hidrófilo puede ser una mezcla de líquidos, sólidos o de ambos.

Cuando un componente hidrófilo sólido está presente, la composición farmacéutica puede comprender desde aproximadamente 1% a aproximadamente 25% en peso de componente hidrófilo sólido, por ejemplo, desde aproximadamente 2% a aproximadamente 20%, por ejemplo, desde aproximadamente 3% a aproximadamente 15%, por ejemplo desde aproximadamente 4% a aproximadamente 10%.

Un ejemplo de un componente hidrófilo es PEG que es el polímero de óxido de etileno que se adapta generalmente a la fórmula $H(OCH_2CH_2)_nOH$ en la que n se correlaciona con el peso molecular promedio del polímero.

Los tipos de PEG útiles en la preparación de composiciones farmacéuticas se pueden clasificar por su estado de materia, es decir, si la sustancia existe en una forma sólida o líquida a temperatura y presión ambiente. En la presente memoria, "PEG sólido" se refiere a PEG que tiene un peso molecular tal que la sustancia está en estado sólido a temperatura y presión ambiente. Por ejemplo, PEG que tiene un peso molecular que oscila entre 1.000 y 10.000, es un PEG sólido. Tales PEGs incluyen, pero no se limitan a PEG 1000, PEG 1550, PEG 2000, PEG 3000, PEG 3350, PEG 4000 o PEG 8000. Los PEGs sólidos particularmente útiles son aquellos que tienen un peso molecular entre 1.450 y 8.000. Especialmente útiles como PEG sólido son PEG 1450, PEG 3350, PEG 4000, PEG 8000, derivados de los mismos y mezclas de los mismos. Los PEGs de diversos pesos moleculares están comercialmente disponibles como la serie CARBOWAX SENTRY de Dow Chemicals (Danbury, CT). Además, los PEGs sólidos tienen una estructura cristalina, o una matriz polimérica, óxido de polietileno ("PEO") que tiene una estructura idéntica a PEG excepto la longitud de cadena y los grupos terminales, son también adecuados. Varios grados de PEO están disponibles comercialmente como POLYOX de Dow Chemicals. PEO, por ejemplo, tiene un peso molecular que varía desde aproximadamente 100.000 a 7.000.000. El componente hidrófilo puede comprender PEG, PEO y cualquier combinación de los anteriores.

Los componentes hidrófilos pueden incluir, opcionalmente, un alcohol inferior, por ejemplo, etanol. Aunque el uso de etanol no es esencial, puede mejorar la solubilidad del polipéptido en el vehículo, mejorar las características de almacenamiento y/o reducir el riesgo de precipitación del fármaco.

En un aspecto a modo de ejemplo alternativo, el componente hidrófilo del vehículo consiste en un único componente hidrófilo, por ejemplo, un PEG sólido, por ejemplo, PEG 1450, PEG 3350, PEG 4000 y PEG 8000. En este aspecto ejemplar, la fase hidrófila del componente de la microemulsión consiste en una sola sustancia hidrófila. Por ejemplo, si el vehículo comprende PEG 3350, el vehículo no contendrá otras sustancias hidrófilas, por ejemplo, alcoholes inferiores (siendo el alquilo inferior $s\ C_1-C_4$), tales como etanol; o agua.

En aún otro aspecto ejemplar alternativo, el componente hidrófilo del vehículo consiste en una mezcla de PEGs sólidos. Por ejemplo, el componente hidrófilo comprende PEG 1450, PEG 3350, PEG 4000, PEG 8000, derivados de los mismos y cualquier combinación y mezclas de los mismos.

En un aspecto, el vehículo comprende uno o varios tensioactivos, es decir, opcionalmente una mezcla de tensioactivos; o agentes tensioactivos activos, que reducen la tensión interfacial. El tensioactivo es, por ejemplo, no iónico, iónico o anfótero. Los tensioactivos pueden ser mezclas complejas que contienen productos secundarios o productos de partida sin reaccionar, implicados en la preparación de los mismos, por ejemplo, los tensioactivos preparados mediante polioxietilación pueden contener otro producto secundario, por ejemplo, PEG. El tensioactivo o los tensioactivos tienen un valor de equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) que es al menos 8. Por ejemplo, el tensioactivo puede tener un valor medio de HLB de 8-30, por ejemplo, 12-30, 12-20 o 13-15. Los tensioactivos pueden ser líquidos, semisólidos o sólidos en la naturaleza.

El término "tensioactivo" tal como se emplea en este documento, se refiere a cualquier sustancia, en particular, un detergente que se puede adsorber a las superficies e interfaces, como líquido a aire, líquido a líquido, líquido a recipiente o líquido a cualquier sólido. El tensioactivo se puede seleccionar a partir de un detergente, tal como aceite de ricino etoxilado, glicéridos poliglicolizados, monoglicéridos acetilados, ésteres de ácidos grasos de sorbitán, polisorbato, tal como polisorbato-20, poloxámeros, tales como poloxámero 188 y poloxámero 407, ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán, derivados de polioxietileno tales como derivados alquilados y alcoxilados (tweens, por ejemplo, Tween-20, o Tween-80), monoglicéridos o derivados etoxilados de los mismos, diglicéridos o derivados de polioxietileno de los mismos, glicerol, ácido cólico o sus derivados, lecitinas, alcoholes y fosfolípidos, glicerofosfolípidos (lecitinas, cefalinas, fosfatidilserina), gliceroglicolípido (galactopiranosido), esfingofosfolípidos (esfingomielina) y esfingoglicolípido (ceramidas, gangliósidos), DSS (docusato de sodio, registro de CAS n° [577-11-7]), docusato de calcio, registro de CAS n° [128-49-4]), docusato de potasio, registro de CAS n° [7491-09-0]), SDS (dodecil sulfato sódico o lauril sulfato sódico), ácido dipalmitoil fosfatídico, caprilato de sodio, ácidos biliares y sus sales y glicina o conjugados de taurina, ácido ursodesoxicólico, colato de sodio, desoxicolato de sodio, taurocolato de sodio, glicocolato de sodio, N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, tensioactivos monovalentes aniónicos (alquil-sulfonatos), palmitoil lisofosfatidil-L serina, lisofosfolípidos (por ejemplo, ésteres de 1-acil-sn-glicero-3-fosfato de etanolamina, colina, serina o treonina), alquilo, alcoxilo (éster de alquilo), alcoxi (alquil éter)-derivados de lisofosfatidil y fosfatidilcolinas, por ejemplo, derivados lauroílicos y miristoílicos de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina y modificaciones del grupo de cabeza polar, es decir colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol, y DODAC, DOTMA, DCP, BISHOP cargados positivamente, lisofosfatidilserina y lisofosfatidiltreonina, tensioactivos de ion híbrido (por ejemplo, N-alquil-N,N-dimetilamonio-1-propano-sulfonatos, 3-colamido-1-propildimetilamonio-1-propanosulfonato, dodecilsulfocolina, miristoil lisofosfatidilcolina, lisolecitina de huevo de gallina), tensioactivos catiónicos (bases de amonio cuaternario), (por ejemplo, bromuro de cetil-trimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio), tensioactivos no iónicos (por ejemplo, alquil glucósidos tales como dodecil β -D-glucopiranosido, dodecil β -D-maltósido, tetradecil β -D-glucopiranosido, decil β -D-maltósido, dodecil β -D-maltósido, tetradecil β -D-maltósido, hexadecil β -D-maltósido, decil β -D-maltotriósido, dodecil β -D-maltotriósido, tetradecil β -D-maltotriósido, hexadecil β -D-maltotriósido, n-dodecil-sacarosa, n-decil-sacarosa, etoxilatos de alcoholes grasos (por ejemplo, éteres alquílicos de polioxietileno tales como éter mono tridecílico de octaetilenglicol, éter mono dodecílico de octaetilenglicol, éter mono tetradecílico de octaetilenglicol), copolímeros de bloque como copolímeros de bloque de óxido de polietileno/óxido de polipropileno (Pluronic/Tetronic, Triton X-100), tensioactivos de alcaonatos etoxilados de sorbitán (por ejemplo, Tween-40, Tween-80, Brij-35), derivados de ácido fusídico (por ejemplo, tauro-dihidrofusidato de sodio, etc.), ácidos grasos de cadena larga y sales de los mismos C8-C20 (por ejemplo, ácido oleico y ácido caprílico), acilcarnitinas y derivados, derivados de lisina, arginina o histidina N-acilados, o derivados acilados en la cadena lateral de lisina o arginina, derivados N-acilados de dipéptidos que comprenden cualquier combinación de lisina, arginina o histidina y un derivado N-acilado de aminoácido neutro o ácido de un tripéptido que comprende cualquier combinación de un aminoácido neutro y dos aminoácidos cargados, o el tensioactivo se puede seleccionar a partir del grupo de derivados de imidazolina, o mezclas de los mismos.

Los ejemplos de tensioactivos sólidos incluyen, pero no se limitan a,

1. productos de reacción de un aceite de ricino natural o hidrogenado y óxido de etileno. El aceite de ricino natural o hidrogenado puede reaccionar con óxido de etileno en una relación molar de aproximadamente 1:35 a aproximadamente 1:60, con una eliminación opcional del componente PEG de los productos. Varios tensioactivos de este tipo están disponibles comercialmente, por ejemplo, la serie CREMOPHOR de BASF Corp. (Mt. Olive, NJ), tal como CREMOPHOR RH 40, que es aceite de ricino hidrogenado con PEG40 que tiene un valor de saponificación de aproximadamente 50 a 60, un valor de ácido inferior a aproximadamente uno, un contenido en agua, es decir, Fischer, menor de aproximadamente 2%, un n_D^{60} de aproximadamente 1,453-1,457 y un HLB de aproximadamente 14-16;

2. ésteres de ácidos grasos de polioxietileno que incluyen ésteres de ácido esteárico de polioxietileno, tales como la serie MYRJ de Uniqema, por ejemplo, MYRJ 53 que tiene un p.f. de aproximadamente 47°C.

Compuestos particulares de la serie MYRJ son, por ejemplo, MYRJ 53 que tiene un p.f. de aproximadamente 47°C y PEG-40-estearato disponible como MYRJ 52;

3. derivados de sorbitán que incluyen la serie TWEEN de Uniqema, por ejemplo, TWEEN 60;

4. copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno y copolímeros de bloque o poloxámeros, por ejemplo, Pluronic F127, Pluronic F68 de BASF;

5. alquil éteres de polioxietileno, por ejemplo, tales como éteres de polioxietilenglicol de alcoholes C₁₂-C₁₈, por ejemplo, polioxil éter 10-cetílico o 20-cetílico o polioxil éter 23-laurílico, o éter 20-oleílico, o polioxil éter 10-, 20- o 100-estearílico, como se conocen y están disponibles comercialmente como la serie BRIJ de Uniqema. Productos particularmente útiles de la serie BRIJ son BRIJ 58; BRIJ 76; BRIJ 78; BRIJ 35, es decir, polioxil éter 23 laurílico; y BRIJ 98, es decir, polioxil éter 20 oleílico. Estos productos tienen un p.f. entre aproximadamente 32°C y aproximadamente 43°C;
 6. ésteres de ácido succínico de tocoferil PEG solubles en agua, disponibles en Eastman Chemical Co. con un p.f. de aproximadamente 36°C, por ejemplo, TPGS, por ejemplo, vitamina E TPGS.
 7. éteres de esteroil PEG que tienen, por ejemplo, 5-35 [CH₂-CH₂-O] unidades, por ejemplo, 20-30 unidades, por ejemplo, SOLULAN C24 (Choleth-24 y Cetheth-24) de Chemron (Paso Robles, CA); productos similares que también pueden ser utilizados son aquellos que son conocidos y están disponibles comercialmente como NIKKOL BPS-30 (30 fitosterol polietoxilado) y NIKKOL BPSH-25 (25 fitostanol polietoxilado) de Nikko Chemicals;
 8. ésteres de ácido graso de poliglicerol, por ejemplo, que tienen un intervalo de unidades de glicerol desde 4-10, o 4, 6 o 10 unidades de glicerol. Por ejemplo, son particularmente adecuados los monoestearatos de deca-/hexa-/tetraglicerilo, por ejemplo, DECAGLYN, HEXAGLYN y TETRAGLYN de Nikko Chemicals;
 9. éster o éter de alquilenpoliol, por ejemplo, lauroil macrogol-32 glicéridos y/o estearoil macrogol-32 glicéridos que son GELUCIRE 44/14 y GELUCIRE 50/13 respectivamente;
 10. monoésteres de polioxietileno de un ácido graso hidroxil saturado C₁₀ a C₂₂, tal como por ejemplo sustituido en C₁₈; por ejemplo, éster PEG de ácido 12 hidroxistearílico, por ejemplo, de PEG de aproximadamente, por ejemplo, 600-900, por ejemplo, 660 Dalton de PM, por ejemplo, SOLUTOL HS 15 de BASF (Ludwigshafen, 20 Alemania). De acuerdo con un folleto técnico de BASF para MEF 151E (1986), SOLUTOL HS 15 comprende aproximadamente 70% de 12-hidroxistearato polietoxilado en peso y aproximadamente 30% en peso de componente polietilenglicol no esterificado. Tiene un valor de hidrogenación de 90 a 110, un valor de saponificación de 53 a 63, un número de ácido máximo de 1 y un contenido máximo de agua de 0,5% en peso;
 11. éteres alquílicos de polioxipropileno-polioxietileno, por ejemplo, éteres de polioxietileno-polioxipropileno de alcoholes C₁₂ a C₁₈, por ejemplo, éter 4-cetílico de polioxietileno-20-polioxipropileno que está disponible comercialmente como NIKKOL PBC 34 en Nikko Chemicals;
 12. diestearatos polietoxilados, por ejemplo, disponibles comercialmente bajo los nombres comerciales ATLAS G 1821 de Uniqema y NIKKOCDS-6000P de Nikko Chemicals; y
 13. lecitinas, por ejemplo, fosfolípidos de semilla de soja, por ejemplo, disponibles comercialmente como LIPOID S75 en Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemania) o fosfolípido de huevo, disponible comercialmente como PHOSP-HOLIPON 90 en Nattermann (Colonia, Alemania).
- Ejemplos de tensioactivos líquidos incluyen, pero no se limitan a, derivados de sorbitán, tales como TWEEN 20, TWEEN 40 y TWEEN 80, SYNPERONIC L44 y éter 10-oleílico de polioxilo, todos disponibles en Uniqema, y tensioactivos que contienen polioxietileno, por ejemplo, glicéridos de PEG-8 caprílico/cáprico (por ejemplo, Labrasol disponible en Gattefosse).
- La composición puede comprender desde aproximadamente 0% a aproximadamente 95% en peso de tensioactivo, por ejemplo, desde aproximadamente 5% a aproximadamente 80% en peso, por ejemplo, desde aproximadamente 10% a aproximadamente 70% en peso, por ejemplo, desde aproximadamente 20% a aproximadamente 60% en peso, por ejemplo, desde aproximadamente 30% a aproximadamente 50%.
- En un aspecto, el tensioactivo son copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno y copolímeros de bloque o poloxámeros, por ejemplo, Pluronic F127, Pluronic F68 de BASF.
- En un aspecto, el tensioactivo es un poloxámero. En un aspecto adicional, el tensioactivo se selecciona a partir del grupo que consiste en poloxámero 188, poloxámero 407 y mezclas de poloxámero 407 y poloxámero 188.
- En un aspecto, el tensioactivo es un tensioactivo que contiene polioxietileno por ejemplo, glicéridos de PEG-8 caprílico/cáprico (por ejemplo, Labrasol disponible en Gattefosse).
- En un aspecto, el tensioactivo es un polioxilglicérido de lauroilo (por ejemplo, Gelucire 44/14 disponible en Gattefosse).
- En un aspecto, el tensioactivo es Cremofor RH40 de BASF.
- En ciertos aspectos, la composición farmacéutica puede comprender excipientes adicionales que se encuentran comúnmente en composiciones farmacéuticas, ejemplos de tales excipientes incluyen, pero no se limitan a antioxidantes, agentes antimicrobianos, inhibidores de enzimas, estabilizantes, conservantes, saborizantes, edulcorantes y otros componentes como se describen en Handbook of Pharmaceutical Excipients, Rowe et al., compiladores, 4ª

edición, Pharmaceutical Press (2003).

Estos excipientes adicionales pueden estar en una cantidad desde aproximadamente 0,05 - 5% en peso de la composición farmacéutica total. Los antioxidantes, agentes antimicrobianos, inhibidores de enzimas, estabilizantes o conservantes normalmente proporcionan hasta aproximadamente 0,05 - 1% en peso de la composición farmacéutica total. Los agentes edulcorantes o aromatizantes normalmente proporcionan hasta aproximadamente 2,5% o 5% en peso de la composición farmacéutica total.

Ejemplos de antioxidantes incluyen, pero no se limitan a, ácido ascórbico y sus derivados, tocoferol y sus derivados, butil hidroxil anisol y butil hidroxil tolueno.

En un aspecto, la composición comprende un tampón. El término "tampón" tal como se emplea en este documento, se refiere a un compuesto químico en una composición farmacéutica que reduce la tendencia del pH de la composición a cambiar con el tiempo, como ocurriría de otra manera debido a reacciones químicas. Los tampones incluyen productos químicos tales como fosfato de sodio, TRIS, glicina y citrato de sodio.

El término "conservante" tal como se emplea en este documento, se refiere a un compuesto químico que se añade a una composición farmacéutica para prevenir o retrasar la actividad microbiana (crecimiento y metabolismo). Ejemplos de conservantes farmacéuticamente aceptables son fenol, m-cresol y una mezcla de fenol y m-cresol.

El término "estabilizante" tal como se emplea en este documento, se refiere a productos químicos añadidos a composiciones farmacéuticas que contienen péptidos, con el fin de estabilizar el péptido, es decir, para aumentar la vida útil y/o el tiempo de uso de tales composiciones. Ejemplos de estabilizantes usados en formulaciones farmacéuticas son L-glicina, L-histidina, arginina, glicilglicina, etilendiamina, citrato, EDTA, zinc, cloruro de sodio, polietilenglicol, carboximetilcelulosa, y tensioactivos y antioxidantes tales como alfa-tocoferol y ácido L-ascórbico.

En un aspecto adicional, un procedimiento para preparar una composición farmacéutica, que contiene una insulina acilada estabilizada frente a proteasas, comprende las etapas de mezclar a fondo por adición el fármaco y un vehículo que comprende un disolvente orgánico polar, un componente lipófilo y opcionalmente un tensioactivo y/o un componente hidrófilo. Por ejemplo, la insulina acilada estabilizada frente a proteasas y el vehículo se pueden licuar, por ejemplo, por calentamiento a aproximadamente 20°C hasta aproximadamente 80°C, y luego solidificar por enfriamiento a temperatura ambiente.

El vehículo se puede preparar por separado antes de mezclar a fondo por adición un vehículo que comprende un disolvente orgánico polar, un componente lipófilo, y opcionalmente un tensioactivo y/o un componente hidrófilo con el péptido de insulina derivatizado. Alternativamente, uno, dos o más de los componentes del vehículo se pueden mezclar junto con el polipéptido.

La insulina acilada estabilizada frente a proteasas se puede disolver en el disolvente orgánico polar, y luego mezclar con el componente lipídico y opcionalmente con un tensioactivo.

Alternativamente, un procedimiento para preparar una composición farmacéutica tal como SEDDS o SMEDDS (que se puede rellenar en una cápsula, por ejemplo, una cápsula entérica recubierta, una cápsula blanda, una cápsula entérica blanda) que contiene una insulina acilada estabilizada frente a proteasas, comprende las siguientes etapas:

(a) disolver el péptido de insulina derivatizado en el disolvente orgánico polar y

(b) mezclar con el componente lipófilo, un tensioactivo y opcionalmente un componente hidrófilo.

Por ejemplo, un procedimiento para preparar la composición farmacéutica se lleva a cabo a baja temperatura (por ejemplo, temperatura ambiente o por debajo de la temperatura ambiente).

En la preparación de la composición farmacéutica, la insulina acilada estabilizada frente a proteasas se puede disolver, por ejemplo, en el disolvente orgánico polar por el método siguiente:

a) proporcionar una solución acuosa de la insulina acilada estabilizada frente a proteasas, que comprende opcionalmente excipientes,

b) ajustar el valor del pH a un valor de pH diana que es 1 unidad, alternativamente, 2 unidades y, alternativamente, 2,5 unidades de pH por arriba o por debajo del pI de la insulina acilada estabilizada frente a proteasas,

c) eliminar el agua (deshidratar) de la insulina acilada estabilizada frente a proteasas mediante tecnologías de secado convencionales, tales como liofilización y secado por pulverización, y

d) mezclar y disolver la insulina acilada estabilizada frente a proteasas en dicho disolvente no acuoso polar, por ejemplo, mediante agitación, volteo u otros métodos de mezcla,

e) filtrar o centrifugar, opcionalmente, la solución no acuosa de la insulina acilada estabilizada frente a proteasas para eliminar las sales inorgánicas no disueltas,

f) opcionalmente eliminar cantidades residuales de agua mediante, por ejemplo, la adición de desecantes sólidos o secado al vacío.

Por ejemplo, la insulina acilada estabilizada frente a proteasas se disuelve en el disolvente orgánico polar a través del método siguiente:

- 5 a) proporcionar una solución acuosa de una insulina acilada estabilizada frente a proteasas, que contiene opcionalmente estabilizantes tales como zinc y glicilglicina,
- b) ajustar el valor del pH a 1 unidad, alternativamente, 2 unidades y, alternativamente, 2,5 unidades de pH por encima o por debajo del pl del polipéptido, por ejemplo, mediante la adición de una base o un ácido no volátil, tal como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio, a la solución,
- 10 c) eliminar el agua (deshidratar) de la insulina acilada estabilizada frente a proteasas mediante tecnologías de secado convencionales, tales como liofilización y secado por pulverización,
- d) mezclar y disolver la insulina acilada estabilizada frente a proteasas en dicho disolvente no acuoso polar, por ejemplo, mediante agitación, volteo u otros métodos de mezcla,
- e) filtrar o centrifugar, opcionalmente, la solución no acuosa de la insulina acilada estabilizada frente a proteasas para eliminar las sales inorgánicas no disueltas,
- 15 f) opcionalmente eliminar cantidades residuales de agua mediante, por ejemplo, la adición de desecantes sólidos o secado al vacío.

Por "base volátil" se entiende una base, que en cierta medida se va a evaporar después de un calentamiento y/o a presión reducida, por ejemplo, bases que tienen una presión de vapor superior a 65 Pa a temperatura ambiente o una mezcla azeotrópica acuosa que incluye una base que tiene una presión de vapor por encima de 65 Pa a temperatura ambiente. Ejemplos de bases volátiles son hidróxidos de amonio, hidróxidos de tetraalquilamonio, aminas secundarias, aminas terciarias, aminas de arilo, aminas alifáticas o bicarbonato de amonio o una combinación. Por ejemplo, la base volátil puede ser bicarbonato, carbonato, amoniaco, hidrazina o una base orgánica tal como aminas alifáticas inferiores, por ejemplo, trimetilamina, trietilamina, dietanolaminas, trietanolamina y sus sales. Además, la base volátil puede ser hidróxido de amonio, etilamina o metilamina o una combinación de las mismas.

Por "ácido volátil" se entiende un ácido, que en cierta medida se va a evaporar después de un calentamiento y/o a presión reducida, por ejemplo, ácidos que tienen una presión de vapor por encima de 65 Pa a temperatura ambiente o una mezcla azeotrópica acuosa que incluye un ácido que tiene una presión de vapor por encima de 65 Pa a temperatura ambiente. Ejemplos de ácidos volátiles son ácido carbónico, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico.

Una "base no volátil", tal y como se menciona en este documento significa una base, que no se evapora o solo se evapora en parte después de un calentamiento, por ejemplo, bases con una presión de vapor por debajo de 65 Pa a temperatura ambiente. La base no volátil se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en sales de metal alcalino, hidróxidos de metal alcalino, sales de metal alcalinotérreo, hidróxidos de metal alcalinotérreo y aminoácidos, o una combinación de los mismos. Ejemplos de bases no volátiles son hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio y óxido de calcio.

Un "ácido no volátil", tal y como se menciona en este documento significa un ácido, que no se evapora o solo se evapora en parte después de un calentamiento, por ejemplo, bases con una presión de vapor por debajo de 65 Pa a temperatura ambiente. Ejemplos de ácidos no volátiles son ácido clorhídrico, ácido fosfórico y ácido sulfúrico.

La insulina acilada estabilizada frente a proteasas puede estar presente en una cantidad de hasta aproximadamente 40%, tal como hasta aproximadamente 20% en peso de la composición, o desde aproximadamente 0,01%, tal como desde aproximadamente 0,1%, alternativamente, desde aproximadamente 0,01% a aproximadamente 20%, alternativamente, desde aproximadamente 1% a 20% o desde aproximadamente 1% a 10% en peso de la composición. Se pretende, sin embargo, que la elección de un nivel particular de polipéptido se haga de acuerdo con factores bien conocidos en las técnicas farmacéuticas, incluyendo la solubilidad del polipéptido en el disolvente orgánico polar o el componente hidrófilo opcional o agente tensioactivo utilizado, o una mezcla de los mismos, el modo de administración y el tamaño y el estado del paciente.

Por ejemplo, la formulación farmacéutica comprende una insulina acilada estabilizada frente a proteasas en una concentración de 0,1% p/p a 30% p/p.

Cada unidad de dosificación contendrá adecuadamente de 0,1 mg a 300 mg de polipéptido de insulina acilada estabilizada frente a proteasas, por ejemplo, aproximadamente 0,1 mg, 1 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 25 mg, 50 mg, 100 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, por ejemplo, entre 5 mg y 300 mg de la insulina acilada estabilizada frente a proteasas. Por ejemplo, cada unidad de dosificación contiene entre 10 mg y 300 mg, por ejemplo, entre 10 mg y 100 mg o entre 20 mg y 300 mg, por ejemplo, entre 20 mg y 100 mg de la insulina acilada estabilizada frente a proteasas.

Tales formas de dosificación unitaria son adecuadas para la administración 1-5 veces al día, dependiendo del objetivo particular de la terapia.

En la insulina acilada estabilizada frente a proteasas se optimiza el pH antes de la disolución en el disolvente orgánico polar para mejorar la solubilidad en el disolvente orgánico polar.

- 5 Cuando se utiliza la expresión "pH optimizado", se entiende en este documento que la insulina acilada estabilizada frente a proteasas se ha deshidratado a un pH diana que es al menos 1 unidad de pH del pI de la insulina acilada estabilizada frente a proteasas en solución acuosa. Por lo tanto, el pH diana es más de 1 unidad de pH por encima del punto isoeléctrico de la insulina acilada estabilizada frente a proteasas. Alternativamente, el pH diana es más de 1 unidad de pH por debajo del punto isoeléctrico de la insulina acilada estabilizada frente a proteasas. Por lo tanto, el
- 10 pH diana podría ser más de 1,5 unidades de pH por encima o por debajo del pI, por ejemplo, 2,0 unidades de pH o más por encima o por debajo del pI, por ejemplo, 2,5 unidades de pH o más por encima o por debajo del pI de la insulina acilada estabilizada frente a proteasas.

- El término "deshidratado" tal y como se usa en el presente documento, en relación con una insulina acilada estabilizada frente a proteasas, se refiere a una insulina acilada estabilizada frente a proteasas, derivatizada que se ha secado desde una solución acuosa. La expresión "pH diana" tal como se utiliza en este documento, se refiere al pH acuoso que se establecerá cuando la insulina acilada estabilizada frente a proteasas deshidratada se rehidrate en agua pura hasta una concentración de aproximadamente 40 mg/ml o más. El pH diana será normalmente idéntico al pH de la solución acuosa de la insulina acilada estabilizada frente a proteasas a partir de la cual se ha recuperado la insulina acilada estabilizada frente a proteasas mediante secado. Sin embargo, el pH de la solución de insulina acilada estabilizada frente a proteasas no será idéntico al pH diana, si la solución contiene ácidos o bases volátiles. Se
- 15 ha encontrado que el historial de pH de la insulina acilada estabilizada frente a proteasas será determinante para la cantidad de insulina acilada estabilizada frente a proteasas que se puede solubilizar en el disolvente orgánico polar.
- 20 La expresión "el pI del polipéptido" tal como se utiliza en este documento, se refiere al punto isoeléctrico de un polipéptido.

- 25 La expresión "punto isoeléctrico" tal y como se usa en el presente documento, significa el valor de pH en donde la carga neta global de una macromolécula tal como un péptido, es cero. En los péptidos puede haber varios grupos cargados, y en el punto isoeléctrico la suma de todas estas cargas es cero. A un pH superior al punto isoeléctrico, la carga neta global del péptido será negativa, mientras que a valores de pH por debajo del punto isoeléctrico, la carga neta global del péptido será positiva.

- 30 El pI de una proteína se puede determinar experimentalmente mediante técnicas de electroforesis como electroenfoque:

- Un gradiente de pH se estableció en un medio anticonvectivo, tal como un gel de poliacrilamida. Cuando una proteína se introduce en el sistema, migrará bajo la influencia de un campo eléctrico aplicado a través del gel. Las proteínas cargadas positivas migrarán hacia el cátodo. Eventualmente, la proteína que migra llega a un punto en el gradiente de pH en el que su carga eléctrica neta es cero y se dice que está enfocada. Este es el pH isoeléctrico (pI) de la proteína. La proteína se fija a continuación en el gel y se tiñe. El pI de la proteína se puede determinar entonces comparando la posición de la proteína sobre el gel, en relación con moléculas marcadoras con valores de pI conocidos.
- 35

- La carga neta de una proteína a un valor de pH dado, puede ser estimada teóricamente por una persona experta en la técnica por métodos convencionales. En esencia, la carga neta de una proteína es el equivalente a la suma de las cargas fraccionales de los aminoácidos cargados en la proteína: aspartato (grupo β -carboxilo), glutamato (grupo δ -carboxilo), cisteína (grupo tiol), tirosina (grupo fenol), histidina (cadenas laterales de imidazol), lisina (grupo ϵ -amonio) y arginina (grupo guanidinio). Adicionalmente, también hay que tener en cuenta la carga de los grupos terminales de proteínas (α -NH₂ y α -COOH). La carga fraccional de los grupos ionizables puede calcularse a partir de los valores intrínsecos de pKa.
- 40
- 45

- El secado, es decir, la deshidratación de la insulina acilada estabilizada frente a proteasas se puede realizar por cualquier método de secado convencional, tal como por ejemplo, mediante secado por pulverización, congelación, vacío, abierto y por contacto. Por ejemplo, la solución de insulina acilada estabilizada frente a proteasas se seca por pulverización para obtener un contenido en agua por debajo de aproximadamente 10%, por ejemplo, por debajo de aproximadamente 8%, por debajo de aproximadamente 6%, por debajo de aproximadamente 5%, por debajo de aproximadamente 4%, por debajo de aproximadamente 3%, por debajo de aproximadamente 2% o por debajo de aproximadamente 1%, calculado/medido por la pérdida en la prueba de secado (gravimétrica) como se indica en la parte experimental.
- 50

Por ejemplo, la insulina acilada estabilizada frente a proteasas se seca por pulverización o por liofilización.

- 55 Las composiciones que contienen insulinas aciladas estabilizadas frente a proteasas de esta invención se pueden usar en el tratamiento de estados que son sensibles a la insulina. Por lo tanto, se pueden utilizar en el tratamiento de la diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 y la hiperglucemia, por ejemplo, como a veces se observa en personas gra-

vemente heridas y personas que se han sometido a una cirugía mayor. El nivel de dosis óptimo para cualquier paciente dependerá de una variedad de factores que incluyen la eficacia del derivado específico de insulina empleado, la edad, el peso corporal, la actividad física y la dieta del paciente, de una posible combinación con otros fármacos, y de la gravedad del estado que se va a tratar. Se recomienda que la dosificación diaria de la insulina acilada de esta invención se determine para cada paciente individual a través de expertos en la técnica, de una manera similar como para las composiciones de insulina conocidas.

CARACTERÍSTICAS PREFERIDAS DE ESTA INVENCION

Las características de esta invención son las siguientes:

1. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas en donde la insulina estabilizada frente a proteasas, formalmente, consiste en una insulina no estabilizada frente a proteasas (insulina de origen) en la que al menos un aminoácido hidrófobo se ha sustituido por aminoácidos hidrófilos, y en donde dicha sustitución está dentro o muy cerca de uno o varios sitios de escisión de proteasas de la insulina no estabilizada frente a proteasas (insulina de origen) y en donde tal insulina estabilizada frente a proteasas, opcionalmente, comprende además una o varias mutaciones adicionales, con la condición de que solo haya un residuo de lisina en la insulina estabilizada, y en donde el resto acilo está fijado al residuo de lisina o a una posición N-terminal en la insulina estabilizada frente a proteasas.
2. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas en la que la insulina estabilizada frente a proteasas, formalmente, consiste en una insulina no estabilizada frente a proteasas (insulina de origen) en la que al menos dos aminoácidos hidrófobos se han sustituido con aminoácidos hidrófilos, y en donde dichas sustituciones están dentro o muy cerca de dos o varios sitios de escisión de proteasas de la insulina no estabilizada frente a proteasas (insulina de origen) y en donde tal insulina estabilizada frente a proteasas, opcionalmente, comprende además una o varias mutaciones adicionales, con la condición de que solo haya un residuo de lisina en la insulina estabilizada, y en donde el resto acilo está fijado al residuo de lisina en la insulina estabilizada frente a proteasas.
3. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas en la que la insulina estabilizada frente a proteasas, formalmente, consiste en una insulina no estabilizada frente a proteasas (insulina de origen) en la que al menos dos aminoácidos hidrófobos se han sustituido con aminoácidos hidrófilos, y en donde dichas sustituciones están dentro o muy cerca de dos o varios sitios de escisión de proteasas de la insulina no estabilizada frente a proteasas (insulina de origen) y en donde tal insulina estabilizada frente a proteasas, opcionalmente, comprende además una o varias mutaciones adicionales, con la condición de que solo haya un residuo de lisina en la insulina estabilizada, y en donde el resto acilo está fijado al residuo de lisina o a una posición N-terminal en la insulina estabilizada frente a proteasas.
4. Una insulina acilada de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde la insulina estabilizada frente a proteasas ha aumentado la solubilidad con respecto a la insulina de origen acilada.
5. Una insulina acilada de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde la cadena B de la insulina comprende al menos una mutación con respecto a la insulina de origen.
6. Una insulina acilada de acuerdo con la cláusula anterior, en la medida de lo posible, en donde la cadena B de la insulina comprende una, dos o tres, pero no más mutaciones con respecto a la insulina de origen.
7. Una insulina acilada de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde la cadena A de la insulina estabilizada frente a proteasas es idéntica a la cadena A de la insulina humana.
8. Una insulina acilada de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde la cadena A de la insulina comprende al menos una mutación y la cadena B de la insulina comprende al menos una mutación con respecto a la insulina de origen.
9. Una insulina acilada de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde la cadena A de la insulina comprende al menos dos mutaciones y la cadena B de la insulina comprende al menos una mutación con respecto a la insulina de origen.
10. Una insulina acilada de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde la insulina comprende además al menos una sustitución de un aminoácido en un sitio de proteasas de una primera insulina modificada estabilizada frente a proteasas, en donde dicha al menos una sustitución de aminoácidos es tal, que al menos un aminoácido hidrófobo ha sido sustituido por al menos un aminoácido hidrófilo.
11. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde 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 Tyr, Asn, Gln, Glu, Arg, Asp, Gly o His; y/o el aminoácido en la posición A15 es Glu o Asp; y el aminoácido en la posición B24 es His; y/o el aminoácido en la posición B25 es His o Asn; 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, Asp, Gly o Arg; y/o el aminoácido en la posición B28 es His, Gly, Glu o Asp; y que opcionalmente comprende además una o varias mutaciones adicionales.

12. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde 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 Tyr, Asn, Gln, Glu, Arg, Asp, Gly o His; y/o el aminoácido en la posición A15 es Glu o Asp; y/o el aminoácido en la posición B16 es Tyr, His o Glu; y/o el aminoácido en la posición B24 es His; y/o el aminoácido en la posición B25 es His o Asn; 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, Asp, Gly, Lys, Arg o está delecionado; y/o el aminoácido en la posición B28 es His, Gly, Glu, Asp o está ausente (delecionado); y/o el aminoácido en la posición B29 es Lys, Arg o está ausente (delecionado); y que opcionalmente comprende además una o varias mutaciones adicionales y, preferiblemente, insulinas aciladas estabilizadas frente a proteasas en donde 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 Tyr, Asn, Gln, Glu, Arg, Asp, Gly o His; y/o el aminoácido en la posición A15 es Glu o Asp; y el aminoácido en la posición B24 es His; y/o el aminoácido en la posición B25 es His o Asn; 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, Asp, Gly o Arg; y/o el aminoácido en la posición B28 es His, Gly, Glu o Asp; y que opcionalmente comprende además una o varias mutaciones adicionales.
13. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde el aminoácido en la posición A14 es Glu, Asp o His, el aminoácido en la posición B25 es His o Asn y que opcionalmente comprende además una o varias mutaciones adicionales.
14. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde el aminoácido en la posición A14 es Glu, Asp o His, el aminoácido en la posición B25 es His o Asn y el aminoácido en la posición B30 está delecionado.
15. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde el aminoácido en la posición A14 es Glu, Asp o His, el aminoácido en la posición B16 es His o Glu, el aminoácido en la posición B25 es His y el aminoácido en la posición B30 está delecionado.
16. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde el aminoácido en la posición A14 es Glu, Asp o His y el aminoácido en la posición B25 es His y el aminoácido en la posición B30 está delecionado.
17. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde el aminoácido en la posición A14 es Glu o Asp y el aminoácido en la posición B28 es Glu o Asp, y, opcionalmente, no hay ningún residuo de aminoácido en la posición B30.
18. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde una o varias mutaciones adicionales se seleccionan a partir de un grupo que consiste en: A8His, A18Gln, A21Gln, A21Gly, B1Glu, B1Gln, B3Gln, B10Pro, B14Thr, B16Glu, B17Ser, B26Asp, B27Glu, B27Asp, B28Asp, B28Glu y desB30.
19. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde la mutación adicional es desB30.
20. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde A14 es Glu.
21. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde B25 es Asn.
22. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde B25 es His.
23. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde B25 es Asn y B27 es Glu o Asp.
24. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde B25 es Asn y B27 es Glu.
25. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, que muestra una mayor estabilidad frente a una o varias enzimas proteasas con respecto a la proteína de origen.
26. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, que muestra una mayor estabilidad frente a dos o más enzimas proteasas con respecto a la proteína de origen.
27. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde la insulina de origen se selecciona a partir de un grupo que consiste en a) insulina

humana; b) un análogo de insulina de la insulina humana en donde el residuo de aminoácido en la posición B28 es Pro, Asp, Lys, Leu, Val o Ala, y el residuo de aminoácido en la posición B29 es Lys o Pro y opcionalmente el residuo de aminoácido en la posición B30 está delecionado; c) 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); d) un análogo de insulina de la insulina humana en donde el residuo de aminoácido en la posición B3 es Lys y el residuo de aminoácido en la posición B29 es Glu o Asp; e) un análogo de insulina de la insulina humana en donde el residuo de aminoácido en posición A21 es Gly y en donde el análogo de insulina se extiende adicionalmente en el extremo C-terminal con dos residuos de Arg; f) un derivado de insulina en donde el residuo de aminoácido en la posición B30 se sustituye con un éster metílico de treonina; y g) un derivado de insulina en el que la posición Nε de la lisina en la posición B29 de la insulina humana des(B30) está fijado a una cadena de tetradecanoilo.

28. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores en la medida de lo posible, en donde una o varias mutaciones adicionales se seleccionan para mejorar la estabilidad química de la insulina.

29. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con la cláusula anterior, en la medida de lo posible, en donde una o varias mutaciones adicionales se seleccionan a partir de un grupo que consiste en A18Gln, A21Gln, A21Gly y B3Gln.

30. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena A de fórmula 1, es decir: Xaa_{A(-2)}-Xaa_{A(-1)}-Xaa_{A0}-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} (SEQ ID No:1), y una secuencia de aminoácidos de la cadena B de fórmula 2, es decir: 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} (SEQ ID No:2), en donde Xaa_{A(-2)} está ausente o es Gly; Xaa_{A(-1)} está ausente o es Pro; Xaa_{A0} está ausente o es Pro; Xaa_{A8} se selecciona independientemente a partir de Thr y His; Xaa_{A12} se selecciona independientemente a partir de Ser, Asp y Glu; Xaa_{A13} se selecciona independientemente a partir de Leu, Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser y Glu; Xaa_{A14} se selecciona independientemente a partir de Tyr, Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser y Glu; Xaa_{A15} se selecciona independientemente a partir de Gln, Asp y Glu; Xaa_{A18} se selecciona independientemente a partir de Asn, Lys y Gln; Xaa_{A21} se selecciona independientemente a partir de Asn y Gln; 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 a partir de Phe y Glu; Xaa_{B2} está ausente o es Val; Xaa_{B3} está ausente o se selecciona independientemente a partir de Asn y Gln; Xaa_{B4} se selecciona independientemente a partir de Gln y Glu; Xaa_{B10} se selecciona independientemente a partir de His, Asp, Pro y Glu; Xaa_{B16} se selecciona independientemente a partir de Tyr, Asp, Gln, His, Arg, y Glu; Xaa_{B24} se selecciona independientemente a partir de Phe y His; Xaa_{B25} se selecciona independientemente a partir de Phe, Asn y His; Xaa_{B26} está ausente o se selecciona independientemente a partir de Tyr, His, Thr, Gly y Asp; Xaa_{B27} está ausente o se selecciona independientemente a partir de Thr, Asn, Asp, Gln, His, Gly, Arg, Pro, Ser y Glu; Xaa_{B28} está ausente o se selecciona independientemente a partir de Pro, His, Gly y Asp; Xaa_{B29} está ausente o se selecciona independientemente a partir de Lys y Gln; Xaa_{B30} está ausente o es Thr; Xaa_{B31} está ausente o es Leu; Xaa_{B32} está ausente o es Glu; el extremo C-terminal puede estar opcionalmente derivatizado como una amida; en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena A y la secuencia de aminoácidos de la cadena B están conectadas por puentes 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 en donde las cisteínas en la posición 6 y 11 de la cadena A están conectadas por un puente disulfuro; en donde opcionalmente la secuencia de aminoácidos de la cadena A N-terminal está conectada a la secuencia de aminoácidos de la cadena B C-terminal por una secuencia de aminoácidos que comprende de 3-7 aminoácidos para formar una molécula de insulina de cadena sencilla, en donde opcionalmente el extremo N-terminal de la cadena B se prolonga con 1-10 aminoácidos; en 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 en 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.

31. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena A de fórmula 3, es decir: 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} (SEQ ID No:3), y una secuencia de aminoácidos de la cadena B de fórmula 4, es decir: 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} (SEQ ID No:4), en donde Xaa_{A8} se selecciona independientemente a partir de Thr y His; Xaa_{A12} se selecciona independientemente a partir de Ser, Asp y Glu; Xaa_{A13} se selecciona independientemente a partir de Leu, Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser y Glu; Xaa_{A14} se selecciona independientemente a partir de Tyr, Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser y Glu; Xaa_{A15} se selecciona independientemente a partir de Gln, Asp y Glu; Xaa_{A18} se selecciona independientemente a partir de Asn, Lys y Gln; Xaa_{A21} se selecciona independientemente a partir de Asn y Gln; Xaa_{B1} se selecciona independientemente a partir de Phe y Glu; Xaa_{B3} se selecciona independientemente a partir de Asn y Gln; Xaa_{B4} se selecciona independientemente a partir de Gln y Glu; Xaa_{B10} se selecciona independientemente a partir de His, Asp, Pro y Glu; Xaa_{B16} se selecciona independientemente a partir de Tyr, Asp, Gln, His, Arg, y Glu; Xaa_{B24} se selecciona independientemente a partir de Phe y His; Xaa_{B25} se selecciona independientemente a partir de Phe, Asn y His; Xaa_{B26} está ausente o se selecciona independientemente a partir de Tyr, His, Thr, Gly y Asp; Xaa_{B27} está ausente o se selecciona independientemente a partir de Thr, Asn, Asp, Gln, His, Gly, Arg, Pro, Ser

y Glu; Xaa_{B28} está ausente o se selecciona independientemente a partir de Pro, His, Gly y Asp; Xaa_{B29} está ausente o se selecciona independientemente a partir de Lys y Gln; Xaa_{B30} está ausente o es Thr; el extremo C-terminal puede estar opcionalmente derivatizado como una amida; en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena A y la secuencia de aminoácidos de la cadena B están conectadas por puentes 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 en donde las cisteínas en la posición 6 y 11 de la cadena A están conectadas por un puente disulfuro.

32. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con la cláusula anterior, en la medida de lo posible, en donde Xaa_{A8} se selecciona independientemente a partir de Thr y His; Xaa_{A12} se selecciona independientemente a partir de Ser y Glu; Xaa_{A13} se selecciona independientemente a partir de Leu, Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser y Glu; Xaa_{A14} se selecciona independientemente a partir de Tyr, Asp, His, y Glu; Xaa_{A15} se selecciona independientemente a partir de Gln y Glu; Xaa_{A18} se selecciona independientemente a partir de Asn, Lys y Gln; Xaa_{A21} se selecciona independientemente a partir de Asn, y Gln; Xaa_{B1} se selecciona independientemente a partir de Phe y Glu; Xaa_{B3} se selecciona independientemente a partir de Asn y Gln; Xaa_{B4} se selecciona independientemente a partir de Gln y Glu; Xaa_{B10} se selecciona independientemente a partir de His, Asp, Pro y Glu; Xaa_{B16} se selecciona independientemente a partir de Tyr, Asp, Gln, His, Arg, y Glu; Xaa_{B24} se selecciona independientemente a partir de Phe y His; Xaa_{B25} se selecciona independientemente a partir de Phe, Asn y His; Xaa_{B26} se selecciona independientemente a partir de Tyr, Thr, Gly y Asp; Xaa_{B27} se selecciona independientemente a partir de Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg y Glu; Xaa_{B28} se selecciona independientemente a partir de Pro, Gly y Asp; Xaa_{B29} se selecciona independientemente a partir de Lys y Gln; Xaa_{B30} está ausente o es Thr; el extremo C-terminal puede estar opcionalmente derivatizado como una amida; en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena A y la secuencia de aminoácidos de la cadena B están conectadas por puentes 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 en donde las cisteínas en la posición 6 y 11 de la cadena A están conectadas por un puente disulfuro.

33. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas en donde, en la insulina estabilizada frente a proteasas, el aminoácido en la posición A14 es Glu o His (es decir, E o H, de acuerdo con el código de una letra), el aminoácido en la posición B25 es His y que opcionalmente comprende además una o varias mutaciones adicionales, y en donde el resto acilo está fijado al grupo amino ε en el residuo de lisina en la posición B29.

34. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas en donde, en la insulina estabilizada frente a proteasas, el aminoácido en la posición B25 es His o Asn, el aminoácido en la posición B27 es Glu o Asp, y que opcionalmente comprende además una o varias de las siguientes mutaciones adicionales: A8H, A14E/D, B1E/D, B28E/D y desB30 y en donde el resto acilo está fijado al grupo amino ε en el residuo de lisina en la posición B29.

35. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas en donde, en la insulina estabilizada frente a proteasas, el aminoácido en la posición A14 es Tyr, Glu o His (es decir, Y, E o H, de acuerdo con el código de una letra), el aminoácido en la posición B25 es Asn, el aminoácido en la posición B27 es Glu o Asp y que comprende opcionalmente además una o varias mutaciones adicionales, y en donde el resto acilo está fijado al grupo amino ε en el residuo de lisina en la posición B29.

36. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde la insulina estabilizada frente a proteasas comprende la mutación A14E.

37. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde, en la insulina estabilizada frente a proteasas, además de la mutación en la posición B25, solo hay la mutación en la posición A14 mencionada en la cláusula anterior.

38. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde la insulina estabilizada frente a proteasas comprende la mutación A14H.

39. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde el análogo de la insulina estabilizada frente a proteasas comprende la mutación desB30.

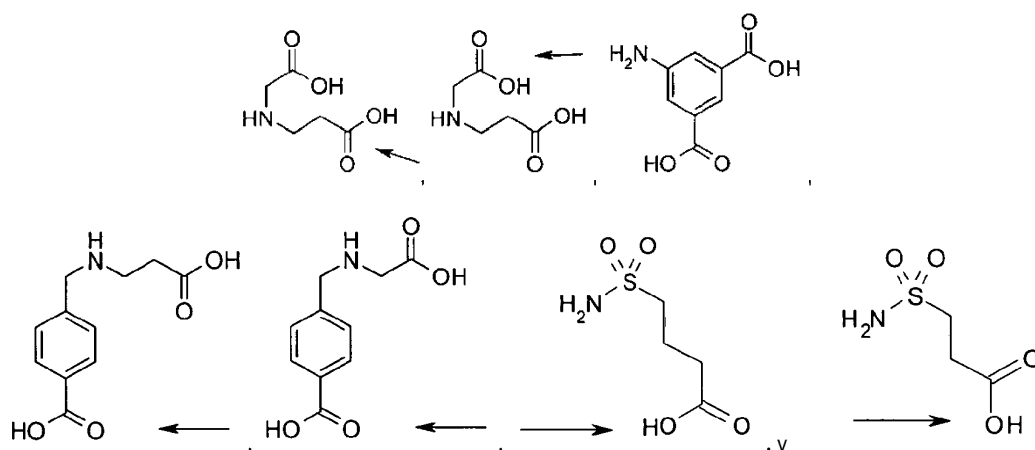
40. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde una o varias mutaciones adicionales dentro de la insulina estabilizada frente a proteasas se selecciona a partir de un grupo que consiste en: A(-1)P, A(0)P, A8H, A21G, B(-1)P, B(0)P, B1E, B1Q, B16E, B26D, B27E, B28D, desB30, B31L y B32E.

41. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con la cláusula anterior, en la medida de lo posible, en donde la insulina estabilizada frente a proteasas, además de las mutaciones en las posiciones A14 y B25, solo tiene una de las mutaciones mencionadas en las cláusulas anteriores.

42. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, excepto la última (es decir, excepto la cláusula 41) en la medida de lo posible, en donde la insulina estabilizada fren-

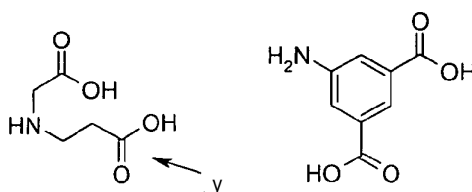
te a proteasas, además de las mutaciones en las posiciones A14 y B25, tiene exactamente dos de las mutaciones mencionadas en la cláusula anterior, excepto dos (es decir, que se mencionan en la cláusula 40).

43. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, excepto las dos últimas (es decir, excepto las cláusulas 41 y 42) en la medida de lo posible, en donde la insulina estabilizada frente a proteasas, además de las mutaciones en las posiciones A14 y B25, tiene exactamente tres de las mutaciones mencionadas en la cláusula anterior, excepto dos (es decir, que se mencionan en la cláusula 40).
44. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, excepto las dos últimas (es decir, excepto las cláusulas 41 y 42) en la medida de lo posible, en donde, aparte de las mutaciones en las posiciones A14 y B25, la única mutación adicional es desB30.
45. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde el residuo de aminoácido C-terminal en la cadena A de la insulina estabilizada frente a proteasas, es el residuo de aminoácido A21.
46. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde la insulina estabilizada frente a proteasas se selecciona a partir del grupo que consiste en insulina humana A8H, B25N, B27E, desB30; insulina humana A14E, A18L, B25H, desB30; insulina humana A14E, A21G, B25H, desB27, desB30; insulina humana A14E, B1E, B25H, B27E, B28E, desB30; insulina humana A14E, B1E, B25H, B28E, desB30; insulina humana A14E, B1E, B27E, B28E, desB30; insulina humana A14E, B1E, B28E, desB30; insulina humana A14E, B16H, B25H, desB30; insulina humana A14E, B25H, desB30; insulina humana A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30; insulina humana A14E, B25H, B27E, desB30; insulina humana A14E, B25H, desB27, desB30; insulina humana A14E, B25H, B29R, desB30; insulina humana A14E, B28D, desB30; insulina humana A14E, B28E, desB30; insulina humana B25N, B27E, desB30; insulina humana B25H, desB30; insulina humana A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30; insulina humana A14E, B25H, B29R, desB30; insulina humana A14E, A21G, B25H, desB27, desB30; insulina humana A14E, A21G, B25H, desB30; insulina humana A14E, B16H, B25H, desB30; insulina humana A14E, B25H, B16H, desB30; insulina humana A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30; insulina humana A14E, B25H, desB27, desB30; insulina humana A14E, B25H, B27K, desB28, desB29, desB30; insulina humana A14E, B25H, desB30; insulina humana A14E, desB30 e insulina humana A21G, B25H, desB30.
47. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde el resto acilo fijado a la insulina estabilizada frente a proteasas tiene la fórmula general $\text{Aci-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p\text{- (I)}$, en donde Aci, AA1, AA2, AA3, n, m y p son como se han definido anteriormente.
48. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con la cláusula anterior, en la medida de lo posible, en donde Aci es un ácido graso, preferiblemente ácido mirístico o ácido estérico, más preferido ácido mirístico.
49. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, excepto la última, en donde Aci es un diácido graso, preferiblemente un diácido graso (α , ω), más preferido ácido heptadecanodioico, ácido hexadecanodioico, ácido octadecanodioico, ácido nonadecanodioico, ácido docosanodioico, ácido eicosanodioico.
50. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, excepto la última, en donde Aci es un ácido graso ω -(tetrazol-5-il)-, preferiblemente ácido 15-(1H-tetrazol-5-il)pentadecanoico, ácido 16-(1H-tetrazol-5-il)hexadecanoico, ácido 17-(1H-tetrazol-5-il)heptadecanoico, ácido 18-(1H-tetrazol-5-il)octadecanoico o ácido 19-(1H-tetrazol-5-il)nonadecanoico.
51. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde AA1 es ácido tranexámico o glicina.
52. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde AA1 es ácido tranexámico.
53. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde n es 0 o 1.
54. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde n es 0.
55. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde n es 1.
56. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde AA2 es γGlu , αGlu , βAsp , αAsp , $\gamma\text{-D-Glu}$, $\alpha\text{-D-Glu}$, $\beta\text{-D-Asp}$, $\alpha\text{-D-Asp}$, o un aminoácido de la siguiente fórmula:



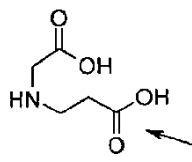
en donde las flechas indican el punto de fijación al grupo amino de AA1, AA2, AA3 o al grupo ϵ -amino del residuo de lisina B29 o a una posición N-terminal de la insulina estabilizada frente a proteasas.

57. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde AA2 es γ Glu, β Asp, γ -D-Glu, β -D-Asp, o un aminoácido con la siguiente fórmula:



en donde la flecha indica el punto de fijación al grupo amino de AA1, AA2, AA3 o al grupo ϵ -amino del residuo de lisina B29 o a una posición N-terminal de la insulina estabilizada frente a proteasas

58. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde AA2 es γ Glu, γ -D-Glu, o un aminoácido con la siguiente fórmula:



en donde la flecha indica el punto de fijación al grupo amino de AA1, AA2, AA3 o al grupo ϵ -amino del residuo de lisina B29 o a una posición N-terminal de la insulina estabilizada frente a proteasas.

59. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde m es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

60. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde m es 0, 1, 2, 3 o 4.

61. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde m es 4.

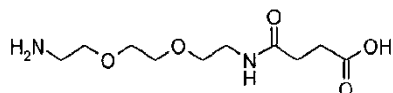
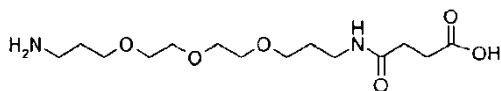
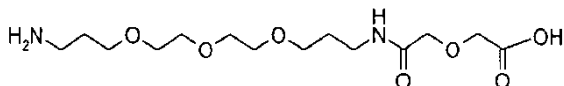
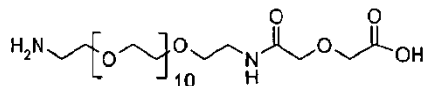
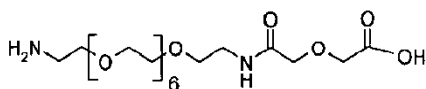
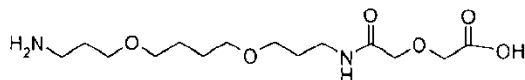
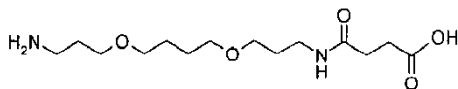
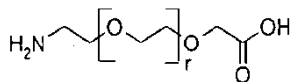
62. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde m es 3.

63. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde m es 2.

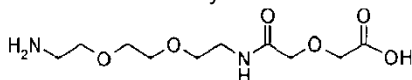
64. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde m es 1.

65. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde m es 0.

66. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas, de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde AA3 se selecciona a partir de cualquiera de las siguientes:



y



en donde r es 1, 2, 3, 5, 7, 11, 23 o 27.

67. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas, de acuerdo con la cláusula anterior, en donde r es 1, 3, 5 o 7.

68. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas, de acuerdo con la cláusula anterior, en donde r es 1.

69. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas, de acuerdo con la cláusula anterior excepto una, en donde r es 3.

70. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas, de acuerdo con la cláusula anterior, excepto dos, en donde r es 5.

71. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas, de acuerdo con la cláusula anterior, excepto tres, en donde r es 7.

72. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en la medida de lo posible, en donde p es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10

73. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde p es 0, 1, 2, 3 o 4.

74. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores,

en donde p es 0, 1 o 2.

75. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde p es 0 o 2.

5 76. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde p es 0.

77. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde p es 1.

78. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en donde p es 2.

10 79. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas de productos anteriores, que es uno cualquiera de los compuestos mencionados específicamente en esta memoria descriptiva, tal como en los ejemplos específicos, especialmente uno cualquiera de los ejemplos 1 en adelante, más abajo.

15 80. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas de productos anteriores, que es uno cualquiera de los ejemplos específicos de los restos acilo mencionados específicamente en esta memoria descriptiva, fijado a cualquiera de las insulinas estabilizadas frente a proteasas mencionadas específicamente en esta memoria descriptiva.

81. El uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas de productos anteriores para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de la diabetes.

20 82. El uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas de productos anteriores para la preparación de una composición farmacéutica que se puede administrar por vía pulmonar para el tratamiento de la diabetes.

83. El uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas de productos anteriores para la preparación de una composición farmacéutica que se puede administrar por vía pulmonar para el tratamiento de la diabetes y que proporciona un efecto de acción prolongada.

25 84. El uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas de productos anteriores para la preparación de una composición farmacéutica en polvo que se puede administrar por vía pulmonar para el tratamiento de la diabetes.

30 85. El uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas de productos anteriores para la preparación de una composición farmacéutica líquida que se puede administrar por vía pulmonar para el tratamiento de la diabetes.

86. El uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas de productos anteriores para la preparación de una composición farmacéutica que se puede administrar por vía oral para el tratamiento de la diabetes.

35 87. Un método de tratamiento de la diabetes, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo requiere una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas de productos anteriores.

88. Una composición que contiene insulina humana, así como una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores.

89. Una composición que contiene insulina aspart, así como una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores.

40 90. Una composición que contiene insulina Lispro, así como una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores.

91. Una composición que contiene insulina Glulisina, así como una insulina acilada estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores.

45 92. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad biológicamente activa de la insulina estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en relación con análogos de insulina y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

50 93. Un método para el tratamiento, prevención o alivio de la hiperglucemia, diabetes de tipo 2, tolerancia alterada frente a la glucosa, diabetes de tipo 1, obesidad, síndrome X o dislipidemia en un sujeto que comprende administrar a un sujeto una insulina estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores en relación con análogos de insulina o una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas

anteriores.

94. Uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de una insulina estabilizada frente a proteasas de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en relación con análogos de insulina para la preparación de una formulación farmacéutica para el tratamiento o la prevención de hiperglucemia, diabetes de tipo 2, tolerancia alterada frente a la glucosa, diabetes de tipo 1, obesidad, síndrome X o dislipidemia.

95. Un método de tratamiento de la diabetes, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo requiere una cantidad terapéuticamente eficaz de una insulina acilada de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas de productos anteriores.

La combinación de una o varias de las cláusulas descritas en este documento, opcionalmente también con una o varias de las reivindicaciones siguientes, da como resultado cláusulas adicionales y la presente descripción se refiere a todas las combinaciones posibles de dichas cláusulas y reivindicaciones.

Todos los apartados y subapartados se utilizan en esta memoria únicamente por conveniencia y no deben considerarse limitativos de la invención de ninguna manera.

El uso de cualquiera y de todos los ejemplos, o del lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como") proporcionado en este documento, está destinado simplemente a ilustrar mejor la invención y no plantea una limitación del alcance de la invención, a menos que se reivindique lo contrario. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva debe interpretarse como una indicación de que cualquier elemento no reivindicado sea esencial para la práctica de la invención.

La citación de documentos de patentes en este documento se hace solo por conveniencia y no refleja ninguna consideración de la validez, la patentabilidad y/o la aplicabilidad de tales documentos de patente. La mención en este documento de referencias no es una admisión de que constituyan técnica anterior.

En este documento, la palabra "comprende" debe interpretarse en sentido amplio, con el significado "incluye", "contiene" o "abarca" (directrices C 4.13 de la OPE).

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración, no como una limitación.

Las abreviaturas utilizadas en el presente documento son las siguientes: β Ala es beta-alanilo, Aoc es ácido 8-aminooctanoico, tBu es *tert*-butilo, DCM es diclorometano, DIC es diisopropilcarbodiimida, DIPEA = DIEA es *N,N*-diisopropiletilamina, DMF es *N,N*-dimetilformamida, DMSO es dimetilsulfóxido, EtOAc es acetato de etilo, Fmoc es 9-fluorenilmetiloxycarbonilo, γ Glu es gamma L-glutamilo, HCl es ácido clorhídrico, HOBt es 1-hidroxibenzotriazol, NMP es *N*-metilpirrolidona, MeCN es acetonitrilo, OEG es [2-(2-aminoetoxy)etoxi]etilcarbonilo, Su es succinimidil-1-il = 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo, OSu es succinimidil-1-iloxi = 2,5-dioxo-pirrolidin-1-iloxi, RPC es cromatografía de fase inversa, TA es temperatura ambiente, TFA es ácido trifluoroacético, THF es tetrahidrofurano, TNBS es ácido 2,4,6-trinitrobenzosulfónico, TRIS es tris(hidroximetil)aminometano y TSTU es tetrafluoroborato de O-(*N*-succinimidil)-1,1,3,3-tetrametiluronio.

Los siguientes ejemplos y procedimientos generales se refieren a compuestos intermedios y a productos finales identificados en la memoria descriptiva y en los esquemas de síntesis. La preparación de los compuestos se describe en detalle usando los siguientes ejemplos, pero las reacciones químicas descritas se describen en términos de su aplicabilidad general para la preparación de compuestos. Ocasionalmente, la reacción puede no ser aplicable como se describe para cada compuesto incluido dentro del alcance descrito de la descripción. Los compuestos para los que esto ocurre serán fácilmente reconocidos por los expertos en la técnica. En estos casos, las reacciones se pueden realizar satisfactoriamente mediante modificaciones convencionales conocidas por los expertos en la técnica, es decir, mediante una protección apropiada de grupos que interfieren, cambiando a otros reactivos convencionales, o mediante una modificación rutinaria de las condiciones de reacción. Alternativamente, otras reacciones descritas en este documento o convencionales de otro modo, serán aplicables a la preparación de los compuestos correspondientes. En todos los métodos preparativos, todos los materiales de partida son conocidos o se pueden preparar fácilmente a partir de materiales de partida conocidos. Todas las temperaturas se indican en grados Celsius y a menos que se indique lo contrario, todas las partes y porcentajes son en peso cuando se hace referencia a los rendimientos y todas las partes son en volumen cuando se hace referencia a disolventes y eluyentes.

Los compuestos se pueden purificar mediante el empleo de uno o varios de los siguientes procedimientos que son típicos dentro de la técnica. Estos procedimientos se pueden modificar - si es necesario - con respecto a los gradientes, pH, sales, concentraciones, flujo, columnas y así sucesivamente. Dependiendo de factores tales como el perfil de impurezas, la solubilidad de las insulinas en cuestión, etcétera, estas modificaciones pueden ser fácilmente reconocidas y realizadas por una persona experta en la técnica.

Después de una HPLC ácida o una desalación, los compuestos se aíslan mediante liofilización de las fracciones puras. Después de una HPLC neutra o cromatografía de intercambio aniónico, los compuestos se desalan, precipitan a pH isoelectrico o se purifican mediante HPLC ácida.

Procedimientos de purificación típicos:

El sistema de HPLC es un sistema Gilson que consiste en lo siguiente: administrador de líquidos Modelo 215, bomba Modelo 322-H2 y un detector de UV Modelo 155. La detección es normalmente a 210 nm y 280 nm. El sistema purificador Äkta Purifier FPLC (Amersham Biosciences) consiste en lo siguiente: bomba Modelo P-900, detector de UV Modelo UV-900, detector de pH y conductividad Modelo pH/C-900, colector de fracciones Modelo Frac-950. La detección de UV es normalmente a 214 nm, 254 nm y 276 nm.

HPLC ácida:

Columna: Macherey-Nagel SP 250/21 Nucleusil 300-7 C4	
Flujo:	8 ml/min
Tampón A:	0,1% de TFA en acetonitrilo
Tampón B:	0,1% de TFA en agua.
Gradiente:	0,0 - 5,0 min: 10% de A
5,00 - 30,0 min:	10% de A a 90% de A
30,0 - 35,0 min:	90% de A
35,0 - 40,0 min:	100% de A

HPLC neutra:

Columna: Phenomenex, Jupiter, C4 5 µm 250 x 10,00 mm, 300 Å	
Flujo:	6 ml/min
Tampón A:	TRIS 5 mM, (NH ₄) ₂ SO ₄ 7,5 mM, pH = 7,3, 20% de CH ₃ CN
Tampón B:	60% de CH ₃ CN, 40% de agua
Gradiente:	0 - 5 min: 10% de B
5 - 35 min:	10 - 60% de B
35 - 39 min:	60% de B
39 - 40 min:	70% de B
40 - 43,5 min:	70% de B

Cromatografía de intercambio aniónico:

Columna:	RessourceQ, 1 ml
Flujo:	6 ml/min
Tampón A:	0,09% de NH ₄ HCO ₃ , 0,25% de NH ₄ OAC, 42,5% de etanol pH 8,4
Tampón B:	0,09% de NH ₄ HCO ₃ , 2,5% de NH ₄ OAC, 42,5% de etanol pH 8,4
Gradiente:	100% de A hasta 100% de B durante 30 volúmenes de columna

Desalación:**Columna:** HiPrep 26/10

Flujo:	10 ml/min, 6 volúmenes de columna
Tampón:	NH ₄ HCO ₃ 10 mM

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

(II): Aci-AA1_n-AA2_m-AA3_p-Act,

en donde Aci, AA1, AA2, AA3, n, m, y p son como se han definido anteriormente y Act es el grupo saliente de un éster activo, tal como *N*-hidroxisuccinimida (OSu) o 1-hidroxibenzotriazol, y en donde los ácidos carboxílicos dentro de los restos Aci y AA2 del resto acilo están protegidos como ésteres *terc*-butilicos.

Los compuestos de la fórmula general (II) según la invención, se pueden sintetizar sobre un soporte sólido, usando procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica de síntesis de péptidos en fase sólida. Este procedimiento comprende la fijación de un aminoácido protegido con Fmoc a una resina de cloruro de 2-clorotritilo de poliestireno. La fijación, por ejemplo, puede llevarse a cabo usando el aminoácido libre protegido en N en presencia de una amina terciaria, como trietilamina o *N,N*-diisopropiletilamina (véanse las referencias más abajo). El extremo C-terminal (que está fijado a la resina) de este aminoácido se encuentra al final de la secuencia sintética que está acoplada a las insulinas de origen de la invención. Después de la fijación del aminoácido con Fmoc a la resina, el grupo Fmoc se desprotege usando, por ejemplo, aminas secundarias, tales como piperidina o dietilamina, seguidas de acoplamiento de otro (o el mismo) aminoácido protegido con Fmoc y desprotección. La secuencia sintética se termina mediante acoplamiento de diácidos grasos (α , ω) protegidos con mono-*terc*-butilo, como ésteres mono-*terc*-butilícos de ácido hexadecanodioico, heptadecanodioico, octadecanodioico o eicosanodioico. La escisión de los compuestos desde la resina se lleva a cabo usando ácido diluido, tal como 0,5-5% de TFA/DCM (ácido trifluoroacético en diclorometano), ácido acético (por ejemplo, 10% en DCM, o HOAc/trifluoroetanol/DCM 1:1:8), o hecafluoroisopropanol en DCM (véase, por ejemplo "Organic Synthesis on Solid Phase", F.Z. Dörwald, Wiley-VCH, 2000. ISBN 3-527-29950-5, "Peptides: Chemistry and Biology", N. Sewald & H.-D. Jakubke, Wiley-VCH, 2002, ISBN 3-527-30405-3 o "The Combinatorial Chemistry Catalog" 1999, Novabiochem AG, y las referencias citadas ahí). Esto asegura que los ésteres *terc*-butilícos presentes en los compuestos como grupos protectores de ácido carboxílico no se desprotejan. Finalmente, el grupo carboxi C-terminal (liberado de la resina) se activa, por ejemplo, como el éster de *N*-hidroxisuccinimida (OSu) y se emplea directamente o después de una purificación como reactivo de acoplamiento en la fijación a insulinas de origen de la invención. Este procedimiento se ilustra en el ejemplo 9.

Alternativamente, los reactivos de acilación de la fórmula general (II) anterior, se pueden preparar por síntesis en fase de solución como se describe a continuación.

Los diácidos grasos protegidos con mono-*terc*-butilo, tales como ésteres mono-*terc*-butilícos de ácido hexadecanodioico, heptadecanodioico, octadecanodioico o eicosanodioico se activan, por ejemplo, como OSu-ésteres tal como se describe a continuación o como cualquier otro éster activado conocido por los expertos en la técnica, tal como ésteres de HOBt o HOAt. Este éster activo se acopla con uno de los aminoácidos AA1, AA2 protegido con mono-*terc*-butilo o AA3 en un disolvente adecuado, tal como THF, DMF, NMP (o una mezcla de disolventes) en presencia de una base adecuada, tal como DIPEA o trietilamina. El compuesto intermedio se aísla, por ejemplo, por procedimientos extractivos o por procedimientos cromatográficos. El producto intermedio resultante se somete de nuevo a una activación (como se ha descrito anteriormente) y para el acoplamiento con uno de los aminoácidos AA1, AA2 protegido con mono-*terc*-butilo o AA3 como se ha descrito anteriormente. Este procedimiento se repite hasta que se obtiene el producto intermedio protegido deseado, Aci-AA1_n-AA2_m-AA3_p-OH. Este a su vez se activa para producir los reactivos de acilación de la fórmula general (II) Aci-AA1_n-AA2_m-AA3_p-Act. Este procedimiento se ilustra en el ejemplo 21.

Los reactivos de acilación preparados por cualquiera de los métodos anteriores, se pueden desproteger (*terc*-butilo) después de la activación en forma de ésteres de OSu. Esto se puede hacer por tratamiento con TFA del reactivo de acilación protegido con *terc*-butilo activado con OSu. Después de la acilación de cualquier insulina estabilizada frente a proteasas, se obtiene la insulina acilada estabilizada frente a proteasas resultante, sin protección, de la invención. Esto se ilustra, por ejemplo, en el ejemplo 16 a continuación.

Si los reactivos preparados por cualquiera de los métodos anteriores no están desprotegidos (*terc*-butilo) después de la activación en forma de ésteres de OSu, la acilación de cualquier insulina estabilizada frente a proteasas produce la correspondiente insulina acilada estabilizada frente a proteasas protegida con *terc*-butilo de la invención. Con el fin de obtener la insulina acilada estabilizada frente a proteasas sin protección de la invención, la insulina protegida se desprotege. Esto se puede realizar mediante un tratamiento con TFA para obtener la insulina acilada estabilizada frente a proteasas sin protección de la invención. Esto se ilustra, por ejemplo, en los ejemplos 1 y 2 a continuación.

Si se desea una acilación de un resto de lisina (en la posición épsilon) de una insulina, la acilación se lleva a cabo a pH alcalino (por ejemplo, a pH 10, 10,5, o 11). Esto, por ejemplo, se ilustra en los ejemplos 1 y 2 a continuación.

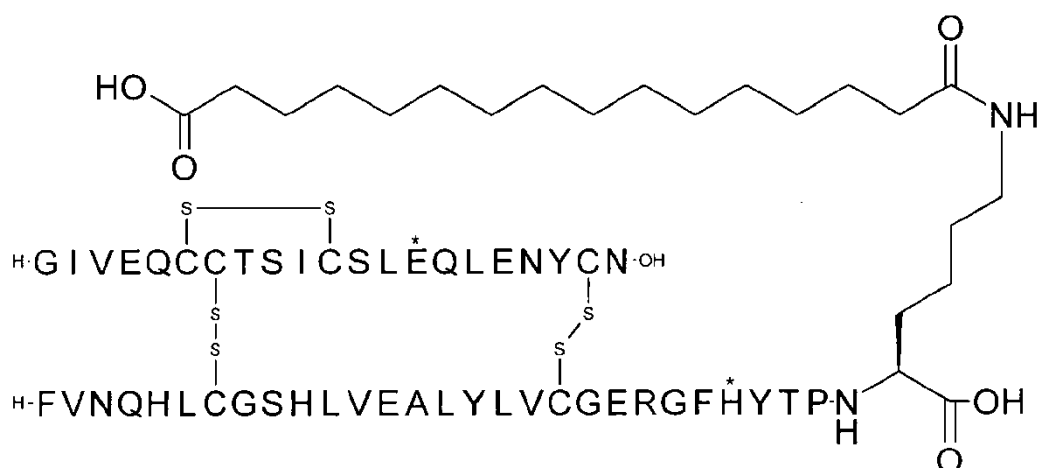
Si se desea una acilación de la posición N-terminal de la cadena A (A1) de una insulina, la acilación se lleva a cabo a pH neutro (por ejemplo, a pH 7, 7,5, 8 u 8,5). Esto, por ejemplo, se ilustra en los ejemplos 38 y 44 a continuación.

Procedimiento general (A) para la preparación de insulinas estabilizadas frente a proteasas aciladas de esta invención

El procedimiento general (A) se ilustra en el primer ejemplo.

Ejemplo 1, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B25H, B29K(N⁶-Hexadecanodioilo), desB30



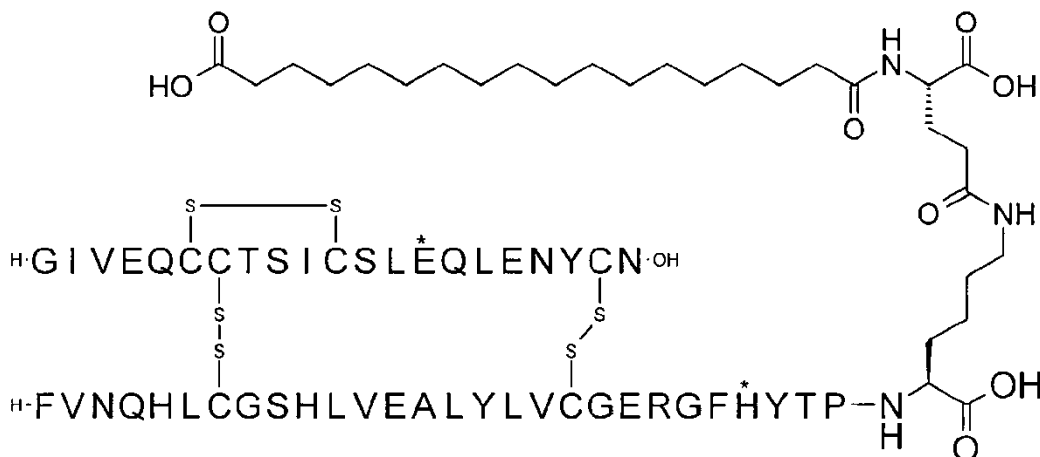
La insulina humana A14E, B25H, desB30 (500 mg) se disolvió en Na_2CO_3 100 mM acuoso (5 ml), y se ajustó el pH a 10,5 con NaOH 1 N. Se disolvió éster *N*-hidroxisuccinimídico de éster *terc*-butilico de ácido hexadecanodioico en acetonitrilo (10 P N%) y se añadió a la solución de insulina y se calentó suavemente bajo un grifo de agua caliente, para evitar la precipitación y se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla se liofilizó. El sólido se disolvió en ácido trifluoroacético al 95% enfriado en hielo (que contenía 5% de agua) y se mantuvo en hielo durante 30 minutos. La mezcla se concentró a vacío y se evaporó de nuevo desde diclorometano. El residuo se disolvió en agua, y el pH se ajustó a neutro (6-7) y la mezcla se liofilizó.

La insulina resultante se purificó por cromatografía de intercambio iónico en una columna Source 15Q de 21 ml, varias migraciones, eluyendo con un gradiente de 15 a 300 nM de acetato de amonio en Tris 15 mM, 50% v/v de etanol, pH 7,5 (ácido acético). La desalación final de las fracciones puras se realizó en una columna RPC de 3 ml, eluyendo isocráticamente con 0,1% v/v de TFA, 50% v/v de etanol. La insulina pura resultante se liofilizó.

LC-MS (electropulverización): $m/z = 1483,2$ ($M+4$)/4. Calculado: 1483,5

Ejemplo 2, Procedimiento general (A):

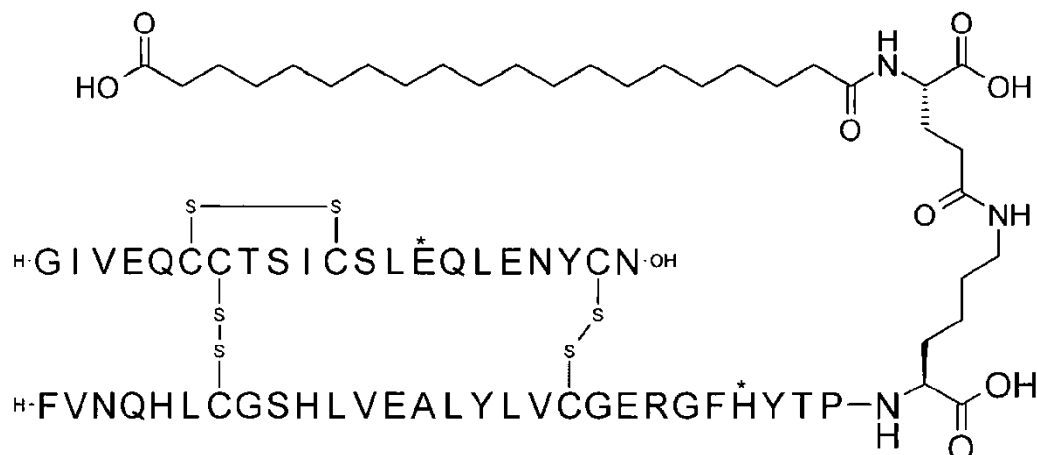
Insulina humana A14E, B25H, B29K(*N*⁶Octadecanodioil- γ Glu), desB30



La insulina humana A14E, B25H, desB30 (2 g) se disolvió en Na_2CO_3 100 mM acuoso (10 ml), y se añadió DMSO (4 ml). El pH se ajustó a 10,5 con NaOH 1 N. Octadecanodioil-L-Glu(OSu)-OtBu de *terc*-butilo (preparado como se describe en el documento WO 2005/012347). Se añadió más Na_2CO_3 100 mM acuoso (20 ml) seguido por THF (20 ml). Después de 1,5 h, se añadieron unas gotas de metilamina y la mezcla se acidificó a continuación con ácido acético. La mezcla se purificó por HPLC preparativa y se liofilizó para proporcionar la insulina del título como éster di-*terc*-butilico. Este se disolvió en diclorometano y ácido trifluoro-acético 1:1 (50 ml). La mezcla se dejó reposar durante 2 horas y se concentró a vacío. Después de la adición de un poco de agua y acetonitrilo, la mezcla se purificó mediante HPLC preparativa. Se liofilizaron las fracciones puras. Esto proporcionó 313 mg de la insulina del título.

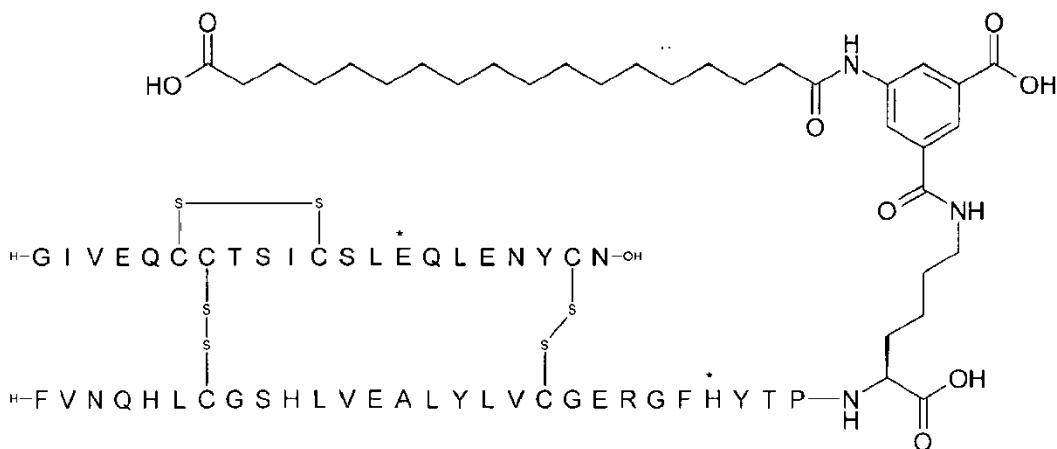
MALDI-TOF MS: $m/z = 6089$ ($M+1$). Calculado: 6089.

Ejemplo 3, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B25H, B29K(N^εEicosanodioil-γGlu), desB30

Esta insulina se preparó de forma similar a como se ha descrito anteriormente, partiendo de ácido eicosanodioico a través de éster mono-*tert*-butilico de ácido eicosanodioico e icosanodioil-L-Glu(OSu)OtBu de *tert*-butilo.

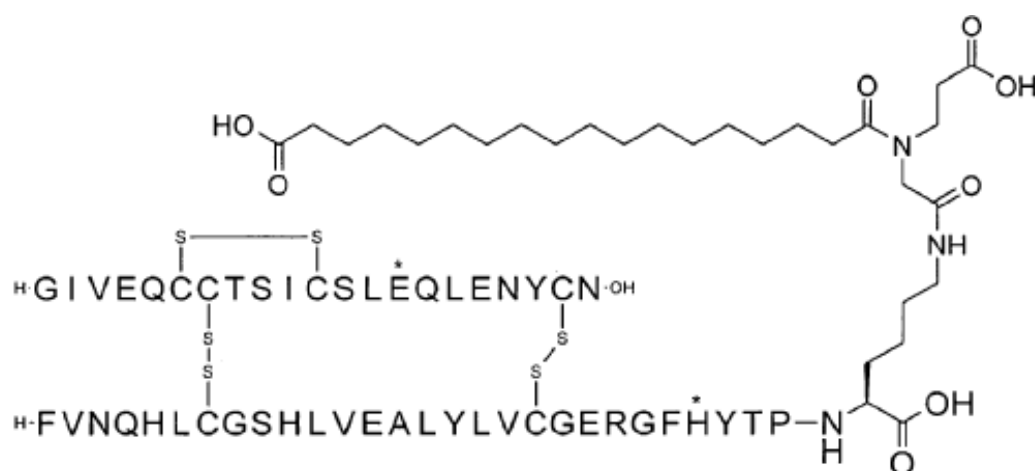
- 5 MALDI-TOF MS: $m/z = 6120$ (M+1). Calculado: 6117.

Ejemplo 4, Procedimiento general (A):**Insulina humana A14E, B25H, B29K(N^ε3-carboxi-5-octadecanodioilaminobenzoilo), desB30**

- 10 Esta insulina se preparó de forma similar a como se ha descrito anteriormente, a partir de éster mono-(2,5-dioxopirrolidin-1-ílico) de ácido 5-(17-*tert*-butoxicarbonilhepta-decanoilamino)isofáltico (preparado como se describe en el documento WO 2006/082204).

LC-MS: 1531 (M+4), Pm 6124 (desconvolucionado. Calc.: 1531 (M+4), 6122.

Ejemplo 5, Procedimiento general (A):**Insulina humana A14E, B25H, B29K(N^ε-N-octadecanodioil-N-(2-carboxietil)glicilo), desB30**

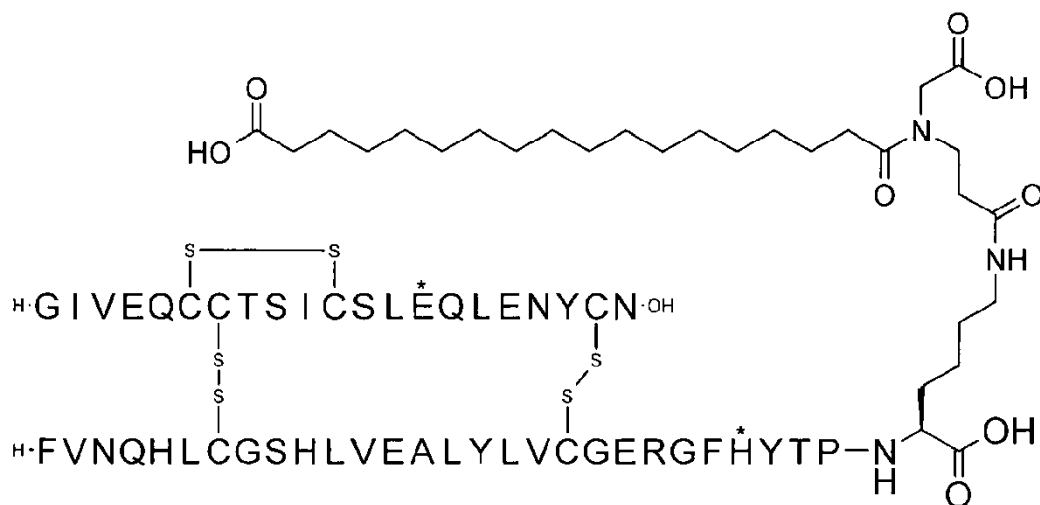


Esta insulina se preparó de forma similar a como se ha descrito anteriormente, a partir de octadecanodioil-N-(2-(*terc*-butoxicarbonil)etil)Gly-OSu de *terc*-butilo (preparado como se describe en el documento WO 2005/012347).

LC-MS (electropulverización): m/z: 1522,52 (M+4). Calc.: 1523.

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

Insulina humana A14E, B25H, B29K(N^ε(N-Octadecanodioil-N-carboximetil)-beta-alanilo), desB30

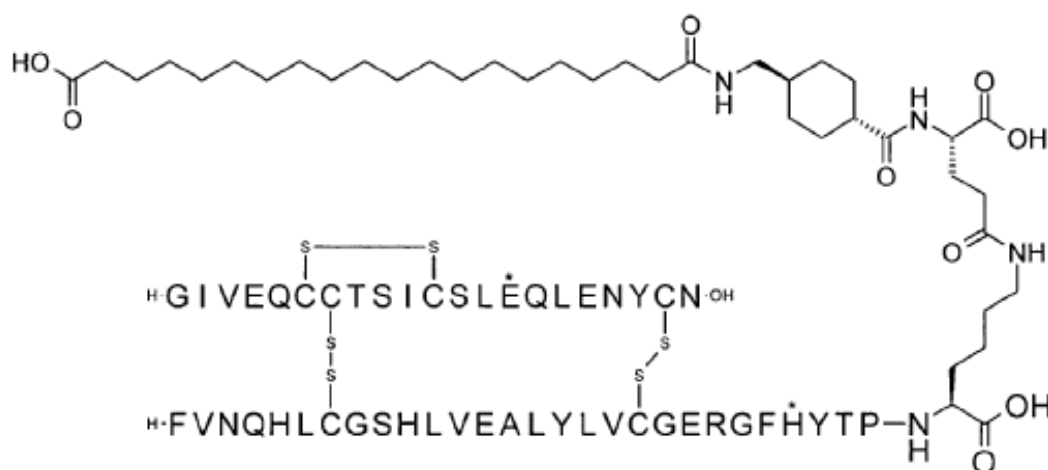


Esta insulina se preparó de forma similar a como se ha descrito anteriormente, a partir de octadecanodioil-N-(*terc*-butoxicarbonilmetil)-(3Ala-OSu de *terc*-butilo (preparado como se describe en el documento WO 2005/012347).

10 MALDI-TOF MS: m/z = 6088 (M+1). Calculado: 6089.

Ejemplo 7, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B25H, B29K(N^ε4-([4-({19-Carboxinonadecanoilamino}metil)trans-ciclohexano-carbonil]-γGlu), desB30



Esta insulina se preparó de forma similar a como se ha descrito anteriormente, a partir de éster 5-(2,5-di-oxopirrolidin-1-ílico) de éster 1-*terc*-butílico de ácido 2-({4-[(19-*terc*-butoxicarbonil-nonadecanoilamino)metil]ciclohexanocarbonil}amino)pentanodioico.

5 LC-MS (electropulverización): m/z: 6260. Calc.: 6255.

Preparación de éster 5-(2,5-di-oxopirrolidin-1-ílico) de éster 1-*terc*-butílico de ácido 2-({4-[(19-*terc*-butoxicarbonil-nonadecanoilamino)metil]ciclohexanocarbonil}amino)pentanodioico.

1. Activación con OSu de ácido *terc*-butil eicosanodioico

10 El ácido *terc*-butil eicosanodioico (5,0 g) se disolvió en THF (50 ml) y DMF (30 ml). Se añadieron TSTU (4,53 g) y DIPEA (2,65 ml). La mezcla se agitó durante 3 días y después se concentró *a vacío*. El residuo sólido recrystalizó en acetonitrilo para proporcionar éster de *N*-hidroxi-succinimida de éster *terc*-butílico de ácido eicosanodioico como un compuesto cristalino blanco (5,52 g, 89%).

LC-MS (electropulverización): m/z: 440 [M-56 (= *terc*-Bu)]

2. Acoplamiento de ácido tranexámico

15 A una solución de éster de *N*-hidroxisuccinimida de éster *terc*-butílico de ácido eicosanodioico (5,52 g) en THF (100 ml) se añadió ácido tranexámico (1,75 g). Se obtuvo un precipitado. Los intentos de obtener una solución mediante la adición de DMF (75 ml), agua (25 ml) y DMSO (50 ml) y unas pocas gotas de DIPEA no tuvieron éxito. La suspensión se agitó durante una noche. La mezcla se concentró *a vacío*. Al residuo sólido se añadió THF y el precipitado se separó por filtración. El material filtrado se concentró y el residuo sólido recrystalizó en acetonitrilo para proporcionar ácido 4-[(19-*terc*-butoxicarbonilnonadecanoilamino)metil]ciclohexanocarboxílico como un compuesto cristalino blanco (5,56 g, 93%)

LC-MS (electropulverización): m/z: 538 (M+1).

3. Activación con OSu de ácido 4-[(19-*terc*-butoxicarbonilnonadecanoilamino)metil]ciclohexanocarboxílico

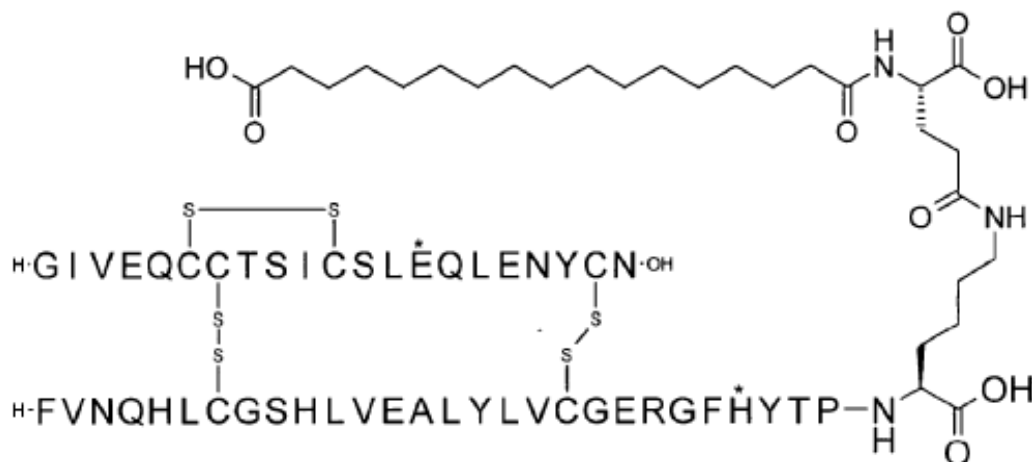
25 A una solución de ácido 4-[(19-*terc*-butoxicarbonilnonadecanoilamino)metil]ciclohexanocarboxílico (5,56 g) en THF (100 ml) se añadió una solución de TSTU (3,42 g) en acetonitrilo (25 ml). La mezcla se concentró *a vacío* después de agitar durante una noche. El residuo sólido recrystalizó en acetonitrilo para proporcionar éster 2,5-di-oxopirrolidin-1-ílico de ácido 4-[(19-*terc*-butoxicarbonil-nonadecanoilamino)metil]ciclohexanocarboxílico (5,76 g, 88%).

LC-MS (electropulverización): m/z: 635 (M+1).

4. Acoplamiento de H-Glu-OtBu y activación con OSu.

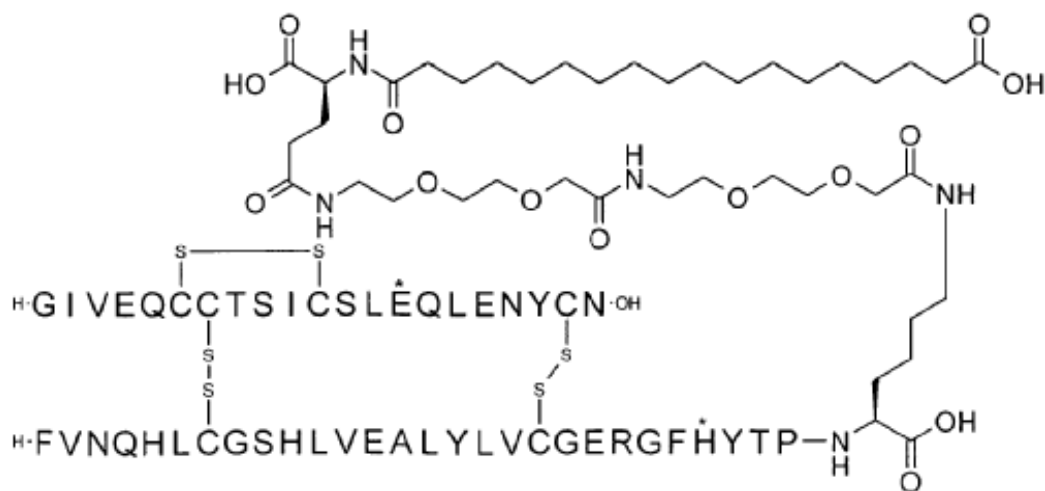
30 A una solución de éster 2,5-di-oxopirrolidin-1-ílico de ácido 4-[(19-*terc*-butoxicarbonil-nonadecanoilamino)metil]ciclohexanocarboxílico en THF (150 ml) se añadió una solución de H-Glu-OtBu (1,84 g) en agua (25 ml) y unas pocas gotas de DIPEA. La mezcla se agitó durante una noche y después se concentró *a vacío*. El residuo se disolvió en THF caliente (60°C) y se filtró. Al material filtrado frío se añadió THF hasta 150 ml y TSTU (2,98 g) disuelto en acetonitrilo (25 ml). La mezcla se concentró después de agitar durante 20 min. El residuo recrystalizó en acetonitrilo para proporcionar un sólido blanco, éster 5-(2,5-di-oxopirrolidin-1-ílico) de éster 1-*terc*-butílico de ácido 2-({4-[(19-*terc*-butoxicarbonil-nonadecanoilamino)metil]ciclohexanocarbonil}amino)pentanodioico (6,8 g, 92%).

LC-MS (electropulverización): m/z: 820 (M+1).

Ejemplo 8, Procedimiento general (A):**Insulina humana A14E, B25H, B29K(N⁶Heptadecanodioil-γGlu), desB30**

5 Esta insulina se preparó de forma similar a como se ha descrito anteriormente, a partir de éster mono-*tert*-bútilico de ácido heptadecanodioico y heptadecanodioil-L-Glu(OSu)OtBu de *tert*-butilo (preparado como se describe en el documento WO 2006/082204).

LC -MS (electropulverización): m/z: 1519 (M+4). Calc.: 1519.

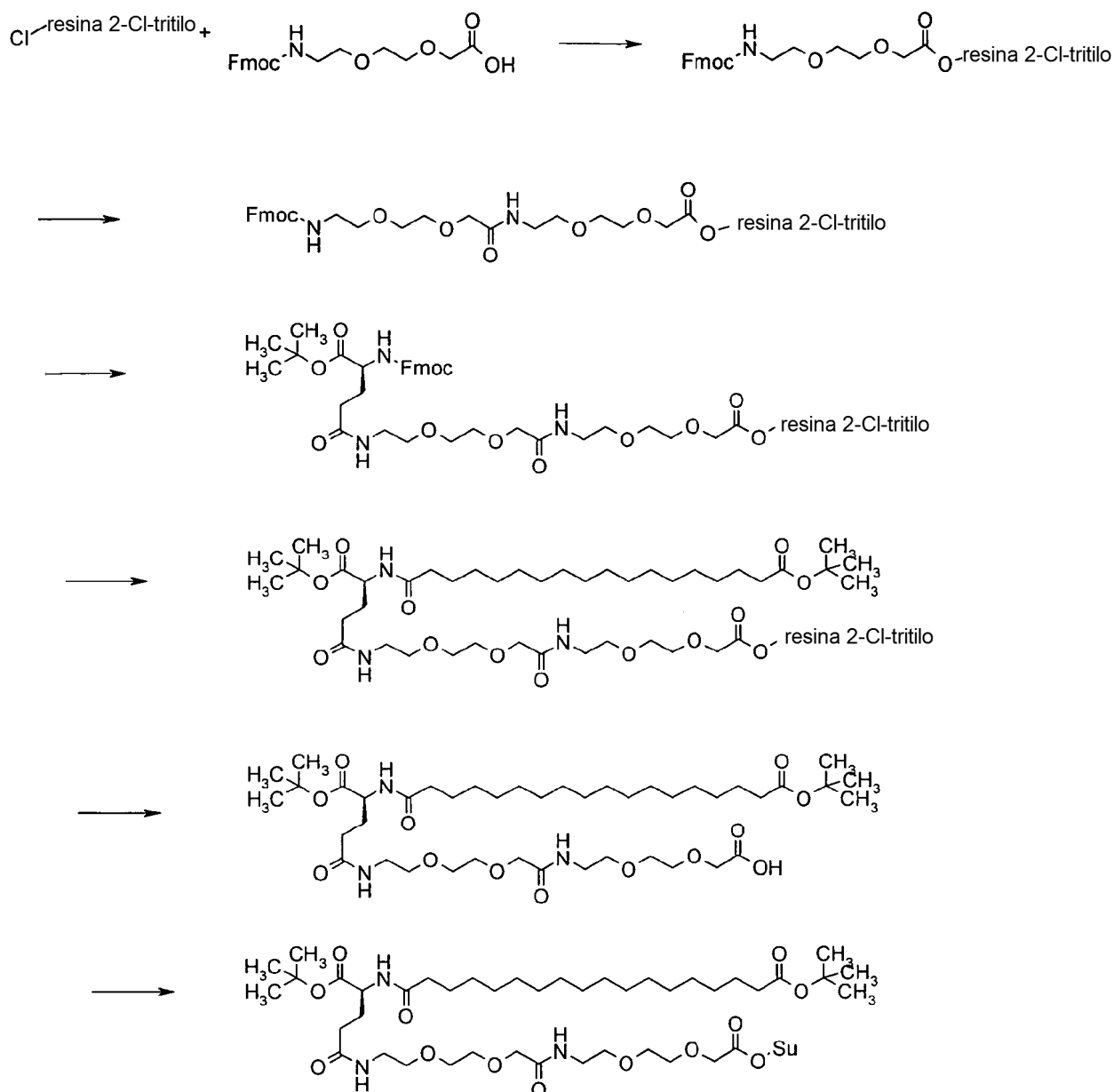
Ejemplo 9, Procedimiento general (A):**Insulina humana A14E, B25H, B29K(N⁶Octadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30**

10 El efecto oral de este compuesto sobre ratas Wistar macho en ayunas durante una noche, se proporciona en la Fig. 2a y Fig. 2b a continuación.

15 Esta insulina se preparó de forma similar a como se ha descrito anteriormente, a partir de éster *tert*-bútilico de ácido 17-((S)-1-*tert*-butoxicarbonil-3-{2-[2-((2-[2-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxycarbonilmetoxi)etoxi]etilcarbamoil)metoxi)etoxi]etilcarbamoil}propilcarbamoil)heptadecanoico (nombre alternativo: octa-decanodioil-Glu(OEG-OEG-OSu)-OtBu de *tert*-butilo)

LC-MS (electropulverización): m/z: 1596 (M+4). Calc.: 1596.

La unidad estructural para la preparación de esta insulina se preparó como se describe a continuación:



Resina de partida: resina de 2-clorotritilo, 1,60 mmol/g

Se hinchó 1,0 g de la resina durante 30 min en DCM (10 ml).

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

- 5 Se disolvieron 0,39 g (0,63 eq, 1,0 mmol) de ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico (Fmoc-OEG-OH) en DCM (15 ml) y se añadieron a la resina. N,N-Diisopropiletilamina (DIEA) (0,44 ml, 2,5 mmol) se añadió gota a gota. La mezcla de reacción se agitó en vórtice durante 30 min y después se añadió metanol (2 ml) y la mezcla se agitó en vórtice durante otros 15 min. La resina se filtró y se lavó con NMP (2x8 ml) y DCM (8x8 ml).

Se añadió 20% de piperidina/NMP (8 ml), se dejó reposar 10 min, se repitió una vez. Se filtró y se lavó con NMP (2x8 ml), DCM (3x8 ml) y NMP (5x8 ml). Una prueba de TNBS positiva proporcionó resinas de color rojo.

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

- Se disolvieron 0,78 g (2 eq, 2,0 mmol) de ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico en NMP/DCM 1:1 (10 ml). Se añadieron 0,28 g (2,2 eq, 2,4 mmol) de HOSu, seguido de la adición de 0,37 ml (2,2 eq, 2,4 mmol) de DIC. La mezcla de reacción se dejó en reposo durante 1 hora y después se añadió a la resina y finalmente se añadieron 0,407 ml (2,2 eq) de DIEA. La mezcla se agitó en vórtice durante 16 horas, se filtró y se lavó con NMP (2x8 ml), DCM (3x8 ml) y NMP (5x8 ml). Una prueba de TNBS positiva proporcionó resinas incolores.

Se añadió 20% de piperidina/NMP (10 ml), se dejó reposar 10 min, se repitió una vez. Se filtró y se lavó con NMP (2x8 ml), DCM (3x8 ml) y NMP (5x8 ml). Una prueba de TNBS positiva proporcionó resinas de color rojo.

Acilación con Fmoc-Glu-OtBu:

5 Se disolvieron 0,86 g (2 eq, 2,0 mmol) de Fmoc-Glu-OtBu en NMP/DCM 1:1 (10 ml). Se añadieron 0,32 g (2,2 eq, 2,4 mmol) de HOBT, seguido de la adición de 0,37 ml (2,2 eq, 2,4 mmol) de DIC. La mezcla de reacción se dejó en reposo durante 20 min y luego se transfirió a la resina y finalmente se añadieron 0,407 ml (2,2 eq) de DIEA. La mezcla se agitó en vórtice durante 16 horas, se filtró y se lavó con NMP (2x8 ml), DCM (3x8 ml) y NMP (5x8 ml). Una prueba de TNBS positiva proporcionó resinas incolores.

10 Se añadió 20% de piperidina/NMP (10 ml), se dejó reposar 10 min, se repitió una vez. Se filtró y se lavó con NMP (2x8 ml), DCM (3x8 ml) y NMP (5x8 ml). Una prueba de TNBS positiva proporcionó resinas de color rojo.

Acilación con éster mono *terc*-butilico de ácido octadecanodioico:

15 Se disolvieron 0,75 g (2 eq, 2,0 mmol) de éster mono *terc*-butilico de ácido octadecanodioico en NMP/DCM 1:1 (10 ml). Se añadieron 0,32 g (2,2 eq, 2,4 mmol) de HOBT seguido de la adición de 0,37 ml (2,2 eq, 2,4 mmol) de DIC. La mezcla de reacción se dejó en reposo durante 20 min y luego se transfirió a la resina y finalmente se añadieron 0,41 ml (2,2 eq) de DIEA. La mezcla se agitó en vórtice durante 16 horas, se filtró y se lavó con NMP (2x8 ml), DCM (3x8 ml) y NMP (5x8 ml).

Escisión con TFA:

20 Se añadieron 8 ml de 5% de TFA/DCM a la resina y la mezcla de reacción se agitó en vórtice durante 2 horas, se filtró y se recogió el material filtrado. Se añadió a la resina 5% de TFA/DCM adicional (8 ml) y la mezcla se agitó en vórtice durante 10 min, se filtró y la resina se lavó con DCM (2x10 ml). Los materiales filtrados y lavados combinados se ajustaron a pH básico, utilizando aproximadamente 800 ul de DIEA. La mezcla se evaporó a vacío, dando un aceite (3,5 g). Se añadió éter dietílico (30 ml) y el aceite no disuelto se separó por decantación y se evaporó a vacío. Esto proporcionó 1,1 g de éster *terc*-butilico de ácido 17-((S)-1-*terc*-butoxi-carbonil-3-[2-(2-[[2-(2-carboximetoxietoxi)etilcarbamoil]metoxi]etoxi)etilcarbamoil]propil-carbamoil]heptadecanoico de *terc*-butilo (nombre alternativo: octadecanodioil-Glu(OEG-OEG-OH)-OtBu de *terc*-butilo) como un aceite.

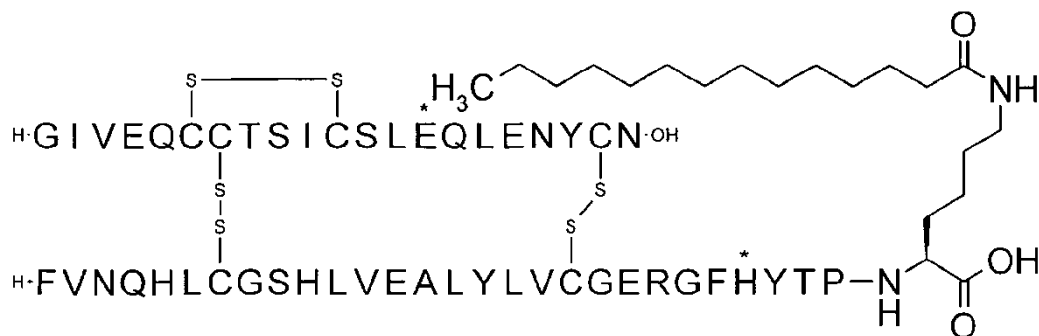
LC-MS (Sciex100 API): m/z = 846,6 (M+1)+.

Activación con OSu:

30 El octadecanodioil-Glu(OEG-OEG-OH)-OtBu de *terc*-butilo (0,63 g) anterior se disolvió en THF (35 ml). Se añadió DIEA (0,255 ml, 2 eq.) seguido de TSTU (0,45 g, 2 eq.), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla se repartió entre acetato de etilo (250 ml) y NaHSO₄ acuoso (3 x 100 ml). La fase orgánica se secó (MgSO₄) y se concentró a vacío para proporcionar 0,65 g de éster *terc*-butilico de ácido 17-((S)-1-*terc*-butoxicarbonil-3-{2-[2-({2-[2-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxycarbonilmetoxi)etoxi]etilcarbamoil]metoxi]etoxi]etilcarbamoil}propilcarbamoil]heptadecanoico (nombre alternativo: octadecanodioil-Glu(OEG-OEG-OSu)-OtBu de *terc*-butilo) como un aceite. LC-MS: m/z = 943,4 (M+1).

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

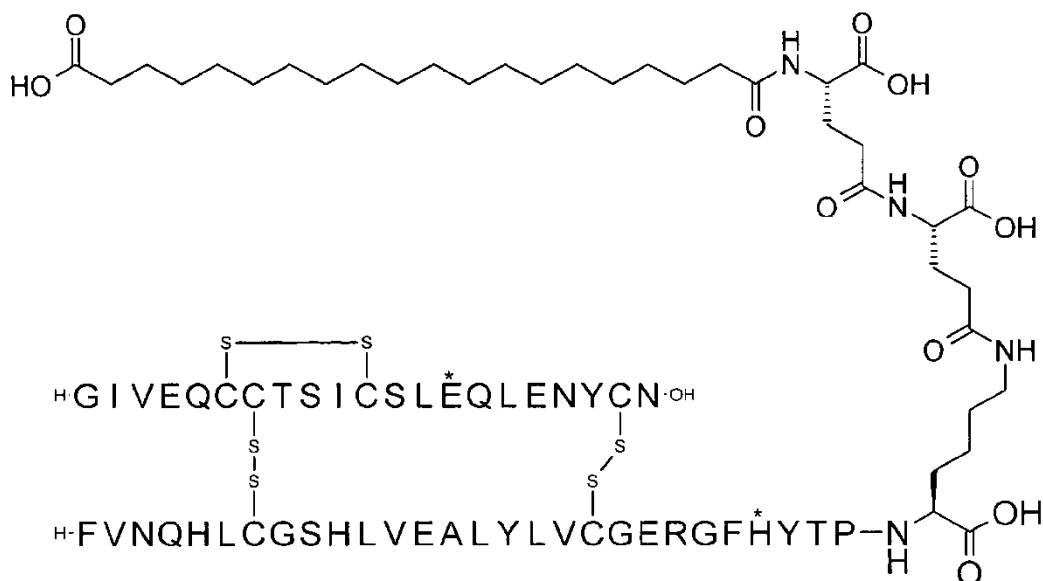
Insulina humana A14E, B25H, B29K(N^εmiristilo), desB30



Esta insulina se preparó de forma similar a como se ha descrito anteriormente, partiendo de 1-tetradecanoil-pirrolidin-2,5-diona.

40 MALDI-TOF MS: m/z = 5873,6. Calculado: 5872,9.

Ejemplo 11, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B25H, B29K(N^eEicosanodioil-γGlu-γGlu), desB30

Esta insulina se preparó de forma similar a como se ha descrito anteriormente, a partir de éster 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-ílico) de éster 5-*tert*-butílico de ácido (S)-2-[4-*tert*-butoxicarbonil-4-(19-*tert*-butoxicarbonilnonadecanoilamino)butirilamino]pentanodioico.

MALDI-TOF MS: m/z = 6242,5. Calculado: 6245,2.

Preparación de éster 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-ílico) de éster 5-*tert*-butílico de ácido (S)-2-[4-*tert*-butoxicarbonil-4-(19-*tert*-butoxicarbonilnonadecanoilamino)butirilamino]pentanodioico.

1. Éster 1-*tert*-butílico de ácido (S)-2-[4-*tert*-butoxicarbonil-4-(19-*tert*-butoxicarbonilnonadecanoilamino)butirilamino]pentanodioico

A una solución de éster 5-(2,5-dioxopirrolidin-1-ílico) de éster 1-*tert*-butílico de ácido (S)-2-(19-*tert*-butoxicarbonilnonadecanoilamino)pentanodioico (preparado de forma similar a como se describe en el documento WO 2005/012347) (4,1 g) en THF (100 ml), se añadió una solución de H-Glu-OtBu (1,47 g) en agua (20 ml). El pH se ajustó a 8 con DIEA. La mezcla se concentró después de agitar durante 1,5 h. El residuo recristalizó en DCM para proporcionar el compuesto del título como un sólido blanco (2,81 g, 61%).

LC-MS: m/z = 769 (M+1).

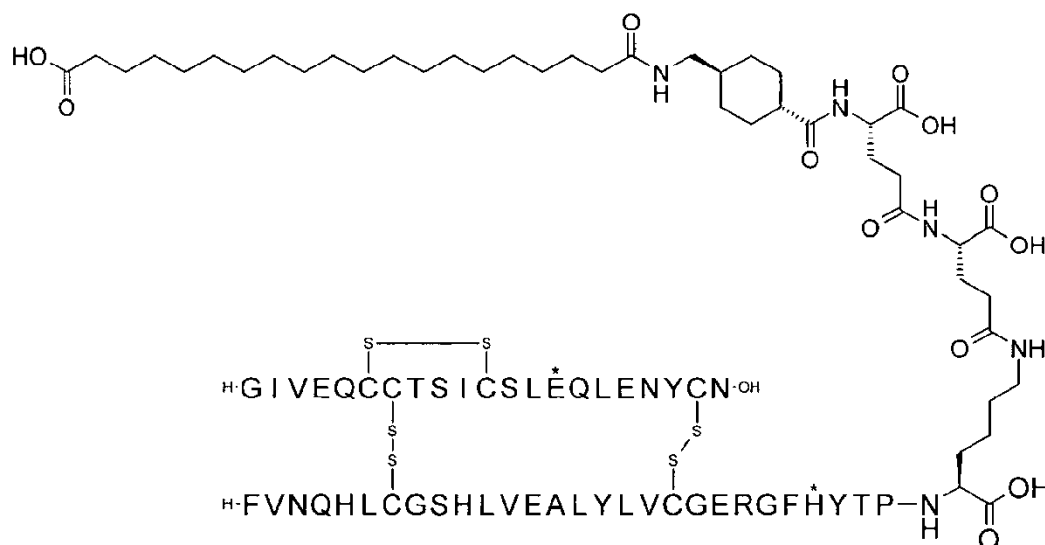
Éster 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-ílico) de éster 5-*tert*-butílico de ácido (S)-2-[4-*tert*-butoxicarbonil-4-(19-*tert*-butoxicarbonilnonadecanoilamino)butirilamino]pentanodioico

A una solución de éster 1-*tert*-butílico de ácido (S)-2-[4-*tert*-butoxicarbonil-4-(19-*tert*-butoxicarbonilnonadecanoilamino)butiril-amino]pentanodioico (2,81 g) en acetonitrilo (80 ml) se añadió una solución de TSTU (1,32 g) en acetonitrilo (20 ml). El pH se ajustó a 8 con DIPEA. Después de agitar durante 1,5 h la mezcla se concentró. El residuo recristalizó en acetonitrilo para proporcionar el compuesto del título (1,7 g, 54%).

LC-MS: m/z = 866,4 (M+1).

Ejemplo 12, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B25H, B29K(N^e 4-[(4-({19-Carboxinonadecanoilamino}metil)*trans*-ciclohexanocarbonil]-γGlu-γGlu), desB30



Esta insulina se preparó de forma similar a como se ha descrito anteriormente, a partir de éster 5-(2,5-dioxopirrolidin-1-ílico) de éster 1-*tert*-butílico de ácido 2-[4-*tert*-butoxicarbonil-4-({4-[(19-*tert*-butoxicarbonilnonadecanoilamino)metil]ciclohexanocarbonil}amino)butirilamino]pentanodioico.

5 LC-MS (electropulverización): m/z: 6386 (M+1). Calc.: 6384.

Preparación de éster 5-(2,5-dioxopirrolidin-1-ílico) de éster 1-*tert*-butílico de ácido 2-[4-*tert*-butoxicarbonil-4-({4-[(19-*tert*-butoxicarbonilnonadecanoilamino)metil]ciclohexanocarbonil}amino)butirilamino]pentanodioico.

10 1. Éster 1-*tert*-butílico de ácido 2-[4-*tert*-butoxicarbonil-4-({4-[(19-*tert*-butoxicarbonilnonadecanoilamino)metil]ciclohexanocarbonil}amino)butirilamino]pentanodioico

15 A una solución de éster 5-(2,5-dioxopirrolidin-1-ílico) de éster 1-*tert*-butílico de ácido 2-({4-[(19-*tert*-butoxicarbonilnonadecanoilamino)metil]ciclohexanocarbonil}amino)pentanodioico (5,0 g) en THF (100 ml) se añadió una solución de H-Glu-OtBu (1,36 g) en agua (25 ml). Después de agitar durante una noche, la mezcla se concentró a vacío. El residuo precipitó en agua y se separó por filtración y se secó *a vacío* para proporcionar el compuesto del título (4,63 g, 84%).

LC-MS: m/z = 740 (M-3x56, pérdida de 3xt-Bu).

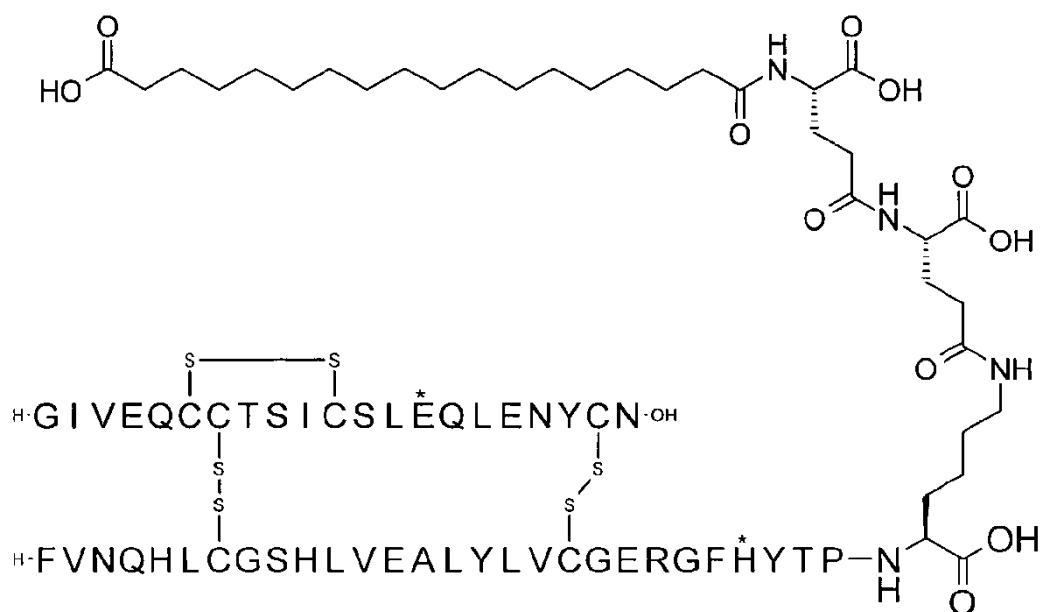
Éster 5-(2,5-dioxopirrolidin-1-ílico) de éster 1-*tert*-butílico de ácido 2-[4-*tert*-butoxicarbonil-4-({4-[(19-*tert*-butoxicarbonilnonadecanoilamino)metil]ciclohexano-carbonil}amino)butirilamino]pentanodioico

20 A una solución de éster 1-*tert*-butílico de ácido 2-[4-*tert*-butoxicarbonil-4-({4-[(19-*tert*-butoxicarbonilnonadecanoilamino)metil]-ciclohexanocarbonil}amino)butirilamino]pentanodioico (4,6 g) en THF (150 ml), se añadió TSTU (1,68 g). Se añadió DIPEA (0,97 ml). Después de agitar durante una noche, la mezcla se concentró a vacío. El residuo cristalizó en acetonitrilo para proporcionar el compuesto del título como un sólido (4,4 g, 87%).

LC-MS: m/z = 837 (M-3x56, pérdida de 3xt-Bu).

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

Insulina humana A14E, B25H, B29K(N^oOctadecanodioil-γGlu-γGlu), desB30

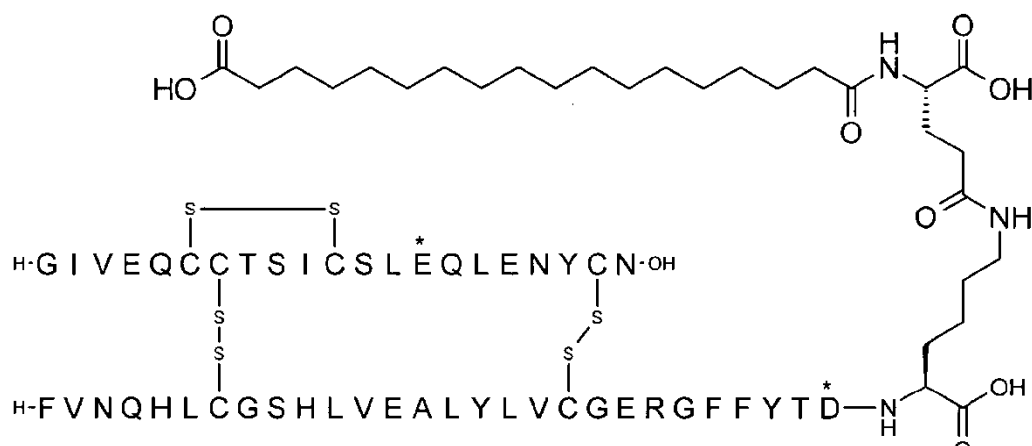


El efecto oral de este compuesto sobre ratas Wistar macho en ayunas durante una noche, se proporciona en la Fig. 7 más abajo.

LC-MS: $m/z = 1555 (M+4)/4$.

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

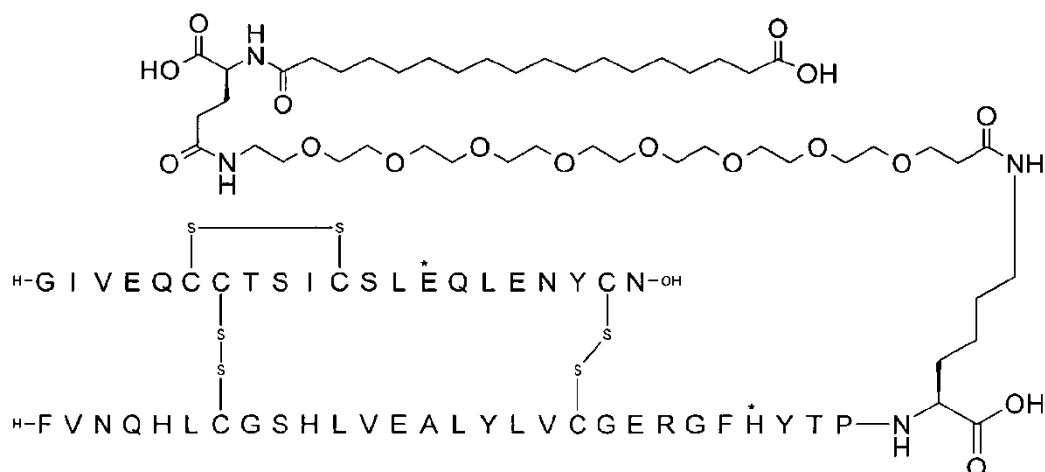
Insulina humana A14E, B28D, B29K(N^ooctadecanodioil-γGlu), desB30



MALDI-TOF MS: $m/z = 6118$

Ejemplo 15, Procedimiento general (A):

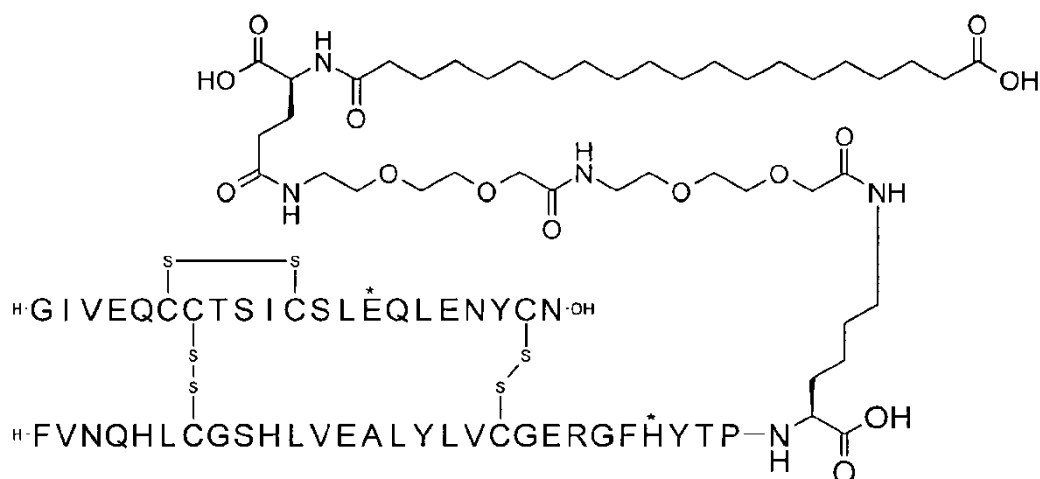
10 Insulina humana A14E, B25H, B29K(N^ooctadecanodioil-γGlu-PEG7), desB30



MALDI-TOF MS: m/z = 6510

Ejemplo 16, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B25H, B29K(N^eeicosanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



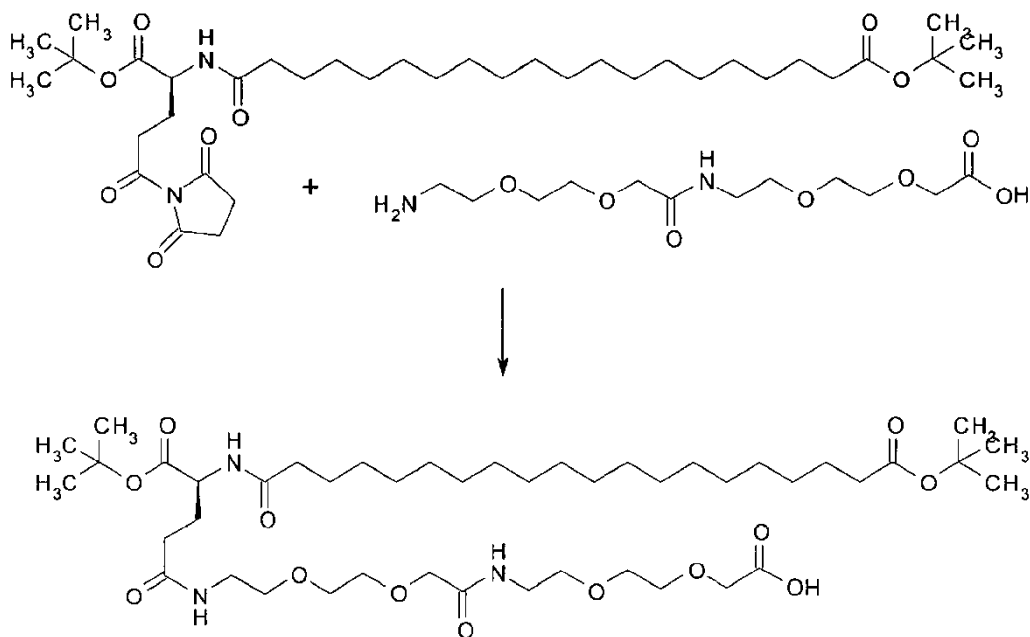
5

El efecto oral de este compuesto sobre ratas Wistar macho en ayunas durante una noche se proporciona en la Fig. 3 más abajo

MALDI-TOF MS: m/z = 6407

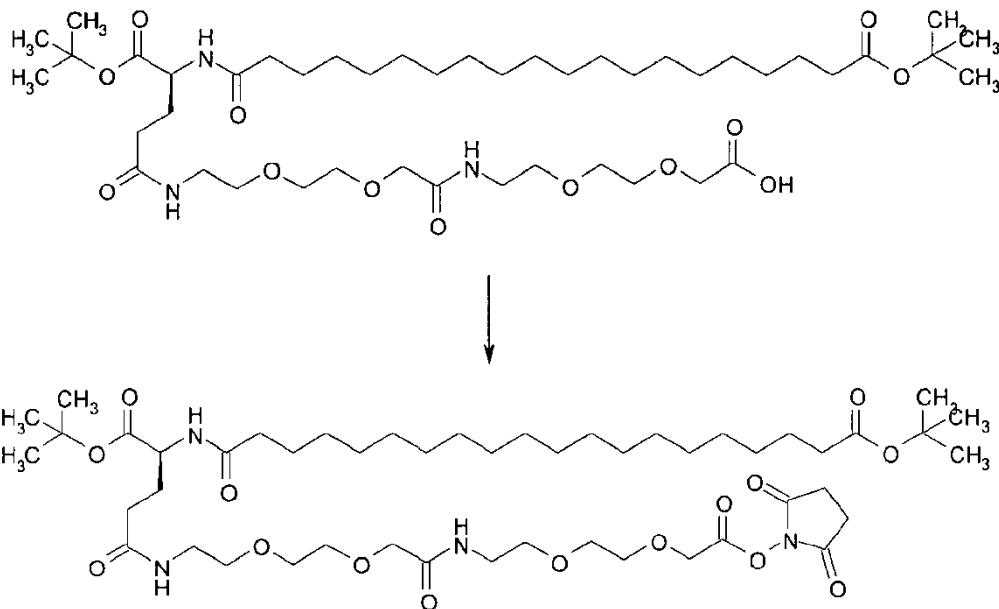
El reactivo de acilación intermedio para este ejemplo se preparó como se describe a continuación:

- 10 Etapa 1: éster *tert*-butilico de ácido 19-((S)-1-*tert*-butoxicarbonil-3-[2-(2-[[2-(2-carboximetoxi-etoxi)etilcarbamoil]metoxi]etoxi)etilcarbamoil]propilcarbamoil]-nonadecanoico



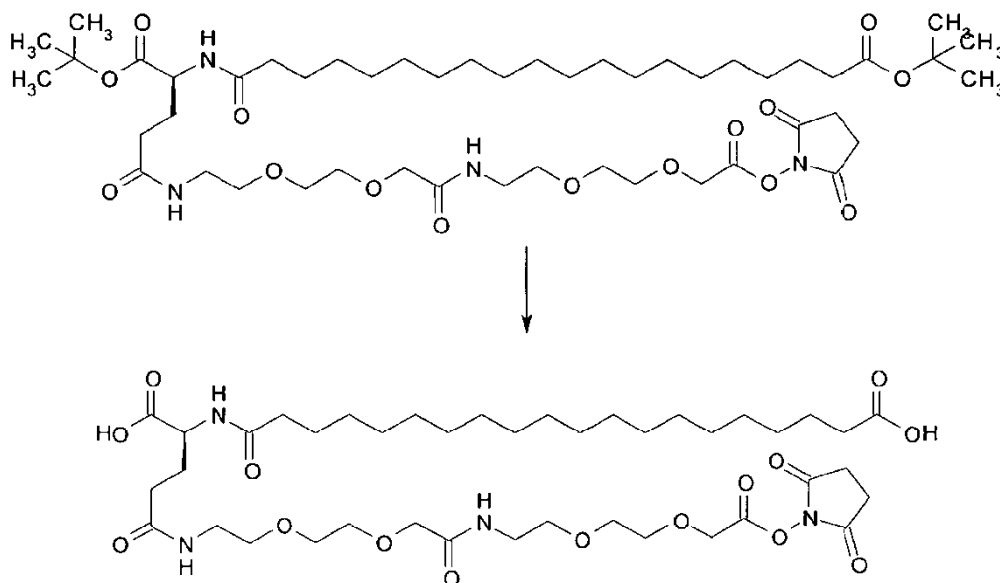
5

10



15

Etapa 3: ácido 19-((S)-1-carboxi-3-{2-[2-({2-[2-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxicarbonilmetoxi)etoxi]etil-carbamoi}metoxi)etoxi]etilcarbamoi}propilcarbamoi)nonadecanoico:

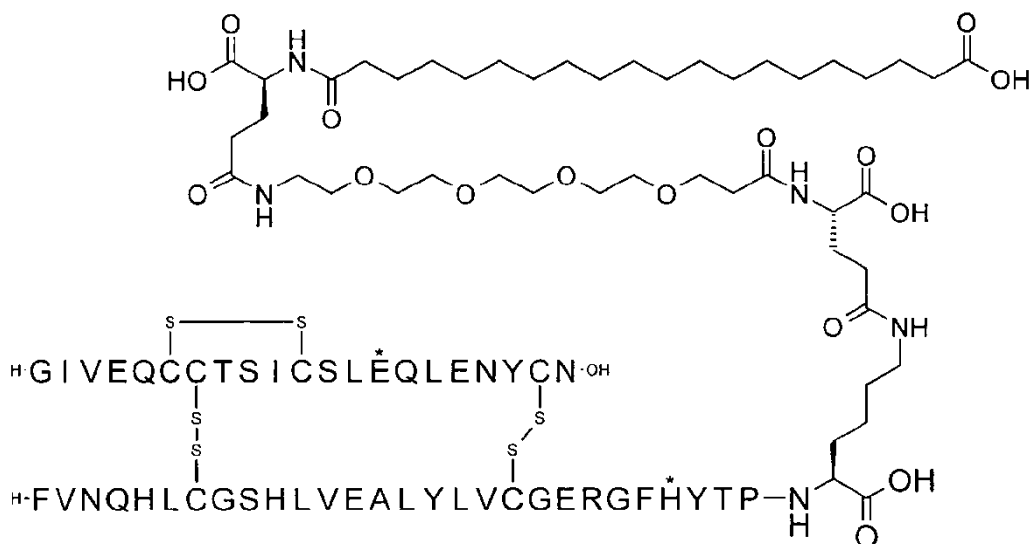


5 El éster *terc*-butilico de ácido 19-((S)-1-*terc*-butoxicarbonil-3-{2-[2-({2-[2-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxicarbonilmetoxi)etoxi]etil-carbamoi}metoxi)etoxi]etilcarbamoi}propilcarbamoi)nonadecanoico (3,4 g) se agitó en TFA (75 ml) durante 45 min y después se concentró *a vacío*. El residuo se concentró con tolueno 3 veces para proporcionar un sólido. El residuo cristalizó en 2-propanol y se filtró para proporcionar un compuesto cristalino blanco. Rendimiento 80% (2,4 g). LC-MS (electropulverización): m/z: 859,44.

10 El reactivo de acilación similar con el fragmento de ácido octadecanodioico (por ejemplo, utilizado en el ejemplo 26 y otros ejemplos) se puede preparar de manera similar.

Ejemplo 17, Procedimiento general (A):

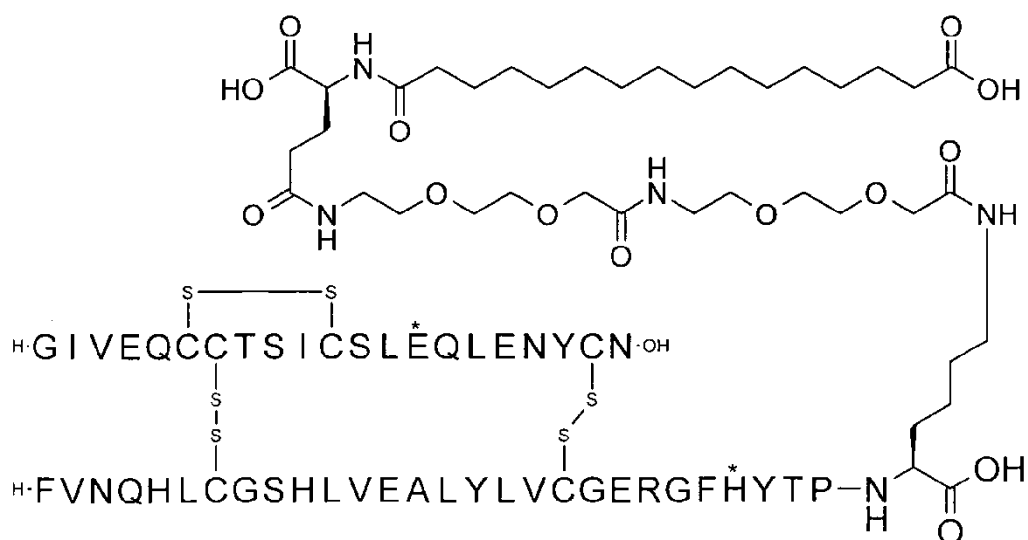
Insulina humana A14E, B25H, B29K(N^eeicosanodioil-γGlu-(3-(2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi)etoxi)propionil-γGlu), desB30



15 ES-MS: m/z 1626 (M+4)

Ejemplo 18, Procedimiento general (A):

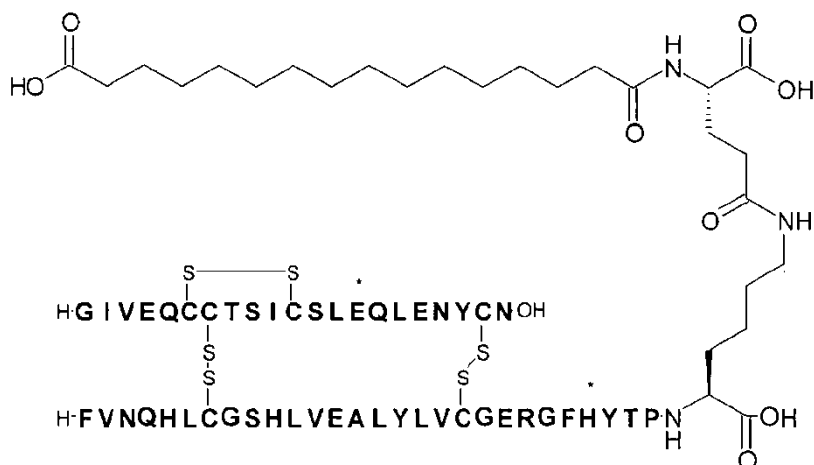
Insulina humana A14E, B25H, B29K(N^eHexadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



MALDI-TOF MS: $m/z = 6348$

Ejemplo 19, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B25H, B29K(N⁶Hexadecanodioil-γGlu), desB30

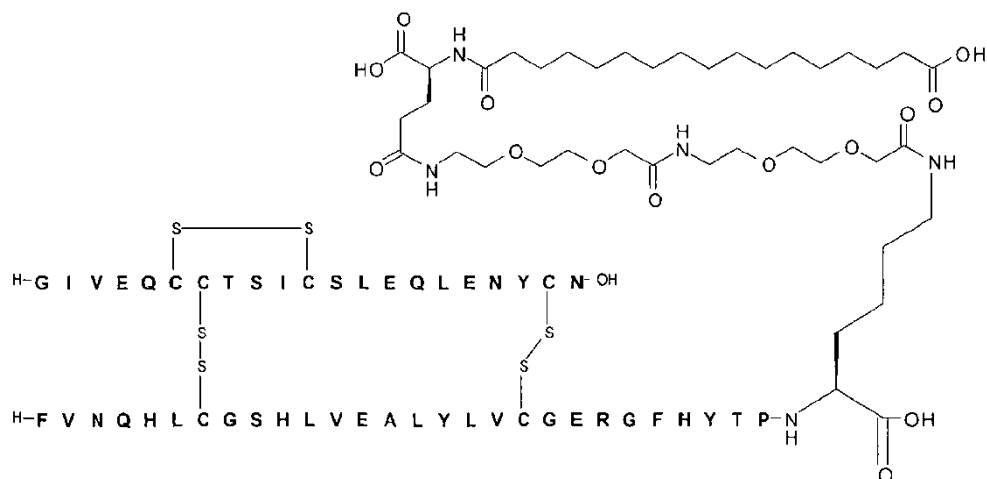


5

MALDI-TOF MS: $m/z = 6062$

Ejemplo 20, Procedimiento general (A):

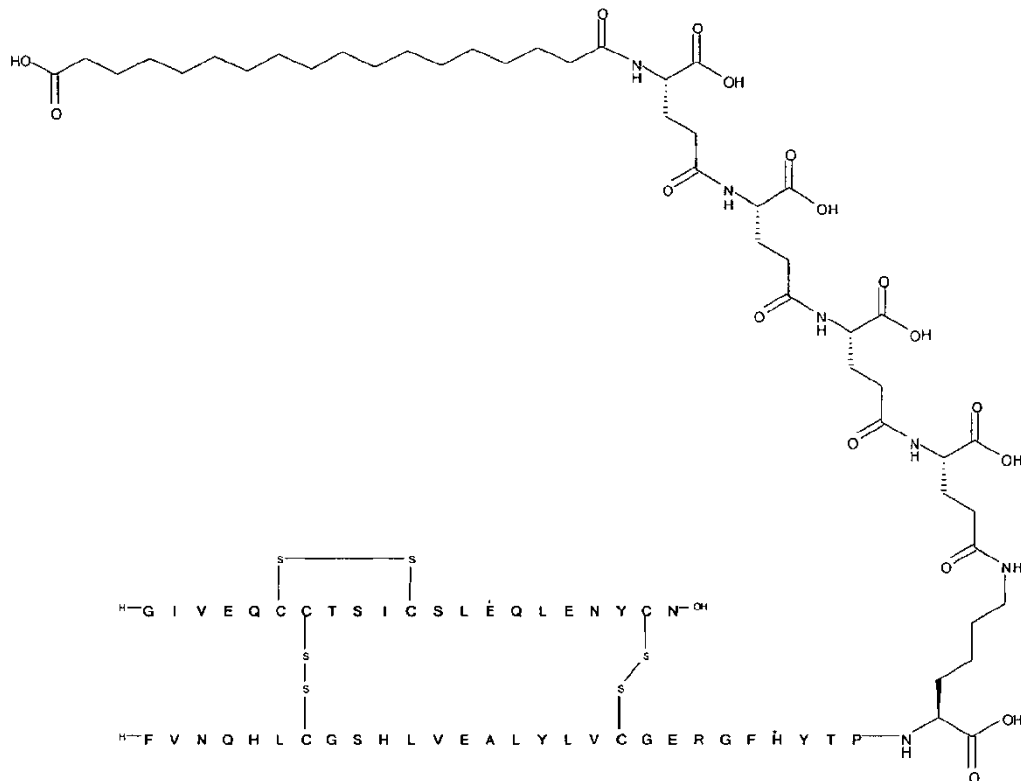
Insulina humana A14E, B25H, B29K(N⁶heptadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



ES-MS: m/z 1592 (M+4)

Ejemplo 21, Procedimiento general (A):

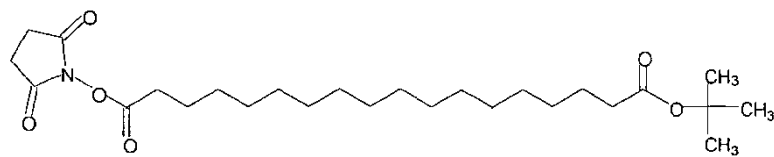
Insulina humana A14E, B25H, B29K(N^εoctadecanodioil-γGlu-γGlu-γGlu-γGlu), desB30



5 ES-MS: m/z 1620 (M+4)

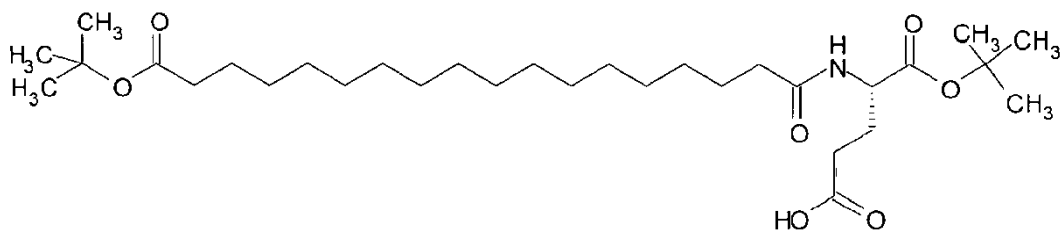
El reactivo de acilación intermedio octadecanodioil-γGlu-γGlu-γGlu-γGlu-OSu (con ésteres de *tert*-butilo como grupos protectores sobre los ácidos carboxílicos restante) se preparó como se describe a continuación:

Éster 2,5-dioxopirrolidin-1-ílico de éster *tert*-butilico de ácido octadecanodioico



- 10 El éster mono-*tert*-butilico de ácido octadecanodioico (4,2 g, 0,011 mol) se disolvió en THF (20 ml), se añadió TSTU (4 g, 0,013 mol) en acetonitrilo (20 ml) y el pH de la solución se ajustó a 8 con la adición gota a gota de DIPEA. La mezcla se agitó a TA durante 4 h, después se acidificó con HCl (2 M) a pH 3 y se evaporó *a vacío*. El aceite residual se repartió posteriormente entre acetato de etilo y HCl (0,1 M). La capa orgánica se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó hasta sequedad *a vacío*. Esto produjo 5,2 g de éster 2,5-dioxopirrolidin-1-ílico de éster *tert*-butilico de ácido octadecanodioico como un aceite, que se podía utilizar en la próxima etapa sin una purificación adicional. LC-MS (electropulverización): m/z = 468 (M+1) y 412 (M+1 - ^tBu).
- 15

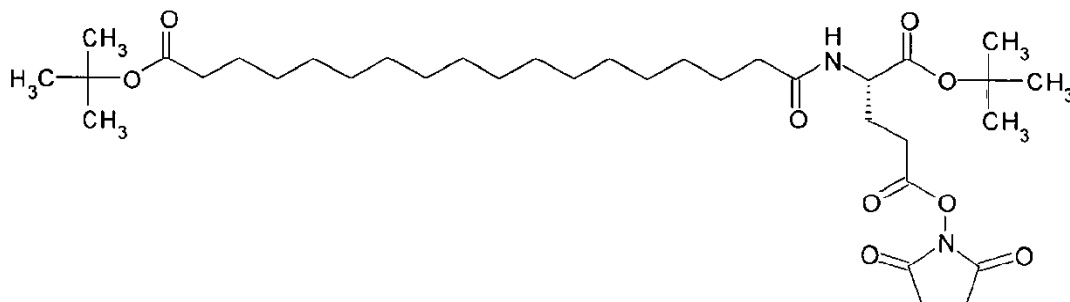
Éster 1-*tert*-butilico de ácido (S)-2-(17-*tert*-butoxarbonilheptadecanoilamino)-pentanodioico.



El éster 2,5-dioxopirrolidin-1-ílico de éster *tert*-butilico de ácido octadecanodioico (7 g, 0,015 mol) se disolvió en THF (80 ml) y se añadió a una solución de H-Glu-O^tBu (3,7 g, 0,0165 mol) en Na₂CO₃ (0,1 M, 40 ml). La mezcla se agitó a TA durante una noche, después se acidificó con HCl (2 M) a pH 3 y se evaporó a vacío. El residuo se repartió entre acetato de etilo y HCl (0,1 M). La capa orgánica se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó hasta sequedad a vacío. La adición de acetonitrilo (30 ml) causó la formación de un precipitado blanco, que se aisló por filtración y se secó para proporcionar 3,75 g de éster 1-*tert*-butilico de ácido (S)-2-(17-*tert*-butoxycarbonilheptadecanoilamino)pentanodioico. LC-MS (electropulverización): M/z = 556 (M+1).

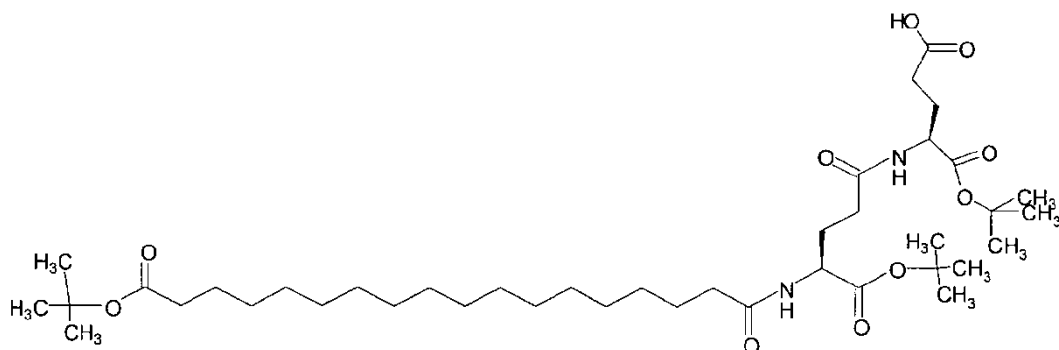
Después de la evaporación del material filtrado de acetonitrilo, se aislaron 2,6 g de producto adicionales.

Éster 5-(2,5-dioxopirrolidin-1-ílico) de éster 1-*tert*-butilico de ácido (S)-2-(17-*tert*-butoxycarbonilheptadecanoilamino)pentanodioico



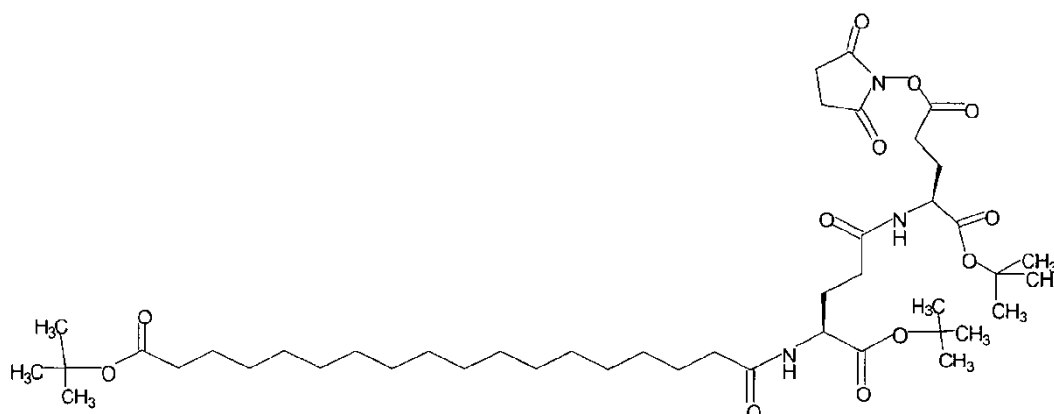
El éster 1-*tert*-butilico de ácido (S)-2-(17-*tert*-butoxycarbonilheptadecanoilamino)pentanodioico (3 g, 0,005 mol) se disolvió en THF (100 ml) y se añadió a una solución de TSTU (1,78 g, 0,006 mol) en acetonitrilo (30 ml). El pH se ajustó a 8 mediante la adición gota a gota de DIPEA. La mezcla se agitó a TA durante 1 h, después se acidificó con HCl (2 M) a pH 3 y se evaporó a vacío. El aceite residual se repartió posteriormente entre acetato de etilo y HCl (0,1 M). La capa orgánica se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó a vacío hasta sequedad. Esto proporcionó un sólido blanco (2,75 g) de éster 5-(2,5-dioxopirrolidin-1-ílico) de éster 1-*tert*-butilico de ácido (S)-2-(17-*tert*-butoxycarbonilheptadecanoilamino)pentanodioico. LCMS (electropulverización): m/z = 653 (M+1).

Éster 1-*tert*-butilico de ácido (S)-2-[(S)-4-*tert*-butoxycarbonil-4-(17-*tert*-butoxycarbonilheptadecanoilamino)butirilamino]-pentanodioico



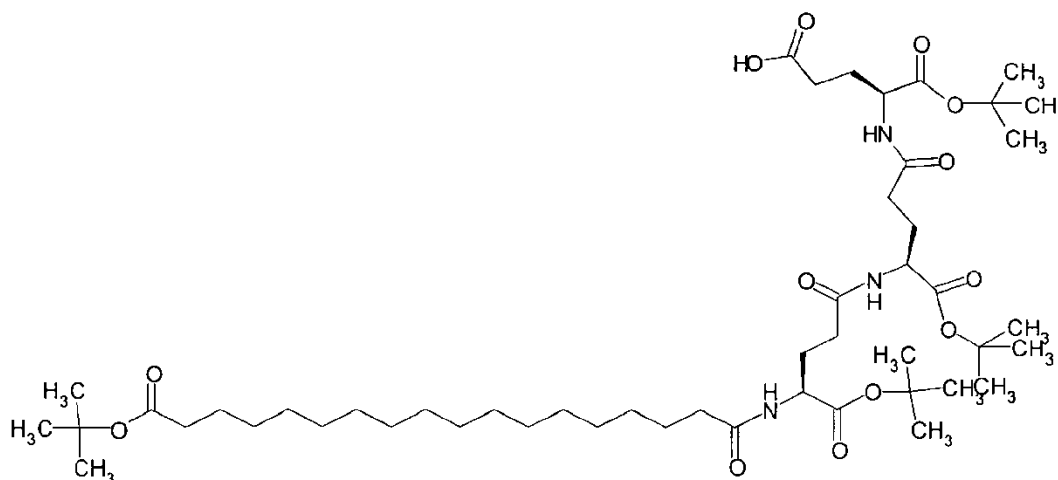
El éster 5-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-ílico) de éster 1-*tert*-butilico de ácido (S)-2-(17-*tert*-butoxycarbonilheptadecanoilamino)pentanodioico (0,5 g, 0,766 mmol) se disolvió en acetonitrilo (20 ml). Esta solución se añadió a una solución de H-Glu-O^tBu (0,171 g, 0,84 mmol) en agua (30 ml). El pH se ajustó a 10 con DIPEA. La mezcla se agitó a TA durante 15 min, después se acidificó a pH 7 con HCl (2 M) y se evaporó a vacío. El residuo se repartió entre acetato de etilo y HCl (0,1 M). La capa orgánica se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó a vacío hasta sequedad. Esto proporcionó éster 1-*tert*-butilico de ácido (S)-2-[(S)-4-*tert*-butoxycarbonil-4-(17-*tert*-butoxycarbonilheptadecanoilamino)butirilamino]pentanodioico como un aceite. LC-MS (electropulverización): m/z = 741 (M+1).

Éster 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-ílico) de éster 5-*tert*-butilico de ácido (S)-2-[(S)-4-*tert*-butoxycarbonil-4-(17-*tert*-butoxycarbonilheptadecanoilamino)butirilamino]pentanodioico



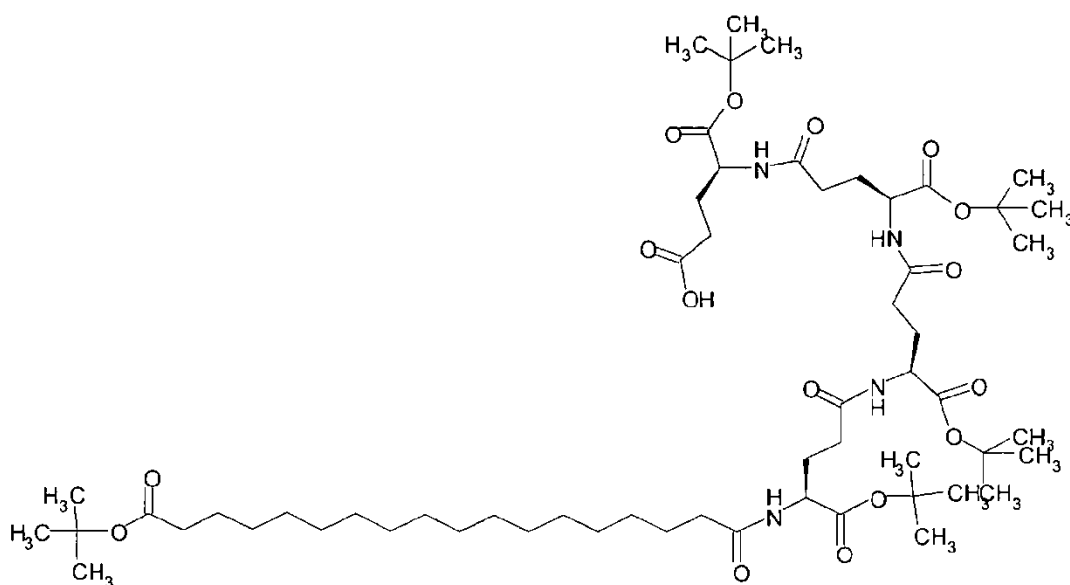
El éster 1-*tert*-butílico de ácido (S)-2-[(S)-4-*tert*-butoxicarbonil-4-(17-*tert*-butoxicarbonilheptadecanoilamino)butirilamino]pentanodioico (8 g, 10,79 mmol) se disolvió en acetonitrilo (40 ml) y se añadió una solución de TSTU (3,89 g, 12,95 mmol) en acetonitrilo (40 ml). El pH se ajustó a 8 mediante la adición gota a gota de DIPEA. La mezcla se agitó a TA durante 1 h, después se acidificó con HCl (2 M) a pH 3 y se evaporó a vacío. Esto proporcionó un aceite, que se repartió posteriormente entre acetato de etilo y HCl (0,1 M). La capa orgánica se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó a sequedad *a vacío*. Esto proporcionó 8,2 g de éster 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-ílico) de éster 5-*tert*-butílico de ácido (S)-2-[(S)-4-*tert*-butoxicarbonil-4-(17-*tert*-butoxicarbonilheptadecanoilamino)butirilamino]pentanodioico como un sólido.

Éster 1-*tert*-butílico de ácido (S)-2-[(S)-4-*tert*-butoxicarbonil-4-[(S)-4-*tert*-butoxicarbonil-4-(17-*tert*-butoxicarbonil-heptadecanoilamino)butirilamino]butirilamino]pentanodioico



Éster 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-ílico) de éster 5-*tert*-butílico de ácido (S)-2-[(S)-4-*tert*-butoxicarbonil-4-(17-*tert*-butoxicarbonilheptadecanoilamino)butirilamino]pentanodioico (4 g, 4,77 mmol) se disolvió en acetonitrilo (30 ml) y se añadió a una solución de H-Glu-OtBu (1,07 g, 5,25 mmol) en Na₂CO₃ (0,1 M, 20 ml). La mezcla se agitó a TA durante 1 h, después se neutralizó con HCl (2 M) a pH 7 y se evaporó *a vacío*. El aceite residual se repartió posteriormente entre acetato de etilo y HCl (0,1 M). La capa orgánica se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó hasta sequedad *a vacío*. El residuo (4 g) se disolvió en acetonitrilo y se trató con carbón activo. Después de la filtración y la evaporación a sequedad, seguidas de secado durante una noche *a vacío*, se obtuvieron 2,8 g de éster 1-*tert*-butílico de ácido (S)-2-[(S)-4-*tert*-butoxicarbonil-4-[(S)-4-*tert*-butoxicarbonil-4-(17-*tert*-butoxicarbonilheptadecanoilamino)butirilamino]butirilamino]pentanodioico como un sólido cristalino. LC-MS (electropulverización): m/z = 927 (M+1).

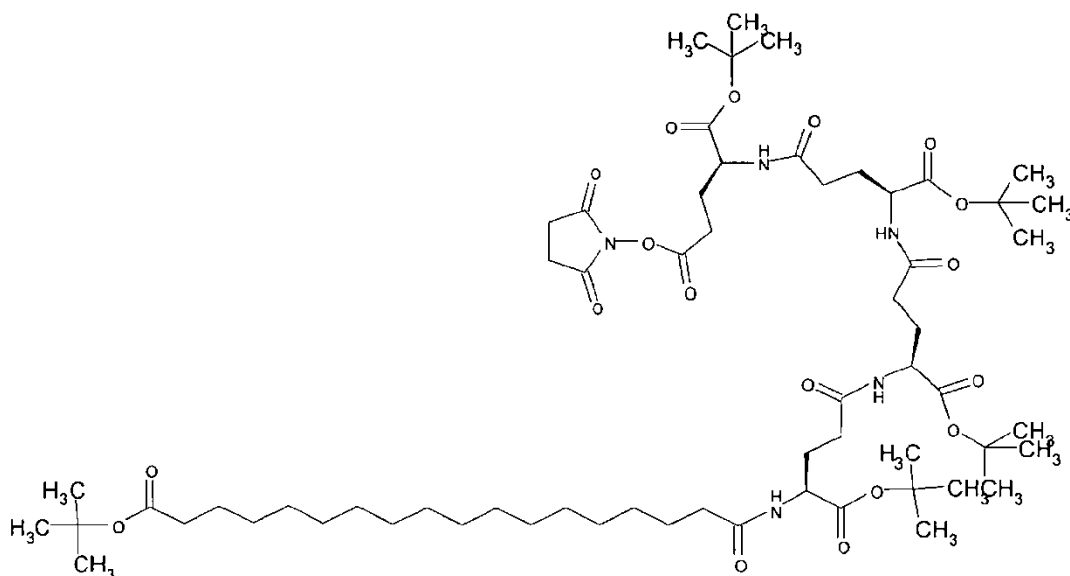
Éster 1-*tert*-butílico de ácido (S)-2-[(S)-4-*tert*-butoxicarbonil-4-[(S)-4-*tert*-butoxicarbonil-4-[(S)-4-*tert*-butoxicarbonil-4-(17-*tert*-butoxicarbonilheptadecanoilamino)butirilamino]butirilamino]butirilamino]pentanodioico



El éster 1-*tert*-butílico de ácido (S)-2-((S)-4-*tert*-butoxicarbonil-4-[(S)-4-*tert*-butoxicarbonil-4-(17-*tert*-butoxicarbonilheptadecanoilamino)butirilamino]butirilamino}pentanodioico (2,8 g, 3,02 mmol) se activó con TSTU (1,0 g, 3,325 mmol) usando el mismo método que se ha descrito anteriormente, proporcionando éster 5-(2,5-dioxopirrolidin-1-ílico) de éster 1-*tert*-butílico de ácido (S)-2-((S)-4-*tert*-butoxicarbonil-4-[(S)-4-*tert*-butoxicarbonil-4-(17-*tert*-butoxicarbonilheptadecanoilamino)butirilamino]butirilamino}pentanodioico crudo. LC-MS (electropulverización): $m/z = 1024$ (M+1).

Se disolvieron 1,3 g de este compuesto en acetonitrilo (40 ml) y se añadieron a una solución de H-Glu-O^tBu (0,28 g, 1,39 mmol) en agua (30 ml), se ajustó el pH a 9,3 con DIPEA. La mezcla se agitó a TA durante 2 h, después se neutralizó a pH 7 con HCl (2 M) y después se evaporó a vacío hasta casi sequedad. El residuo se trató con agua dando un precipitado blanco, que se separó por filtración. Después de secar a vacío durante una noche, se aislaron 1,1 g de éster 1-*tert*-butílico de ácido (S)-2-((S)-4-*tert*-butoxicarbonil-4-[(S)-4-*tert*-butoxicarbonil-4-(17-*tert*-butoxicarbonilheptadecanoilamino)butirilamino]butirilamino}butirilamino)pentanodioico, que contenía pequeñas cantidades de material de partida. LC-MS (electropulverización): $m/z = 1111,9$ (M+1).

Éster 5-(2,5-dioxopirrolidin-1-ílico) de éster 1-*tert*-butílico de ácido (S)-2-((S)-4-*tert*-butoxicarbonil-4-[(S)-4-*tert*-butoxicarbonil-4-(17-*tert*-butoxicarbonilheptadecanoilamino)butirilamino]butirilamino}butirilamino)-

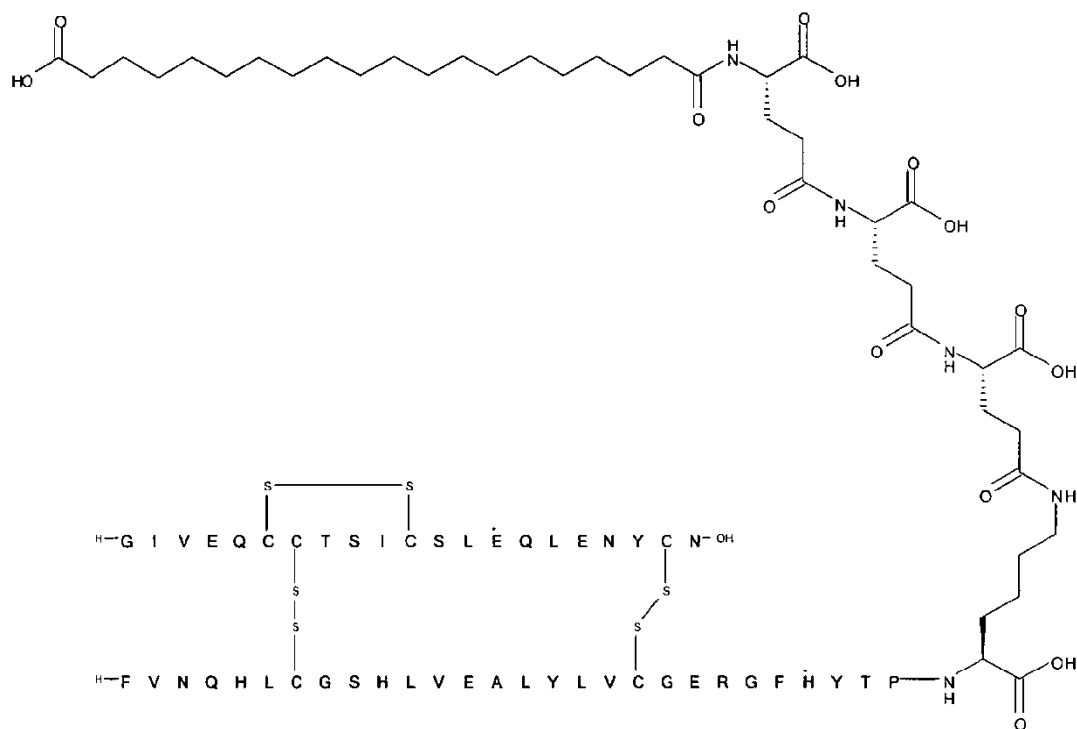


El éster 1-*tert*-butílico de ácido (S)-2-((S)-4-*tert*-butoxicarbonil-4-[(S)-4-*tert*-butoxicarbonil-4-(17-*tert*-butoxicarbonilheptadecanoilamino)butirilamino]butirilamino}butirilamino)pentanodioico (0,1 g, 0,09 mmol) se activó con TSTU (29,8 mg, 0,099 mmol) en solución de acetonitrilo, a temperatura ambiente durante 1 h, usando el mismo método para la activación y el tratamiento que el descrito anteriormente. Esto proporcionó

100 mg de producto crudo activado que se podía utilizar como tal para la acilación de la insulina sin una purificación adicional. LC-MS (electropulverización): $m/z = 1208$ ($M+1$).

Ejemplo 22, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B25H, B29K(*N*⁶Eicosanodioil- γ Glu- γ Glu- γ Glu), desB30

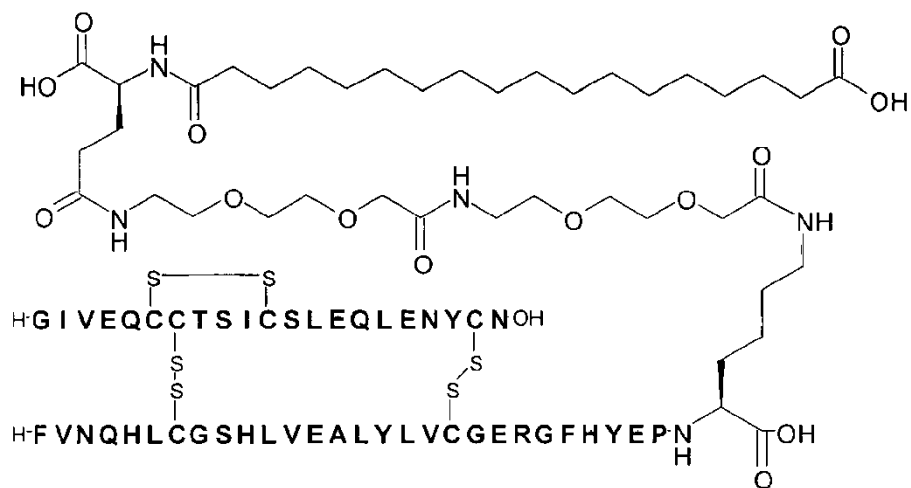


5

MALDI-TOF MS: $m/z = 6373$

Ejemplo 23, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B25H, B27E, B29K(*N*⁶Octadecanodioil- γ Glu-OEG-OEG), desB30

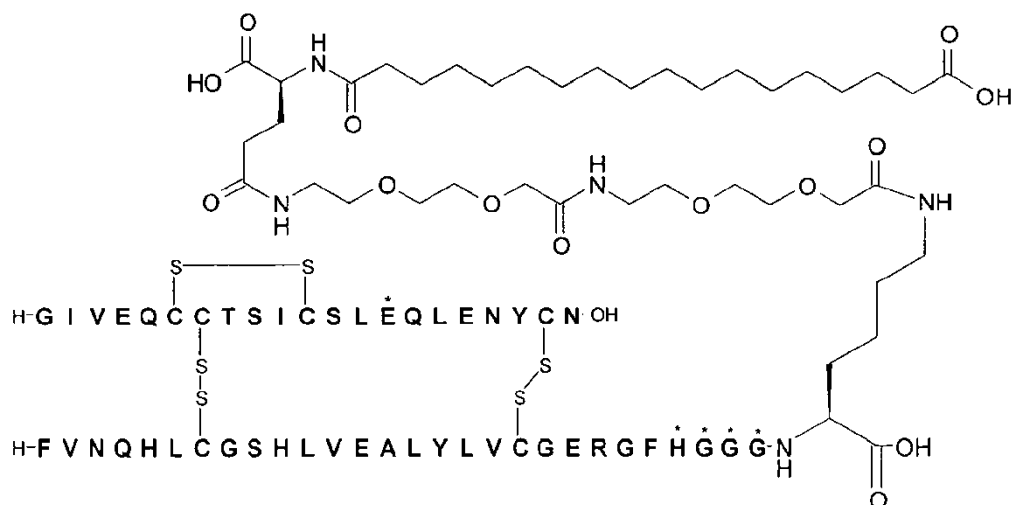


10

MALDI-TOF MS: $m/z = 6407$

Ejemplo 24, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29K(*N*⁶Octadecanodioil- γ -Glu-OEG-OEG), desB30

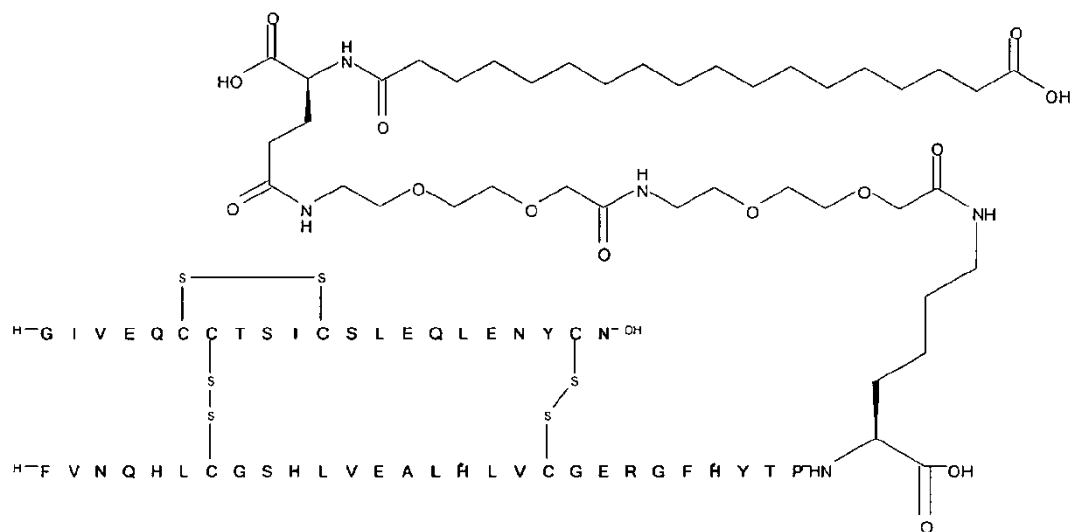


El efecto oral de este compuesto sobre ratas Wistar macho en ayunas durante una noche se proporciona en la Fig. 6 a continuación.

MALDI-TOF MS: $m/z = 6188$

5 **Ejemplo 25, Procedimiento general (A):**

Insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K(AfOctadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30

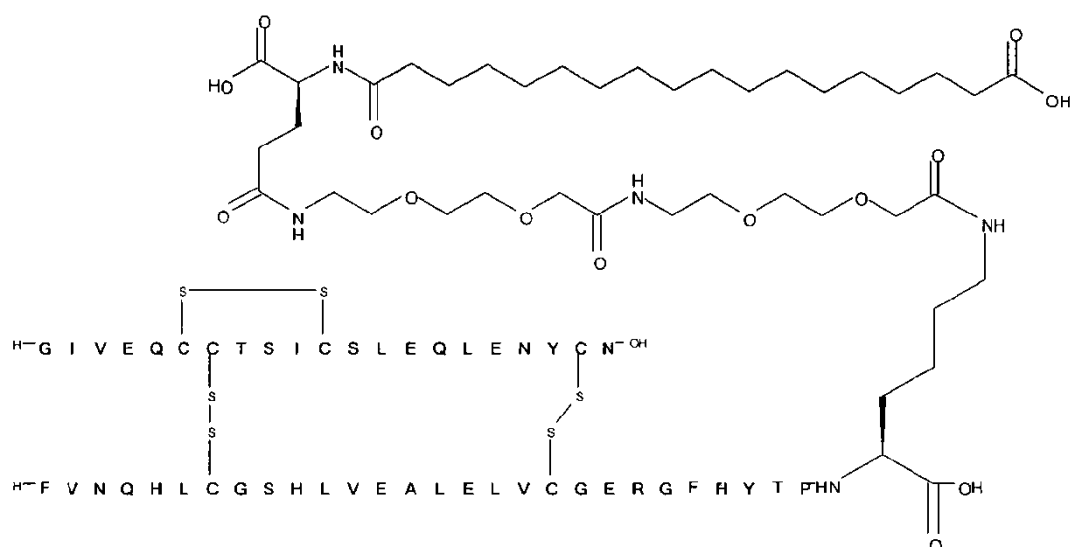


El efecto oral de este compuesto sobre ratas Wistar macho en ayunas durante una noche, se proporciona en la Fig. 4 a continuación.

10 MALDI-TOF MS: $m/z = 6352$

Ejemplo 26, Procedimiento general (A):

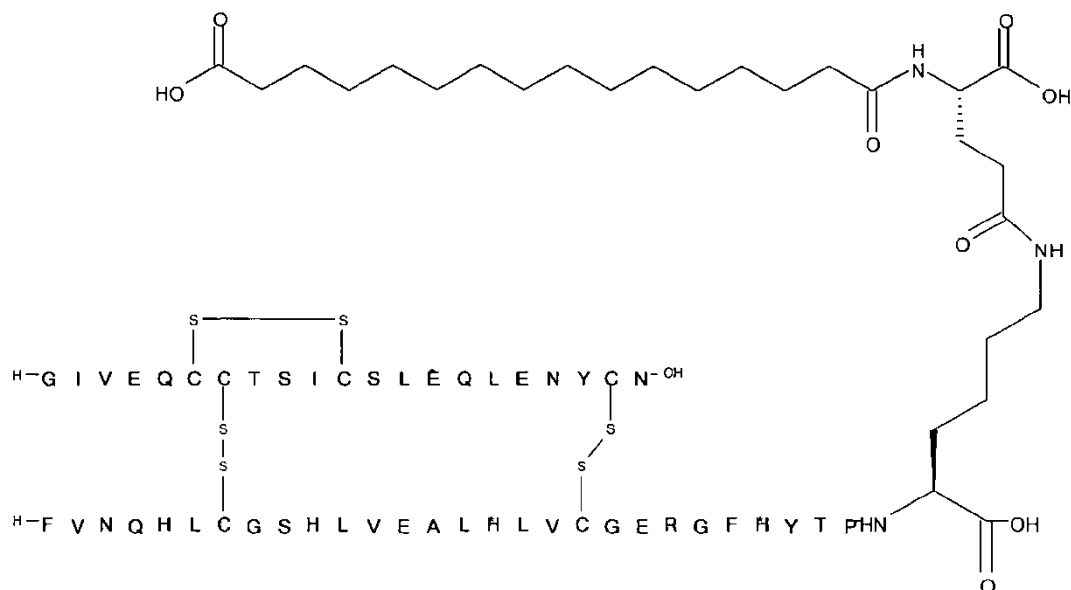
Insulina humana A14E, B16E, B25H, B29K(N⁶Octadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



MALDI-TOF MS: m/z = 6345

Ejemplo 27, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K(N⁶Hexadecanodioil-γGlu), desB30



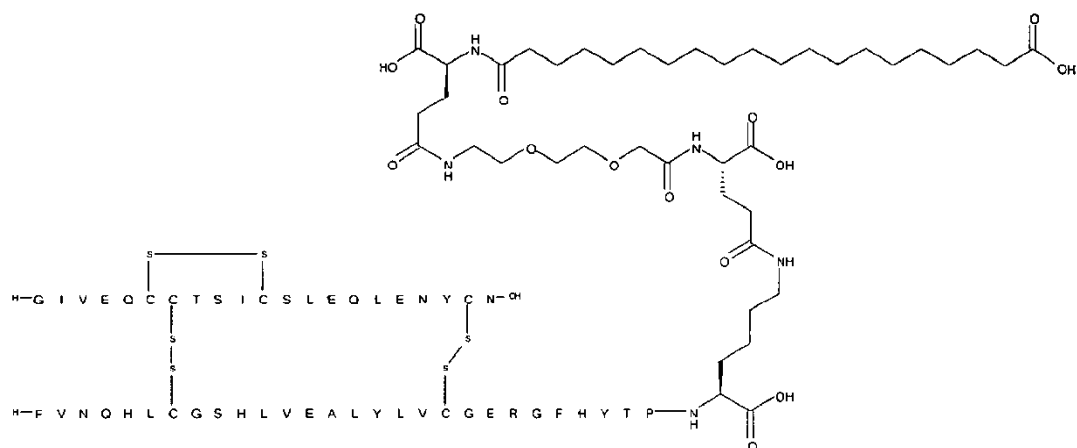
5

El efecto oral de este compuesto sobre ratas Wistar macho en ayunas durante una noche se proporciona en la Fig. 5 a continuación.

MALDI-TOF MS: m/z = 6041

Ejemplo 28, Procedimiento general (A):

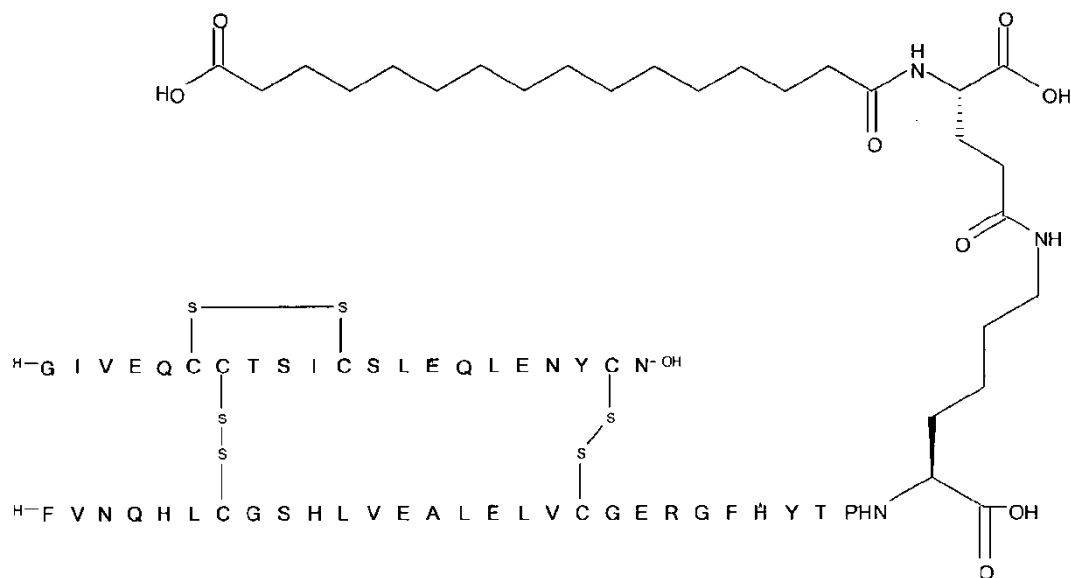
10 Insulina humana A14E, B25H, B29K(N⁶Eicosanodioil-γGlu-OEG-γGlu), desB30



ES-MS: $m/z = 1598$ (M+4)

Ejemplo 29, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B16E, B25H, B29K(N⁶Hexadecanodioil-γGlu), desB30

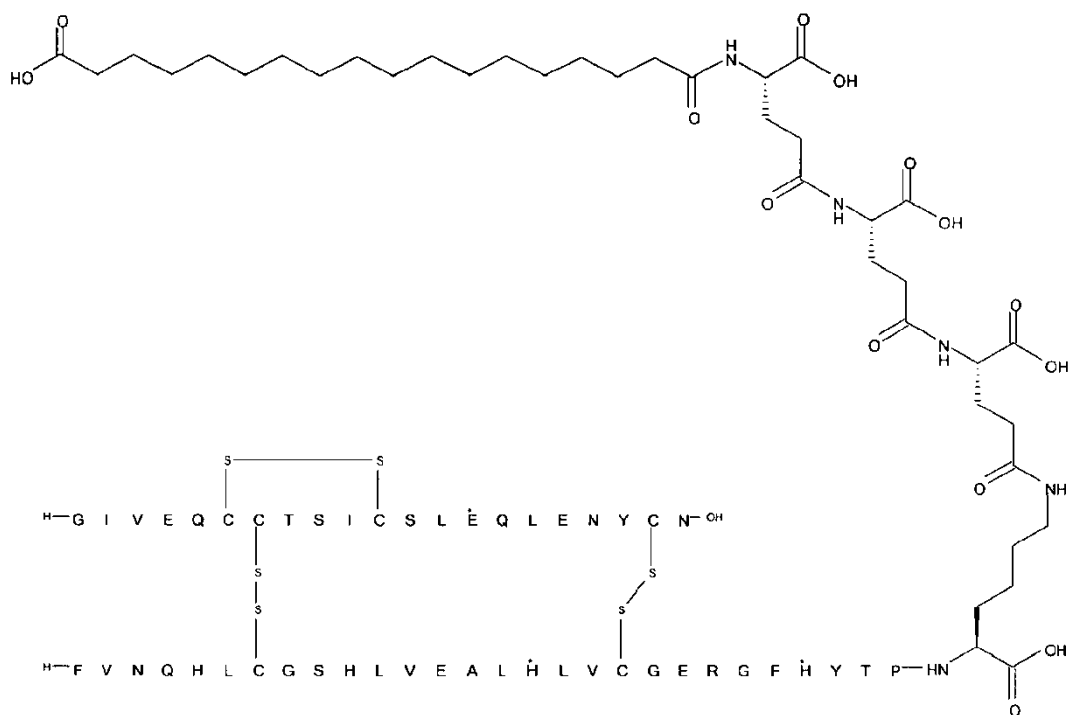


5

MALDI-TOF MS: $m/z = 6028$

Ejemplo 30, Procedimiento general (A):

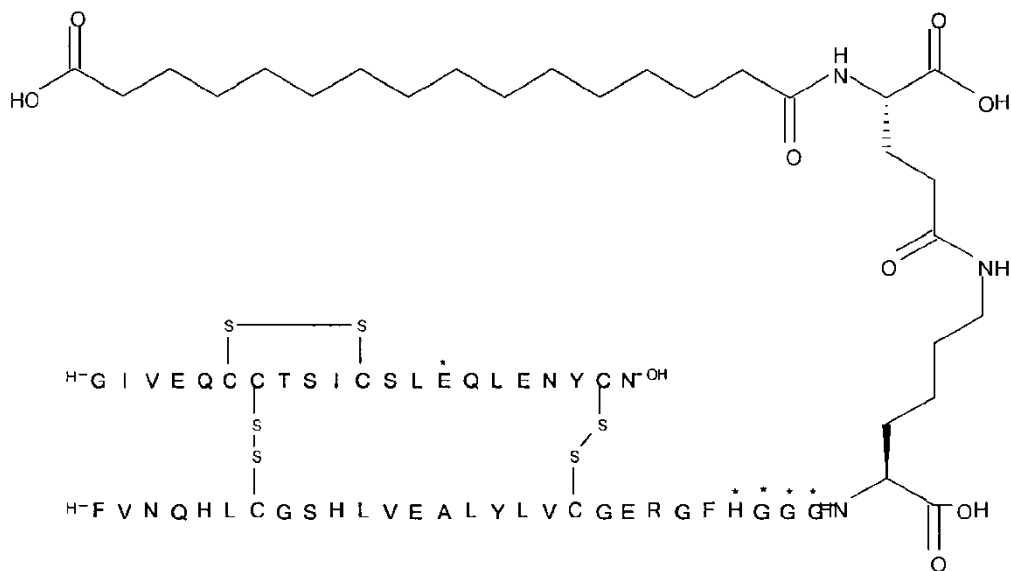
Insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K(N⁶Octadecanodioil-γGlu-γGlu-γGlu), desB30



ES-MS: $m/z = 1581 (M+4)$

Ejemplo 31, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29K(N^6 Hexadecanodioil- γ Glu), desB30

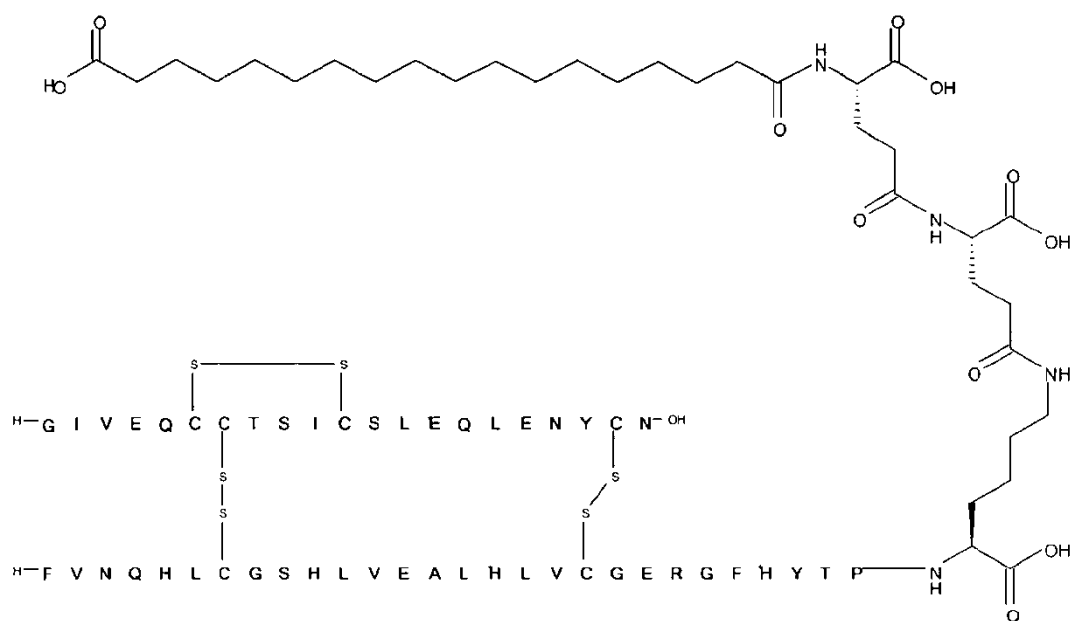


5

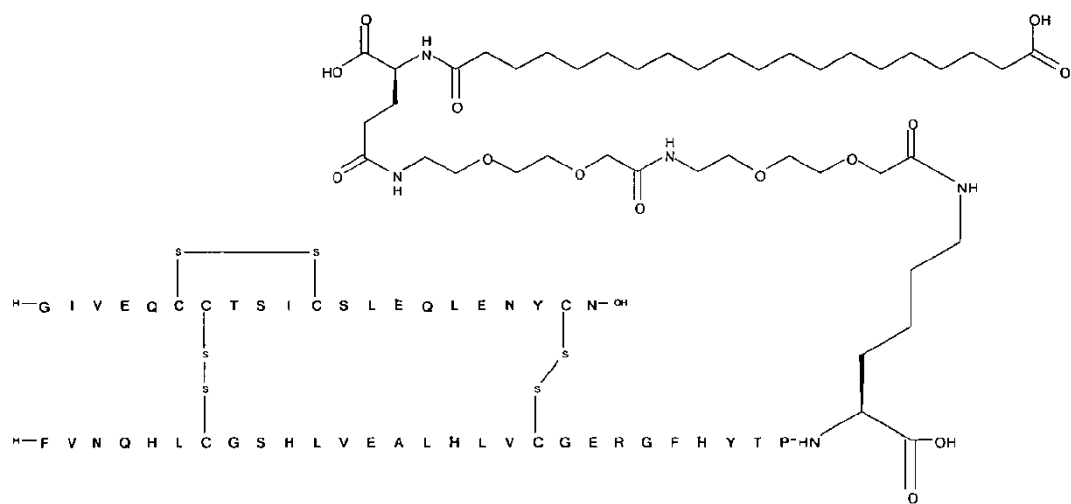
ES-MS: $m/z = 1484 (M+4)$

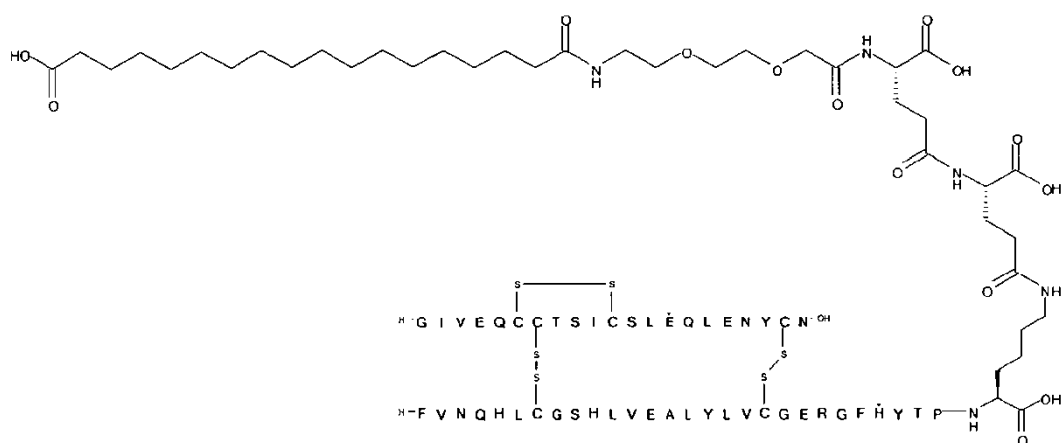
Ejemplo 32, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K(N^6 Octadecanodioil- γ Glu- γ Glu), desB30

**Ejemplo 33, Procedimiento general (A):**

Insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K(N(e)s)Eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG, desB30

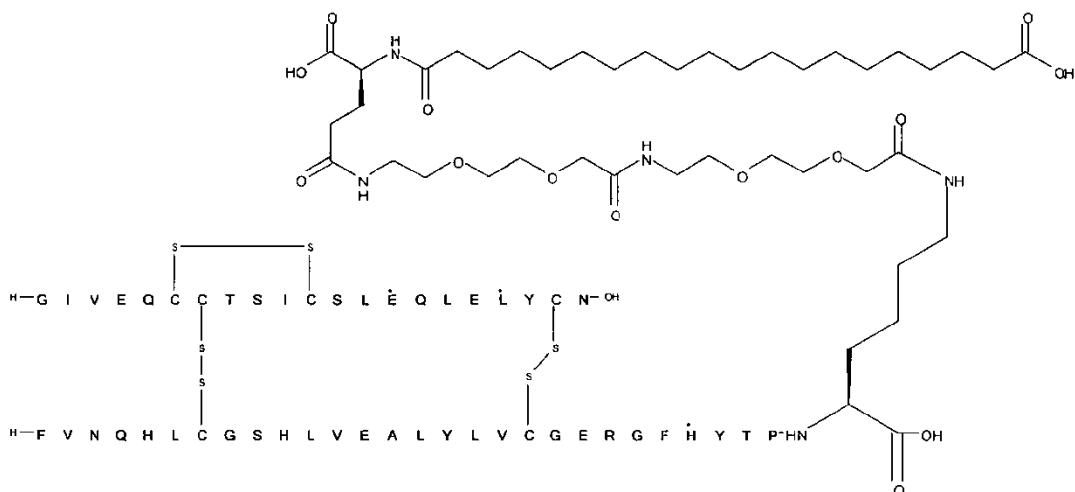
**Ejemplo 34, Procedimiento general (A):**Insulina humana A14E, B25H, B29K(N^e)Octadecanodioil-OEG-γGlu-γGlu, desB30



ES-MS: $m/z = 1592 (M+4)$

Ejemplo 35, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, A18L, B25H, B29K(*N*⁶Eicosanodiyl-γGlu-OEG-OEG), desB30

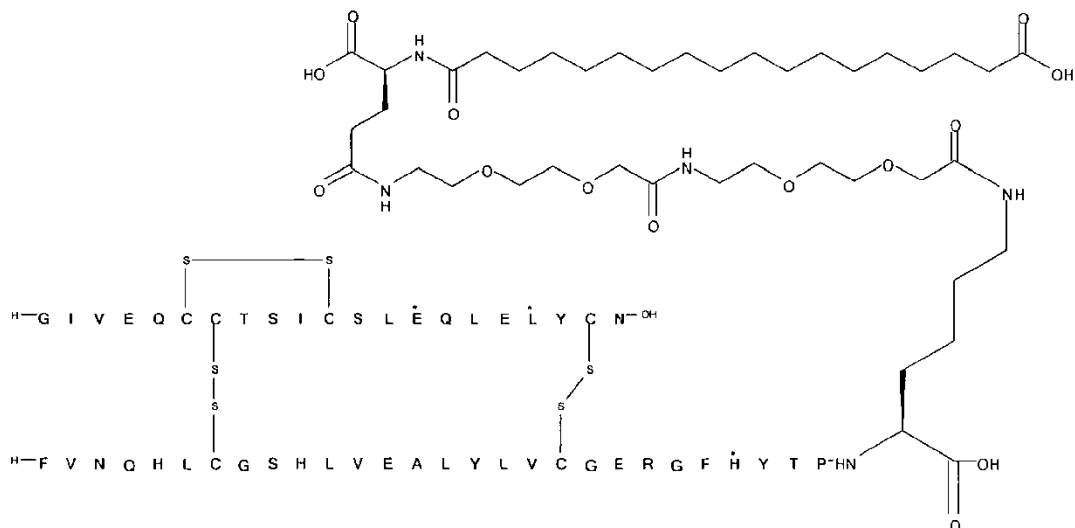


5

MALDI-TOF MS: $m/z = 6405$

Ejemplo 36, Procedimiento general (A):

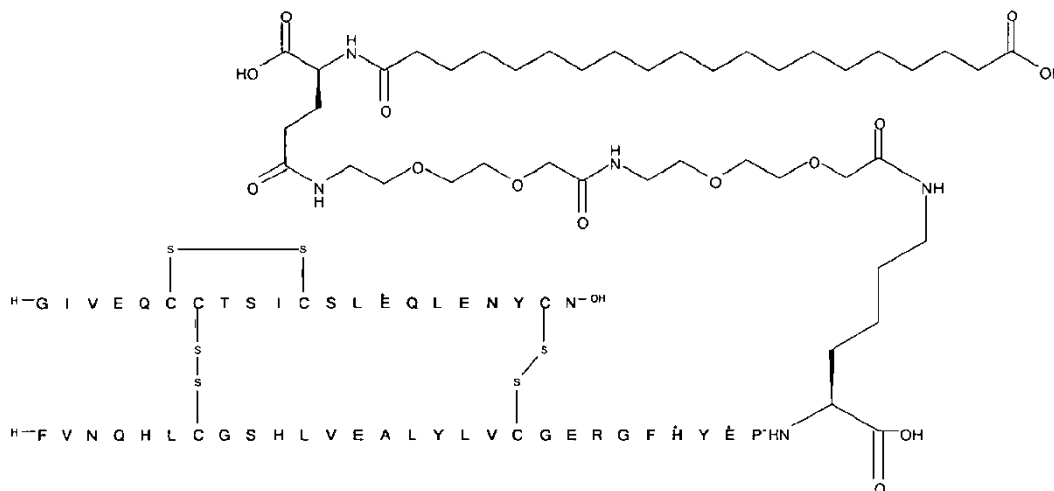
Insulina humana A14E, A18L, B25H, B29K(*N*⁶Octadecanodiyl-γGlu-OEG-OEG), desB30



MALDI-TOF MS: $m/z = 6377$

Ejemplo 37, Procedimiento general (A):

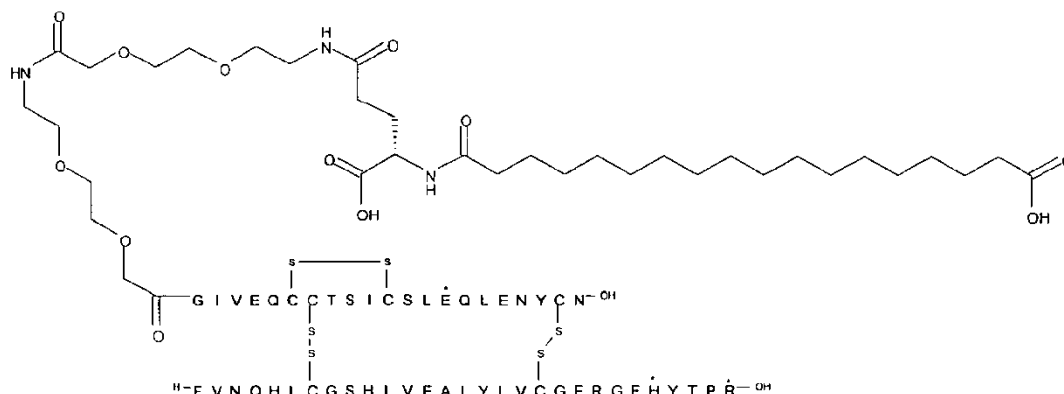
Insulina humana A14E, B25H, B27E, B29K(*N*⁶Eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



5 MALDI-TOF MS: $m/z = 6433$

Ejemplo 38, Procedimiento general (A):

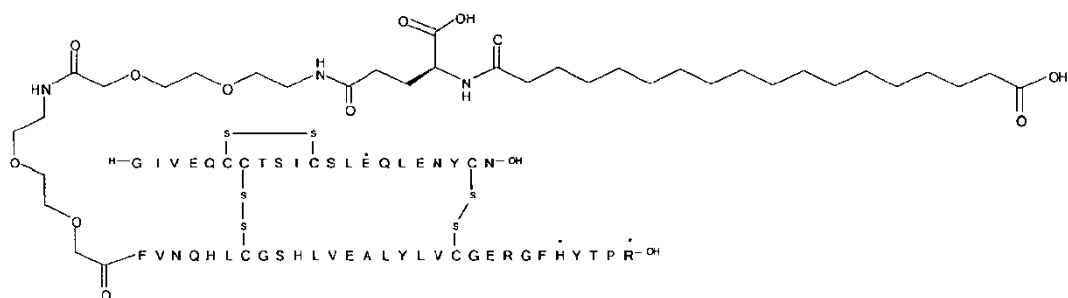
Insulina humana A1G(*N*⁶Octadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), A14E, B25H, B29R, desB30



- 10 La insulina A14E, B25H, B29R, desB30 (500 mg, 88 μmol) se disolvió en NaHCO₃ 0,1 M, pH 8 (5 ml). ω-carboxiheptadecanoil-γ-L-glutamyl-OEG-OEG-OSu (65 mg, 88 μmol) se disolvió en THF/MeCN 1:1 (5 ml) y se añadió a la solución de insulina. Después de 30 minutos, la reacción se inactivó mediante la adición de metilamina acuosa 2 M (0,5 ml). El disolvente se evaporó a vacío y el sólido se redisolvió en la cantidad mínima de agua/MeCN. El pico principal de producto se aisló mediante el uso de RP-HPLC en una columna C18, tampón A: 0,1% de TFA en agua, tampón B: 0,1% de TFA en MeCN, gradiente 30-55% de tampón B durante 45 minutos. Las fracciones de producto se evaporaron parcialmente a vacío y se liofilizaron para proporcionar 59 mg de producto (10%). Análisis LC-MS: M⁴⁺ = 1602,7, calculado 1602,6. Dos etapas de análisis convencional de la secuencia de aminoácidos mostraron F-V, confirmando la acilación en A1.
- 15

Ejemplo 39, Procedimiento general (A):

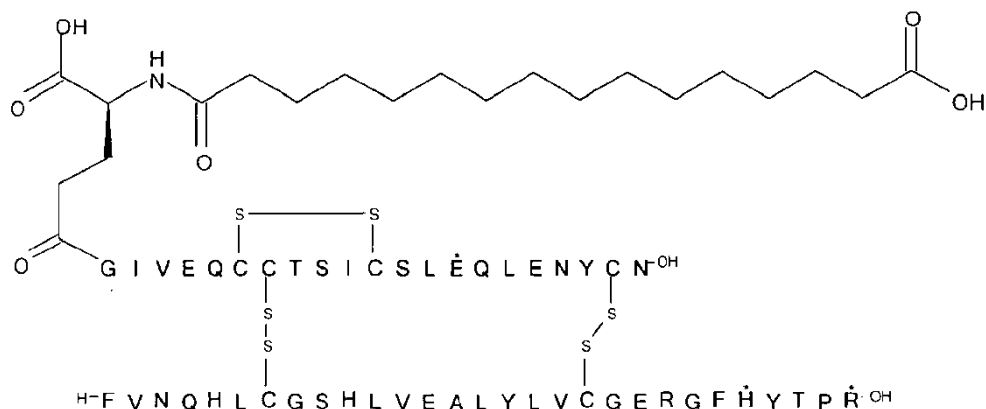
Insulina humana A14E, B1F(*N*⁶Octadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), B25H, B29R, desB30



Este compuesto se aisló como un subproducto a partir del ejemplo anterior (ejemplo 38). Análisis LCMS: $M^{4+} = 1602,5$, calculado 1602,6. Dos etapas de análisis convencional de la secuencia de aminoácidos mostraron G-I, confirmando la acilación en B1.

5 **Ejemplo 40, Procedimiento general (A):**

Insulina humana A1G(N^6 Hexadecanodioil- γ Glu), A14E, B25H, B29R, desB30

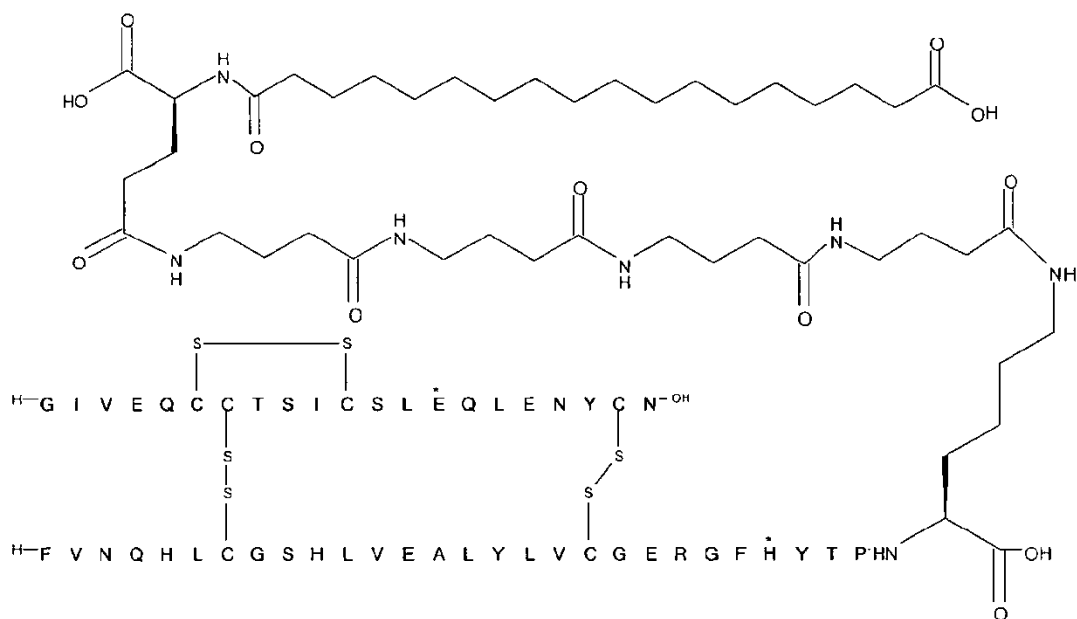


ES-MS: $m/z = 1523 (M+4)$

10 Este compuesto se preparó de manera similar a la acilación de A1 descrita anteriormente (ejemplo 38), utilizando ω -carboxipentadecanoil- γ -L-glutamyl(OSu) como reactivo de acilación. El producto mostró LCMS: $M^{4+} = 1523,2$, calculado 1523,0. Dos etapas de análisis convencional de la secuencia de aminoácidos mostraron F-V, confirmando la acilación en A1.

Ejemplo 41, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B25H, B29K(N^6 Octadecanodioil- γ Glu-Abu-Abu-Abu-Abu), desB30

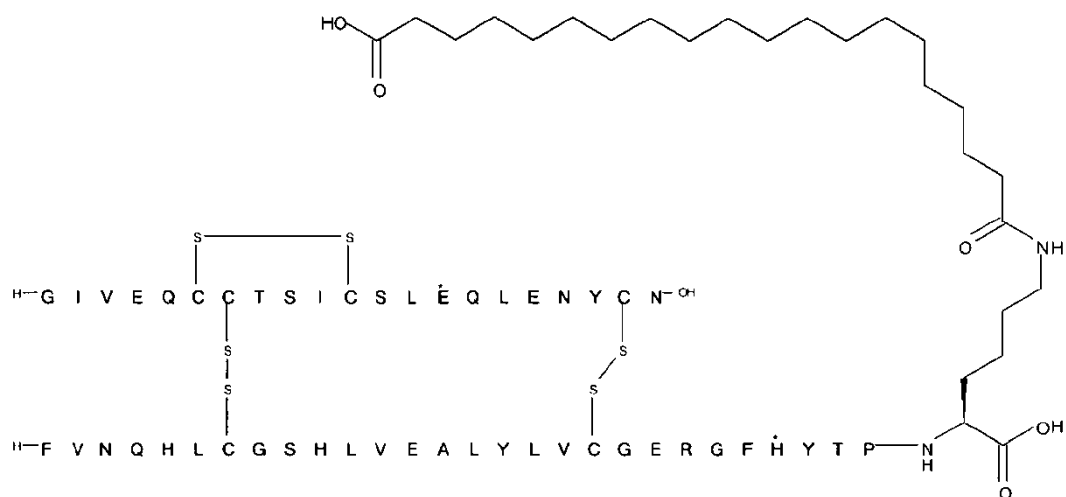


ES-MS: $m/z = 1286 (M+5)$

5 El reactivo de acilación para este ejemplo se preparó análogamente al reactivo preparado en el ejemplo 9, partiendo de la fijación de ácido 4-aminobutírico protegido con Fmoc a la resina de 2-clorotritilo, seguida de desprotección y fijación secuencial de 3 unidades más de ácido 4-aminobutírico protegido con Fmoc, y como se describe en el ejemplo 9, Fmoc-Glu-OtBu y éster mono-*terc*-butílico de ácido octadecanodioico.

Ejemplo 42, Procedimiento general (A):

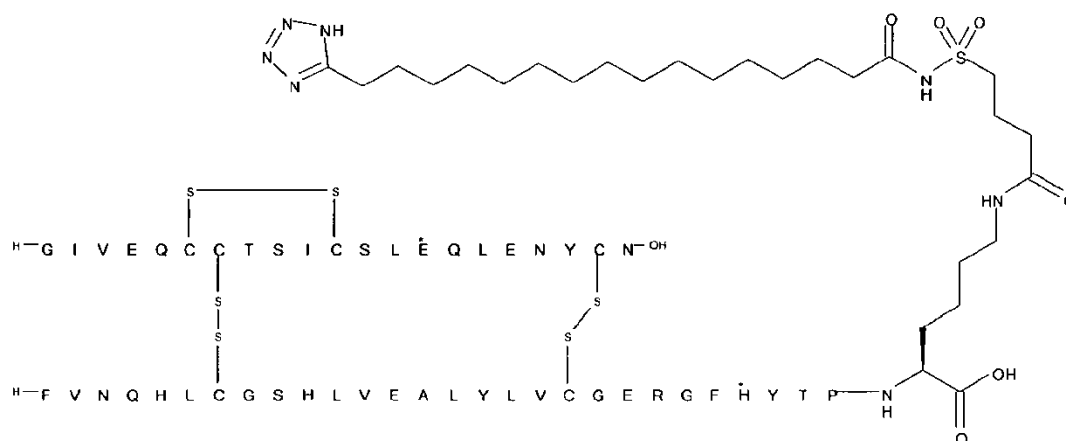
Insulina humana A14E, B25H, B29K(*N*^εEicosanodioilo), desB30



10 MALDI-TOF-MS: $m/z = 5987$

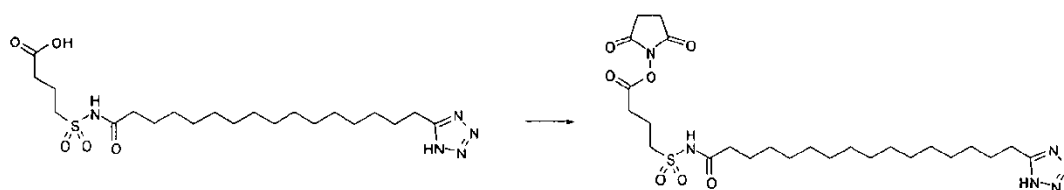
Ejemplo 43, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B25H, B29K(*N*^ε4-(16-(1H-Tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil]butanoilo), desB30



ES-MS: $m/z = 1530 (M+4)$

Preparación del reactivo de acilación intermedio:



5

Ácido 4-[16-(1H-tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil]butanoico (500 mg, preparado como se describe en el documento WO 2006/005667) se disolvió en etanol (20 ml) y TSTU (381 mg), y se añadió DIPEA (542 μ l) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla se concentró a vacío, y el residuo se agitó con HCl 0,25 M. El sólido se aisló por filtración, se lavó con agua y se secó a vacío para proporcionar 580 mg (91%) del reactivo de acilación.

10

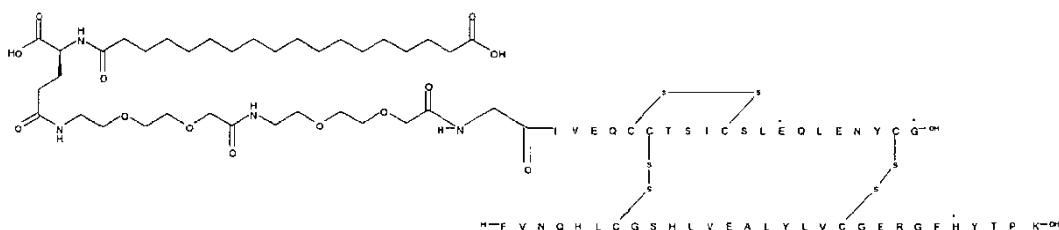
Reacción de acilación:

Insulina humana A14E, B25H, desB30 (500 mg) se disolvió en carbonato de sodio 0,1 M acuoso (10 ml) y etanol (4 ml). El pH se ajustó a 10,8 con NaOH 1 N. Se añadió el reactivo de acilación anterior (101 mg) disuelto en THF (2 ml) y etanol (2 ml) en dos porciones con 10 minutos de intervalo. La mezcla resultante se agitó lentamente durante 1 hora y se diluyó con agua (50 ml). La insulina resultante precipitó por la adición de HCl 1 N a pH 5,5. El material precipitado se aisló por centrifugación y se purificó por HPLC. Las fracciones puras se agruparon y se liofilizaron.

15

Ejemplo 44, Procedimiento general (A):

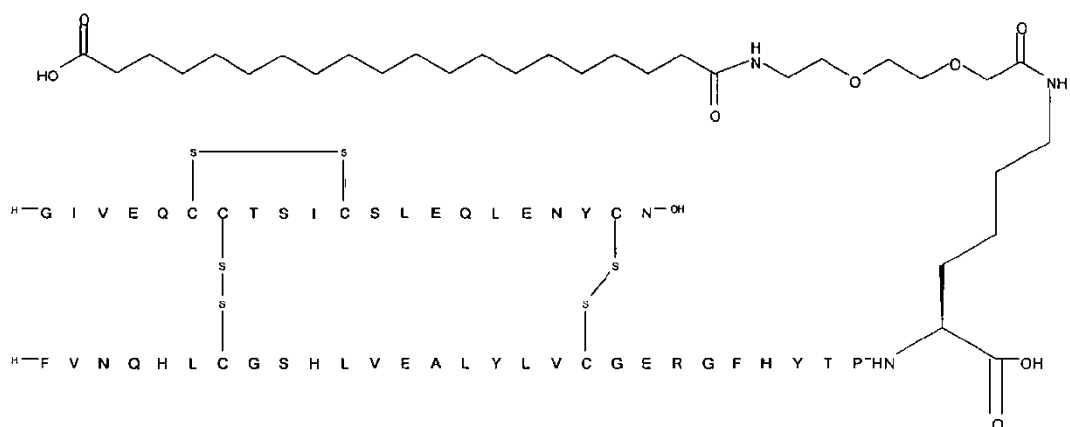
Insulina humana A1G(N^{α} Octadecanodioil- γ Glu-OEG-OEG), A14E, A21G, B25H, desB30



20 MALDI-TOF-MS: $m/z = 6321$

Ejemplo 45, Procedimiento general (A):

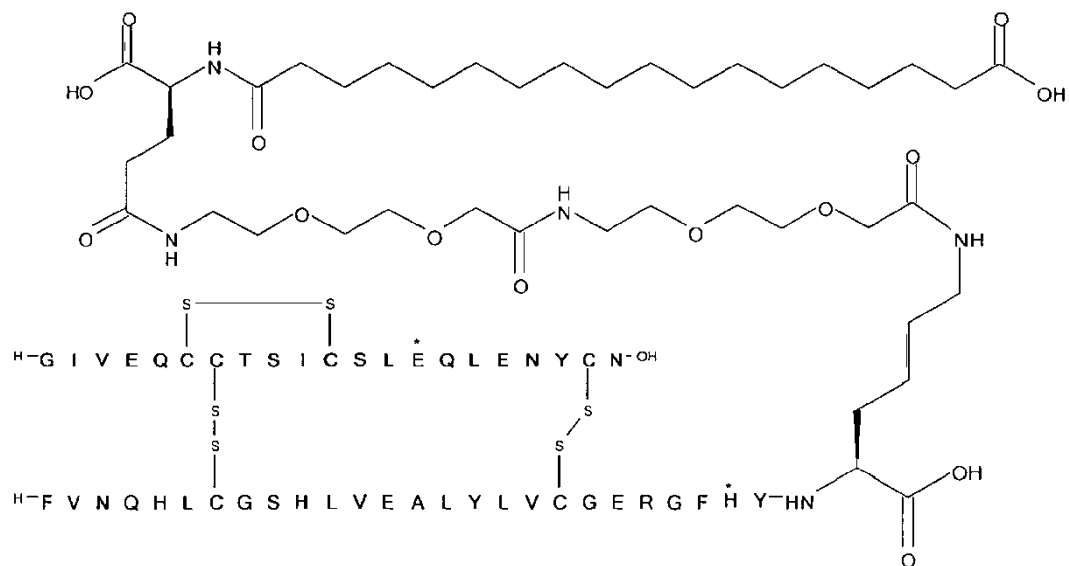
Insulina humana A14E, B25H, B29K(N^{ϵ} Eicosanodioil-OEG), desB30



MALDI-TOF-MS: $m/z = 6130$

Ejemplo 46, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B25H, B27K(*N*⁶Octadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB28, desB29, desB30

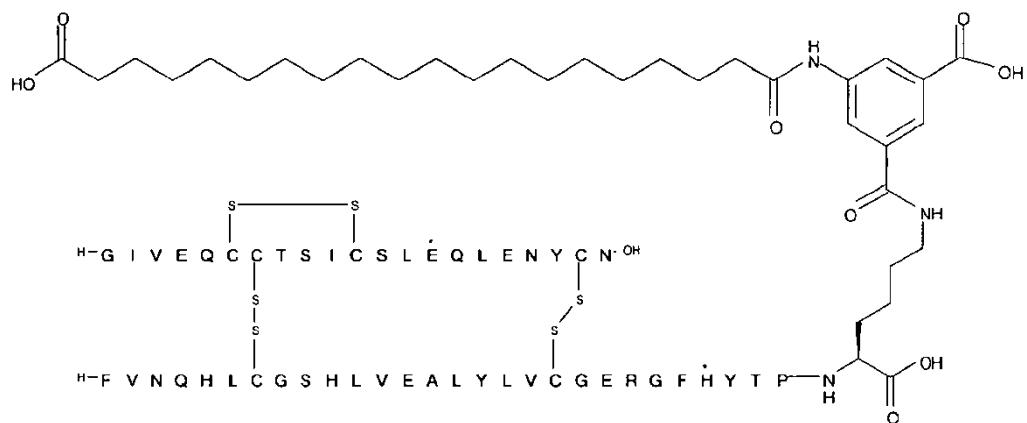


5

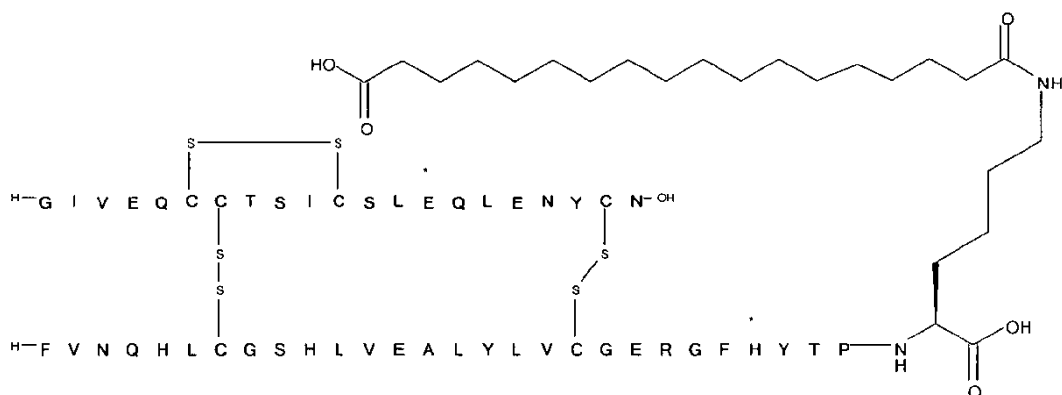
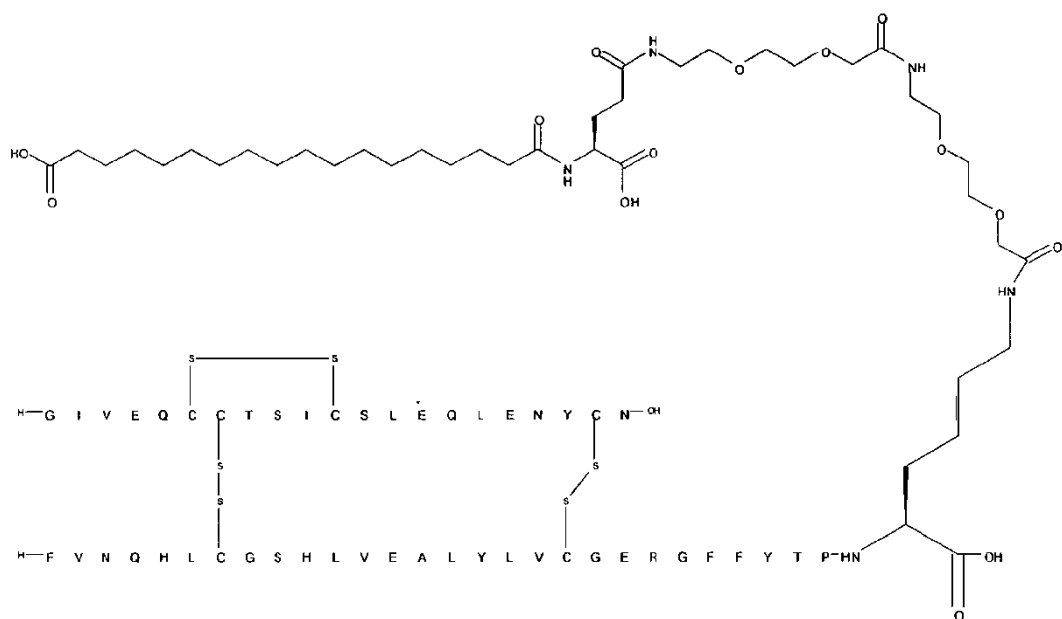
MALDI-TOF-MS: $m/z = 6181$

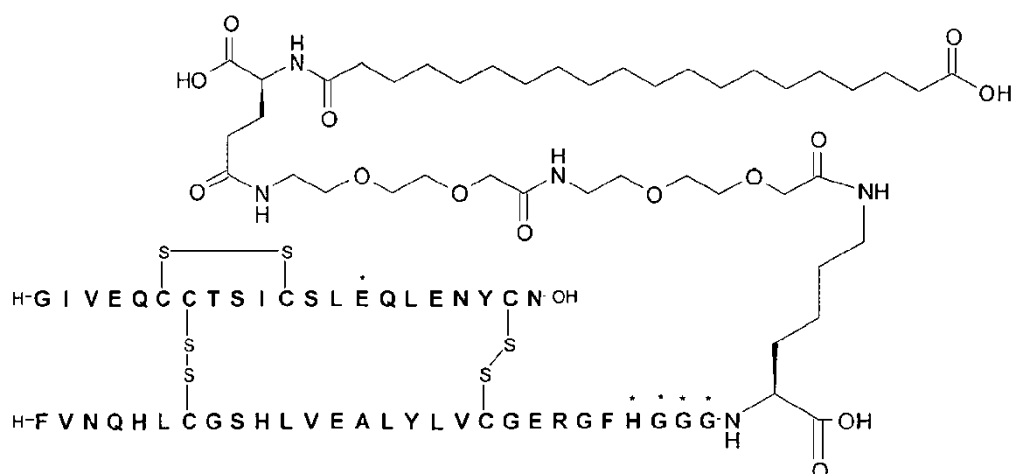
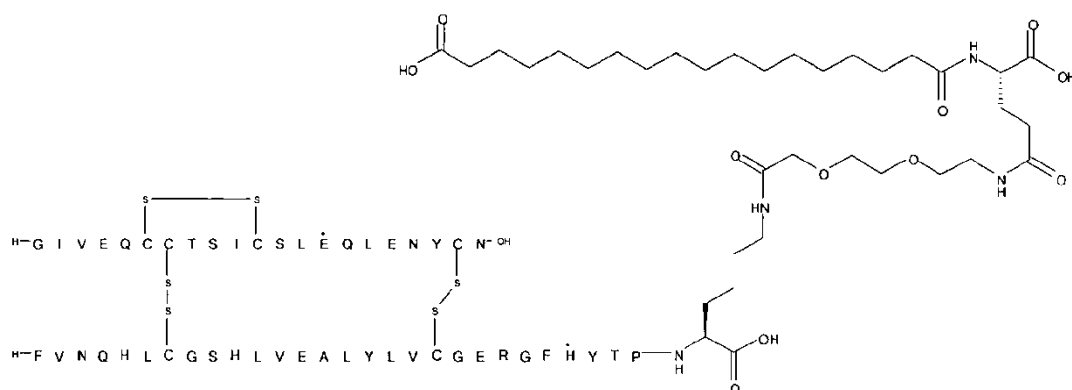
Ejemplo 47, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B25H, B29K(*N*⁶(ácido 5-eicosanodioilaminoisofáltico)), desB30

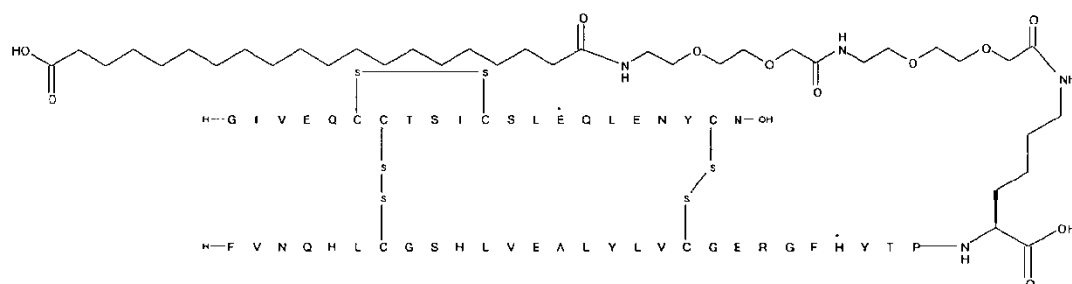


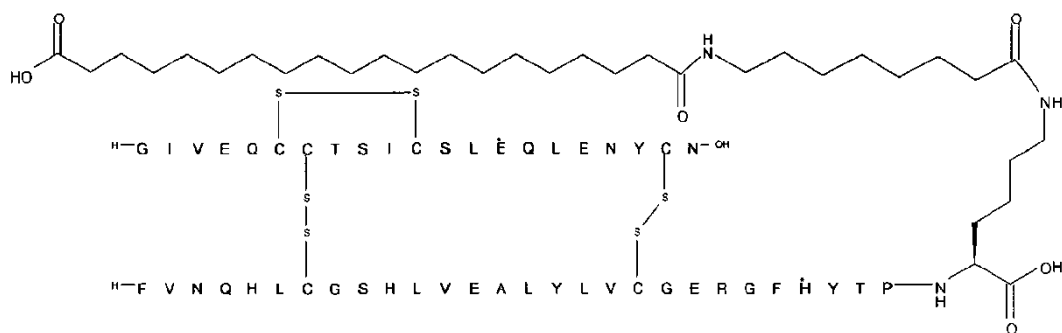
10 MALDI-TOF-MS: $m/z = 6150$

Ejemplo 48, Procedimiento general (A):Insulina humana A14E, B25H, B29K(*N*⁶Octadecanodioilo), desB30MALDI-TOF-MS: $m/z = 5959$ 5 **Ejemplo 49, Procedimiento general (A):**Insulina humana A14E, B29K(*N*⁶Octadecanodioil- γ Glu-OEG-OEG), desB30ES-MS: $m/z = 1598 (M+4)$ **Ejemplo 50, Procedimiento general (A):**10 Insulina humana A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29K(*N*⁶Eicosanodioil- γ Glu-OEG-OEG), desB30

MALDI-TOF-MS: $m/z = 6216$ **Ejemplo 51, Procedimiento general (A):**Insulina humana A14E, B25H, B29K(N^{ϵ} Octadecanodioil- γ Glu-OEG), desB30

5

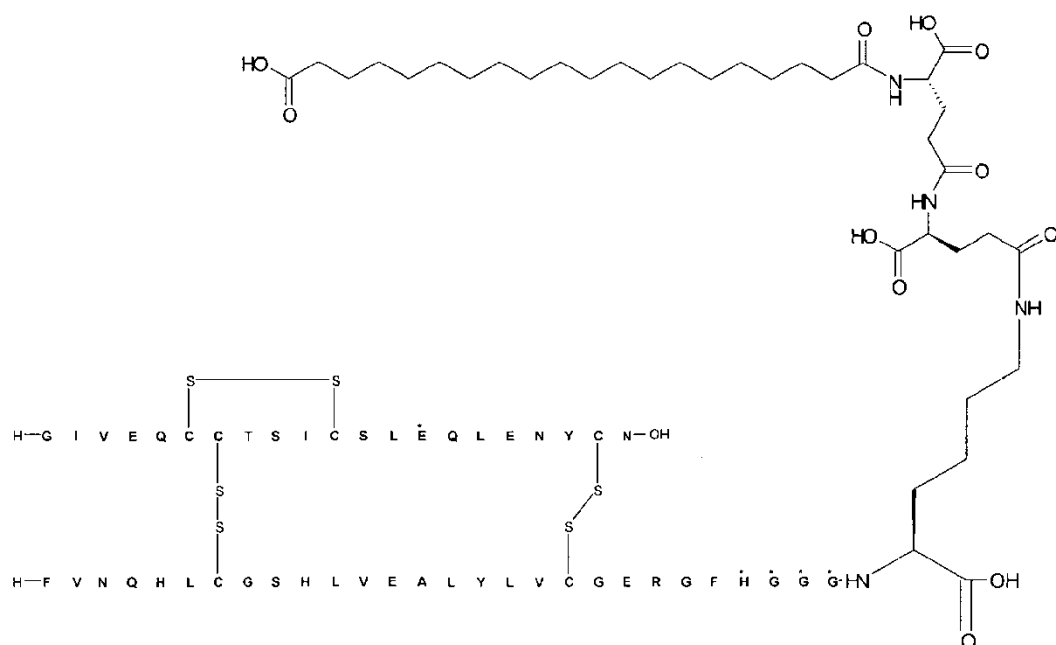
ES-MS: $m/z = 1559 (M+4)$ **Ejemplo 52, Procedimiento general (A):**Insulina humana A14E, B25H, B29K(N^{ϵ} Eicosanodioil-OEG-OEG), desB3010 MALDI-TOF-MS: $m/z = 6278$ **Ejemplo 53, Procedimiento general (A):**Insulina humana A14E, B25H, B29K(N^{ϵ} Eicosanodioil-Aoc), desB30



MALDI-TOF-MS: $m/z = 6126$

Ejemplo 54, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29K(N^{ϵ} Eicosanodioil- γ Glu- γ Glu), desB30

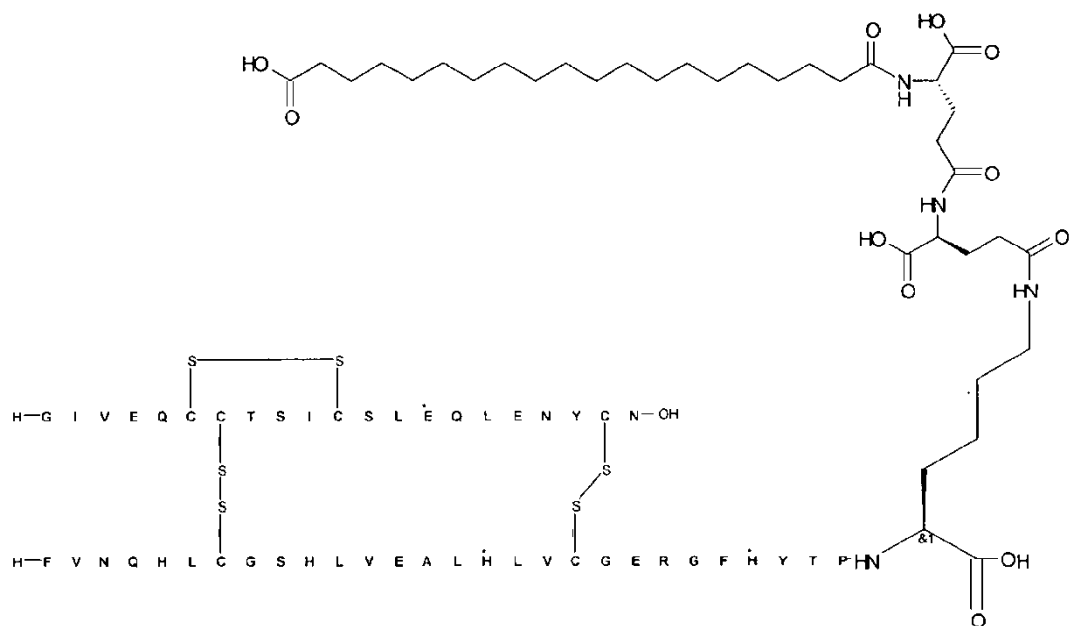


5

ES-MS: $m/z = 6055$ (desconvolucionado)

Ejemplo 55, Procedimiento general (A):

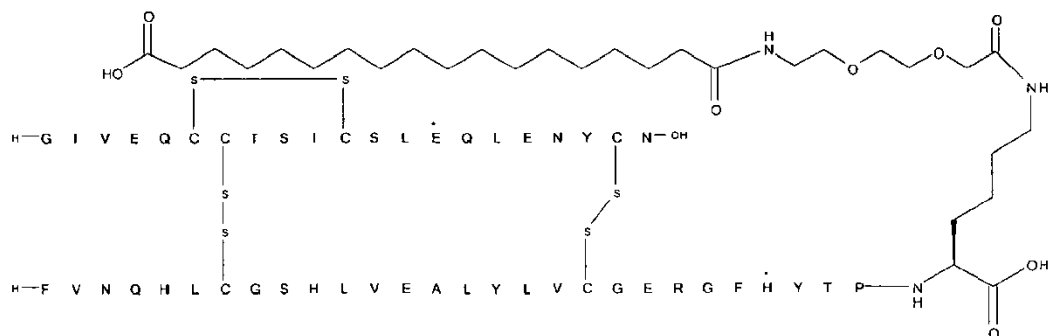
Insulina humana A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29K(N^{ϵ} Eicosanodioil- γ Glu- γ Glu), desB30



ES-MS: $m/z = 6220$ (desconvolucionado)

Ejemplo 56, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B25H, B29K(*N*-Octadecanodioil-OEG), desB30

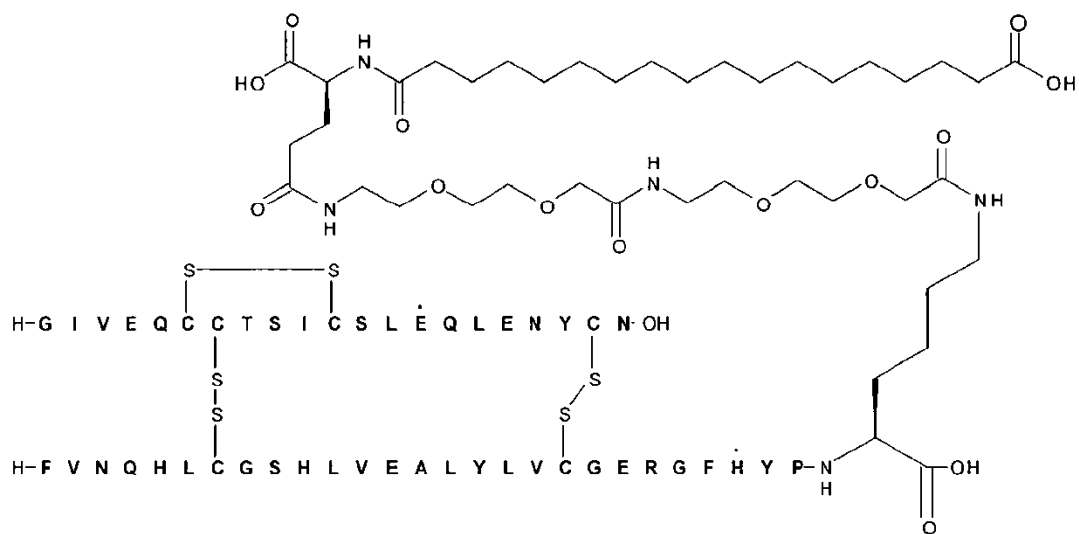


5

MALDI-TOF-MS: $m/z = 6101$

Ejemplo 57, Procedimiento general (A):

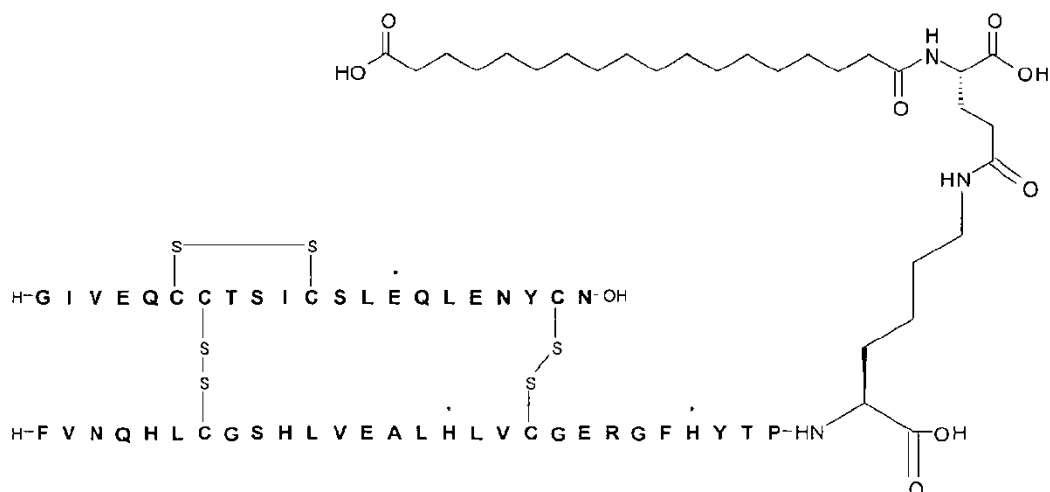
Insulina humana A14E, B25H, desB27, B29K(*N*-Octadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



MALDI-TOF-MS: $m/z = 6277$

Ejemplo 58, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B25H, B16H, B29K(N^6 Octadecanodioil- γ Glu), desB30

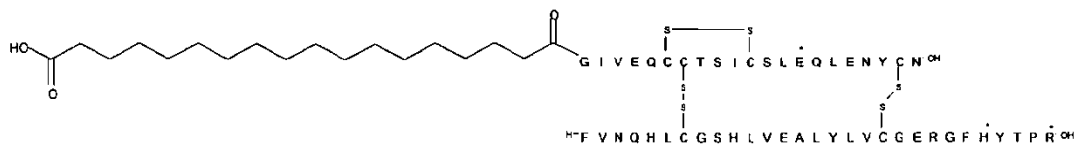


5

ES-MS: $m/z = 1516$ ($M+4$)

Ejemplo 59, Procedimiento general (A):

Insulina humana A1G(N^6 Octadecanodioilo), A14E, B25H, B29R, desB30

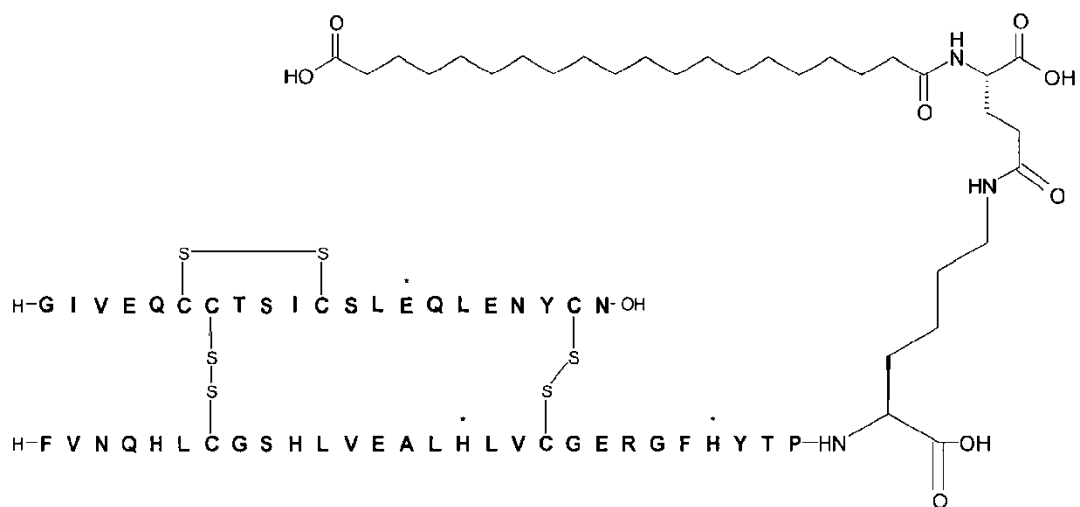


10

ES-MS: $m/z = 1498$ ($M+4$)

Ejemplo 60, Procedimiento general (A):

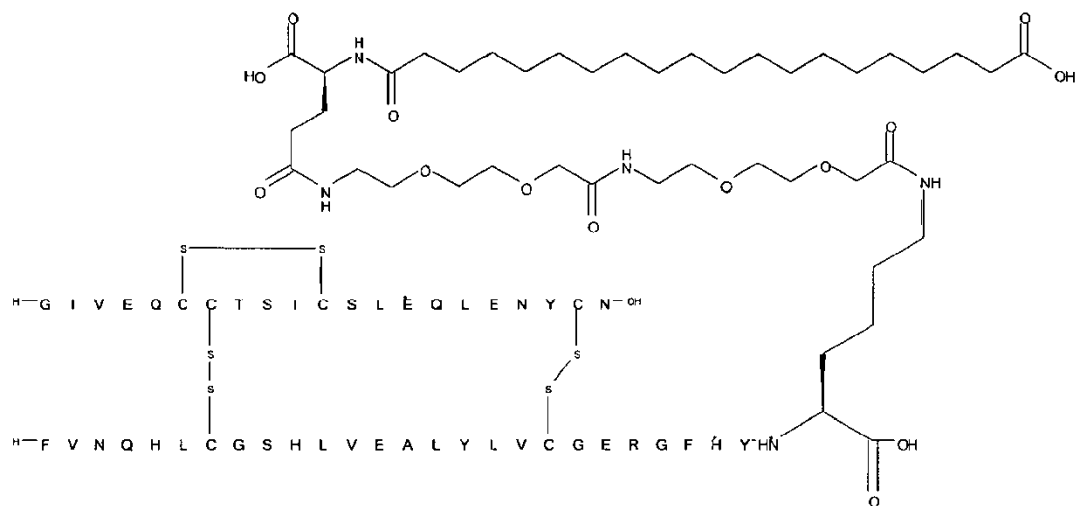
Insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K(N^6 Eicosanodioil- γ Glu), desB30



ES-MS: $m/z = 1523 (M+4)$

Ejemplo 61, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B25H, B27K(N^6 Eicosanodioil- γ Glu), desB28, desB29, desB30

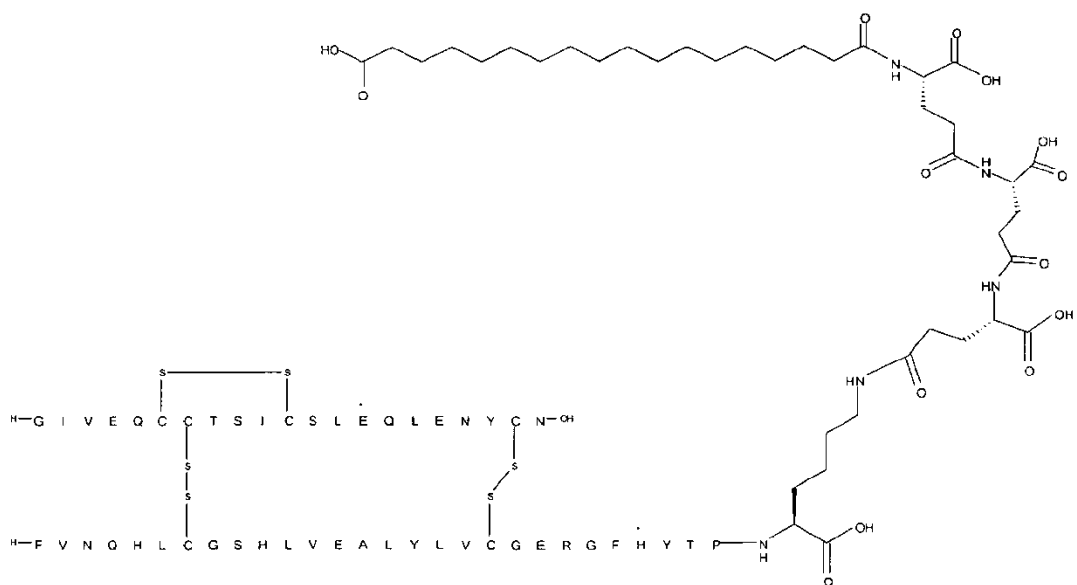


5

MALDI-TOF MS: $m/z = 6208$

Ejemplo 62, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B25H, B29K(N^6 Octadecanodioil- γ Glu- γ Glu- γ Glu), desB30

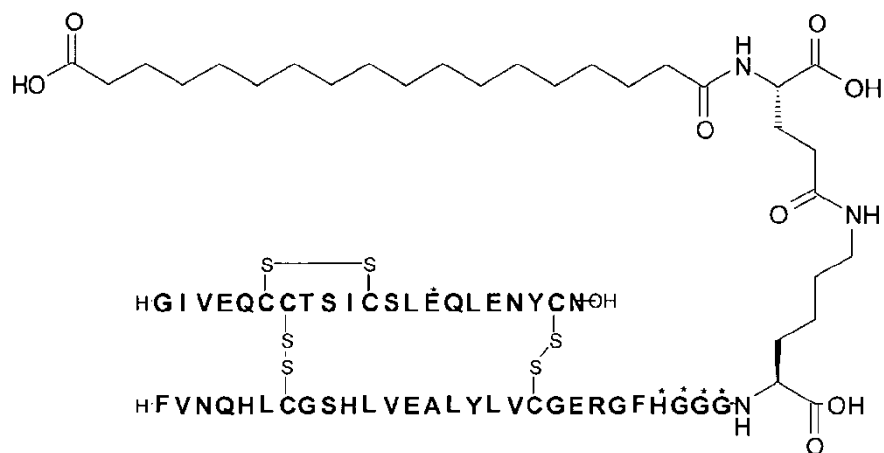


ES-MS: $m/z = 1587 (M+4)$

Las insulinas aciladas de la invención en los siguientes ejemplos se pueden preparar de manera similar:

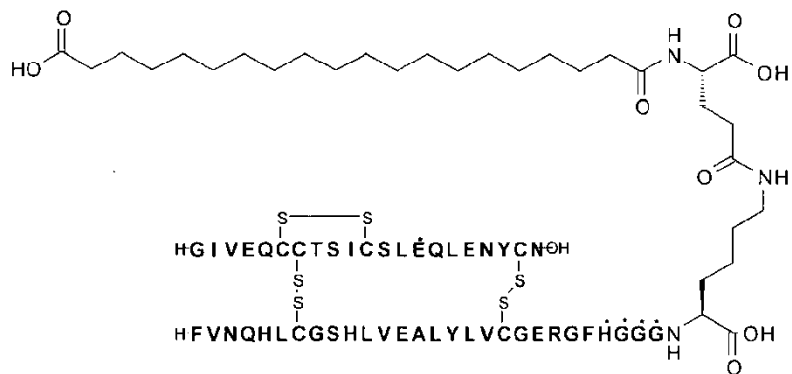
Ejemplo 63, Procedimiento general (A):

- 5 Insulina humana A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29K(N^6 Octadecanodioil- γ Glu), desB30



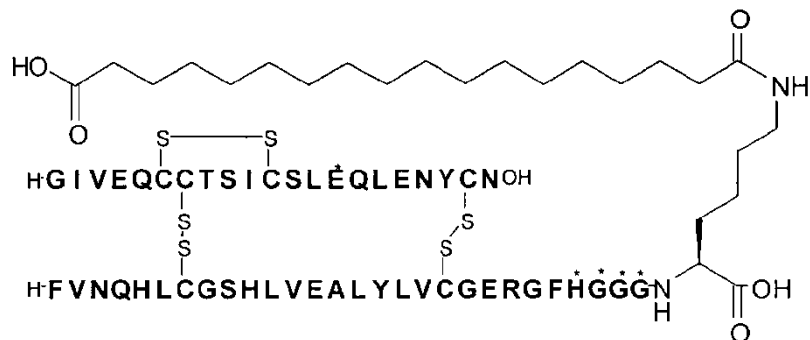
Ejemplo 64, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B26G, B27G, B28G, B29K(N^6 Eicosanodioil- γ Glu), desB30



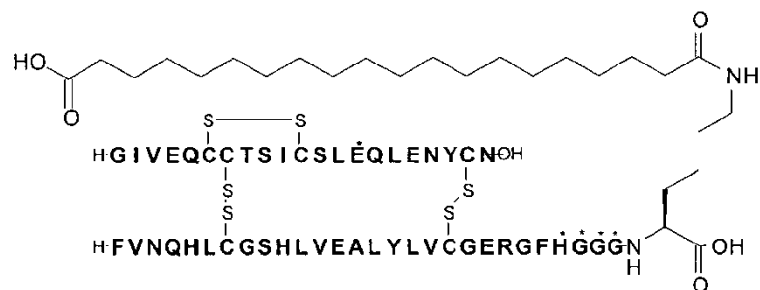
- 10 **Ejemplo 65, Procedimiento general (A):**

Insulina humana A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29K(N⁶Octadecanodioilo), desB30



Ejemplo 66, Procedimiento general (A):

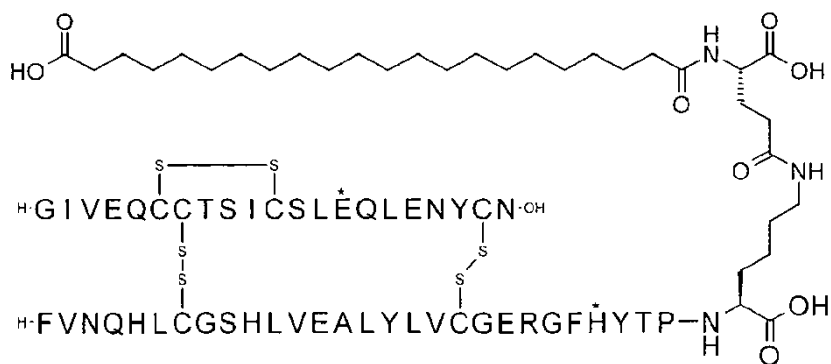
Insulina humana A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29K(N⁶Eicosanodioilo), desB30



5

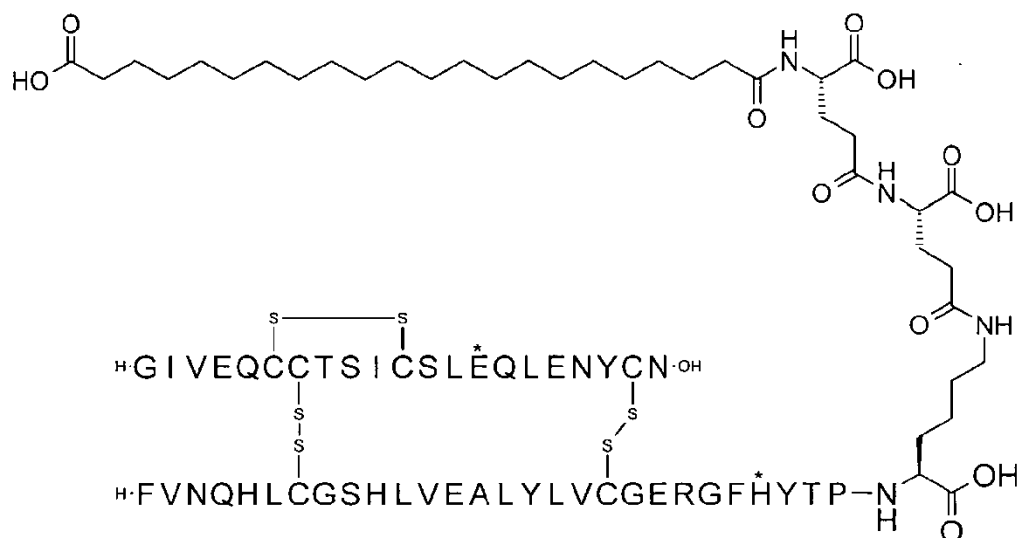
Ejemplo 67, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B25H, B29K(N⁶Docosanodioil-γGlu), desB30



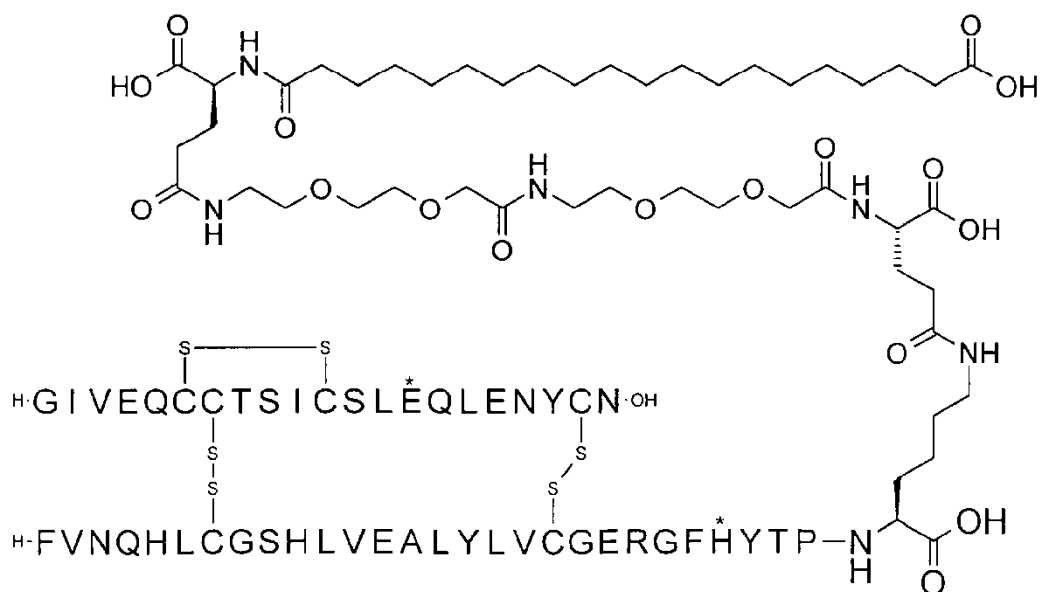
Ejemplo 68, Procedimiento general (A):

10 Insulina humana A14E, B25H, B29K(N⁶Docosanodioil-γGlu-γGlu), desB30



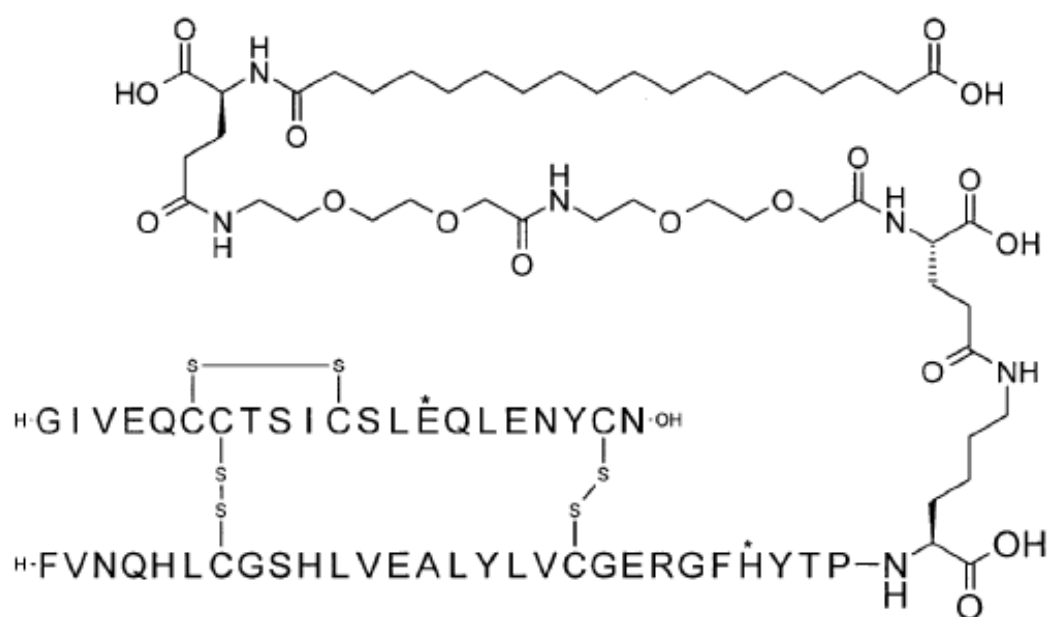
Ejemplo 69, General de procedimiento (A):

Insulina humana A14E, B25H, B29K(N^εIcosanodioil-γGlu-OEG-OEG-γGlu), desB30

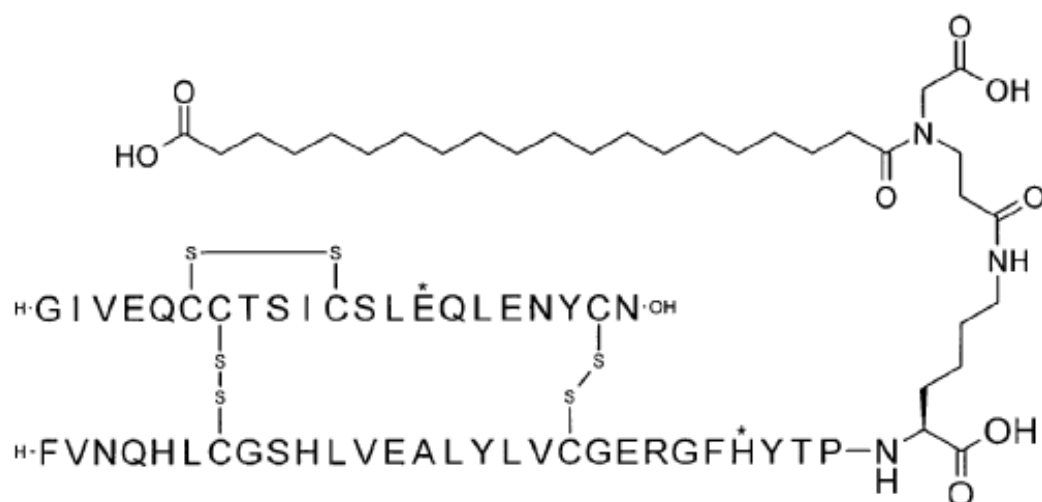


5 **Ejemplo 70, Procedimiento general (A):**

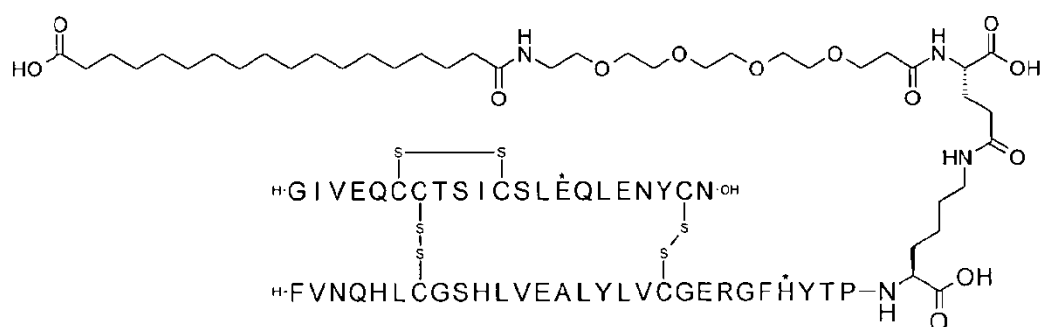
Insulina humana A14E, B25H, B29K(N^εOctadecanodioil-γGlu-OEG-OEG-γGlu), desB30

**Ejemplo 71, Procedimiento general (A):**

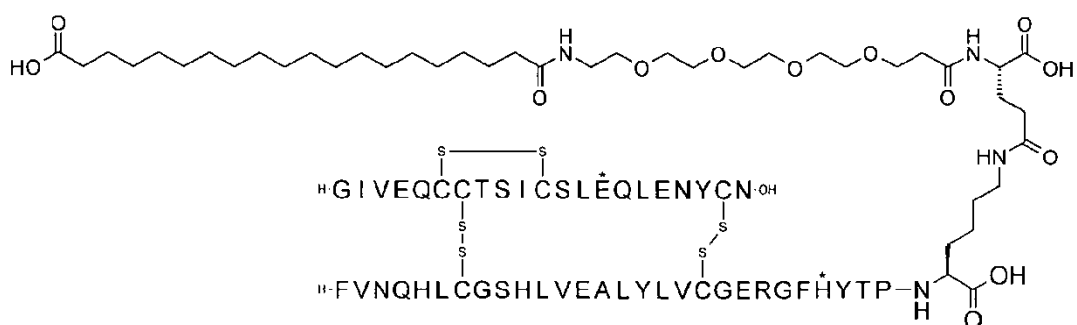
Insulina humana A14E, B25H, B29K(N^ε(N-icosanodioil-N-carboximetil)-βAla), desB30

**5 Ejemplo 72, Procedimiento general (A):**

Insulina humana A14E, B25H, B29K(N^ε-3-[2-(2-((2-[2-(17-Carboxiheptadecanoilamino)etoxi]etoxi)etoxi)-etoxi]propionil-γGlu), desB30

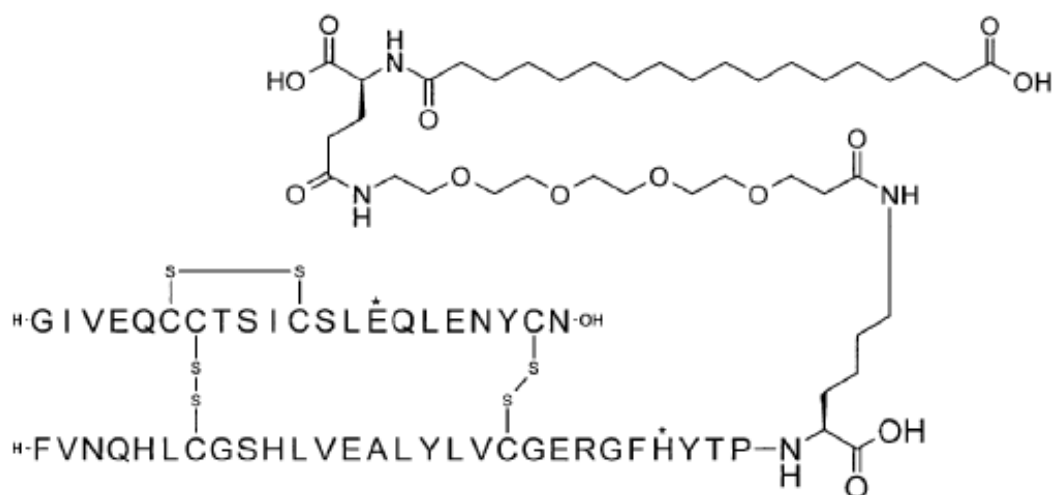
**Ejemplo 73, Procedimiento general (A):**

Insulina humana A14E, B25H, B29K(N⁶3-[2-(2-[2-(19-Carboxinonadecanoilamino)etoxi]etoxi)etoxi]propionil-γGlu), desB30



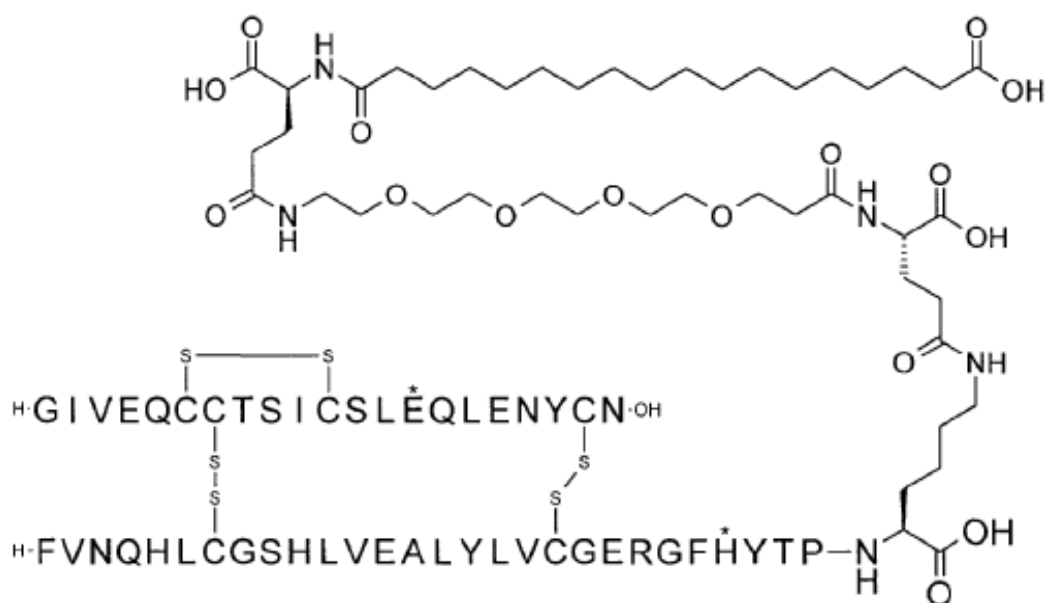
Ejemplo 74, Procedimiento general (A):

5 Insulina humana A14E, B25H, B29K(N⁶Octadecanodioil-γGlu-(3-(2-[2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi]etoxi)propionilo), desB30



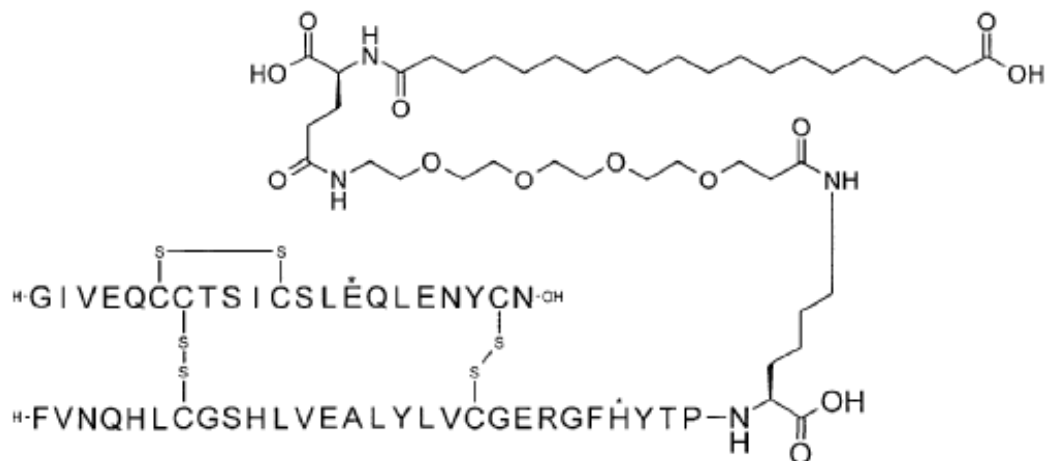
Ejemplo 75, Procedimiento general (A):

10 Insulina humana A14E, B25H, B29K(N⁶Octadecanodioil-γGlu-(3-(2-[2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi]etoxi)propionil-γGlu), desB30

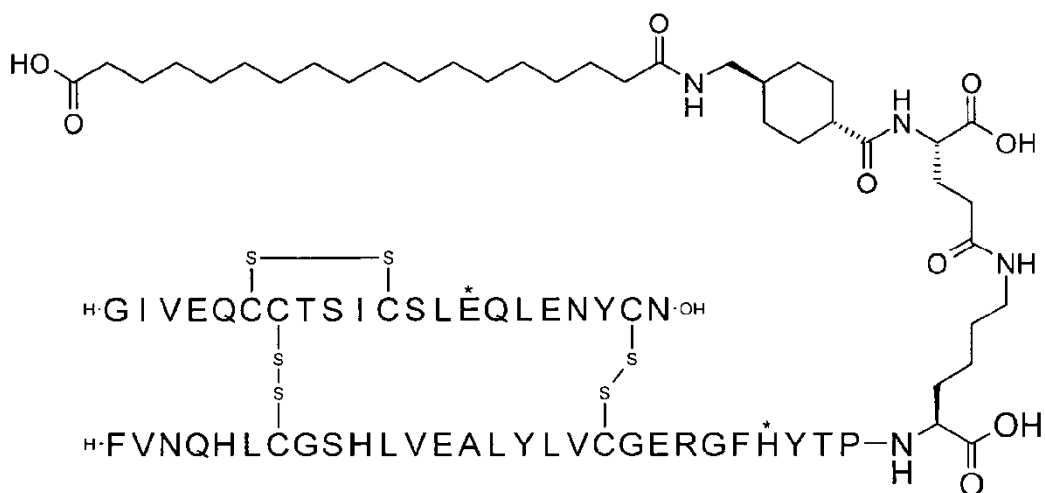


Ejemplo 76, Procedimiento general (A):

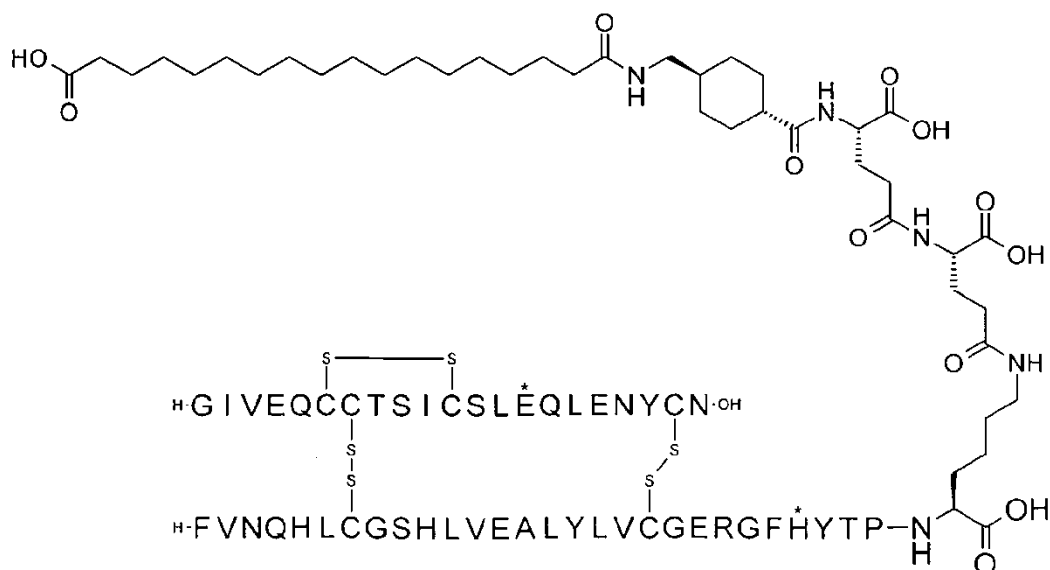
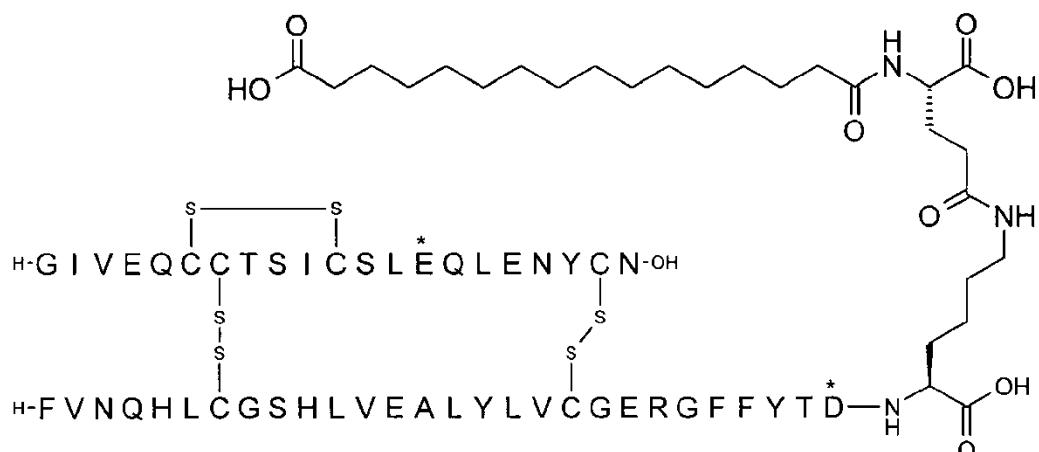
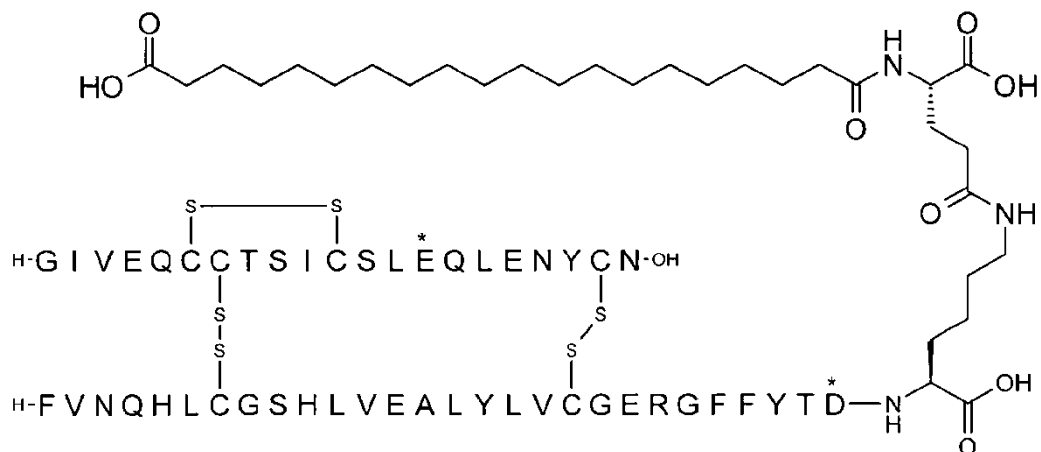
Insulina humana A14E, B25H, B29K(N⁶icosanodioil-γGlu-(3-(2-{2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]etoxi}etoxi)propionilo), desB30

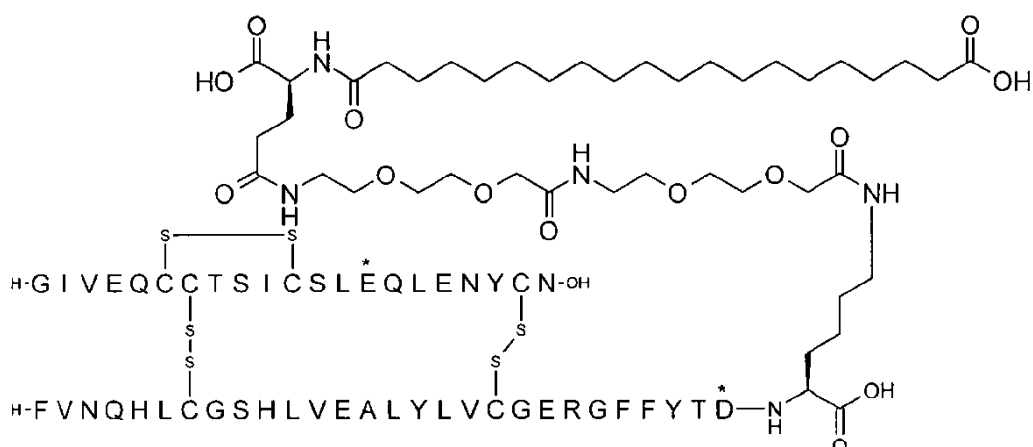
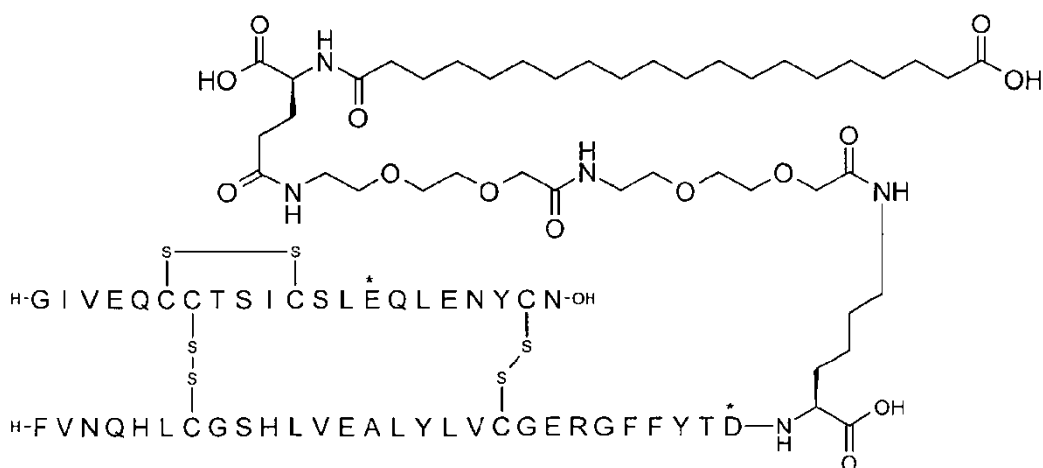
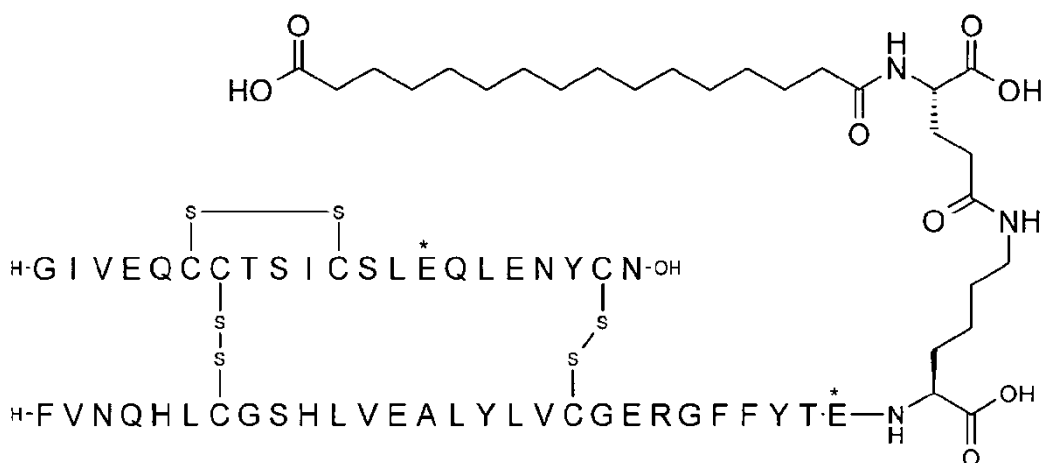
5 **Ejemplo 77, Procedimiento general (A):**

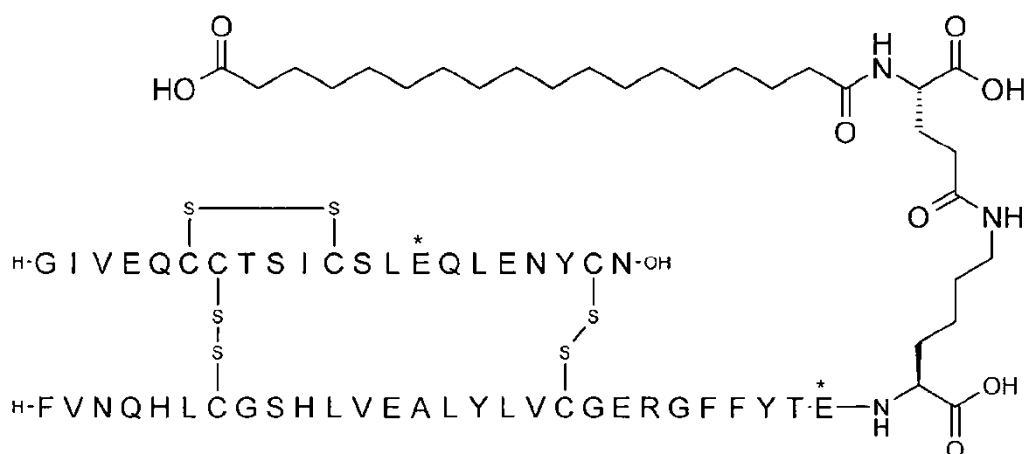
Insulina humana A14E, B25H, B29K(N⁶4-([4-({17-Carboxinonadecanoilamino}metil)trans-ciclohexanocarbonil]-γGlu), desB30

**Ejemplo 78, Procedimiento general (A):**

10 Insulina humana A14E, B25H, B29K(N⁶4-([4-({17-Carboxiheptadecanoilamino}metil)trans-ciclohexanocarbonil]-γGlu-γGlu), desB30

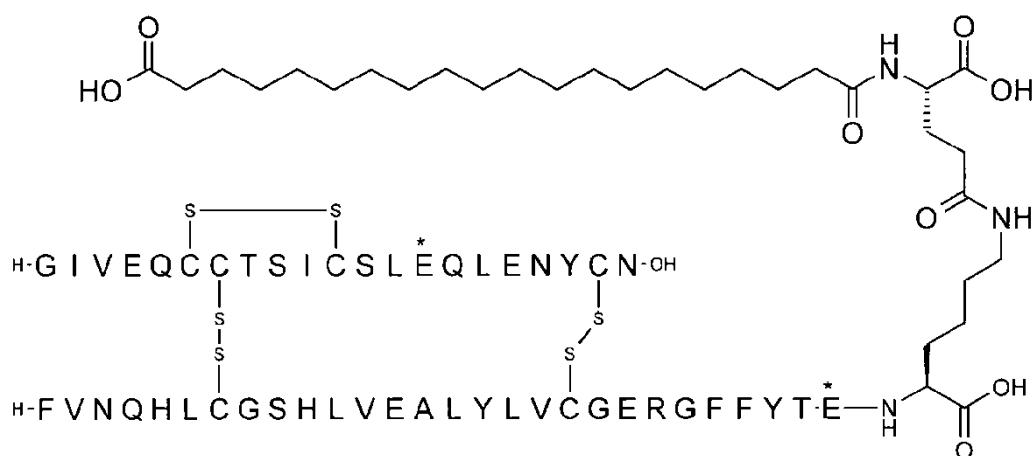
**Ejemplo 79, Procedimiento general (A):**Insulina humana A14E, B28D, B29K(N^{hexadecanodioil}-γGlu, desB30)**5 Ejemplo 80, Procedimiento general (A):**Insulina humana A14E, B28D, B29K(N^{eicosanodioil}-γGlu, desB30)**Ejemplo 81, Procedimiento general (A):**Insulina humana A14E, B28D, B29K(N^{octadecanodioil}-OEG-OEG, desB30)

**Ejemplo 82, Procedimiento general (A):**Insulina humana A14E, B28D, B29K(N^EEicosanodioil-glycyl-L-glutamate, desB30)**5 Ejemplo 83, Procedimiento general (A):**Insulina humana A14E, B28E, B29K(N^EHexadecanodioil-glycyl-L-glutamate, desB30)**Ejemplo 84, Procedimiento general (A):**Insulina humana A14E, B28E, B29K(N^EOctadecanodioil-glycyl-L-glutamate, desB30)



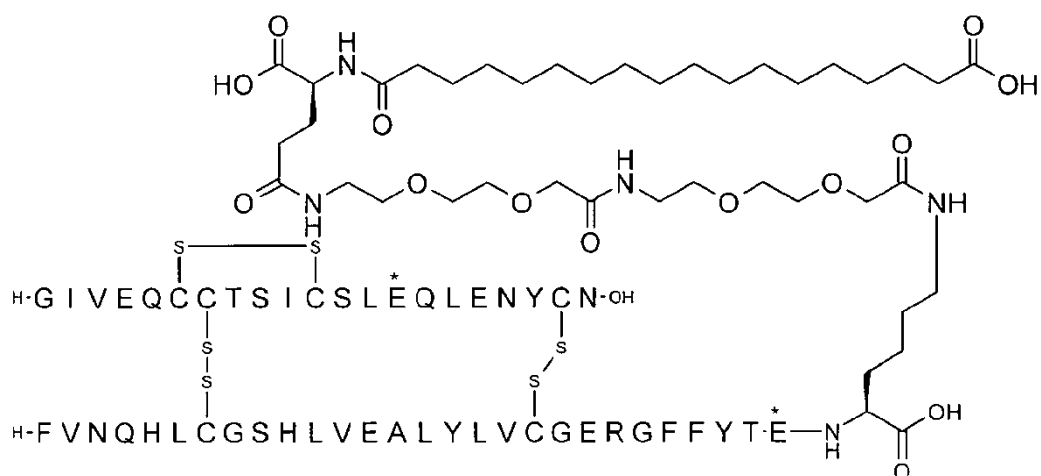
Ejemplo 85, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B28E, B29K(N^EEicosanodioil-γGlu), desB30



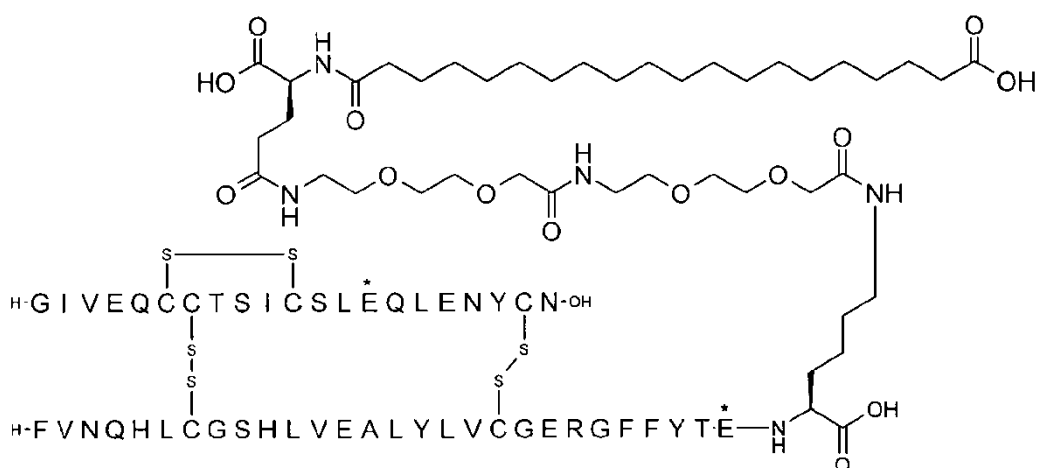
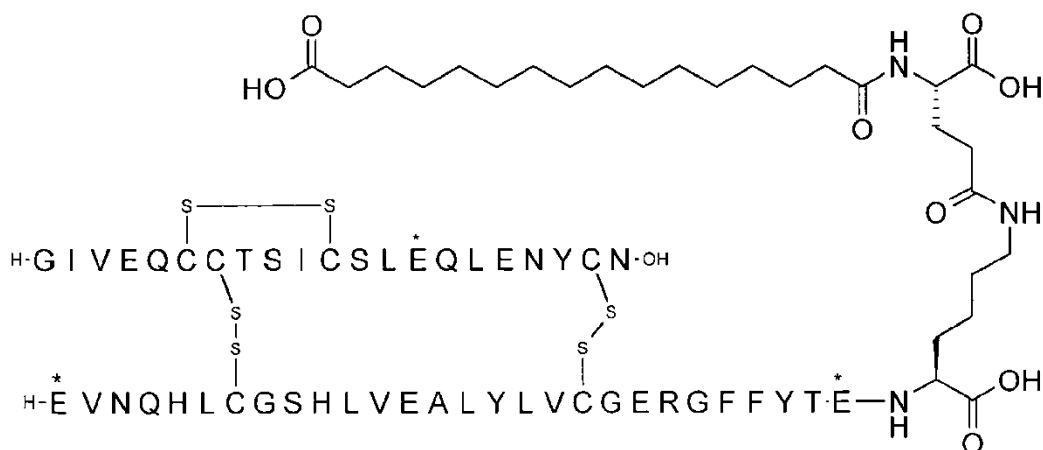
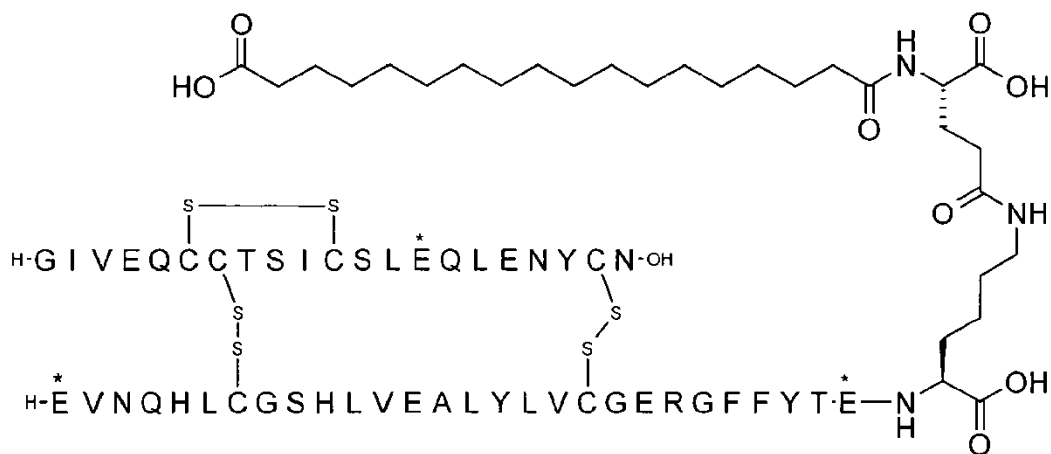
5 **Ejemplo 86, Procedimiento general (A):**

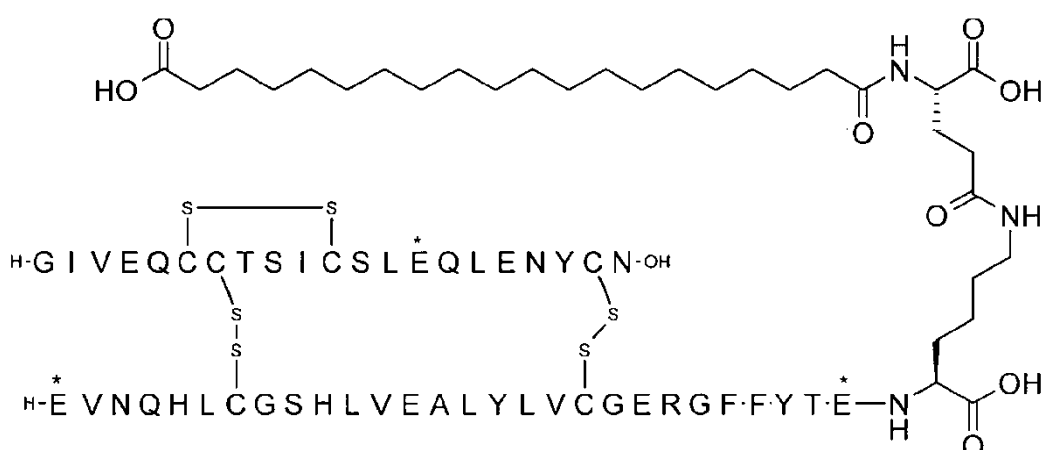
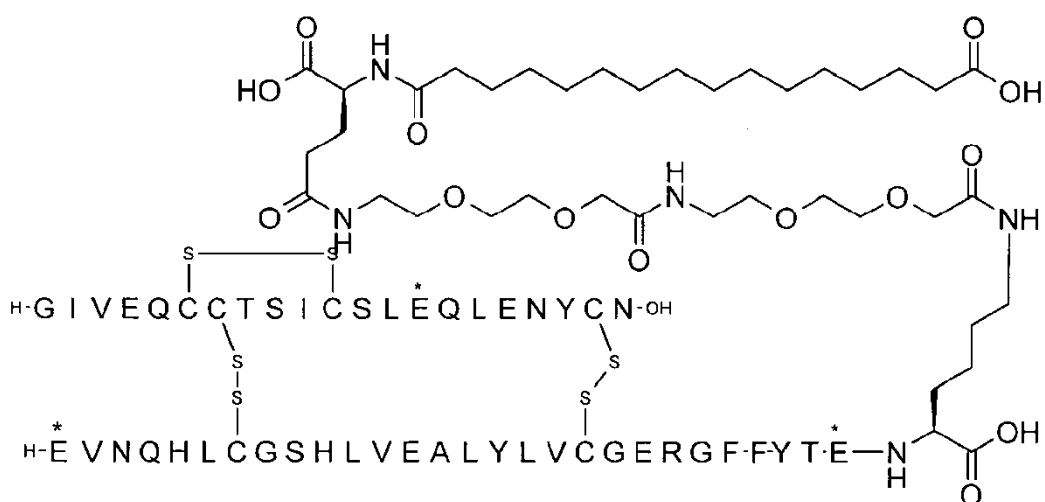
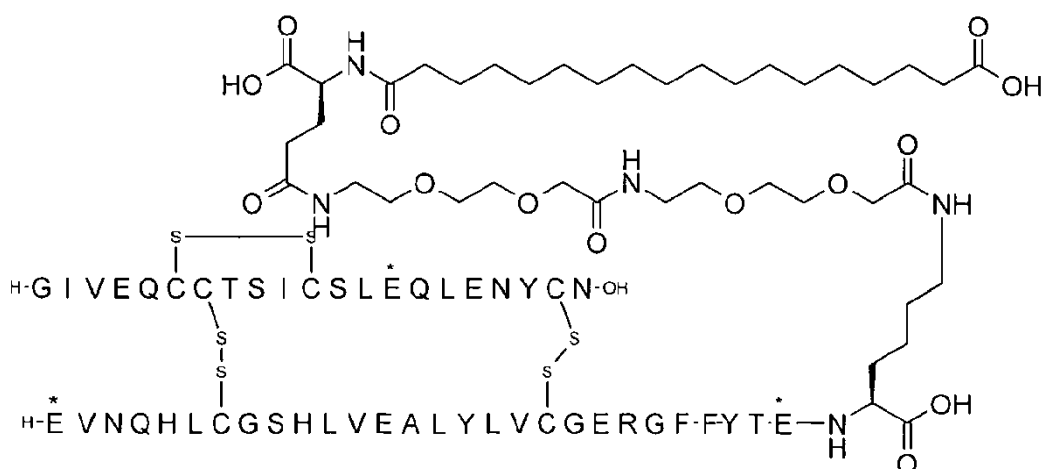
Insulina humana A14E, B28E, B29K(*N*⁶Octadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30

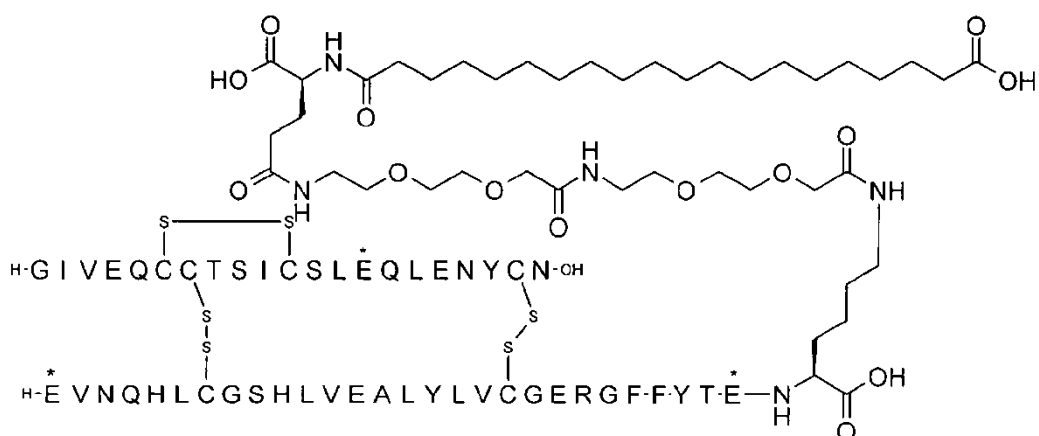


Ejemplo 87, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B28E, B29K(*N*^EEicosanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30

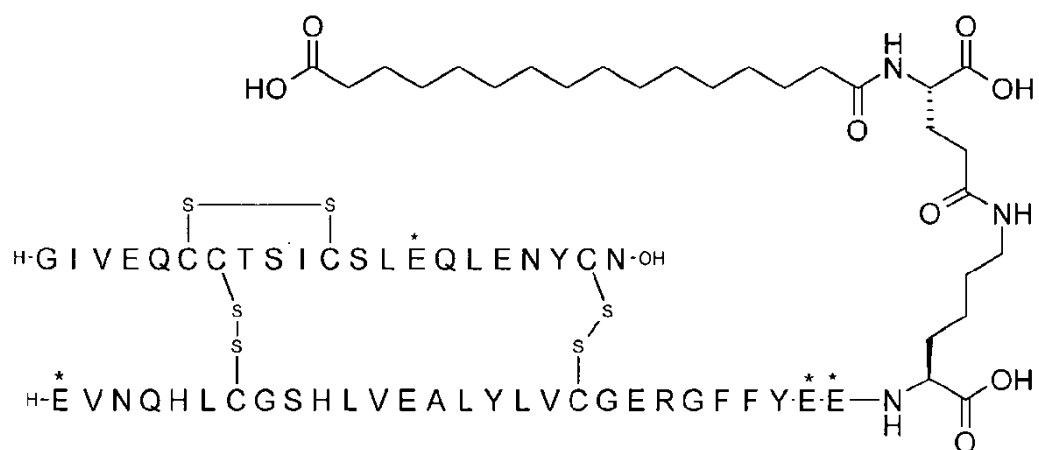
**Ejemplo 88, Procedimiento general (A):**Insulina humana A14E, B1E, B28E, B29K(*N*⁶Hexadecanodioil-γGlu), desB30**5 Ejemplo 89, Procedimiento general (A):**Insulina humana A14E, B1E, B28E, B29K(*N*⁶Octadecanodioil-γGlu), desB30**Ejemplo 90, Procedimiento general (A):**Insulina humana A14E, B1E, B28E, B29K(*N*⁶Eicosanodioil-γGlu), desB30

**Ejemplo 91, Procedimiento general (A):**Insulina humana A14E, B1E, B28E, B29K(*N*⁶Hexadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30**5 Ejemplo 92, Procedimiento general (A):**Insulina humana A14E, B1E, B28E, B29K(*N*⁶Octadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30**Ejemplo 93, Procedimiento general (A):**Insulina humana A14E, B1E, B28E, B29K(*N*⁶Eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



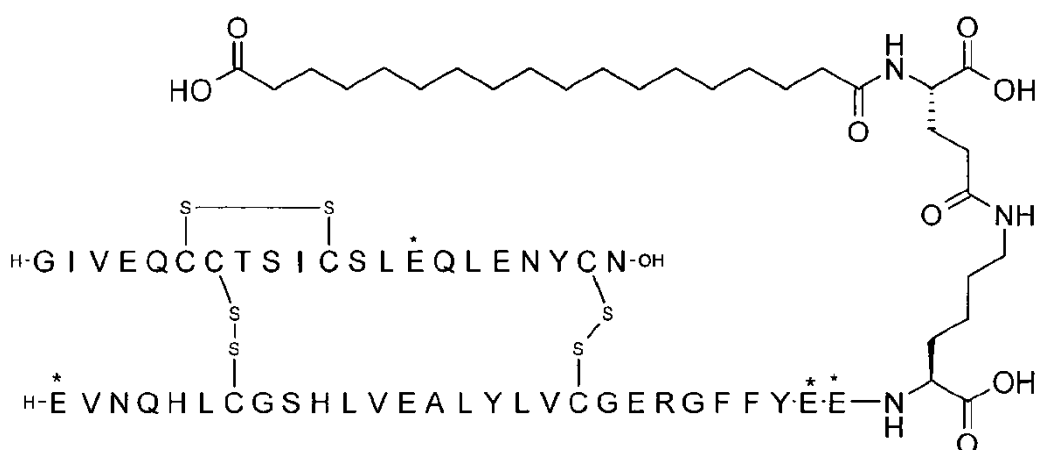
Ejemplo 94, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B1E, B27E, B28E, B29K(N⁶Hexadecanodioil-γGlu), desB30



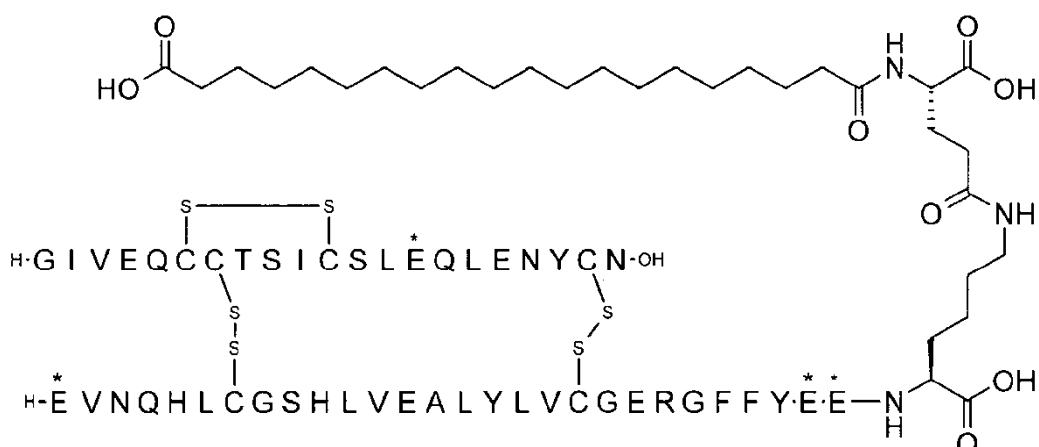
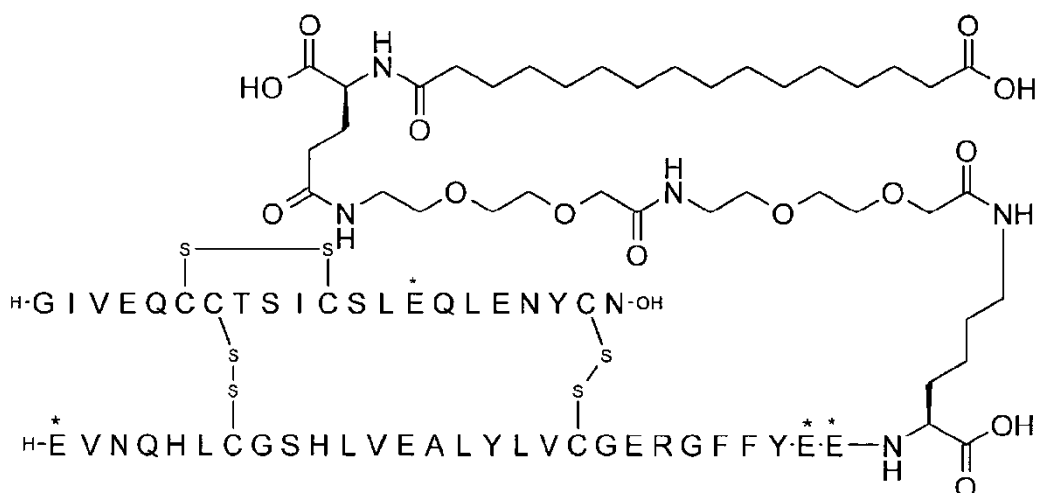
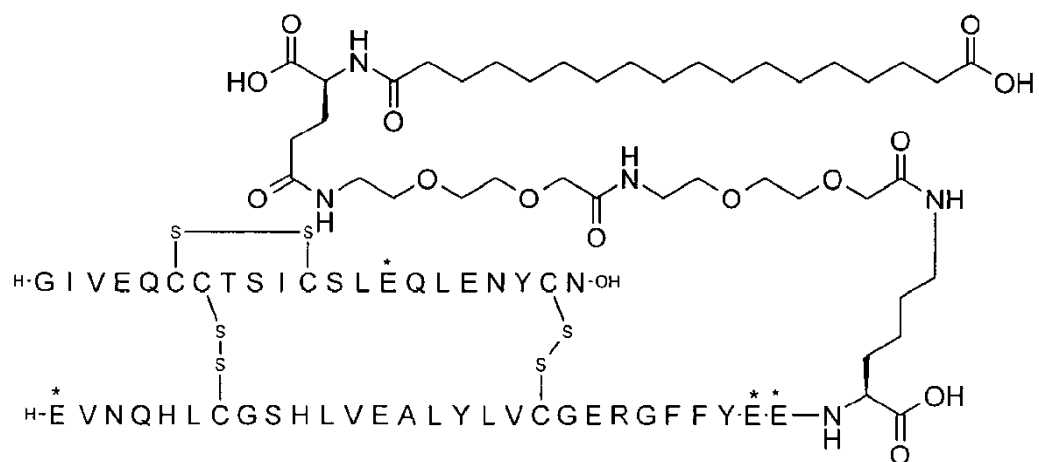
5 **Ejemplo 95, Procedimiento general (A):**

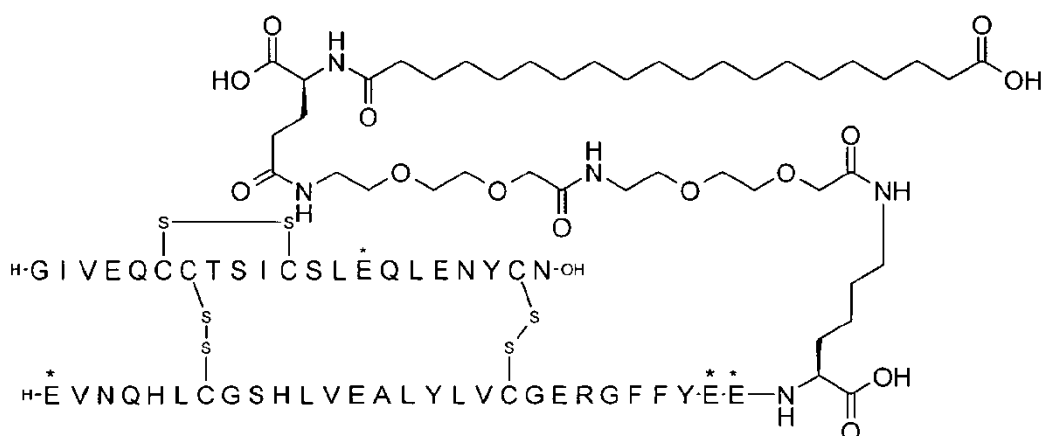
Insulina humana A14E, B1E, B27E, B28E, B29K(N⁶Octadecanodioil-γGlu), desB30



Ejemplo 96, Procedimiento general (A):

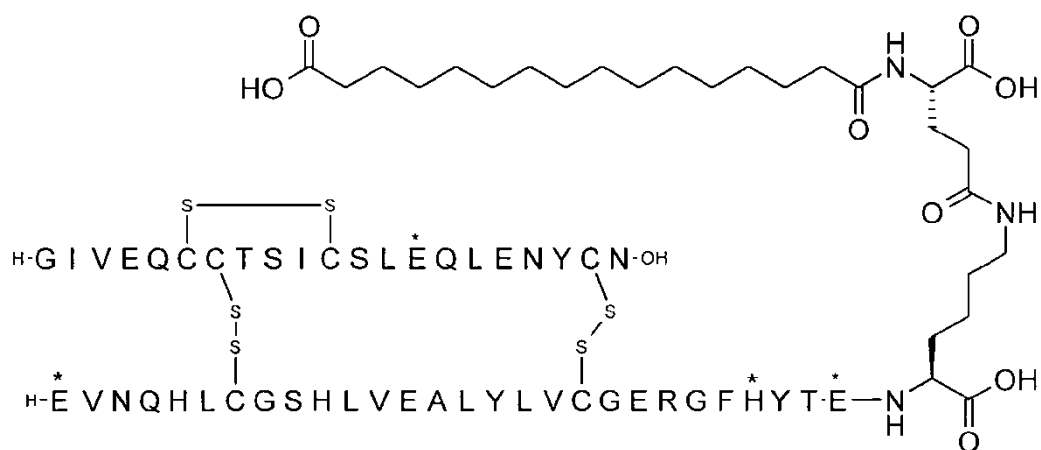
Insulina humana A14E, B1E, B27E, B28E, B29K(N⁶Eicosanodioil-γGlu), desB30

**Ejemplo 97, Procedimiento general (A):**Insulina humana A14E, B1E, B27E, B28E, B29K(N⁶Hexadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30**5 Ejemplo 98, Procedimiento general (A):**Insulina humana A14E, B1E, B27E, B28E, B29K(N⁶Octadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30**Ejemplo 99, Procedimiento general (A):**Insulina humana A14E, B1E, B27E, B28E, B29K(N⁶Eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



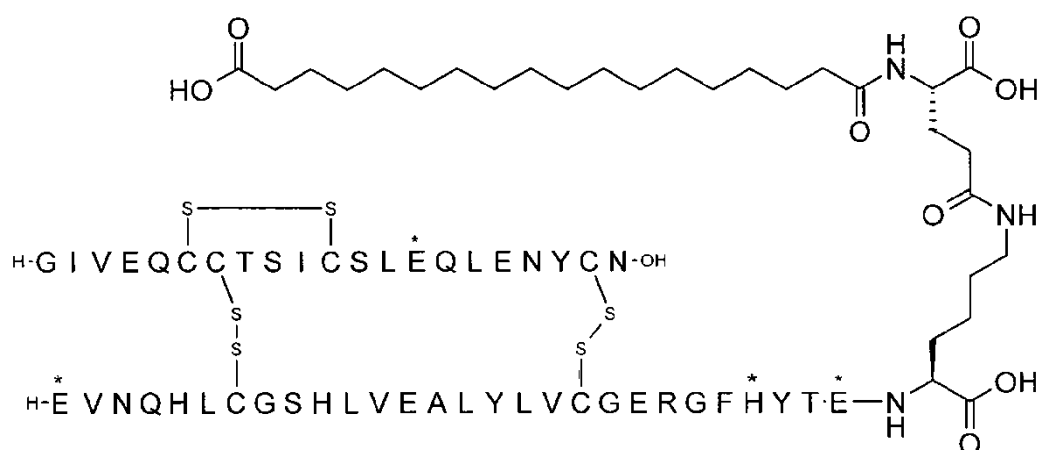
Ejemplo 100, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B1E, B25H, B28E, B29K(N⁶Hexadecanodioil-γGlu), desB30



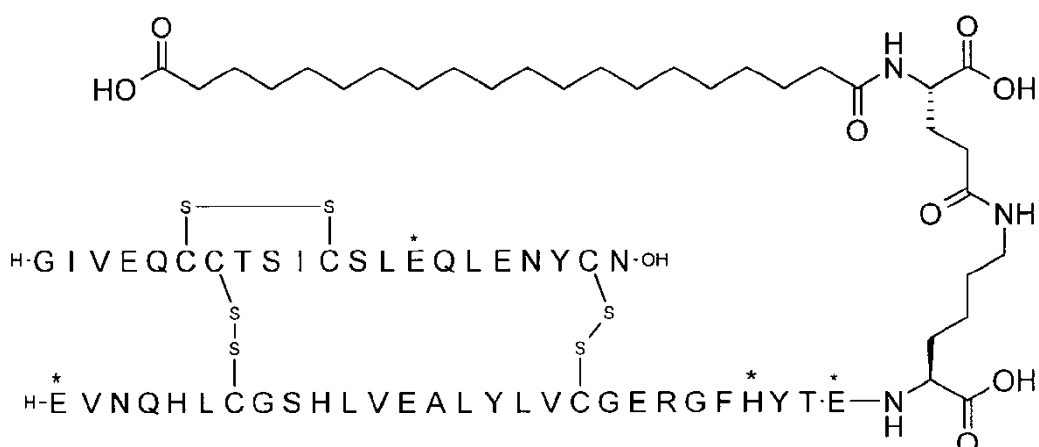
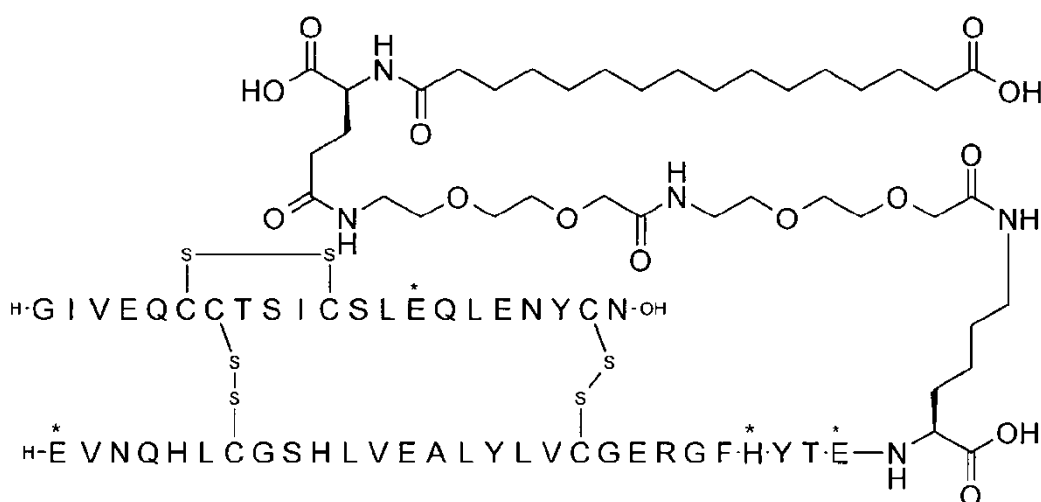
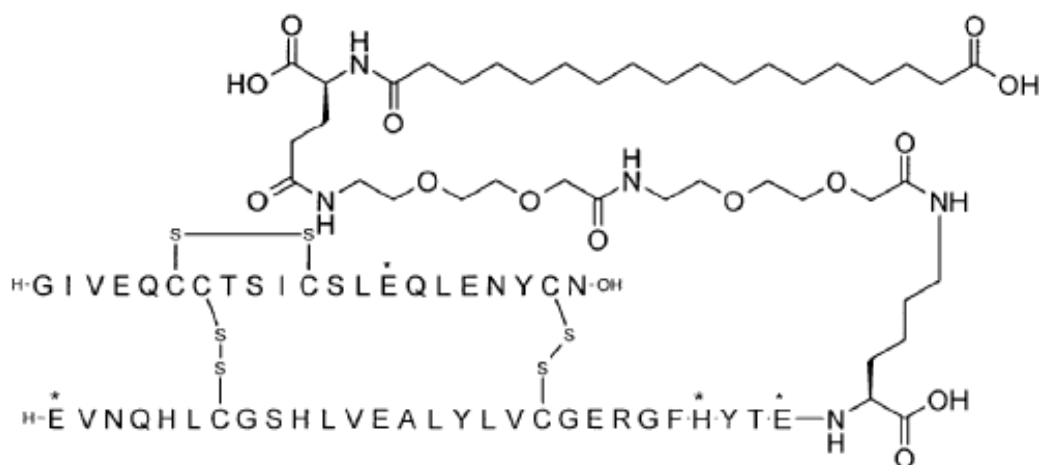
5 Ejemplo 101, Procedimiento general (A):

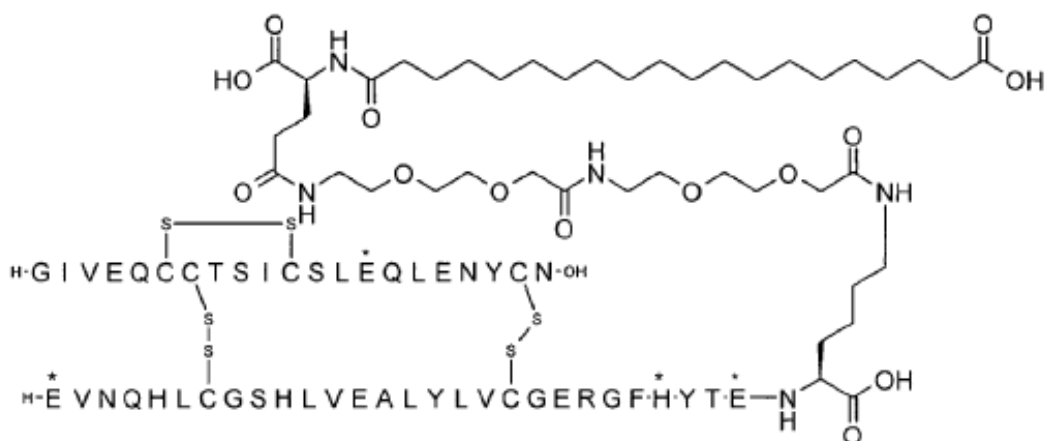
Insulina humana A14E, B1E, B25H, B28E, B29K(N⁶Octadecanodioil-γGlu), desB30



Ejemplo 102, Procedimiento general (A):

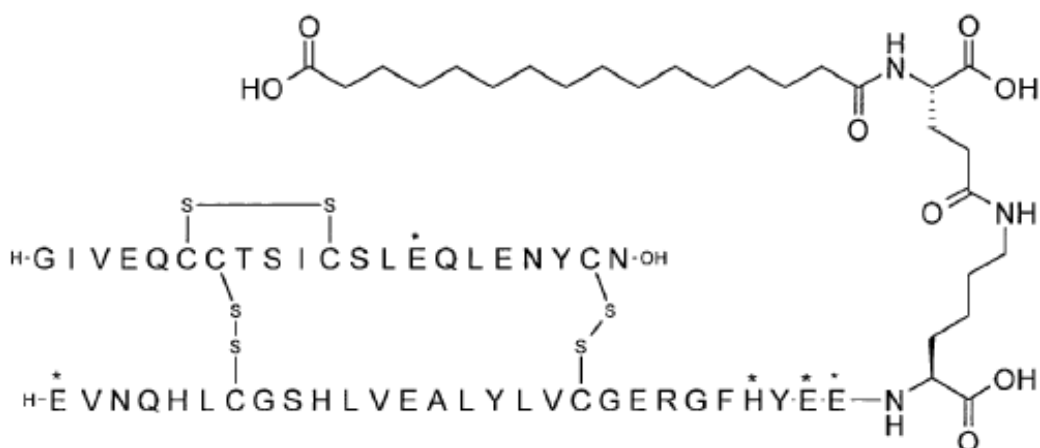
Insulina humana A14E, B1E, B25H, B28E, B29K(N⁶Eicosanodioil-γGlu), desB30

**Ejemplo 103, Procedimiento general (A):**Insulina humana A14E, B1E, B25H, B28E, B29K(N⁶Hexadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30**5 Ejemplo 104, Procedimiento general (A):**Insulina humana A14E, B1E, B25H, B28E, B29K(N⁶Octadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30**Ejemplo 105, Procedimiento general (A):**Insulina humana A14E, B1E, B25H, B28E, B29K(N⁶Eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



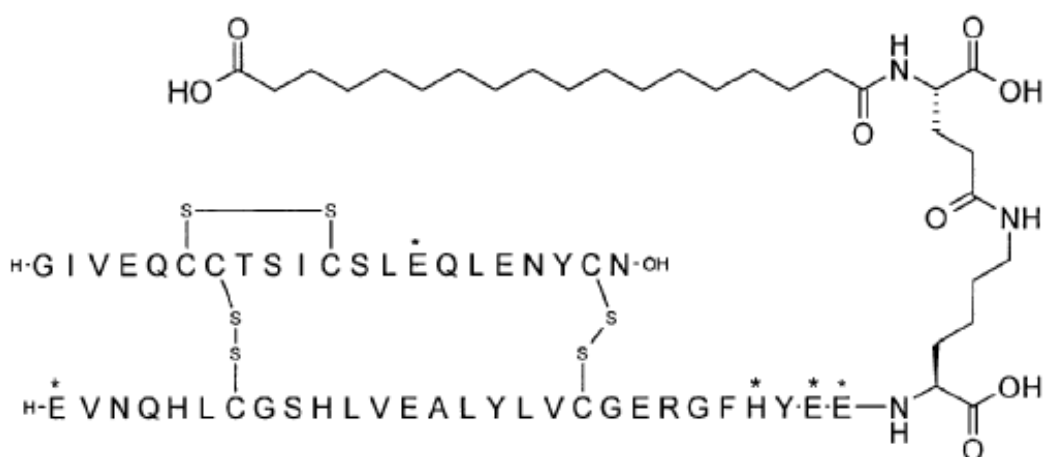
Ejemplo 106, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B1E, B25H, B27E, B28E, B29K(N^fHexadecanodioil-γGlu), desB30



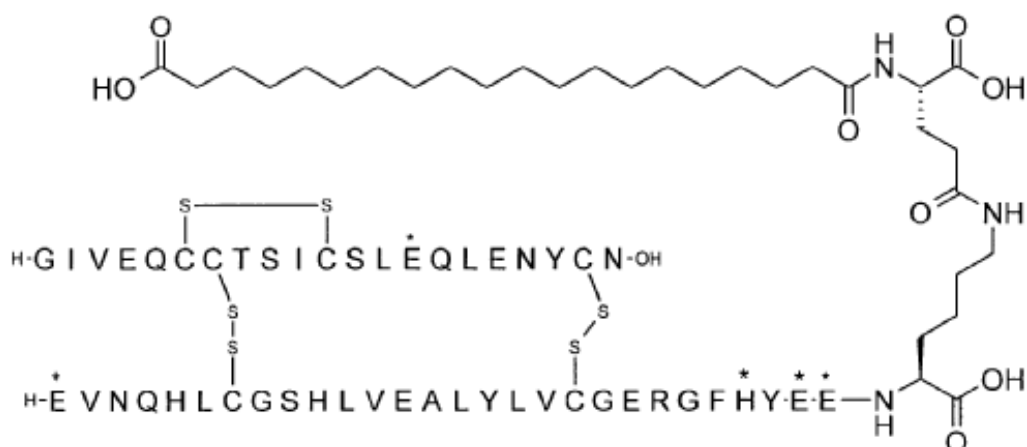
5 **Ejemplo 107, Procedimiento general (A):**

Insulina humana A14E, B1E, B25H, B27E, B28E, B29K(N^fOctadecanodioil-γGlu), desB30



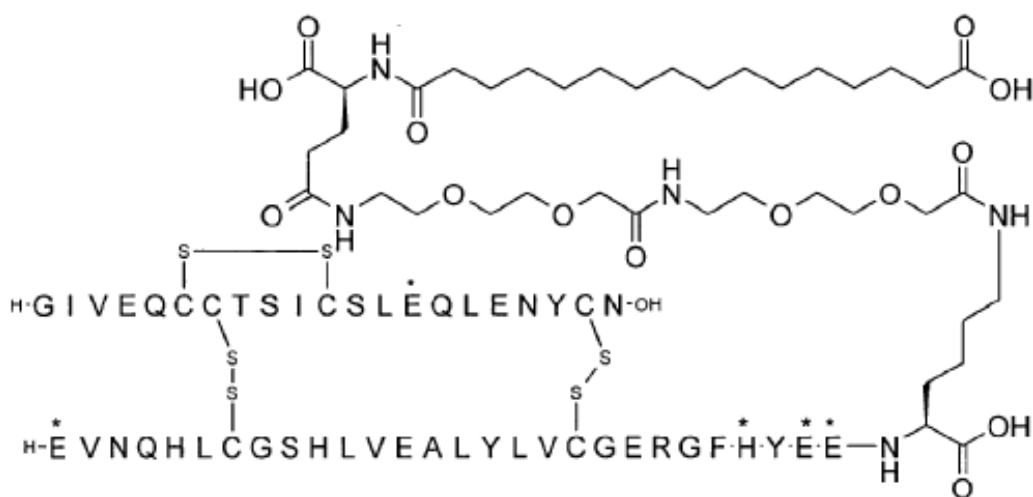
Ejemplo 108, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B1E, B25H, B27E, B28E, B29K(N^fEicosanodioil-γGlu), desB30



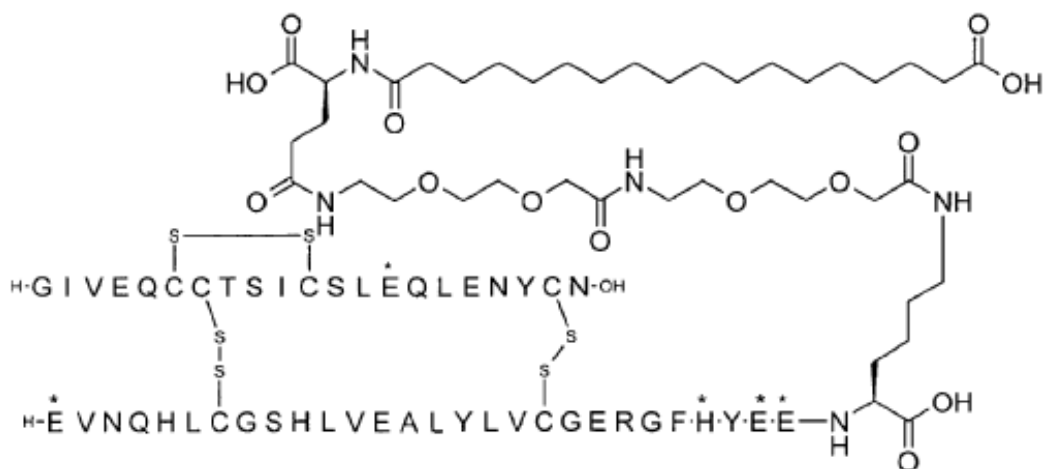
Ejemplo 109, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B1E, B25H, B27E, B28E, B29K(N^EHexadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



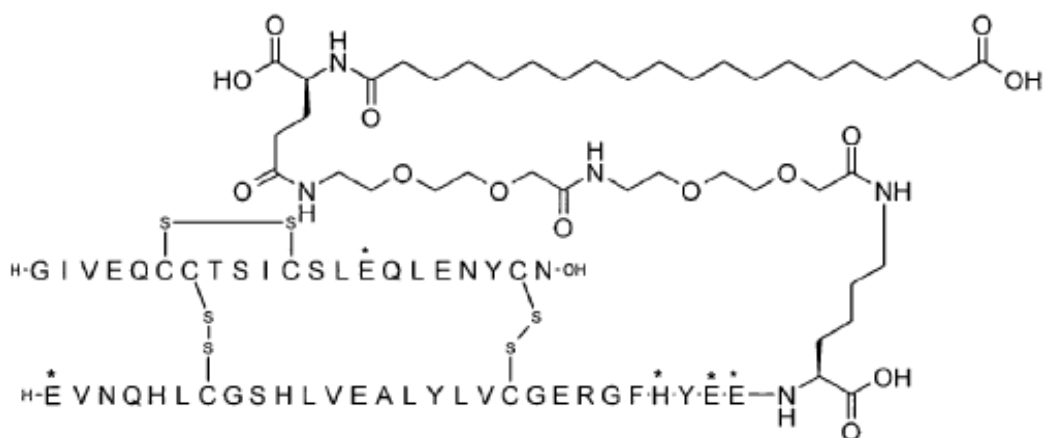
5 **Ejemplo 110, Procedimiento general (A):**

Insulina humana A14E, B1E, B25H, B27E, B28E, B29K(N^EOctadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



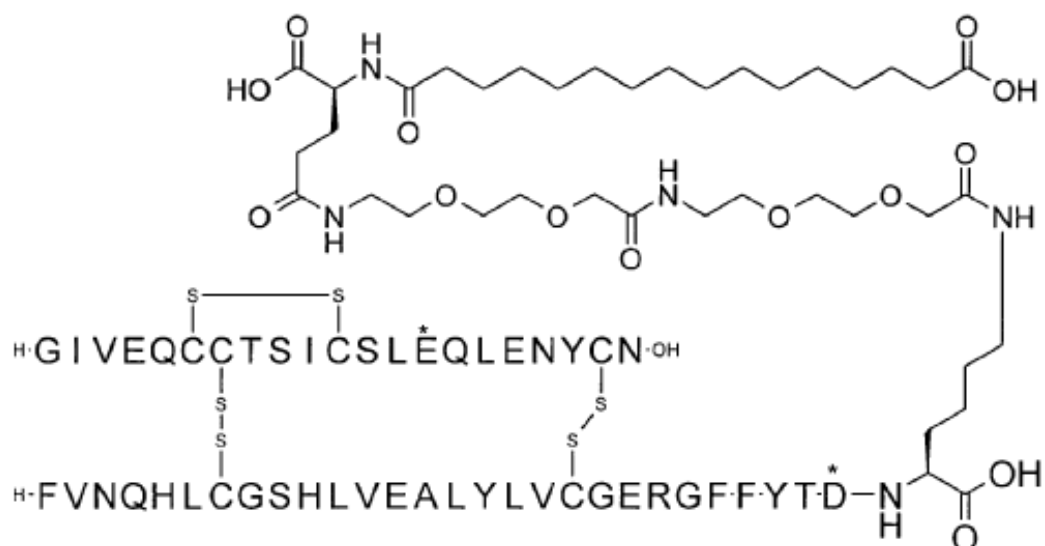
Ejemplo 111, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B1E, B25H, B27E, B28E, B29K(N^EEicosanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



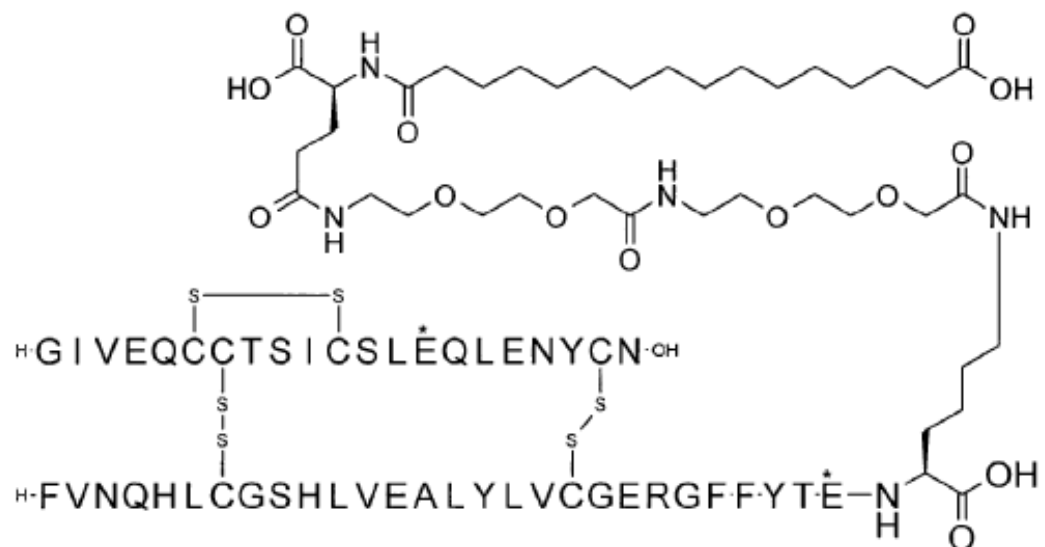
Ejemplo 112, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B28D, B29K(N⁶Hexadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



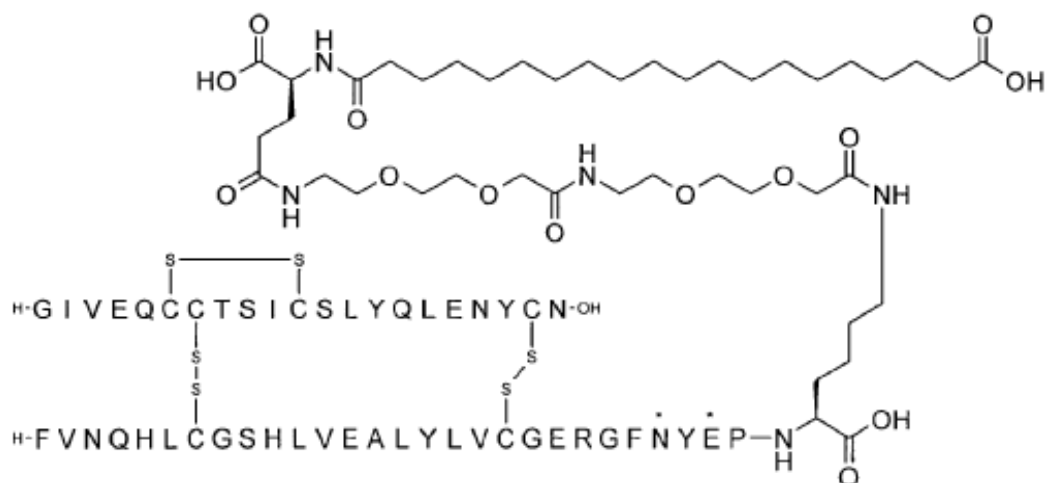
5 Ejemplo 113, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B28E, B29K(N⁶Hexadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



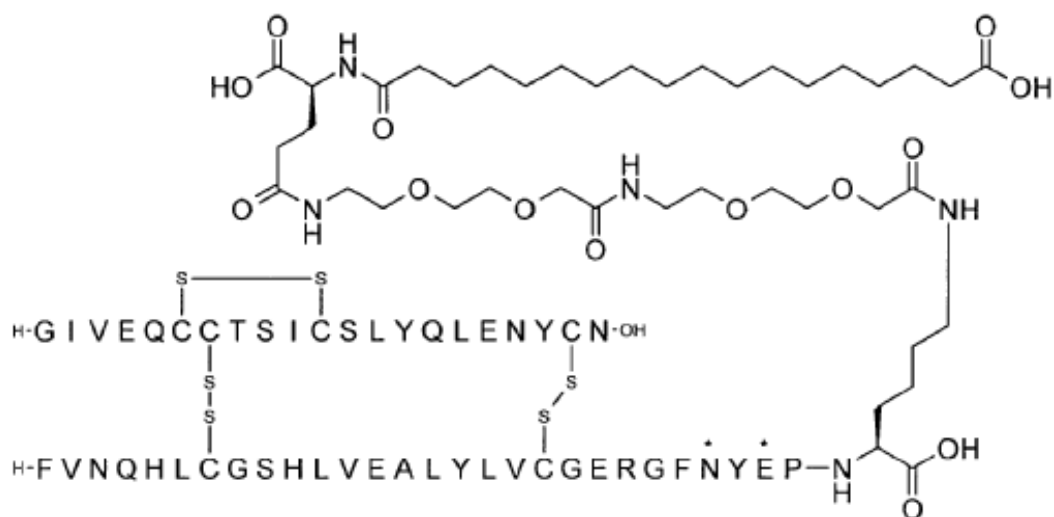
Ejemplo 114, Procedimiento general (A):

Insulina humana B25N, B27E, B29K(*N*^EEicosanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



Ejemplo 115, Procedimiento general (A):

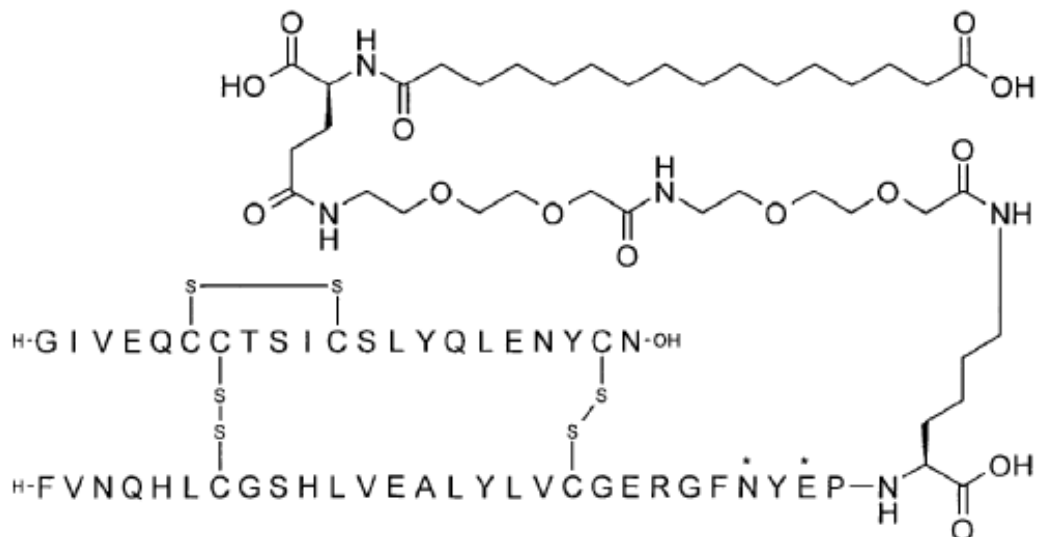
Insulina humana B25N, B27E, B29K(N^oOctadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



5

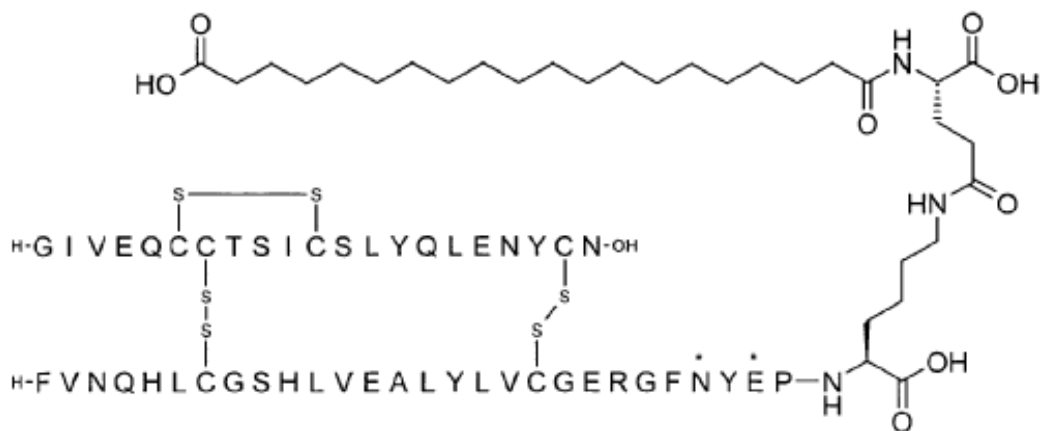
Ejemplo 116, Procedimiento general (A):

Insulina humana B25N, B27E, B29K(N⁶Hexadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



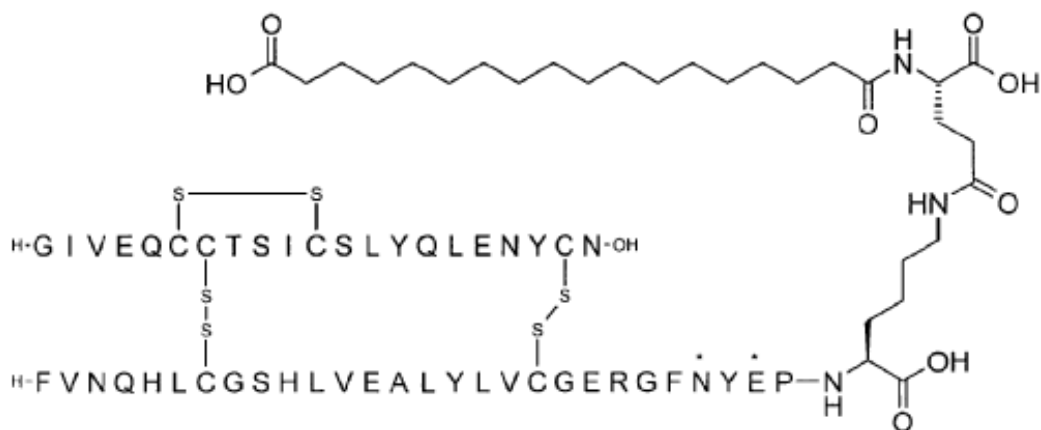
Ejemplo 117, Procedimiento general (A):

Insulina humana B25N, B27E, B29K(N^eEicosanodioil-γGlu), desB30



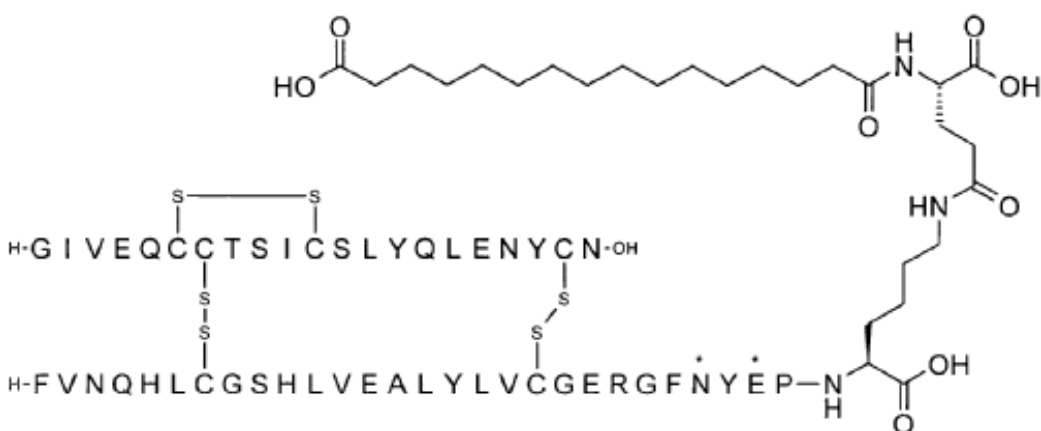
Ejemplo 118, Procedimiento general (A):

5 Insulina humana B25N, B27E, B29K(N^eOctadecanodioil-γGlu), desB30



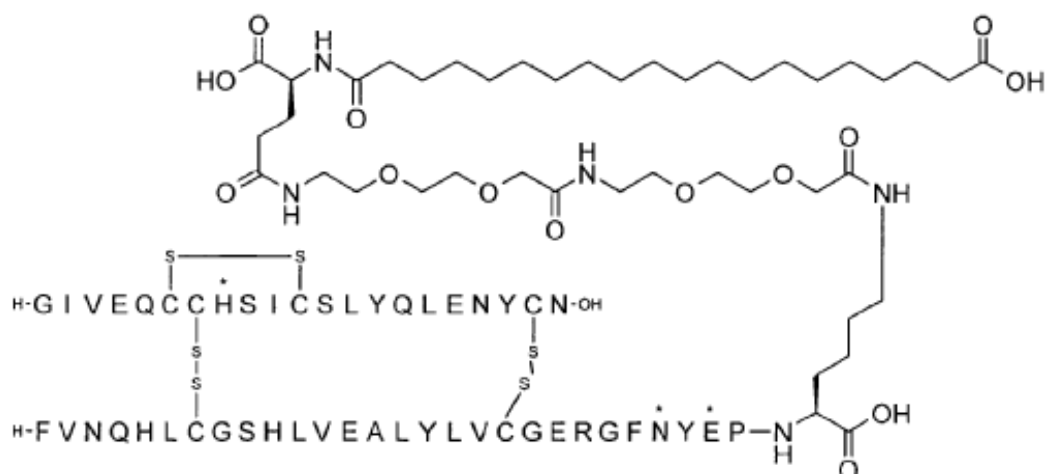
Ejemplo 119, Procedimiento general (A):

Insulina humana B25N, B27E, B29K(N^eHexadecanodioil-γGlu), desB30



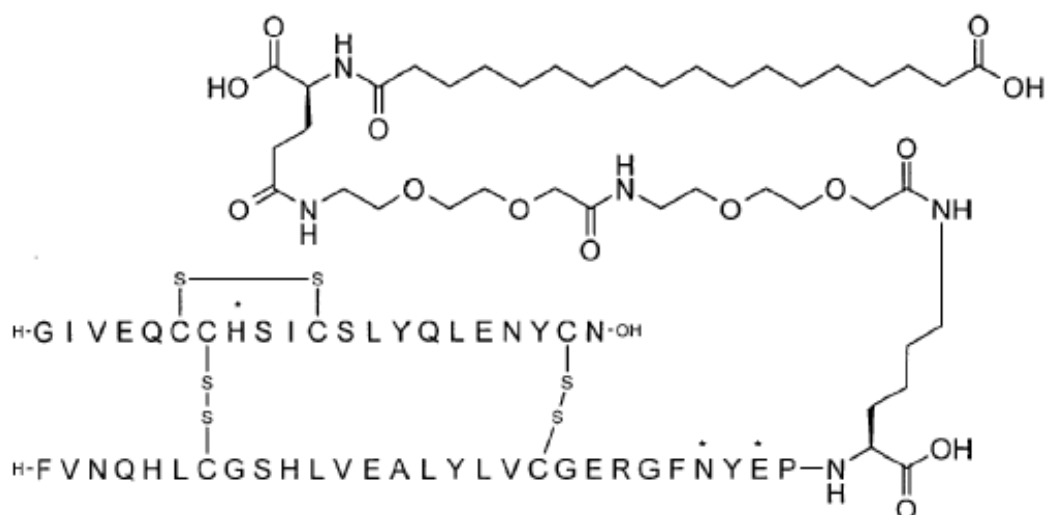
10 **Ejemplo 120, Procedimiento general (A):**

Insulina humana A8H, B25N, B27E, B29K(N^eEicosanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



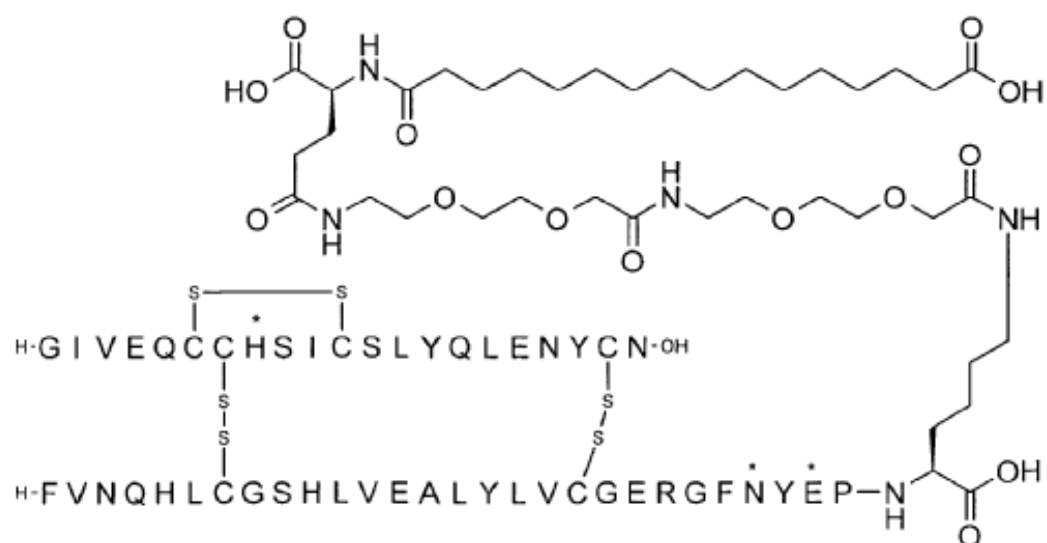
Ejemplo 121, Procedimiento general (A):

Insulina humana A8H, B25N, B27E, B29K(N⁶Octadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



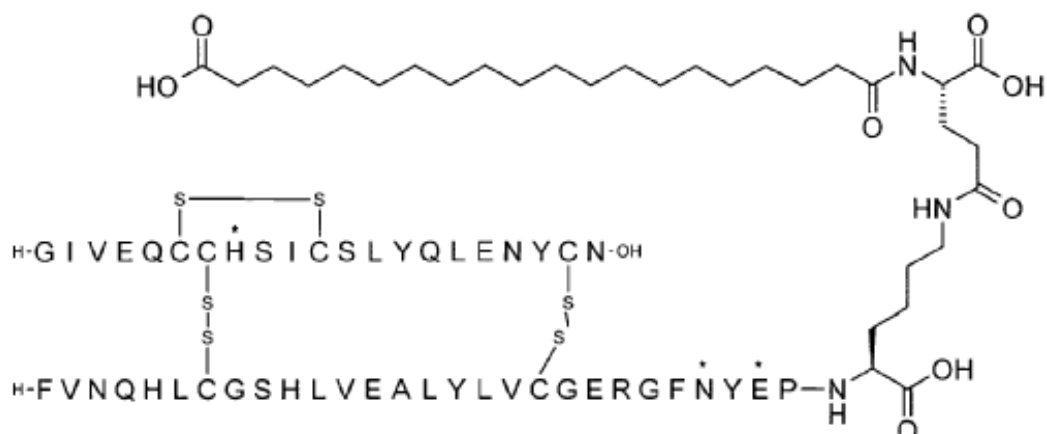
5 **Ejemplo 122, Procedimiento general (A):**

Insulina humana A8H, B25N, B27E, B29K(N⁶Hexadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



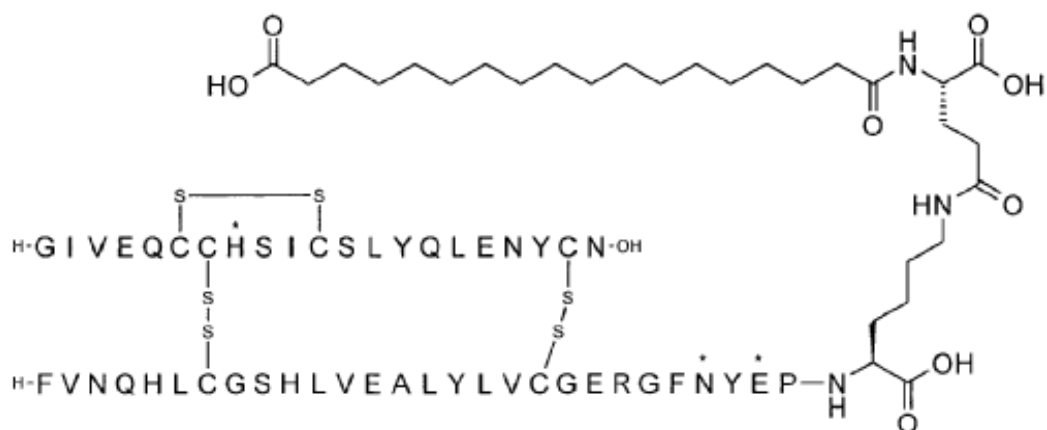
Ejemplo 123, Procedimiento general (A):

Insulina humana A8H, B25N, B27E, B29K(N^eEicosanodioil-γGlu), desB30



Ejemplo 124, Procedimiento general (A):

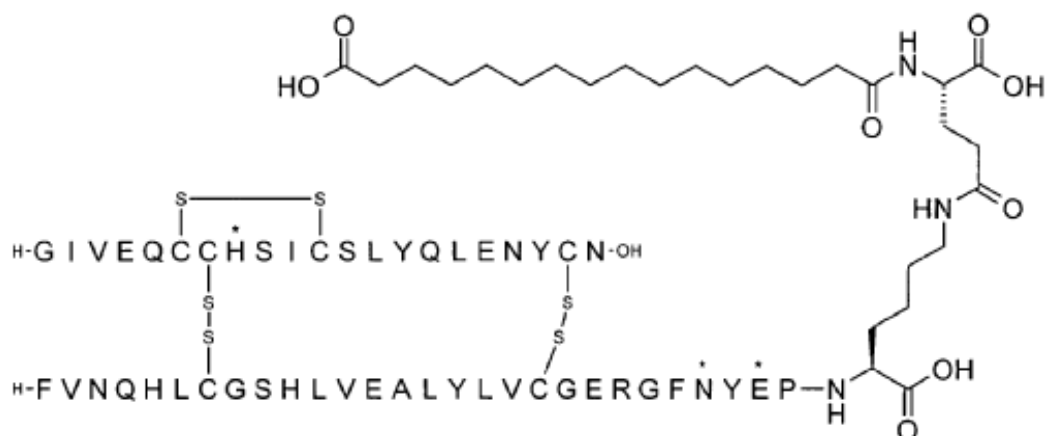
Insulina humana A8H, B25N, B27E, B29K(N^eOctadecanodioil-γGlu), desB30



5

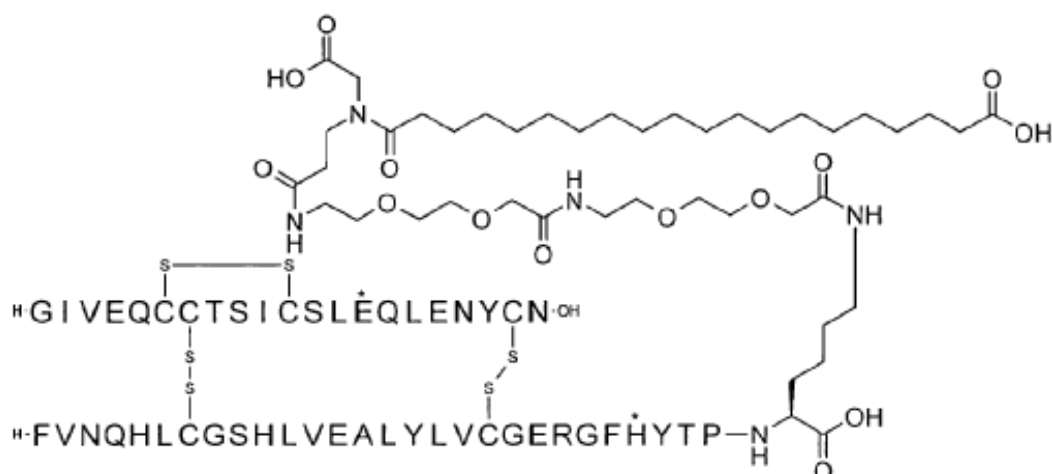
Ejemplo 125, Procedimiento general (A):

Insulina humana A8H, B25N, B27E, B29K(N^eHexadecanodioil-γGlu), desB30



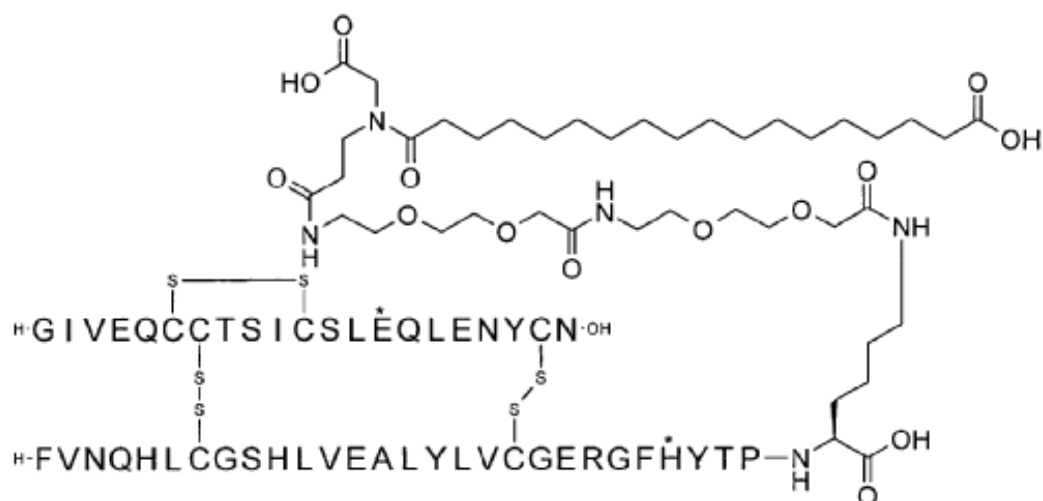
Ejemplo 126, Procedimiento general (A):

10 Insulina humana A14E, B25H, B29K(N^e(N-Icosanodioil-N-carboximetil)-βAla-OEG-OEG), desB30



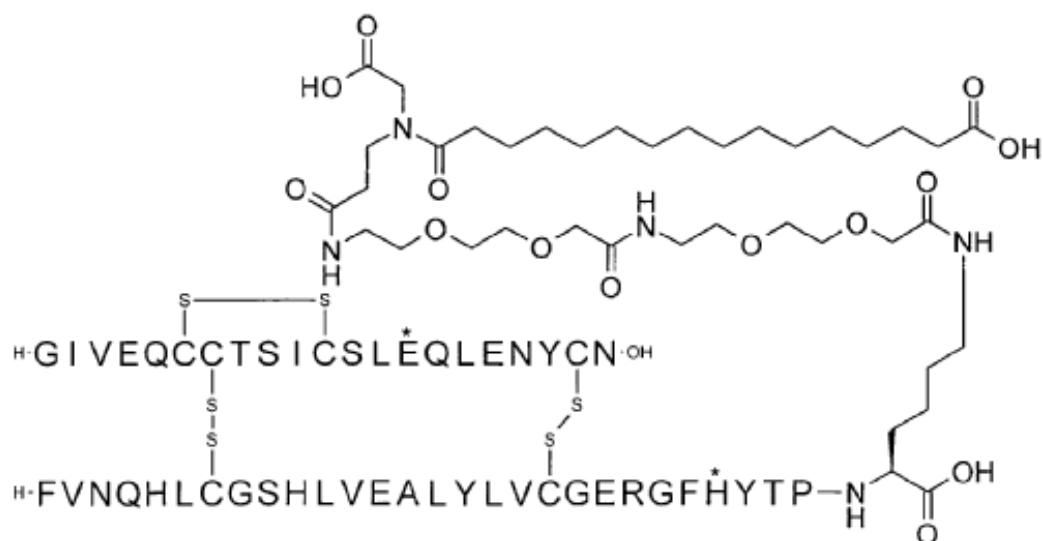
Ejemplo 127, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B25H, B29K(N^ε(N-Octadecanodioil-N-carboximetil)-βAla-OEG-OEG), desB30



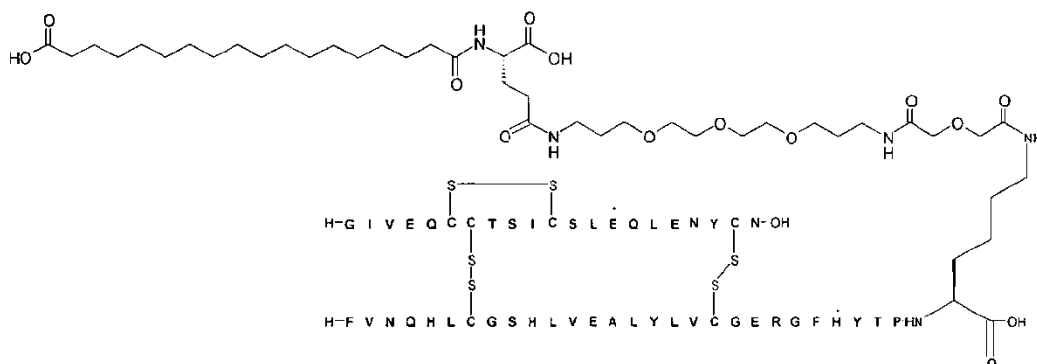
5 Ejemplo 128, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B25H, B29K(N^ε(N-Hexadecanodioil-N-carboximetil)-βAla-OEG-OEG), desB30



Ejemplo 129, Procedimiento general (A):

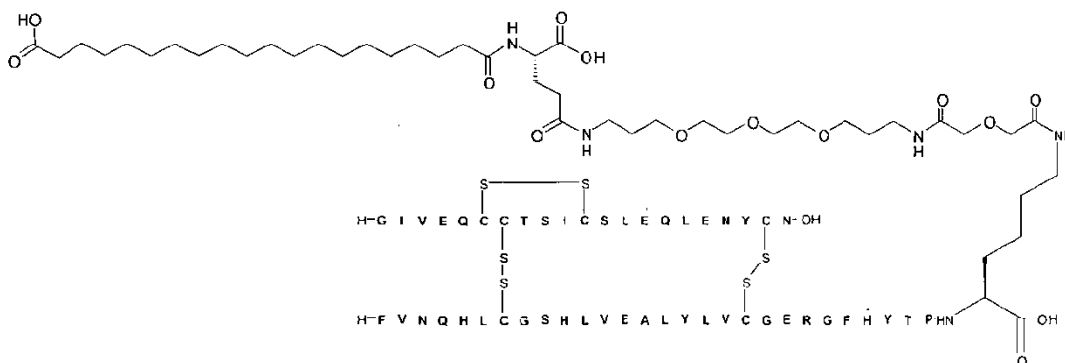
Insulina humana A14E, B25H, B29K(*N*-octadecanodioil-γGlu-2-[(3-{2-[2-(3-aminopropoxi)etoxi]etoxi}propilcarbamoil)metoxi]acetilo), desB30



- 5 El ácido [(3-{2-[2-(3-aminopropoxi)etoxi]etoxi}propilcarbamoil)metoxi]acético se puede preparar como se ha descrito (Eur. J. Med. Chem. 2007, 42, 114) y se hace reaccionar con ω-(*terc*-butil-carboxi-heptadecanoil-γ-L-glutamyl(OSu)-OtBu. El producto se puede activar usando TSTU y acoplado a insulina humana A14E, B25H, desB30 en Na₂CO₃ 0,1 M a pH 10,5, para proporcionar el producto.

Ejemplo 130, Procedimiento general (A):

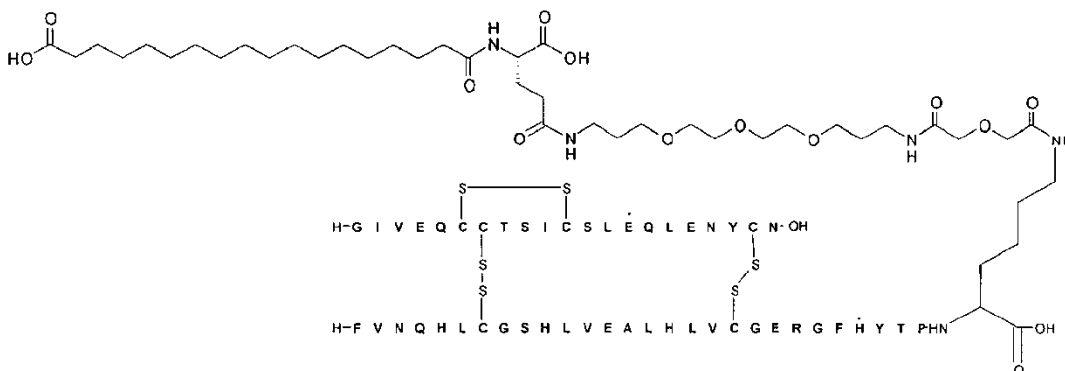
10 Insulina humana A14E, B25H, B29K(*N*-eicosanodioil-γGlu-2-[(3-{2-[2-(3-aminopropoxi)etoxi]etoxi}propilcarbamoil)metoxi]acetilo), desB30



- 15 El ácido [(3-{2-[2-(3-aminopropoxi)etoxi]etoxi}propilcarbamoil)metoxi]acético se puede preparar como se ha descrito (Eur. J. Med. Chem. 2007, 42, 114) y hacer reaccionar con ε-(*terc*-butil-carboxi-nonadecanoil-γ-L-glutamyl(OSu)-OtBu. El producto se puede activar usando TSTU y acoplado a insulina humana A14E, B25H, desB30 en Na₂CO₃ 0,1 M a pH 10,5 para proporcionar el producto.

Ejemplo 131, Procedimiento general (A):

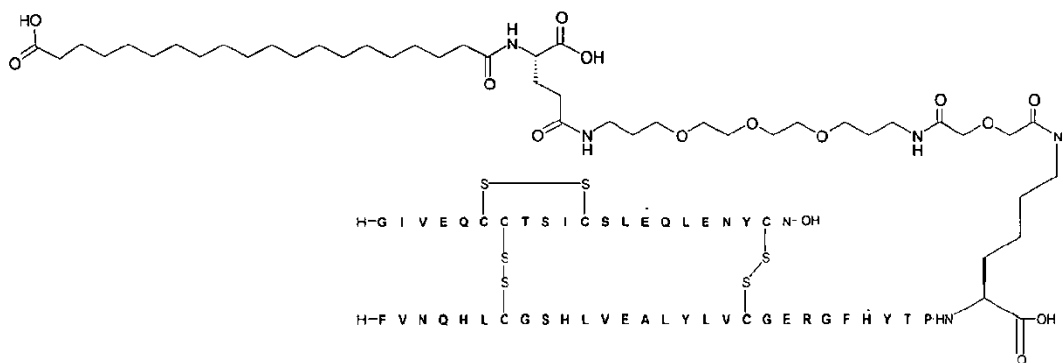
Insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K(*N*-Octadecanodioil-γGlu-2-[(3-{2-[2-(3-aminopropoxi)etoxi]etoxi}propilcarbamoil)metoxi]acetilo), desB30



El ácido [(3-{2-[2-(3-aminopropoxi)etoxi]etoxi}propilcarbamoil)metoxi]acético se puede preparar como se ha descrito (Eur. J. Med. Chem. 2007, 42, 114) y hacer reaccionar con ω -(*terc*-butil-carboxi-heptadecanoil- γ -L-glutamyl(OSu)-OtBu. El producto se puede activar usando TSTU y acoplado a insulina humana A14E, B16H, B25H, desB30 en Na_2CO_3 0,1 M a pH 10,5 para proporcionar el producto.

5 **Ejemplo 132, Procedimiento general (A):**

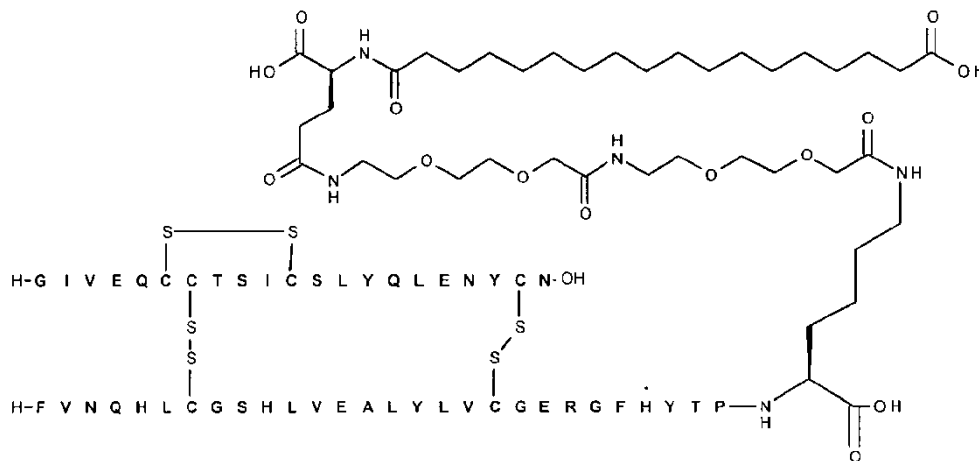
Insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K(*N*⁶Eicosanodioil- γ Glu-2-[(3-{2-[2-(3-aminopropoxi)etoxi]etoxi}propilcarbamoil)metoxi]acetilo), desB30



10 El ácido [(3-{2-[2-(3-aminopropoxi)etoxi]etoxi}propilcarbamoil)metoxi]acético se puede preparar como se ha descrito (Eur. J. Med. Chem. 2007, 42, 114) y hacer reaccionar con ω -(*terc*-butil-carboxi-nonadecanoil- γ -L-glutamyl(OSu)-OtBu. El producto se puede activar usando TSTU y acoplado a insulina humana A14E, B16H, B25H, desB30 en Na_2CO_3 0,1 M a pH 10,5 para proporcionar el producto.

Ejemplo 133, Procedimiento general (A):

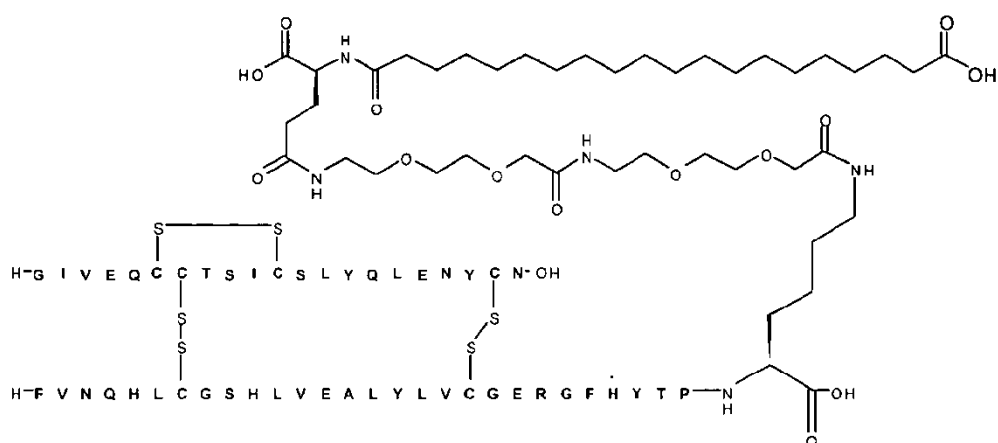
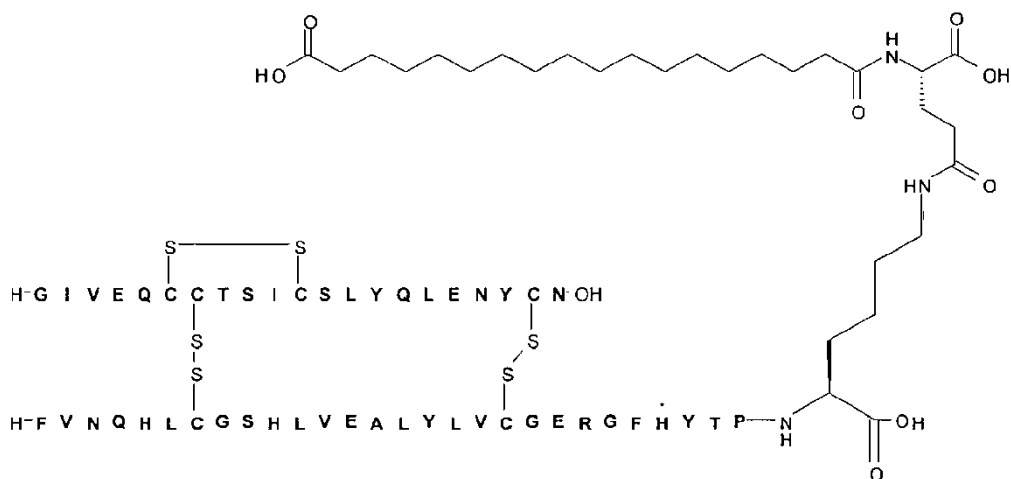
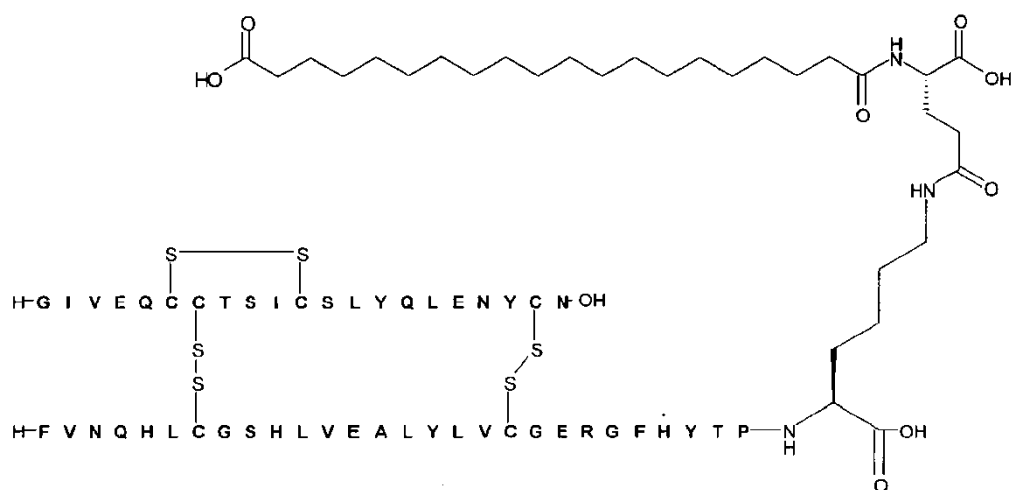
Insulina humana B25H, B29K(*N*⁶Octadecanodioil- γ Glu-OEG-OEG), desB30

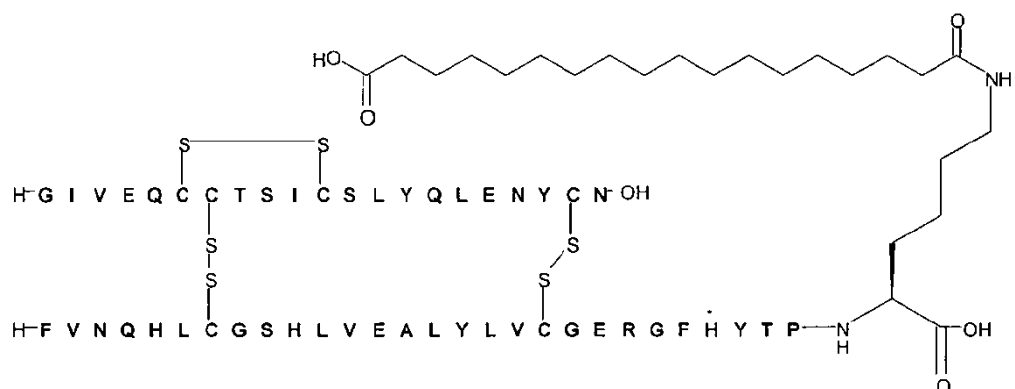


15

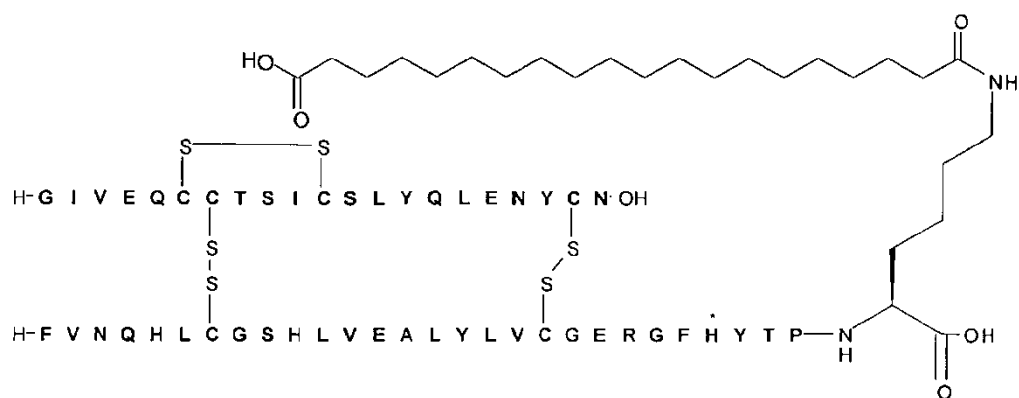
Ejemplo 134, Procedimiento general (A):

Insulina humana B25H, B29K(*N*⁶Eicosanodioil- γ Glu-OEG-OEG), desB30

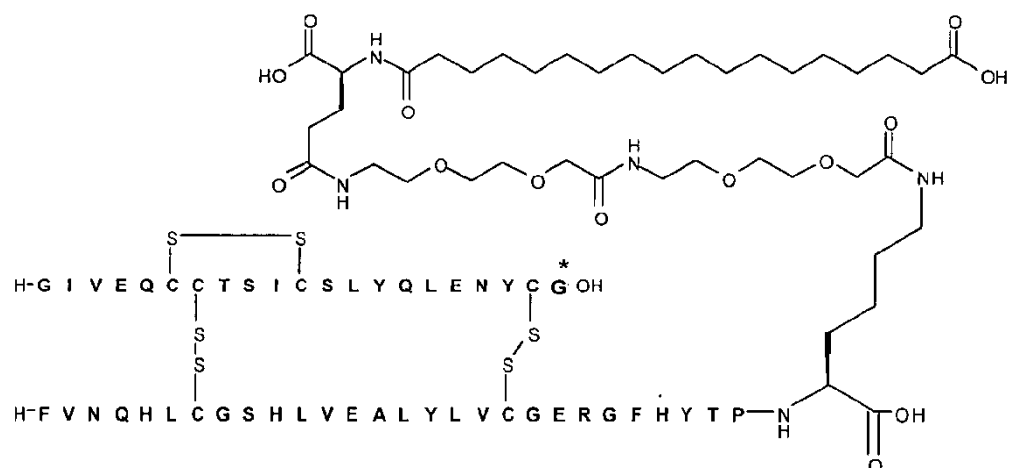
**Ejemplo 135, Procedimiento general (A):**Insulina humana B25H, B29K(*N*⁶Octadecanodioil-γGlu), desB30**5 Ejemplo 136, Procedimiento general (A):**Insulina humana B25H, B29K(*N*⁶Eicosanodioil-γGlu), desB30**Ejemplo 137, Procedimiento general (A):**Insulina humana B25H, B29K(*N*⁶Octadecanodioilo), desB30



Ejemplo 138, Procedimiento general (A):

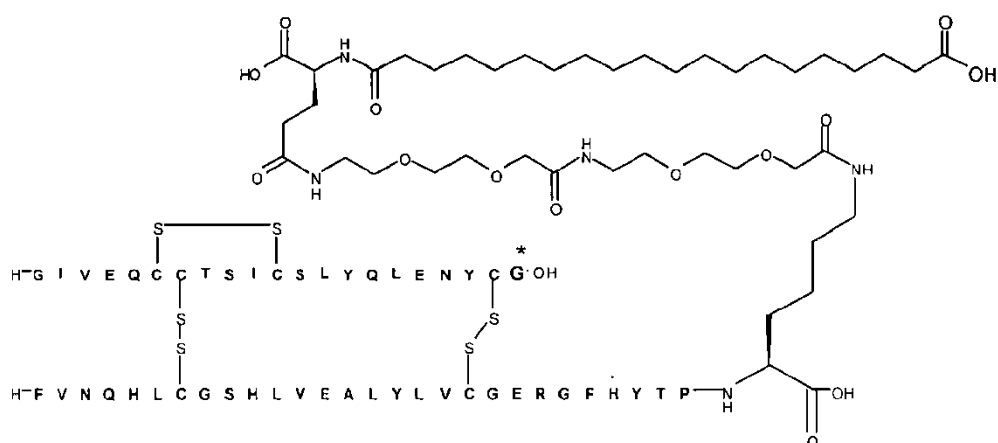
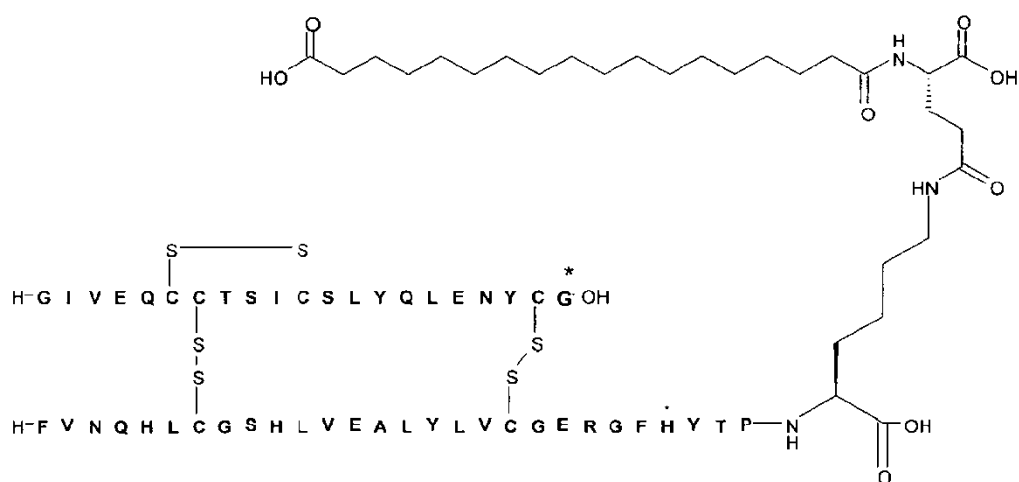
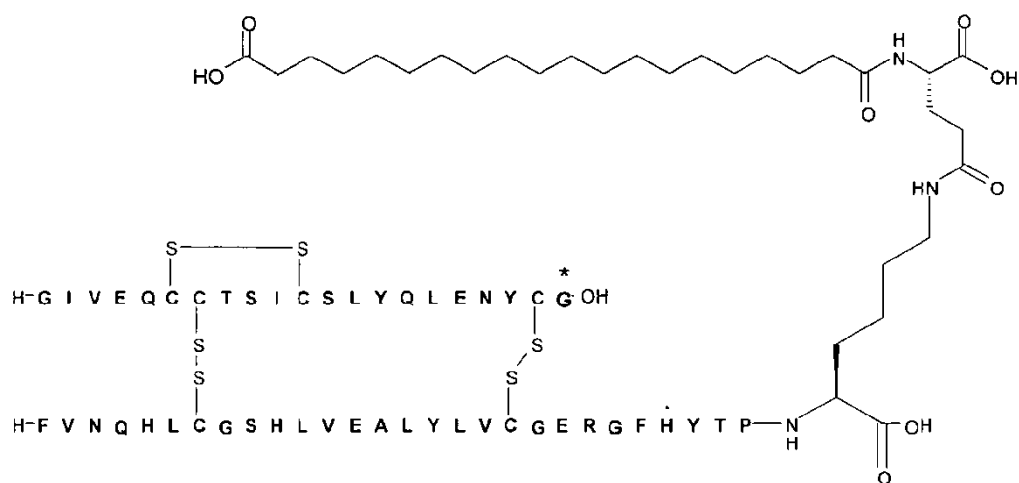
Insulina humana B25H, B29K(N^εEicosanodioilo), desB30

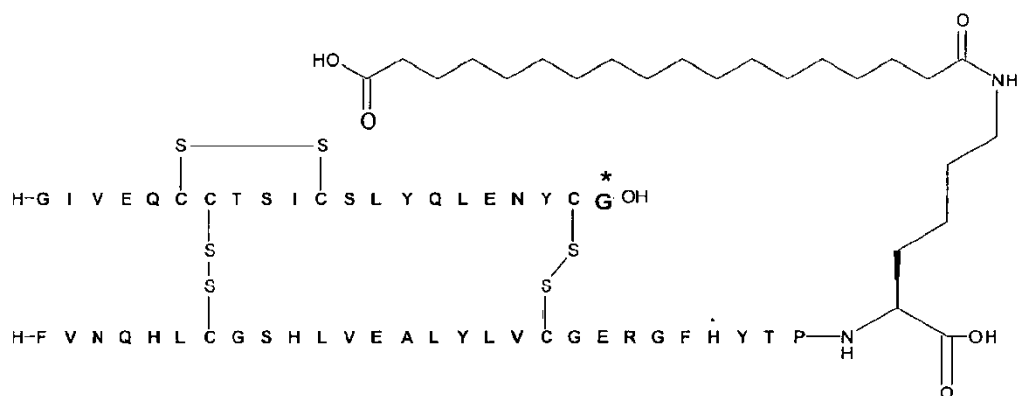
5 **Ejemplo 139, Procedimiento general (A):**

Insulina humana B25H, B29K(N⁶Octadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30

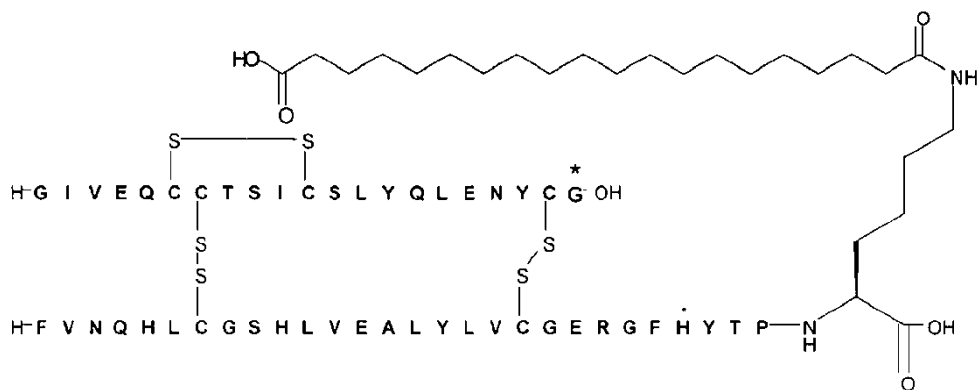
Ejemplo 140, Procedimiento general (A):

Insulina humana B25H, B29K(N⁶Eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30

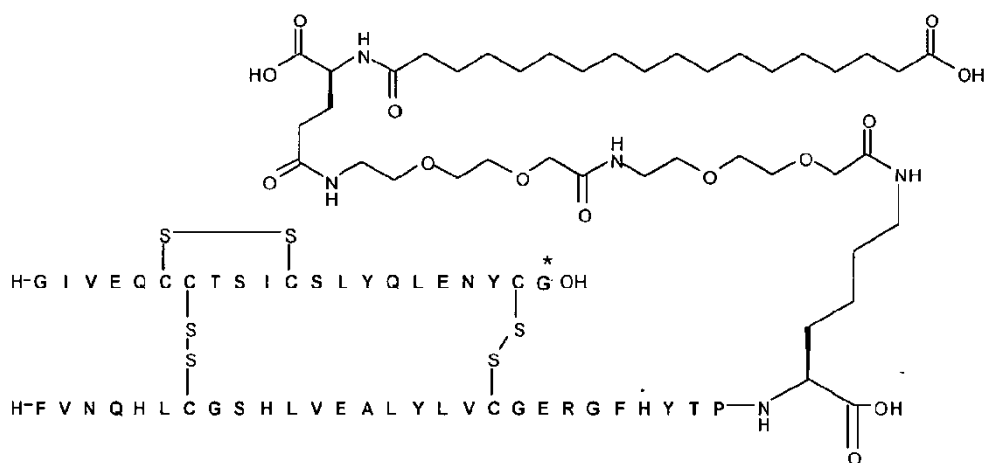
**Ejemplo 141, Procedimiento general (A):**Insulina humana B25H, B29K(*N*^εOctadecanodioil-γGlu), desB30**5 Ejemplo 142, Procedimiento general (A):**Insulina humana B25H, B29K(*N*^εEicosanodioil-γGlu), desB30**Ejemplo 143, Procedimiento general (A):**Insulina humana A21G, B25H, B29K(*N*^εOctadecanodioilo), desB30

**Ejemplo 144, Procedimiento general (A):**

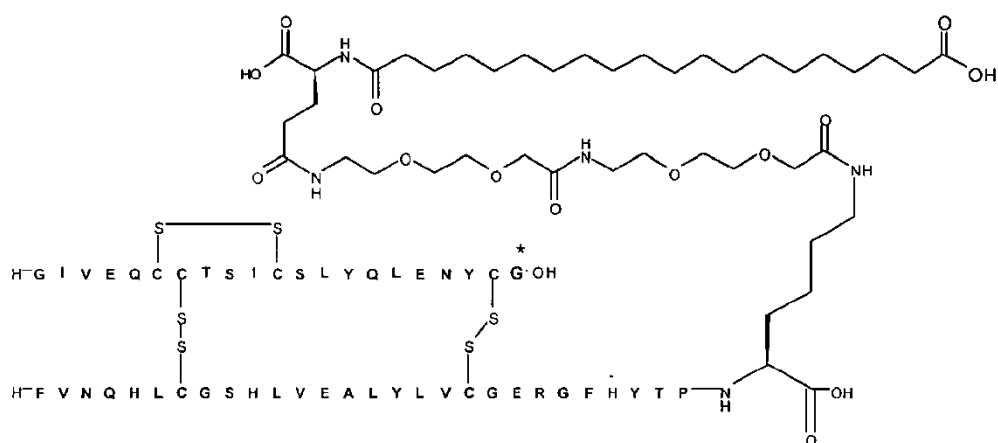
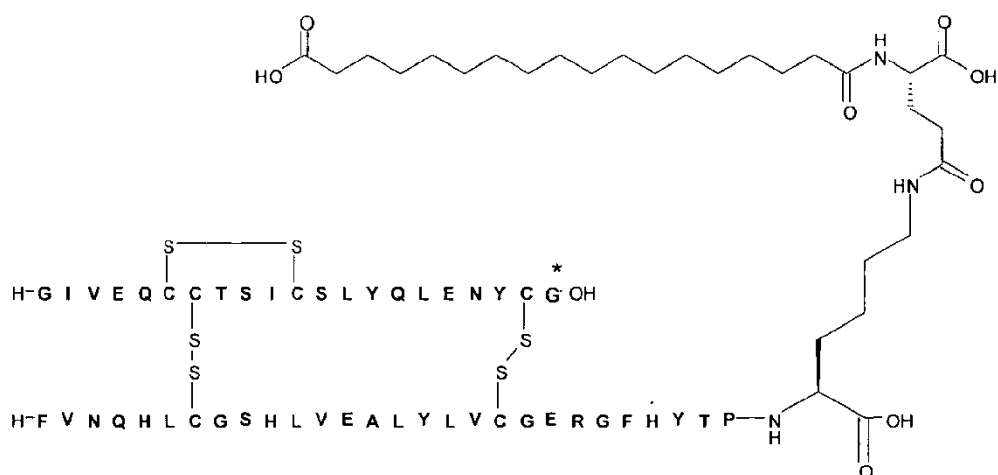
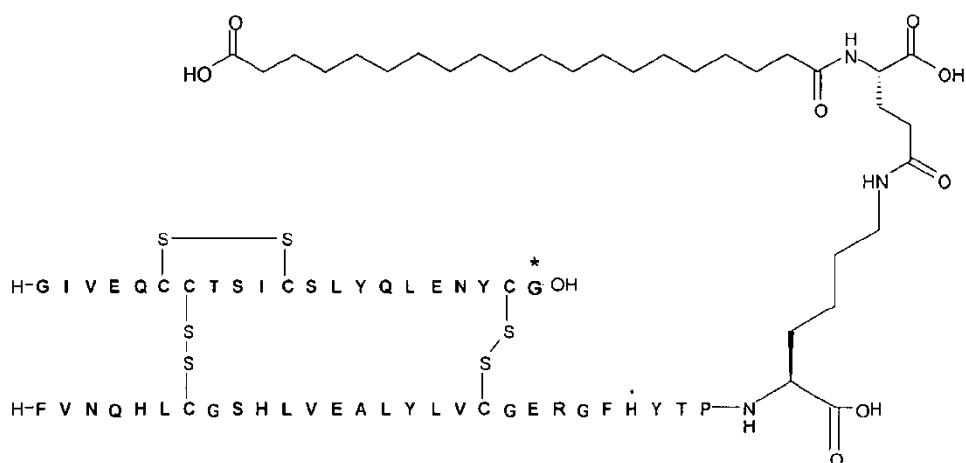
Insulina humana A21G, B25H, B29K(N^EEicosanodioilo), desB30

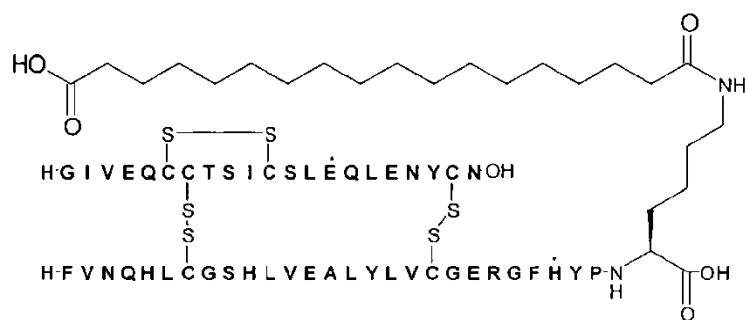
**5 Ejemplo 145, Procedimiento general (A):**

Insulina humana A21G, B25H, B29K(N^EOctadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30

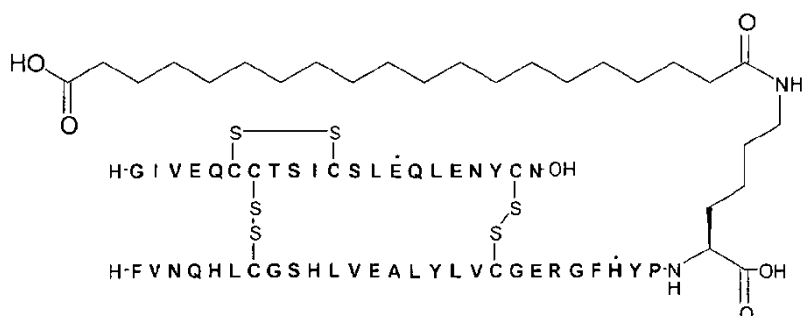
**Ejemplo 146, Procedimiento general (A):**

Insulina humana A21G, B25H, B29K(N^EEicosanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30

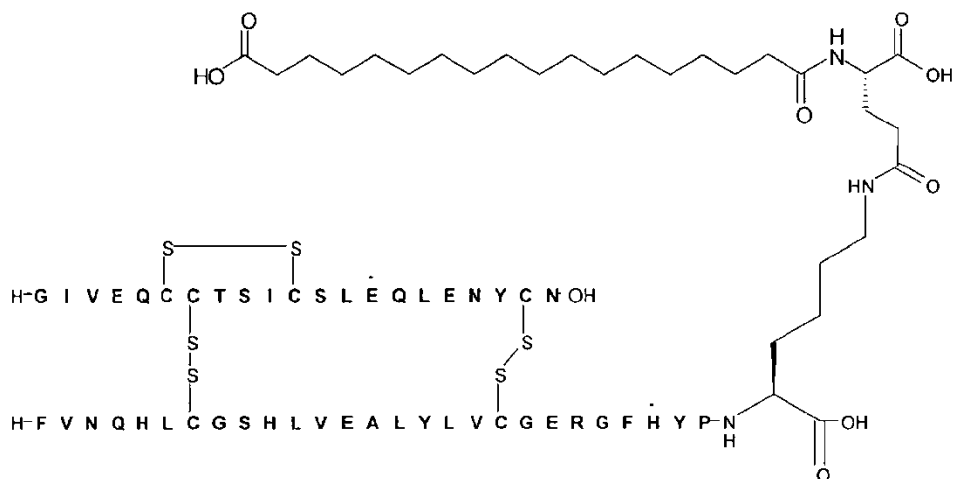
**Ejemplo 147, Procedimiento general (A):**Insulina humana A21G, B25H, B29K(N^eOctadecanodioil-γGlu), desB30**5 Ejemplo 148, Procedimiento general (A):**Insulina humana A21G, B25H, B29K(N^eEicosanodioil-γGlu), desB30**Ejemplo 149, Procedimiento general (A):**Insulina humana A14E, B25H, desB27, B29K(N^eOctadecanodioilo), desB30

**Ejemplo 150, Procedimiento general (A):**

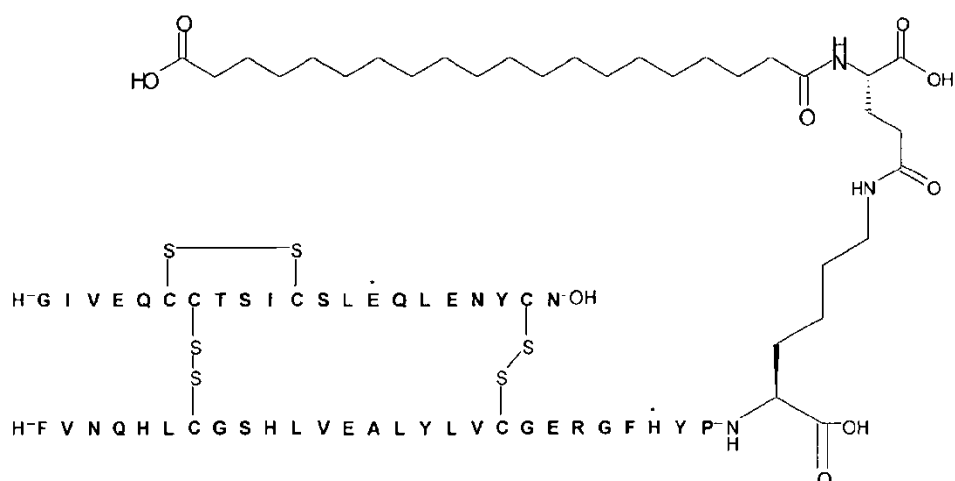
Insulina humana A14E, B25H, desB27, B29K(*N*⁶Eicosanodioilo), desB30

**5 Ejemplo 151, Procedimiento general (A):**

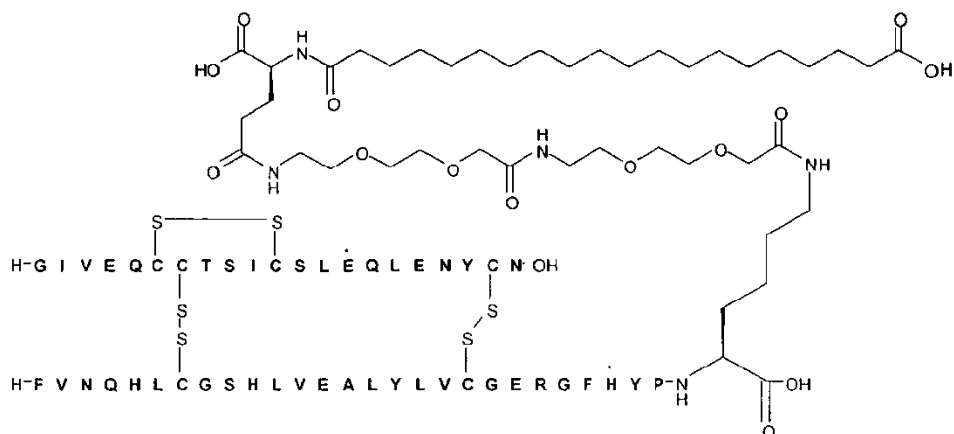
Insulina humana A14E, B25H, desB27, B29K(*N*⁶Octadecanodioil-γGlu), desB30

**Ejemplo 152, Procedimiento general (A):**

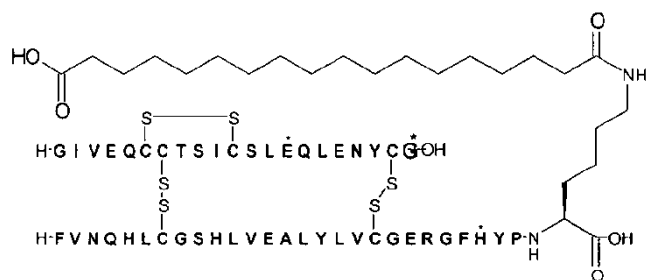
Insulina humana A14E, B25H, desB27, B29K(*N*⁶Eicosanodioil-γGlu), desB30

**Ejemplo 153, Procedimiento general (A):**

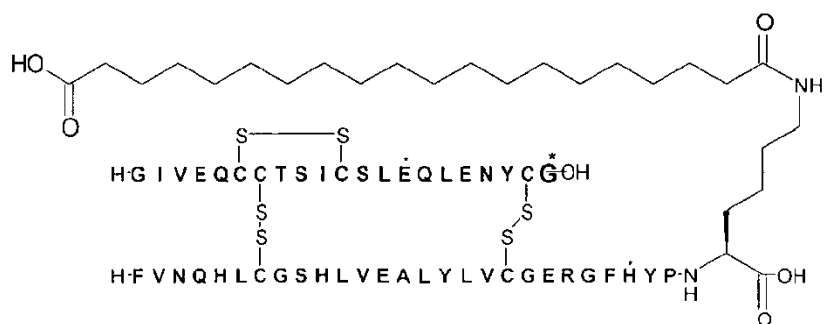
Insulina humana A14E, B25H, desB27, B29K(*N*⁶Eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30

**5 Ejemplo 154, Procedimiento general (A):**

Insulina humana A14E, A21G, B25H, desB27, B29K(*N*⁶Octadecanodioilo), desB30

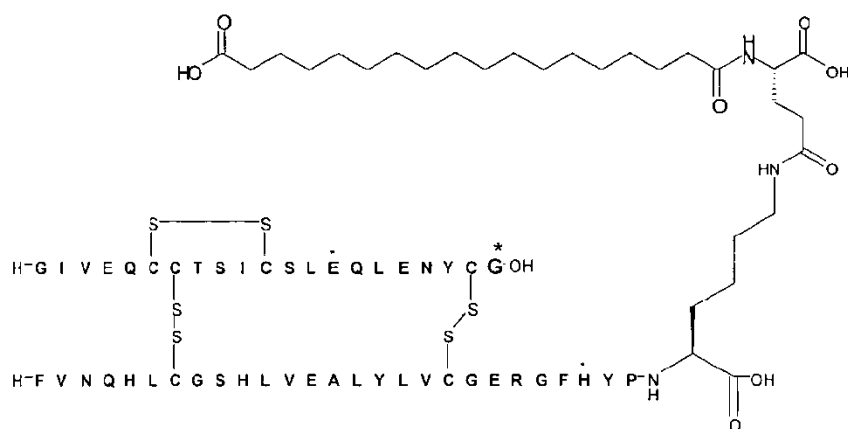
**Ejemplo 155, Procedimiento general (A):**

Insulina humana A14E, A21G, B25H, desB27, B29K(*N*⁶icosanodioilo), desB30



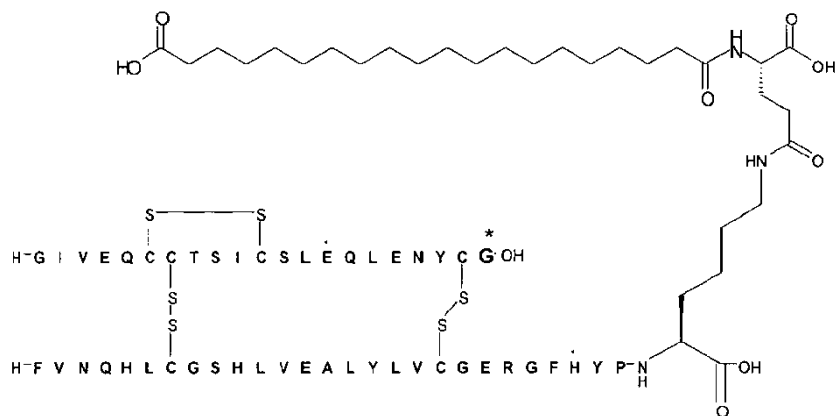
Ejemplo 156, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, A21G, B25H, desB27, B29K(N⁶Octadecanodioil-γGlu), desB30



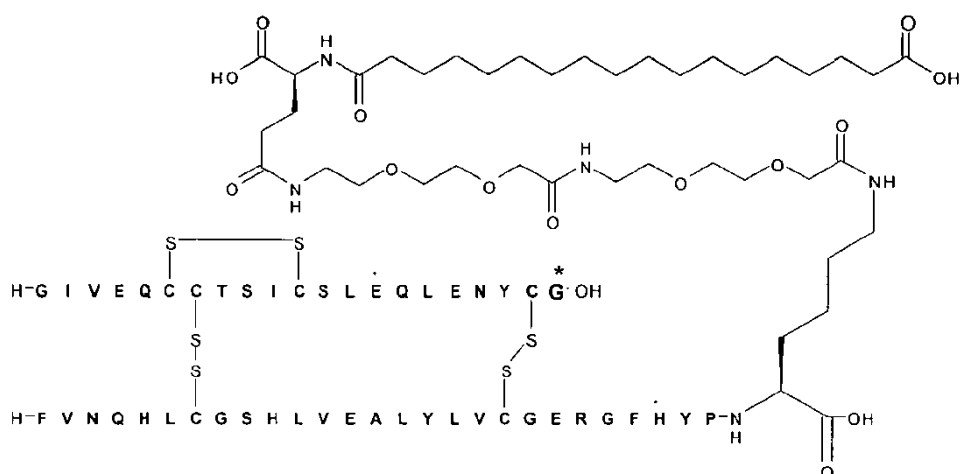
5 Ejemplo 157, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, B25H, desB27, B29K(N⁶Eicosanodioil-γGlu), desB30



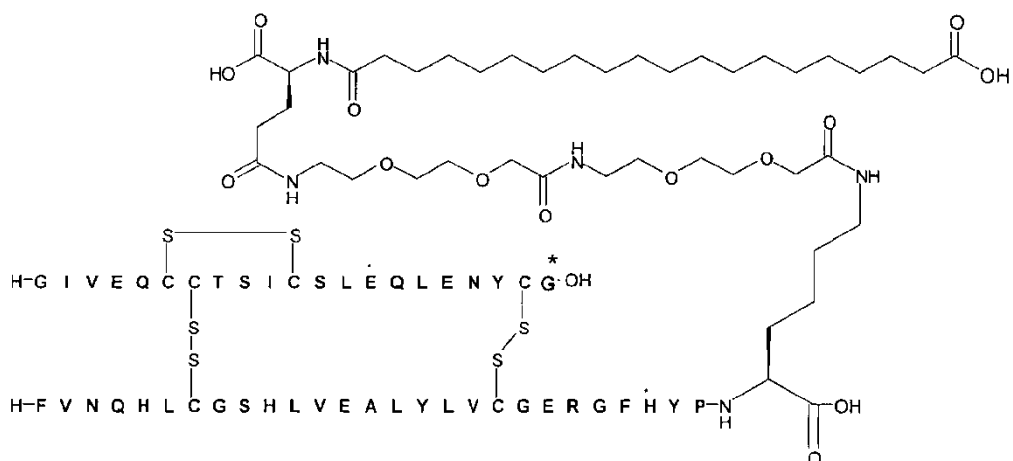
Ejemplo 158, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, A21G, B25H, desB27, B29K(N⁶Octadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



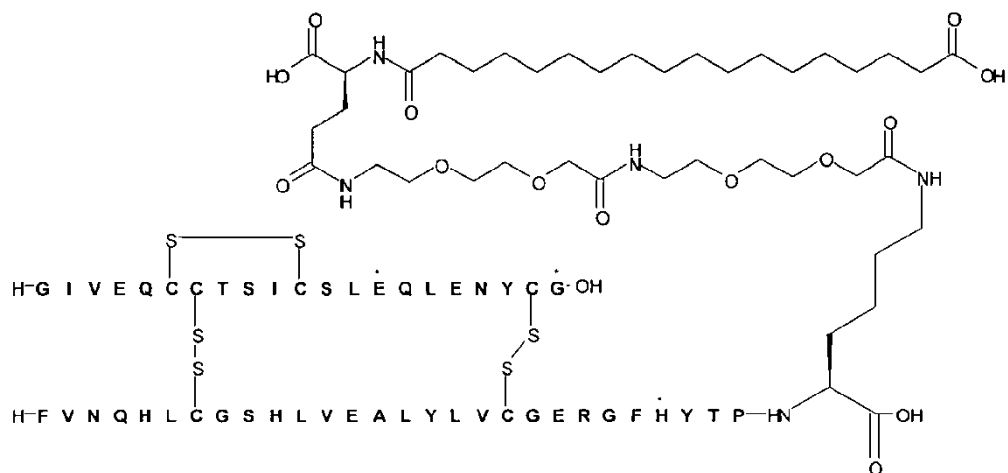
Ejemplo 159, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, A21G, B25H, desB27, B29K(N⁶Eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



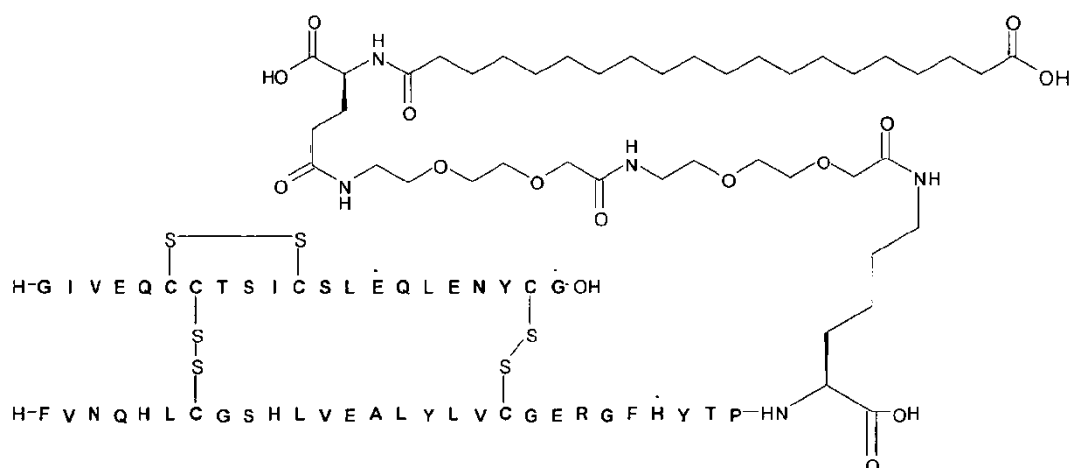
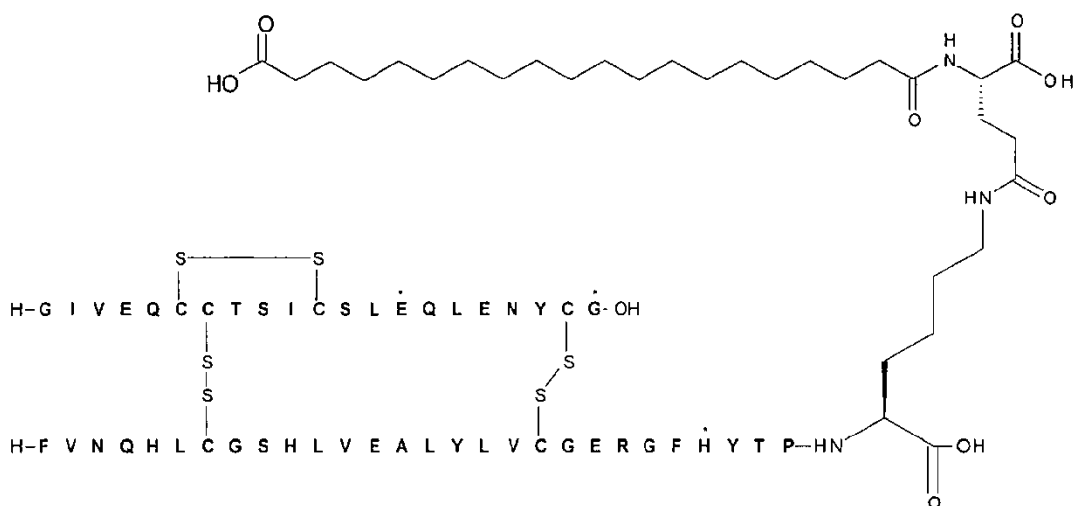
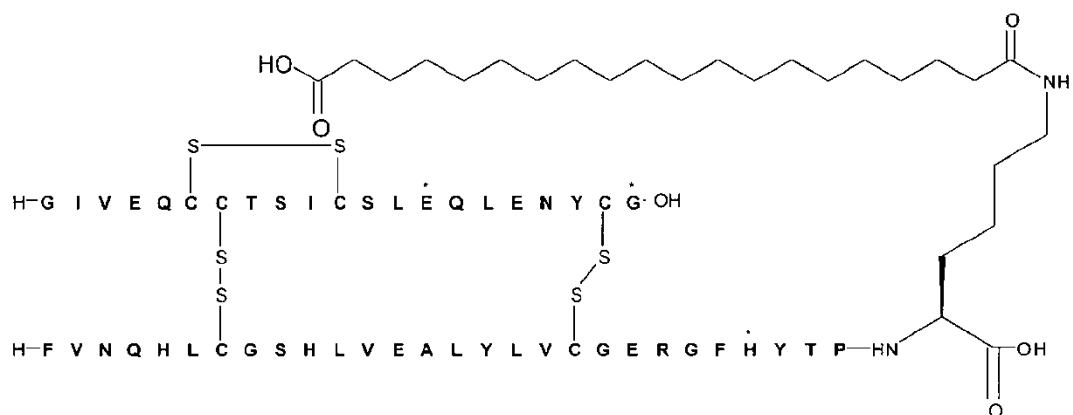
5 Ejemplo 160, Procedimiento general (A):

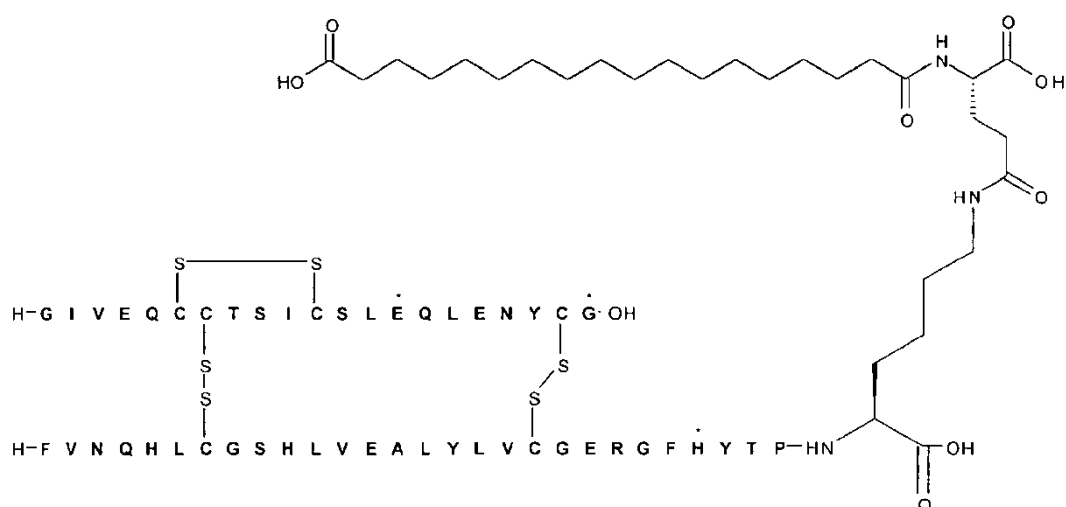
Insulina humana A14E, A21G, B25H, B29K(N⁶Octadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



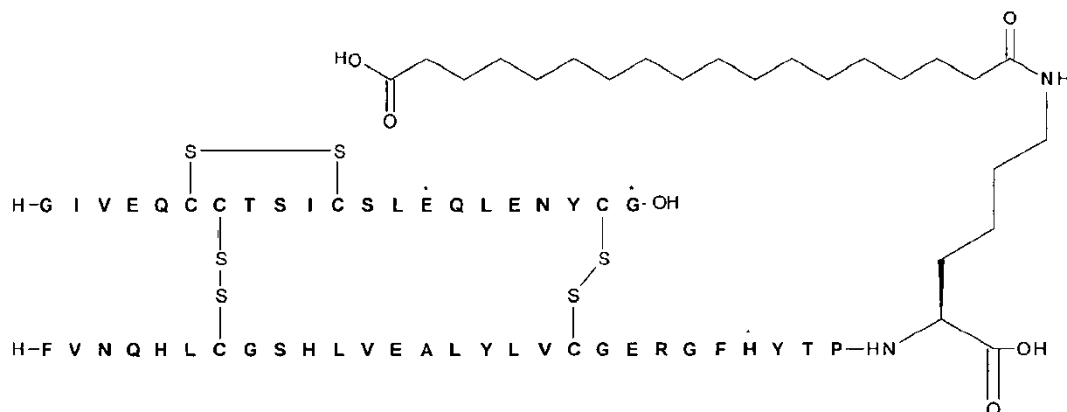
Ejemplo 161, Procedimiento general (A):

Insulina humana A14E, A21G, B25H, B29K(N⁶Eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30

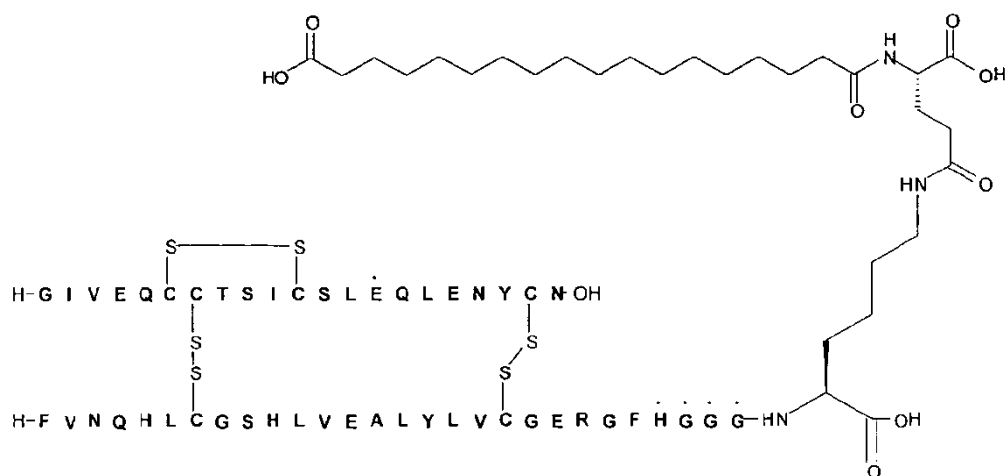
**Ejemplo 162, Procedimiento general (A):**Insulina humana A14E, A21G, B25H, B29K(*N*⁶Eicosanodioil-γGlu), desB30**5 Ejemplo 163, Procedimiento general (A):**Insulina humana A14E, A21G, B25H, B29K(*N*⁶Eicosanodioilo), desB30**Ejemplo 164, Procedimiento general (A):**Insulina humana A14E, A21G, B25H, B29K(*N*⁶Octadecanodioil-γGlu), desB30

**Ejemplo 165, Procedimiento general (A):**

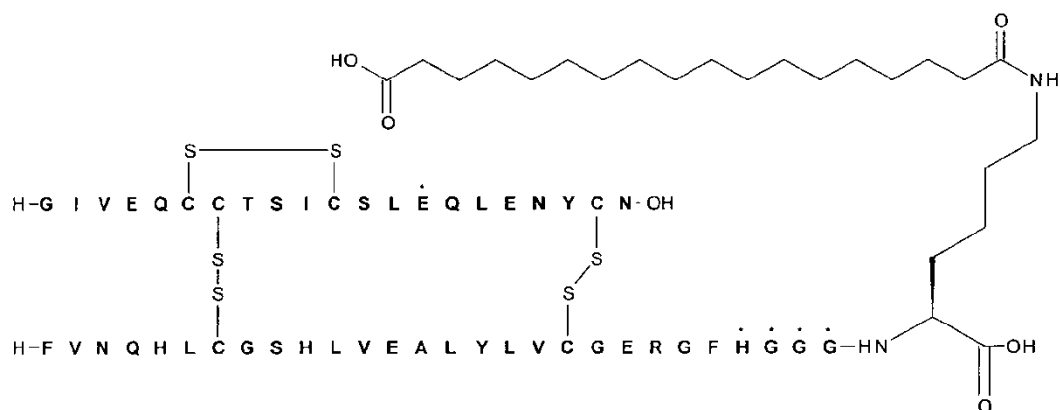
Insulina humana A14E, A21G, B25H, B29K(N^oOctadecanodioilo), desB30

**5 Ejemplo 166, Procedimiento general (A):**

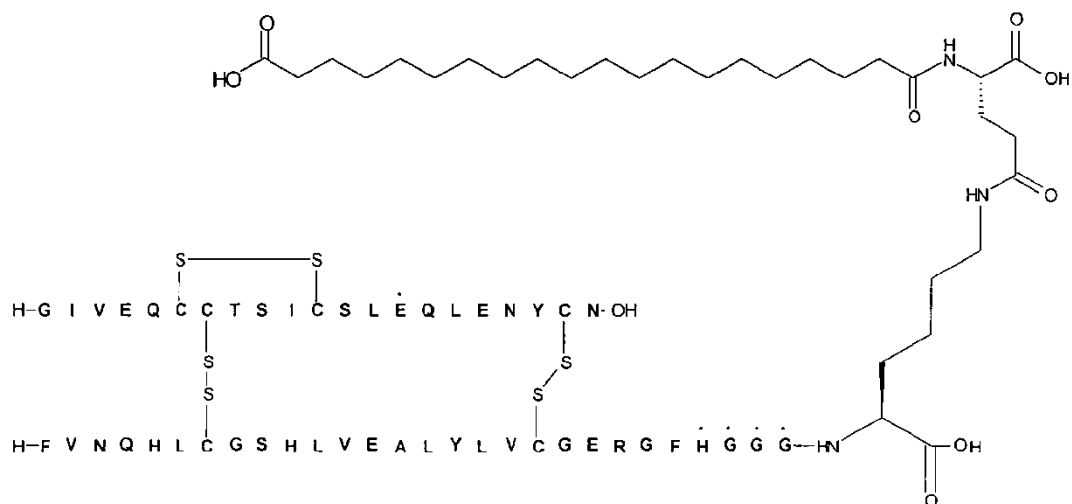
Insulina humana A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29K(N^oOctadecanodioil-γGlu), desB30

**Ejemplo 167, Procedimiento general (A):**

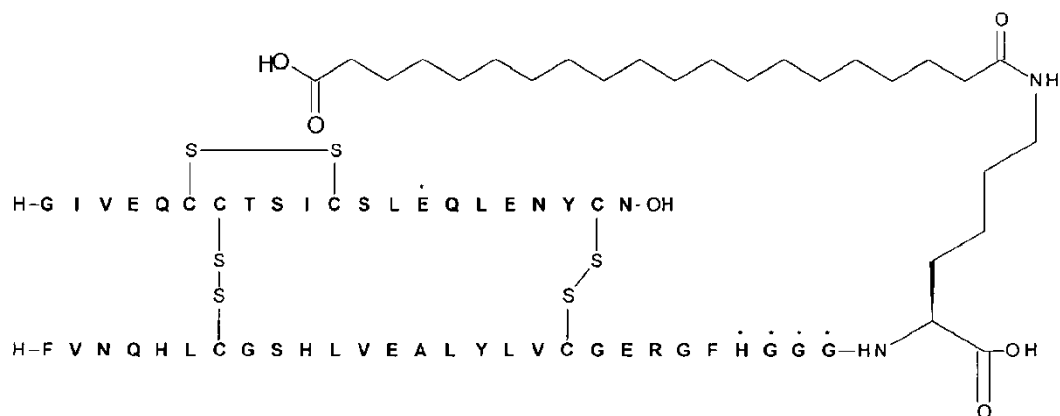
Insulina humana A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29K(N^oOctadecanodioilo), desB30

**Ejemplo 168, Procedimiento general (A):**

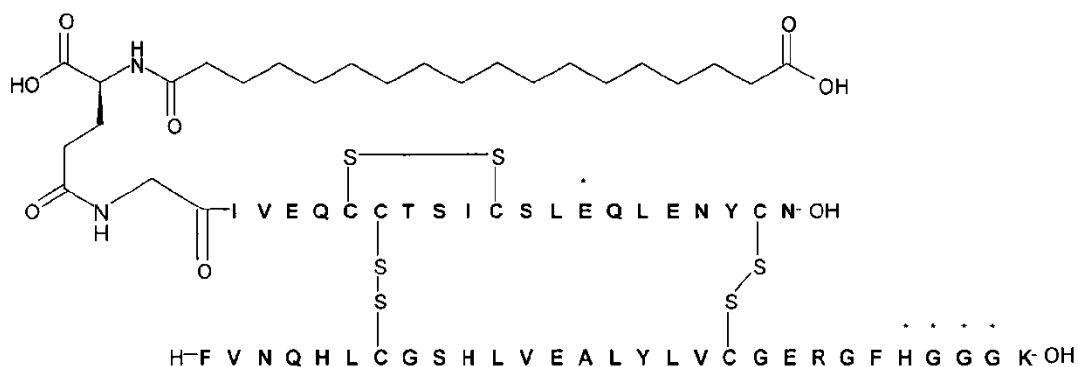
Insulina humana A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29K(*N*⁶Eicosanodioil-γGlu), desB30

**5 Ejemplo 169, Procedimiento general (A):**

Insulina humana A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29K(*N*⁶Eicosanodioilo), desB30

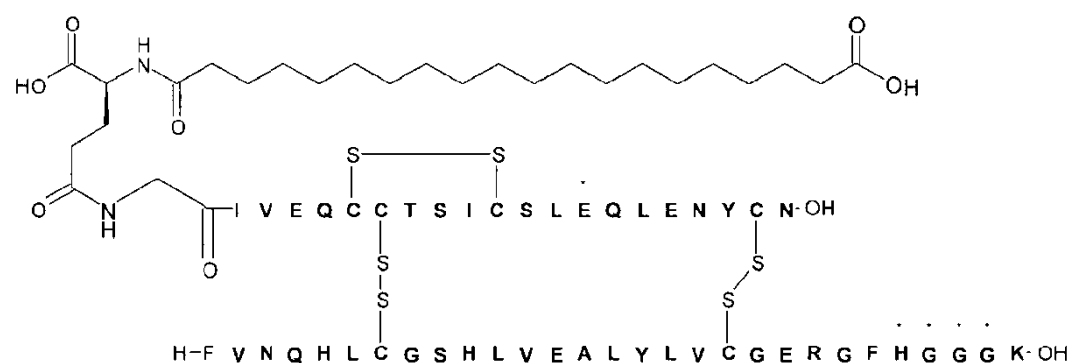
**Ejemplo 170, Procedimiento general (A):**

Insulina humana A1G(*N*⁶Octadecanodioil-γGlu), A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30



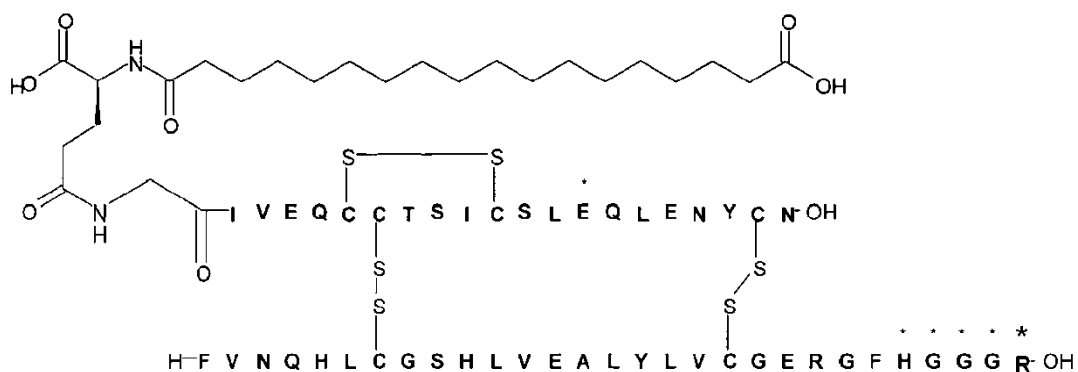
Ejemplo 171, Procedimiento general (A):

Insulina humana A1G(*N*^EEicosanodioil-γGlu), A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30



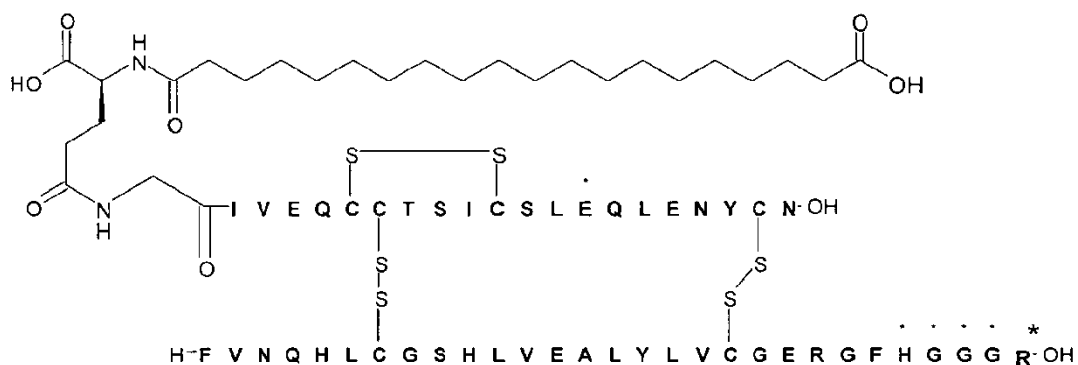
5 Ejemplo 172, Procedimiento general (A):

Insulina humana A1G(*N*^EOctadecanodioil-γGlu), A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30



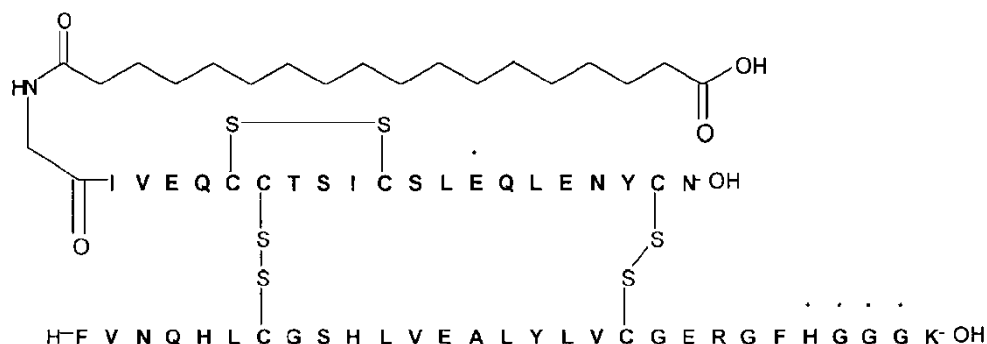
Ejemplo 173, Procedimiento general (A):

Insulina humana A1G(*N*^EEicosanodioil-γGlu), A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30



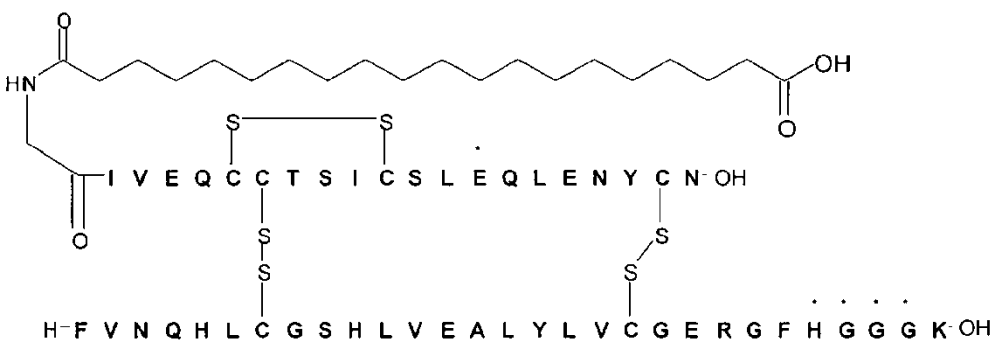
Ejemplo 174, Procedimiento general (A):

Insulina humana A1G(N^oOctadecanodioilo), A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30



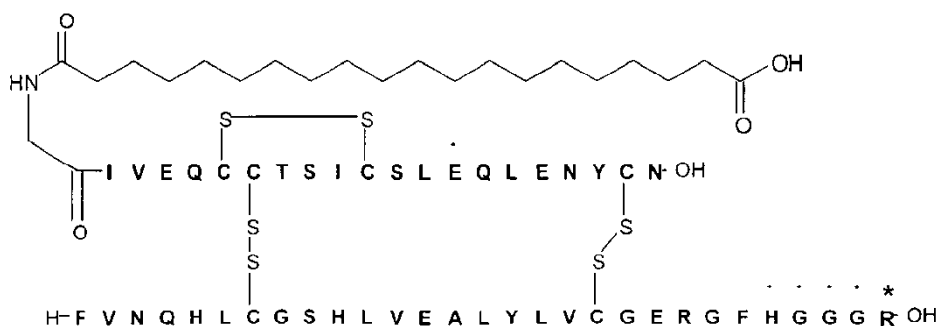
Ejemplo 175, Procedimiento general (A):

5 Insulina humana A1G(N^oEicosanodioilo), A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30



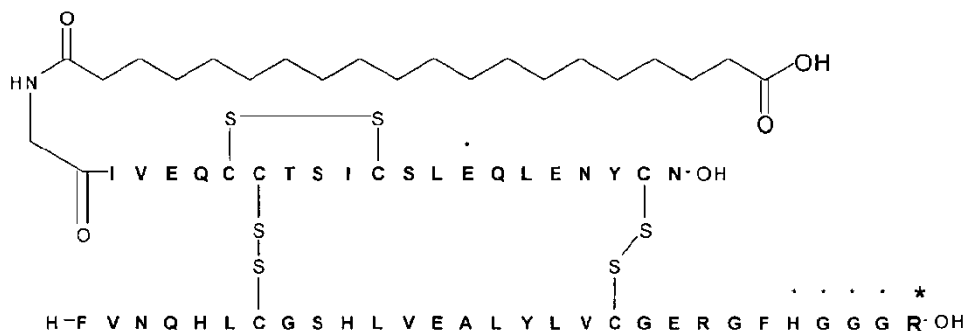
Ejemplo 176, Procedimiento general (A):

Insulina humana A1G(N^oOctadecanodioilo), A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30



10 **Ejemplo 177, Procedimiento general (A):**

Insulina humana A1G(N^oEicosanodioilo), A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30



Ejemplo 178, Afinidad del receptor de insulina de derivados de insulina seleccionados de la invención:

La afinidad de los análogos de insulina acilados de esta invención hacia el receptor de insulina humano se determina por un ensayo de captura de anticuerpos en placas de microtitulación, ensayo de SPA (ensayo de proximidad de centelleo). Perlas de SPA-PVT que se unen a anticuerpo, reactivo anti-ratón (Amersham Biosciences, n° de cat. PRNQ0017) se mezclan con 25 ml de tampón de unión (HEPES 100 mM pH 7,8; cloruro de sodio 100 mM, MgSO₄ 10 mM, 0,025% de Tween-20). La mezcla de reactivos para una sola placa Packard Optiplat (Packard n° 6005190) se compone de 2,4 µl de un receptor de insulina humana recombinante purificado, diluido 1:5000 (con o sin el exón 11), una cantidad de una solución madre de A14Tyr¹²⁵I-insulina humana correspondiente a 5000 cpm por 100 µl de mezcla de reactivos, 12 µl de una dilución 1:1000 de anticuerpo F12, 3 ml de perlas de SPA y tampón de unión hasta un total de 12 ml. A continuación, se añade un total de 100 µl de mezcla de reactivos a cada pocillo en la placa Packard Optiplat y se realiza una serie de diluciones del derivado de insulina en la Optiplat, a partir de muestras apropiadas. Las muestras se incuban a continuación durante 16 horas mientras se agita suavemente. Las fases se separan a continuación mediante centrifugación durante 1 min y se hace un recuento de las placas en un Topcounter. Los datos de la unión se ajustaron utilizando el algoritmo de regresión no lineal en el GrafPad Prism 2.01 (GrafPad Software, San Diego, CA) y las afinidades se expresan en relación (en porcentaje (%)) con la afinidad de la insulina humana.

Un ensayo relacionado también se utiliza, en el que el tampón de unión también contiene 4,5% de HSA, con el fin de imitar las condiciones fisiológicas.

Afinidades hacia el receptor de insulina de insulinas seleccionadas de la invención:

Nº de Ejemplo	Afinidad IR-A relativa (@ 0% de HSA) (%)	Afinidad IR-A relativa (@ 4,5% de HSA) (%)
19	3,8	,30
10	9,5	
1	5,0	,10
2	2,1	,06
5	2,5	
4	3,4	
3	2,0	
9	1,7	,20
6	2,6	,04
7	2,1	
8	2,1	
12	1,7	
11	,8	
17	,9	
13	1,1	
15	1,9	
20	2,0	
22	,7	
16	,9	,23
18	2,3	
23	1,4	
24	7,9	2,23
25	,4	,05
26	,0	,01
27	,7	,06
28	,3	

Nº de Ejemplo	Afinidad IR-A relativa (@ 0% de HSA) (%)	Afinidad IR-A relativa (@ 4,5% de HSA) (%)
29	,2	,01
30	,3	,02
31	16,2	1,11
32	,3	
33	,5	0,06
21	,8	
34	1,3	
35	5,8	
36	9,3	
37	,8	
40	0,3	
38	,6	,10
41	1,6	,31
39	11,2	,67
Técnica anterior 183	10	1,00
46	1,9	0,08
47	1,2	0,10
48	1,3	0,01
49	6,2	0,86
50	4,3	1,21
51	1,7	0,12
52	2,1	
53	2,3	0,03
54	3,9	0,91
55	0,3	0,03
56	4,4	0,03
57	2,5	
58	0,5	
59	0,3	

Ejemplo 179, Hidrofobicidad de los derivados de insulina de la invención:

La hidrofobicidad de un derivado de insulina se encuentra mediante HPLC de fase inversa llevada a cabo en condiciones isocráticas. El tiempo de elución del derivado de insulina se compara con el de la insulina humana (denominada IH en el presente documento) u otro derivado con una hidrofobicidad conocida en las mismas condiciones. La hidrofobicidad, k'_{rel} , se calcula como: $k'_{rel_{deriv}} = ((t_{deriv} - t_0) / (t_{ref} - t_0)) * k'_{rel_{ref}}$. Usando como referencia la IH: $k'_{rel_{ref}} = k'_{rel_{IH}} = 1$. El tiempo de vacío del sistema de HPLC, t_0 , se determina mediante la inyección de 5 µl de NaNO_3 0,1 mM. Condiciones de la ejecución:

Columna: Lichrosorb RP-C18, 5 µm, 4 x 250 mm

Tampón A: fosfato de sodio 0,1 M pH 7,3, 10% en volumen de CH_3CN

Tampón B: 50% en volumen de CH_3CN

Volumen de inyección: 5 µl

Tiempo de la ejecución: 60 minutos máximo

Después de ejecutar un gradiente inicial, se elige el nivel isocrático para ejecutar el derivado y la referencia (por ejemplo, IH), y los tiempos de elución del derivado y de la referencia en condiciones isocráticas se utilizan en la

ecuación anterior para calcular $k'_{rel_{deriv}}$.

Nº de ejemplo	Hidrofobicidad relativa, $k'_{rel_{deriv}}$
19	,07
10	14,60
1	,33
2	,25
5	,23
4	,48
3	,77
9	,31
6	,19
7	2,78
8	,14
12	,94
11	,19
17	,57
13	,10
15	,43
20	,15
22	,20
16	1,15
18	,10
23	,16
24	,26
25	,22
26	,21
27	,05
28	,42
29	,05
30	,05
31	
32	,07
33	,76
21	,04
34	
35	,84
36	,24
37	,56
40	,09
38	
41	

Nº de ejemplo	Hidrofobicidad relativa, $k'_{rel_{deriv}}$
46	0,44

Ejemplo 180, Administración por vía pulmonar de derivados de insulina a ratas:

Protocolo:

La sustancia del ensayo se dosificará por vía pulmonar por el método de instilación de gota. En resumen, las ratas Wistar machos (aprox. 250 g) se anestesian con aprox. 60 ml de fentanilo/dehidrocloruro de zolopridolol/-dormicum administrados como una dosis inicial de 6,6 ml/kg s.c. y seguida de 3 dosis de mantenimiento de 3,3 ml/kg s.c., con un intervalo de 30 min. Diez minutos después de la inducción de la anestesia, las muestras basales se obtienen a partir de la vena de la cola ($t = -20$ min) seguidas de una muestra basal inmediatamente antes de la dosificación de la sustancia del ensayo ($t = 0$). En $t = 0$, la sustancia del ensayo se dosifica intratraquealmente en un pulmón. Una cánula especial con extremo redondeado se monta en una jeringa que contiene 200 μ l de aire y la sustancia del ensayo (1 ml/kg). A través del orificio, la cánula se introduce en la tráquea y se lleva a uno de los bronquios principales - justo pasada la bifurcación. Durante la inserción, se palpa el cuello desde el exterior para asegurar el posicionamiento intratraqueal. El contenido de la jeringa se inyecta seguido de 2 s de pausa. Después, la cánula se extrae lentamente de vuelta. Las ratas se mantienen anestesiadas durante la prueba (muestras de sangre durante un máximo de 4 u 8 horas) y se sacrifican después del experimento.

Las Figs. 8 y 9 muestran los efectos de disminuir la glucosa en sangre y las concentraciones de insulina en plasma, respectivamente, a partir de la instilación de gota intratraqueal de una insulina de la invención (ejemplo 9), en comparación con una similar, pero no resistente a las proteasas, de la técnica anterior (ejemplo 183).

Ejemplo 181, Administración por vía pulmonar de derivados de insulina a cerdos enanos:

Protocolo:

Los cerdos se equiparon con catéteres venosos centrales para inyecciones intravenosas y toma de muestras de sangre. Los cerdos se mantienen en ayunas antes del experimento por vía pulmonar, es decir, el día antes de la dosificación, las sobras de la alimentación de la tarde se eliminan aproximadamente una hora después de la alimentación y el día de la dosificación, los cerdos no reciben alimento. La permeabilidad de los catéteres se comprueba antes del experimento con solución salina añadida a 10 UI/ml de heparina.

Después de la dosificación por vía pulmonar, una solución de glucosa debe estar lista para inyección i.v. para prevenir una **hipoglucemia**, es decir, 4-5 jeringas (20 ml) se llenan de glucosa estéril al 20%, lista para el uso. El diagnóstico de la hipoglucemia se basa en síntomas clínicos y mediciones de glucosa en sangre en un glucómetro (Glucocard X-meter). El tratamiento consiste en la inyección i.v. lenta de 50-100 ml de glucosa al 20% (10-20 g de glucosa). La glucosa se administra en fracciones durante 5-10 minutos hasta tener efecto.

Los cerdos se mantienen en ayunas durante la primera parte del experimento (hasta 24 h), pero con acceso libre al agua. Después de 16 h, los catéteres para muestras de sangre se cierran con 5000 UI/ml de heparina, se colocan en las cavidades y los cerdos son liberados. Después de la muestra de sangre de 24 h, los cerdos son alimentados con doble ración de comida y manzanas. Los cerdos no se mantienen en ayunas desde las 24 h hasta las 48 h.

Compuesto y dosificación por vía pulmonar

Polvo para la dosificación por vía pulmonar

Los polvos de insulina se pesan en 8 cámaras de polvo separadas del dispositivo de polvo seco (PennCentury® Modelo DP-4, dispositivo porcino hecho a la medida) el día antes del experimento. Todas las cámaras se mantienen protegidas de la luz y la humedad, manteniéndolas sobre un material desecante en un recipiente envuelto con papel de aluminio, en un laboratorio con temperatura y humedad controladas hasta la dosificación.

Basándose en el peso más reciente de cada animal, el dispositivo de administración se cargó previamente con 25 nmol/kg, ya que se esperaba cierta retención de polvo.

$$\text{Dosis de carga} = (\text{peso del polvo} + (\text{peso del dispositivo y el polvo} - \text{peso del dispositivo}))/2$$

Anestesia

Mediante una inyección i.v. de Domitor® Vet inj. (medetomidina 1 mg/ml), 0,15 ml/10 kg = 0,4 ml/cerdo, el cerdo está sedado.

Inmediatamente después, se inyecta Rapinivet Vet. inj. (10 mg/ml de propofol) lentamente i.v., hasta que se obtiene la suficiente profundidad de la anestesia. En general, 2-3 ml/10 kg es suficiente, pero puede ser necesario complementar con unos 1-2 ml hasta la intubación sea posible. Atropina (1 mg/ml) se inyecta i.m. a 0,5 ml/cerdo y se deja

actuar 5 min antes de la intubación.

Para la intubación, el cerdo se coloca en posición ventral con la parte delantera ligeramente elevada, el anestésico local Xylocaïne® kutanspray (10 mg/dosis de lidocaína) se pulveriza sobre la epiglotis, y los cerdos se intuban utilizando un laringoscopio y un tamaño de tubo desechable de 8,0 mm (ID). Las dos partes del tubo se presionan firmemente entre sí.

Posición del dispositivo durante la dosificación por vía pulmonar

La posición del dispositivo PennCentury® durante la dosificación debe ser justo fuera del extremo del tubo endotraqueal y esto se debe medir en el dispositivo antes de la intubación (recordar la pieza en L conectora cuando se mide). Durante la dosificación, la punta del dispositivo PennCentury® se debe colocar en la tráquea justo por debajo de los bronquios que van al lóbulo craneal derecho, lo que se confirma con el broncoscopio.

Respiración artificial

La frecuencia de la respiración se establece en **10/min** y la profundidad de la respiración a **250 ml/respiración**. El respirador se monta con la bolsa para "bebé" para optimizar el tiempo de dosificación. El aparato de la anestesia se conecta a un filtro que está conectado al tubo endotraqueal a través de una pieza en L. El dispositivo PennCentury® se introduce a través de la pieza en L, lo que permitirá el control sobre la profundidad de la respiración y la frecuencia durante la dosificación.

Técnica de dosificación

El dispositivo PennCentury® debe colocarse como se ha descrito anteriormente. Los cerdos se dosifican (uno a la vez) con el dispositivo PennCentury® mediante una administración manual durante la inhalación, usando la bomba de aire ajustable de PennCentury (modelo AP-1). A cada cerdo se le dan **8 pulverizaciones aéreas** (bomba de aire ajustada a 4 ml) durante 8 inhalaciones consecutivas forzadas con respirador para garantizar que se administre toda la dosis. La cámara se golpea suavemente entre las pulverizaciones para evitar la adherencia del polvo al dispositivo. Para cada cerdo, se utiliza un nuevo tubo de administración. La sincronización en relación con la inhalación es muy importante, y las pulverizaciones de aire se deben dar al comienzo de la inhalación (intento de inicio con inhalación de 50 ml).

Para contrarrestar el efecto de Domitor, se inyecta Antisedan® Vet inj. (atipamezol 5 mg/ml) en forma de inyección intramuscular (**0,4 ml/cerdo**) inmediatamente después de la dosificación, y los cerdos se llevan de nuevo a sus jaulas y se deja que se despierten de la anestesia.

Análisis de retención

La dosis emitida debería ser el contenido completo de la cámara y después de la dosificación, el dispositivo se pesa de nuevo con cualquier polvo residual, y el polvo retenido se extrae con **9 ml** de HCl 0,01 N med en 0,05% (p/v) de tampón de extracción Tween 80 y se envía a analizar.

Toma de muestras de sangre

Después de la dosificación, se toman muestras de sangre desde un catéter venoso central en los siguientes puntos de tiempo:

- 10, 0, 10, 20, 40, 60, 90, 120, 150, 180, 240 (4 h), 300 (5 h), 360 (6 h), 8 h, 10 h, 12 h, 14 h, 16 h, 24 h, 32 h y 48 h.

Las muestras se toman con una válvula de retención de 3 vías; la sangre residual se inyecta de nuevo en el animal. El **tamaño de la muestra es: 0,8 ml** de sangre recogida en un tubo recubierto con EDTA. Después de cada muestra de sangre, el catéter se lava con 5 ml de NaCl estéril al 0,9% con 10 UI/ml de heparina. El tubo se inclina suavemente un mínimo de 8 veces para asegurar una mezcla suficiente de la sangre y el anticoagulante (EDTA) y después de un minuto se coloca sobre hielo húmedo. Los tubos se centrifugan durante 10 min a 3000 rpm y 4°C, 1 hora después del muestreo. Las muestras se almacenan en hielo húmedo hasta que se pipeteen.

Cierre de los catéteres después del experimento

Un tratamiento intravenoso individual con ampicilina (10 mg/kg = 0,1 ml/kg de una solución de 100 mg/ml) disuelta en solución salina estéril (1 g de ampicilina en 10 ml = 100 mg/ml) se proporciona a través del catéter que se ha utilizado para la toma de muestras de sangre. Ambos catéteres se lavan con 4-5 ml de solución estéril de NaCl al 0,9% con heparina a una concentración de 10 UI/ml. Los catéteres se cierran con un nuevo bloqueo luer con membrana de inyección de látex. Se inyectan 4-5 ml de NaCl estéril al 0,9% a través de la membrana. Finalmente se inyectan 0,8 ml de heparina, 5000 UI/ml, a través del catéter como un bloqueo. La técnica aséptica se exige para evitar el crecimiento de bacterias en el catéter con un mayor riesgo de coagulación.

Análisis de muestras de sangre

Se pipetea 10 µl de plasma en 500 µl de solución tampón EBIO para las mediciones de la concentración de glucosa en plasma en el autoanalizador Biosen.

Las muestras de plasma también se analizaron para insulina exógena mediante inmunoensayos para calcular los parámetros PK.

5 Dosificación por vía pulmonar de la insulina del ejemplo 9 a cerdos enanos de acuerdo con el protocolo anterior:

Las Figs. 10 y 11 muestran el perfil farmacocinético de la insulina del ejemplo 9, en comparación con la misma insulina pero sin las mutaciones A14E y B25H que estabilizan frente a proteasas (insulina de la técnica anterior). Los datos proceden del mismo experimento, la Fig. 10 se muestra con los datos de los primeros 250 minutos, y la Fig. 11 se muestra con el curso de tiempo de 24 horas completo (1440 minutos).

- 10 Datos farmacocinéticos de la insulina del ejemplo 9, en comparación con la misma insulina pero sin las mutaciones A14E y B25H que estabilizan frente a proteasas (insulina de la técnica anterior). Los datos proceden del mismo experimento, semivida ($T_{1/2}$) y biodisponibilidad (F_{it}) en relación con la administración intravenosa:

Insulina, ejemplo nº	$T_{1/2}$ (minutos)	F_{it}
Estado de la técnica (véase ej. 183)	211	4%
9	1127	13%

Ejemplo 182, Degradación de análogos de insulina utilizando enzimas del lumen de duodeno:

- 15 La degradación de los análogos de insulina utilizando enzimas del lumen del duodeno (preparadas mediante filtración del contenido del lumen del duodeno) de ratas SPD. El ensayo se realiza mediante un robot en una placa de 96 pocillos (2 ml) con 16 pocillos disponibles para los análogos de insulina y los patrones. Los análogos de insulina -15 µM se incuban con enzimas del duodeno en Hepes 100 mM, pH = 7,4 a 37°C, se toman muestras después de 1, 15, 30, 60, 120 y 240 min y la reacción se inactiva mediante la adición de TFA. Los análogos de insulina intactos en cada punto de tiempo se determinan mediante RP-HPLC. El tiempo medio de degradación se determina mediante un ajuste exponencial de los datos y la normalización a tiempo medio se determina para las insulinas de referencia, insulina humana A14E, B25H, desB30 o insulina humana en cada ensayo. La cantidad de enzimas añadidas para la degradación es tal, que el tiempo medio para la degradación de la insulina de referencia está entre 60 min y 180 min. El resultado se proporciona como el tiempo medio de degradación para el análogo de la insulina en el duodeno de rata, dividido por el tiempo medio de degradación de la insulina de referencia del mismo experimento (tasa de degradación relativa).

Ejemplo nº	Degradación en el duodeno. Estabilidad relativa frente a insulina humana A14E, B25H, desB30	Degradación en el duodeno. Estabilidad relativa frente a insulina humana
19	1,8	21,6
2	1,3	15,6
3	,7	8,4
9	,8	9,6
8	1,8	21,6
11	,9	10,8
13	1,5	18
22	,9	11
16	,5	6
18	1,1	13,2
23	1,9	22,8
24	1,2	14,4
25	1,1	13,2
26	1,2	14,4
27	2,9	35
28	,7	7,2

Ejemplo nº	Degradación en el duodeno. Estabilidad relativa frente a insulina humana A14E, B25H, desB30	Degradación en el duodeno. Estabilidad relativa frente a insulina humana
29	3,1	37
30	2,1	25,2
31	1,6	19,2
32	1,9	22,8
33	,5	6
21	1,1	13,2
34	1,0	12
35	,6	7,2
36	,9	10,8
37	,8	9,6
40	,7	8,4
38	,5	6
41	,7	8,4
Técnica anterior 183	0,1	1,2
46	2,0	24
47	0,6	7
48	0,5	6
49	0,1	1,2
50	0,5	6
51	1,0	12

Farmacocinética (PK) en ratas

PK en ratas por vía intravenosa:

- 5 Ratas anestesiadas se dosifican por vía intravenosa (*i.v.*) con análogos de insulina a diversas dosis y las concentraciones plasmáticas de los compuestos empleados se miden usando inmunoensayos o espectrometría de masas en los intervalos especificados durante 4 horas o más después de la dosis. Los parámetros farmacocinéticos se calculan posteriormente usando WinNonLin Professional (Pharsight Inc., Mountain View, CA, EE.UU.).

Se utilizan ratas macho Wistar sin ayuno (Taconic) con un peso aproximado de 200 gramos.

- 10 El peso corporal se mide y las ratas se anestesian posteriormente con Hypnorm/Dormicum (cada compuesto se diluye por separado 1:1 en agua estéril y después se mezclan; preparado recientemente el día del experimento). La anestesia se inicia con 2 ml/kg de mezcla de Hypnorm/Dormicum s.c., seguida por dos dosis de mantenimiento de 1 ml/kg s.c. a intervalos de 30 minutos y dos dosis de mantenimiento de 1 ml/kg s.c. a intervalos de 45 min. Si es necesario, con el fin de mantener a las ratas anestesiadas ligeramente a lo largo de una o varias dosis adicionales, se suministran 1-2 ml/kg s.c. El pesado y la anestesia inicial se realizan en la sala de espera de las ratas, con el fin de
- 15 evitar un estrés a los animales, moviéndolos de una habitación a otra.

PK en ratas por vía peroral:

Alimentación forzada:

- 20 Ratas conscientes son dosificadas por vía p.o. con análogos de insulina. Las concentraciones plasmáticas de los compuestos empleados, así como los cambios de la glucosa en sangre se miden a intervalos especificados durante 4-6 horas después de la dosificación. Los parámetros farmacocinéticos se calculan posteriormente usando WinNonLin Professional (Pharsight Inc., Mountain View, CA, EE.UU.)

Ratas Sprague-Dawley macho (Taconic), de 250-300 g de peso se mantuvieron en ayunas durante -18 h y se dosificaron por vía p.o. con el compuesto del ensayo o el vehículo.

La composición de la formulación utilizada para la dosificación con sonda oral es la siguiente (en % en peso):

45% de Propilenglicol	(Merck)
33% de Capmul MCM C10	(Abitec)
11% de Poloxámero 407	(BASF)
11% de Polietilenglicol 3350 Ultra	(Fluka)

5 La cantidad de insulina añadida se resta igualmente de Capmul MCM C10, Poloxámero 407 y PEG 3350 y no de propilenglicol, con el fin de mantener la cantidad de propilenglicol independiente de la carga de fármaco, constante en 45%.

10 Insulina neutra (liofilizada a pH 7,4) se disuelve en propilenglicol a TA con agitación suave. Dependiendo de la insulina y la cantidad de insulina, puede tardar varias horas la disolución en propilenglicol. La solución resultante debe ser transparente. Los otros aditivos, Capmul, poloxámero y PEG3350 se mezclan y se funden entre sí a 58°C y también deberían dar lugar a una solución transparente, ligeramente amarillenta. A continuación, la solución de propilenglicol e insulina se calienta hasta 35°C y se añaden los aditivos fundidos en porciones, con agitación magnética. La mezcla resultante debe ser transparente y homogénea a 35°C y da como resultado un semisólido después de su almacenamiento en el frigorífico. Después de la preparación, la composición SEDDS se enfría a 5°C con el fin de solidificar.

15 Las muestras de sangre para la determinación de las concentraciones de glucosa en sangre total, se recogen en tubos capilares heparinizados de 10 µl, mediante una punción de los vasos capilares en la punta de la cola. Las concentraciones de glucosa en sangre se miden después de una dilución en 500 µl de tampón de análisis a través del método de glucosa oxidasa, utilizando un autoanalizador Biosen (EKF Diagnostic GmbH, Alemania). Los cursos de concentración media de glucosa en sangre (media ± SEM) se realizan para cada compuesto.

20 Las muestras se recogen para la determinación de la concentración de insulina en plasma. Se toman muestras de sangre de 100 µl en tubos refrigerados que contienen EDTA. Las muestras se mantienen en hielo hasta que se centrifugan (7000 rpm, 4°C, 5 min), el plasma se pipetea en tubos Micronic y luego se congela a -20°C hasta el ensayo. Las concentraciones plasmáticas de los análogos de insulina se miden en el departamento de Ensayo y Tecnología, empleando un inmunoensayo que se considera apropiado o está validado para el análogo individual.

25 Las muestras de sangre se toman en t = -10 (para la glucosa en sangre solamente), en t = -1 (justo antes de la dosificación) y a intervalos especificados durante 4-6 horas después de la dosificación.

Inyección intrainestinal:

30 Ratas anestesiadas se dosifican intrainestinalmente (en el yeyuno) con análogos de insulina. Las concentraciones plasmáticas de los compuestos empleados, así como los cambios en la glucosa en sangre, se miden a intervalos especificados durante 4 horas o más después de la dosificación. Los parámetros farmacocinéticos se calculan posteriormente usando WinNonLin Professional (Pharsight Inc., Mountain View, CA, EE.UU.).

Ratas Sprague-Dawley macho (Taconic), con un peso de 250-300 g, en ayunas durante -18 h, se anestesian usando 2 ml/kg de Hypnorm-Dormicum s.c. (0,079 mg/ml de citrato de fentanilo, 2,5 mg/ml de fluanisona y 1,25 mg/ml de midazolam) como una dosis inicial (hasta el punto de tiempo -60 min antes de la dosificación de la sustancia del ensayo), 1 ml/kg después de 20 min seguido de 1 ml/kg cada 40 min.

35 Las insulinas que se van a someter a ensayo en el modelo de inyección intrainestinal se formulan como se han formulado para el modelo anterior de alimentación forzada.

40 La rata anestesiada se coloca sobre una manta homeotérmica estabilizada a 37°C. Un catéter de polietileno de 20 cm montado con una jeringa de 1 ml, se llena con la formulación de insulina o el vehículo. Se realiza una incisión de 4-5 cm en la línea media en la pared abdominal. El catéter se inserta suavemente en el yeyuno medio, a -50 cm del ciego, mediante penetración de la pared intestinal. Si hay contenido intestinal presente, el sitio de aplicación se mueve ± 10 cm. La punta del catéter se coloca aprox. 2 cm en el interior del lumen del segmento intestinal y se fija sin el uso de ligaduras. Los intestinos se vuelven a colocar cuidadosamente en la cavidad abdominal y la pared abdominal y la piel se cierran con autograpas en cada capa. En el tiempo 0, las ratas son dosificadas a través del catéter, con 0,4 ml/kg de compuesto de ensayo o de vehículo.

45 Las muestras de sangre para la determinación de las concentraciones de glucosa en sangre total se recogen en tubos capilares heparinizados de 10 µl mediante una punción de los vasos capilares en la punta de la cola. Las concentraciones de glucosa en sangre se miden después de una dilución en 500 µl de tampón de análisis, por el método de glucosa oxidasa, utilizando un autoanalizador Biosen (EKF Diagnostic GmbH, Alemania). Los cursos de concentración media de glucosa en sangre (media ± SEM) se realizan para cada compuesto.

Las muestras se recogen para la determinación de la concentración de insulina en plasma. Se toman muestras de sangre de 100 µl en tubos refrigerados que contienen EDTA. Las muestras se mantienen sobre hielo hasta que se centrifugan (7000 rpm, 4°C, 5 min), el plasma se pipetea en tubos Micronic y luego se congela a -20°C hasta el ensayo. Las concentraciones plasmáticas de los análogos de insulina se miden en un inmunoensayo que se considera apropiado o que está validado para el análogo individual.

Las muestras de sangre se toman en t = -10 (solo para glucosa en sangre), en t = -1 (justo antes de la dosificación) y en los intervalos especificados durante 4 horas o más después de la dosificación.

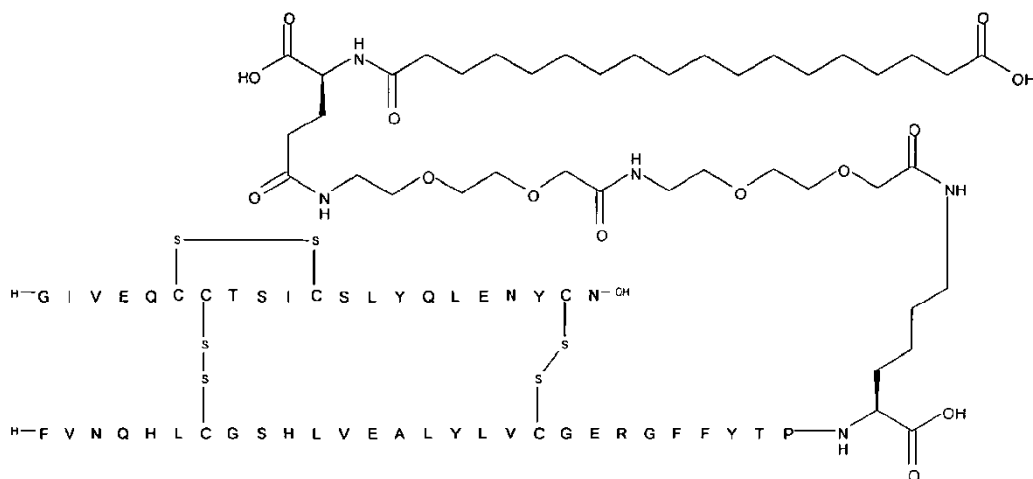
Ejemplo nº	TRM (min) (tiempo de retención medio, sonda oral)	Fpo, sonda oral (%)	Fpo, inyección intra-intestinal (%)
183 (Técnica anterior)	97 ± 15	0,005 ± 0,009	0,28 ± 0,14
2	401 ± 82	0,05 ± 0,02	
9	345 ± 111	0,10 ± 0,09	1,9 ± 1,0
13	251 ± 47	0,12 ± 0,08	
16	416 ± 37	0,06 ± 0,04	1,8 ± 1,9
18	149 ± 29	0,13 ± 0,07	
24	194 ± 54	0,06 ± 0,05	1,4 ± 1,1
25	481 ± 108	0,20 ± 0,05	3,3 ± 1,2
26			
33			

Farmacodinámica en ratas:

- 10 Los perfiles de glucosa en sangre frente al tiempo después de la administración oral (como se ha descrito anteriormente) de insulinas aciladas seleccionadas de la invención, se muestran a continuación:

Ejemplo 183

El efecto oral de ratas Wistar macho en ayunas durante una noche sobre una insulina de la técnica anterior, es decir:



- 15 Insulina humana B29K(N^εOctadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30 se proporciona en la Fig. 1 a continuación.

Ejemplo 184

Potencia de los análogos de insulina acilados de esta invención en relación con la insulina humana

Ratas macho Sprague Dawley que pesaban 238-383 g el día del experimento, se utilizan para el experimento "clamp" (estado estacionario). Las ratas tienen libre acceso al alimento bajo condiciones ambientales controladas y se mantienen en ayunas durante una noche (desde las 3 pm) antes del experimento clamp.

Protocolo experimental:

- Las ratas se aclimatan en las instalaciones de animales durante al menos 1 semana antes del procedimiento quirúrgico. Aproximadamente 1 semana antes del experimento clamp, se insertan catéteres Tygon bajo anestesia con halotano en la vena yugular (para infusión) y en la arteria carótida (para la toma de muestras de sangre) y se externalizan y se fijan en la parte posterior del cuello. A las ratas se les administró Streptocilin vet. (Boehringer Ingelheim; 0,15 ml/rata, i.m.) después de la cirugía y se colocan en una unidad de cuidado de animales (25°C) durante el período de recuperación. Para obtener una analgesia, se administra Anorfina (0,06 mg/rata, s.c.) durante la anestesia y Rimadyl (1,5 mg/kg, s.c.) se administra después de la recuperación completa de la anestesia (2-3 h) y de nuevo una vez al día durante 2 días.
- A las 7 de la mañana del día del experimento, las ratas que habían ayunado durante una noche (desde las 3 pm del día anterior) se pesan y se conectan al sistema de jeringas de muestreo y de infusión (bombas Harvard 22 Basic, Harvard, y jeringa de vidrio de Perfectum Hypodermic, Aldrich) y luego se colocan en jaulas de clamp individuales en donde descansan durante aprox. 45 minutos antes del comienzo del experimento. Las ratas son capaces de moverse libremente en su lecho habitual durante todo el experimento y tienen libre acceso a agua potable. Después de un período basal de 30 min durante el cual se midieron los niveles de glucosa en plasma a intervalos de 10 min, el derivado de insulina que se va a someter a ensayo y la insulina humana (un nivel de dosis por rata, n = 6-7 por nivel de dosis) se infunden (i.v.) con una tasa constante durante 300 minutos. Opcionalmente, una infusión en bolo inicial del derivado de insulina que se va a someter a ensayo, se administra con el fin de alcanzar niveles inmediatos de estado estacionario en plasma. La dosis de la infusión en bolo inicial se puede calcular a partir de los datos de aclaramiento obtenidos a partir de la farmacocinética en bolo i.v., mediante un experto en la técnica farmacocinética. Los niveles de glucosa en plasma se midieron a intervalos de 10 min a lo largo del experimento y la infusión de 20% de glucosa acuosa se ajusta en consecuencia con el fin de mantener la euglucemia. Las muestras de eritrocitos resuspendidos de cada rata se agrupan y regresan en volúmenes de aproximadamente ½ ml por medio del catéter de la carótida.
- En cada día de experimento, las muestras de las soluciones de los derivados de insulina individuales que se van a someter a ensayo y la solución de insulina humana, se toman antes y al final de los experimentos clamp y las concentraciones de los péptidos se confirman por HPLC. Las concentraciones plasmáticas de insulina de rata y de péptido C, así como del derivado de insulina que se va a someter a ensayo y la insulina humana, se miden en puntos de tiempo pertinentes antes y al final de los estudios. Las ratas se sacrifican al final del experimento utilizando una sobredosis de pentobarbital.

LISTAS DE SECUENCIAS

SEQ ID Nos. 5 - 11 son las secuencias de las cadenas A presentes en los compuestos, mostrados en los ejemplos específicos anteriores y SEQ ID Nos. 12 - 29 son las secuencias de las cadenas B presentes en los compuestos mostrados en los ejemplos específicos anteriores.

- <110> NOVO NORDISK A/S
- <120> Análogos de insulina acilados, estabilizados frente a proteasas
- <130> 7777.504-WO
- <160> 29
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
< 211> 24
< 212> PRT
< 213> Artificial
- <220>
< 223> Cadena A de insulina modificada
- <220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (1)..(1)
< 223> Xaa está ausente o es Gly

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (2)..(2)
 < 223> Xaa está ausente o es Pro

5

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (3)..(3)
 < 223> Xaa está ausente o es Pro

10

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (11)..(11)
 < 223> Xaa es Thr o His

15

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (15)..(15)
 < 223> Xaa es Ser, Asp o Glu

20

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (16)..(16)
 < 223> Xaa es Leu, Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser o Glu

25

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (17)..(17)
 < 223> Xaa es Tyr, Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser o Glu

30

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (18)..(18)
 < 223> Xaa es Gln, Asp o Glu

35

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (21)..(21)
 < 223> Xaa es Asn, Lys o Gln

<400> 1
Xaa Xaa Xaa Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Xaa Ser Ile Cys Xaa Xaa
1 5 10 . 15

40

Xaa Xaa Leu Glu Xaa Tyr Cys Xaa
20

<210> 2
 < 211> 35
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

45

<220>
 < 223> Cadena B de insulina modificada

	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (1)..(1) < 223> Xaa está ausente o es Gly
5	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (2)..(2) < 223> Xaa está ausente o es Pro
10	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (3)..(3) < 223> Xaa está ausente o es Pro
15	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (4)..(4) < 223> Xaa está ausente o es Phe o Glu
20	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (5)..(5) < 223> Xaa está ausente o es Val
	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (6)..(6) < 223> Xaa está ausente o es Asn o Gln
25	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (7)..(7) < 223> Xaa es Gln o Glu
30	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (13)..(13) < 223> Xaa es His, Asp, Pro o Glu
35	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (19)..(19) < 223> Xaa es Tyr, Asp, Gln, His, Arg o Glu
40	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (27)..(27) < 223> Xaa es Phe o His
	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (28)..(28) < 223> Xaa es Phe, Asn o His
45	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (29)..(29) < 223> Xaa está ausente o es Tyr, His, Thr, Gly o Asp
50	<220> < 221> MISC_FEATURE

	< 222> (30)..(30)
	< 223> Xaa está ausente o es Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser o Glu
5	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (31)..(31) < 223> Xaa está ausente o es Pro, His, Gly o Asp
10	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (32)..(32) < 223> Xaa está ausente o es Lys, Arg o Gln
15	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (33)..(33) < 223> Xaa está ausente o es Thr
20	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (34)..(34) < 223> Xaa está ausente o es Leu
	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (35)..(35) < 223> Xaa está ausente o es Glu
	<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
25	<210> 3 < 211> 21 < 212> PRT < 213> Artificial
30	<220> < 223> Cadena A de insulina modificada
35	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (8)..(8) < 223> Xaa es Thr o His
40	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (12)..(12) < 223> Xaa es Ser, Asp o Glu
	<220> < 221> MISC_FEATURE < 222> (13)..(13) < 223> Xaa es Leu, Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser o Glu

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (14)..(14)
 < 223> Xaa es Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly. Arg, Pro, Ser o Glu

5

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (15)..(15)
 < 223> Xaa es Gln, Asp o Glu

10

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (18)..(18)
 < 223> Xaa es Asn, Lys o Gln

15

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 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

Glu Xaa Tyr Cys Xaa
20

20

<210> 4
 < 211> 30
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> Cadena B de insulina modificada

25

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (1)..(1)
 < 223> Xaa es Phe o Glu

30

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (3)..(3)
 < 223> Xaa es Asn o Gln

35

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (4)..(4)
 < 223> Xaa es Gln o Glu

40

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (10)..(10)
 < 223> Xaa es His, Asp, Pro o Glu

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (16)..(16)
 < 223> Xaa es Tyr, Asp, Gln, His, Arg o Glu

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (24)..(24)
 < 223> Xaa es Phe o His

5
 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (26)..(26)
 < 223> Xaa está ausente o es Tyr, His, Thr, Gly o Asp

10
 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (27)..(27)
 < 223> Xaa está ausente o es Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser o Glu

15
 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (28)..(28)
 < 223> Xaa está ausente o es Pro, His, Gly o Asp

20
 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (29)..(29)
 < 223> Xaa está ausente o es Lys, Arg o Gln

25
 <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

30
 <210> 5
 < 211> 21
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> Cadena A

35
 <400> 5
 Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
 1 5 10 15
 Glu Asn Tyr Cys Asn
 20

40
 <210> 6
 < 211> 21
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> Cadena A

<400> 6
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Gly
20

5
 <210> 7
 < 211> 21
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> Cadena A

<400> 7
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys His Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
1 5 10 15

10
Glu Asn Tyr Cys Asn
20

<210> 8
 < 211> 21
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

15
 <220>
 < 223> Cadena A

<400> 8
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn
20

20
 <210> 9
 < 211> 21
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> Cadena A

25
 <400> 9
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15

Glu Leu Tyr Cys Asn
20

30
 <210> 10
 < 211> 21
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> Cadena A

<400> 10
 Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
 1 5 10 15

 Glu Asn Tyr Cys Gly
 20

 <210> 11
 < 211> 21
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

 <220>
 < 223> Cadena A

 <400> 11
 Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
 1 5 10 15

 Glu Asn Tyr Cys Gly
 20

 <210> 12
 < 211> 29
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

 <220>
 < 223> Cadena B

 <400> 12
 Glu Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15

 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Glu Lys
 20 25

 <210> 13
 < 211> 29
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

 <220>
 < 223> Cadena B

 <400> 13
 Glu Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15

 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Glu Glu Lys
 20 25

 <210> 14
 < 211> 29
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

 <220>
 < 223> Cadena B

<400> 14
Glu Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Thr Glu Lys
 20 25

 5
 <210> 15
 < 211> 29
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

 <220>
 < 223> Cadena B

 <400> 15
Glu Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Glu Glu Lys
 20 25
 10

 <210> 16
 < 211> 29
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

 15
 <220>
 < 223> Cadena B

 <400> 16
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu His
 1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Thr Pro Lys
 20 25

 20
 <210> 17
 < 211> 29
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

 <220>
 < 223> Cadena B

 25
 <400> 17
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu
 1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Thr Pro Lys
 20 25

 30
 <210> 18
 < 211> 29
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

 <220>
 < 223> Cadena B

<400> 18
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Thr Pro Lys
 20 25

 5
 <210> 19
 < 211> 29
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

 <220>
 < 223> Cadena B

 <400> 19
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Glu Pro Lys
 20 25
 10

 <210> 20
 < 211> 28
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

 15
 <220>
 < 223> Cadena B

 <400> 20
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Pro Lys
 20 25

 20
 <210> 21
 < 211> 29
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

 <220>
 < 223> Cadena B

 25
 <400> 21
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Gly Gly Gly Arg
 20 25

 30
 <210> 22
 < 211> 29
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

 <220>
 < 223> Cadena B

<400> 22
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Gly Gly Gly Lys
20 25

5
 <210> 23
 < 211> 27
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> Cadena B

<400> 23
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

10
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Lys
20 25

<210> 24
 < 211> 29
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

15
 <220>
 < 223> Cadena B

<400> 24
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Asn Tyr Glu Pro Lys
20 25

20
 <210> 25
 < 211> 29
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

25
 <220>
 < 223> Cadena B

<400> 25
Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe His Tyr Thr Pro Arg
20 25

30
 <210> 26
 < 211> 29
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> Cadena B

<400> 26

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Glu Lys
20 25

<210> 27

< 211> 29

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Cadena B

<400> 27

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr His Arg
20 25

<210> 28

< 211> 29

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Cadena B

<400> 28

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Asp Lys
20 25

<210> 29

< 211> 29

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Cadena B

<400> 29

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys
20 25

REIVINDICACIONES

1. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas en donde el resto acilo se fija a un residuo de lisina en la posición B29 de la insulina humana A14E, B16H, B25H, desB30, en donde
- 5 dicha insulina acilada estabilizada frente a proteasas es insulina humana A14E, B16H, B25H, B29K(N^eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30.
2. Una composición farmacéutica que comprende una insulina acilada estabilizada frente a proteasas según la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
3. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas según la reivindicación 1 o la composición farmacéutica según la reivindicación 2, para uso como medicamento.
- 10 4. Una insulina acilada estabilizada frente a proteasas según la reivindicación 1 o la composición farmacéutica según la reivindicación 2, para uso en el tratamiento o la prevención de hiperglucemia, diabetes de tipo 2, tolerancia alterada a la glucosa o diabetes de tipo 1.
- 15 5. Uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de una insulina estabilizada frente a proteasas según la reivindicación 1 o la composición farmacéutica según la reivindicación 2, para la preparación de una formulación farmacéutica para el tratamiento o la prevención de hiperglucemia, diabetes de tipo 2, tolerancia alterada a la glucosa o diabetes de tipo 1.

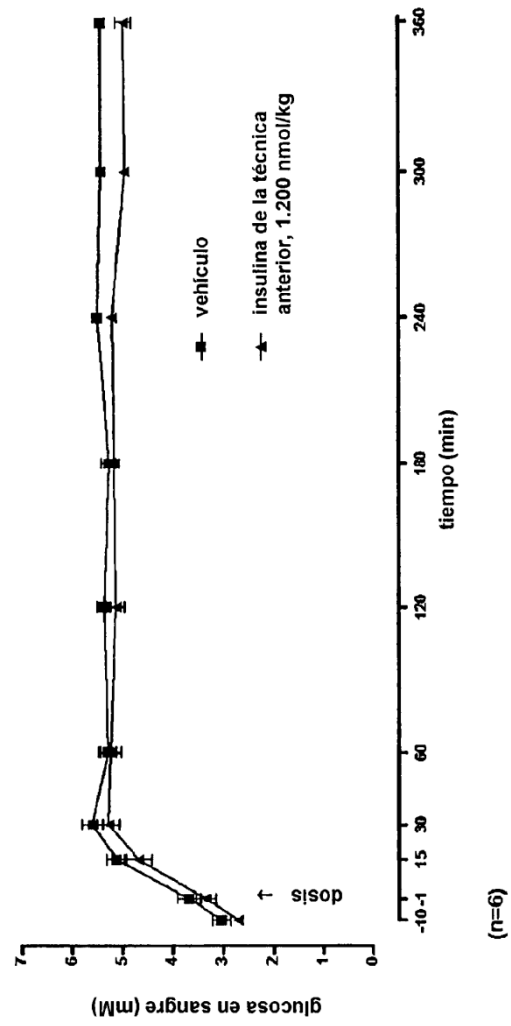


Fig. 1

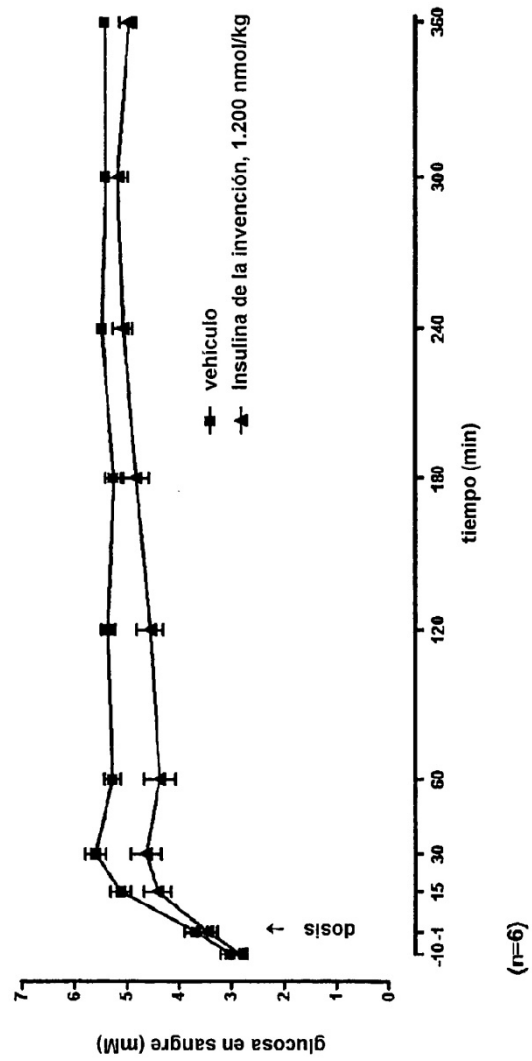


Fig. 2a

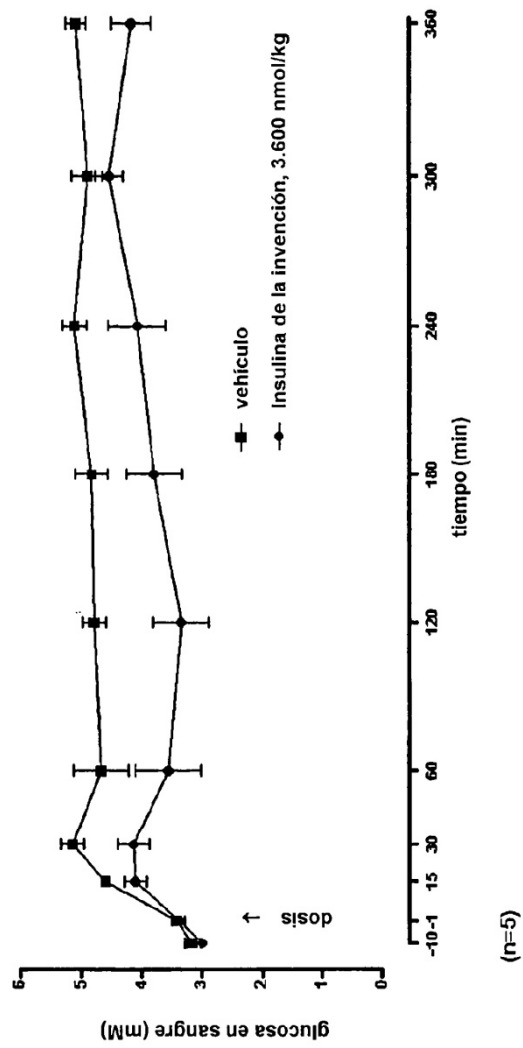


Fig. 2b

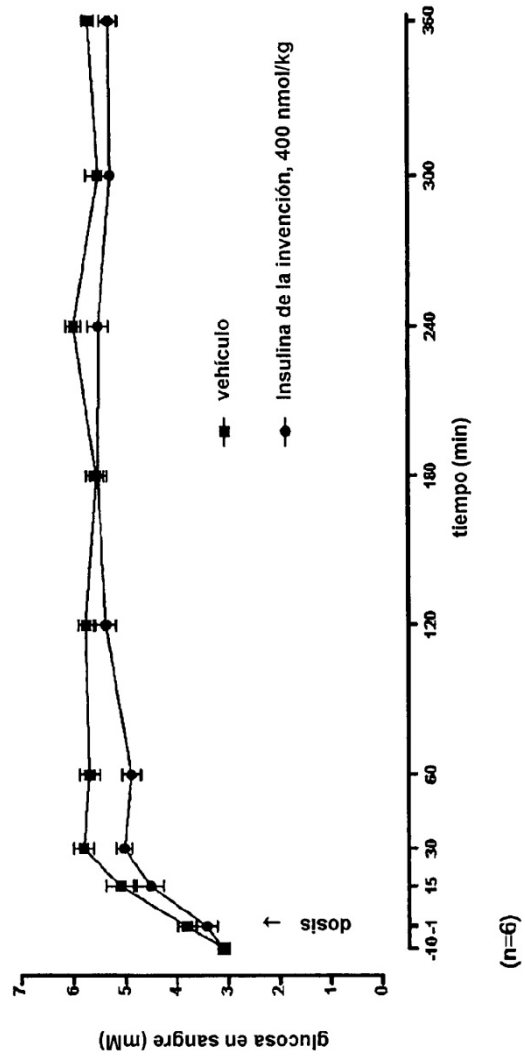


Fig. 3

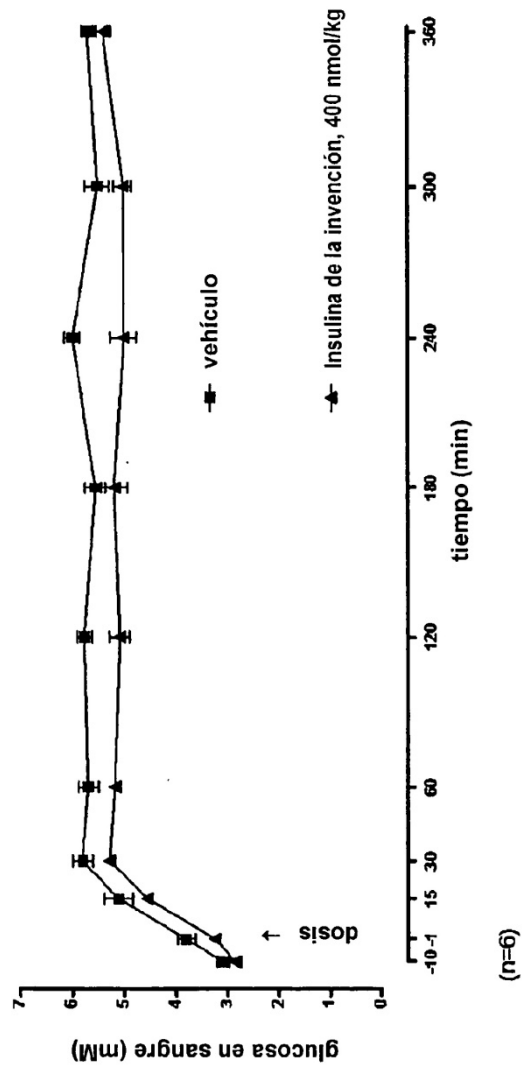


Fig. 4

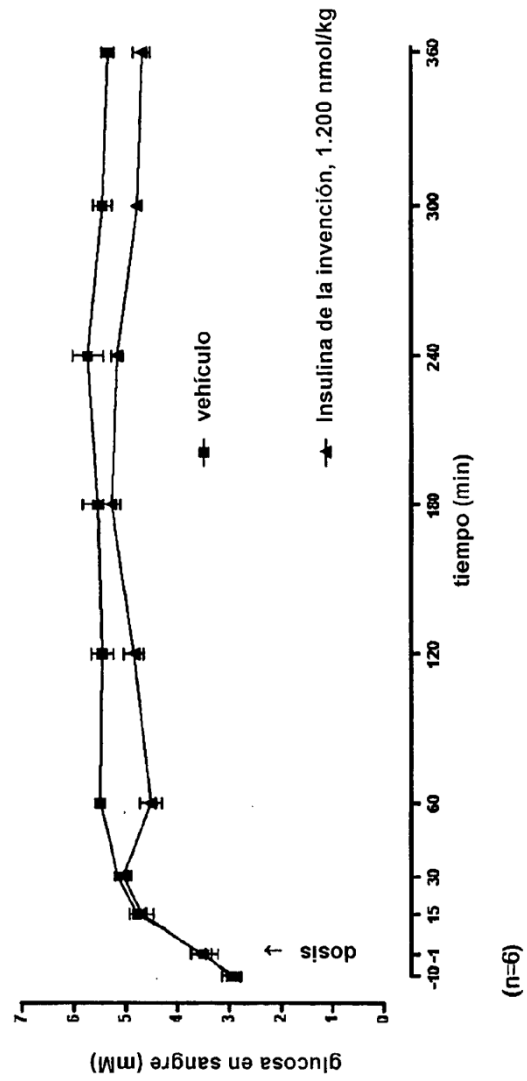


Fig. 5

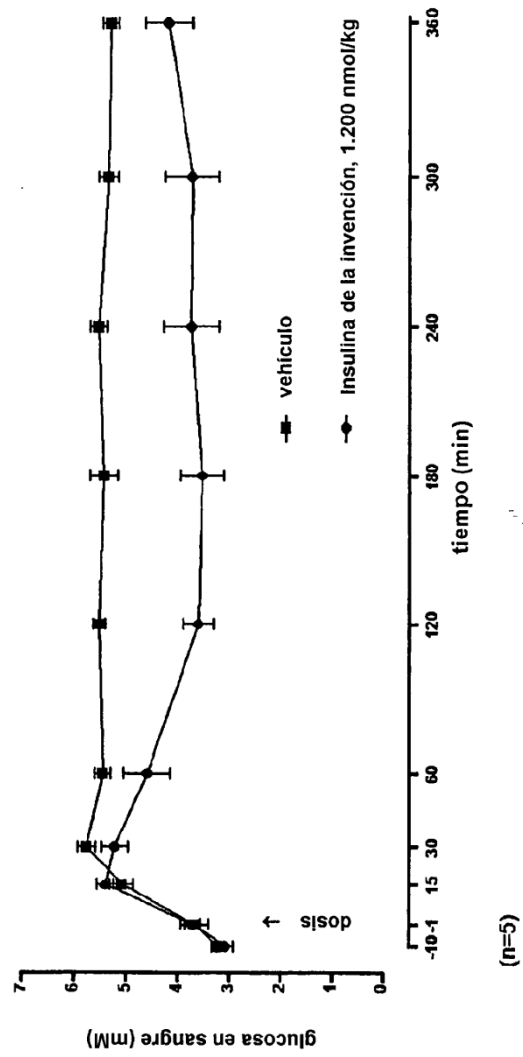


Fig. 6

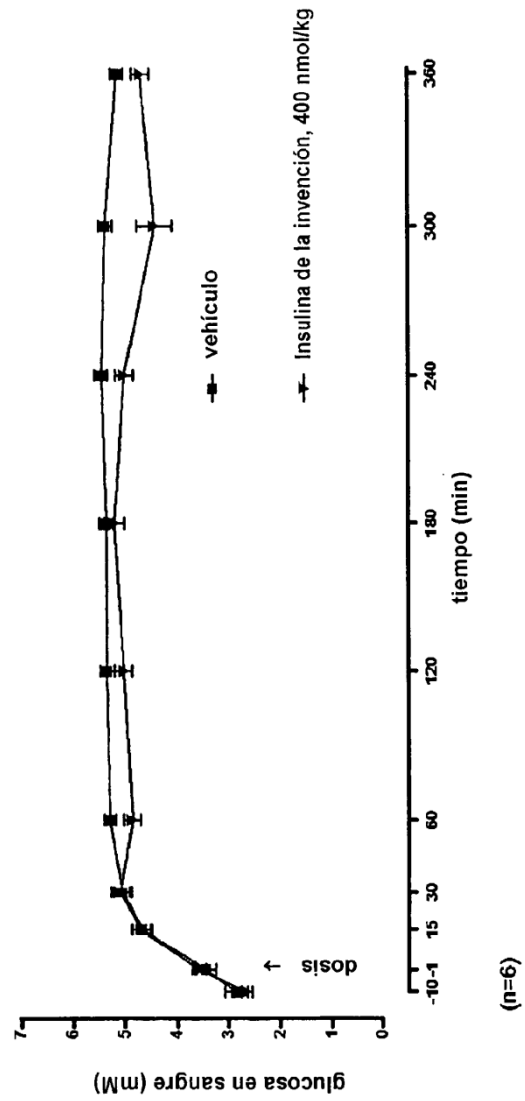


Fig. 7

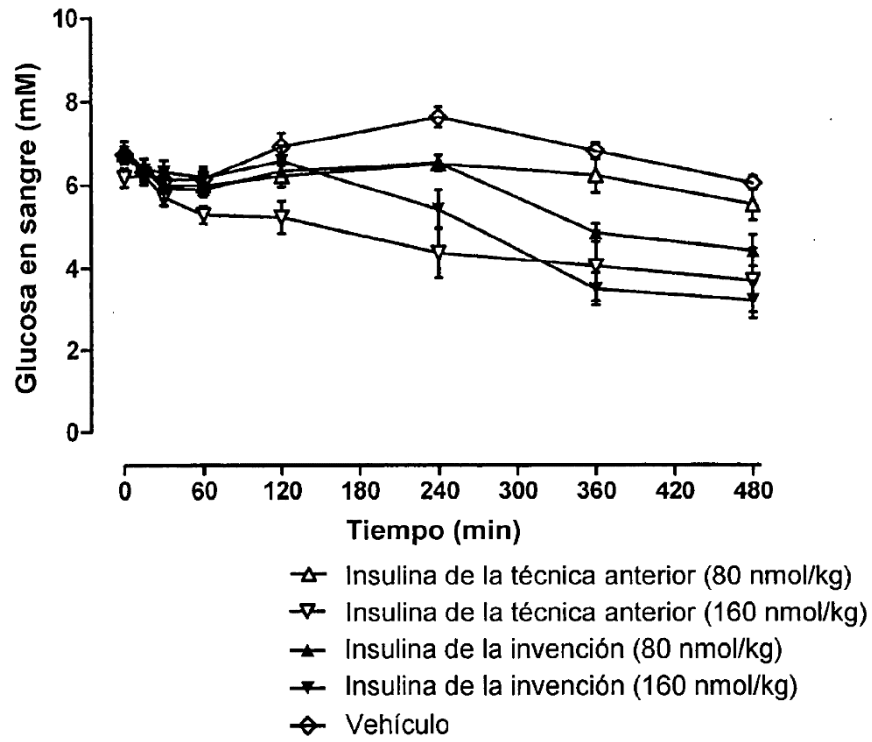


Fig. 8

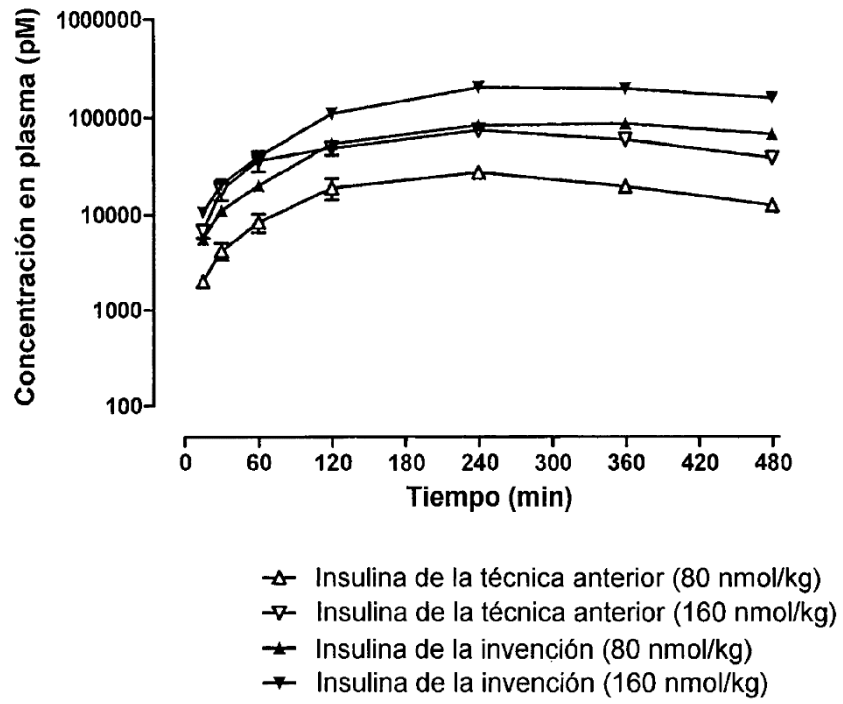


Fig. 9

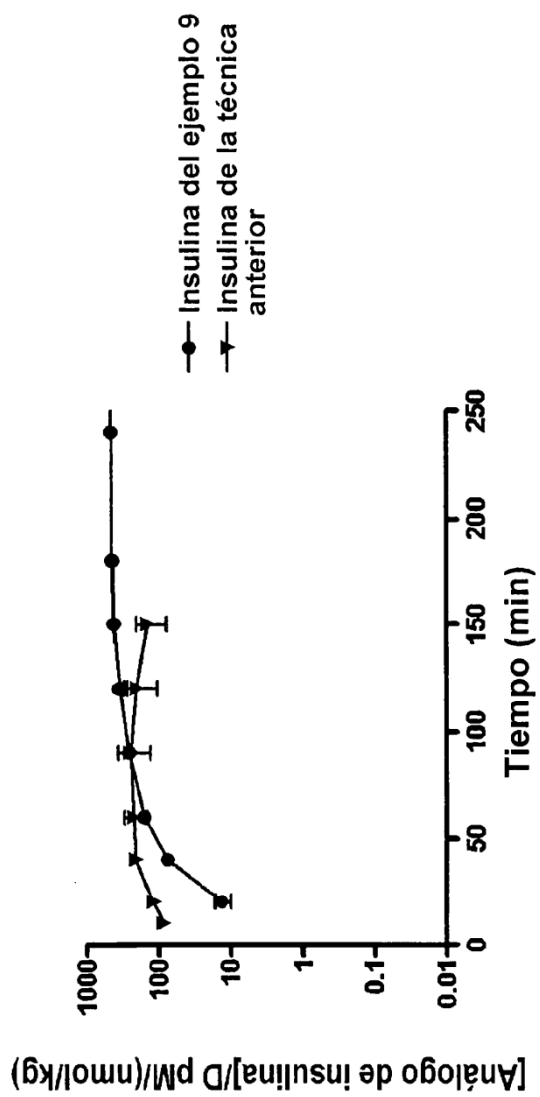


Fig. 10

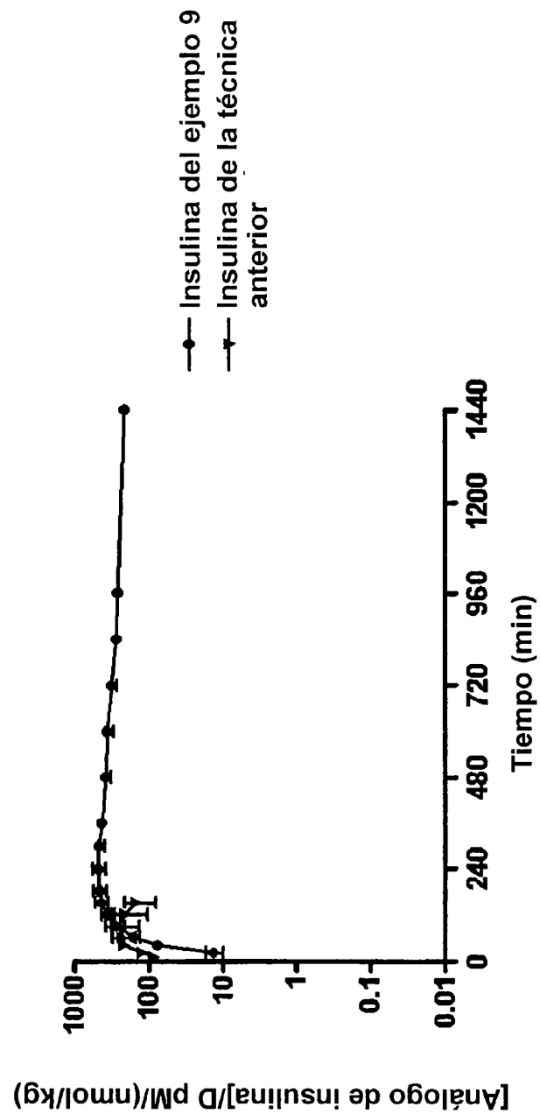


Fig. 11