

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 152**

51 Int. Cl.:

C07K 14/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.01.2009 PCT/EP2009/000017**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.07.2009 WO09087081**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.01.2009 E 09701358 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2229407**

54 Título: **Nuevos derivados de insulina con perfil tiempo/acción extremadamente retardado**

30 Prioridad:

09.01.2008 DE 102008003568

14.04.2008 US 44659 P

24.05.2008 DE 102008025008

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

22.05.2017

73 Titular/es:

SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH

(100.0%)

Brüningstraße 50

65929 Frankfurt am Main, DE

72 Inventor/es:

HABERMANN, PAUL;

SEIPKE, GERHARD;

KURRLE, ROLAND;

MÜLLER, GÜNTER;

SOMMERFELD, MARK;

TENNAGELS, NORBERT;

TSCHANK, GEORG y

WERNER, ULRICH

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 2 613 152 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

Nuevos derivados de insulina con perfil tiempo/acción extremadamente retardado

La invención se refiere a nuevos análogos de insulina con perfil tiempo/acción basal, a su obtención y empleo.

5 Durante los últimos años ha aumentado el número de afecciones de diabetes en una medida francamente epidémica. Debido a la afección, se puede llegar a un acortamiento agravante de la esperanza de vida. Las personas con diabetes deben administrar frecuentemente insulina a su cuerpo desde fuera. Es razonable optimizar el tratamiento con insulina. Entre tanto, existen diversas insulinas con propiedades farmacológicas específicas para el tratamiento. De manera práctica, las diferentes insulinas se diferencian según su tiempo de acción en insulinas eficaces a corto plazo, insulinas de acción rápida, insulinas eficaces a largo plazo e insulinas mixtas. Las denominaciones empleadas como sinónimo para insulinas eficaces a largo plazo son insulina retardada, insulina de depósito o insulina basal. Los productos activos de muchos de estos preparados de insulina son los denominados análogos de insulina, que se han derivado de insulina humana mediante sustitución, delección y/o adición de uno o varios aminoácidos. Los conceptos "análogos de insulina" e "insulina" se emplean como sinónimos en este caso.

15 El concepto de terapia por insulina intensificada intenta reducir el riesgo para la salud, pretendiéndose un control estable del nivel de azúcar en la sangre mediante adición temprana de insulinas basales. Un ejemplo de una insulina basal de uso común es el medicamento Lantus[®] (producto activo: insulina glargina = Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) insulina humana). En general es válido minimizar el número de episodios hipoglucémicos en el desarrollo de nuevas insulinas basales mejoradas. En este caso, una insulina basal ideal actúa de manera segura en cualquier paciente al menos 24 horas. Idealmente, la acción de la insulina se inicia de manera retardada y con un perfil tiempo/acción lo más plano posible, de modo que el peligro de una hipoglucemia a corto plazo está claramente minimizado, y la aplicación se puede efectuar incluso sin ingesta previa de alimentos. Se da un buen abastecimiento de insulina basal si la acción de la insulina permanece constante el mayor tiempo posible, es decir, si el cuerpo se abastece de una cantidad de insulina constante. De este modo, el peligro de episodios hipoglucémicos es reducido, y se minimiza una variabilidad específica del paciente y del día. Por lo tanto, el perfil farmacocinético de una insulina basal ideal debía estar caracterizado por un inicio de acción retardado y por una acción retardada, es decir, de larga duración y uniforme.

30 No obstante – a pesar de las ventajas terapéuticas ya conseguidas – ninguna de las insulinas retardadas descritas hasta la fecha muestra las propiedades farmacocinéticas de una insulina basal ideal. Son deseables insulinas que tienen un perfil tiempo/acción tan plano y duradero que el peligro de episodios hipoglucémicos y de la variación dependiente del día en pacientes se minimiza adicionalmente, y el tiempo de acción se retrasa ulteriormente, de modo que, bajo ciertas circunstancias, ya no se debe administrar insulina diariamente. Esto posibilitaría un tratamiento simplificado de diabéticos, en especial de diabéticos mayores y necesitados de cuidados, que ya no se pueden inyectar insulina por sí mismos, y por lo tanto sería también de gran utilidad económica. En la fase temprana de diabetes tipo 2 serían además útiles tales insulinas basales. Los clínicos informan de que la fobia a las jeringuillas, presente en muchas personas, se puede detener en las mismas comenzando con la terapia por insulina a tiempo. Como consecuencia resulta un mal ajuste del azúcar en la sangre, que conlleva consecuencias diabéticas. Una insulina basal que reduce el número de dosis de insulina efectuadas mediante inyección, podría ocasionar que los pacientes acepten más fácilmente la terapia por insulina.

40 El documento US 6,100,376 da a conocer derivados de insulina con un punto isoeléctrico entre 5 y 8,5, con una estabilidad elevada en medio acuoso ligeramente ácido. El documento US 6,100,376 describe la modificación C-terminal Arg-Arg-OH en la cadena B.

El documento WO 2007/081824 da a conocer análogos de insulina con restos histidina contra fibrilación en las posiciones A4, A8 y B1.

45 El documento WO 89/10937 se refiere a la estabilización de análogos de insulina contra modificaciones químicas, como por ejemplo desamidación o di- o bien polimerización. El documento WO 89/10937 da a conocer modificaciones en las posiciones A15, A18, A21, B3, B4 y B10.

50 Markussen et al. (Protein Engineering, 1987, 1:205-213) dan a conocer análogos de insulina con acción prolongada, y describen sustituciones en las posiciones B-1, B1, B29, B30, B31 y B32. Se substituye con los aminoácidos Thr, Lys, Asp, Arg y Phe.

Kohn et al. (Peptides 28 (2007) 935-948) describen que se puede conseguir la optimización de la farmacodinámica de insulina obteniéndose análogos de insulina cuyo punto isoeléctrico (pI), mediante adición de lisina o arginina en el extremo de cadena B o el término N de la cadena Y a B, está desplazado en el sentido del intervalo alcalino en comparación con el punto isoeléctrico de insulina humana (pI = 5,6), de modo que la solubilidad bajo condiciones

5 fisiológicas es reducida, y resulta un perfil tiempo/acción prolongado. El compuesto 18 de Kohn et al. (Arg (A0), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) insulina humana (pI determinado experimentalmente = 7,3; pI calculado = 7,58) se presenta en este caso como el mejor compuesto en el sentido del concepto. Por lo tanto, el objetivo principal en la configuración de nuevos análogos de insulina es considerado por Kohn et al. la adición de aminoácidos cargados positivamente a la secuencia de aminoácidos de insulina humana, con el fin de aumentar el punto isoelectrónico de pI = 5,6 al intervalo neutro.

10 A este objetivo en el acondicionamiento de nuevos análogos de insulina se opone la sustitución de aminoácidos neutros en insulina humana por aminoácidos ácidos y/o la adición de aminoácidos ácidos, ya que tal sustitución y/o tales adiciones anulan al menos parcialmente el efecto de la introducción de aminoácidos cargados positivamente. No obstante, sorprendentemente ahora se descubrió que conducen al perfil tiempo/acción basal descrito deseable aquellos análogos de insulina que se distinguen por las características:

- el extremo de cadena B está constituido por un resto aminoácido amidado básico, como lisina, o bin argininamida, es decir, en el caso del resto aminoácido amidado básico, el grupo carboxilo del aminoácido terminal en el extremo de cadena B se presenta en su forma amidada, y
- 15 • el resto aminoácido N-terminal de la cadena de insulina A es un resto lisina o arginina, y
- la posición de aminoácido A8 está ocupada por un resto histidina, y
- la posición de aminoácido A21 está ocupada por un resto glicina, y
- dos sustituciones de aminoácidos neutros por aminoácidos ácidos, dos adiciones de restos aminoácido cargados negativamente, o respectivamente una sustitución tal y una sustitución tal, se efectúan respectivamente en las posiciones A5, A15, A18, B-1, B0, B1, B2, B3 y B4.

25 Mientras que las tres primeras características citadas, mediante introducciones de cargas positivas, o bien la exclusión de cargas negativas, tienden a contribuir a un aumento del valor pI de un correspondiente análogo de insulina, las sustituciones y/o adiciones de restos aminoácido cargados negativamente, citadas en último lugar, tienen el efecto contrario y contribuyen a una reducción del valor pI. De modo sorprendente, precisamente los análogos de insulina descritos anteriormente tienen los perfiles tiempo/acción ventajosos deseados. Los valores pI de estos compuestos son más reducidos que los del compuesto 18 de Kohn et al. (Arg (A0), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – insulina humana), pero en este caso presentan, no obstante, un inicio de acción retardado y un tiempo de acción más largo, es decir, un desarrollo de acción extremadamente plano y duradero, uniforme. De este modo se minimiza claramente el peligro de episodios hipoglucémicos. El retardo es tan evidente que el efecto se puede identificar de modo sorprendente incluso en modelos de ensayo en ratas, aunque, en contrapartida, la acción retardada de insulina glargina en la rata no es observable evidentemente. En la figura 1 se representa la acción hipoglucémica del compuesto YKL205 según la invención, en comparación con la de insulina glargina. Se obtienen resultados similares en el perro (véase la figura 2). De este modo se han puesto a disposición nuevas insulinas basales, que se deben aplicar claramente con menor frecuencia. Además de estas ventajas farmacocinéticas descritas, los análogos según la invención, frente a insulina glargina, presentan propiedades claramente mejores desde el punto de vista farmacológico, como por ejemplo especificidad con el receptor y mitogenicidad in vitro. Además, las insulinas reivindicadas tienen también ventajas desde el punto de vista físico-químico.

35 Por consiguiente, es objeto de la invención un análogo de insulina de la fórmula I

ES 2 613 152 T3

- Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,
- 5 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Glu(A5), Glu (A15), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Glu (A15), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His(A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ insulina humana,
- 10 Arg (A0), His(A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,
- 15 Arg (A0), His(A8), Gly (A21), Asp (B3), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ insulina humana,
- 20 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,
- 25 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg(B32) - NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ insulina humana,

5 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B30), Arg (B31) - NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B30), Lys (B31) - NH₂ insulina humana.

10 Mediante la indicación del concepto "insulina humana" en las denominaciones de los citados análogos de insulina se hace referencia a las secuencias de aminoácidos de la cadena A y B de insulina humana, y todas las divergencias (adiciones, sustituciones, deleciones) de las mismas se indican en una denominación dada de un análogo de insulina.

15 Otro objeto de la invención es un procedimiento para la obtención de un análogo de insulina, como se cita anteriormente, obteniéndose por vía recombinante un precursor del análogo de insulina, procesándose el precursor enzimáticamente para dar insulina de dos cadenas, y llevándose a cabo un acoplamiento con argininamida en presencia de un enzima con actividad de tripsina, y aislándose el análogo de insulina.

20 Otro objeto de la invención es un empleo de un análogo de insulina, como se describe anteriormente, para la obtención de un medicamento para el tratamiento de diabetes, en especial de diabetes tipo I o tipo II. Es igualmente objeto de la invención un empleo de un análogo de insulina, como se describe anteriormente, para la obtención de un medicamento para el apoyo de la regeneración de células beta.

Otro objeto de la invención es un medicamento que contiene un análogo de insulina como se describe anteriormente, y/o sales del mismo compatibles fisiológicamente.

25 Otro objeto de la invención es una formulación del análogo de insulina como se describe anteriormente, presentándose la formulación en forma acuosa, que contiene el análogo de insulina disuelto.

Otro objeto de la invención es una formulación del análogo de insulina como se describe anteriormente, presentándose la formulación en forma de polvo.

Otro objeto de la invención es una formulación como se describe anteriormente, estando presente el análogo de insulina como se describe anteriormente en forma cristalina y/o amorfa.

30 Otro objeto de la invención es una formulación del análogo de insulina como se describe anteriormente, presentándose la formulación en forma de una suspensión. Otro objeto de la invención es una formulación del análogo de insulina como se describe anteriormente, conteniendo la formulación adicionalmente una chaperona química.

35 Otro objeto de la invención es un ADN codificante para la cadena A o la cadena B de un análogo de insulina como se describe anteriormente.

Otro objeto de la invención es un vector que contiene un ADN como se describe anteriormente.

Otro objeto de la invención es un organismo huésped que contiene un ADN como se describe anteriormente, o un vector como se describe anteriormente.

Otro objeto de la invención es una formulación como se describe anteriormente, en la que está contenido

adicionalmente un péptido 1 de tipo glucagon (GLP1), o un análogo o derivado del mismo, o exendina-3, o bien -4, o un análogo o derivado del mismo, preferentemente exendina-4.

Otro objeto de la invención es una formulación como se describe anteriormente, en la que se selecciona un análogo de exendina-4 a partir de un grupo que contiene

- 5 H-desPro³⁶-exendina-4-Lys₆-NH₂,
H-des(Pro^{36,37})-exendina-4-Lys₄-NH₂ y

H-des(Pro^{36,37})-exendina-4-Lys₅-NH₂,
o una sal de la misma tolerable desde el punto de vista farmacológico.

- 10 Otro objeto de la invención es una formulación como se describe anteriormente, en la que se selecciona un análogo de exendina-4 a partir de un grupo que contiene

desPro³⁶ [Asp²⁸]exendina-4 (1-39),
desPro³⁶ [IsoAsp²⁸]exendina-4 (1-39),
desPro³⁶ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]exendina-4 (1-39),
desPro³⁶ [Met(O)¹⁴, IsoAsp²⁸]exendina-4 (1-39),
15 desPro³⁶ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-2 (1-39),
desPro³⁶ [Trp(O₂)²⁵, IsoAsp²⁸]exendina-2 (1-39),
desPro³⁶ [Met(O)¹⁴Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4 (1-39) y
desPro³⁶ [Met(O)¹⁴Trp(O₂)²⁵, IsoAsp²⁸]exendina-4 (1-39),
o una sal de la misma tolerable desde el punto de vista farmacológico.

- 20 Otro objeto de la invención es una formulación como se describe en el anterior párrafo, en la que se ha añadido el péptido -Lys₆-NH₂ en los extremos de C de los análogos de exendina-4.

Otro objeto de la invención es una formulación como se describe anteriormente, en la que se selecciona un análogo de exendina-4 a partir de un grupo que contiene

- 25 H-(Lys)₆- des Pro³⁶ [Asp²⁸]exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂
des Asp²⁸Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ exendina-4(1-39) -NH₂,
H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]exendina-4(1-39) -NH₂,
H-Asn-(Glu)₅ des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]exendina-4(1-39) -NH₂,
des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
30 H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
H-(Lys)₆- des Pro³⁶ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂,
H- des Asp²⁸ Pro³⁶ Pro³⁷ Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵]exendina-4(1-39) -NH₂,
H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39) -NH₂,
H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39) -NH₂,
35 des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
H-(Lys)₆-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
H-(Lys)₆- des Pro³⁶ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂,
des Met(O)¹⁴ Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ exendina-4(1-39) -NH₂,
40 H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]exendina-4(1-39) -NH₂,
H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] exendina-4(1-39) -NH₂,
des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂,
H-Asn-(Glu)₅ des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
45 H-(Lys)₆- des Pro³⁶ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂,
des Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵]exendina-4(1-39) -NH₂,
H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39) -NH₂,
H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] exendina-4(1-39) -NH₂,
des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
50 H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

o una sal de la misma tolerable desde el punto de vista farmacológico.

Otro objeto de la invención es una formulación como se describe anteriormente, en la que está contenida adicionalmente Arg³⁴, Lys²⁶ (N^ε(γ-glutamil(N^α-hexadecanoil))) GLP-1 (7-37) [liraglutida], o una sal de la misma

tolerable desde el punto de vista farmacológico.

En este caso, para el especialista es evidente que las insulinas según la invención pueden ser objeto de una formulación farmacéutica, que actúan ventajosamente tras aplicación. En este caso se parte de disoluciones acuosas. Correspondientemente, deben ser miscibles varios otros componentes. El peligro de contaminación viral animal se minimiza al no contener el preparado ningún componente que proceda de fuentes animales. Además es ventajoso impedir una impurificación microbiana mediante adición de agentes conservantes. Mediante la adición de agentes isotónicos se puede compensar un posible efecto negativo de la formulación sobre la fisiología de las células de tejido en el punto de aplicación. La adición de protamina puede tener un efecto estabilizante, de modo que se puede llegar a un preparado de insulina sensiblemente exento de sales si se añade protamina a la formulación. La adición de un componente fenólico puede conducir a una estabilización de la estructura del análogo de insulina empleado y ocasionar, entre otras cosas, el efecto de retardo en el inicio de la acción. A la formulación se pueden añadir también sustancias que estabilizan la estructura espacial de la insulina retardada según la invención, y conducen a una mayor estabilidad térmica. Tales chaperonas químicas pueden comprender, por ejemplo, péptidos sintéticos cortos, que pueden contener también análogos de aminoácidos o, por ejemplo, secuencias peptídicas derivadas del péptido C de insulina.

Para el desarrollo de formas de depósito se pueden integrar las insulinas según la invención en nanopartículas. También son concebibles las denominadas formulaciones de "liberación lenta", en las que la insulina retardada según la invención se presenta unida a soportes polímeros de manera reversible.

Las insulinas según la invención se pueden administrar paralelamente a insulinas de acción rápida, como Apidra[®], NovoRapid[®], Humalog[®], o derivados de insulina o formulaciones con perfil tiempo/acción correspondiente, que se encuentran en desarrollo, o insulina inhalable, o insulinas aplicadas por vía nasal u oral, que se encuentran en desarrollo. En este caso, para el especialista es evidente que, a tal efecto, también se pueden emplear mezclas formuladas correspondientemente a partir de insulina retardada de acción rápida y según la invención. Además se pueden emplear en preparados farmacéuticos los análogos de insulina según la invención que contienen péptidos, que se describen mediante una actividad comparable a la de GLP-1 (péptido-1 tipo glucagón), o la exendina-4, o bien exendina 3. Constituyen ejemplos de tales péptidos GLP-1 (7-37), Exenatide (Byetta[®]) o péptidos cuya obtención se describe en las solicitudes de patente WO 2006/058620, WO 2001/04156, WO 2004/005342 y WO 98/08871. En este caso son especialmente ventajosas formulaciones que contienen una formulación de depósito de estos péptidos. En la fase inicial de la enfermedad diabetes tipo II, son ventajosas especialmente formas de terapia que previenen paralelamente la administración de productos farmacéuticos según la invención, que aumentan la acción de insulina, como por ejemplo metformina. Son igualmente posibles terapias combinadas con inhibidores de dipeptidil peptidasa-4, que aumentan el nivel de incretinas, como combinaciones con sulfonilureas, que aumentan la distribución de insulina en el páncreas. Las insulinas retardadas según la invención se pueden emplear de modo especialmente ventajoso si, mediante aplicación de factores de diferenciación, se induce la regeneración de células beta pancreáticas a partir de correspondientes células madre. Todas estas aplicaciones se citan a modo de ejemplo de la terapia de diabetes, y son igualmente objeto de la invención. Por consiguiente, otro objeto de la invención es el empleo de las insulinas según la invención en combinación con otros productos activos para el tratamiento de diabetes, en especial diabetes tipo I o tipo II.

Otro objeto de la invención es un medicamento que contiene un análogo de insulina según la invención, que constituye en especial una formulación acuosa o un polvo.

El medicamento es un preparado farmacéutico que es preferentemente una disolución o suspensión con fines de inyección; está caracterizado por un contenido en al menos un análogo de insulina según la invención, y/o al menos una de sus sales compatibles desde el punto de vista fisiológico en forma disuelta, amorfa y/o cristalina – preferentemente disuelta.

El preparado presenta preferentemente un valor de pH entre 2,5 y 8,5, en especial entre aproximadamente 4,0 y 8,5, contiene preferentemente un agente de isotonización apropiado, un agente conservante apropiado, y en caso dado un tampón apropiado, así como preferentemente también una determinada concentración de iones cinc, en disolución estéril acuosa. El soporte de la preparación forma la totalidad de componentes del preparado, aparte del producto activo. Agentes de isotonización apropiados son, por ejemplo, glicerina, glucosa, manita, NaCl, compuestos de calcio o magnesio, como CaCl₂, etc. Mediante la selección del agente de isotonización y/o del agente conservante se influye sobre la solubilidad de las insulinas según la invención, o bien de sus sales compatibles desde el punto de vista fisiológico, a valores de pH ligeramente ácidos. Agentes conservantes apropiados son, por ejemplo, fenol, m-cresol, alcohol bencílico y/o p-hidroxibenzoato.

Como sustancias tampón, en especial para el ajuste de un valor de pH entre aproximadamente 4,0 y 8,5 se pueden emplear, por ejemplo, acetato sódico, citrato sódico, fosfato sódico, etc. En otro caso, para el ajuste del valor de pH también son apropiados ácidos diluidos inofensivos desde el punto de vista fisiológico (típicamente HCl), o bien hidróxidos (típicamente NaOH).

Si el preparado posee un contenido en cinc, es preferente un contenido de 1 a 2 mg/mol, en especial de 1 µg/ml a 200 µg de cinc/ml. A través de la adición de Zn se puede influir de modo sorprendentemente conveniente sobre el perfil de acción de los análogos de insulina según la invención. Esto permite preparados, que se diferencian respecto a tiempo de acción total, la velocidad del inicio de acción y el perfil de la curva de acción, y de este modo un ajuste individual del paciente. Otra posibilidad resulta del empleo de un "dispositivo de insulina de cámara doble", que permite la aplicación de una formulación con inicio de acción rápido y/o inicio de acción lento plano, según situación de vida.

Con el fin de la variación del perfil de productos activos del preparado según la invención, también se puede añadir insulina no modificada, preferentemente insulina bovina, porcina o humana, en especial insulina humana, o análogos de insulina y derivados de los mismos. Del mismo modo, se pueden añadir uno o varios derivados de exendina-4 o péptidos, que están caracterizados por una actividad comparable a la de GLP-1 (péptido-1 tipo glucagón), o que corresponden directamente a GLP-1. Tales medicamentos (preparados) son igualmente objeto de la invención.

Las concentraciones de productos activos preferentes son aquellas que corresponden aproximadamente a 1 – 1500, más preferentemente aproximadamente 5 – 1000, y en especial aproximadamente 40 – 400 unidades internacionales/ml.

Los análogos de insulina según la invención se obtienen en primer lugar como precursor, que no comprende aún la amida, por vía biotecnológica. Para el especialista es común que exista una pluralidad de posibilidades para la obtención de insulinas. Como sistemas de célula huésped se emplean en este caso bacterias, levaduras y plantas, o bien células vegetales a cultivar por fermentación. Si la consideración de costes lo permite, también son concebibles sistemas de expresión que utilizan células animales como sistema huésped. No obstante, es condición una libertad segura de virus animales. Por consiguiente, es evidente que los sistemas de expresión descritos a modo de ejemplo representan solo una pequeña sección de sistemas huésped/vector desarrollados para la obtención recombinante de proteínas. En la solicitud no se describen, por ejemplo, procedimientos biotecnológicos que tienen como base sistemas de levaduras o vegetales, como musgo, algas o plantas superiores, como tabaco, guisante, cardo, cebada, maíz o colza. Sin embargo, son igualmente objeto de la invención sistemas huésped/vector, así como secuencias de ADN codificantes que permiten la obtención de péptidos objetivo en correspondientes sistemas de expresión biotecnológicos. Por lo tanto, los organismos huésped se pueden seleccionar especialmente a partir del reino vegetal de organismos de la primera sección Schizophyta que contiene Schizomycetes, bacterias o algas verde-azuladas, organismos de la 2ª sección Phycophyta clase V Chlorophyceae, organismos de la 2ª sección Phycophyta clase VII Rhodophyceae, organismos de la 3ª sección Mycophyta, organismos de la 5ª sección Bryophyta y organismos de la 7ª sección Spermatophyta.

En la solicitud de patente europea EP-A 1 222 207 se describe un plásmido pINT358d, que codifica para una preproinsulina, que comprende un péptido C modificado. Con ayuda de la reacción en cadena de polimerasa (PCR), ahora es posible modificar selectivamente la secuencia que codifica la proinsulina, de modo que se puedan expresar preproinsulinas que pueden servir como precursores de las insulinas según la invención. Las proteínas de fusión correspondientes no se deben obtener necesariamente por vía intracelular. Para el especialista es obvio que tales proteínas se pueden obtener también mediante expresión bacteriana con subsiguiente secreción en el periplasma y/o en el exceso de cultivo. La solicitud de patente europea EP-A 1 364 029 describe esto a modo de ejemplo. Los precursores de insulina, que conducen a los análogos según la invención, son igualmente objeto de la invención.

Las proinsulinas obtenidas de este modo se pueden transformar en principio en un precursor análogo de insulina, que comprende lisina o arginina en posición A0, y porta lisina o arginina en el extremo C-terminal de la cadena B.

Si las proinsulinas según la invención se presentan como cuerpos de inclusión o en forma soluble tras expresión intracelular, estos precursores se deben plegar mediante plegamiento in vitro en la conformación correcta, antes de poderse efectuar el procesado y la modificación bioquímica. En este caso, la proteína de fusión descrita permite un plegamiento directo tras desnaturalización por medio de urea o hidrocioruro de guanidinio, en este caso son igualmente objeto de la invención los intermedios de plegamiento.

Para el enriquecimiento de las etapas intermedias aisladas se emplean métodos bioquímicos, en especial procedimientos de separación, cuyos principios básicos están publicados, y son incluso objeto de libros de texto. Para el especialista es claro que tales principios se pueden combinar en consecuencia, y de este modo pueden conducir a procedimientos que no se publicaron previamente en su secuencia. Por consiguiente, son igualmente objeto de la invención procedimientos que conducen a la purificación de los análogos según la invención.

Otro objeto de la invención es un procedimiento para la obtención de los análogos de insulina según la invención, obteniéndose por vía recombinante un precursor del análogo de insulina, y transformándose el mismo por vía enzimática en un precursor de insulina de 2 cadenas, que porta arginina, o bien lisina en posición N-terminal respecto al aminoácido 1 de la cadena A, y presenta un resto lisina o arginina en el extremo C-terminal de la cadena B, que se transforma en la amida con argininamida o lisinamida en presencia de un enzima con actividad de tripsina, y por consiguiente en la insulina retardada según la invención, y se sintetiza en pureza elevada a través de un

procedimiento de purificación bioquímico.

5 Las proteínas que se diferencian debido a sustitución de al menos un resto aminoácido presente naturalmente con otros restos aminoácidos y/o adición y/o eliminación de al menos un resto aminoácido de la correspondiente proteína, en otro caso igual, presente naturalmente, se denominan "análogos" de proteínas. En el caso de los restos aminoácido añadidos y/o sustituidos se puede tratar también de aquellos que no se presentan naturalmente.

Las proteínas que se obtienen mediante modificación química de determinados restos aminoácido de proteínas de partida, se denominan "derivados" de proteínas. La modificación química puede consistir, por ejemplo, en la adición de uno o varios grupos químicos determinados en uno o varios aminoácidos.

Leyendas de las figuras:

- 10 Fig. 1: acción reductora de azúcar en la sangre de nuevos análogos de insulina en ratas
 Fig. 2: acción reductora de azúcar en la sangre de nuevos análogos de insulina en el perro
 Fig. 3: acción reductora de azúcar en la sangre de YKL205 en el perro
 Fig. 4: dependencia de cinc de la acción hipoglucémica de YKL205 en el perro

Los siguientes ejemplos deben ilustrar los conceptos de la invención, sin tener un efecto limitante en este caso.

- 15 Ejemplo 1: obtención del derivado del vector pINT3580, que codifica para Gly (A21) – insulina y un péptido C modificado, que porta Arg Arg en el límite de cadena C/A.

20 La solicitud de patente europea EP-A 1 222 207 describe los plásmidos pINT358d, pINT91d y la secuencia de cebador Tir. Se emplea ADN de estos productos en la construcción del plásmido pINT3580. El plásmido pINT358d está caracterizado en este caso por una secuencia génica que codifica para un péptido C modificado con propiedades especiales. Se sintetizan tres secuencias de cebador:

pint3580_glya21rev

5'- CAAAGGTCGACTATTAG**CC**CGCAGTAGTTCTCCAGCTGG-3' (SEQ ID NO: 3)

Este cebador, tras elaboración a tal efecto, sirve para introducir glicina (negrita, subrayada) en lugar de asparagina en posición 21 de la cadena A de la secuencia de proinsulina codificada por pINT358d.

- 25 arg_cjuncf

5'-GTCCCTGCAG**CG**TCGCGGCATCGTGGAGCAG-3' (SEQ ID NO: 4)

Este cebador, como el cebador arg_cjunc_rev, sirve para la introducción de arginina en lugar de lisina en el límite de cadena A/B de insulina.

arg_cjunc_rev

- 30 5'- CCACGATGCC GCGACGCTGC AGGGACCCCT CCAGCG-3' (SEQ ID NO: 5)

35 El codón para la arginina a introducir está en negrita en ambos cebadores. Con ADN del plásmido pINT358d como matriz se lleva a cabo con los pares de cebadores Tir / arg_cjunc_rev y arg_cjuncf / pint3580_glya21rev respectivamente una PCR correspondientemente a la solicitud de patente europea EP-A 1 222 207. Se combinan alícuotas de los productos de ambas reacciones, y se emplean en una tercera PCR junto con el par de cebadores Tir / pint3580_glya21rev. El producto de esta reacción se purifica tras separación mediante electroforesis en gel de la mezcla de reacción, y se digiere con los enzimas de restricción Sal1 / Nco1, según datos del fabricante, en una única reacción, la mezcla de reacción se separa mediante electroforesis en gel y el fragmento de ADN que codifica la secuencia de proinsulina se aísla. El fragmento se inserta a continuación en el vector de ADN pINT91d Nco1/Sal1 abierto a través de una reacción de ADN-ligasa.

- 40 Con la mezcla de ligandos se transforman células bacterianas de E. coli competentes. La mezcla de transformación se cultiva en placas de selección que contienen 25 mg/l de ampicilina. El ADN plasmídico se aísla de las colonias y

se caracteriza por medio de análisis de ADN. Los plásmidos correctos reciben la denominación pINT3580.

Ejemplo 2: construcción del plásmido pINT3581 codificante para His (A8), Gly (A21) – preproinsulina

5 La construcción se efectúa como se describe en el ejemplo 1 a través de 3 reacciones en cadena de polimerasa. El producto de la tercera reacción se inserta en el vector de ADN pINT91d Nco1 /Sal1 abierto tras disociación de Nco1 /Sal1. Se emplean los cebadores Tir y pint3580_glya21rev. Se sintetizan dos cebadores adicionales:

pint3580_Ha8f

5'-AGCAGTGCTGCC**CAC**AGCATCTGCTCCCTCTAC-3' (SEQ ID NO: 6)

pint3580_Ha8rev

5'-GAG CAGATGCT GTG GCAGCACTG CTCCACGATG-3' (SEQ ID NO: 7)

10 El codón que codifica para histidina en posición 8 de la cadena A se representa en negrita repectivamente. La construcción se lleva a cabo como se describe en el ejemplo 1. El molde para PCR1 y 2 es ADN del plásmido pINT3580. PCR1 se lleva a cabo con el par de cebadores Tir/ pint3580_Ha8rev y PCR2 se lleva a cabo con el par de cebadores pint3580_Ha8f/ pint3580_glya21rev. En la PCR3 se emplea el par de cebadores Tir/ pint3580_glya21rev. En este caso, el molde es una mezcla de productos de reacción de PCR1 y PCR2. Los plásmidos correctos reciben la denominación pINT3581.

Ejemplo 3: construcción del plásmido pINT3582 codificante para His (A8), Glu (A5), Gly (A21) – preproinsulina

La construcción se efectúa como se describe en el ejemplo 1 y 2 a través de 3 reacciones en cadena de polimerasa. El producto de la tercera reacción se inserta en el vector de ADN pINT91d Nco1 /Sal1 abierto tras disociación de Nco1 /Sal1. Se emplean los cebadores Tir y pint3580_glya21rev. Se sintetizan dos cebadores adicionales:

20 pint3581_Ea5f

5'GCATCGTGGAG**GAG**TGCTGCCACAGCATCTG 3' (SEQ ID NO: 8) pint3581_Ea5rev

5'-CTGT GGCAGCACTC CTCCACGATG CCGCGACG-3' (SEQ ID NO: 9)

25 El codón, que codifica para ácido glutámico en posición 5 de la cadena A se representa en negrita respectivamente. La construcción se lleva a cabo como se describe en el ejemplo1. El molde es ADN del plásmido pINT3581. Los plásmidos correctos reciben la denominación pINT3582.

Ejemplo 4: construcción del plásmido pINT3583 codificante para His (A8), Asp (A18), Gly(A21) - preproinsulina

A diferencia del ejemplo 1, la construcción se efectúa a través de solo una reacción en cadena de polimerasa. El producto de esta reacción se inserta en el vector de ADN pINT91d Nco1 /Sal1 abierto tras disociación de Nco1 /Sal1. Se emplea el cebador Tir. Se sintetiza un cebador adicional:

30 pint3580_Da18rev

5' CAAAGGTCGACTATTAGCCGCAGTAG**GCCT**CCAGCTGGTAGAGGGAG 3' (SEQ ID NO: 10)

El codón que codifica para ácido aspártico en posición 18 de la cadena A se representa en negrita. El molde es ADN del plásmido pINT3581. Los plásmidos correctos reciben la denominación pINT3583.

35 Ejemplo 5: construcción del plásmido pINT3584 codificante para His (A8), Glu (A5) Asp (A18), Gly (A21) – preproinsulina

A diferencia del ejemplo 1, la construcción se efectúa a través de solo una reacción en cadena de polimerasa. El producto de esta reacción se inserta en el vector de ADN pINT91d Nco1 /Sal1 abierto tras disociación de Nco1 /Sal1. Se emplea el cebador Tir. pint3580_Da18rev (Ej.4). El molde es ADN del plásmido pINT3582. Los plásmidos correctos reciben la denominación pINT3584. La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del

compuesto YKL205-1, que se produce tras amidación con argininamida, y describe la siguiente estructura:

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Asp(A18), Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂-insulina humana

La correspondiente amidación con lisinamida conduce al compuesto YKL205-1b:

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Asp (A18), Gly(A21), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂-insulina humana

- 5 Ejemplo 6: construcción del plásmido pINT3585 codificante para His (A8), Glu (A15), Gly (A21) - preproinsulina

A diferencia del ejemplo 1, la construcción se efectúa a través de solo una reacción en cadena de polimerasa. El producto de esta reacción se inserta en el vector de ADN pINT91d Nco1 /Sal1 abierto tras disociación de Nco1 /Sal1. Se emplea el cebador Tir. Se sintetiza un cebador adicional:

pint3580_Ea15rev

10

**5'- CAAAGGTCGA CTATTAGCCG CAGTAGTTCCTCCAGCTCGTA GAGGGAGCAG
ATGCTG -3' (SEQ ID NO: 11)**

El codón que codifica para ácido glutámico en posición 15 de la cadena A se representa en negrita. El molde es ADN del plásmido pINT3581. Los plásmidos correctos reciben la denominación pINT3585.

- 15 Ejemplo 7: construcción del plásmido pINT3586 codificante para His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21) – preproinsulina

A diferencia del ejemplo 1, la construcción se efectúa a través de solo una reacción en cadena de polimerasa. El producto de esta reacción se inserta en el vector de ADN pINT91d Nco1 /Sal1 abierto tras disociación de Nco1 /Sal1. Se emplea el cebador Tir. Se sintetiza un cebador adicional:

pint3585_Ea15_Da18rev

20

**5'- CAAAGGTCGACTATTAGCCGCAGTAGTCCTCCAGCTCGTAGAGGGAGCAG
ATGCTG -3' (SEQ ID NO: 12)**

El codón que codifica para ácido glutámico en posición 15 de la cadena A y en ácido aspártico en posición A18 de la cadena A se representa en negrita respectivamente. El molde es ADN del plásmido pINT3581. Los plásmidos correctos reciben la denominación pINT3586. La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205, que se produce tras amidación con argininamida, y describe la siguiente estructura:

25

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂-insulina humana

La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205b, que se produce tras amidación con lisinamida, y describe la siguiente estructura:

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂-insulina humana

- 30 Ejemplo 8: construcción del plásmido pINT3587codificante para Glu (A5), His (A8), Glu (A15), Gly (A21) – preproinsulina

La construcción se efectúa como se describe en el ejemplo 1 a través de reacciones en cadena de polimerasa. El producto de la tercera reacción se inserta en el vector de ADN pINT91d Nco1 /Sal1 abierto tras disociación de Nco1 /Sal1. Se emplean los cebadores Tir y pint3580_Ea15rev según el ejemplo 6. El molde es ADN del plásmido pINT3582. Los plásmidos correctos reciben la denominación pINT3587. La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205-2, que se produce tras amidación con argininamida, y describe la siguiente estructura:

35

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂-insulina humana

La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205-2b, que se produce tras amidación con lisinamida, y describe la siguiente estructura:

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂-insulina humana

- 5 Ejemplo 9: construcción del plásmido pINT3588 codificante para His (A8), Gly (A21), Asp (B3)- preproinsulina

La construcción se efectúa como se describe en el ejemplo 1 y 2 a través de 3 reacciones en cadena de polimerasa. El producto de la tercera reacción se inserta en el vector de ADN pINT91d Nco1 /Sal1 abierto tras disociación de Nco1 /Sal1. Se emplean los cebadores Tir y pint3580_glya21rev. Se sintetizan dos cebadores adicionales:

pint3581_Db3f

- 10 5'- GCACGATTTGTGG**ACC**CAGCACCTGTGCGGC -3' (SEQ ID NO: 13)

pint3581_Db3rev

5'- CACAGG TGCTGG**TCCA** CAAATCGTGC CGAATTC -3' (SEQ ID NO: 14)

- 15 El codón que codifica para ácido aspártico en posición 3 de la cadena de insulina B se representa en negrita respectivamente. La construcción se lleva a cabo como se describe en el ejemplo 1. El molde es ADN del plásmido pINT3581. Los plásmidos correctos reciben la denominación pINT3588.

Ejemplo 10: construcción del plásmido pINT3589 codificante para Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Asp (B3)- preproinsulina

Si las reacciones se llevan a cabo como se describe en el ejemplo 9, pero se emplea en PCR1 y PCR 2 ADN del plásmido pINT3582 como molde, se llega al plásmido pINT3589.

- 20 La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205-3, que se produce tras amidación con argininamida, y describe la siguiente estructura:

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂-insulina humana

La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205-3b, que se produce tras amidación con lisinamida, y describe la siguiente estructura:

- 25 Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂-insulina humana

Ejemplo 11: construcción del plásmido pINT3590 codificante para His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3) – preproinsulina

- 30 Si las reacciones se llevan a cabo como se describe en el ejemplo 9, pero se emplea en PCR1 y PCR 2 ADN del plásmido pINT3585 como molde, se llega al plásmido pINT3590. La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205-4, que se produce tras amidación con argininamida, y describe la siguiente estructura:

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂-insulina humana

La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205-4b, que se produce tras amidación con lisinamida, y describe la siguiente estructura:

- 35 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂-insulina humana

Ejemplo 12: construcción del plásmido pINT3591 codificante para His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3)- preproinsulina

Si las reacciones se llevan a cabo como se describe en el ejemplo 9, pero se emplea en PCR1 y PCR 2 ADN del

ES 2 613 152 T3

plásmido pINT3586 como molde, se llega al plásmido pINT3591. La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205-5, que se produce tras amidación con argininamida, y describe la siguiente estructura:

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂-insulina humana

- 5 La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205-5b, que se produce tras amidación con lisinamida, y describe la siguiente estructura:

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂-insulina humana

Ejemplo 13: construcción del plásmido pINT3592 codificante para His (A8), Gly (A21), Asp (B3)- Glu (B4) - preproinsulina

- 10 La construcción se efectúa como se describe en el ejemplo 1 y 2 a través de 3 reacciones en cadena de polimerasa. El producto de la tercera reacción se inserta en el vector de ADN pINT91d Nco1 /Sal1 abierto tras disociación de Nco1 /Sal1. Se emplean los cebadores Tir y pint3580_glya21rev. Se sintetizan dos cebadores adicionales:

pint3581_Db3_Eb4f

5'- GCACGATTTGTG**GACGAG**CACCTGTGCGGCTC -3' (SEQ ID NO: 15)

- 15 pint3581_Db3_Eb4rev

5'- CGCACAGG TG**CTCG**TCCA CAAATCGTGC CGAATTTTC -3' (SEQ ID NO: 16)

- 20 El codón que codifica para ácido aspártico en posición 3 y ácido glutámico en posición 4 de la cadena de insulina B se representa en negrita respectivamente. La construcción se lleva a cabo como se describe en el ejemplo 1. El molde es ADN del plásmido pINT3581. Los plásmidos correctos reciben la denominación pINT3592. La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205-6, que se produce tras amidación con argininamida, y describe la siguiente estructura:

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂-insulina humana

La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205-6b, que se produce tras amidación con lisinamida, y describe la siguiente estructura:

- 25 Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂-insulina humana

Ejemplo 14: construcción del plásmido pINT3593 codificante para His (A8), Gly (A21), Glu (B4) - preproinsulina

La construcción se efectúa como se describe en el ejemplo 1 y 2 a través de 3 reacciones en cadena de polimerasa. El producto de la tercera reacción se inserta en el vector de ADN pINT91d Nco1 /Sal1 abierto tras disociación de Nco1 /Sal1. Se emplean los cebadores Tir y pint3580_glya21rev. Se sintetizan dos cebadores adicionales:

- 30 pint3581_Eb4f

5'- ACGATTTGTGAAC**GAG**CACCTGTGCGGCTC -3' (SEQ ID NO: 17)

pint3581_Eb4rev

5'- CGCACAGG TG**CTCG**TTCA CAAATCGTGC CGAATTTTC -3' (SEQ ID NO: 18)

- 35 El codón que codifica para ácido glutámico en posición 4 de la cadena de insulina B se representa en negrita. La construcción se lleva a cabo como se describe en el ejemplo 1. El molde es ADN del plásmido pINT3581. Los plásmidos correctos reciben la denominación pINT3593.

Ejemplo 15: construcción del plásmido pINT3594 codificante para Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B4) - preproinsulina

Si las reacciones se llevan a cabo como se describe en el ejemplo 9, pero se emplea en PCR1 y PCR 2 ADN del plásmido pINT3582 como molde, se llega al plásmido pINT3594.

La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205-7, que se produce tras amidación con argininamida, y describe la siguiente estructura:

5 Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂-insulina humana.

La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205-7b, que se produce tras amidación con argininamida, y describe la siguiente estructura:

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂-insulina humana

10 Ejemplo 16: construcción del plásmido pINT3595 codificante para His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4) - preproinsulina

Si las reacciones se llevan a cabo como se describe en el ejemplo 9, pero se emplea en PCR1 y PCR 2 ADN del plásmido pINT3585 como molde, se llega al plásmido pINT3595. La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205-8, que se produce tras amidación con argininamida, y describe la siguiente estructura:

15 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂-insulina humana

La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205-8b, que se produce tras amidación con argininamida, y describe la siguiente estructura:

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂-insulina humana

20 Ejemplo 17: construcción del plásmido pINT3596 codificante para His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4)-preproinsulina

Si las reacciones se llevan a cabo como se describe en el ejemplo 9, pero se emplea en PCR1 y PCR 2 ADN del plásmido pINT3586 como molde, se llega al plásmido pINT3596. La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205-9, que se produce tras amidación con argininamida, y describe la siguiente estructura:

25 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂-insulina humana

La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205-9b, que se produce tras amidación con argininamida, y describe la siguiente estructura:

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂-insulina humana

Ejemplo 18: construcción del plásmido pINT3597 codificante para His (A8), Gly (A21), Glu (B0) –preproinsulina

30 La construcción se efectúa a través de 2 reacciones en cadena de polimerasa. Se emplea el cebador pint3580_glya21rev. Se sintetizan dos cebadores adicionales:

pint3581_Eb0f1

5'- CAACAGGAA ATTCGGCACG **AGAG**TTTGTG AACCAGCACC TGTG-3' (SEQ

ID NO: 19)

35 pint3581_Eb01f2

5'- TATCGA CCAT GG CAACAACA TCAACAGGAA ATTCGGCACG **AGAG**-3' (SEQ ID NO: 20)

En este caso, ambos cebadores se solapan parcialmente. Pint3581_Eb0f2 contiene una secuencia de identificación de Ncol. Esta se representa subrayada. El codón que codifica para ácido glutámico en posición 0 al comienzo de la

cadena B, se representa respectivamente en negrita. El molde para PCR1 es ADN del plásmido pINT3581.

PCR1 se lleva a cabo con el par de cebadores pint3581_Eb-1f2 / pint3580_glya21rev. El molde para PCR2 es el producto de PCR1. PCR2 se lleva a cabo con el par de cebadores pint3581_Eb-1f2 / pint3580_glya21rev. El producto de PCR2 cubre la secuencia de preproinsulina completa. El producto de la segunda reacción se inserta en el vector de ADN pINT91d Nco1/Sal1 abierto tras disociación de Nco1/Sal1. Los plásmidos correctos reciben la denominación pINT3597. Si se substituye el codón para ácido glutámico en posición B0 por el codón de ácido aspártico y se sigue el ejemplo, se llega a plásmidos que portan ácido aspártico en lugar de ácido glutámico en posición B0.

5
10 Ejemplo 19: construcción del plásmido pINT3598 codificante para Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B0) – preproinsulina

Si las reacciones se llevan a cabo como se describe en el ejemplo 18, pero se emplea en PCR1 ADN del plásmido pINT3582 como molde, se llega al plásmido pINT3598. La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205-10, que se produce tras amidación con argininamida, y describe la siguiente estructura:

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂-insulina humana

15 La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205-10b, que se produce tras amidación con lisinamida, y describe la siguiente estructura:

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂-insulina humana

Ejemplo 20: construcción del plásmido pINT3599 codificante para His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0) - preproinsulina

20 Si las reacciones se llevan a cabo como se describe en el ejemplo 18, pero se emplea en PCR1 ADN del plásmido pINT3585 como molde, se llega al plásmido pINT3599. La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205-11, que se produce tras amidación con argininamida, y describe la siguiente estructura:

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂-insulina humana

25 La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205-11b, que se produce tras amidación con lisinamida, y describe la siguiente estructura:

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂-insulina humana

Ejemplo 21: construcción del plásmido pINT3600 codificante para His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0) - preproinsulina

30 Si las reacciones se llevan a cabo como se describe en el ejemplo 18, pero se emplea en PCR1 ADN del plásmido pINT3586 como molde, se llega al plásmido pINT3600. La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205-12, que se produce tras amidación con argininamida, y describe la siguiente estructura:

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂-insulina humana

La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205-12b, que se produce tras amidación con lisinamida, y describe la siguiente estructura:

35 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂-insulina humana

Ejemplo 22: construcción del plásmido pINT3601 codificante para His (A8), Gly (A21), Asp (B1) – preproinsulina

La construcción se efectúa a través de 2 reacciones en cadena de polimerasa. Se emplea el cebador pint3580_glya21rev. Se sintetizan dos cebadores adicionales:

pint3581_Db1f1

40 5'-CAACAGGAA ATTCGGCACG **AGAC**GTG AACCAGCACC TGTGCG-3' (SEQ ID NO: 21)

pint3581_Db1f2

5'-TATCGA CCAT GG CAACAACA TCAACAGGAA ATTCGGCACG **AGAC**-3' (SEQ ID NO: 22)

En este caso, ambos cebadores se solapan parcialmente. Pint3581_Db-1f2 contiene una secuencia de identificación de NcoI. Esta se representa subrayada. El codón que codifica para ácido glutámico en posición 1 de la cadena B, se representa respectivamente en negrita. El molde para PCR1 es ADN del plásmido pINT3581. PCR1 se lleva a cabo con el par de cebadores pint3581_Db1f1 / pint3580_glya21rev. El molde para PCR2 es el producto de PCR1. PCR2 se lleva a cabo con el par de cebadores pint3581_Db1f2 / pint3580_glya21rev. El producto de PCR2 cubre la secuencia de preproinsulina completa. El producto de la segunda reacción se inserta en el vector de ADN pINT91d Nco1/Sal1 abierto tras disociación de Nco1/Sal1. Los plásmidos correctos reciben la denominación pINT3601.

10 Ejemplo 23: construcción del plásmido pINT3602 codificante para Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Asp (B1) - preproinsulina

Si las reacciones se llevan a cabo como se describe en el ejemplo 22, pero se emplea en PCR1 ADN del plásmido pINT3582 como molde, se llega al plásmido pINT3602. La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205-13, que se produce tras amidación con argininamida, y describe la siguiente estructura:

15 Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂-insulina humana

La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205-13b, que se produce tras amidación con lisinamida, y describe la siguiente estructura:

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂-insulina humana

20 Ejemplo 24: construcción del plásmido pINT3603 codificante para His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1) - preproinsulina

Si las reacciones se llevan a cabo como se describe en el ejemplo 22, pero se emplea en PCR1 ADN del plásmido pINT3585 como molde, se llega al plásmido pINT3603. La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205-14, que se produce tras amidación con argininamida, y describe la siguiente estructura:

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂-insulina humana

25 La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205-14b, que se produce tras amidación con lisinamida, y describe la siguiente estructura:

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂-insulina humana

Ejemplo 25: construcción del plásmido pINT3604 codificante para His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1) - preproinsulina

30 Si las reacciones se llevan a cabo como se describe en el ejemplo 22, pero se emplea en PCR1 ADN del plásmido pINT3586 como molde, se llega al plásmido pINT3604. La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205-15, que se produce tras amidación con argininamida, y describe la siguiente estructura:

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂-insulina humana

35 La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205-15b, que se produce tras amidación con lisinamida, y describe la siguiente estructura:

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂-insulina humana

Ejemplo 26: construcción del plásmido pINT3605 codificante para His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1) - preproinsulina

40 La construcción se efectúa a través de 2 reacciones en cadena de polimerasa. Se emplea el cebador pint3580_glya21rev y el cebador pint3581_Eb01f2 descrito en el ejemplo 18. Se sintetiza el cebador pint3597_Db1f:

5'-CAACAGGAA ATTCGGCACG **AGAGGAC**GTG AACCAGCACC TGTGC-3' (SEQ ID NO: 23)

5 El codón que codifica para ácido glutámico en posición 0 y el que codifica para ácido aspártico respectivamente al inicio de la cadena B se representan en negrita respectivamente. El molde para PCR1 es ADN del plásmido pINT3597. PCR1 se lleva a cabo con el par de cebadores pint3597_Db1f/ pint3580_glya21rev. El molde para PCR2 es el producto de PCR1. PCR2 se lleva a cabo con el par de cebadores pint3581_Eb1f2 / pint3580_glya21rev. El producto de PCR2 cubre la secuencia de preproinsulina completa. El producto de la segunda reacción se inserta en el vector de ADN pINT91d Nco1/Sal1 abierto tras disociación de Nco1/Sal1. Los plásmidos correctos reciben la denominación pINT3605. La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205-16, que se produce tras amidación con argininamida, y describe la siguiente estructura:

10 Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂-insulina humana

La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205-16b, que se produce tras amidación con lisinamida, y describe la siguiente estructura:

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂-insulina humana

15 Ejemplo 27: construcción del plásmido pINT3606 codificante para His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), desThr (B30) – preproinsulina

La construcción se efectúa como se describe en el ejemplo 1 y 2 a través de 3 reacciones en cadena de polimerasa. Se emplea el cebador Tir y pint3580_glya21rev. Zwei weitere Primer werden synthetisiert:

desB30f

5'-TTCTACACACCC**AA**GC GCGATGTTCCCTCAGGTGG-3' (SEQ ID NO: 24)

20 desB30rev

5'-AGG AACATCGCGC TTGGGTGTGT AGAAGAAGC-3' (SEQ ID NO: 25)

25 El molde para PCR1 y PCR2 es ADN del plásmido pINT3586. PCR1 se lleva a cabo con el par de cebadores desB30f / pint3580_glya21rev y PCR2 se lleva a cabo con el par de cebadores Tir / desB30rev. Como molde para PCR3 se emplea una mezcla equimolar de productos de PCR1 y PCR2. La reacción se lleva a cabo con el par de cebadores Tir/ pint3580_glya21rev. El producto de PCR3 cubre la secuencia de preproinsulina completa. El producto de la tercera reacción se inserta en el vector de ADN pINT91d Nco1/Sal1 abierto tras disociación de Nco1/Sal1. La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205-17, que se produce tras amidación con argininamida, y describe la siguiente estructura:

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B30), Arg (B31) - NH₂-insulina humana

30 La preproinsulina codificada por el plásmido es precursor del compuesto YKL205-17b, que se produce tras amidación con lisinamida, y describe la siguiente estructura:

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B30), Lys (B31) - NH₂-insulina humana

Ejemplo 28: expresión de los derivados de proinsulina

La expresión se lleva a cabo correspondientemente al ejemplo 1 de la solicitud de patente europea EP-A 1 222 207.

35 Ejemplo 29: plegamiento de los derivados de proinsulina

El plegamiento se efectúa en principio según el método descrito en el documento EP-A 0 668 282.

Ejemplo 30: procesado enzimático de la preproinsulina plegada para dar el precursor de insulina de 2 cadenas Arg(A0), cuyo extremo C de cadena B terminal está caracterizado por medio de lisina o arginina.

40 El procesado enzimático del precursor de preproinsulina plegado se efectúa, por ejemplo, como se describe en el ejemplo 4 del documento WO91/03550. En este caso se muestra especialmente ventajoso el empleo de las

variantes de tripsina descritas en el documento WO 2007/031187 A1

Ejemplo 31: obtención de una Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂- insulina humana

Independientemente del posicionamiento de los aminoácidos adicionales se lleva a cabo una reacción estándar como sigue: se disuelven 100 mg de análogo de insulina Arg (A0), Gly (A21), Arg (B31) en 0,95 ml de disolución de argininamida (446 g/L), se añaden 0,13 mL de tampón acetato sódico M (pH 5.8) y 2 ml de DMF. La mezcla de reacción se enfría a 12°C y se activa mediante adición de 0,094 ml de tripsina (0,075 mg, Roche Diagnostics). Después de 8 horas se detiene la reacción mediante adición de THF hasta pH 2,5, y se analiza por HPLC. Se forma >60 % de insulina humana Arg (A0), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂. Tras adición de disolución de inhibidor de tripsina se efectúa la purificación del análogo amidado en analogía al documento US 5,656,722.

La obtención del correspondiente compuesto de lisinamida se efectúa análogamente. Sin embargo se parte de una disolución madre acuosa de lisinamida, que contiene 366 g/L de lisinamida disuelta.

Ejemplo 32: formulación de los derivados de insulina amidados

Para examinar los derivados de insulina según la invención sobre sus propiedades biológicas, farmacológicas y físicas se obtuvo una disolución de los compuestos como sigue: el derivado de insulina según la invención se disolvió con una concentración objetivo de 240 ± 5 µM en ácido clorhídrico 1 mM con 80 µg/mL de cinc (como cloruro de cinc).

Como medio de disolución se emplearon las siguientes composiciones:

- a) ácido clorhídrico 1 mM
- b) ácido clorhídrico 1 mM, 5 µg/mL de cinc (añadido como cloruro de cinc o ácido clorhídrico)
- c) ácido clorhídrico 1 mM, 10 µg/mL de cinc (añadido como cloruro de cinc o ácido clorhídrico)
- d) ácido clorhídrico 1 mM, 15 µg/mL de cinc (añadido como cloruro de cinc o ácido clorhídrico)
- e) ácido clorhídrico 1 mM, 30 µg/mL de cinc (añadido como cloruro de cinc o ácido clorhídrico)
- f) ácido clorhídrico 1 mM, 80 µg/mL de cinc (añadido como cloruro de cinc o ácido clorhídrico)
- g) ácido clorhídrico 1 mM, 120 µg/mL de cinc (añadido como cloruro de cinc o ácido clorhídrico)

A tal efecto se pesó del material liofilizado en primer lugar una cantidad aproximadamente un 30 % mayor que la requerida en base al peso molecular y a la concentración deseada. Después se determinó la concentración presente por medio de HPLC analítica, y a continuación la disolución se completó al volumen necesario para la consecución de la concentración objetivo con ácido clorhídrico 5 mM con 80 µg/mL de cinc. En caso necesario se reajustó el valor de pH a 3,5 ± 0,1. Tras el análisis definitivo por medio de HPLC para asegurar la concentración objetivo de 240 ± 5 µM, la disolución acabada se trasladó a una frasco estéril cerrado con un septum y una tapa rebordeada por medio de una jeringa con un elemento de filtración de 0,2 µm. Para el análisis a corto plazo, único, de los derivados de insulina según la invención no se efectuó una optimización de las formulaciones, por ejemplo respecto a una adición de agentes isotónicos, agentes conservantes o sustancias tampón.

Ejemplo 33: evaluación de la acción reductora de azúcar en sangre de nuevos análogos de insulina en la rata

La acción reductora de azúcar en la sangre de nuevos análogos de insulina seleccionados se analiza en ratas Wistar macho, sanas, normoglucémicas. Se inyecta en los animales macho una dosis de 9 nmol/kg de un análogo de insulina por vía subcutánea. Inmediatamente antes de la inyección del análogo de insulina y a intervalos regulares, hasta ocho horas tras la inyección, se extraen muestras de sangre de los animales, y se determina en las mismas el contenido en azúcar de la sangre. El experimento muestra claramente (véase la fig. 1), que el análogo de insulina empleado según la invención conduce a un inicio de acción claramente retardado, y a un tiempo de acción más largo, uniforme.

Ejemplo 34: evaluación de la acción reductora de azúcar en sangre de nuevos análogos de insulina en el perro

5 La acción reductora de azúcar en la sangre de nuevos análogos de insulina seleccionados se analiza en perros Beagle macho, sanos, normoglucémicos. Se inyecta en los animales macho una dosis de 6 nmol/kg de un análogo de insulina por vía subcutánea. Inmediatamente antes de la inyección del análogo de insulina y a intervalos regulares, hasta cuarenta y ocho horas tras la inyección, se extraen muestras de sangre de los animales, y se determina en las mismas el contenido en azúcar de la sangre. El experimento muestra claramente (véase la fig. 2), que el análogo de insulina empleado según la invención conduce a un inicio de acción claramente retardado, y a un tiempo de acción más largo, uniforme.

Ejemplo 35: evaluación de la acción reductora de azúcar en sangre en el perro en el caso de dosis duplicada

10 La acción reductora de azúcar en la sangre de nuevos análogos de insulina seleccionados se analiza en perros Beagle macho, sanos, normoglucémicos. Se inyecta en los animales macho una dosis de 6 nmol/kg y 12 nmol/kg de un análogo de insulina por vía subcutánea. Inmediatamente antes de la inyección del análogo de insulina y a intervalos regulares, hasta cuarenta y ocho horas tras la inyección, se extraen muestras de sangre de los animales, y se determina en las mismas el contenido en azúcar de la sangre. El experimento muestra claramente (véase la fig. 3), que el análogo de insulina empleado según la invención actúan en dependencia de la dosis, pero a pesar de 15 dosis duplicada el transcurso de reacción presenta un desarrollo plano, es decir, no se observa ningún punto mínimo pronunciado (Nadir). De ello se puede deducir que las insulinas según la invención conducen claramente a menos episodios hipoglucémicos en comparación con insulinas retardadas conocidas.

Ejemplo 36: evaluación de la acción reductora de azúcar en sangre en el perro en el caso de diversas concentraciones de cinc en la formulación

20 Los experimentos se llevaron a cabo como se describe en el ejemplo 35. La figura 4 muestra el resultado. Después se puede influir sobre la curva tiempo-acción del análogo de insulina según la invención mediante el contenido en iones cinc en la formulación, con concentración de insulina constante, de modo que con contenido en cinc nulo o reducido se observa un inicio de acción rápido, y la acción se mantiene durante 24 horas, mientras que con contenido en cinc más elevado se observa un inicio de acción plano, y la acción de insulina se mantiene claramente 25 más de 24 horas.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Sanofi-Aventis Deutschland GmbH

<120> Nuevos derivados de insulina con perfil tiempo/acción extremadamente retardado

<130> DE2008/001

5 <140> 102008003568.8-43
< 141> 2008-01-09

<160> 25

<170> PatentIn version 3.3

10 <210> 1
< 211> 22
< 212> PRT
< 213> Artificial

<220>
< 223> Cadena A

15 <220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (1)..(1)
< 223> Xaa es Lys o Arg

20 <220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (6)..(6)
< 223> Xaa es Asp, Gln o Glu

25 <220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (16)..(16)
< 223> Xaa es Asp, Glu o Gln

30 <220>
< 221> MISC_FEATURE
< 222> (19)..(19)
< 223> Xaa es Asp, Glu o Asn

<400> 1
Xaa Gly Ile Val Glu Xaa Cys Cys His Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Xaa
1 5 10 15

Leu Glu Xaa Tyr Cys Gly
20

35 <210> 2
< 211> 34
< 212> PRT
< 213> Artificial

<220>
< 223> Cadena B

40 <220>
< 221> MISC_FEATURE

ES 2 613 152 T3

< 222> (1)..(1)
 < 223> Xaa es Asp, Glu o un grupo amino

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 5 < 222> (2)..(2)
 < 223> Xaa es Asp, Glu o un enlace químico

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 10 < 222> (3)..(3)
 < 223> Xaa es Asp, Glu o Phe

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (4)..(4)
 < 223> Xaa es Asp, Glu o Val

15 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (5)..(5)
 < 223> Xaa es Asp, Glu o Asn

20 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (6)..(6)
 < 223> Xaa es Asp, Glu o Gln

25 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (31)..(31)
 < 223> Xaa es Lys o un enlace químico

30 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (32)..(32)
 < 223> Xaa es Thr o un enlace químico

35 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (33)..(33)
 < 223> Xaa es Arg, Lys o un enlace químico

35 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (34)..(34)
 < 223> Xaa es Arg-Amid, Lys-Amid o un grupo amino

<400> 2
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala
 1 5 10 15

Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Xaa Xaa
 20 25 30

40 Xaa Xaa

<210> 3
 < 211> 38
 < 212> ADN

< 213> Artificial

<220>
< 223> pint3580_glya21rev

<400> 3
5 caaaggtcga ctattagccg cagtagttct ccagctgg 38

<210> 4
< 211> 31
< 212> ADN
< 213> Artificial

10 <220>
< 223> arg_cjuncf

<400> 4
gtccctgcag cgtcgcgca tcgtggagca g 31

15 <210> 5
< 211> 36
< 212> ADN
< 213> Artificial

<220>
< 223> arg_cjunc_rev

20 <400> 5
ccacgatgcc gcgacgctgc agggaccct ccagcg 36

<210> 6
< 211> 32
< 212> ADN
25 < 213> Artificial

<220>
< 223> pint3580_Ha8f

<400> 6
agcagtgctg ccacagcatc tgctccctct ac 32

30 <210> 7
< 211> 33
< 212> ADN
< 213> Artificial

<220>
35 < 223> pint3580_Ha8rev

<400> 7
gagcagatgc tgtgcagca ctgctccacg atg 33

<210> 8
< 211> 31
40 < 212> ADN
< 213> Artificial

<220>
< 223> pint3581_Ea5f

ES 2 613 152 T3

<400> 8
gcatcgtgga ggagtgctgc cacagcatct g 31

<210> 9
< 211> 32
5 < 212> ADN
< 213> Artificial

<220>
< 223> pint3581_Ea5rev

<400> 9
10 ctgtggcagc actcctccac gatgccgca cg

<210> 10
< 211> 47
< 212> ADN
< 213> Artificial

<220>
15 < 223> pint3580_Da18rev

<400> 10
caaaggtcga ctattagccg cagtagtct ccagctgga gaggag 47

<210> 11
20 < 211> 56
< 212> ADN
< 213> Artificial

<220>
< 223> pint3580_Ea15rev

<400> 11
25 caaaggtcga ctattagccg cagtagtct ccagctgta gaggagcag atgctg 56

<210> 12
< 211> 56
< 212> ADN
30 < 213> Artificial

<220>
< 223> pint3585_Ea15_Da18rev

<400> 12
caaaggtcga ctattagccg cagtagtct ccagctgta gaggagcag atgctg 56

<210> 13
< 211> 30
< 212> ADN
35 < 213> Artificial

<220>
40 < 223> pint3581_Db3f

<400> 13
gcacgatttg tggaccagca cctgtcggc 30

<210> 14
< 211> 34

ES 2 613 152 T3

< 212> ADN
 < 213> Artificial

 <220>
 < 223> pint3581_Db3rev

 5 <400> 14
 cacaggtgct ggtccacaaa tcgtgccgaa tttc 34

 <210> 15
 < 211> 32
 < 212> ADN
 10 < 213> Artificial

 <220>
 < 223> pint3581_Db3_Eb4f

 <400> 15
 gcacgatttg tggacgagca cctgtgcggc tc 32

 15 <210> 16
 < 211> 36
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

 <220>
 20 < 223> pint3581_Db3_Eb4rev

 <400> 16
 cgcacaggtg ctcgtccaca aatcgtgccg aatttc 36

 <210> 17
 < 211> 30
 25 < 212> ADN
 < 213> Artificial

 <220>
 < 223> pint3581_Eb4f

 <400> 17
 30 acgatttgatg aacgagcacc tgtcggctc 30

 <210> 18
 < 211> 36
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

 35 <220>
 < 223> pint3581_Eb4rev

 <400> 18
 cgcacaggtg ctcgtccaca aatcgtgccg aatttc 36

 <210> 19
 < 211> 43
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

 <220>
 < 223> pint3581_Eb0f1

ES 2 613 152 T3

<400> 19
 caacaggaaa ttcggcacga gagttgtga accagcacct gtg 43

5 <210> 20
 < 211> 44
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> pint3581_Eb01f2

10 <400> 20
 tatcgacat ggcaacaaca tcaacaggaa attcggcacg agag 44

<210> 21
 < 211> 42
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

15 <220>
 < 223> pint3581_Db1f1

<400> 21
 caacaggaaa ttcggcacga gacgtgaacc agcacctgtg cg 42

20 <210> 22
 < 211> 44
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> pint3581_Db1f2

25 <400> 22
 tatcgacat ggcaacaaca tcaacaggaa attcggcacg agac 44

30 <210> 23
 < 211> 44
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> pint3597_Db1f

<400> 23
 caacaggaaa ttcggcacga gaggacgtga accagcacct gtgc 44

35 <210> 24
 < 211> 34
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

40 <220>
 < 223> desB30f

<400> 24
 ttctacacac ccaagcgga tggtcctcag gtgg

<210> 25
 < 211> 32

ES 2 613 152 T3

< 212> ADN
< 213> Artificial

<220>
< 223> desB30rev

5 <400> 25
aggaacatcg cgctgggtg tgtagaagaa gc 32

amino.

6.- Análogo de insulina según una o varias de las reivindicaciones precedentes, correspondiendo B0 a Glu.

7.- Análogo de insulina según una o varias de las reivindicaciones precedentes, correspondiendo B1 a Asp.

8.- Análogo de insulina según una o varias de las reivindicaciones precedentes, correspondiendo B2 a Val.

5 9.- Análogo de insulina según una o varias de las reivindicaciones precedentes, correspondiendo B3 a Asp.

10.- Análogo de insulina según una o varias de las reivindicaciones precedentes, correspondiendo B4 a Glu.

11.- Análogo de insulina según una o varias de las reivindicaciones precedentes, seleccionado a partir de un grupo que contiene:

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ insulina humana,

10 Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Glu(A5), Glu (A15), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Glu (A15), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,

15 Arg (A0), His(A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His(A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ insulina humana,

20 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His(A8), Gly (A21), Asp (B3), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,

25 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ insulina humana,

- Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ insulina humana,
- 5 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg(B32) - NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,
- 10 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) - NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B30), Arg (B31) - NH₂ insulina humana,
- 15 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B30), Lys (B31) - NH₂ insulina humana.

12.- Procedimiento para la obtención de un análogo de insulina según una de las reivindicaciones 1 a 11, obteniéndose un precursor del análogo de insulina, obteniéndose un precursor del análogo de insulina de modo recombinante, procesándose el precursor por vía enzimática para dar insulina de dos cadenas, y llevándose a cabo un acoplamiento con argininamida en presencia de un enzima con actividad de tripsina, y aislándose el análogo de insulina.

20

13.- Empleo de un análogo de insulina según una de las reivindicaciones 1 a 11 para la obtención de un medicamento para el tratamiento de Diabetes Mellitus.

14.- Empleo de un análogo de insulina según una de las reivindicaciones 1 a 11 en un procedimiento para la obtención de un medicamento para el tratamiento de Diabetes Mellitus tipo I o tipo II, o para el apoyo terapéutico de la regeneración de células beta.

25

15.- Medicamento que contiene un análogo de insulina según una de las reivindicaciones 1 a 11 y/o sales del mismo compatibles desde el punto de vista fisiológico.

16.- Formulación del análogo de insulina según una de las reivindicaciones 1 a 11, presentándose la formulación en forma acuosa que contiene el análogo de insulina disuelto.

17.- Formulación del análogo de insulina según una de las reivindicaciones 1 a 11, presentándose la formulación en forma de polvo.

30

18.- Formulación según la reivindicación 17, estando presente el análogo de insulina según una de las reivindicaciones 1 a 11 en forma cristalina y/o amorfa.

19.- Formulación del análogo de insulina según una de las reivindicaciones 1 a 11, presentándose la formulación en forma de una suspensión.

35

20.- Formulación del análogo de insulina según una de las reivindicaciones 1 a 11, conteniendo la formulación

adicionalmente una chaperona química.

21.- ADN codificante para una preproinsulina de un análogo de insulina según una de las reivindicaciones 1 a 11.

22.- Vector que contiene un ADN según la reivindicación 21.

5 23.- Organismo huésped no humano que contiene un ADN según la reivindicación 21 o un vector según la reivindicación 22.

24.- Formulación según una o varias de las reivindicaciones 16 a 20, en el que aún está contenido adicionalmente un péptido 1 de tipo glucagon (GLP1), o un análogo o derivado del mismo, o exendina-3, o bien -4, o un análogo o derivado del mismo.

25.- Formulación según la reivindicación 24, en la que está contenida adicionalmente exendina-4.

10 26.- Formulación según la reivindicación 24, en la que se selecciona un análogo de exendina-4 a partir de un grupo que contiene

H-desPro³⁶-exendina-4-Lys₆-NH₂,
H-des(Pro^{36,37})-exendina-4-Lys₄-NH₂ y

15 H-des(Pro^{36,37})-exendina-4-Lys₅-NH₂,
o una sal de la misma tolerable desde el punto de vista farmacológico.

27.- Formulación según la reivindicación 24, en el que se selecciona un análogo de exendina-4 a partir de un grupo que contiene

20 desPro³⁶ [Asp²⁸]exendina-4 (1-39),
desPro³⁶ [IsoAsp²⁸]exendina-4 (1-39),
desPro³⁶ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]exendina-4 (1-39),
desPro³⁶ [Met(O)¹⁴, IsoAsp²⁸]exendina-4 (1-39),
desPro³⁶ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-2 (1-39),
desPro³⁶ [Trp(O₂)²⁵, IsoAsp²⁸]exendina-2 (1-39),
desPro³⁶ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4 (1-39) y
25 desPro³⁶ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, IsoAsp²⁸]exendina-4 (1-39),
o una sal de la misma tolerable desde el punto de vista farmacológico.

28.- Formulación según la reivindicación 27, en la que se ha añadido el péptido -Lys₆-NH₂ en los extremos de C de los análogos de exendina-4.

30 29.- Formulación según la reivindicación 24, en la que se selecciona un análogo de exendina-4 a partir de un grupo que contiene

H-(Lys)₆- des Pro³⁶ [Asp²⁸]exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂
des Asp²⁸Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ exendina-4(1-39) -NH₂,
H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]exendina-4(1-39) -NH₂,
35 H-Asn-(Glu)₅ des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]exendina-4(1-39) -NH₂,
des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
H-(Lys)₆- des Pro³⁶ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂,
H- des Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵]exendina-4(1-39) -NH₂,
40 H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39) -NH₂,
H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39) -NH₂,
des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
H-(Lys)₆-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
45 H-(Lys)₆- des Pro³⁶ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂,
des Met(O)¹⁴ Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ exendina-4(1-39) -NH₂,
H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]exendina-4(1-39) -NH₂,
H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] exendina-4(1-39) -NH₂,
des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
50 H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂,

- H-Asn-(Glu)₅ des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
 H-(Lys)₆- des Pro³⁶ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂,
 des Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵]exendina-4(1-39) -NH₂,
 H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39) -NH₂,
 5 H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] exendina-4(1-39) -NH₂,
 des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
 H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
 H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂.

o una sal de la misma tolerable desde el punto de vista farmacológico.

- 10 30.- Formulación según la reivindicación 24, en la que está contenida adicionalmente Arg³⁴, Lys²⁶ (N^ε(γ-glutamil(N^α-hexadecanoil))) GLP-1 (7-37) [liraglutida], o una sal de la misma tolerable desde el punto de vista farmacológico.
- 31.- Formulación acuosa del análogo de insulina según una de las reivindicaciones 1 a 11, que no contiene, o contiene menos de 15 µg/ml de cinc.
- 15 32.- Formulación acuosa del análogo de insulina según una de las reivindicaciones 1 a 11, que no contiene, o contiene menos de 15 µg/ml a 2 mg/ml de cinc.
- 33.- Formulación según la reivindicación 32, estando contenidos 200 µg/ml de cinc.

Fig. 1

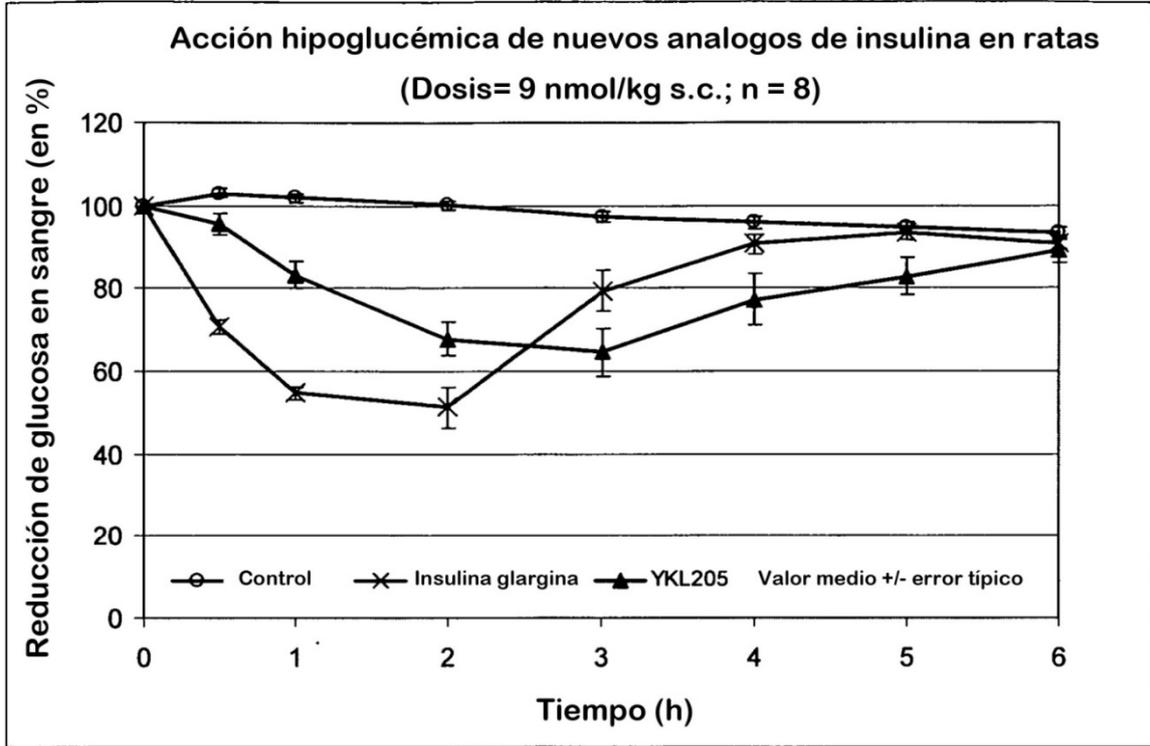


Fig. 2

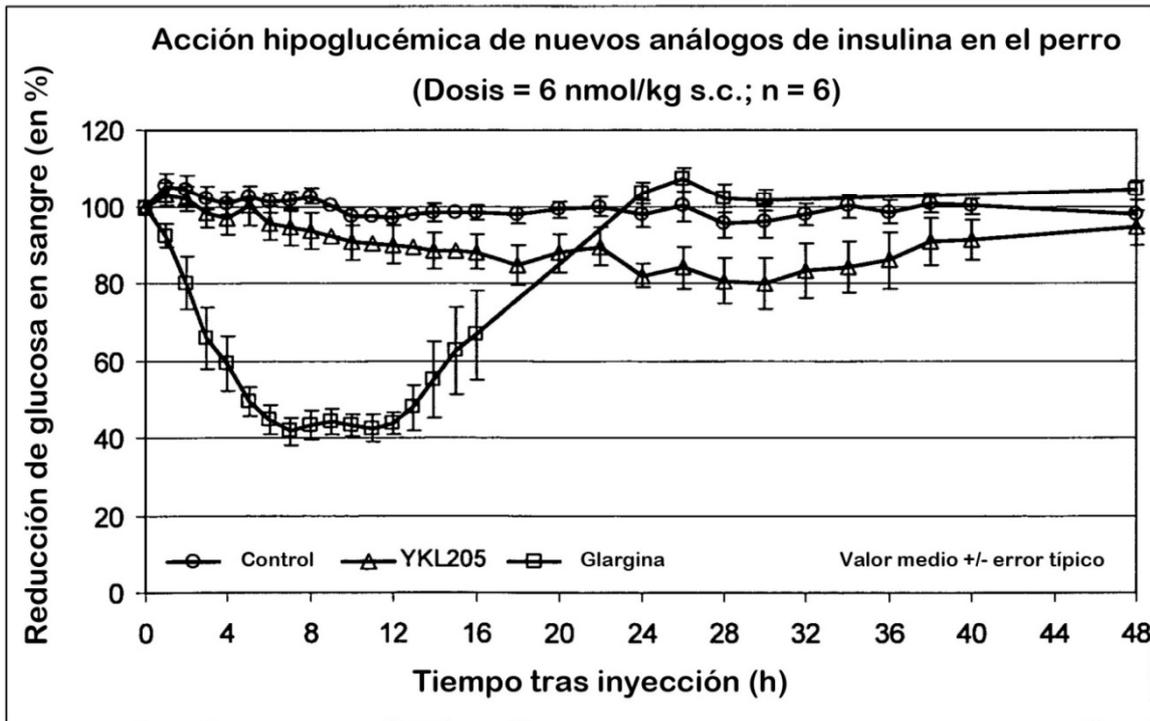


Fig. 3

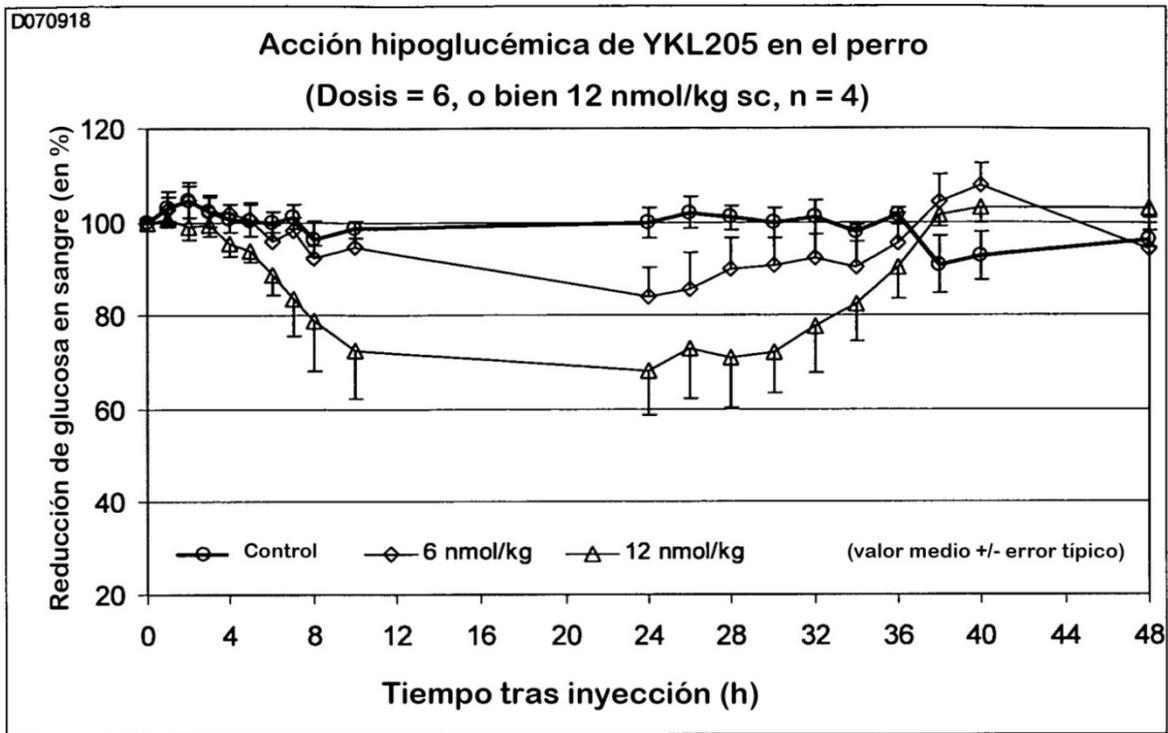


Fig. 4

