

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 073**

51 Int. Cl.:

C07K 14/62 (2006.01)

A61K 38/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2009 PCT/EP2009/053019**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2009 WO2009112583**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2009 E 09721144 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2254905**

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

30 Prioridad:

14.03.2008 EP 08102598

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**NIELSEN, PETER KRESTEN;
HUBALEK, FRANTISEK;
LAUTRUP-LARSEN, INGER;
BALSCHMIDT, PER;
LUDVIGSEN, SVEND y
KJELDSEN, THOMAS BØRGLUM**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 618 073 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 estabilizados frente a proteasas

Campo de la invención

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

Antecedentes de la invención

10 La diabetes mellitus es un trastorno metabólico en el que la capacidad para utilizar glucosa se pierde parcial o completamente. Aproximadamente un 5% de todas las personas padecen diabetes y el trastorno se acerca a proporciones epidémicas.

15 La insulina humana está constituida por dos cadenas polipeptídicas, las cadenas A y B, que contienen 21 y 30 residuos aminoacídicos, respectivamente. Las cadenas A y B están interconectadas mediante dos puentes de disulfuro. La insulina de la mayoría de las demás especies es similar, pero puede contener sustituciones de aminoácidos en algunas posiciones. En el tratamiento de la diabetes mellitus, se han sugerido y utilizado muchas variedades de formulaciones de insulina, tales como insulina normal, insulina isofánica (denominada NPH), suspensiones de insulina y zinc (tales como Semilente®, Lente® y Ultralente®) e insulina isofánica bifásica. También se han desarrollado análogos de insulina humana. Están diseñados para unos perfiles de acción particulares, es decir, acción rápida o acción prolongada. Los productos comercializados que comprenden tales análogos de insulina incluyen Levemir®, NovoRapid®, Humalog®, Apidra® y Lantus®.

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

Sin embargo, la administración mediante la vía oral sería beneficiosa debido a su seguridad, conveniencia y adhesión al tratamiento por parte del paciente.

25 La administración oral de fármacos proteicos tales como la insulina a menudo conlleva una biodisponibilidad muy baja debido a varias barreras tales como la degradación enzimática en el tubo gastrointestinal (GI), bombas de evacuación de fármacos, una absorción variable e insuficiente desde la mucosa intestinal, así como también el metabolismo de primer paso en el hígado. La insulina humana es degradada por varias enzimas digestivas que se encuentran en el estómago (pepsina y gastricina), en el lumen intestinal (quimotripsina, tripsina, elastasa, carboxipeptidasas, etc.) y en superficies mucosas del tubo GI (aminopeptidasas, carboxipeptidasas, enteropeptidasas, dipeptidilpeptidasas, endopeptidasas, etc.). Los diseños de formulación recientes para el suministro oral de proteínas/péptidos incluyen

30 coformulaciones con inhibidores de proteasas, potenciadores de la permeación, sistemas de suministro basados en polímeros y conjugados de insulina. Estos últimos incluyen el monoconjugado de hexilo-insulina 2 (HIM2) (Nobex Cooperation y GSK), un análogo de insulina humana con un grupo PEG 7-hexilo unido a B29. En, por ejemplo, los documentos US 7 030 082, US 6 867 183 y US 6 770 625, se ha descrito que el HIM2 oral presenta una estabilidad proteolítica y una biodisponibilidad mayores en comparación con la insulina.

35 La combinación de un análogo de insulina resistente a proteasas con un sistema de suministro oral de proteínas representa una estrategia prometedora para la administración oral de insulina. Además, no es necesario incorporar inhibidores enzimáticos en el sistema de suministro.

Compendio de la invención

40 La presente invención divulga análogos de insulina con una estabilidad proteolítica mejorada y que conservan la actividad biológica de la insulina.

En una realización, se proporciona un análogo de la insulina donde

- la cadena A del análogo de insulina comprende al menos una mutación respecto a la insulina original, donde una mutación se encuentra en la posición A14 que es sustituida por un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por Lys, Glu, Arg, Asp, Pro, Gln e His; y
- 45 • la cadena B del análogo de insulina comprende al menos dos mutaciones respecto a la insulina original, donde dos o más mutaciones se presentan en forma de deleciones de los aminoácidos en las posiciones B27, B28, B29 y B30, o una combinación de una deleción del aminoácido en la posición B30 y una sustitución de un aminoácido seleccionada a partir de las sustituciones de un aminoácido en la posición: B24 por Gly o His, B25 por His, B26 por Gly, Glu o Lys, B27 por Gly, Glu o Lys y B28 por Asp, His, Gly, Lys o Glu;

50 que se selecciona a partir del grupo constituido por:

insulina humana A8H, A14E, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30

insulina humana A8H, A14E, A22K, B25H, B29R, desB30

ES 2 618 073 T3

- insulina humana A8H, A14E, B10E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
- insulina humana A8H, A14E, B16H, B25H, desB30
- insulina humana A8H, A14E, B22K, B25H, B29R, desB30
- insulina humana A8H, A14H, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30
- 5 insulina humana A8H, A14H, B16H, B25H, desB30
- insulina humana A14E, B16H, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14E, B16E, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14E, B16D, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14E, B24G, desB30
- 10 insulina humana A14E, B28E, desB29, desB30
- insulina humana A14E, B28E, desB30
- insulina humana A14E, B28H, desB30
- insulina humana A14E, desB1, desB2, desB3, B25H, B27K, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14E, desB27, desB28, desB29, desB30
- 15 insulina humana A14P, B25H, desB30
- insulina humana A21G, desB27, desB30
- insulina humana B27K, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14D, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14E, A15E, B25H, desB30
- 20 insulina humana A14E, A18Q, A21G, B3Q, B25H, B27E, desB30
- insulina humana A14E, A21G, B25H, desB27, desB30
- insulina humana A14E, A21G, B25H, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16E, B25H, B29R, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30
- 25 insulina humana A14E, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30
- insulina humana A14E, B10E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
- insulina humana A14E, B16D, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14E, B16E, B22K, B25H, B29R, desB30
- 30 insulina humana A14E, B16E, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14E, B16H, B22K, B25H, B29R, desB30
- insulina humana A14E, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14E, B22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30
- insulina humana A14E, B24G, B25H, desB30
- 35 insulina humana A14E, B25H, B26E, B27E, desB30
- insulina humana A14E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30
- insulina humana A14E, B25H, B26G, B27G B28K, desB29, desB30

ES 2 618 073 T3

- insulina humana A14E, B25H, B26G, B27G, desB30
- insulina humana A14E, B25H, B26G, B27K, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14E, B25H, B26G, B27T, B28G, desB30
- insulina humana A14E, B25H, B26G, desB30
- 5 insulina humana A14E, B25H, B27G, B28G, desB30
- insulina humana A14E, B25H, B27G, desB30
- insulina humana A14E, B25H, B28G, desB30
- insulina humana A14E, B25H, B29R, desB30
- insulina humana A14H, B16H, B24H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
- 10 insulina humana A14H, B16H, B24H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14H, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14H, B24H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16E, B25H, B29R, desB30
- 15 insulina humana A14E, A22K, B16H, B25H, desB27, B29R, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16E, B25H, desB27, B29R, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16H, B25H, B27E, B29R, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16E, B25H, B27E, B29R, desB30
- 20 insulina humana A14E, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16H, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30
- 25 insulina humana A14E, A22K, B16H, B25H, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16E, B25H, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B25H, B27E, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16H, B25H, B27E, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16E, B25H, B27E, desB30
- 30 insulina humana A14E, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30
- 35 insulina humana A14E, A22K, B16H, B25H, desB27, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16E, B25H, desB27, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30

ES 2 618 073 T3

- insulina humana A14Q, A22K, B16E, B25H, B29R, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B16H, B25H, desB27, B29R, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B16E, B25H, desB27, B29R, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30
- 5 insulina humana A14Q, A22K, B16H, B25H, B27E, B29R, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B16E, B25H, B27E, B29R, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B16H, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B16E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30
- 10 insulina humana A14Q, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B16H, B25H, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B16E, B25H, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B25H, B27E, desB30
- 15 insulina humana A14Q, A22K, B16H, B25H, B27E, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B16E, B25H, B27E, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B16H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B16E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
- 20 insulina humana A14Q, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B16H, B25H, desB27, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B16E, B25H, desB27, desB30
- insulina humana A14P, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30
- 25 insulina humana A14P, A22K, B16E, B25H, B29R, desB30
- insulina humana A14P, A22K, B16H, B25H, desB27, B29R, desB30
- insulina humana A14P, A22K, B16E, B25H, desB27, B29R, desB30
- insulina humana A14P, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30
- insulina humana A14P, A22K, B16H, B25H, B27E, B29R, desB30
- 30 insulina humana A14P, A22K, B16E, B25H, B27E, B29R, desB30
- insulina humana A14P, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30
- insulina humana A14P, A22K, B16H, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30
- insulina humana A14P, A22K, B16E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30
- insulina humana A14P, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30
- 35 insulina humana A14P, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30
- insulina humana A14P, A22K, B16H, B25H, desB30
- insulina humana A14P, A22K, B16E, B25H, desB30

ES 2 618 073 T3

- insulina humana A14P, A22K, B25H, B27E, desB30
- insulina humana A14P, A22K, B16H, B25H, B27E, desB30
- insulina humana A14P, A22K, B16E, B25H, B27E, desB30
- insulina humana A14P, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
- 5 insulina humana A14P, A22K, B16H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
- insulina humana A14P, A22K, B16E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
- insulina humana A14P, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30
- insulina humana A14P, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30
- insulina humana A14P, A22K, B16H, B25H, desB27, desB30
- 10 insulina humana A14P, A22K, B16E, B25H, desB27, desB30
- insulina humana A14D, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30
- insulina humana A14D, A22K, B16E, B25H, B29R, desB30
- insulina humana A14D, A22K, B16H, B25H, desB27, B29R, desB30
- insulina humana A14D, A22K, B16E, B25H, desB27, B29R, desB30
- 15 insulina humana A14D, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30
- insulina humana A14D, A22K, B16H, B25H, B27E, B29R, desB30
- insulina humana A14D, A22K, B16E, B25H, B27E, B29R, desB30
- insulina humana A14D, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30
- insulina humana A14D, A22K, B16H, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30
- 20 insulina humana A14D, A22K, B16E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30
- insulina humana A14D, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30
- insulina humana A14D, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30
- insulina humana A14D, A22K, B16H, B25H, desB30
- insulina humana A14D, A22K, B16E, B25H, desB30
- 25 insulina humana A14D, A22K, B25H, B27E, desB30
- insulina humana A14D, A22K, B16H, B25H, B27E, desB30
- insulina humana A14D, A22K, B16E, B25H, B27E, desB30
- insulina humana A14D, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
- insulina humana A14D, A22K, B16H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
- 30 insulina humana A14D, A22K, B16E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
- insulina humana A14D, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30
- insulina humana A14D, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30
- insulina humana A14D, A22K, B16H, B25H, desB27, desB30
- insulina humana A14D, A22K, B16E, B25H, desB27, desB30
- 35 insulina humana A14E, A22K, B16H, B25H, desB27, B29R, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16E, B25H, desB27, B29R, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16H, B25H, desB27, desB30

insulina humana A14E, A22K, B16E, B25H, desB27, desB30

insulina humana A14E, B16H, B25H, desB27, desB30

insulina humana A14E, B16E, B25H, desB27, desB30

insulina humana A14P, A22K, B16H, B25H, desB27, B29R, desB30

5 insulina humana A14P, A22K, B16E, B25H, desB27, B29R, desB30

insulina humana A14P, A22K, B16H, B25H, desB27, desB30

insulina humana A14P, A22K, B16E, B25H, desB27, desB30

insulina humana A14P, B16H, B25H, desB27, desB30

insulina humana A14P, B16E, B25H, desB27, desB30

10 insulina humana A14D, A22K, B16H, B25H, desB27, B29R, desB30

insulina humana A14D, A22K, B16E, B25H, desB27, B29R, desB30

insulina humana A14D, A22K, B16H, B25H, desB27, desB30

insulina humana A14D, A22K, B16E, B25H, desB27, desB30

insulina humana A14D, B16H, B25H, desB27, desB30

15 insulina humana A14D, B16E, B25H, desB27, desB30

insulina humana A14Q, A22K, B16H, B25H, desB27, B29R, desB30

insulina humana A14Q, A22K, B16E, B25H, desB27, B29R, desB30

insulina humana A14Q, A22K, B16H, B25H, desB27, desB30

insulina humana A14Q, A22K, B16E, B25H, desB27, desB30

20 insulina humana A14Q, B16H, B25H, desB27, desB30

insulina humana A14Q, B16E, B25H, desB27, desB30

En otra realización, la presente invención divulga una composición farmacéutica que comprende una cantidad biológicamente activa del análogo de insulina y un portador farmacéuticamente aceptable.

25 En otra realización, la presente invención divulga un análogo de insulina para su uso como un medicamento para el tratamiento o la prevención de la hiperglucemia que incluye la hiperglucemia inducida por estrés, diabetes de tipo 2, tolerancia alterada a la glucosa, diabetes de tipo 1 y quemaduras, heridas quirúrgicas y otras enfermedades o lesiones en las que se necesite un efecto anabólico en el tratamiento, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, cardiopatía coronaria y otros trastornos cardiovasculares y el tratamiento de pacientes diabéticos y no diabéticos en estado crítico.

30 En otra realización, se proporciona un análogo de insulina que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena A de fórmula 9:

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Xaa_{A14}-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-
Asn

Fórmula (9) (SEQ ID No:9)

y una secuencia de aminoácidos de la cadena B de fórmula 10:

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-
Glu-Arg-Gly-Xaa_{B24}-Xaa_{B25}-Xaa_{B26}-Xaa_{B27}-Xaa_{B28}-Xaa_{B29}

Fórmula (10) (SEQ ID No:10)

35

donde

Xaa_{A14} se selecciona independientemente entre Asp, His, Lys, Arg, Pro, Glu y Gln;

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

Xaa_{B25} se selecciona independientemente entre Phe e His;

Xaa_{B26} se selecciona independientemente entre Tyr, Gly, Glu y Lys;

Xaa_{B27} está ausente o se selecciona independientemente entre Gly, Lys o Thr;

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

Xaa_{B29} está ausente o es Lys;

el extremo C se puede derivatizar opcionalmente como una amida;

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

donde la cadena A del análogo de insulina comprende al menos una mutación respecto a la insulina original y la cadena B del análogo de insulina comprende al menos dos mutaciones respecto a la insulina original; y

15 donde, si las mutaciones de la cadena B del análogo de insulina están constituidas por la combinación de una delección del aminoácido en la posición B30 y una sustitución del aminoácido en la posición B25 por His, entonces la mutación o mutaciones en la posición A14 en la cadena A del análogo de insulina se seleccionan a partir del grupo constituido por Lys, Arg y Pro.

En otra realización más, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad biológicamente activa del análogo de insulina de acuerdo con la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

20 También se proporciona un método para el tratamiento de la diabetes mellitus en un sujeto y/o para reducir el nivel de glucosa en sangre en mamíferos que comprende administrar a un sujeto o mamífero un análogo de insulina o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención.

Descripción de la invención

25 En una realización de la invención, se proporcionan análogos de insulina con una estabilidad proteolítica mejorada y que conservan la actividad biológica de la insulina.

Los inventores han identificado varios análogos de insulina con una estabilidad mejorada respecto a las proteasas digestivas. Estos análogos de insulina se pueden utilizar en el tratamiento oral de la diabetes debido a una mayor biodisponibilidad en el estómago o tubo GI como resultado de la resistencia mejorada a la degradación proteolítica cuando se compara con la insulina humana no modificada.

30 La estabilidad proteolítica de los análogos de insulina se puede caracterizar mediante un análisis de HPLC de fracciones digeridas utilizando insulina humana, diversos análogos de insulina, enzimas digestivas y extractos (del estómago, intestino y páncreas). Los análogos de insulina se pueden generar mediante expresión recombinante y mutación o mediante síntesis química.

35 En una realización, los análogos de insulina de acuerdo con la invención muestran un aumento de la semivida en presencia de pepsina en comparación con la insulina humana.

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

insulina humana A8H, A14E, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30

insulina humana A8H, A14E, A22K, B25H, B29R, desB30

40 insulina humana A8H, A14E, B10E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30

insulina humana A8H, A14E, B16H, B25H, desB30

insulina humana A8H, A14E, B22K, B25H, B29R, desB30

insulina humana A8H, A14H, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30

insulina humana A8H, A14H, B16H, B25H, desB30

45 insulina humana A14D, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30

ES 2 618 073 T3

- insulina humana A14E, A15E, B25H, desB30
- insulina humana A14E, A18Q, A21G, B3Q, B25H, B27E, desB30
- insulina humana A14E, A21G, B25H, desB27, desB30
- insulina humana A14E, A21G, B25H, desB30
- 5 insulina humana A14E, A22K, B16E, B25H, B29R, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30
- insulina humana A14E, B10E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
- 10 insulina humana A14E, B16D, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14E, B16D, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14E, B16E, B22K, B25H, B29R, desB30
- insulina humana A14E, B16E, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14E, B16E, desB27, desB28, desB29, desB30
- 15 insulina humana A14E, B16H, B22K, B25H, B29R, desB30
- insulina humana A14E, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14E, B16H, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14E, B22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30
- insulina humana A14E, B24G, B25H, desB30
- 20 insulina humana A14E, B24G, B25H, desB30
- insulina humana A14E, B24G, desB30
- insulina humana A14E, B25H, B26E, B27E, desB30
- insulina humana A14E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30
- insulina humana A14E, B25H, B26G, B27G B28K, desB29, desB30
- 25 insulina humana A14E, B25H, B26G, B27G, desB30
- insulina humana A14E, B25H, B26G, B27K, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14E, B25H, B26G, B27T, B28G, desB30
- insulina humana A14E, B25H, B26G, desB30
- insulina humana A14E, B25H, B27G, B28G, desB30
- 30 insulina humana A14E, B25H, B27G, desB30
- insulina humana A14E, B25H, B28G, desB30
- insulina humana A14E, B25H, B29R, desB30
- insulina humana A14E, B28E, desB29, desB30
- insulina humana A14E, B28E, desB30
- 35 insulina humana A14E, B28H, desB30
- insulina humana A14E, desB1, desB2, desB3, B25H, B27K, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14E, desB27, desB28, desB29, desB30

ES 2 618 073 T3

insulina humana A14H, B16H, B24H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
insulina humana A14H, B16H, B24H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30
insulina humana A14H, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30
insulina humana A14H, B24H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
5 insulina humana A14P, B25H, desB30
insulina humana A21G, desB27, desB30
insulina humana B27K, desB28, desB29, desB30

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

10 insulina humana desB27, desB28, desB29, desB30
insulina humana desB27, desB30
insulina humana desB28, desB29, desB30
insulina humana B24H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30
insulina humana B24H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
15 insulina humana B24G, B25H, desB30
insulina humana B24G, desB30
insulina humana B25H, desB26, desB27, desB28, desB29, desB30
insulina humana B25H, desB27, desB28, desB29, desB30
insulina humana B25H, desB27, desB30
20 insulina humana B25H, B27K, desB28, desB29, desB30
insulina humana B25H, B26E, B27E, desB30
insulina humana B25H, B26G, desB27, desB28, desB29, desB30
insulina humana B25H, B26G, B27K, desB28, desB29, desB30
insulina humana B25H, B26G, B27G, desB28, desB29, desB30
25 insulina humana B25H, B26G, B27G, B28K, desB29, desB30
insulina humana B25H, B26G, B27G, B28G, desB29, desB30
insulina humana B25H, B26G, B27G, B28G, B29K, desB30
insulina humana B25H, B26G, B27E, B28G, desB30
insulina humana B25H, B26G, B27T, B28G, desB30
30 insulina humana B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30
insulina humana B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
insulina humana B25H, B26G, B27G, desB30
insulina humana B25H, B26G, desB30
insulina humana B25H, B27E, B29R, desB30
35 insulina humana B25H, B27E, B29R, desB30
insulina humana B25H, B27E, desB30
insulina humana B25H, B27G, desB28, desB29, desB30

- insulina humana B25H, B27K, desB28, desB29, desB30
- insulina humana B25H, B27G, B28K, desB29, desB30
- insulina humana B25H, B27G, B28G, desB29, desB30
- insulina humana B25H, B29R, desB27, desB30
- 5 insulina humana B25H, B27G, B28G, B29K, desB30
- insulina humana B25H, B27G, B28G, desB30
- insulina humana B25H, B27G, desB30
- insulina humana B25H, B28G, desB30
- insulina humana B25H, B29R, desB30
- 10 insulina humana B25H, desB30
- insulina humana B27K, desB28, desB29, desB30
- insulina humana B26G, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana B26G, B27K, desB28, desB29, desB30
- insulina humana B27G, desB28, desB29, desB30
- 15 insulina humana B27G, B28K, desB29, desB30
- insulina humana B27G, B28G, desB29, desB30
- insulina humana B27G, B28G, B29K, desB30
- insulina humana B28E, desB29, desB30
- insulina humana B28E, desB30
- 20 insulina humana B28H, desB30

donde el análogo de insulina comprende además sustituciones seleccionadas a partir del grupo constituido por:

- A14D
- A14E
- A14H
- 25 A14P
- A14Q
- A21G
- A14D, A22K
- A14D, B16E
- 30 A14D, B16H
- A14E, A15E
- A14E, A21G
- A14E, A22K
- A14E, B10E
- 35 A14E, B16D
- A14E, B16E
- A14E, B16H

- A14E, B22K
 A14H, A22K
 A14H, B16E
 A14H, B16H
 5 A14P, A22K
 A14P, B16E
 A14P, B16H
 A14Q, A22K
 A14Q, B16E
 10 A14Q, B16H
 A8H, A14E, A22K
 A8H, A14E, B10E
 A8H, A14E, B10E
 A8H, A14E, B10H
 15 A8H, A14E, B22K
 A8H, A14H, A22K
 A8H, A14H, B16H
 A14D, A22K, B16E
 A14D, A22K, B16H
 20 A14E, A22K, B16E
 A14E, A22K, B16H
 A14P, A22K, B16E
 A14P, A22K, B16H
 A14Q, A22K, B16E
 25 A14Q, A22K, B16H
 A14E, B16E, B22K
 A14E, B16H, B22K
 A14E, B16H, B24H
 A14E, A18Q, A21G, B3Q
 30 A14E, desB1, desB2, des3

A continuación, se presenta una lista no limitante de realizaciones, las cuales se describen adicionalmente en otras partes de la presente:

Realización 1. Un análogo de insulina, donde

- 35
- la cadena A del análogo de insulina comprende al menos una mutación respecto a la insulina original, donde una mutación se encuentra en la posición A14 que es sustituida por un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por Lys, Glu, Arg, Asp, Pro e His; y
 - la cadena B del análogo de insulina comprende al menos dos mutaciones respecto a la insulina original, donde dos o más mutaciones se presentan en forma de deleciones de los aminoácidos en las posiciones B27, B28, B29 y B30, o una combinación de una deleción del aminoácido en la posición B30 y una sustitución

de un aminoácido seleccionada a partir de las sustituciones de un aminoácido en la posición: B25 por His, B26 por Gly o Glu, B27 por Gly o Lys y B28 por Asp, His, Gly, Lys o Glu;

5 donde, si las mutaciones de la cadena B del análogo de insulina están constituidas por la combinación de una deleción del aminoácido la posición B30 y una sustitución del aminoácido en la posición B25 por His, entonces la mutación o mutaciones en la posición A14 en la cadena A del análogo de insulina se seleccionan partir del grupo constituido por Lys, Arg y Pro.

Realización 2. Un análogo de insulina de acuerdo con la realización 1, que comprende además una o más mutaciones seleccionadas a partir del grupo constituido por: A22K, B16D, B16E, B16H, B24H, B25H, B26E, B26G, B27G, B27K, B28D, B28G, B28E, B28H, B28K, B29K, desB26, desB27, desB28 y desB29.

10 Realización 3. Un análogo de insulina de acuerdo con la realización 1, donde dichas dos o más mutaciones en la cadena B se presentan en forma de deleciones de los aminoácidos en las posiciones B27, B28, B29 y B30.

Realización 4. Un análogo de insulina de acuerdo con la realización 3, que comprende además una o más mutaciones seleccionadas a partir del grupo constituido por: A22K, B16D, B16E, B16H, B24H, B25H, B26E, B26G, B27G, B27K, B28D, B28G, B28E, B28H, B28K, B29K y desB26.

15 Realización 5. Un análogo de insulina de acuerdo con la realización 1, donde dichas dos o más mutaciones en la cadena B se presentan en forma de una combinación de una deleción del aminoácido en la posición B30 y una sustitución de un aminoácido en la posición B25 por His.

20 Realización 6. Un análogo de insulina de acuerdo con la realización 5, que comprende además una o más mutaciones seleccionadas a partir del grupo constituido por: A22K, B16D, B16E, B16H, B24H, B26E, B26G, B27G, B27K, B28D, B28G, B28E, B28H, B28K, B29K, desB26, desB27, desB28 y desB29.

Realización 7. Un análogo de insulina de acuerdo con la realización 1, donde dichas dos o más mutaciones en la cadena B se presentan en forma de una combinación de una deleción del aminoácido en la posición B30 y una sustitución de un aminoácido en la posición B26 por Glu o Gly.

25 Realización 8. Un análogo de insulina de acuerdo con la realización 7, que comprende además una o más mutaciones seleccionadas a partir del grupo constituido por: A22K, B16D, B16E, B16H, B24H, B25H, B27G, B27K, B28D, B28G, B28E, B28H, B28K, B29K, desB26, desB27, desB28 y desB29.

Realización 9. Un análogo de insulina de acuerdo con la realización 1, donde dichas dos o más mutaciones en la cadena B se presentan en forma de una combinación de una deleción del aminoácido en la posición B30 y una sustitución de un aminoácido en la posición B27 por Gly o Lys.

30 Realización 10. Un análogo de insulina de acuerdo con la realización 9, que comprende además una o más mutaciones seleccionadas a partir del grupo constituido por: A22K, B16D, B16E, B16H, B24H, B25H, B26E, B26G, B28D, B28G, B28E, B28H, B28K, B29K, desB26, desB27, desB28 y desB29.

35 Realización 11. Un análogo de insulina de acuerdo con la realización 1, donde dichas dos o más mutaciones en la cadena B se presentan en forma de una combinación de una deleción del aminoácido en la posición B30 y una sustitución de un aminoácido en la posición B28 por Asp, His, Gly, Lys o Glu.

Realización 12. Un análogo de insulina de acuerdo con la realización 11, que comprende además una o más mutaciones seleccionadas a partir del grupo constituido por: A22K, B16D, B16E, B16H, B24H, B25H, B26E, B26G, B27G, B27K, B29K, desB26, desB27, desB28 y desB29.

Realización 13. Un análogo de insulina, donde

- 40
- la cadena A del análogo de insulina comprende al menos una mutación respecto a la insulina original, donde una mutación se encuentra en la posición A14 que es sustituida por un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por Lys, Glu, Arg, Asp, Pro, Gln e His; y
 - la cadena B del análogo de insulina comprende al menos dos mutaciones respecto a la insulina original, donde dos o más mutaciones se presentan en forma de deleciones de los aminoácidos en las posiciones

45 B27, B28, B29 y B30, o una combinación de una deleción del aminoácido en la posición B30 y una sustitución de un aminoácido seleccionada a partir de las sustituciones de un aminoácido en la posición: B24 por Gly o His, B25 por His, B26 por Gly, Glu o Lys, B27 por Gly, Glu o Lys y B28 por Asp, His, Gly, Lys o Glu;

que se selecciona a partir del grupo constituido por:

insulina humana A8H, A14E, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30

50 insulina humana A8H, A14E, A22K, B25H, B29R, desB30

insulina humana A8H, A14E, B10E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30

ES 2 618 073 T3

- insulina humana A8H, A14E, B16H, B25H, desB30
- insulina humana A8H, A14E, B22K, B25H, B29R, desB30
- insulina humana A8H, A14H, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30
- insulina humana A8H, A14H, B16H, B25H, desB30
- 5 insulina humana A14E, B16H, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14E, B16E, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14E, B16D, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14E, B24G, desB30
- insulina humana A14E, B28E, desB29, desB30
- 10 insulina humana A14E, B28E, desB30
- insulina humana A14E, B28H, desB30
- insulina humana A14E, desB1, desB2, desB3, B25H, B27K, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14E, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14P, B25H, desB30
- 15 insulina humana A21G, desB27, desB30
- insulina humana B27K, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14D, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14E, A15E, B25H, desB30
- insulina humana A14E, A18Q, A21G, B3Q, B25H, B27E, desB30
- 20 insulina humana A14E, A21G, B25H, desB27, desB30
- insulina humana A14E, A21G, B25H, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16E, B25H, B29R, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30
- 25 insulina humana A14E, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30
- insulina humana A14E, B10E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
- insulina humana A14E, B16D, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14E, B16E, B22K, B25H, B29R, desB30
- insulina humana A14E, B16E, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30
- 30 insulina humana A14E, B16H, B22K, B25H, B29R, desB30
- insulina humana A14E, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14E, B22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30
- insulina humana A14E, B24G, B25H, desB30
- insulina humana A14E, B24G, B25H, desB30
- 35 insulina humana A14E, B25H, B26E, B27E, desB30
- insulina humana A14E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30
- insulina humana A14E, B25H, B26G, B27G B28K, desB29, desB30

insulina humana A14E, B25H, B26G, B27G, desB30

insulina humana A14E, B25H, B26G, B27K, desB28, desB29, desB30; insulina humana A14E, B25H, B26G, B27T, B28G, desB30

insulina humana A14E, B25H, B26G, desB30

5 insulina humana A14E, B25H, B27G, B28G, desB30

insulina humana A14E, B25H, B27G, desB30

insulina humana A14E, B25H, B28G, desB30

insulina humana A14E, B25H, B29R, desB30

insulina humana A14H, B16H, B24H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30

10 insulina humana A14H, B16H, B24H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30

insulina humana A14H, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30

insulina humana A14H, B24H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30

15 Realización 14. Un análogo de insulina de acuerdo con la realización 13, que comprende además una o más mutaciones seleccionadas a partir del grupo constituido por: A8H, A18Q, A21A, A21G, A21Q, A22K, B3G, B3A, B3Q, B10E, B10D, B16H, B16E, B16D y B22K.

Realización 15. Un análogo de insulina de acuerdo con las realizaciones 13, que comprende además una o más mutaciones seleccionadas a partir del grupo constituido por: B16H, B16E y B16D.

Realización 16. Un análogo de insulina de acuerdo con las realizaciones 13, que además comprende A22K o B22K.

20 Realización 17. Un análogo de insulina de acuerdo con las realizaciones 13, que comprende además una o más mutaciones seleccionadas a partir del grupo constituido por: A21A, A21G y A21Q.

Realización 18. Un análogo de insulina de acuerdo con las realizaciones 13, que comprende además una o más mutaciones seleccionadas a partir del grupo constituido por: B3Q, B3G, B3A.

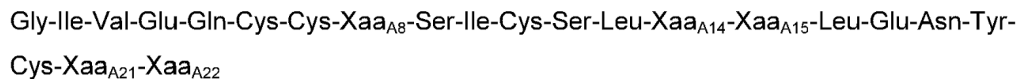
Realización 19. Un análogo de insulina de acuerdo con las realizaciones 13, que además comprende A18Q.

Realización 20. Un análogo de insulina de acuerdo con las realizaciones 13, que además comprende A8H.

25 Realización 21. Un análogo de insulina de acuerdo con las realizaciones 13, que comprende además una o más mutaciones seleccionadas a partir del grupo constituido por: B10E y B10D.

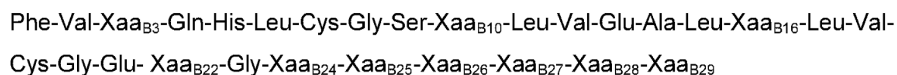
Realización 22. Un análogo de insulina de acuerdo con las realizaciones 13, donde la insulina original es insulina humana.

Realización 23. Un análogo de insulina que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena A de fórmula 1:



30 Fórmula (1) (SEQ ID No:1)

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



Fórmula (2) (SEQ ID No:2)

donde

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

35 Xaa_{A14} se selecciona independientemente entre Asp, His, Lys, Arg, Pro, Gln y Glu;

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

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

Xaa_{A22} está ausente o es Lys;

Xaa_{B3} se selecciona independientemente entre Asn, Gln, Gly y Ala;

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

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

Xaa_{B22} está ausente o se selecciona independientemente entre Arg y Lys;

Xaa_{B24} está ausente o se selecciona independientemente entre Phe, Gly e His;

Xaa_{B25} está ausente o se selecciona independientemente entre Phe, Asn, Ala e His;

Xaa_{B26} está ausente o se selecciona independientemente entre Tyr, Gly, Lys y Glu;

10 Xaa_{B27} está ausente o se selecciona independientemente entre Gly, Lys y Thr;

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

Xaa_{B29} está ausente o es Lys;

el extremo C se puede derivatizar opcionalmente como una amida;

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

donde la cadena A del análogo de insulina comprende al menos una mutación respecto a la insulina original y la cadena B del análogo de insulina comprende al menos dos mutaciones respecto a la insulina original; y

20 donde, si las mutaciones de la cadena B del análogo de insulina están constituidas por la combinación de una delección del aminoácido en la posición B30 y una sustitución del aminoácido en la posición B25 por His, entonces la mutación o mutaciones en la posición A14 en la cadena A del análogo de insulina se seleccionan a partir del grupo constituido por Lys, Arg y Pro.

Realización 24. Un análogo de insulina que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena A de fórmula 3:

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Xaa_{A14}-Xaa_{A15}-Leu-Glu-Asn-Tyr-
Cys-Xaa_{A21}-Xaa_{A22}

25 Fórmula (3) (SEQ ID No:3)

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

Phe-Val-Xaa_{B3}-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Xaa_{B16}-Leu-Val-Cys-
Gly-Glu- Xaa_{B22}-Gly-Xaa_{B24}-Xaa_{B25}-Xaa_{B26}-Xaa_{B27}-Xaa_{B28}-Xaa_{B29}

Fórmula (4) (SEQ ID No:4)

donde

Xaa_{A14} se selecciona independientemente entre Asp, His, Lys, Arg, Pro, Gln y Glu;

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

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

Xaa_{A22} está ausente o es Lys;

Xaa_{B3} se selecciona independientemente entre Asn, Gln, Gly y Ala;

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

35 Xaa_{B22} está ausente o se selecciona independientemente entre Arg y Lys;

Xaa_{B24} está ausente o se selecciona independientemente entre Phe, Gly e His;

Xaa_{B25} está ausente o se selecciona independientemente entre Phe, Asn, Ala e His;

Xaa_{B26} está ausente o se selecciona independientemente entre Tyr, Gly, Lys y Glu;

Xaa_{B27} está ausente o se selecciona independientemente entre Gly, Lys y Thr;

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

Xaa_{B29} está ausente o es Lys;

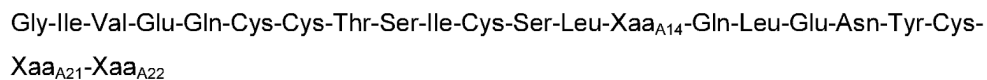
el extremo C se puede derivatizar opcionalmente como una amida;

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

donde la cadena A del análogo de insulina comprende al menos una mutación respecto a la insulina original y la cadena B del análogo de insulina comprende al menos dos mutaciones respecto a la insulina original; y

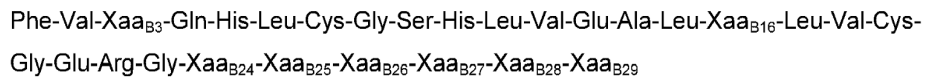
15 donde, si las mutaciones de la cadena B del análogo de insulina están constituidas por la combinación de una delección del aminoácido en la posición B30 y una sustitución del aminoácido en la posición B25 por His, entonces la mutación o mutaciones en la posición A14 en la cadena A del análogo de insulina se seleccionan a partir del grupo constituido por Lys, Arg y Pro.

Realización 25. Un análogo de insulina que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena A de fórmula 5:



Fórmula (5) (SEQ ID No:5)

20 y una secuencia de aminoácidos de la cadena B de fórmula 6:



Fórmula (2) (SEQ ID No:6)

donde

Xaa_{A14} se selecciona independientemente entre Asp, His, Lys, Arg, Pro, Gln y Glu;

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

25 Xaa_{A22} está ausente o es Lys;

Xaa_{B3} se selecciona independientemente entre Asn, Gln, Gly y Ala;

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

Xaa_{B24} está ausente o se selecciona independientemente entre Phe, Gly e His;

Xaa_{B25} está ausente o se selecciona independientemente entre Phe, Asn, Ala e His;

30 Xaa_{B26} está ausente o se selecciona independientemente entre Tyr, Gly, Lys y Glu;

Xaa_{B27} está ausente o se selecciona independientemente entre Gly, Lys y Thr;

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

Xaa_{B29} está ausente o es Lys;

el extremo C se puede derivatizar opcionalmente como una amida;

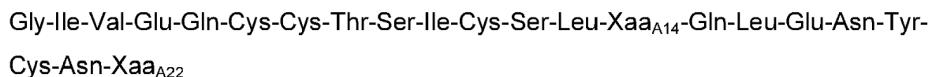
35 donde la secuencia de aminoácidos de la cadena A y la secuencia de aminoácidos de la cadena B están conectadas mediante puentes de disulfuro entre las cisteínas en la posición 7 de la cadena A y la cisteína en la posición 7 de la

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

donde la cadena A del análogo de insulina comprende al menos una mutación respecto a la insulina original y la cadena B del análogo de insulina comprende al menos dos mutaciones respecto a la insulina original; y

- 5 donde, si las mutaciones de la cadena B del análogo de insulina están constituidas por la combinación de una delección del aminoácido en la posición B30 y una sustitución del aminoácido en la posición B25 por His, entonces la mutación o mutaciones en la posición A14 en la cadena A del análogo de insulina se seleccionan a partir del grupo constituido por Lys, Arg y Pro.

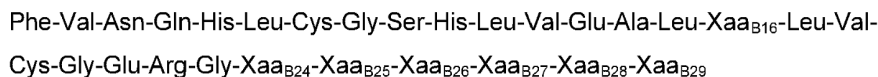
Realización 26. Un análogo de insulina que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena A de fórmula 7:



10

Fórmula (7) (SEQ ID No:7)

y una secuencia de aminoácidos de la cadena B de fórmula 8:



Fórmula (8) (SEQ ID No:8)

donde

Xaa_{A14} se selecciona independientemente entre Asp, His, Lys, Arg, Pro y Glu;

15

Xaa_{A22} está ausente o es Lys;

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

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

Xaa_{B25} se selecciona independientemente entre Phe e His;

Xaa_{B26} se selecciona independientemente entre Tyr, Gly y Glu;

20

Xaa_{B27} está ausente o se selecciona independientemente entre Gly, Lys y Thr;

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

Xaa_{B29} está ausente o es Lys;

el extremo C se puede derivatizar opcionalmente como una amida;

25

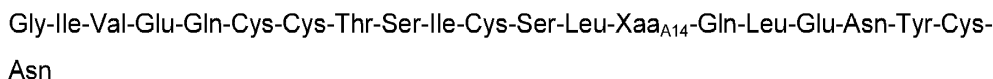
donde la secuencia de aminoácidos de la cadena A y la secuencia de aminoácidos de la cadena B están conectadas mediante puentes de disulfuro entre las cisteínas en la posición 7 de la cadena A y la cisteína en la posición 7 de la cadena B, y entre la cisteína en la posición 20 de la cadena A y la cisteína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

donde la cadena A del análogo de insulina comprende al menos una mutación respecto a la insulina original y la cadena B del análogo de insulina comprende al menos dos mutaciones respecto a la insulina original; y

30

donde, si las mutaciones de la cadena B del análogo de insulina están constituidas por la combinación de una delección del aminoácido en la posición B30 y una sustitución del aminoácido en la posición B25 por His, entonces la mutación o mutaciones en la posición A14 en la cadena A del análogo de insulina se seleccionan a partir del grupo constituido por Lys, Arg y Pro.

Realización 27. Un análogo de insulina que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena A de fórmula 9:



35

Fórmula (9) (SEQ ID No:9)

y una secuencia de aminoácidos de la cadena B de fórmula 10:

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-
Glu-Arg-Gly-Xaa_{B24}-Xaa_{B25}-Xaa_{B26}-Xaa_{B27}-Xaa_{B28}-Xaa_{B29}

Fórmula (10) (SEQ ID No:10)

donde

Xaa_{A14} se selecciona independientemente entre Asp, His, Lys, Arg, Pro, Glu y Gln;

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

Xaa_{B25} se selecciona independientemente entre Phe e His;

Xaa_{B26} se selecciona independientemente entre Tyr, Gly, Glu y Lys;

Xaa_{B27} está ausente o se selecciona independientemente entre Gly, Lys y Thr;

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

10 Xaa_{B29} está ausente o es Lys;

el extremo C se puede derivatizar opcionalmente como una amida;

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

donde la cadena A del análogo de insulina comprende al menos una mutación respecto a la insulina original y la cadena B del análogo de insulina comprende al menos dos mutaciones respecto a la insulina original; y

20 donde, si las mutaciones de la cadena B del análogo de insulina están constituidas por la combinación de una delección del aminoácido en la posición B30 y una sustitución del aminoácido en la posición B25 por His, entonces la mutación o mutaciones en la posición A14 en la cadena A del análogo de insulina se seleccionan a partir del grupo constituido por Lys, Arg y Pro.

Realización 28. Un análogo de insulina, donde

- 25 • la cadena A del análogo de insulina comprende al menos una mutación respecto a la insulina original, donde una mutación se encuentra en la posición A14 que es sustituida por un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por Lys, Glu, Arg, Asp, Pro, Gln e His; y
- 30 • la cadena B del análogo de insulina comprende al menos dos mutaciones respecto a la insulina original, donde dos o más mutaciones se presentan en forma de delecciones de los aminoácidos en las posiciones B27, B28, B29 y B30, o una combinación de una delección del aminoácido en la posición B30 y una sustitución de un aminoácido seleccionada a partir de las sustituciones de un aminoácido en la posición: B24 por Gly o His, B25 por His, B26 por Gly, B27 por Gly, His, Thr o Lys y B28 por His, Gly, Lys o Glu;

que se selecciona a partir del grupo constituido por:

insulina humana B25H, desB26, desB27, desB28, desB29, desB30

insulina humana B25H, desB27, desB28, desB29, desB30

insulina humana B25H, B27K, desB28, desB29, desB30

35 insulina humana B25H, B26G, desB27, desB28, desB29, desB30

insulina humana B25H, B26G, B27K, desB28, desB29, desB30

insulina humana B25H, B26G, B27G, desB28, desB29, desB30

insulina humana B25H, B26G, B27G, B28K, desB29, desB30

insulina humana B25H, B26G, B27G, B28G, desB29, desB30

40 insulina humana B25H, B26G, B27G, B28G, B29K, desB30

insulina humana B25H, B27G, desB28, desB29, desB30

insulina humana B25H, B27G, B28K, desB29, desB30

insulina humana B25H, B27G, B28G, desB29, desB30

insulina humana B25H, B27G, B28G, B29K, desB30

insulina humana B27K, desB28, desB29, desB30

5 insulina humana B26G, desB27, desB28, desB29, desB30

insulina humana B26G, B27K, desB28, desB29, desB30

insulina humana B27G, desB28, desB29, desB30

insulina humana B27G, B28K, desB29, desB30

insulina humana B27G, B28G, desB29, desB30 e

10 insulina humana B27G, B28G, B29K, desB30

donde el análogo de insulina comprende además sustituciones seleccionadas a partir del grupo constituido por:

A14E

A14D

A14H

15 A14E, A22K

A14D, A22K

A14H, A22K

A14D, B16H

A14E, B16H

20 A14H, B16H

A14E, A22K, B16H

A14H, A22K, B16H y

A14D, A22K, B16H

Realización 29. Un análogo de insulina, donde

25 • la cadena A del análogo de insulina comprende al menos una mutación respecto a la insulina original, donde una mutación se encuentra en la posición A14 que es sustituida por un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por Lys, Glu, Arg, Asp, Pro, Gln e His; y

30 • la cadena B del análogo de insulina comprende al menos dos mutaciones respecto a la insulina original, donde dos o más mutaciones se presentan en forma de deleciones de los aminoácidos en las posiciones B27, B28, B29 y B30, o una combinación de una deleción del aminoácido en la posición B30 y una sustitución de un aminoácido seleccionada a partir de las sustituciones de un aminoácido en la posición: B24 por Gly o His, B25 por His, B26 por Gly, B27 por Gly, His, Thr o Lys y B28 por His, Gly, Lys o Glu;

que se selecciona a partir del grupo constituido por:

insulina humana desB27, desB28, desB29, desB30

35 insulina humana desB27, desB30

insulina humana desB28, desB29, desB30

insulina humana B24H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30

insulina humana B24H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30

insulina humana B24G, B25H, desB30

40 insulina humana B24G, desB30

- insulina humana B25H, desB26, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana B25H, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana B25H, desB27, desB30
- insulina humana B25H, B27K, desB28, desB29, desB30
- 5 insulina humana B25H, B26E, B27E, desB30
- insulina humana B25H, B26G, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana B25H, B26G, B27K, desB28, desB29, desB30
- insulina humana B25H, B26G, B27G, desB28, desB29, desB30
- insulina humana B25H, B26G, B27G, B28K, desB29, desB30
- 10 insulina humana B25H, B26G, B27G, B28G, desB29, desB30
- insulina humana B25H, B26G, B27G, B28G, B29K, desB30
- insulina humana B25H, B26G, B27E, B28G, desB30
- insulina humana B25H, B26G, B27T, B28G, desB30
- insulina humana B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30
- 15 insulina humana B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
- insulina humana B25H, B26G, B27G, desB30
- insulina humana B25H, B26G, desB30
- insulina humana B25H, B27E, B29R, desB30
- insulina humana B25H, B27E, B29R, desB30
- 20 insulina humana B25H, B27E, desB30
- insulina humana B25H, B27G, desB28, desB29, desB30
- insulina humana B25H, B27K, desB28, desB29, desB30
- insulina humana B25H, B27G, B28K, desB29, desB30
- insulina humana B25H, B27G, B28G, desB29, desB30
- 25 insulina humana B25H, B29R, desB27, desB30
- insulina humana B25H, B27G, B28G, B29K, desB30
- insulina humana B25H, B27G, B28G, desB30
- insulina humana B25H, B27G, desB30
- insulina humana B25H, B28G, desB30
- 30 insulina humana B25H, B29R, desB30
- insulina humana B25H, desB30
- insulina humana B27K, desB28, desB29, desB30
- insulina humana B26G, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana B26G, B27K, desB28, desB29, desB30
- 35 insulina humana B27G, desB28, desB29, desB30
- insulina humana B27G, B28K, desB29, desB30
- insulina humana B27G, B28G, desB29, desB30

insulina humana B27G, B28G, B29K, desB30

insulina humana B28E, desB29, desB30

insulina humana B28E, desB30

insulina humana B28H, desB30

5 donde el análogo de insulina comprende además sustituciones seleccionadas a partir del grupo constituido por:

A14D

A14E

A14H

A14P

10 A14Q

A14D, A22K

A14D, B16E

A14D, B16H

A14E, A15E

15 A14E, A21G

A14E, A22K

A14E, B10E

A14E, B16D

A14E, B16E

20 A14E, B16H

A14E, B22K

A14H, A22K

A14H, B16E

A14H, B16H

25 A14P, A22K

A14P, B16E

A14P, B16H

A14Q, A22K

A14Q, B16E

30 A14Q, B16H

ABH, A14E, A22K

A8H, A14E, B10E

A8H, A14E, B10E

A8H, A14E, B10H

35 A8H, A14E, B22K

A8H, A14H, A22K

A8H, A14H, B16H

A14D, A22K, B16E

A14D, A22K, B16H

A14E, A22K, B16E

A14E, A22K, B16H

5 A14P, A22K, B16E

A14P, A22K, B16H

A14Q, A22K, B16E

A14Q, A22K, B16H

A14E, B16E, B22K

10 A14E, B16H, B22K

A14E, B16H, B24H

A14E, A18Q, A21G, B3Q

A14E, desB1, desB2, des3

Realización 30. Un análogo de insulina, donde

- 15
- la cadena A del análogo de insulina comprende al menos una mutación respecto a la insulina original, donde una mutación se encuentra en la posición A14 que es sustituida por un aminoácido seleccionado a partir del grupo constituido por Lys, Glu, Arg, Asp, Pro, Gln e His; y
 - la cadena B del análogo de insulina comprende al menos dos mutaciones respecto a la insulina original, donde dos o más mutaciones se presentan en forma de deleciones de los aminoácidos en las posiciones B27, B28, B29 y B30, o una combinación de una deleción del aminoácido en la posición B30 y una sustitución de un aminoácido seleccionada a partir de las sustituciones de un aminoácido en la posición: B24 por Gly o His, B25 por His, B26 por Gly, B27 por Gly, His, Thr o Lys y B28 por His, Gly, Lys o Glu;
- 20

que se selecciona a partir del grupo constituido por:

insulina humana desB27, desB28, desB29, desB30

25 insulina humana desB27, desB30

insulina humana desB28, desB29, desB30

insulina humana B24H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30

insulina humana B24H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30

insulina humana B24G, B25H, desB30

30 insulina humana B24G, desB30

insulina humana B25H, desB27, desB28, desB29, desB30

insulina humana B25H, desB27, desB30

insulina humana B25H, B26E, B27E, desB30

insulina humana B25H, B26G, B27K, desB28, desB29, desB30

35 insulina humana B25H, B26G, B27G, B28K, desB29, desB30

insulina humana B25H, B26G, B27E, B28G, desB30

insulina humana B25H, B26G, B27T, B28G, desB30

insulina humana B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30

insulina humana B25H, B26G, B27G, B28G, desB30

40 insulina humana B25H, B26G, B27G, desB30

insulina humana B25H, B26G, desB30

insulina humana B25H, B27E, B29R, desB30

insulina humana B25H, B27E, B29R, desB30

insulina humana B25H, B27E, desB30

5 insulina humana B25H, B27K, desB28, desB29, desB30

insulina humana B25H, B27G, B28G, desB30

insulina humana B25H, B27G, desB30

insulina humana B25H, B28G, desB30

insulina humana B25H, B29R, desB30

10 insulina humana B25H, desB30

insulina humana B28E, desB29, desB30

insulina humana B28E, desB30

insulina humana B28H, desB30

donde el análogo de insulina comprende además sustituciones seleccionadas a partir del grupo constituido por:

15 A14D

A14E

A14P

A14E, A15E

A14E, A21G

20 A14E, A22K

A14E, B10E

A14E, B16D

A14E, B16E

A14E, B16H

25 A14E, B22K

A14H, B16H

A8H, A14E, A22K

A8H, A14E, B10E

A8H, A14E, B10E

30 A8H, A14E, B10H

A8H, A14E, B22K

A8H, A14H, A22K

A8H, A14H, B16H

A14E, A22K, B16E

35 A14E, A22K, B16H

A14E, B16E, B22K

A14E, B16H, B22K

A14E, B16H, B24H

A14E, A18Q, A21G, B3Q

A14E, desB1, desB2, des3

5 Realización 31. Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 28-30, donde el análogo de insulina no es:

insulina humana A14E, B25H, desB30

insulina humana A14H, B25H, desB30

insulina humana A14E, B16E, B25H, desB30

insulina humana A14E, B16H, B25H, desB30

10 insulina humana A14E, B25H, desB26, desB27, desB28, desB29, desB30

insulina humana A14E, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30

Insulina humana A14E, B25H, B27K, desB28, desB29, desB30

insulina humana A14E, B25H, B26G, desB27, desB28, desB29, desB30

insulina humana A14E, B27G, B28K, desB29, desB30 ni

15 insulina humana A14E, B27G, B28G, desB29, desB30

Realización 32. Un análogo de insulina de acuerdo con la realización 29, que se selecciona a partir del grupo constituido por:

insulina humana A14D, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30

insulina humana A14E, A22K, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30

20 insulina humana A14E, B16D, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30

insulina humana A14E, B16E, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30

insulina humana A14E, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30

insulina humana A14E, desB27, desB28, desB29, desB30

insulina humana A14E, B16D, desB27, desB28, desB29, desB30

25 insulina humana A14E, B16E, desB27, desB28, desB29, desB30

insulina humana A14E, B16H, desB27, desB28, desB29, desB30

insulina humana A14H, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30

insulina humana A14H, B16H, B24H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30

insulina humana A14E, B28E, desB30

30 insulina humana A14E, B28H, desB30

insulina humana A14E, B28E, desB29, desB30

insulina humana A14P, B25H, desB30

insulina humana A14K, B25H, desB30

insulina humana A14H, B24H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30

35 insulina humana A14H, B16H, B24H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30

Realización 33. Un análogo de insulina de acuerdo con la realización 29, que se selecciona a partir del grupo constituido por:

insulina humana A8H, A14E, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30

ES 2 618 073 T3

- insulina humana A8H, A14E, A22K, B25H, B29R, desB30
- insulina humana A8H, A14E, B10E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
- insulina humana A8H, A14E, B16H, B25H, desB30
- insulina humana A8H, A14E, B22K, B25H, B29R, desB30
- 5 insulina humana A8H, A14H, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30
- insulina humana A8H, A14H, B16H, B25H, desB30
- insulina humana A14D, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14E, A15E, B25H, desB30
- insulina humana A14E, A18Q, A21G, B3Q, B25H, B27E, desB30
- 10 insulina humana A14E, A21G, B25H, desB27, desB30
- insulina humana A14E, A21G, B25H, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16E, B25H, B29R, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30
- 15 insulina humana A14E, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30
- insulina humana A14E, B10E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
- insulina humana A14E, B16D, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14E, B16D, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14E, B16E, B22K, B25H, B29R, desB30
- 20 insulina humana A14E, B16E, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14E, B16E, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14E, B16H, B22K, B25H, B29R, desB30
- insulina humana A14E, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14E, B16H, desB27, desB28, desB29, desB30
- 25 insulina humana A14E, B22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30
- insulina humana A14E, B24G, B25H, desB30
- insulina humana A14E, B24G, B25H, desB30
- insulina humana A14E, B24G, desB30
- insulina humana A14E, B25H, B26E, B27E, desB30
- 30 insulina humana A14E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30
- insulina humana A14E, B25H, B26G, B27G B28K, desB29, desB30
- insulina humana A14E, B25H, B26G, B27G, desB30
- insulina humana A14E, B25H, B26G, B27K, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14E, B25H, B26G, B27T, B28G, desB30
- 35 insulina humana A14E, B25H, B26G, desB30
- insulina humana A14E, B25H, B27G, B28G, desB30
- insulina humana A14E, B25H, B27G, desB30

- insulina humana A14E, B25H, B28G, desB30
- insulina humana A14E, B25H, B29R, desB30
- insulina humana A14E, B28E, desB29, desB30
- insulina humana A14E, B28E, desB30
- 5 insulina humana A14E, B28H, desB30
- insulina humana A14E, desB1, desB2, desB3, B25H, B27K, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14E, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14H, B16H, B24H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
- insulina humana A14H, B16H, B24H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30
- 10 insulina humana A14H, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30
- insulina humana A14H, B24H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
- insulina humana A14P, B25H, desB30
- insulina humana A21G, desB27, desB30
- insulina humana B27K, desB28, desB29, desB30
- 15 Realización 34. Un análogo de insulina de acuerdo con la realización 29, que se selecciona a partir del grupo constituido por:
- insulina humana A14E, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16E, B25H, B29R, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16H, B25H, desB27, B29R, desB30
- 20 insulina humana A14E, A22K, B16E, B25H, desB27, B29R, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16H, B25H, B27E, B29R, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16E, B25H, B27E, B29R, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30
- 25 insulina humana A14E, A22K, B16H, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16H, B25H, desB30
- 30 insulina humana A14E, A22K, B16E, B25H, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B25H, B27E, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16H, B25H, B27E, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16E, B25H, B27E, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
- 35 insulina humana A14E, A22K, B16H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30

ES 2 618 073 T3

- insulina humana A14E, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16H, B25H, desB27, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16E, B25H, desB27, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30
- 5 insulina humana A14Q, A22K, B16E, B25H, B29R, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B16H, B25H, desB27, B29R, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B16E, B25H, desB27, B29R, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B16H, B25H, B27E, B29R, desB30
- 10 insulina humana A14Q, A22K, B16E, B25H, B27E, B29R, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B16H, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B16E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30
- 15 insulina humana A14Q, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B16H, B25H, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B16E, B25H, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B25H, B27E, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B16H, B25H, B27E, desB30
- 20 insulina humana A14Q, A22K, B16E, B25H, B27E, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B16H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B16E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30
- 25 insulina humana A14Q, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B16H, B25H, desB27, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B16E, B25H, desB27, desB30
- insulina humana A14P, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30
- insulina humana A14P, A22K, B16E, B25H, B29R, desB30
- 30 insulina humana A14P, A22K, B16H, B25H, desB27, B29R, desB30
- insulina humana A14P, A22K, B16E, B25H, desB27, B29R, desB30
- insulina humana A14P, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30
- insulina humana A14P, A22K, B16H, B25H, B27E, B29R, desB30
- insulina humana A14P, A22K, B16E, B25H, B27E, B29R, desB30
- 35 insulina humana A14P, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30
- insulina humana A14P, A22K, B16H, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30
- insulina humana A14P, A22K, B16E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30

ES 2 618 073 T3

- insulina humana A14P, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30
insulina humana A14P, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30
insulina humana A14P, A22K, B16H, B25H, desB30
insulina humana A14P, A22K, B16E, B25H, desB30
5 insulina humana A14P, A22K, B25H, B27E, desB30
insulina humana A14P, A22K, B16H, B25H, B27E, desB30
insulina humana A14P, A22K, B16E, B25H, B27E, desB30
insulina humana A14P, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
insulina humana A14P, A22K, B16H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
10 insulina humana A14P, A22K, B16E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
insulina humana A14P, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30
insulina humana A14P, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30
insulina humana A14P, A22K, B16H, B25H, desB27, desB30
insulina humana A14P, A22K, B16E, B25H, desB27, desB30
15 insulina humana A14D, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30
insulina humana A14D, A22K, B16E, B25H, B29R, desB30
insulina humana A14D, A22K, B16H, B25H, desB27, B29R, desB30
insulina humana A14D, A22K, B16E, B25H, desB27, B29R, desB30
insulina humana A14D, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30
20 insulina humana A14D, A22K, B16H, B25H, B27E, B29R, desB30
insulina humana A14D, A22K, B16E, B25H, B27E, B29R, desB30
insulina humana A14D, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30
insulina humana A14D, A22K, B16H, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30
insulina humana A14D, A22K, B16E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30
25 insulina humana A14D, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30
insulina humana A14D, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, B29R, desB30
insulina humana A14D, A22K, B16H, B25H, desB30
insulina humana A14D, A22K, B16E, B25H, desB30
insulina humana A14D, A22K, B25H, B27E, desB30
30 insulina humana A14D, A22K, B16H, B25H, B27E, desB30
insulina humana A14D, A22K, B16E, B25H, B27E, desB30
insulina humana A14D, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
insulina humana A14D, A22K, B16H, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
insulina humana A14D, A22K, B16E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30
35 insulina humana A14D, A22K, B16E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30
insulina humana A14D, A22K, B16H, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30
insulina humana A14D, A22K, B16H, B25H, desB27, desB30

insulina humana A14D, A22K, B16E, B25H, desB27, desB30

Realización 35. Un análogo de insulina de acuerdo con la realización 29, que se selecciona a partir del grupo constituido por:

- insulina humana A14E, A22K, B16H, B25H, desB27, B29R, desB30
- 5 insulina humana A14E, A22K, B16E, B25H, desB27, B29R, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16H, B25H, desB27, desB30
- insulina humana A14E, A22K, B16E, B25H, desB27, desB30
- insulina humana A14E, B16H, B25H, desB27, desB30
- insulina humana A14E, B16E, B25H, desB27, desB30
- 10 insulina humana A14P, A22K, B16H, B25H, desB27, B29R, desB30
- insulina humana A14P, A22K, B16E, B25H, desB27, B29R, desB30
- insulina humana A14P, A22K, B16H, B25H, desB27, desB30
- insulina humana A14P, A22K, B16E, B25H, desB27, desB30
- insulina humana A14P, B16H, B25H, desB27, desB30
- 15 insulina humana A14P, B16E, B25H, desB27, desB30
- insulina humana A14D, A22K, B16H, B25H, desB27, B29R, desB30
- insulina humana A14D, A22K, B16E, B25H, desB27, B29R, desB30
- insulina humana A14D, A22K, B16H, B25H, desB27, desB30
- insulina humana A14D, A22K, B16E, B25H, desB27, desB30
- 20 insulina humana A14D, B16H, B25H, desB27, desB30
- insulina humana A14D, B16E, B25H, desB27, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B16H, B25H, desB27, B29R, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B16E, B25H, desB27, B29R, desB30
- insulina humana A14Q, A22K, B16H, B25H, desB27, desB30
- 25 insulina humana A14Q, A22K, B16E, B25H, desB27, desB30
- insulina humana A14Q, B16H, B25H, desB27, desB30
- insulina humana A14Q, B16E, B25H, desB27, desB30

Realización 36. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad biológicamente activa del análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-35 y un portador farmacéuticamente aceptable.

- 30 Realización 37. Una composición farmacéutica que comprende dos o más análogos de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-35, donde cada análogo se define por tener al menos una mutación, la cual está ausente o es diferente en cualquiera de las demás variantes.

Realización 38. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 36-37, que comprende además un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente un adyuvante.

- 35 Realización 39. Un método para el tratamiento de la diabetes mellitus en un sujeto que comprende administrar a un sujeto un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-35 o una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 36-37.

- 40 Realización 40. Un método para reducir el nivel de glucosa en sangre en mamíferos mediante la administración a un paciente que necesite dicho tratamiento de una dosis terapéuticamente activa de un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-35 o una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 36-37.

Realización 41. El método de acuerdo con la realización 39 o 40 que es una administración oral.

Realización 42. El método de acuerdo con la realización 39 o 40 que es una administración parenteral.

Realización 43. El método de acuerdo con la realización 39 o 40 que es una administración intratraqueal.

5 Realización 44. Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-35, para su uso como un medicamento para el tratamiento o la prevención de la hiperglucemia que incluye la hiperglucemia inducida por estrés, diabetes de tipo 2, tolerancia alterada a la glucosa, diabetes de tipo 1 y quemaduras, heridas quirúrgicas, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, cardiopatía coronaria y otros trastornos cardiovasculares y el tratamiento de pacientes diabéticos en estado crítico.

10 Realización 45. Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-35 para su uso como un medicamento para retrasar o prevenir la evolución de la enfermedad en la diabetes de tipo 2.

Realización 46. Un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-35, para su uso como un medicamento para el tratamiento o la prevención de la hiperglucemia que incluye la hiperglucemia inducida por estrés, diabetes de tipo 2, tolerancia alterada a la glucosa, diabetes de tipo 1 y quemaduras, heridas quirúrgicas, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, cardiopatía coronaria y otros trastornos cardiovasculares.

15 Realización 47. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-35, un derivado de esta, una secuencia parcial de esta, una secuencia degenerada de esta o una secuencia que se hibrida con esta en condiciones rigurosas.

20 Realización 48. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un precursor de un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-35, un derivado de esta, una secuencia parcial de esta, una secuencia degenerada de esta o una secuencia que se hibrida con esta en condiciones rigurosas.

Realización 49. Un vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 47-48 para expresar un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-35.

Realización 50. Una célula hospedadora que comprende un vector de la realización 49 para producir un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-35.

25 Realización 51. Un método para producir un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-35 expresando una secuencia de ácido nucleico de las realizaciones 47-48 que codifica el análogo de insulina en cuestión en una célula hospedadora adecuada.

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

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

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

40 La expresión "análogo de insulina", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un polipéptido derivado de la estructura primaria de una insulina de origen natural, por ejemplo, la de la insulina humana, por mutación. Se realizan una o más mutaciones eliminando y/o sustituyendo al menos un residuo aminoacídico presente en la insulina de origen natural y/o añadiendo al menos un residuo aminoacídico. Los residuos aminoacídicos añadidos y/o sustituidos pueden ser o bien residuos aminoacídicos que puedan ser codificados o bien otros residuos aminoacídicos de origen natural.

45 Los análogos de insulina de acuerdo con la presente invención pueden ser la insulina humana o un análogo de esta que comprendan una o más mutaciones en la cadena A y dos o más mutaciones en la cadena B de la insulina. En una realización, los análogos de insulina se diseñan para obtener una estabilidad mejorada frente a proteasas basándose en los sitios de escisión de proteasas identificados.

50 En una realización, un análogo de insulina de acuerdo con la invención comprende menos de 8 modificaciones (sustituciones, deleciones, adiciones) respecto a la insulina original. En una realización, un análogo de insulina comprende menos de 7 modificaciones (sustituciones, deleciones, adiciones) respecto a la insulina original. En una

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

- 5 Los análogos de insulina de acuerdo con la invención pueden comprender mutaciones adicionales. Las mutaciones en la molécula de insulina se denominan indicando la cadena (A o B), la posición y el código de tres letras para el aminoácido que sustituye al aminoácido natural. El término "desB30" o "B(1-29)" se refiere a una cadena B de insulina natural o un análogo de esta que carece del residuo aminoacídico B30 y el término "A(1-21)" se refiere a la cadena A de insulina natural.
- 10 En la presente, términos como A1, A2, A3, etc. indican la posición 1, 2 y 3, respectivamente, en la cadena A de insulina (contando desde el extremo N-terminal). De forma similar, términos como B1, B2, B3, etc. indican la posición 1, 2 y 3, respectivamente, en la cadena B de insulina (contando desde el extremo N-terminal). Utilizando los códigos de una letra para los aminoácidos, términos como A21A, A21G y A21Q designan que el aminoácido en la posición A21 es A, G y Q, respectivamente. Utilizando los códigos de tres letras para los aminoácidos, las expresiones correspondientes son A21Ala, A21Gly y A21Gln, respectivamente. De este modo, la insulina humana A14D, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30 es un análogo de la insulina humana en el que la posición 14 en la cadena A se ha mutado en ácido aspártico, la posición 25 en la cadena B se ha mutado en histidina y todas las posiciones 27, 28, 29 y 30 en la cadena B se han eliminado.

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

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

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

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

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

En una realización, una insulina original de acuerdo con la invención es insulina humana.

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

- 35 Un análogo de insulina de acuerdo con la invención puede ser un análogo de insulina proteolíticamente estable.

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

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

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

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

Los ensayos estándar para medir la potencia de la insulina son conocidos por el experto en la técnica e incluyen, entre otros, (1) ensayos de radiorreceptores de insulina, en los que la potencia relativa de una insulina se define como la relación de insulina respecto a análogo de insulina requerida para desplazar un 50% de ^{125}I -insulina unida específicamente a receptores de insulina presentes en membranas celulares, p. ej., una fracción de membrana plasmática de hígado de rata; (2) ensayos de lipogénesis, realizados, p. ej., con adipocitos de rata, en los que la potencia relativa de la insulina se define como la relación de insulina respecto a análogo de insulina requerida para conseguir un 50% de la conversión máxima de $[3\text{-}^3\text{H}]$ glucosa en material orgánico extraíble (es decir, lípidos); (3) ensayos de oxidación de glucosa en células grasas aisladas, en los que la potencia relativa del análogo de insulina se define como la relación de insulina respecto a análogo de insulina para conseguir un 50% de la conversión máxima de glucosa-1- $[^{14}\text{C}]$ en $[^{14}\text{CO}_2]$; (4) ensayos radioinmunológicos de insulina, que pueden determinar la inmunogenicidad de los análogos de insulina midiendo la eficacia con la que la insulina o un análogo de insulina compite con ^{125}I -insulina para unirse a anticuerpos antiinsulínicos específicos; y (5) otros ensayos que miden la unión de la insulina o un análogo de insulina a anticuerpos en muestras de plasma sanguíneo animal, tales como ensayos ELISA que poseen anticuerpos contra la insulina específicos. La biodisponibilidad de los análogos de insulina después de la administración oral se puede medir, p. ej., como la relación de la concentración del análogo de insulina en el plasma después de la administración oral respecto a la concentración del análogo de insulina en plasma después de la administración i.v. Como alternativa, la administración i.v. se puede sustituir por administración s.c. La concentración del análogo de insulina se puede determinar, por ejemplo, mediante el método (5) enumerado anteriormente.

Los análogos de insulina de acuerdo con la invención se pueden analizar opcionalmente para detectar sitios de proteasas adicionales que se puedan someter a sustituciones adicionales de uno o más aminoácidos hidrófobos con aminoácidos hidrófilos.

En la técnica, existe constancia de la producción de polipéptidos, p. ej., insulinas. Un análogo de insulina de acuerdo con la invención se puede producir, por ejemplo, mediante la síntesis clásica de péptidos, p. ej., síntesis de péptidos en fase sólida utilizando la química de t-Boc o Fmoc u otras técnicas de eficacia comprobada, remítase a, p. ej., Greene y Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, 1999. El análogo de insulina también se puede producir mediante un método que comprende cultivar una célula hospedadora que contiene una secuencia de ADN que codifica el análogo y capaz de expresar el análogo de insulina en un medio nutriente adecuado en condiciones que permiten la expresión del análogo de insulina. En el caso de los análogos de insulina que comprenden residuos aminoácidos no naturales, la célula recombinante debería modificarse de manera que los aminoácidos no naturales se incorporen al análogo, por ejemplo, utilizando mutantes de ARNt. Así pues, resumiendo, los análogos de insulina de acuerdo con la invención se preparan de manera análoga a como se preparan los análogos de insulina conocidos.

Se pueden utilizar varios métodos para la producción de insulina humana y análogos de insulina humana. Por ejemplo, en el documento WO2008034881 se divulgan tres métodos importantes que se utilizan en la producción de insulina en microorganismos. Dos de ellos utilizan *Escherichia coli*, con o bien la expresión de una proteína de fusión grande en el citoplasma (Frank *et al.* (1981) en *Peptides: Proceedings of the 7th American Peptide Chemistry Symposium* (Rich & Gross, eds.), Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. págs. 729-739) o bien el uso de un péptido señal para hacer posible la secreción en el espacio periplásmico (Chan *et al.* (1981) *PNAS* 78:5401-5404). Un tercer método utiliza *Saccharomyces cerevisiae* para secretar un precursor de insulina en el medio (Thim *et al.* (1986) *PNAS* 83:6766-6770). La técnica anterior describe una serie de precursores de insulina que se expresan en *E. coli* o *Saccharomyces cerevisiae*, remítase a los documentos U.S. 5 962 267, WO 95/16708, EP 0055945, EP 0163529, EP 0347845 y EP 0741188.

Los análogos de insulina se producen mediante la expresión de una secuencia de ADN que codifica el análogo de insulina en cuestión en una célula hospedadora adecuada utilizando técnicas muy conocidas según se describe en, p. ej., el documento US 6500645. El análogo de insulina se expresa directamente o como una molécula precursora que presenta una extensión N-terminal en la cadena B o una extensión C-terminal en la cadena B. La extensión N-terminal puede tener la función de incrementar el rendimiento del producto expresado directamente y puede tener una longitud de hasta 15 residuos aminoácidos. La extensión N-terminal debe ser escindida *in vitro* tras el aislamiento a partir del caldo de cultivo y, por consiguiente, tendrá un sitio de escisión al lado de B1. Las extensiones N-terminales del tipo adecuado en la presente invención se divulgan en los documentos US 5 395 922 y EP 765 395. La extensión C-terminal puede tener la función de proteger la molécula de insulina madura o del análogo de insulina frente al

5 procesamiento proteolítico intracelular por parte de las exoproteasas de la célula hospedadora. La extensión C-terminal debe ser escindida extracelularmente en el caldo de cultivo por parte de la carboxipeptidasa activa secretada o *in vitro* tras el aislamiento del caldo de cultivo. Un método para producir insulina madura y análogos de insulina con extensiones C-terminales en la cadena B que son eliminadas por una carboxipeptidasa se divulga en el documento WO 08037735. El producto de tipo insulina diana del proceso puede ser una insulina humana bicatenaria o un análogo de insulina humana bicatenaria que podrá o no tener una extensión C-terminal corta de la cadena B. Si el producto de tipo insulina diana no va tener la extensión C-terminal de la cadena B, entonces debería ser posible escindir posteriormente de la cadena B dicha extensión C-terminal antes de las etapas de purificación.

10 La eliminación de la extensión tendrá lugar normalmente mediante la actividad carboxipeptidasa. La etapa proteolítica catalizada por tal actividad carboxipeptidasa puede tener lugar mediante la adición de la enzima apropiada directamente al caldo de fermentación para procesar los residuos aminoacídicos restantes unidos al extremo C-terminal de la cadena B en la molécula precursora secretada por la célula.

15 Además de la extensión del extremo C-terminal de la cadena B, la molécula de insulina se puede modificar adicionalmente en la cadena A y/o B siempre que tal modificación no tenga un efecto adverso en la actividad de la insulina de la molécula de insulina diana.

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

20 En una realización adicional diferente, la invención divulga un proceso para producir un análogo de insulina que comprende (i) cultivar una célula hospedadora que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un precursor de insulina; (ii) aislar el precursor de insulina del medio de cultivo y (iii) convertir el precursor de insulina en un análogo de insulina de la invención mediante una conversión enzimática *in vitro*.

25 En una realización adicional diferente, la invención divulga un proceso para producir un análogo de insulina que comprende (i) cultivar una célula hospedadora que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un precursor de insulina; (ii) aislar el precursor de insulina del medio de cultivo y (iii) convertir el precursor de insulina en un análogo de insulina de la invención.

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

30 **Composiciones farmacéuticas**

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

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

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

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

50 Las formulaciones diseñadas para uso oral se pueden preparar de acuerdo con cualquier método conocido y tales formulaciones pueden contener uno o más agentes seleccionados a partir del grupo constituido por agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes y agentes conservantes con el fin de proporcionar preparados farmacéuticamente elegantes y agradables al paladar. Los comprimidos pueden contener el principio activo mezclado con excipientes farmacéuticamente aceptables atóxicos que sean adecuados para la elaboración de los comprimidos.

55 Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como manitol, maltodextrina, caolín, carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes desintegrantes y granulantes, por

ejemplo, almidón de maíz; agentes aglutinantes, por ejemplo, almidón, gelatina, polímeros o goma arábiga, y agentes lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden estar sin recubrir o se pueden recubrir utilizando técnicas conocidas para retrasar la desintegración o liberación del polipéptido terapéuticamente activo.

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

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

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

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

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

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

40 En una realización adicional de la invención, la formulación comprende además un conservante farmacéuticamente aceptable. El conservante está presente en una cantidad suficiente para obtener un efecto conservante. El experto estará familiarizado con la cantidad de conservante en una formulación farmacéutica y esta se puede determinar, p. ej., a partir de la bibliografía de la técnica y/o la o las cantidades conocidas de conservante en, p. ej., productos comerciales. Cada uno de estos conservantes específicos constituye una realización alternativa de la invención. El experto estará familiarizado con el uso de un conservante en las composiciones farmacéuticas. Para su conveniencia, se hace referencia a *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 19.^a edición, 1995.

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

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

55 En una realización adicional de la invención, la formulación comprende además un surfactante. El término "surfactante", tal como se utiliza en la presente, se refiere a cualesquiera moléculas o iones que comprenden una parte hidrosoluble (hidrófila), la cabeza, y un segmento liposoluble (lipófilo). Los surfactantes se acumulan preferentemente en las interfases, donde la parte hidrófila se orienta hacia el agua (fase hidrófila) y la parte lipófila hacia la fase hidrófoba u oleosa (es decir, vidrio, aire, aceite, etc.). La concentración en la que los surfactantes empiezan a formar micelas se

conoce como concentración micelar crítica o CMC. Además, los surfactantes reducen la tensión superficial de un líquido. Los surfactantes también se conocen como compuestos anfipáticos. El término "detergente" es un sinónimo utilizado para los surfactantes en general. El experto estará familiarizado con el uso de un surfactante en las composiciones farmacéuticas. Para su conveniencia, se hace referencia a *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 19.^a edición, 1995.

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

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

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

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

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar en varias formas farmacéuticas, por ejemplo, como soluciones, suspensiones, emulsiones, microemulsiones, emulsión múltiple, espumas, pomadas balsámicas, pastas, yesos, ungüentos, comprimidos, comprimidos recubiertos, enjuagues, cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina dura y cápsulas de gelatina blanda, supositorios, cápsulas rectales, gotas, geles, nebulizados, polvos, aerosoles, inhalantes, gotas para los ojos, ungüentos oftálmicos, enjuagues oftálmicos, pesarios vaginales, anillos vaginales, ungüentos vaginales, solución para inyección, soluciones de transformación *in situ*, por ejemplo, gelificación *in situ*, deposición *in situ*, precipitación *in situ*, cristalización *in situ*, solución de infusión e implantes.

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

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

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

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

La administración parenteral se puede llevar a cabo mediante inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa utilizando una jeringuilla, opcionalmente una jeringuilla en forma de bolígrafo. Como alternativa, la administración parenteral se puede llevar a cabo utilizando una bomba de venoclisis. Otra opción consiste en una composición que puede ser una solución o suspensión para la administración del compuesto que es análogo de

insulina en forma de un nebulizado nasal o pulmonar. Como otra opción más, las composiciones farmacéuticas que contienen el compuesto que es un análogo de insulina de la invención también se pueden adaptar para la administración transdérmica, p. ej., mediante una inyección sin aguja o a partir de un parche, opcionalmente un parche iontoforético, o para la administración transmucosa, p. ej., bucal.

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

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

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

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

25 La expresión "estabilidad física" de la formulación proteica, tal como se utiliza en la presente, se refiere a la tendencia de la proteína a formar agregados insolubles y/o biológicamente inactivos de la proteína como resultado de la exposición de la proteína a estreses termomecánicos y/o a la interacción con superficies interfaciales y superficies que son desestabilizantes, tales como superficies y superficies interfaciales hidrófobas. La estabilidad física de las formulaciones proteicas acuosas se evalúa mediante una inspección visual y/o medidas de la turbidez después de exponer la formulación introducida en envases adecuados (p. ej., cartuchos o viales) a un estrés mecánico/físico (p. ej., agitación) a diferentes temperaturas durante varios periodos de tiempo. La inspección visual de las formulaciones se lleva a cabo en una luz enfocada nítida con un fondo oscuro. La turbidez de la formulación se caracteriza mediante una puntuación visual que evalúa el grado de turbidez, por ejemplo, en una escala de 0 a 3 (a una formulación que no presente turbidez le corresponde una puntuación visual de 0 y a una formulación que presente turbidez visual a la luz del día le corresponde a una puntuación visual de 3). Una formulación se clasifica como físicamente inestable respecto a la agregación de proteínas cuando presenta turbidez visual a la luz del día. Como alternativa, la turbidez de la formulación se puede evaluar mediante medidas simples de la turbidez con las cuales estará familiarizado el experto. La estabilidad física de las formulaciones proteicas acuosas también se puede evaluar utilizando una sonda o agente espectroscópico del estado conformacional de la proteína. La sonda es preferentemente una molécula de bajo peso molecular que se une preferentemente a un conformero no natural de la proteína. Un ejemplo de una sonda espectroscópica molecular de bajo peso molecular de estructura proteica es la Tioflavina T. La Tioflavina T es un tinte fluorescente que se ha utilizado de forma generalizada para la detección de fibrillas de amiloide. En presencia de fibrillas, y quizás también de otras configuraciones proteicas, la Tioflavina T da lugar a un nuevo máximo de excitación a aproximadamente 450 nm y una mayor emisión a aproximadamente 482 nm cuando se une a una forma proteica de las fibrillas. La Tioflavina T no unida es esencialmente no fluorescente en las longitudes de onda.

35 Se pueden utilizar otras moléculas de bajo peso molecular como sondas de los cambios en la estructura proteica desde el estado natural hasta estados no naturales. Por ejemplo, las sondas de "parche hidrófobo", las cuales se unen preferentemente a parches hidrófobos expuestos de una proteína. Los parches hidrófobos están por lo general enterrados en la estructura terciaria de una proteína en su estado natural, pero quedan expuestos cuando la proteína empieza a desplegarse o desnaturalizarse. Algunos ejemplos de estas sondas espectroscópicas moleculares de bajo peso molecular son tintes hidrófobos y aromáticos tales como el antraceno, la acridina, la fenantrolina o similares. Otras sondas espectroscópicas son complejos de metal-aminoácido tales como complejos del metal cobalto de aminoácidos hidrófobos tales como fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina y valina, o similares.

45 La expresión "estabilidad química" de la formulación proteica, tal como se utiliza en la presente, se refiere a cambios químicos covalentes en la estructura de la proteína que llevan a la formación de productos de degradación química con una posible reducción de la potencia biológica y/o un posible incremento de las propiedades inmunogénicas en comparación con la estructura de la proteína natural. Se pueden formar varios productos de degradación química dependiendo del tipo y la naturaleza de la proteína natural y del entorno al cual se exponga la proteína. Lo más probable es que la eliminación de la degradación química no se pueda evitar completamente y se suelen observar cantidades cada vez mayores de productos de degradación química durante el almacenamiento y el uso de la formulación proteica, como bien sabe el experto en la técnica. La mayoría de las proteínas tienen tendencia a

5 experimental desamidación, un proceso en el cual el grupo amida de la cadena lateral en los residuos de glutamilo o asparaginilo se hidroliza para formar un ácido carboxílico libre. Otras rutas de degradación conllevan la formación de productos de transformación de elevado peso molecular, donde dos o más moléculas proteicas se unen covalentemente entre sí mediante transamidación y/o interacciones de disulfuro, que llevan a la formación de
 10 productos de degradación diméricos, oligoméricos y poliméricos unidos covalentemente (*Stability of Protein Pharmaceuticals*, Ahern. T.J. y Manning M.C., Plenum Press, Nueva York 1992). La oxidación (de, por ejemplo, residuos de metionina) se puede mencionar como otra variante de la degradación química. La estabilidad química de la formulación proteica se puede evaluar midiendo la cantidad de los productos de degradación química en varios puntos de evaluación tras la exposición a diferentes condiciones medioambientales (la formación de productos de
 15 degradación se puede acelerar a menudo, por ejemplo, incrementando la temperatura). La cantidad de cada producto de degradación individual se suele determinar mediante la separación de los productos de degradación según su tamaño molecular y/o su carga utilizando varias técnicas cromatográficas (p. ej., SEC-HPLC y/o RP-HPLC).

15 Así pues, según se ha expuesto anteriormente, una "formulación estabilizada" se refiere a una formulación con un incremento de la estabilidad física, un incremento de la estabilidad química o un incremento de la estabilidad física y química. En general, una formulación debe ser estable durante su uso y almacenamiento (de acuerdo con las condiciones de almacenamiento y uso recomendadas) hasta que se alcance la fecha de caducidad.

En una realización de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el compuesto que es un análogo de insulina es estable durante más de 6 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.

20 En otra realización de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el compuesto que es un análogo de insulina es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.

En una realización adicional de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el compuesto que es un análogo de insulina es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de dos años de almacenamiento.

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

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

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

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

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

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

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

- 5 En una realización adicional de la invención, la formulación comprende además un polímero mucoadhesivo. Se puede obtener un contacto íntimo del sistema de suministro farmacológico con la mucosa del tubo gastrointestinal mediante el uso de un polímero mucoadhesivo de este tipo. Un contacto íntimo de la forma farmacéutica con la membrana parece beneficioso, ya que se puede evitar la degradación enzimática del polipéptido terapéuticamente activo en su recorrido entre el sistema de suministro y la membrana de absorción. Además, se puede proporcionar un gradiente de concentración por pasos en la membrana de absorción que representa la fuerza conductora para la captación pasiva del fármaco.
- 10 En una realización adicional de la invención, la formulación comprende además un inhibidor de una o más enzimas proteolíticas para eludir adicionalmente la barrera enzimática y conseguir el suministro del polipéptido terapéuticamente activo, tal como un inhibidor de aminopeptidasas, amastatina, bestatina, boroleucina y puromicina. Algunos ejemplos de inhibidores de proteasas son glicolato de sodio, mesilato de camostato, bacitracina, inhibidor de la tripsina de la soja y aprotinina.
- 15 El atrapamiento y la encapsulación constituyen una técnica utilizada en sistemas de suministro farmacológico para polipéptidos terapéuticamente activos que tiene como objetivo optimizar las propiedades de suministro, incluida la protección contra la degradación enzimática. El atrapamiento o encapsulación puede adoptar la forma de sistemas de suministro farmacológico poliméricos tales como hidrogeles y nanocápsulas/microesferas, y sistemas de suministro farmacológico lipídicos tales como liposomas y microemulsiones.
- 20 Las composiciones de la presente invención se pueden administrar en varias formas farmacéuticas, por ejemplo, como soluciones, suspensiones, micro- y nanosuspensión, emulsiones, microemulsiones, emulsión múltiple, espumas, pomadas balsámicas, pastas, ungüentos, comprimidos, comprimidos recubiertos, comprimidos efervescentes, comprimidos sublinguales, comprimidos bucales, cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina dura y cápsulas de gelatina blanda, polvos, gránulos, soluciones de transformación *in situ*, por ejemplo, gelificación *in situ*, deposición *in situ*, precipitación *in situ*, cristalización *in situ*, una formulación que flote en el estómago tal como una suspensión flotante, un comprimido flotante o similares.
- 25 En otra realización, la presente invención se refiere a un análogo de insulina de acuerdo con la invención para su uso como un medicamento.
- 30 El término "diabetes" o "diabetes mellitus" incluye la diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2, diabetes gestacional (durante el embarazo) y otros estados que provocan hiperglucemia. El término se utiliza para un trastorno metabólico en el cual el páncreas produce cantidades insuficientes de insulina o en el cual las células del cuerpo no son capaces de responder de manera apropiada a la insulina lo que evita que las células absorban la glucosa. El resultado es que la glucosa se acumula en la sangre.
- La diabetes de tipo 1, también denominada diabetes mellitus dependiente de la insulina (IDDM, por sus siglas en inglés) y diabetes de aparición en jóvenes, está provocada por una destrucción de células B lo que conlleva normalmente una deficiencia absoluta de insulina.
- 35 La diabetes de tipo 2, también conocida como diabetes mellitus no dependiente de la insulina (NIDDM, por sus siglas en inglés) y diabetes de aparición en adultos, se asocia con una resistencia a la insulina predominante y, por lo tanto, la deficiencia relativa de insulina y/o un defecto secretor predominantemente de insulina con resistencia a la insulina.
- 40 En una realización, un análogo de insulina de acuerdo con la invención se utiliza para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la hiperglucemia que incluye la hiperglucemia inducida por estrés, diabetes de tipo 2, tolerancia alterada a la glucosa, diabetes de tipo 1 y quemaduras, heridas quirúrgicas, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, cardiopatía coronaria y otros trastornos cardiovasculares y el tratamiento de pacientes diabéticos en estado crítico.
- 45 En otra realización, un análogo de insulina de acuerdo con la invención se utiliza como un medicamento para retrasar o prevenir la evolución de la enfermedad en la diabetes de tipo 2.
- 50 En una realización de la invención, se proporciona el análogo de insulina de acuerdo con la invención que se utiliza como un medicamento para el tratamiento o la prevención de la hiperglucemia que incluye la hiperglucemia inducida por estrés, diabetes de tipo 2, tolerancia alterada a la glucosa, diabetes de tipo 1 y quemaduras, heridas quirúrgicas, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, cardiopatía coronaria, y otros trastornos cardiovasculares.
- 55 En una realización adicional de la invención, se proporciona un método para el tratamiento o la prevención de la hiperglucemia incluida la hiperglucemia inducida por estrés, diabetes de tipo 2, tolerancia alterada a la glucosa, diabetes de tipo 1 y quemaduras, heridas quirúrgicas, infarto de miocardio, cardiopatía coronaria y otros trastornos cardiovasculares, accidente cerebrovascular, comprendiendo el método administrar a un paciente que necesite tal tratamiento una cantidad eficaz para tal tratamiento de un análogo de insulina de acuerdo con la invención.
- El tratamiento con un análogo de insulina de acuerdo con la presente invención también se puede combinar con una segunda sustancia farmacológicamente activa o con más sustancias farmacológicamente activas, p. ej., seleccionadas entre agentes antidiabéticos, agentes contra la obesidad, agentes reguladores del apetito, agentes contra la

hipertensión, agentes para el tratamiento y/o la prevención de complicaciones resultantes de la diabetes o asociadas con ella y agentes para el tratamiento y/o la prevención de complicaciones y trastornos resultantes de la obesidad o asociados con ella. Algunos ejemplos de estas sustancias farmacológicamente activas son: GLP-1 y derivados y análogos de GLP-1, GLP-2 y derivados y análogos de GLP-2, Exendina-4 y derivados y análogos de Exendina-4, amilina y derivados y análogos de amilina, sulfonilureas, biguanidas, meglitinidas, inhibidores de glucosidasas, antagonistas de glucagón, inhibidores de DPP-IV (dipeptidilpeptidasa-IV), inhibidores de enzimas hepáticas que participan en la estimulación de la gluconeogénesis y/o glucogenólisis, moduladores de la captación de glucosa, compuestos que modifican el metabolismo de los lípidos tales como agentes antihiperlipidémicos como inhibidores de HMG CoA (estatinas), compuestos que reducen la ingesta de alimentos, agonistas de RXR y agentes que actúan en el canal de potasio dependiente de ATP de las células β ; Colestiramina, colestipol, clofibrato, gemfibrozil, lovastatina, pravastatina, simvastatina, probucol, dextrotiroxina, neteglinida, repaglinida; bloqueantes β tales como alprenolol, atenolol, timolol, pindolol, propranolol y metoprolol, inhibidores de ACE (enzima convertidora de angiotensina) tales como benazepril, captopril, enalapril, fosinopril, lisinopril, alatriopril, quinapril y ramipril, bloqueadores del canal del calcio tales como nifedipina, felodipina, nicardipina, isradipina, nimodipina, diltiazem y verapamil, y bloqueantes α tales como doxazosina, urapidil, prazosina y terazosina; agonistas de CART (transcrito regulado de cocaína y anfetamina), antagonistas de NPY (neuropéptido Y), agonistas de MC4 (melanocortina 4), antagonistas de orexina, agonistas de TNF (factor de necrosis tumoral), agonistas de CRF (factor liberador de corticotropina), antagonistas de CRF BP (proteína de unión al factor liberador de corticotropina), agonistas de urocortina, agonistas de β_3 , agonistas de MSH (hormona estimuladora de melanocitos), antagonistas de MCH (hormona concentradora de melanocitos), agonistas de CCK (colecistocinina), inhibidores de la recaptación de serotonina, inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina, compuestos noradrenérgicos y de serotonina mixtos, agonistas de 5HT (serotonina), agonistas de bombesina, antagonistas de galanina, hormona del crecimiento, compuestos liberadores de la hormona del crecimiento, agonistas de TRH (hormona liberadora de tireotropina), moduladores de UCP 2 o 3 (proteína desacopladora 2 o 3), agonistas de leptina, agonistas de DA (bromocriptina, doprexina), inhibidores de lipasas/amilasas, moduladores de RXR (receptor retinoide X), agonistas de TR β ; antagonistas de histamina H3, gastrina y análogos y derivados de gastrina.

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

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

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

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

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

Ejemplos

Ejemplo 1

Estabilidad proteolítica (semivida) de los análogos de insulina e insulina humana respecto a la pepsina. Se midió la estabilidad proteolítica de la insulina humana y análogos de insulina (0.06 mM, 10 μ L) respecto a la pepsina (0.34-3.4 μ g) (Pepsina A, Sigma P6887) después de una incubación en HCl 10 mM, pH 2.0 y 37 °C en un volumen final de 100 μ L. Las muestras se desactivaron en diferentes momentos (0, 5, 15, 30 y 60 min) con un volumen equivalente de Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0 (pH final de 7.7) y se transfirieron a 5 °C. Se prepararon muestras de referencia (0 min) sin añadir enzima. La insulina humana y los análogos de insulina se analizaron inmediatamente mediante RP-HPLC a 214 nm y se determinó el área bajo el pico correspondiente a la proteína intacta. Se obtuvieron las semividas ($T_{1/2}$) medidas en minutos a partir de las curvas y se calculó el factor de incremento/reducción en comparación con la insulina humana (utilizado como referencia interna en cada experimento) (factor relativo de estabilidad).

Se evaluaron los análogos de insulina en ensayos de estabilidad y se identificaron los análogos que exhibieron una mayor resistencia frente a la digestión proteolítica mediante el aumento de las semividas de acuerdo con los métodos descritos anteriormente. Los resultados demuestran el potencial de los análogos de insulina mejorados adicionalmente para presentar una mayor biodisponibilidad debido a su resistencia mejorada frente a la degradación proteolítica y a su solubilidad mejorada. Se ha estudiado la estabilidad de los siguientes análogos de insulina frente a la pepsina respecto a la insulina humana.

Tabla 1.

Análogo de insulina	T _{1/2} [Min] (Factor) Pepsina
insulina humana A14H, B16H, B25H, desB30	173.3 (258.6)
insulina humana A14E, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30	385.1 (555.6)
insulina humana A14H, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30	239 (344.8)
Insulina humana	0.67 (1)

Ejemplo 2

Afinidad por el receptor de insulina de análogos de insulina seleccionados de la invención

Se determinó la afinidad de los análogos de insulina de esta invención por el receptor de la insulina humana mediante un ensayo SPA (siglas en inglés de *Scintillation Proximity Assay*, Ensayo de centelleo por proximidad) en un ensayo de captura con anticuerpos en placas de microvaloración. Se mezclaron microesferas de SPA-PVT con anticuerpos unidos, reactivo anti-ratón (Amersham Biosciences, N.º de Cat. PRNQ0017) 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 reactivo para una placa Optiplate de Packard (N.º Packard 6005190) estuvo compuesta 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 A14Tyr^[125I]-insulina humana correspondiente a 5000 cpm por 100 µL de mezcla de reactivo, 12 µL de una dilución 1:1000 del anticuerpo F12, 3 mL de microesferas para SPA y tampón de unión hasta un total de 12 mL. A continuación, se añadió un total de 100 µL de mezcla de reactivo a cada pocillo en la placa Optiplate de Packard y se realizó una serie de diluciones del derivado de insulina en las placas Optiplate a partir de muestras apropiadas. A continuación, las muestras se incubaron durante 16 horas a la vez que se agitaba con suavidad. A continuación, se separaron las fases centrifugando durante 1 min y se realizó un recuento en las placas con un contador de sobremesa. Los datos de unión se ajustaron utilizando el algoritmo de regresión no lineal en GraphPad Prism 2.01 (software GraphPad, San Diego, CA) y las afinidades se expresaron respecto a la afinidad de la insulina humana (en porcentaje (%)).

Tabla 2. Afinidades por el receptor de insulina de análogos de insulina seleccionados de la invención

Análogo de insulina	Afinidad relativa de unión respecto al receptor de insulina (%)
insulina humana A14E, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30	7.61
insulina humana A14E, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30	59.25
insulina humana A8H, A14E, A22K, B25H, B29R, desB30	67.09
insulina humana A8H, A14E, B22K, B25H, B29R, desB30	81.11
insulina humana A14E, A22K, B16E, B25H, B29R, desB30	0.9
insulina humana A14E, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30	24.6
insulina humana A14E, B22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30	60.67
insulina humana A14E, B16E, B22K, B25H, B29R, desB30	0.59
insulina humana A14E, A21G, B25H, desB30	13.12
insulina humana A14E, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30	1.9

Análogo de insulina	Afinidad relativa de unión respecto al receptor de insulina (%)
insulina humana A14H, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30	2
insulina humana A14P, B25H, desB30	14
insulina humana A14E, B27K, desB28, desB29, desB30	79
insulina humana A14E, A15E, B25H, desB30	23
insulina humana A14E, B25H, B26E, B27E, desB30	16.5
insulina humana A14E, B10E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30	144
insulina humana A8H, A14E, B10E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30	136
insulina humana A8H, A14E, B16H, B25H, desB30	24
insulina humana A8H, A14H, B16H, B25H, desB30	27
insulina humana A14E, B25H, B29R, desB30	26.05
insulina humana A14E, B16H, B22K, B25H, B29R, desB30	4.61
insulina humana A14E, B25H, B28G, desB30	18.4
insulina humana A14E, B25H, B26G, B27G, B28K, desB30	69.54
insulina humana A14E, B25H, B27G, B28G, desB30	16.48
insulina humana A14E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30	22.71
insulina humana A14K, B25H, B29R	11

Ejemplo 3

Degradación de los análogos de insulina utilizando enzimas del lumen del duodeno

5 Degradación de los análogos de insulina utilizando enzimas del lumen del duodeno (preparadas por filtración del contenido del lumen del duodeno) de ratas SPD. El ensayo se llevó a cabo con un robot en una placa de 96 pocillos (2 mL) en la que había 16 pocillos disponibles para los análogos de insulina y patrones. Los análogos de insulina, ~15 μM , se incubaron con enzimas del duodeno en Hepes 100 mM, pH = 7.4 a 37 °C, se obtuvieron muestras después de 1, 15, 30, 60, 120 y 240 min, y la reacción se desactivó mediante la adición de TFA. Se determinaron los análogos de insulina intactos en cada momento mediante RP-HPLC. Se determinó el semitiempo de degradación mediante el ajuste exponencial de los datos y se normalizó respecto al semitiempo determinado para las insulinas de referencia o la insulina humana en cada ensayo. La cantidad de enzimas añadida para la degradación fue tal que el semitiempo de degradación de la insulina de referencia estuvo comprendido entre 60 y 180 min. El resultado se proporcionó como el semitiempo de degradación para el análogo de insulina en el duodeno de rata dividido por el semitiempo de degradación para la insulina de referencia del mismo experimento (velocidad de degradación relativa).

15

ES 2 618 073 T3

Tabla 3.

Análogo de insulina	Estabilidad relativa frente a la degradación en el duodeno respecto a la insulina humana
insulina humana B27K, desB28,desB29,desB30	1.1
insulina humana A14E, B27K, desB28, desB29, desB30	3.3
insulina humana A14E, A15E, B25H, desB30	17.6
insulina humana A14E, B25H, B26E, B27E, desB30	11.55
insulina humana A14E, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30	0.88
insulina humana A14H, B16H, B25H, desB27, desB28, desB29, desB30	0.88
insulina humana A14E, B10E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30	8.14
insulina humana A8H, A14E, B10E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30	14.85
insulina humana A8H, A14E, B16H, B25H, desB30	11.55
insulina humana A8H, A14H, B16H, B25H, desB30	3.3
insulina humana A14E, B25H, B29R, desB30	9.9
insulina humana A14E, B16H, B22K, B25H, B29R, desB30	4.4
insulina humana A14E, A22K, B16H, B25H, B29R, desB30	6.6
insulina humana A14E, A22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30	8.25
insulina humana A8H, A14E, A22K, B25H, B29R, desB30	7.15
insulina humana A8H, A14E, B22K, B25H, B29R, desB30	9.9
insulina humana A14E, B22K, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30	4.4
insulina humana A14E, A22K, B16E, B25H, B29R, desB30	7.15
insulina humana A14E, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30	20.9
insulina humana A14E, B16E, B22K, B25H, B29R, desB30	17.05

Análogo de insulina	Estabilidad relativa frente a la degradación en el duodeno respecto a la insulina humana
insulina humana A14E, A21G, B25H, desB30	6.6
insulina humana A14P, B25H, desB30	0
insulina humana A14E, B25H, B28G, desB30	6.05
insulina humana A14E, B25H, B26G, B27G, B28K, desB30	7.7
insulina humana A14E, B25H, B27G, B28G, desB30	11
insulina humana A14E, B25H, B26G, B27E, B28G, desB30	8.25
insulina humana A14E, B24G, B25H, desB30	2.5

Lista de secuencias

- <110> NOVO NORDISK A/S
- <120> ANÁLOGOS DE INSULINA ESTABILIZADOS FRENTE A PROTEASAS
- 5 <130> 7781.204-WO
- <150> EP 08102598.3
- < 151> 14-03-2008
- <160> 10
- <170> PatentIn versión 3.5
- 10 <210> 1
- < 211> 22
- < 212> PRT
- < 213> Artificial
- <220>
- 15 < 223> Cadena A de insulina modificada
- <220>
- < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
- < 222> (8)..(8)
- < 223> Xaa es Thr o His
- 20 <220>
- < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
- < 222> (14) .. (14)
- < 223> Xaa es Asp, His, Lys, Arg, Pro, Gln o Glu
- <220>
- 25 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
- < 222> (15)..(15)
- < 223> Xaa es Gln o Glu

<220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (21) .. (21)
 < 223> Xaa es Asn, Gin, Gly o Ala

5

<220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (22) .. (22)
 < 223> Xaa está ausente o es Lys

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

10

Glu Asn Tyr Cys Xaa Xaa
 20

<210> 2
 < 211> 29
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

15

<220>
 < 223> Cadena B de insulina modificada

<220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (3)..(3)
 < 223> Xaa es Asn, Gln, Gly o Ala

20

<220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (10)..(10)
 < 223> Xaa es His, Glu o Asp

25

<220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (16)..(16)
 < 223> Xaa es Tyr, Asp, His or Glu

30

<220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (22) .. (22)
 < 223> Xaa está ausente, o es Arg o Lys

<220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (24) .. (24)
 < 223> Xaa está ausente, o es Phe, Gly o His

35

<220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (25) .. (25)
 < 223> Xaa está ausente, o es Phe, Asn, Ala o His

40

<220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (26) .. (26)
 < 223> Xaa está ausente, o es Tyr, Gly, Glu o Lys

- <220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (27) .. (27)
 < 223> Xaa está ausente, o es Gly, Lys o Thr
- 5 <220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (28) .. (28)
 < 223> Xaa está ausente, o es Pro, Gly, His, Lys, Asp o Glu
- 10 <220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (29) .. (29)
 < 223> Xaa está ausente o es Lys
- <400> 2
 Phe Val Xaa Gln His Leu Cys Gly Ser Xaa Leu Val Glu Ala Leu Xaa
 1 5 10 15
- Leu Val Cys Gly Glu Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25
- 15 <210> 3
 < 211> 22
 < 212> PRT
 < 213> Artificial
- 20 <220>
 < 223> Cadena A de insulina modificada
- <220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (14)..(14)
 < 223> Xaa es Asp, His, Lys, Arg, Pro, Gln o Glu
- 25 <220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (15)..(15)
 < 223> Xaa es Gln o Glu
- 30 <220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (21) .. (21)
 < 223> Xaa es Asn, Gln, Gly o Ala
- <220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (22) .. (22)
 < 223> Xaa está ausente o es Lys
- 35 <400> 3
 Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Xaa Xaa Leu
 1 5 10 15
- Glu Asn Tyr Cys Xaa Xaa
 20
- 40 <210> 4
 < 211> 29
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> Cadena B de insulina modificada

5 <220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (3)..(3)
 < 223> Xaa es Asn, Gln, Gly o Ala

10 <220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (16)..(16)
 < 223> Xaa es Tyr, Asp, His o Glu

<220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (22) .. (22)
 < 223> Xaa está ausente, o es Arg o Lys

15 <220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (24) .. (24)
 < 223> Xaa está ausente, o es Phe, Gly o His

20 <220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (25) .. (25)
 < 223> Xaa está ausente, o es Phe, Asn, Ala o His

25 <220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (26) .. (26)
 < 223> Xaa está ausente, o es Tyr, Gly, Glu o Lys

30 <220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (27) .. (27)
 < 223> Xaa está ausente, o es Gly, Lys o Thr

<220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (28) .. (28)
 < 223> Xaa está ausente, o es Pro, Gly, His, Lys, Asp o Glu

35 <220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (29) .. (29)
 < 223> Xaa está ausente o es Lys

<400> 4
 Phe Val Xaa Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Xaa
 1 5 10 15

40 Leu Val Cys Gly Glu Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25

45 <210> 5
 < 211> 22
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

<220>
< 223> Cadena A de insulina modificada

5 <220>
< 221> CARACTERÍSTICA_MISC
< 222> (14)..(14)
< 223> Xaa es Asp, His, Lys, Arg, Pro, Gln o Glu

10 <220>
< 221> CARACTERÍSTICA_MISC
< 222> (21) .. (21)
< 223> Xaa es Asn, Gln, Gly o Ala

<220>
< 221> CARACTERÍSTICA_MISC
< 222> (22) .. (22)
< 223> Xaa está ausente o es Lys

15 <400> 5
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Xaa Gln Leu
1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Xaa Xaa
20

20 <210> 6
< 211> 29
< 212> PRT
< 213> Artificial

<220>
< 223> Cadena B de insulina modificada

25 <220>
< 221> CARACTERÍSTICA_MISC
< 222> (3)..(3)
< 223> Xaa es Asn, Gln, Gly o Ala

30 <220>
< 221> CARACTERÍSTICA_MISC
< 222> (16)..(16)
< 223> Xaa es Tyr, Asp, His o Glu

<220>
< 221> CARACTERÍSTICA_MISC
< 222> (24) .. (24)
< 223> Xaa está ausente, o es Phe, Gly o His

35 <220>
< 221> CARACTERÍSTICA_MISC
< 222> (25) .. (25)
< 223> Xaa está ausente, o es Phe, Asn, Ala o His

40 <220>
< 221> CARACTERÍSTICA_MISC
< 222> (26) .. (26)
< 223> Xaa está ausente, o es Tyr, Gly, Glu o Lys

<220>
< 221> CARACTERÍSTICA_MISC

< 222> (27) .. (27)
 < 223> Xaa está ausente, o es Gly, Lys o Thr

<220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 5 < 222> (28) .. (28)
 < 223> Xaa está ausente, o es Pro, Gly, His, Lys, Asp o Glu

<220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 10 < 222> (29) .. (29)
 < 223> Xaa está ausente o es Lys

<400> 6
 Phe Val Xaa Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Xaa
 1 5 10 15
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25

<210> 7
 < 211> 22
 15 < 212> PRT
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> Cadena A de insulina modificada

<220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 20 < 222> (14)..(14)
 < 223> Xaa es Asp, His, Lys, Arg, Pro o Glu

<220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 25 < 222> (22) .. (22)
 < 223> Xaa está ausente o es Lys

<400> 7
 Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Xaa Gln Leu
 1 5 10 15
 Glu Asn Tyr Cys Asn Xaa
 20

<210> 8
 < 211> 29
 30 < 212> PRT
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> Cadena B de insulina modificada

<220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 35 < 222> (16)..(16)
 < 223> Xaa es Tyr, Asp, His o Glu

<220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 40

< 222> (24) .. (24)
 < 223> Xaa es Phe o His

<220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 5 < 222> (25) .. (25)
 < 223> Xaa es Phe o His

<220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 10 < 222> (26) .. (26)
 < 223> Xaa es Tyr, Gly o Glu

<220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (27) .. (27)
 < 223> Xaa está ausente, o es Gly, Lys o Thr

15 <220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (28) .. (28)
 < 223> Xaa está ausente, o es Pro, Gly, His, Lys, Asp o Glu

20 <220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (29) .. (29)
 < 223> Xaa está ausente o es Lys

<400> 8
 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Xaa
 1 5 10 15

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

25 <210> 9
 < 211> 21
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

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

<220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (14)..(14)
 < 223> Xaa es Asp, His, Lys, Arg, Pro, Gln o Glu

35 <400> 9
 Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Xaa Gln Leu
 1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn
 20

<210> 10
 < 211> 29
 < 212> PRT
 40 < 213> Artificial

<220>
 < 223> Cadena B de insulina modificada

5 <220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (24) .. (24)
 < 223> Xaa es Phe o His

10 <220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (25) .. (25)
 < 223> Xaa es Phe o His

<220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (26) .. (26)
 < 223> Xaa es Tyr, Gly, Glu o Lys

15 <220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (27) .. (27)
 < 223> Xaa está ausente, o es Gly, Lys o Thr

20 <220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (28) .. (28)
 < 223> Xaa está ausente, o Pro, Gly, His, Lys, Asp o Glu

25 <220>
 < 221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (29) .. (29)
 < 223> Xaa está ausente o es Lys

<400> 10
 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 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25

30

REIVINDICACIONES

1. Un análogo de insulina seleccionado a partir del grupo constituido por:
 - insulina humana A14E, A15E, B25H, desB30;
 - insulina humana A14E, B25H, B26E, B27E, desB30;
 - 5 insulina humana A8H, A14E, B10E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30;
 - insulina humana A8H, A14E, B16H, B25H, desB30;
 - insulina humana A14E, B25H, B29R, desB30;
 - insulina humana A8H, A14E, B22K, B25H, B29R, desB30;
 - insulina humana A14E, A22K, B25H, B27E, B29R, desB30; e
 - 10 insulina humana A14E, B16E, B22K, B25H, B29R, desB30.
2. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad biológicamente activa del análogo de insulina de acuerdo con la reivindicación 1 y un portador farmacéuticamente aceptable.
3. Un análogo de insulina de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento o la prevención de la hiperglucemia incluida la hiperglucemia inducida por estrés, diabetes de tipo 2, tolerancia alterada a la glucosa, diabetes de tipo 1, quemaduras, heridas quirúrgicas, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, cardiopatía coronaria y otros trastornos cardiovasculares, y el tratamiento de pacientes diabéticos en estado crítico.
- 15