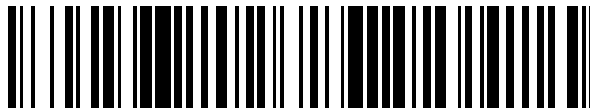


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 065**

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: **03.10.2014 PCT/EP2014/071236**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.04.2015 WO15052088**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2014 E 14780512 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018 EP 3055325**

54 Título: **Nuevo derivado de un análogo de la insulina**

30 Prioridad:

07.10.2013 EP 13187626

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

16.07.2018

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)

Novo Allé

2880 Bagsværd, DK

72 Inventor/es:

MADSEN, PETER;

TAGMOSE, TINA MØLLER;

NAVER, HELLE y

KJELDSEN, THOMAS BØRGLUM

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 676 065 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

Nuevo derivado de un análogo de la insulina

5 Campo de la invención

La presente invención proporciona un nuevo derivado de un análogo de la insulina humana, útil para el tratamiento de la diabetes.

10 Antecedentes de la invención

La insulina es una hormona polipeptídica secretada por las células β del páncreas. La insulina consta de dos cadenas polipeptídicas denominadas cadenas A y B que están unidas entre sí por dos puentes disulfuro intercatenarios. En la insulina humana, porcina y bovina, las cadenas A y B contienen 21 y 30 residuos de aminoácidos, respectivamente. Sin embargo, existen variaciones de una especie a otra entre los residuos de aminoácidos presentes en las diferentes posiciones en las dos cadenas. El uso ampliamente generalizado de la ingeniería genética ha hecho posible preparar análogos de las insulinas de origen natural mediante el intercambio, la eliminación y la adición de uno o más residuos de aminoácidos. La insulina se utiliza para el tratamiento de la diabetes y de las enfermedades asociadas a la diabetes o que son consecuencia de ella.

Por décadas se han desarrollado y comercializado preparaciones de insulina de diferente duración de la acción y son ejemplos de dichas preparaciones las preparaciones de insulina de acción prolongada, las preparaciones de insulina de acción media y las preparaciones de insulina de acción rápida. Muchos pacientes reciben 2-4 inyecciones por día, cada semana, cada mes, y cada año, opcionalmente durante décadas. A la fecha se han aprobado productos de insulina no basal para la administración menos frecuente que una inyección subcutánea diaria. Se puede, por ejemplo, disminuir la incomodidad de un gran número de inyecciones diarias utilizando derivados de la insulina que tengan una duración extremadamente prolongada de la acción.

Diversas solicitudes de patente incluidas WO 2010/049488 y WO 2011/161125 mencionan la posibilidad de administrar derivados de la insulina a intervalos prolongados. WO 2009/115469 se refiere a insulinas estabilizadas con proteasa acilada en las que al menos un aminoácido hidrófobo ha sido sustituido por aminoácidos hidrófilos.

Sería deseable para los pacientes diabéticos, disponer de preparaciones de insulina basal para ser administradas aproximadamente una vez a la semana.

35 Objetos de la invención

El objeto de esta invención se define en las reivindicaciones. Un aspecto es superar o mejorar al menos una de las desventajas del estado anterior de la técnica, o proporcionar una alternativa útil.

Otro aspecto se refiere al suministro de derivados de la insulina con perfiles farmacocinéticos (de aquí en adelante FC) prolongados, por ejemplo de modo que un tratamiento subcutáneo una vez a la semana o más espaciadamente, será un tratamiento satisfactorio de la necesidad de tratamiento con insulina basal del paciente diabético.

Otro aspecto se refiere al suministro de derivados de la insulina con perfiles FC prolongados, por ejemplo perfiles FC que sean más prolongados que el perfil FC de la insulina humana, después de la administración subcutánea. En este sentido, el perfil FC se puede determinar según se explica en los ejemplos 5 y 6 de este documento.

Otro aspecto se refiere al suministro de derivados de la insulina que tengan una alta solubilidad en un medio acuoso que contenga opcionalmente zinc, por ejemplo una solubilidad superior a la solubilidad de la insulina humana. En este sentido, la solubilidad se puede determinar según se explica en el ejemplo 7 de este documento.

Otro aspecto se refiere al suministro de derivados de la insulina que sean solubles en un medio acuoso que contenga zinc, por ejemplo al menos 5 iones de zinc por hexámero de insulina, cuando se mide luego del almacenamiento durante al menos 4 semanas a 37 °C o menos luego de la preparación. En este sentido, la solubilidad se puede determinar según se explica en el ejemplo 7 de este documento.

Otro aspecto se refiere al suministro de derivados de la insulina que sean solubles en un medio acuoso que contenga zinc, por ejemplo al menos 5 iones de zinc por hexámero de insulina, cuando se mide en las 24-48 horas siguientes a la preparación. En este sentido, la solubilidad se puede determinar según se explica en el ejemplo 7 de este documento.

Otro aspecto se refiere al suministro de derivados de la insulina que tengan una buena estabilidad frente a enzimas, por ejemplo enzimas proteolíticas, por ejemplo enzimas proteolíticas presentes en el estómago humano, como pepsina, quimiotripsina y carboxipeptidasa A. En este sentido, la estabilidad frente a las enzimas se puede determinar según se explica en el ejemplo 1 de WO 2008/034881.

Otro aspecto se refiere al suministro de derivados de la insulina que tengan buena estabilidad, especialmente estabilidad química y estabilidad física, durante el almacenamiento, por ejemplo, el almacenamiento a 5 °C y a 30 °C durante, por ejemplo, 2 años y 2 semanas, respectivamente. En este sentido, la estabilidad química se puede determinar según se explica en los ejemplos 9 y 10 de este documento y la estabilidad física se puede determinar según se explica en los ejemplos 9 y 10 de este documento.

Otro aspecto se refiere al suministro de derivados de la insulina que puedan ser administrados oralmente de manera eficaz a pacientes diabéticos, por ejemplo, una vez al día. Asimismo, o alternativamente, esta divulgación se refiere al suministro de derivados de la insulina que tengan una elevada biodisponibilidad oral.

Otro aspecto se refiere al suministro de derivados de la insulina que tengan menores fluctuaciones diarias, por ejemplo las variaciones entre las concentraciones plasmáticas ($C_{m\acute{a}x}$ y $C_{m\acute{i}n}$) luego de, por ejemplo, la administración subcutánea una vez a la semana.

Otro aspecto se refiere al suministro de derivados de la insulina que tengan una menor influencia en la variación diaria de la biodisponibilidad luego de la administración oral.

Otro aspecto se refiere al suministro de derivados de la insulina que tengan elevada potencia, es decir, que provoquen una gran respuesta a baja concentración del fármaco (actividad del fármaco expresada en términos de la cantidad requerida para producir un efecto de determinada intensidad).

Otro aspecto se refiere al suministro de derivados de la insulina que se unan muy bien al receptor de la insulina. En este sentido, la afinidad por el receptor de la insulina se puede determinar según se explica en el ejemplo 2 de este documento.

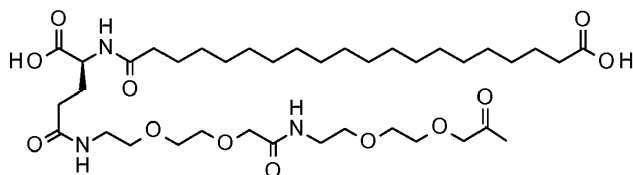
Otro aspecto se refiere al suministro de derivados de la insulina que tengan una baja afinidad por el receptor de la insulina. En este sentido, la afinidad por el receptor de la insulina se puede determinar según se explica en el ejemplo 2 de este documento.

Definiciones

El término "diabetes" o "diabetes mellitus" incluye la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2, la diabetes gestacional (durante el embarazo) y otros estados que causan hiperglucemia. El término se usa para un trastorno metabólico en el que el páncreas produce cantidades insuficientes de insulina, o en el que las células del organismo no pueden responder adecuadamente a la insulina impidiendo que las células absorban la glucosa. Como resultado, la glucosa se acumula en la sangre.

La diabetes tipo 1, también denominada diabetes mellitus dependiente de la insulina (DMDI) y diabetes de inicio juvenil, es causada por la destrucción de las células B, que generalmente provoca una deficiencia absoluta de insulina. La diabetes tipo 2, también conocida como diabetes mellitus no dependiente de insulina (DMNDI) y diabetes del adulto, se asocia a resistencia predominante a la insulina y por lo tanto una deficiencia de insulina relativa y/o a un defecto predominantemente secretor de la insulina con resistencia a la insulina.

En este documento, la denominación de las insulinas se realiza según los principios siguientes: los nombres se dan como mutaciones y modificaciones (acilaciones) en relación con la insulina humana. Para nombrar la porción acilo, la denominación se hace según la nomenclatura IUPAC y en otros casos según la nomenclatura de los péptidos. Por ejemplo, el nombre de la porción acilo:

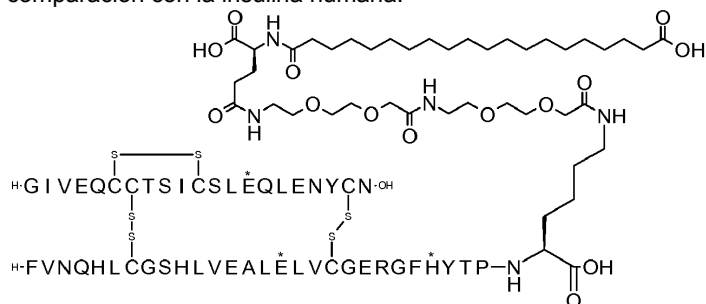


puede ser por ejemplo "eicosanodiol- γ Glu-OEG-OEG", "eicosanodiol- γ Glu-2xOEG" o "eicosanodiol-gGlu-2xOEG" o "19-carboxinadecanoil- γ Glu-OEG-OEG", donde OEG es la notación abreviada para el aminoácido $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, ácido [2-(2-aminoetoxi)etoxi]acético y γ Glu (y gGlu) es la notación abreviada para el aminoácido gamma glutámico en la configuración L. Alternativamente, la porción acilo se puede nombrar según la nomenclatura IUPAC (OpenEye, IUPAC style). Según esta nomenclatura, a la porción acilo anterior de la invención se le asigna el nombre siguiente: [2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]-etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetilo].

Por ejemplo, la insulina del ejemplo 1 (con la secuencia/estructura indicada continuación) se denomina "A14E, B16E, B25H, B29K(N^EEicosanodiol-gGlu-2xOEG), desB30 insulina humana" para indicar que el aminoácido en la posición A14, Y en la insulina humana, ha sido mutado a E, el aminoácido en la posición B16, Y en la insulina humana, ha

sido mutado a E, el aminoácido en la posición B25, F en la insulina humana, ha sido mutado a H, el aminoácido en la posición B29, K como en la insulina humana, ha sido modificado por acilación en el nitrógeno épsilon del residuo de lisina de B29, indicado N^ε, por el residuo eicosanodioil-gGlu-2xOEG, y el aminoácido en la posición B30, T en la insulina humana, ha sido eliminado.

5 Los asteriscos en la fórmula siguiente indican que el residuo en cuestión es diferente (es decir, ha sido mutado) en comparación con la insulina humana.



10 Alternativamente, las insulinas de la invención se pueden nombrar según la nomenclatura IUPAC (OpenEye, IUPAC style). Según esta nomenclatura, a la insulina del ejemplo 1 (es decir el compuesto 1) se le asigna el nombre siguiente: N{Épsilon-B29}-[2-[2-[2-[2-[2-[[4S]-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[GluA14,GluB16,HisB25],des-ThrB30-insulina (humana).

15 Resumen de la invención

Esta invención se refiere a un derivado de un análogo de la insulina, a saber A14E, B16E, B25H, B29K(N(éps)eicosanodioil-gGlu-2xOEG), desB30 insulina humana (Compuesto1).

20 Descripción detallada de esta invención

Se encontró, sorprendentemente, que la A14E, B16E, B25H, B29K(N(éps)eicosanodioil-gGlu-2xOEG), desB30 insulina humana cumple en suficiente medida los objetivos anteriores. Por ejemplo, un tratamiento subcutáneo con el compuesto 1 una vez a la semana o más espaciadamente será un tratamiento satisfactorio de la necesidad de tratamiento con insulina basal del paciente diabético. Además, el compuesto 1 tiene una alta solubilidad en un medio acuoso que contiene opcionalmente zinc. En un aspecto, el compuesto 1 tiene una solubilidad que es superior a la solubilidad de la insulina humana.

En un aspecto, el compuesto 1 es soluble en un medio acuoso que contiene zinc como al menos 5 iones zinc por hexámero de insulina, al menos 6 iones zinc por hexámero de insulina, al menos 7 iones zinc por hexámero de insulina, al menos 8 iones zinc por hexámero de insulina o al menos 9 iones zinc por hexámero de insulina, donde la solubilidad se mide después del almacenamiento durante al menos 4 semanas a 37 °C o menos luego de la preparación.

En un aspecto de la invención, el compuesto 1 es soluble en un medio acuoso que contiene zinc como al menos 5 iones zinc por hexámero de insulina, al menos 6 iones zinc por hexámero de insulina, al menos 7 iones zinc por hexámero de insulina, al menos 8 iones zinc por hexámero de insulina, al menos 9 iones zinc por hexámero de insulina, al menos 10 iones zinc por hexámero de insulina, al menos 11 iones zinc por hexámero de insulina o al menos 12 iones zinc por hexámero de insulina, donde la solubilidad se mide en las 24-48 horas siguientes a la preparación.

En un aspecto, la solubilidad se determina como se explica en el ejemplo 7 de este documento.

Las composiciones farmacéuticas que contienen el compuesto 1 se pueden preparar de manera conocida, por ejemplo, utilizando los excipientes habitualmente empleados en composiciones de insulina similares.

Las composiciones farmacéuticas inyectables que contienen el compuesto 1 se pueden preparar usando las técnicas convencionales de la industria farmacéutica que implican disolver y mezclar los ingredientes según sea apropiado para dar el producto final deseado. Por lo tanto, según un procedimiento, el compuesto 1 se disuelve en una cantidad de agua algo menor que el volumen final de la composición farmacéutica que se va preparar. Se agregan un agente isotónico, un conservante y un tampón, según sea necesario, y el valor del pH de la solución se ajusta, si fuera necesario, utilizando un ácido, por ejemplo, ácido clorhídrico, o una base, por ejemplo, hidróxido de sodio acuoso, según sea necesario. Finalmente, el volumen de la solución se ajusta con agua para dar la concentración deseada de los ingredientes.

55

Más precisamente, una preparación de insulina de esta invención, por ejemplo una solución, se puede preparar disolviendo el compuesto 1 en un medio acuoso en condiciones ligeramente ácidas. El medio acuoso se vuelve isotónico por ejemplo mediante adición de un agente regulador de la tonicidad. Además, el medio acuoso puede contener, por ejemplo tampones, conservantes e iones zinc. El valor de pH de la solución se ajusta hacia la neutralidad sin llegar demasiado cerca del punto isoeléctrico del compuesto de esta invención para evitar la posible precipitación. El valor de pH de la preparación de insulina final depende de la concentración de iones zinc y de la concentración del compuesto de esta invención. La preparación de insulina se esteriliza, por ejemplo, mediante esterilización por filtración.

5

Una composición farmacéutica puede contener uno o más excipientes.

10

El término "excipiente" se refiere ampliamente a cualquier componente diferente del principio o los principios activos. El excipiente puede ser una sustancia inerte, una sustancia inactiva y/o una sustancia que no sea medicinalmente activa.

15

El excipiente puede servir para diferentes propósitos, dependiendo de la composición farmacéutica, por ejemplo como un portador, vehículo, diluyente, auxiliar de compresión, y/o para mejorar la administración y/o la absorción del principio activo. Los ejemplos de excipientes incluyen, pero no exclusivamente, diluyentes, tampones, conservantes, reguladores de la tonicidad (también conocidos como agentes de tonicidad o agentes isotónicos), quelantes, surfactantes, inhibidores de proteasas, humectantes, emulsionantes, antioxidantes, incrementadores del volumen, iones metálicos, vehículos oleosos, proteínas y/o un zwitterion y estabilizantes.

20

La composición farmacéutica de principios activos con diversos excipientes es conocida en el área, véase por ej. Remington: The Science and Practice of Pharmacy (por ej. 19ª edición (1995), y ediciones posteriores).

25

Las composiciones de insulina se administran a los pacientes de manera conocida, por ejemplo según el conocimiento general del paciente combinado con el conocimiento general del médico. Esta invención se usa mejor a conveniencia del paciente. Por lo tanto, los intervalos de administración específicos se estudiarán para cada paciente donde las dosis se administran menos de una vez al día. El modo final de uso depende por lo tanto de las capacidades del producto y de la disposición y la preferencia del paciente. Esto se debe a que el efecto de cualquier producto de insulina depende de la necesidad de insulina de cada paciente y de la sensibilidad a las acciones farmacodinámicas de dicha insulina y por último también a las preferencias del paciente en una determinada situación. Estas condiciones pueden cambiar con el tiempo, tanto en términos de períodos más largos (años) como de un día para otro. El nivel de dosificación óptimo para cualquier paciente dependerá de diversos factores que incluyen la edad, el peso corporal, la actividad física y la dieta del paciente, de una posible combinación con otros fármacos y de la gravedad de la afección a tratar. Se recomienda que el régimen de dosificación sea determinado por los técnicos con experiencia para cada paciente en particular, de manera similar que para las composiciones de insulina conocidas, teniendo en cuenta sin embargo las enseñanzas de la presente con respecto a los intervalos de dosificación.

30

35

40

Para comodidad de los pacientes, se presume que prefieren que el intervalo de tiempo (tiempo de retraso) desde la administración del compuesto 1 hasta la siguiente administración del compuesto 1 tenga la misma extensión, o aproximadamente la misma extensión, en cantidad de días. Incluso se puede esperar que los pacientes prefieran que la administración del compuesto 1 tenga lugar una vez por semana, es decir, en el mismo día de la semana, por ejemplo, todos los domingos. Esto consistirá en la administración del compuesto 1 cada 7 días, y no con mayor frecuencia, en un promedio calculado para un período de tiempo de 1 mes, 6 meses o 1 año. Para algunos pacientes, puede ser deseable la administración del compuesto 1 cada 6 días o aproximadamente cada 6 días, y no con mayor frecuencia, en un promedio calculado para un período de 1 mes, 6 meses o 1 año. Para otros pacientes, puede ser deseable la administración del compuesto 1 cada 5 días o aproximadamente cada 5 días, y no con mayor frecuencia, en un promedio calculado para un período de 1 mes, 6 meses o 1 año. Para otros pacientes, puede ser deseable la administración del compuesto 1 cada 4 días o aproximadamente cada 4 días, y no con mayor frecuencia, en un promedio calculado para un período de 1 mes, 6 meses o 1 año. Incluso otros pacientes pueden encontrar ventajoso la administración del compuesto 1 dos veces por semana, por ejemplo, con un intervalo de unos 3-4 días entre cada administración en un promedio calculado para un período de 1 mes, 6 meses o 1 año. Para algunos pacientes, puede ser deseable la administración del compuesto 1 cada 3 días o aproximadamente cada 3 días, y no con mayor frecuencia, en un promedio calculado para un período de 1 mes, 6 meses o 1 año. Para otros pacientes, puede ser deseable la administración del compuesto 1 cada 2 días o aproximadamente cada 2 días, y no con mayor frecuencia, en un promedio calculado para un período de 1 mes, 6 meses o 1 año. Para algunos pacientes, puede ser deseable la administración del compuesto 1 cada 8 días o aproximadamente cada 8 días, y no con mayor frecuencia, en un promedio calculado para un período de 1 mes, 6 meses o 1 año. Incluso otros pacientes pueden no recibir el compuesto 1 con un intervalo de tiempo de exactamente la misma extensión (contada en días), semana tras semana, mes tras mes o año tras año. Algunos pacientes pueden recibir el compuesto 1 en algún momento en el intervalo de tiempo de cada 6 a cada 8 días en un promedio calculado para un período de 1 mes, 6 meses o 1 año, y no con mayor frecuencia. Otros pacientes pueden recibir el compuesto 1 en algún momento en el intervalo de tiempo de cada 5 a cada 7 días en un promedio calculado para un período de 1 mes, 6 meses o 1 año, y no con mayor frecuencia. Incluso otros pacientes pueden recibir el compuesto 1 en algún momento en el

65

5 intervalo de tiempo de cada 4 a cada 8 días en un promedio calculado para un período de 1 mes, 6 meses o 1 año, y no con mayor frecuencia. Los intervalos de tiempo mencionados aquí deben ser entendidos como intervalos de tiempo promedio dentro de un período de por ejemplo semanas, meses o años. En este documento, se pretende que el término "día" abarque 24 horas (es decir, un día y una noche) y, en aras de la facilidad, un número de horas que no sea divisible entre 24 se debe redondear a un número entero de días. Así, por ejemplo 30 horas corresponden a 1 día y 40 horas corresponden a 2 días. Las administraciones mencionadas anteriormente son por vía parenteral.

10 Los pacientes pueden tener un requerimiento diario de insulina basal mayor de aproximadamente 0.2 UI/kg de peso corporal/día e inferior a aproximadamente 1 UI/kg de peso corporal/día y, además, los pacientes pueden tener un requerimiento total de insulina diaria (es decir, basal más prandial) superior a aproximadamente 1 UI/kg de peso corporal/día. Sin embargo, estos rangos pueden variar considerablemente de paciente a paciente y varios pacientes pueden estar algo fuera de los rangos mencionados aquí.

15 Las enfermedades y afecciones que son los objetivos principales de esta invención son la diabetes mellitus (tipo 1 o 2) u otras afecciones caracterizadas por hiperglucemia, pero también enfermedades metabólicas y afecciones en general en las que los efectos metabólicos de la insulina tienen importancia clínica o son de interés, como prediabetes, intolerancia a la glucosa, síndrome metabólico, obesidad, caquexia, pérdida/muerte de células beta *in vivo*, exceso de apetito e inflamación. Se sabe o se cree que todos esos tipos de afecciones se benefician de un estado metabólico estable en el sujeto que tiene la enfermedad o la afección. En cualquier caso, cualquier régimen terapéutico que incluya la administración de insulina puede ser modificado mediante la aplicación de las enseñanzas actuales, lo que significa que tales tratamientos incluirán la administración de insulinas de perfil de acción prolongada según las enseñanzas provistas en este documento.

25 El compuesto 1 se puede administrar por vía parenteral a pacientes que necesiten un tratamiento de ese tipo. La administración parenteral se puede realizar por inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa en forma de lapicera. Alternativamente, la administración parenteral se puede realizar por medio de una bomba de infusión. Otras opciones son administrar la composición de insulina por vía oral, nasal o pulmonar, por ejemplo en composiciones farmacéuticas, polvos o líquidos, diseñadas específicamente para el propósito en cuestión.

30 Alternativamente, el compuesto 1 se puede administrar por vía oral a pacientes que necesiten un tratamiento de ese tipo. La administración oral se puede realizar administrando por vía oral composiciones farmacéuticas sólidas, semisólidas o líquidas.

35 Características preferidas de esta invención

En resumen y para complementar las afirmaciones anteriores, las características y cláusulas de esta divulgación son las siguientes:

- 40 1. A14E, B16E, B25H, B29K(N(éps)eicosanodioil-gGlu-2xOEG), desB30 insulina humana (Compuesto1).
 2. Una composición farmacéutica que contiene el compuesto 1.
 3. El compuesto 1 para utilizar como un medicamento.
 4. El compuesto 1 para utilizar en la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento o la
 45 prevención de la diabetes.
 5. El compuesto 1 para utilizar en la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento o la
 prevención de la diabetes tipo 1 y/o tipo 2.
 6. El compuesto 1 para utilizar en el tratamiento de la diabetes, donde el compuesto se administra al mismo
 paciente cada 2 días o con menor frecuencia y, en promedio, durante un período de al menos 1 mes, 6 meses
 o 1 año, y donde dicho compuesto no se administra con mayor frecuencia al mismo paciente.
 50 7. El compuesto 1 para utilizar en el tratamiento de la diabetes, donde el compuesto se administra cada 3 días
 o con menor frecuencia y, en promedio, durante un período de al menos 1 mes, 6 meses o 1 año, y donde
 dicho compuesto no se administra con mayor frecuencia al mismo paciente.
 8. El compuesto 1 para utilizar en el tratamiento de la diabetes, donde el compuesto se administra dos veces
 por semana o con menor frecuencia y, en promedio, durante un período de al menos 1 mes, 6 meses o 1 año,
 55 y donde dicho compuesto no se administra con mayor frecuencia al mismo paciente.
 9. El compuesto 1 para utilizar en el tratamiento de la diabetes, donde el compuesto se administra cada 4 días
 o con menor frecuencia y, en promedio, durante un período de al menos 1 mes, 6 meses o 1 año, y donde
 dicho compuesto no se administra con mayor frecuencia al mismo paciente.
 60 10. El compuesto 1 para utilizar en el tratamiento de la diabetes, donde el compuesto se administra cada 5 días
 o con menor frecuencia y, en promedio, durante un período de al menos 1 mes, 6 meses o 1 año, y donde
 dicho compuesto no se administra con mayor frecuencia al mismo paciente.
 11. El compuesto 1 para utilizar en el tratamiento de la diabetes, donde el compuesto se administra cada 6 días
 o con menor frecuencia y, en promedio durante un período de al menos 1 mes, 6 meses o 1 año, y donde dicho
 compuesto no se administra con mayor frecuencia al mismo paciente.

12. El compuesto 1 para utilizar en el tratamiento de la diabetes, donde el compuesto se administra una vez por semana o con menor frecuencia y, en promedio, durante un período de al menos 1 mes, 6 meses o 1 año, y donde dicho compuesto no se administra con mayor frecuencia al mismo paciente.
- 5 13. El compuesto 1 para utilizar en el tratamiento de la diabetes, donde el compuesto se administra cada 8 días o con mayor frecuencia.
14. El compuesto 1 para utilizar en el tratamiento de la diabetes, donde el compuesto se administra cada 9 días o con mayor frecuencia.
15. El compuesto 1 para utilizar en el tratamiento de la diabetes, donde el compuesto se administra cada 10 días o con mayor frecuencia.
- 10 16. El compuesto 1 para utilizar en el tratamiento de la diabetes, donde el compuesto se administra cada 11 días o con mayor frecuencia.
17. El compuesto 1 para utilizar en el tratamiento de la diabetes, donde el compuesto se administra cada 12 días o con mayor frecuencia.
- 15 18. El compuesto 1 para utilizar en el tratamiento de la diabetes, donde el compuesto se administra cada 14 días o con mayor frecuencia.
19. El compuesto 1 para utilizar en el tratamiento de la diabetes, donde el compuesto se administra cada 21 días o con mayor frecuencia.
20. El compuesto 1 según cualquiera de las cláusulas 6-19, donde el tratamiento en curso o repetido dura más de 1 mes.
- 20 21. El compuesto 1 según cualquiera de las cláusulas 6-19, donde el tratamiento en curso o repetido dura más de 2 meses.
22. El compuesto 1 según cualquiera de las cláusulas 6-19, donde el tratamiento en curso o repetido dura más de 3 meses.
- 25 23. El compuesto 1 según cualquiera de las cláusulas 6-19, donde el tratamiento actual o repetido dura más de 1 año (un año).
24. El compuesto 1 según cualquiera de las cláusulas 2-23, donde el compuesto se administra por vía parenteral, preferentemente por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa.
25. El compuesto 1 según cualquiera de las cláusulas 2-23, donde el compuesto se administra por vía oral.
- 30 26. Una solución acuosa que contiene el compuesto 1.
27. Una solución acuosa que contiene el compuesto 1 y al menos 5 iones zinc por hexámero de insulina.
28. Una solución acuosa que contiene el compuesto 1 y al menos 6 iones zinc por hexámero de insulina.
29. Una solución acuosa que contiene el compuesto 1 y al menos 7 iones zinc por hexámero de insulina.
30. Una solución acuosa que contiene el compuesto 1 y al menos 8 iones zinc por hexámero de insulina.
- 35 31. Una solución acuosa que contiene el compuesto 1 y al menos 9 iones zinc por hexámero de insulina.
32. Una solución acuosa que contiene el compuesto 1 y al menos 10 iones zinc por hexámero de insulina.
33. Una solución acuosa que contiene el compuesto 1 y al menos 11 iones zinc por hexámero de insulina.
34. Una solución acuosa que contiene el compuesto 1 y al menos 12 iones zinc por hexámero de insulina.
35. La solución acuosa según cualquiera de las cláusulas 47-55, en la que el pH está en el intervalo de 7 a 8.
- 40 36. La solución acuosa según cualquiera de las cláusulas 47-55, en la que el pH es de aproximadamente 7.4
37. Una composición farmacéutica que contiene el compuesto 1 y un excipiente más.
38. Una composición farmacéutica que contiene el compuesto 1, y un excipiente más elegido del grupo que consiste en diluyentes, tampones, conservantes, reguladores de la tonicidad, quelantes, surfactantes, inhibidores de proteasas, humectantes, emulsionantes, antioxidantes, incrementadores del volumen, iones metálicos, vehículos oleosos, proteínas y/o un zwitterion y estabilizantes.
- 45 39. La composición farmacéutica según la cláusula 59, que contiene al menos 4.5 iones zinc por hexámero de insulina.
40. La composición farmacéutica según la cláusula 59, que contiene al menos 5 iones zinc por hexámero de insulina.
- 50 41. La composición farmacéutica según la cláusula 59, que contiene al menos 6 iones zinc por hexámero de insulina.
42. La composición farmacéutica según la cláusula 59, que contiene al menos 7 iones zinc por hexámero de insulina.
43. La composición farmacéutica según la cláusula 59, que contiene al menos 8 iones zinc por hexámero de insulina.
- 55 44. La composición farmacéutica según la cláusula 59, que contiene al menos 9 iones zinc por hexámero de insulina.
45. La composición farmacéutica según la cláusula 59, que contiene al menos 10 iones zinc por hexámero de insulina.
- 60 46. La composición farmacéutica según la cláusula 59, que contiene al menos 11 iones zinc por hexámero de insulina.
47. La composición farmacéutica según la cláusula 59, que contiene al menos 12 iones zinc por hexámero de insulina.
48. La composición farmacéutica según cualquiera de las cláusulas 59-68, en la que el pH está en el intervalo de 7 a 8.
- 65 49. La composición farmacéutica según cualquiera de las cláusulas 59-68, en la que el pH es de aproximadamente 7.4.

50. La composición farmacéutica según cualquiera de las cláusulas 59-68, que está en forma de una solución acuosa.

51. La composición farmacéutica según cualquiera de las cláusulas 59-68, que está en forma de un comprimido.

52. La composición farmacéutica según cualquiera de las cláusulas 59-68, que está en forma de una preparación sólida, semisólida o líquida, contenida en una cápsula como una cápsula blanda o dura.

53. Cualquier nuevo producto, equipo, método o uso definido por una característica y/o una reivindicación y/o una combinación de características y/o reivindicaciones descritas en este documento.

10 Ejemplos

La invención se ilustra en más detalle con referencia a los ejemplos siguientes, que no pretenden en modo alguno limitar el alcance de la invención según se reivindica.

15 En este documento se utilizan las abreviaturas siguientes:

βAla es beta-alanil;	Fmoc es 9-fluorenilmetiloxi-carbonil;
Aoc es ácido 8-aminooctanoico;	
tBu es <i>tert</i> -butil;	γGlu (gGlu) es gamma L-glutamil;
DCM es diclorometano;	DγGlu (DgGlu) es gamma D-glutamil;
DIC es diisopropilcarbodiimida;	
DIPEA = DIEA es <i>N,N</i> -diisopropiletilamina;	HCl es ácido clorhídrico;
	HOAc es ácido acético;
DMF es <i>N,N</i> -dimetilformamida;	HOBt es 1-hidroxibenzotriazol;
DMSO es dimetilsulfóxido;	NMP es <i>N</i> -metilpirrolidona;
EtOAc es acetato de etilo;	MeCN es acetonitrilo;
OEG es [2-(2-aminoetoxi)etoxi]etilcarbonil;	TFA es ácido trifluoroacético;
	THF es tetrahidrofurano;
Su es succinimidil-1-il = 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il;	TNBS es ácido 2,4,6-trinitrobencen-sulfónico;
OSu es succinimidil-1-iloxi = 2,5-dioxo-pirrolidin-1-iloxi;	TRIS es tris(hidroximetil)-aminometano; y
RPC es cromatografía de fase reversa;	TSTU es tetrafluoroborato de <i>O</i> -(<i>N</i> -succinimidil)-1,1,3,3-tetrametiluronio.
RT es temperatura ambiente;	

Los ejemplos y procedimientos generales siguientes se refieren a compuestos intermedios y productos finales identificados en la memoria y en los esquemas de síntesis. La preparación del compuesto de la presente invención se describe en detalle utilizando los ejemplos siguientes, pero las reacciones químicas descritas se dan a conocer en términos de su aplicabilidad general a la preparación del compuesto de la invención. Ocasionalmente, la reacción puede no ser aplicable según se describe para cada compuesto incluido en el alcance divulgado de la invención. Los compuestos para los cuales ocurre esto, serán fácilmente reconocidos por los técnicos con experiencia. En esos casos, las reacciones se pueden llevar a cabo exitosamente mediante modificaciones convencionales conocidas por los técnicos con experiencia, es decir, mediante protección adecuada de los grupos que interfieren, cambiando a otros reactivos convencionales o por modificación rutinaria de las condiciones de reacción. Alternativamente, otras reacciones dadas a conocer en este documento o de lo contrario convencionales, serán aplicables a la preparación de los compuestos correspondientes de la invención. En todos los métodos de preparación, todos los materiales de partida son conocidos o se pueden preparar fácilmente a partir de materiales de partida conocidos. Todas las temperaturas se indican en grados Celsius y a menos que se indique lo contrario, todas las partes y porcentajes son en peso cuando se refieren a cantidades y todas las partes son en volumen cuando se refieren a solventes y eluyentes.

La construcción de vectores, la expresión en levaduras, el procesamiento y la purificación de los análogos de la insulina se pueden realizar empleando técnicas estándar fácilmente reconocidas por los técnicos con experiencia. Un ejemplo no limitante de preparación de análogos de la insulina fue descrito previamente (Glendorf T, Sørensen AR, Nishimura E, Petterson I, & Kjeldsen T: Importance of the Solvent-Exposed Residues of the Insulin B Chain α -Helix for Receptor Binding; *Biochemistry* 2008 47 4743-4751). Brevemente, las mutaciones se introducen en los vectores de codificación de la insulina mediante PCR de extensión por solapamiento. Los análogos de la insulina se

expresan como proteínas de fusión semejantes a la proinsulina, con un mini C-péptido Ala-Ala-Lys en una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* MT663. Los precursores monocatenarios se convierten enzimáticamente en análogos desB30 de dos cadenas usando endoproteasa A. *lyticus*. La conversión total en el análogo de dos cadenas desB30 se verifica por MALDI-TOF MS, y su pureza se mide por RP-HPLC tanto a pH ácido como neutro.

El compuesto de la invención se puede purificar empleando uno o más de los procedimientos siguientes que son típicos en el área. Estos procedimientos se pueden modificar, si fuera necesario, en lo que respecta a gradientes, pH, sales, concentraciones, flujo, columnas, etc. Dependiendo de factores como el perfil de impurezas, la solubilidad del derivado de la insulina en cuestión, etcétera, estas modificaciones pueden ser reconocidas y realizadas fácilmente por un técnico con experiencia.

Después de la HPLC ácida o la desalinización, los compuestos se aíslan por liofilización de las fracciones puras. Después de la HPLC neutra o la cromatografía de intercambio aniónico, los compuestos se desalinizan, se precipitan al pH isoelectrico o se purifican por HPLC ácida.

Procedimientos de purificación típicos

El sistema de HPLC es un sistema Gilson que consta de lo siguiente: manipulador de líquidos modelo 215, bomba modelo 322-H2 y detector UV modelo 155. La detección se realiza generalmente a 210 nm y 280 nm. El sistema de FPLC Äkta Purifier (Amersham Biosciences) consta de lo siguiente: bomba modelo P-900, detector UV modelo UV-900, detector de pH y conductividad modelo pH/C-900 y colector de fracciones modelo Frac-950. La detección UV se realiza generalmente a 214 nm, 254 nm y 276 nm. El sistema de FPLC Äkta Explorer Air (Amersham BioGE Health Care) consta de lo siguiente: bomba modelo P-900, detector UV modelo UV-900, detector de pH y conductividad modelo pH/C-900 y colector de fracciones modelo Frac-950. La detección UV se realiza generalmente a 214 nm, 254 nm y 276 nm.

HPLC ácida

Columna:	Phenomenex, Gemini, 5 µ, C18, 110 Å, 250 x 30 cm
Flujo:	20 mL/min
Eluyente:	A: 0.1% de TFA en agua B: 0.1% de TFA en CH ₃ CN
Gradiente:	0-7.5 min: 10% de B 7.5-87.5 min: 10% de B a 60% de B 87.5-92.5 min: 60% de B 92.5-97.5 min: 60% de B a 100% de B

HPLC neutra

Columna:	Phenomenex, Gemini, C18, 5 µm 250 x 30.00 mm, 110 Å
Flujo:	20 mL/min
Eluyente:	A: 20% de CH ₃ CN en TRIS acuoso 10 mM + (NH ₄)SO ₄ 15 mM, pH = 7.3 B: 80% de CH ₃ CN, 20% de agua
Gradiente:	0-7.5 min: 0% de B 7.5-52.5 min: 0% de B a 60% de B 52.5-57.5 min: 60% de B 57.5-58 min: 60% de B a 100% de B 58-60 min: 100% de B 60-63 min: 10% de B

Cromatografía de intercambio aniónico

Columna:	150 mL (2.6 x 28 cm) Poros 50HQ
Flujo:	25 mL/min
Eluyente:	Tampón A: TRIS 15 mM, acetato de amonio 50 mM en etanol al 50%, pH 7.5 (1.6 mS/cm) Tampón B: TRIS 15 mM, acetato de amonio 50 mM en etanol al 50%, pH 7.5 (1.6 mS/cm)

Gradiente:	0-80% B en 20 VC
------------	------------------

Síntesis en fase sólida

Ácido 19-((S)-1-carboxi-3-{2-[2-({2-[2-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxicarbonil metoxi)etoxi]etilcarbamoil)}metoxi)etoxi]etilcarbamoil}propilcarbamoil)nonadecanoico; (nombre alternativo: Eicosanodioil-gGlu-OEG-OEG-OSu)

El ácido 19-((S)-1-carboxi-3-{2-[2-({2-[2-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxicarbonil metoxi)etoxi]etilcarbamoil)}metoxi)etoxi]etilcarbamoil}propilcarbamoil)nonadecanoico se puede sintetizar sobre soporte sólido empleando procedimientos conocidos por los técnicos con experiencia en la síntesis de péptidos en fase sólida. Este procedimiento comprende la unión de un aminoácido protegido con Fmoc a una resina de 2-clorotritilcloruro de poliestireno. La unión se puede llevar a cabo, por ej., utilizando el aminoácido N-protegido libre en presencia de una amina terciaria, como trietilamina o *N,N*-diisopropiletilamina (véanse las referencias más adelante). El extremo C-terminal (el que está unido a la resina) de este aminoácido está en el extremo de la secuencia de síntesis que se está acoplando a las insulinas originales. Luego de la unión del aminoácido-Fmoc a la resina, el grupo Fmoc se elimina empleando, por ej., aminas secundarias, como piperidina o dietilamina, seguido del acoplamiento de otro (o el mismo) aminoácido protegido con Fmoc y la desprotección. La secuencia de síntesis se termina acoplando un diácido (α , ω) graso protegido con mono-*tert*-butilo, a saber éster mono-*tert*-butílico del ácido eicosanodioico. La escisión de los compuestos de la resina se lleva a cabo usando ácido diluido como 0.5-5% de TFA/DCM (ácido trifluoroacético en diclorometano), ácido acético (por ej. 10% en DCM, o HOAc/trifluoroetanol/DCM 1:1:8), o hexafluoroisopropanol en DCM (véase por ej. "Organic Synthesis on Solid Phase", F.Z. Dörwald, Wiley-VCH, 2000. ISBN 3-527-29950-5, "Peptides: Chemistry and Biology", N. Sewald & H.-D. Jakubke, Wiley-VCH, 2002, ISBN 3-527-30405-3; y "The Combinatorial Chemistry Catalog" 1999, Novabiochem AG; y la bibliografía citada en ese documento). Esto asegura que el éster *tert*-butílico presente en el compuesto como grupo protector del ácido carboxílico no sea eliminado. Finalmente, se activa el grupo carboxi C-terminal (liberado de la resina) por ejemplo como el éster *N*-hidroxisuccinimida (OSu) y se usa directamente o luego de la purificación como reactivo de acoplamiento, o después de la desprotección en la unión a A14E, B16E, B25H, desB30 insulina humana.

Alternativamente, los reactivos de acilación ácido 19-((S)-1-carboxi-3-{2-[2-({2-[2-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-il oxicarbonil metoxi)etoxi]etilcarbamoil)}metoxi)etoxi]etilcarbamoil}-propilcarbamoil)nonadecanoico se pueden preparar mediante síntesis en fase solución:

El diácido graso protegido con mono-*tert*-butilo, el éster mono-*tert*-butílico del ácido eicosanodioico, se activa por ejemplo como OSu-éster como se describe más adelante o como cualquier otro éster activado conocido por los técnicos con experiencia, como HOBt- o HOAt-éster. Este éster activo se acopla con éster α -*tert*-butílico del ácido glutámico en un solvente adecuado como THF, DMF, NMP (o una mezcla de solventes) en presencia de una base adecuada como DIPEA o trietilamina. El producto intermedio se aísla por ejemplo mediante procedimientos extractivos o mediante procedimientos cromatográficos. El producto intermedio resultante se somete nuevamente a activación (como se describió antes) y al acoplamiento con OEG-OEG (ácido [2-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetilamino)-etoxi]-acético) como se describió antes, seguido de la activación con TSTU para obtener el reactivo de acilación ácido 19-((S)-1-carboxi-3-{2-[2-({2-[2-(2,5-dioxopirrolidin-1-il oxicarbonil-metoxi)etoxi]etilcarbamoil)}metoxi)etoxi]etilcarbamoil}propilcarbamoil)-nonadecanoico.

Al reactivo de acilación preparado por los métodos descritos antes se le puede eliminar el grupo protector *tert*-butilo luego de la activación como OSu éster. Esto se puede realizar mediante tratamiento con TFA del reactivo de acilación protegido con *tert*-butilo activado con OSu. Después de la acilación de A14E, B16E, B25H, desB30 insulina humana, se obtiene la resultante A14E, B16E, B25H, desB30 insulina humana acilada desprotegida por ejemplo como se describe en el Ejemplo 1.

Si el reactivo preparado por cualquiera de los métodos anteriores no es desprotegido del *tert*-butilo luego de la activación como OSu éster, la acilación de A14E, B16E, B25H, desB30 insulina humana produce la correspondiente A14E, B16E, B25H, desB30 insulina humana acilada protegida con *tert*-butilo. Para obtener A14E, B16E, B25H, desB30 insulina humana acilada desprotegida, la insulina protegida se debe desproteger. Esto se puede hacer mediante tratamiento con TFA para obtener A14E, B16E, B25H, desB30 insulina humana acilada desprotegida.

Alternativamente el reactivo de acilación se puede sintetizar en solución empleando protección con bencilo de los grupos ácido carboxílico como se ilustra más adelante.

Ácido 19-((S)-1-carboxi-3-{2-[2-({2-[2-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-il oxicarbonil metoxi)etoxi]etilcarbamoil)}metoxi)etoxi]etilcarbamoil}propilcarbamoil)nonadecanoico;

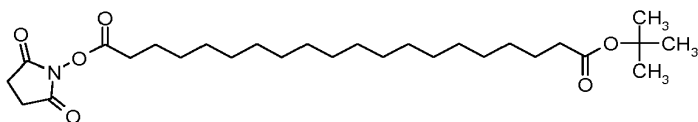
(Nombre alternativo: Eicosanodioil-gGlu-OEG-OEG-OSu)

Método LCMS (LCMS)

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

Eluyentes:	A: 0.1% de ácido trifluoroacético en agua
	B: 0.1% de ácido trifluoroacético en acetonitrilo
Columna:	Phenomenex, Jupiter C4 50 X 4.60 mm id: 5 µm
Gradiente:	10%-90% de B en 7.5 min a 1.0 mL/min
Columna:	Phenomenex, Jupiter 5 µ C4 300Å 50 x 4.60 mm
Método de LC:	10-90% de B 10 min: A: 0.1% de CH ₃ CN B: CH ₃ CN:
	0-7.5 min: 10-90% de B
	7.5-8.5 min: 90-10% de B
	8.5-9.5 min 10% de B
	Flujo: 1 mL/min
	9.5 - 10.00 min 10% de B
	Flujo: 0.1 mL/min

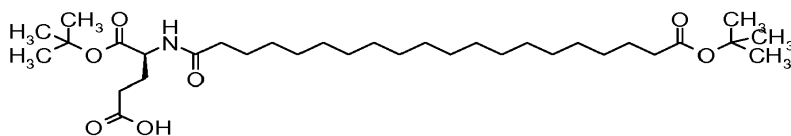
5 *N*-hidroxisuccinimida éster *tert*-butil éster del ácido eicosanodioico



10 Se mezclaron éster mono-*tert*-butílico del ácido eicosanodioico (5 g, 12.54 mmol) y TSTU (4.53 g, 15.05 mmol) en THF (50 mL), se agregó DIPEA (2.62 mL) y la mezcla turbia resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 h, después se le agregó DMF (30 mL) que dio lugar a una solución transparente que luego se agitó durante toda la noche. La mezcla resultante se evaporó casi hasta sequedad y el residuo se mezcló con acetonitrilo frío lo que resultó en la precipitación de un precipitado. Éste se filtró y se secó al vacío toda la noche, produciendo 6.01 g (97%) de *N*-hidroxisuccinimida éster *tert*-butil éster del ácido eicosanodioico.

15 MS (electronebulización): *m/z*: 440 (M-56 (tBu)).

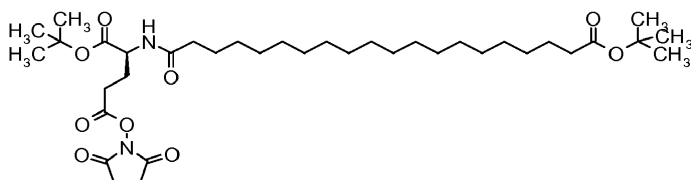
Éster 1-*tert*-butílico del ácido (S)-2-(19-*tert*-butoxicarbonilnonadecanoilamino)pentanodioico



25 Se disolvió 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster *tert*-butil éster del ácido eicosanodioico (6.01 g, 12.124 mmol) en THF (150 mL) y se mezcló con una suspensión de H-Glu-OtBu (2.71 g, 13.33 mmol) en DMF/agua (1/1, 40 mL). Esto resultó en una solución tipo gel que se calentó para dar una solución transparente que se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Después la solución se evaporó, se agregaron 100 mL de agua y la mezcla se calentó hasta 60 °C lo que resultó en una solución que cristalizó al enfriar. El precipitado se recrystalizó de acetonitrilo y los cristales se secaron al vacío. Rendimiento 6.82 g (96%).

30 MS (electronebulización): *m/z* 584 (M+1).

5-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) éster 1-*tert*-butil éster del ácido (S)-2-(19-*tert*-butoxicarbonilnonadecanoilamino)pentanodioico

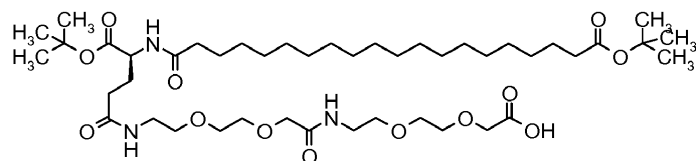


Se disolvió éster 1-*tert*-butílico del ácido (S)-2-(19-*tert*-butoxicarbonilnonadecanoilamino)pentanodioico (6.52 g, 11.17 mmol) en THF (100 mL), se le agregó DIPEA (2.14 mL) seguido de una solución de TSTU (3.70 g, 12.29 mmol) en acetonitrilo (25 mL). La mezcla se agitó toda la noche a temperatura ambiente, luego se evaporó, lo que resultó en un residuo amarronado que se recristalizó de acetonitrilo. Después de enfriar toda la noche a 5°C se formó un polvo. Éste se disolvió en THF, se secó con MgSO₄, se filtró y se evaporó hasta sequedad para obtener 6.17 g (81%) del compuesto del título.

MS (electronebulización): m/z 681 (M+1).

Éster *tert*-butílico del ácido 19-((S)-1-*tert*-butoxicarbonil-3-[2-(2-[[2-(2-carboxi metoxietoxi)etilcarbamoil]-metoxi]etoxi)etilcarbamoil]propilcarbamoil]nonadecanoico;

(Nombre alternativo: ¹Bu-Eicosanodioil-gGlu(OtBu)-OEG-OEG-OH)

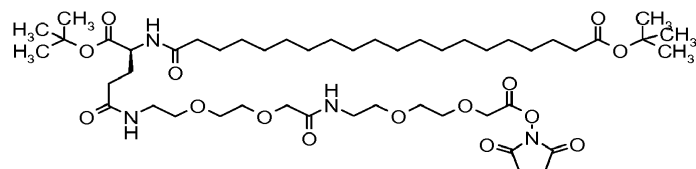


A una solución de 5-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) éster 1-*tert*-butil éster del ácido 2-(19-*tert*-butoxicarbonilnonadecanoilamino)pentanodioico (2.50 g) y ácido [2-(2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acético (nombre alternativo: H-OEG-OEG-OH)(1.47 g) en etanol (40 mL) se le agregó DIPEA (1.26 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche y después se concentró al vacío. Al residuo se le agregó HCl acuoso 0.1 N (150 mL) y acetato de etilo (200 mL). Se separaron las capas y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (100 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua y solución saturada de cloruro de sodio, se secaron (sulfato de magnesio) y se concentraron al vacío para dar un aceite, que cristalizó al quedar en reposo.

Rendimiento: 96% (3.1 g). LCMS: masa teórica: 874.2. Encontrado: 874.49.

Éster *tert*-butílico del ácido 19-((S)-1-*tert*-butoxicarbonil-3-[2-[2-((2-[2-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-il oxicarbonil metoxi)etoxi]etilcarbamoil]metoxi)etoxi]etilcarbamoil]propilcarbamoil]nonadecanoico;

(Nombre alternativo: tBu-Eicosanodioil-gGlu(OtBu)-OEG-OEG-OSu)

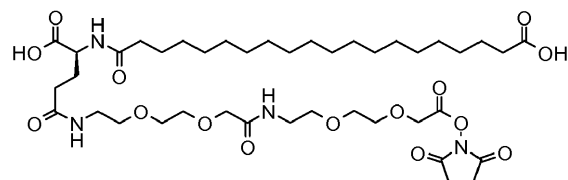


A una solución de éster *tert*-butílico del ácido 19-((S)-1-*tert*-butoxicarbonil-3-[2-(2-[[2-(2-carboxi metoxi)etoxi]etilcarbamoil]metoxi)etoxi]etilcarbamoil]propilcarbamoil]nonadecanoico (3.1 g) en acetonitrilo (50 mL) se le agregó TSTU (1.39 g) y DIPEA (0.91 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche y después se concentró al vacío. Al residuo se le agregó HCl acuoso 0.1 N (100 mL) y acetato de etilo (200 mL). Se separaron las capas y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (50 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua y solución saturada de cloruro de sodio, se secaron (sulfato de magnesio) y se concentraron al vacío para dar un aceite.

Rendimiento: 99% (3.4 g). LCMS: masa teórica: 971.2 Encontrada: 971.8.

Ácido 19-((S)-1-carboxi-3-[2-[2-((2-[2-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-iloxicarbonil metoxi)etoxi]etilcarbamoil]metoxi)etoxi]etilcarbamoil]propilcarbamoil]nonadecanoico;

(Nombre alternativo: Eicosanodioil-gGlu-OEG-OEG-OSu)



Éster *tert*-butilico del ácido 19-((S)-1-*tert*-butoxicarbonil-3-{2-[2-({2-[2-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo)carbonilmetoxi]-etoxi]etilcarbamoil)-metoxi]etoxi]etilcarbamoil}propilcarbamoil)nonadecanoico (3.4 g) se agitó en TFA (75 mL) durante 45 min y después se concentró al vacío. El residuo se concentró conjuntamente con tolueno 3 veces para dar un sólido. El residuo se cristalizó en 2-propanol y se filtró para dar un compuesto cristalino blanco.

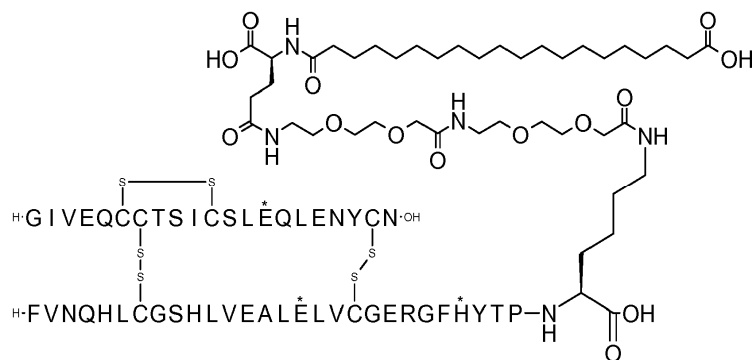
Rendimiento: 80% (2.4 g). LCMS: masa teórica: 859.03 Encontrada: 859.44.

Para la acilación del residuo de lisina en la posición B29 (en la posición épsilon) de A14E, B16E, B25H, desB30 insulina humana, la acilación se realiza preferentemente a pH alcalino (por ejemplo a pH 10, 10.5 o 11). Esto se ilustra en el ejemplo 1 de este documento.

Ejemplo 1

N{Épsilon-B29)-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[GluA14,GluB16,HisB25],des-ThrB30-insulina (humana);

(Nombre alternativo: A14E, B16E, B25H, B29K(N^eeicosanodioil-gGlu-2xOEG), desB30 insulina humana; Compuesto 1)



Se disolvió A14E, B16E, B25H, desB30 insulina humana (3.0 g, 0.53 mmol) en Na₂CO₃ acuoso 150 mM (40 mL) y se le agregaron 5 mL de THF. El valor del pH se ajustó a 11.0 con NaOH acuoso 1 M. Se disolvió bajo agitación vigorosa, ácido 19-((S)-1-carboxi-3-{2-[2-({2-[2-(2,5-dioxopirrolidin-1-ilo)carbonilmetoxi]etoxi]etilcarbamoil)-metoxi]etoxi]-etilcarbamoil}propilcarbamoil)nonadecanoico (641 mg, 0.75 mmol, preparado como se describió antes) en una mezcla de 1.5 mL de THF y 1.5 mL de DMF durante un minuto. Durante la adición, el pH se mantuvo constante a 10.5-11 con la adición de NaOH acuoso 1 N. La mezcla se agitó durante una hora.

El valor del pH se ajustó a 7.5 con HCl 1 M y se agregó etanol al 50% hasta un volumen de 500 mL. El valor del pH se ajustó a 7.5. La conductividad se midió hasta 1.6 mS/cm.

La purificación se llevó a cabo por cromatografía de intercambio aniónico en un Äkta Explorer:

Columna:	150 mL (2.6 x 28 cm) Poros 50HQ
Tampón A:	TRIS 15 mM, acetato de amonio 50 mM en etanol al 50%, pH 7.5 (1.6 mS/cm)
Tampón B:	TRIS 15 mM, acetato de amonio 500 mM en etanol al 50%, pH 7.5 (14 mS/cm)
Gradiente:	0-80% de B en 20 VC
Flujo:	25 mL/min.

La acumulación de producto, 700 mL, se diluyó con 700 mL de etanol al 50% y se purificó una vez más:

Columna:	150 mL (2.6 x 28 cm) Poros 50HQ
Tampón A:	TRIS 15 mM, acetato de amonio 50 mM en etanol al 50%, pH 7.5 (1.6 mS/cm)
Tampón B:	TRIS 15 mM, acetato de amonio 500 mM en etanol al 50%, pH 7.5 (14 mS/cm)
Gradiente:	0-100% B en 12 VC
Flujo:	25 mL/min.

ES 2 676 065 T3

La acumulación de producto, 300 mL, se diluyó con 300 mL de agua y se desalinizó en una columna C18:

Columna:	30 x 250 mm (Daiso_200_15um_FEFge1304_ODDMS_30 x 250 mm), VC = 177 mL
Tampón A:	10% de acetonitrilo en agua milli-Q + 0.1% de TFA
Tampón B:	80% de acetonitrilo en agua milli-Q + 0.1% de TFA
Gradiente:	25-80% de B en 20 min.
Flujo:	35 mL/min.

5 La fracción de productos se liofilizó para obtener la sal de TFA, que se disolvió en 50 mL de agua más 10 mL de acetonitrilo y el pH se ajustó a 8.0 con NaOH acuoso 0.5 M y se liofilizó para obtener 1.25 g (36%) de la insulina del título.

LC-MS (electronebulización): m/z = 1593.1 (M+4)/4. Calculada: 1594.1.

10 Ejemplo 2

Afinidad por el receptor de la insulina

15 La afinidad de los análogos de la insulina acilados de esta divulgación por el receptor de la insulina humana se determina mediante un ensayo de captura de anticuerpo en una placa de microtitulación de ensayo SPA (Ensayo de centelleo por proximidad). Se mezclan perlas de unión al anticuerpo SPA-PVT y reactivo anti-ratón (Amersham Biosciences, Cat No. PRNQ0017) con 25 mL de tampón de unión (HEPES 100 mM pH 7.8; cloruro de sodio 100 mM; MgSO₄ 10 mM, 0.025% de Tween-20). La mezcla de reactivo para una única placa Optiplat Packard (Packard No. 6005190) está compuesta por 2.4 µl de receptor de la insulina humana recombinante purificado diluido 1:5000 (con o sin exón 11), una cantidad de solución madre de A14Tyr[¹²⁵I]-insulina humana correspondiente a 5000 cpm por 100 µl de mezcla de reactivo, 12 µl de una dilución 1:1000 de anticuerpo F12, 3 ml de perlas de SPA y tampón de unión hasta un total de 12 ml. Después se agrega un total de 100 µl de mezcla de reactivo a cada pocillo de la placa Optiplat Packard y se prepara en la Optiplat una serie de diluciones del derivado de la insulina de las muestras apropiadas. Después las muestras se incuban durante 16 horas mientras se agitan suavemente. Luego las fases se separan por centrifugación durante 1 min y las placas se cuentan en un Topcounter. Los datos de unión se ajustan usando el algoritmo de regresión no lineal en el GraphPad Prism 2.01 (GraphPad Software, San Diego, CA) y las afinidades se expresan con respecto (en porcentaje (%)) a la afinidad de la insulina humana.

25 También se usa un ensayo relacionado en el que el tampón de unión también contiene 1.5% de HSA para imitar las condiciones fisiológicas.

Tabla 1

Afinidades de insulinas seleccionadas de la invención por el receptor de la insulina:		
Compuesto de prueba	Afinidad relativa RI-A (0% de HSA) (%)	Afinidad relativa RI-A (1.5% de HSA) (%)
Compuesto 1	0.1	0.01

35 Ejemplo 3

Hidrofobicidad de los derivados de la insulina de la invención

40 La hidrofobicidad de un derivado de la insulina se encuentra por HPLC de fase reversa corrida en condiciones isocráticas. El tiempo de elución del derivado de la insulina se compara con el de la insulina humana (en este documento designada IH) u otro derivado con una hidrofobicidad conocida en las mismas condiciones. La hidrofobicidad, k_{rel}, se calcula como: $k'_{rel\ deriv} = ((t_{deriv} - t_0) / (t_{ref} - t_0)) * k'_{rel\ ref}$. Utilizando la IH como referencia: $k'_{rel\ ref} = k'_{rel\ HI} = 1$. El tiempo de evacuación del sistema de HPLC, t₀, se determina inyectando 5 µl de NaNO₃ 0.1 mM.

Condiciones de la corrida:

Columna:	Lichrosorb RP-C18, 5 µm, 4 x 250 mm
Tampón A:	Fosfato de sodio 0.1 M de pH 7.3, 10 vol% de CH ₃ CN
Tampón B:	50 vol% de CH ₃ CN
Volumen de inyección:	5 µl
Tiempo de la corrida:	Máximo 60 minutos

Después de correr un gradiente inicial, se elige el nivel isocrático para correr el derivado y la referencia (por ejemplo IH), y los tiempos de elución del derivado de la referencia en condiciones isocráticas se usan en la ecuación anterior para calcular $k'_{rel_{deriv}}$.

5 Tabla 2

Hidrofobicidad de los derivados de la insulina de la invención	
Compuesto de prueba	Hidrofobicidad relativa $k'_{rel_{deriv}}$
Compuesto 1	0.6

Ejemplo 4

Degradación de los análogos de la insulina usando enzimas de la luz del duodeno

10 Degradación de análogos de la insulina empleando enzimas de la luz del duodeno (preparadas por filtración del contenido de la luz del duodeno) de ratas SPD. El ensayo es realizado por un robot en una placa de 96 pocillos (2 mL) con 16 pocillos disponibles para los análogos de la insulina y los patrones. Se incuban los análogos de la insulina ~15 μ M con las enzimas del duodeno en Hepes 100 mM, pH = 7.4 a 37 °C, se toman muestras después de 1, 15, 30, 60, 120 y 240 min y la reacción se detiene mediante adición de TFA. Se determinan los análogos de la insulina intactos en cada punto por RP-HPLC. El tiempo medio de degradación se determina por ajuste exponencial de los datos y se normaliza al tiempo medio determinado para las insulinas de referencia, A14E, B25H, desB30 insulina humana o insulina humana en cada ensayo. La cantidad de enzimas agregada para la degradación es tal que el tiempo medio para la degradación de la insulina de referencia es entre 60 minutos y 180 minutos. El resultado se indica como el tiempo medio de degradación para el análogo de la insulina en el duodeno de rata dividido entre el tiempo medio de degradación de la insulina de referencia del mismo experimento (tasa de degradación relativa).

Tabla 3

Degradación	
Compuesto de prueba	Estabilidad relativa de la degradación en el duodeno vs. A14E, B25H, desB30 insulina humana
Compuesto 1	0.7

25 Ejemplo 5

FC intravenosa en rata

30 Las ratas anestesiadas se dosifican por vía intravenosa (iv) con análogos de la insulina en diversas dosis y se miden las concentraciones plasmáticas del compuesto de prueba usando inmunoensayos o espectrometría de masas a intervalos específicos durante 4 horas o más, después de la dosis. Los parámetros farmacocinéticos se calculan a continuación empleando WinNonLin Professional (Pharsight Inc., Mountain View, CA, EE.UU.).

35 Se usan ratas Wistar machos que no están en ayunas (Taconic) y que pesan aproximadamente 200 gramos. Se les mide el peso corporal y luego las ratas son anestesiadas con Hypnorm/Dormicum (cada compuesto se diluye por separado 1:1 en agua estéril y después se mezclan; se preparan en el momento el día del experimento). La anestesia se inicia con 2 ml/kg de mezcla de Hypnorm/Doricum sc seguido de dos dosis de mantenimiento de 1 ml/kg sc a intervalos de 30 minutos y dos dosis de mantenimiento de 1 ml/kg sc a intervalos de 45 minutos. Si es necesario para mantener a las ratas ligeramente anestesiadas todo el tiempo se les suministra una o más dosis de 40 1-2 mL/kg sc. El pesaje y la anestesia inicial se realizan en las habitaciones de mantenimiento de las ratas para evitar estresar a los animales moviéndolos de una habitación a otra.

Tabla 4

FC en ratas	
Compuesto de prueba	FC i.v. en ratas TRM (h)
Compuesto 1	24.5

45 Ejemplo 6

Perfiles farmacocinéticos (FC) intravenosos en perros

El objetivo de este protocolo es obtener datos farmacocinéticos (FC) de los perfiles de concentración plasmática-tiempo de diferentes análogos de la insulina luego de la administración intravenosa a perros beagle, y calcular los parámetros farmacocinéticos pertinentes para los análogos.

5 Los animales tuvieron acceso libre a agua para beber de calidad doméstica. Los animales se pesaron cada día de la dosificación. Cada sustancia de prueba fue administrada a 3 animales. Se tuvo en cuenta el bienestar de cada animal en términos de la cantidad y la magnitud de los procedimientos a llevar a cabo en cada uno de los animales. Se obtuvo un perfil completo de concentración plasmática-tiempo para cada animal. Durante la extracción de sangre los perros fueron colocados en una mesa y mantenidos quietos mediante un técnico veterinario sentado al costado. Este procedimiento se entrenó durante el período de aclimatación. Se extrajeron muestras de sangre, 0.5 mL, en tubos de EDTA según el esquema siguiente:

15 Predosis (-10, 0), y 5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300, 480, 600, 720, 960, 1440, 1920, 2880, 4320, 5760, 7200, 8640, 10080 minutos.

15 Durante los períodos de extracción frecuente de muestras, las muestras de sangre se extrajeron de catéteres Venflon de las venas cefálicas mantenidos abiertos con solución de heparina. Las otras muestras de sangre se extrajeron de la vena yugular.

20 Se mantuvieron las muestras de sangre en hielo por un máximo de 20 minutos antes de la centrifugación a 4 °C durante 4 minutos a 1,300 g.

25 El plasma se transfirió inmediatamente a 2 tubos micrónicos, 80 µl de plasma en cada uno de cada muestra de sangre y se colocaron según el esquema de la rejilla. El plasma se almacenó a -20 °C hasta que se analizó.

25 Se analizaron los perfiles de concentración plasmática-tiempo mediante un análisis farmacocinético no compartimental utilizando WinNonlin Professional (Pharsight Inc., Mountain View, CA, EE.UU.).

30 Se realizaron los cálculos empleando los valores de concentración-tiempo individuales de cada animal.

Tabla 5

FC en perros		
Compuesto de prueba	T _½ Intravenoso en perros ± DE (horas)	TRM intravenoso en perros ± DE (en horas) (tiempo de retención medio)
Compuesto 1	92 ± 22	121 ± 28

Ejemplo 7

35 *Solubilidad inicial del compuesto 1 y el compuesto de comparación A en presencia de zinc*

Se disolvieron, respectivamente, compuesto 1 y compuesto de comparación A (es decir N{épsilon-B29}-[2-[2-[2-[[2-[2-[[[4S]-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-amino]etoxi]etoxi]acetil]-[GluA14,HisB16,HisB25],des-ThrB30-insulina (humana); nombre alternativo: A14E, B16H, B25H, B29K(N^εeicosanodioil-gGlu-2xOEG), desB30 insulina humana, en agua milli-Q a un valor de pH de aproximadamente 8. Se agregaron fenol, cresol, acetato de zinc (Zn), cloruro de sodio y glicerol en el orden mencionado, resultando en una composición farmacéutica final que contenía: insulina 4.2-5 mM, 1.6% de glicerol, fenol 25 mM, cresol 25 mM, pH 7.4 y la concentración de zinc y de cloruro de sodio indicada en la tabla siguiente. Las composiciones farmacéuticas se almacenaron durante 24 horas a 22 °C y se centrifugaron a 15,000 x g durante 15 minutos. Se transfirieron 100 µl del sobrenadante a viales de HPLC y la concentración se determinó usando filtración en gel ácida como se describe en Eur. Pharm. NovoRapid. La cantidad de insulina soluble se determinó en porcentaje de la concentración de partida. La exactitud de la medición fue de +/- 2%.

Tabla 6

Solubilidad del compuesto 1 y del compuesto de comparación A, respectivamente, en presencia de Zn				
Zn/hexámero	NaCl 0 mM compuesto A % de insulina soluble	NaCl 20 mM compuesto A % de insulina soluble	NaCl 0 mM compuesto 1 % de insulina soluble	NaCl 20 mM compuesto 1 % de insulina soluble
4.5	100	100		100
5.5	101	100		100
5.9			100	
6.5	100	100		100

Solubilidad del compuesto 1 y del compuesto de comparación A. respectivamente, en presencia de Zn				
Zn/hexámero	NaCl 0 mM compuesto A % de insulina soluble	NaCl 20 mM compuesto A % de insulina soluble	NaCl 0 mM compuesto 1 % de insulina soluble	NaCl 20 mM compuesto 1 % de insulina soluble
6.6			100	
7.4			100	
7.5	100	100		100
8.3			100	
8.5	100	100		100
9.2			100	
9.5	96	100		103
10.0			100	
10.5	100	99		100
10.9			100	
11.5	100	91		100
11.8			100	
12.5	99	85		100
12.7			100	
13.5	82	67		100
13.6			100	
14.4			100	
14.5	64	23		100
15.3			100	
15.5	47	5		91
16.2			92	
16.5	19	1		79
17.1			13	
17.5	19	1		60
18.5	19	1		9

Conclusión

5 El compuesto de comparación, en una composición sin NaCl, es soluble en las condiciones de prueba en presencia de hasta 12.5 moléculas de zinc por hexámero. El compuesto de comparación A, en una composición con NaCl 20 mM, es soluble en las condiciones de prueba en presencia de hasta 10.5 moléculas de zinc por hexámero.

10 El compuesto 1 es soluble en una composición sin NaCl en las condiciones de prueba hasta aproximadamente 15.3 moléculas de 5 por hexámero de insulina. Además, el compuesto 1 es soluble con NaCl 20 mM en las condiciones de prueba hasta aproximadamente 14.5 moléculas de zinc por hexámero de insulina.

Ejemplo 8

Solubilidad inicial de la insulina humana en presencia de zinc

15 Se disolvió insulina humana en agua milli-Q a un valor de pH de aproximadamente 8. Se agregaron fenol, cresol, acetato de zinc (Zn), cloruro de sodio y glicerol en el orden mencionado, resultando en una formulación final que contenía: insulina 4.2-5 mM, 1.6% de glicerol, fenol 25 mM, cresol 25 mM, pH 7.4 y la concentración de zinc y de cloruro de sodio indicada en la tabla siguiente. Las formulaciones se almacenaron 24 horas a 22 °C y después se
20 centrifugaron a 15,000 x g durante 15 min. Se transfirieron 100 µl del sobrenadante a viales de HPLC y la concentración se determinó usando filtración en gel ácida como se describe en Eur. Pharm. NovoRapid. La cantidad de insulina soluble se determinó en porcentaje de la concentración de partida.

La exactitud de la medición es de +/- 2%.

Tabla 7

Solubilidad de la insulina humana en presencia de zinc		
Zn/hexámero	0 mM NaCl % de insulina soluble	20 mM NaCl % de insulina soluble
2	100	100
4	100	100
6	83	100
8	15	19

Conclusión

5 La insulina humana es soluble en formulaciones que contienen hasta 6 Zn/por hexámero de insulina cuando la formulación contiene NaCl y hasta 4 Zn/por hexámero de insulina cuando la formulación casi no contiene NaCl.

Ejemplo 9

10 Estabilidad química y física como una función del contenido de zinc y cloruro de sodio

15 El objetivo de este experimento fue medir la estabilidad química y física de una formulación dentro de la ventana zinc/hexámero determinada por experimentos de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Además determinar si la presencia de cloruro de sodio afectaba la estabilidad química y/o física.

Formulaciones

20 Las formulaciones contenían: compuesto 1 3.6 mM , fenol 25 mM, cresol 25 mM, pH 7.4. El zinc y el cloruro de sodio según se especifica a continuación.

Tabla 8

Formulaciones que contienen zinc del compuesto 1		
Zinc por hexámero	Cloruro de sodio mM	Glicerol % p/p
5.8	20	1.6
5.8	75	0.7
5.8	120	0
8.1	20	1.6
8.1	75	0.7
8.1	120	0
10.5	20	1.6
10.5	75	0.7
10.5	120	0

25 La formulación se preparó de la manera siguiente:

Se disolvió polvo del compuesto 1 en agua milli-Q en una solución madre en aproximadamente el doble de cantidad que la concentración final de la formulación. Se agregaron fenol, cresol, acetato de zinc, cloruro de sodio y glicerol en el orden mencionado. La solución resultante tenía un pH de aproximadamente 7.8 y se ajustó hasta pH 7.4 usando HCl 0.2 N, lo que resultó en un incremento final en la concentración de cloruro, 1.45 mM de cloruro.

30 La formulación se esterilizó por filtración y se distribuyó en cartuchos de 3 ml con tapones.

Se midió la estabilidad física de la manera siguiente:

35 Se midió la tendencia a la fibrilación en el ensayo de tioflavina T (THT). La posible precipitación que conduce a una formación visible de partículas se midió como un potencial incremento en la turbidez. La formación de partículas inferiores a 2 µm se midió mediante dispersión dinámica de la luz (DLS). La formación de partículas superiores a 2 µm se midió mediante imágenes de microscopía de flujo (MFI).

La estabilidad química se midió como un incremento en porcentaje de las partículas de alto peso molecular (HMWP) y como descenso en la pureza medida por UPLC de fase reversa.

Tendencia a la fibrilación en el ensayo de tioflavina T

La concentración de compuesto 1 se determinó según el método descrito en WO 2013/153000.

5

Tabla 9

Tiempos de retraso medidos en horas en el ensayo de tioflavina T. El tiempo de retraso hasta la fibrilación aumenta como una función del contenido de zinc en la formulación. Las formulaciones que contienen más de 5.8 Zn/hexámero no fibrilan y por lo tanto tienen un tiempo de retraso superior a 45 horas.

Zn/hexámero/NaCl mM	Tiempo de retraso en horas	Concentración de insulina en mM antes de el ensayo ThT	Concentración de insulina en % de la concentración de partida después del ensayoThT
5.8 Zn/hexámero/NaCl 20 mM	15	4.3	91%
5.8 Zn/hexámero/NaCl 75 mM	14	4.2	90%
5.8 Zn/hexámero/NaCl 120 mM	15	4.2	88%
8.1 Zn/hexámero/NaCl 20 mM	45	4.3	100%
8.1 Zn/hexámero/NaCl 75 mM	45	4.2	100%
8.1 Zn/hexámero/NaCl 120 mM	45	4.1	100%
10.5 Zn/hexámero/NaCl 20 mM	45	4.0	100%
Zn/hexámero/NaCl mM	Tiempo de retraso en horas	Concentración de insulina en mM antes de el ensayo ThT	Concentración de insulina en % de la concentración de partida después del ensayoThT
10.5 Zn/hexámero/NaCl 75 mM	45	4.2	100%
10.5 Zn/hexámero/NaCl 120 mM	45	4.2	100%

Estabilidad en reposo del compuesto 1 sondeada por DLS

10 Se sondeó la estabilidad física del compuesto 1 formulado con diversas concentraciones de NaCl y acetato de Zn almacenado a 4 °C, 37 °C y 45 °C mediante dispersión dinámica de la luz (DLS).

Método

15 Se midió cada muestra por triplicado en un lector de placas DynaPro a 25 °C registrando 20 adquisiciones de 10 segundos; los datos se informan como un promedio de las tres medidas. Las muestras no se filtraron, pero en vez de eso se centrifugaron a 15 000 x g durante 20 min para eliminar sólo los floculados y agregados más grandes, que de lo contrario bloquearían las mediciones. Además, se usó aceite de parafina para sellar los pocillos de la microplaca de DLS en vez de la lámina plástica utilizada más comúnmente.

20

Tabla 10

El tamaño promedio de oligómero de proteína medido como diámetro hidrodinámico (DH) en nm para las diferentes formulaciones se incubó durante 2-8 semanas a 4 °C, 30 °C, 37 °C o 45 °C

Formulación Zn NaCl	2 semanas a 4 °C		8 semanas a 4 °C		2 semanas a 37°C		2 semanas a 45°C		8 semanas a 30°C		8 semanas a 37°C	
	R H Diám/n m	DE/n m	R H Diám/n m	DE/n m	H RH Diam/n m	DE/n m	R H Diám/n m	DE/n m	R H Diám/n m	DE/n m	R H Diám/n m	DE/n m
5.8 Zn/hexám/NaCl	4.05	0.10	3.99	0.06	3.8	0.01	3.84	0.02	4.08	0.04	4.17	0.05

El tamaño promedio de oligómero de proteína medido como diámetro hidrodinámico (DH) en nm para las diferentes formulaciones se incubó durante 2-8 semanas a 4 °C, 30 °C, 37 °C o 45 °C

Formulación Zn NaCl	2 semanas a 4 °C		8 semanas a 4 °C		2 semanas a 37°C		2 semanas a 45°C		8 semanas a 30°C		8 semanas a 37°C	
	R H Diám/nm	DE/nm	R H Diám/nm	DE/nm	H RH Diam/nm	DE/nm	R H Diám/nm	DE/nm	R H Diám/nm	DE/nm	R H Diám/nm	DE/nm
20 mM												
5.8 Zn/hexám/NaCl 75 mM	5.25	0.09	5.02	0.02	4.96	0.02	4.97	0.04	5.12	0.09	5.14	0.06
8.1 Zn/hexám/NaCl 20 mM	3.88	0.03	3.88	0.02	3.87	0.01	3.87	0.03	3.94	0.01	4.14	0.03
8.1 Zn/hexám/NaCl 75 mM	5.21	0.01	5.24	0.04	5.17	0.02	5.11	0.03	5.20	0.06	5.32	0.12
10.5 Zn/hexám/NaCl 20 mM	4.34	0.02	4.28	0.04	4.2	0.05	4.17	0.01	4.23	0.03	4.29	0.02
10.5 Zn/hexám/NaCl 75 mM	5.95	0.03	5.93	0.04	5.68	0.05	5.63	0.05	5.65	0.04	5.71	0.04

RH: radio hidrodinámico (nm)
 Diám: diámetro (nm)
 DE: desviación estándar

5 El tamaño promedio de oligómero de proteína determinado con DLS varía entre 3.8 nm (para una formulación con 5.8 Zn/hexámero de insulina, NaCl 20 mM , a 37 °C, después de 2 semanas) y 5.95 nm (para una formulación con 10.5 Zn/hexámero de insulina, NaCl 75 mM a 4 °C, después de 2 semanas). Para las muestras almacenadas a 4 °C el diámetro hidrodinámico disminuye 1% en promedio mientras que aumenta 1 y 4% para las muestras almacenadas a 37 y 45 °C, respectivamente. Por otra parte, todas las funciones de autocorrelación registradas fueron compatibles con distribuciones de partículas unimodales, lo que indica distribuciones de tamaño bastante estrechas carentes de cualquiera agregado grande.

10 Conclusión

Aunque las diferentes condiciones de formulación mostraron diferentes tamaños promedio de oligómero observables, el cambio en el tiempo fue extraordinariamente pequeño, cuando estuvo presente, y todas las formulaciones parecieron ser físicamente estables a 4 °C, 37 °C así como a 45 °C en el período de 8 semanas analizado. No se formaron agregados durante el periodo.

Medición de partículas superiores a 2 µm utilizando MFI

20 Se analizaron las formulaciones en busca de formación de partículas subvisibles en el intervalo micrométrico usando imágenes de microscopía de flujo (MFI™). Los recuentos de partículas fueron generalmente bajos, y una gran fracción de partículas tuvo un aspecto esférico oscuro esperado para las gotas de aceite de silicona. Sin embargo, aparecieron grandes partículas translúcidas semejantes a copos en las formulaciones que contenían 10.5 Zn/hexámero 150 mM o 75 mM después de 2 semanas de incubación a 45 °C y 8 semanas a 37 °C, respectivamente.

25 Tabla 11

Concentraciones de partículas en mL para las diferentes formulaciones incubadas durante 2-20 semanas a 4 °C, 30 °C, 37 °C o 45 °C. Las partículas con Circularidad*Relación de aspecto*Intensidad STD >75 y ECD <3 µm fueron rechazadas del análisis por representar potencialmente aceite de silicona.

Tiempo		2 semanas			4 semanas		8 semanas			20 semanas	
Zn/hexám	NaCl (mM)	4°C	37°C	45°C	4°C	37°C	4°C	30°C	37°C	4°C	25°C

ES 2 676 065 T3

Concentraciones de partículas en mL para las diferentes formulaciones incubadas durante 2-20 semanas a 4 °C, 30 °C, 37 °C o 45 °C. Las partículas con Circularidad*Relación de aspecto*Intensidad STD >75 y ECD <3 µm fueron rechazadas del análisis por representar potencialmente aceite de silicona.

Tiempo		2 semanas			4 semanas		8 semanas			20 semanas	
Zn/hexám	NaCl (mM)	4°C	37°C	45°C	4°C	37°C	4°C	30°C	37°C	4°C	25°C
		89.9	91.8	224.1	202.5	179.7	15.3	80.3	162.4	24.9	5.7
5.8	20	38.2	24.9	57.4	28.7	108.9	21.0	22.9	28.7	1.9	49.7
5.8	75	78.6	80.3	45.9	47.8	86.0	7.7	21.0	19.1	32.5	38.2
5.8	120	19.1	30.6	40.1	7.6	147.2					
8.1	20	105.1	87.9	137.6	26.8	273.2	93.6	82.2	34.4	53.5	370.5
8.1	75	17.2	65.0	57.3	118.5	210.2	59.3	105.1	51.6	72.6	57.3
8.1	120	74.6	44.0	23.0	21.0	191.1					
10.5	20	158.7	78.4	152.9	230.0	326.7	137.6	290.4	131.8	13.4	17.2
10.5	75	63.1	203.2	154.9	225.5	221.7	120.7	126.1	586.6	28.7	44.0
10.5	120	80.3	343.9	1807.6	267.5	279.0					

Tabla 12

Las fracciones partícula volumen (nL partículas por mL de volumen de muestra) para las diferentes formulaciones incubadas durante 2-20 semanas a 4 °C, 30 °C, 37 °C o 45 °C. Las partículas con Circularidad*Relación de aspecto*Intensidad STD >75 y ECD <3 µm fueron rechazadas del análisis por representar potencialmente aceite de silicona.

Tiempo		2 semanas			4 semanas		8 semanas			20 semanas	
Zn/hexám	NaCl (mM)	4°C	37°C	45°C	4°C	37°C	4°C	30°C	37°C	4°C	25°C
		0.01	0.01	0.5	0.06	0.04	0	0.03	0.02	0.01	0
5.8	20	0	0	0.12	0.03	0.03	0	0	0.01	0	0.04
5.8	75	0	0.01	0.02	0	0.03	0.05	0	0	0.05	0.19
5.8	120	0	0	0	0	0.06					
8.1	20	0.01	0	0.01	0	0.02	0	0.01	0	0.02	0.22
8.1	75	0	0.01	0.06	0.01	0.01	0.03	0.02	0.01	0.01	0.01
8.1	120	0.02	0.01	0.03	0	0.03					
10.5	20	0.01	0.01	0.02	0.02	0.08	0.09	0.06	0.03	0.06	0
10.5	75	0.02	0.11	0.04	0.01	0.03	0.01	0.02	0.36	0.01	0.01
10.5	120	0.02	0.26	1.32	0.12	0.08					

Conclusión sobre la estabilidad física

5 La estabilidad física se midió como tiempo de retraso en el ensayo ThT como una función del incremento de zinc/hexámero con incremento del contenido de zinc de 5.8 a 8.1 Zn/hexámero de insulina. El cambio en el tamaño promedio del oligómero medido por DLS reveló que no hubo cambios en el tamaño del oligómero ni se formaron agregados en ninguna de las formulaciones. La medición de partículas determinada por MFI mostró un aumento en la formación de partículas en las formulaciones que contenían 10.5 Zn/hexámero y NaCl 75 mM.

10 La estabilidad física fue por lo tanto óptima en la formulación que contenía más de 5.8 y menos de 10.5 Zn/hexámero de insulina.

15 Estabilidad química

La formación de partículas de alto peso molecular se midió utilizando una columna de filtración en gel en eluyente exento de ácido acético como se describe en WO 2013/153000. El valor de HMWP para las muestras almacenadas a 4 °C se sustrajo del valor de HMPW para las muestras almacenadas a 30 °C o 37 °C.

Tabla 13

Desarrollo de HMWP para las diferentes formulaciones incubadas durante 2-8 semanas a 4 °C, 30 °C o 37 °C.				
	2 s 37 °C-2 s 4 °C	8 s 30 °C-8 s 4 °C	4 s 30 °C-4 s 4 °C	8 s 37°C-8 s 4 °C
5.8 Zn/hexámero/NaCl 20 mM	0.35	0.32	0.52	1.01
5.8 Zn/hexámero/NaCl 75 mM	0.41	0.35	0.58	1.17
5.8 Zn/hexámero/NaCl 120 mM	0.40	0.34		
8.1 Zn/hexámero/NaCl 20 mM	0.25	0.22	0.43	0.75
8.1 Zn/hexámero/NaCl 75 mM	0.26	0.23	0.43	0.73
8.1 Zn/hexámero/NaCl 120 mM	0.28	0.31		
10.5 Zn/hexámero/NaCl 20 mM	0.28	0.32	0.45	0.76
10.5 Zn/hexámero/NaCl 75 mM	0.25	0.26	0.39	0.72
10.5 Zn/hexámero/NaCl 120 mM	0.28	0.23		

Conclusión

- 5 Las formulaciones que contenían 5.8 Zn/hexámero de insulina tuvieron mayor desarrollo de HMWP que la formulaciones que contenían 8.1 Zn/hexámero de insulina o más.

Pérdida de pureza

- 10 La pérdida de pureza se midió con respecto al inicio. La pureza medida por cromatografía de fase reversa para las muestras almacenadas a 4 °C se sustrajo de la pureza medida para las muestras almacenadas a 30 °C o 37 °C. Se usó un método de pureza UPLC ligeramente modificado con respecto al método descrito en WO 2013/153000. En la presente instancia se usó una columna Waters CSH, C18 que en este caso mejoró la separación y el número de inyecciones permitido en la columna antes de tener que cambiarla.

15

Tabla 14

Pérdida de pureza en % para las diferentes formulaciones incubadas durante 2-8 semanas a 4 °C, 30 °C o 37 °C.				
	2 s 37 °C-2 s 4 °C	8 s 30 °C-8 s 4 °C	4 s 30 °C-4 s 4 °C	8 s 37°C-8 s 4 °C
5.8 Zn/hexámero/NaCl 20 mM	1.800	1.700	3.29	6.12
5.8 Zn/hexámero/NaCl 75 mM	1.500	1.300	2.86	5.44
8.1 Zn/hexámero/NaCl 20 mM	1.200	1.000	1.92	3.78
8.1 Zn/hexámero/NaCl 75 mM	1.000	1.000	1.90	3.24
10.5 Zn/hexámero/NaCl 20 mM	1.000	1.100	1.91	3.45
10.5 Zn/hexámero/NaCl 75 mM	0.900	0.800	1.58	3.10

Conclusión

- 20 La formulaciones que contienen 5.8 Zn/hexámero de insulina tienen la mayor degradación. La formulaciones que contienen 8.1 Zn/hexámero de insulina o más tienen menor degradación. La estabilidad química es óptima por lo tanto en formulaciones con 8.1 Zinc/hexámero o más. La estabilidad es mayor en formulaciones que contienen NaCl 75 mM que en las formulaciones que contienen NaCl 20 mM.

25 Ejemplo 10

- 30 El objetivo de este experimento fue investigar la oligomerización mediante cromatografía de exclusión por tamaño como una función del contenido de NaCl en la formulación que contiene el compuesto comparativo A (es decir N{Épsilon-B29)-[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(19-carboxi-nona decanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil-[GluA14,HisB16,HisB25],des-ThrB30-insulina (humana); nombre alternativo: A14E, B16H, B25H, B29K(N^eeicosanodioil-gGlu-2xOEG), desB30 insulina humana a una concentración de insulina de 4.2 mM y relación zinc/hexámero de insulina fija. Además, el objetivo fue medir la estabilidad física y química.

35 Formulación

Se disolvió el compuesto A en agua milli-Q a un valor de pH de aproximadamente 8. Se agregaron fenol, cresol, acetato de zinc (Zn) y glicerol en el orden mencionado, resultando en una formulación final que contenía: 4.5 Zn/6 insulinas, fenol 25 mM, cresol 25 mM, pH 7.4 una concentración de insulina de 4.2 mM y de cloruro de sodio (NaCl), acetato de zinc y glicerol indicada en la tabla siguiente.

5 La estabilidad física se evaluó mediante la medición de

- 10 1. Tendencia a la fibrilación. Medida mediante el ensayo de tioflavina T. La tendencia a la fibrilación se midió en el ensayo de tioflavina T (THT) como el tiempo de retraso hasta la fibrilación. El ensayo de THT se midió como se describió antes, en muestras recién preparadas; y
 2. Radio del oligómero en nm y formación de agregados inferiores a 4 µm mediante dispersión dinámica de la luz.

15 La estabilidad química de las formulaciones se midió como el incremento en proteínas de alto peso molecular (HMWP) en las impurezas relacionadas a la insulina después del almacenamiento durante cuatro semanas (4 s) a 37 °C con respecto a la cantidad de HMWP luego del almacenamiento a 4 °C.

Las HMWP se midieron usando el método 2 de HMWP como se describe en WO 2013/153000.

20 La formación de impurezas relacionadas a la insulina como compuestos de desamidación se midió usando cromatografía de fase reversa (UPLC).

25 La cantidad de monómeros se midió en filtración en gel nativo usando el método 2 como se describe en WO 2013/153000 en eluyente sin fenol.

Tabla 15

Formación de HMWP y tiempo de retraso hasta la fibrilación en el ensayo THT del compuesto A					
Zinc/hexámero de ins, contenido de NaCl y glicerol	% de monómero SEC sin fenol	% monomer SEC sin fenol	Formación de HMWP (%) 4 s 37 °C	Tiempos de retraso THT (horas)	Formación de HMWP (%) 4 s 37 °C
4 Zn/hexámero NaCl 20 mM, 1.6% de glicerol	61	48	0.4	15.6	0.89
4 Zn/hexámero NaCl 50 mM, 1.1% de glicerol	49	33	0.39	19.2	0.8
4 Zn/hexámero NaCl 75 mM, 0.7% de glicerol	46	30	0.43	22.0	0.81
4 Zn/hexámero NaCl 120 mM	45	29	0.49	23.0	0.87
5 Zn/hexámero, NaCl 20 mM, 1.6% de glicerol	78	48	0.52	22.0	0.85
5 Zn/hexámero NaCl 50 mM 1.1% de glicerol	68	36	0.41	27.7	0.84
5 Zn/hexámero NaCl 75 mM 0.7% de glicerol	62	32	0.40	30.9	0.79
5 Zn/hexámero, NaCl 120 mM	64	32	0.35	29.6	0.77
6 Zn/hexámero NaCl 20 mM, 1.6% de glicerol	86	44	0.35	34.2	0.8
6 Zn/hexámero NaCl 50 mM, 1.1 % de glicerol	77	37	0.28	40.4	0.73
6 Zn/hexámero NaCl 75 mM, 0.7% de glicerol	77	35	0.33	45.0	0.73
6 Zn/hexámero NaCl 120 mM	62	28	0.40	45.0	0.73
7 Zn/hexámero NaCl 20 mM, 1.6% de glicerol	58	34	0.45	45.0	0.95

ES 2 676 065 T3

Formación de HMWP y tiempo de retraso hasta la fibrilación en el ensayo THT del compuesto A					
Zinc/hexámero de ins, contenido de NaCl y glicerol	% de monómero SEC sin fenol	% monomer SEC sin fenol	Formación de HMWP (%) 4 s 37 °C	Tiempos de retraso THT (horas)	Formación de HMWP (%) 4 s 37 °C
mM 1.6% de glicerol					

Conclusión

5 La cantidad de compuesto A monómero disminuye como una función de la concentración de cloruro de sodio con un gran efecto de la adición de hasta NaCl 50 mM. La degradación química medida como formación de HMWP y formación de impurezas es baja en todas las formulaciones a pesar del contenido monomérico. Los tiempos de retraso de THT aumentan con el contenido de zinc y de cloruro de sodio.

Tabla 16

Radio hidrodinámico promedio R_h prom. en nm e intensidad normalizada promedio I_{norm} prom. en 10^6 conteos/seg (4 °C). Nota: las muestras no se midieron a $t = 0$.

Insulina	Zinc/hexámero, contenido de NaCl y contenido de glicerol	R_h prom. (nm)		I_{norm} prom. (10^6 cts)	
		2 s	4 s	2 s	4 s
Degludec		1.14	1.15	1.44	1.7 6
NovoRapid		2.49	2.49	1.94	2.2 7
Compuesto A	4 Zn/hexámero NaCl 20 mM, 1.6% de glicerol	2.35	2.32	7.52	7.5 3
	4 Zn/hexámero NaCl 50 mM, 1.1% de glicerol	2.96	3.02	14.7	16. 1
	4 Zn/hexámero NaCl 75 mM, 0.7% de glicerol	3.41	3.49	18.0	19. 5
	4 Zn/hexámero	4.11	4.16	21.7	23. 4
	NaCl 120 mM				
	5 Zn/hexámero	3.07	3.11	13.3	14. 8
	NaCl 50 mM				
	1.1% de glicerol				
	5 Zn/hexámero	3.39	3.49	20.0	20. 1
	NaCl 75 mM				
	0.7% de glicerol				
	5 Zn/hexámero	3.79	3.94	21.9	22. 2
	NaCl 120 mM				
	6 Zn/hexámero	2.90	3.03	15.6	16. 7
	NaCl 50 mM				
	1.6% de glicerol				
	6 Zn/hexámero	3.23	3.41	17.9	19. 8
	NaCl 75 mM				
	1.1% de glicerol				
	6 Zn/hexámero	3.88	3.85	24.3	23. 1
	NaCl 120 mM				
	0.7% de glicerol				
	7 Zn/hexámero	2.52	2.14	18.0	8.2 4
	NaCl 20 mM				
	1.6% de glicerol				
	5 Zn/hexámero	2.18	2.28	7.85	6.5 6

ES 2 676 065 T3

Radio hidrodinámico promedio R_h prom. en nm e intensidad normalizada promedio I_{norm} prom. en 10^6 conteos/seg (4 °C). Nota: las muestras no se midieron a $t = 0$.

Insulina	Zinc/hexámero, contenido de NaCl y contenido de glicerol	R_h prom. (nm)		I_{norm} prom. (10^6 cts)	
		2 s	4 s	2 s	4 s
	NaCl 20 mM, 1.6% de glicerol				
	6 Zn/hexámero				
	NaCl 20 mM, 1.6% de glicerol	2.04	1.99	5.64	4.6 5

R_h prom. (nm): radio hidrodinámico promedio en nm
 I_{norm} prom. (10^6 cts): intensidad normalizada en 10^6 conteos/seg (37 °C)

Tabla 17

Radio hidrodinámico promedio R_h prom. en nm e intensidad normalizada promedio I_{norm} prom. en 10^6 conteos/seg (37°C). Nota: las muestras no se midieron a $t = 0$.

Insulina	Zinc/hexámero, contenido de NaCl y contenido de glicerol	R_h prom. (nm)		I_{norm} prom. (10^6 cts)	
		2 s	4 s	2 s	4 s
Degludec		1.14	1.14	1.44	1.50
NovoRapid		2.49	2.46	1.94	1.94
	4 Zn/hexámero				
	NaCl 20 mM, 1.6% de glicerol	2.35	2.26	7.52	10.6
	4 Zn/hexámero				
	NaCl 50 mM, 1.1% de glicerol	2.96	2.99	14.7	15.6
	4 Zn/hexámero				
	NaCl 75 mM, 0.7% de glicerol	3.41	3.43	18.0	18.9
	4 Zn/hexámero				
	NaCl 120 mM	4.11	4.03	21.7	23.0
	5 Zn/hexámero				
	NaCl 50 mM				
Compuesto A	1.1% de glicerol	3.07	3.02	13.3	16.4
	5 Zn/hexámero				
	NaCl 75 mM				
	0.7% de glicerol	3.39	3.47	20.0	19.6
	5 Zn/hexámero				
	NaCl 120 mM	3.79	3.88	21.9	21.5
	6 Zn/hexámero				
	NaCl 50 mM				
	1.6% de glicerol	2.90	2.90	15.6	15.7
	6 Zn/hexámero				
	NaCl 75 mM				
	1.1 % de glicerol	3.23	3.23	17.9	18.1
	6 Zn/hexámero				
	NaCl 120 mM				
	0.7% de glicerol	3.88	3.87	24.3	22.4

Radio hidrodinámico promedio R_h prom. en nm e intensidad normalizada promedio I_{norm} prom. en 10^6 conteos/seg (37°C). Nota: las muestras no se midieron a $t = 0$.

Insulina	Zinc/hexámero, contenido de NaCl y contenido de glicerol	R_h prom. (nm)		I_{norm} prom. (10^6 cts)	
		2 s	4 s	2 s	4 s
	7 Zn/hexámero				
	NaCl 20 mM				
	1.6% de glicerol	2.52	2.40	18.0	12.7
	5 Zn/hexámero				
	NaCl 20 mM, 1.6% de glicerol	2.18	2.11	7.85	10.7
	6 Zn/hexámero				
	NaCl 20 mM, 1.6% de glicerol	2.04	1.96	5.64	9.73

R_h prom. (nm): radio hidrodinámico promedio en nm
 I_{norm} prom. (10^6 cts): intensidad normalizada en 10^6 conteos/seg (37 °C)

Conclusión

5 El radio hidrodinámico aumenta al aumentar la concentración de sal. La concentración de Zn tiene un impacto menor sobre el tamaño excepto a 7 Zn por hexámero de insulina. No hubo un efecto significativo sobre el tamaño del oligómero ni la estabilidad física por la temperatura de incubación.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> Novo Nordisk A/S
 <120> NUEVO DERIVADO DE LA INSULINA
 <130> 8721.000-EP
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 15 < 211> 21
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial
 <220>
 < 223> Cadena A de la insulina modificada
 20 <400> 1
 Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Glu Gln Leu
 1 5 10 15

 Glu Asn Tyr Cys Asn
 20
 <210> 2
 < 211> 29
 < 212> PRT
 25 < 213> Secuencia artificial
 <220>
 < 223> Cadena B de la insulina modificada
 <220>
 < 221> MOD_RES
 30 < 222> (29)..(29)
 < 223> Lysine(N(epsilon)-Eicosanedioyl-gGlu-2xOEG)
 <400> 2
 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu
 1 5 10 15

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

35

REIVINDICACIONES

1. A14E, B16E, B25H, B29K(N(éps)-Eicosanodioil-gGlu-2xOEG), desB30 insulina humana.
- 5 2. El compuesto de la reivindicación 1 para utilizar como un medicamento.
3. El compuesto de la reivindicación 1, para utilizar como un medicamento en el tratamiento de la diabetes.
- 10 4. El compuesto de la reivindicación 1, para utilizar en el tratamiento de la diabetes, donde el compuesto se administra al mismo paciente cada 2 días o con menor frecuencia y, en promedio, durante un período de al menos 1 mes, 6 meses o 1 año, y donde dicho compuesto no se administra con mayor frecuencia al mismo paciente.
- 15 5. El compuesto de la reivindicación 1, para utilizar en el tratamiento de la diabetes, donde el compuesto se administra dos veces por semana o con menor frecuencia y, en promedio, durante un período de al menos 1 mes, 6 meses o 1 año, y donde dicho compuesto no se administra con mayor frecuencia al mismo paciente.
- 20 6. El compuesto de la reivindicación 1, para utilizar en el tratamiento de la diabetes, donde el compuesto se administra una vez por semana o con menor frecuencia y, en promedio, durante un período de al menos 1 mes, 6 meses o 1 año, y donde dicho compuesto no se administra con mayor frecuencia al mismo paciente.
7. Una solución acuosa que contiene el compuesto de la reivindicación 1.
8. La solución acuosa de acuerdo con la reivindicación 7, que contiene al menos 5 iones zinc por hexámero de insulina.
- 25 9. La solución acuosa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-8, en la que el pH está en el intervalo de 7 a 8.
- 30 10. Una composición farmacéutica que contiene el compuesto de la reivindicación 1, y uno o más excipientes.
11. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, que contiene al menos 4.5 iones zinc por hexámero de insulina.