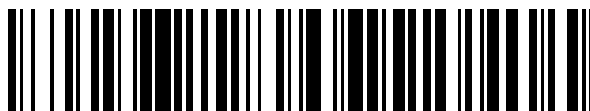


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 960**

51 Int. Cl.:

A61K 47/65 (2007.01)

A61K 38/28 (2006.01)

C07K 14/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.12.2014 PCT/IB2014/066588**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.06.2015 WO15083114**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2014 E 14833536 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2020 EP 3076990**

54 Título: **Derivados de insulina biológicamente activos**

30 Prioridad:

05.12.2013 GB 201321489

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

15.07.2020

73 Titular/es:

**CHEMICAL & BIOPHARMACEUTICAL
LABORATORIES OF PATRAS S.A. (100.0%)
Industrial Area Of Patras, Building Square 1
26000 Patras, GR**

72 Inventor/es:

**BARLOS, KLEOMENIS;
GATOS, DIMITRIOS;
BARLOS, KOSTAS y
ZIOVAS, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

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

ES 2 773 960 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).

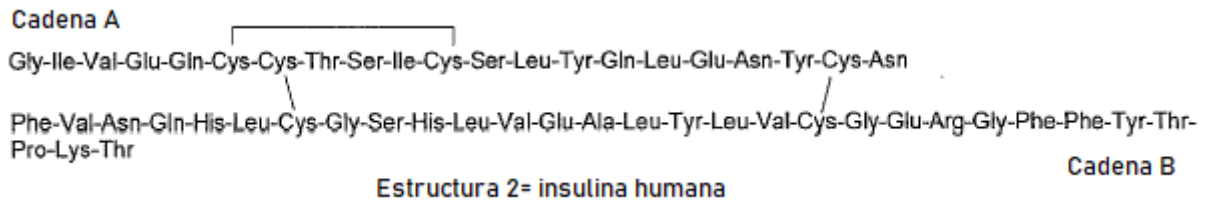
DESCRIPCIÓN

Derivados de insulina biológicamente activos

5 La presente invención se refiere a análogos de insulina según se definen en las reivindicaciones que tienen aplicaciones terapéuticas en el tratamiento de diabetes.

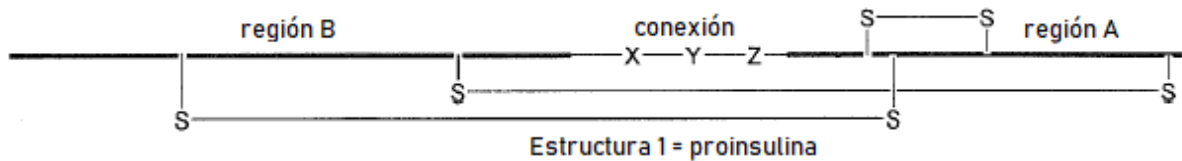
Antecedentes de la invención

10 La insulina es una hormona peptídica secretada por las células β del páncreas. Consiste en dos cadenas peptídicas, A y B, que se ligan mediante dos enlaces disulfuro intermoleculares. La cadena A contiene además un enlace disulfuro intramolecular adicional. La insulina humana tiene la estructura 2.



15 La insulina se produce como un precursor de cadena sencilla, proinsulina, que consiste en un propéptido de 24 aminoácidos continuando con proinsulina que contiene 86 aminoácidos. La secuencia del propéptido es Prepéptido-[cadena B]-Arg-Arg-[péptido de conexión]-Lys-Arg-[cadena A], en la que el péptido de conexión consiste en 31 aminoácidos. Después del retiro enzimático del prepéptido, se forman los tres enlaces disulfuro y se produce y

20 proinsulina.



25 La insulina madura se libera luego por escisión enzimática del péptido de conexión en los sitios Arg-Arg y Lys-Arg.

La proinsulina tiene una afinidad 100 veces menor por el receptor de insulina que la insulina nativa porque los residuos esenciales para unirse al receptor, a saber, la función amino N-terminal de la cadena A y la función carboxilo C-terminal de la cadena B, están bloqueadas.

30 Las propiedades de estabilidad y solubilidad de la insulina son importantes en el contexto de la terapéutica con insulina. Un número de análogos de insulina se conocen en la técnica.

35 A modo de ejemplo, se divulgan análogos de insulina de cadena sencilla con actividad de insulina en el documento EP1193272. Estas insulinas de cadena sencilla tienen un péptido C modificado de 5-18 aminoácidos y, según se informa, tienen hasta 42% de actividad de insulina.

40 El documento US 5.597.796 divulga análogos de insulina en los que dos o más residuos de aminoácidos se sustituyen por Glu y/o Asp. De manera similar, los documentos US 20090069216 y WO 2007/096332 divulgan insulinas de cadena sencilla de acción rápida que contienen una cadena B modificada y un péptido de conexión. Los análogos resultantes son particularmente adecuados para administración transdérmica. La insulina y los análogos de insulina resistentes a la fibrilación se divulgan en el documento US 8.192.957. Insulinas de cadena sencilla pegiladas se divulgan en el documento US 2010/0216690, mientras que las insulinas de cadena sencilla aciladas se divulgan en el documento WO 2007/104738.

45 El documento WO 2005/054291 divulga análogos de insulina de cadena sencilla en los que la cadena A y las cadenas B se conectan por un péptido de conexión de 5-11 aminoácidos. Asimismo, el documento WO 95/16708 divulga además análogos de insulina de cadena sencilla, en los que la cadena A y las cadenas B se conectan por un péptido de conexión de 1-15 aminoácidos, en los que el residuo de aminoácido C-terminal es distinto de Lys o Arg. El documento EP0427296 divulga precursores de la insulina humana de la fórmula general B(1-29)-X_n-Y-A(1-21), en los que X_n es una cadena peptídica con n residuos de aminoácidos que existen de manera natural. De manera similar, el documento EP0741188 divulga derivados de insulina de cadena sencilla de la fórmula b-BP-a que tienen

actividad de insulina significativa; estas insulinas de cadena sencilla tienen, según se informa, actividad de insulina, pero además, una alta afinidad hacia el receptor de IGF-1.

5 Se ha demostrado que los derivados de insulina que contienen D-aminoácidos en su posición A1 retienen su actividad biológica [Geiger R, Geisen K, Regitz G, Summ HD, Langner D., Hoppe Seylers Z Physiol Chem. Abril, 1980; 361 (4): 563-70]. Se ha demostrado que los derivados de insulina que contienen D-Glu en la posición B21 son equipotentes con insulina natural [Wang SH, Hu SQ, Burke GT, Katsoyannis PG. J Protein Chem. Junio 1991; 10 (3): 313-24.]

10 La presente invención busca proporcionar nuevos análogos de insulina de cadena sencilla que exhiban propiedades terapéuticas útiles, en los que dos cadenas de insulina se conectan a través de la cadena lateral de aminoácidos de al menos un aminoácido en la cadena A o la cadena B de insulina.

Declaración de invención

15 Un primer aspecto de la invención se refiere a un análogo de insulina de cadena sencilla según se define en las reivindicaciones.

20 Los análogos de insulina que se reivindican actualmente difieren de aquellos que se conocen en la técnica en virtud del hecho de que las cadenas de insulina se ligan a través del grupo funcional de al menos una cadena lateral de un aminoácido que ya forma parte de la cadena A o la cadena B de insulina. Por este motivo, son distintos de los péptidos de cadena sencilla convencionales y no pueden considerarse como péptidos "de tipo proinsulina".

25 Los péptidos de tipo proinsulina, muchos de los cuales se describen en la literatura y se conocen en la naturaleza, contienen un péptido de conexión convencional, por ejemplo, donde el aminoácido N-terminal de una de las cadenas de insulina se liga con el aminoácido C-terminal de la otra. Dichos péptidos pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante convencionales. Sin embargo, resulta imposible producir los análogos de insulina que se reivindican actualmente mediante metodología de ADN recombinante u otros métodos biológicos. De acuerdo con esto, los análogos de insulina que se describen en la presente son los prototipos de un nuevo grupo de insulinas de
30 cadena sencilla que no se conocen en la técnica con anterioridad.

La incorporación de una ligación entre un grupo funcional de un aminoácido de una cadena y el grupo funcional de la cadena lateral de un aminoácido de la otra cadena significa que al menos uno de los grupos esenciales para la actividad biológica, a saber la función amino N-terminal de la cadena A o la función carboxilo C-terminal de la
35 cadena B, permanece libre.

De manera ventajosa, la incorporación de una ligación adicional entre la cadena A y la cadena B disminuye la flexibilidad de las cadenas, lo que a su vez reduce la fibrilación y la precipitación y aumenta la estabilidad química y enzimática. Las insulinas de cadena sencilla donde las cadenas A y B se conectan a través de un péptido C exhiben,
40 frecuentemente, mayor estabilidad química, pero tienden a mostrar menor afinidad hacia el receptor de insulina porque la función amino N-terminal de la cadena A y la función carboxilo C-terminal de la cadena B están bloqueadas. Los análogos de insulina de cadena sencilla que se reivindican actualmente conservan las ventajas de una ligación adicional entre las cadenas para disminuir la flexibilidad, al tiempo que se alivia el problema de la baja afinidad al liberar uno o ambos de los grupos terminales que son esenciales para la actividad.

45 Descripción detallada

Los análogos de insulina de cadena sencilla que se describen en la presente abarcan un grupo de proteínas que se relacionan de manera estructural en las que las cadenas A y B se ligan de manera covalente a través de al menos un grupo funcional de la cadena lateral de un aminoácido contenido en la cadena A o la B.

De este modo, en una realización preferida, la presente invención se refiere a análogos de insulina de cadena sencilla según se definen en las reivindicaciones que comprenden las cadenas A y B de la insulina humana o animal, o análogos de esta, que se conectan en conjunto, además de mediante enlaces disulfuro intermoleculares,
55 mediante un ligador adicional que se forma entre un grupo funcional de un aminoácido de la cadena A y un grupo funcional de un aminoácido de la cadena B, en los que al menos uno de estos grupos funcionales se encuentra en la cadena lateral de un aminoácido.

Según se usa en la presente, la expresión "análogo de insulina" se refiere a una forma alterada de insulina, diferente de cualquiera que existe en la naturaleza, pero todavía disponible para el cuerpo humano para realizar la misma acción que la insulina humana en los que se refiere a control glucémico. A través de la ingeniería genética del ADN subyacente, la secuencia de aminoácidos de la insulina puede cambiarse para alterar sus características de absorción, distribución, metabolismo y excreción. De manera oficial, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU. (FDA) se refiere a estos como "ligandos del receptor de insulina", a pesar de que los denomina más comúnmente como análogos de insulina. Las modificaciones incluyen análogos de insulina que se absorben más fácilmente del sitio de inyección y, por lo tanto, actúan más rápido que la insulina natural que se inyecta de manera
60 65

subcutánea, destinados a suministrar el nivel de insulina en bolo necesario a la hora de comer (insulina prandial); y aquellos que se liberan lentamente durante un período de entre 8 y 24 horas, destinados a suministrar el nivel basal de insulina durante el día y particularmente durante la noche (insulina basal). Los análogos de insulina de acción rápida incluyen insulina lispro (Eli Lilly and Company) e insulina aspart (Novo Nordisk), mientras que los análogos de insulina de acción prolongada incluyen insulina NPH, insulina glulisina (Sanofi-Aventis), insulina detemir (Novo Nordisk) e insulina glargina (Sanofi-Aventis).

Los análogos de insulina incluyen variantes de insulina. Según se usa en la presente, el término "variante" incluye cualquier variación en la que (a) uno o más residuos de aminoácidos se reemplazan por un residuo de aminoácidos que existe de manera natural o no natural, (b) se invierte el orden de dos o más residuos de aminoácidos, (c) ambos (a) y (b) se presentan en conjunto, (d) un grupo espaciador se presenta entre cualquiera de los dos residuos de aminoácidos, (e) uno o más residuos de aminoácidos se encuentran en forma peptoide, (f) la cadena principal (N-C-C) de uno o más de los residuos de aminoácidos del péptido se ha modificado, o cualquiera de (a)-(f) en combinación. Preferiblemente, las variantes surgen de una de (a), (b) o (c).

Más preferiblemente, uno o dos residuos de aminoácidos se sustituyen por uno o más de otros residuos de aminoácidos. Incluso más preferiblemente, un residuo de aminoácido se sustituye por otro residuo de aminoácido. Preferiblemente, la sustitución es homóloga.

Puede producirse sustitución homóloga (ambos términos sustitución y reemplazo se usan en la presente para referirse al intercambio de un residuo de aminoácido existente, con un residuo alternativo), a saber, una sustitución de igual a igual tal como básica por básica, ácida por ácida, polar por polar, etc. La sustitución no homóloga puede producirse también, a saber, de una clase de residuo a otra, o, de manera alternativa, implicando la inclusión de aminoácidos no naturales tales como ornitina, ácido diaminobutírico ornitina, norleucina ornitina, piridilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina, una lista más detallada de las cuales aparece a continuación. Se puede modificar más de un residuo de aminoácido a la vez.

Según se usa en la presente, los aminoácidos se clasifican de acuerdo con las siguientes clases;

básico; H, K, R

ácido; D, E

no polar; A, F, G, I, L, M, P, V, W

polar; C, N, Q, S, T, Y,

(usando la notación de aminoácidos de una sola letra aceptada internacionalmente) y la sustitución homóloga y no homóloga se define usando estas clases. De este modo la sustitución homóloga se usa para referirse a la sustitución dentro de la misma clase, mientras que la sustitución no homóloga se refiere a la sustitución de una clase diferente o por un aminoácido no natural.

Los grupos espaciadores adecuados que pueden insertarse entre cualquiera de dos residuos de aminoácidos de la fracción transportadora incluyen grupos alquilo tales como grupos metilo, etilo o propilo además de espaciadores de aminoácidos tales como residuos de glicina o β -alanina. Una forma adicional de variación, tipo (e), que implica la presencia de uno o más residuos de aminoácidos en forma peptoide, se comprenderá bien por aquellos expertos en la técnica. Para evitar dudas, "la forma peptoide" se usa para referirse a los residuos de aminoácidos variables en los que el grupo sustituyente de α -carbono se encuentra en el átomo de nitrógeno del residuo en lugar del α -carbono. Los procesos para preparar péptidos en la forma peptoide se conocen en la técnica, por ejemplo, Simon RJ et al., PNAS (1992) 89 (20), 9367-9371 y Horwell DC, Trends Biotechnol. (1995) 13 (4), 132-134. La modificación de tipo (f) puede producirse por métodos tales como los que se describen en la solicitud internacional PCT/GB99/01855.

Resulta preferible que la variación de aminoácidos, preferiblemente del tipo (a) o (b), se produzca de manera independiente en cualquier posición. Según se menciona anteriormente, más de una sustitución homóloga o no homóloga puede producirse de manera simultánea. Puede producirse variación adicional en virtud de invertir la secuencia de un número de residuos de aminoácidos en una secuencia.

En una realización, el residuo de aminoácido de reemplazo se selecciona a partir de los residuos de alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, y valina.

El residuo de aminoácido de reemplazo puede seleccionarse de manera adicional a partir de aminoácidos no naturales según se describe a continuación.

Según se usa en la presente, el término "derivado" se refiere a insulina que se ha sometido a modificación química, por ejemplo, las cadenas laterales de aminoácidos en el N-terminal y/o el C-terminal. Preferiblemente, la

- modificación química sirve para alterar las características de absorción, distribución, metabolismo y excreción características del análogo. Las insulinas semisintéticas se usaron clínicamente durante algún tiempo en base a la modificación química de las insulinas animales, por ejemplo, insulina porcina Novo Nordisk convertida enzimáticamente en insulina semisintética "humana" al retirar el único aminoácido que varía con respecto a la variedad humana, y añadiendo químicamente el aminoácido humano.
- En una realización preferida, la insulina se modifica químicamente para alterar su punto isoeléctrico. La insulina normal sin modificar es soluble a pH fisiológico. Se han creado derivados modificados de la insulina que tienen un punto isoeléctrico cambiado de manera tal que existe un equilibrio de solubilidad en el que la mayoría precipita pero se disuelve lentamente en el torrente sanguíneo y se excreta finalmente por los riñones.
- En una realización preferida, el análogo de insulina de cadena sencilla de la invención deriva de insulina animal.
- La secuencia de aminoácidos de insulinas animales en diferentes mamíferos puede ser similar a la insulina humana (insulina humana INN). Sin embargo, existe una viabilidad considerable dentro de las especies de vertebrados. La insulina porcina tiene una única variación de aminoácido con respecto a la variedad humana, y la insulina bovina varía en tres aminoácidos. Ambas son activas en el receptor humano con aproximadamente la misma fuerza. La insulina bovina y la insulina porcina fueron los primeros análogos de insulina que se usaron clínicamente (que existen de manera natural, producidos por extracción del páncreas animal), en el momento en que la insulina humana biosintética (insulina humana ADNr) no estaba disponible. La insulina de los tiburones y algunas especies de peces puede ser efectiva también.
- Preferiblemente, el análogo de insulina de cadena sencilla de la invención comprende la cadena A de insulina animal, o un análogo o derivado de esta.
- Preferiblemente, el análogo de insulina de cadena sencilla de la invención comprende la cadena B de insulina animal, o un análogo o derivado de esta.
- En otra realización preferida, el análogo de insulina de cadena sencilla de la invención deriva de la insulina humana, o un análogo de esta. Más preferiblemente, la insulina es insulina biosintética (insulina humana ADNr).
- Preferiblemente, el análogo de insulina de cadena sencilla de la invención comprende la cadena A de la insulina humana, o un análogo o derivado de esta.
- Preferiblemente, el análogo de insulina de cadena sencilla de la invención comprende la cadena B de la insulina humana, o un análogo o derivado de esta.
- Según se usa en la presente, la expresión "grupo funcional" se refiere a grupos específicos de átomos o enlaces dentro de una molécula que son responsables de las reacciones químicas características de esa molécula.
- La ligación covalente, L, se encuentra entre el aminoácido C-terminal de dicha cadena A y el grupo funcional de la cadena lateral en el residuo de lisina en la posición 29 de la cadena B.
- En una realización altamente preferida, las dos cadenas se conectan directamente a través de la cadena lateral de un residuo de ácido aspártico o de un residuo de ácido glutámico contenido como el aminoácido C-terminal de la cadena A de insulina y la función amino de la cadena lateral del residuo Lys contenido como el aminoácido C-terminal de la cadena B de insulina.
- En otra realización, las dos cadenas de insulina se ligan a través de un grupo, L, que puede comprender por sí mismo, partes X, Y, Z individuales. Para esta realización en particular, los grupos X, Y y Z no forman parte de las cadenas A o B nativas de insulina.
- En una realización preferida, el grupo L puede comprender uno o más aminoácidos naturales o no naturales, péptidos (que puede contener residuos de aminoácidos no naturales), o varios modificadores de péptidos tales como diácidos, diaminas, poli y oligoetilenglicoles, tiadiácidos, tiaaminoácidos, aminotioles, etc. Los componentes X, Y y Z se pueden intercambiar en su secuencia y repetirse de manera opcional.
- Más específicamente, el grupo ligador L contiene al menos un "modificador" en forma de un grupo X o un grupo Y. De manera adicional, el grupo ligador L puede comprender además uno o más residuos de aminoácidos/péptidos convencionales (Z).
- Según se usa en la presente, el término "modificador" se refiere a cualquier grupo que puede modificar las propiedades biológicas y fisicoquímicas de un péptido.
- El ligador covalente, L, es un grupo que comprende:

(i) al menos un grupo X; y/o

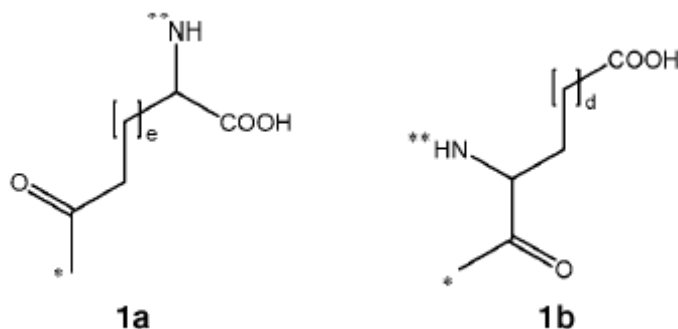
(ii) al menos un grupo Y; y/o

5 (iii) al menos un grupo Z;

en el que:

X es un grupo de fórmula 1a o 1b

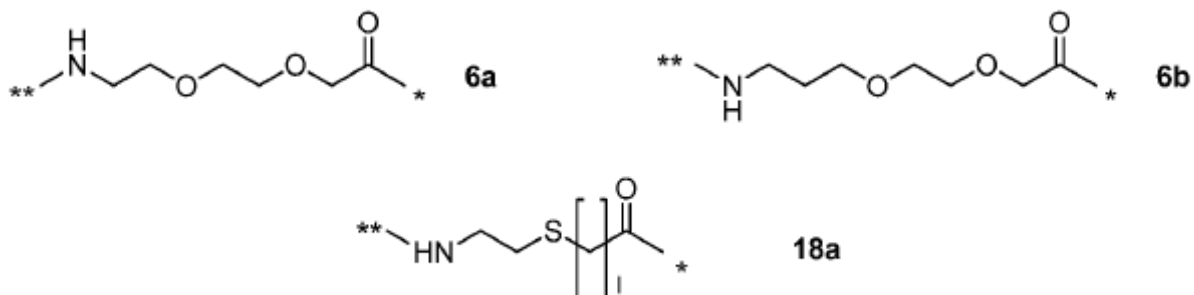
10



en el que d y e son cada uno de manera independiente un número entero que se selecciona a partir de 0 a 10, y * y ** indican los puntos de unión con los grupos adyacentes respectivos;

15

Y es un grupo que se selecciona a partir de los siguientes:



20 en el que l es 1, 2, 3, 4 o 5, y * y ** indican los puntos de unión con los grupos adyacentes respectivos; y

Z es un aminoácido natural o no natural.

25 Según se usa en la presente, el término "alquilo" incluye tanto grupos alquilo saturados de cadena lineal como ramificados que pueden sustituirse (mono o poli) o no sustituirse. Preferiblemente, el grupo alquilo es un grupo alquilo C₁₋₂₀, más preferiblemente un C₁₋₁₅, todavía más preferiblemente un grupo alquilo C₁₋₁₂, todavía más preferiblemente, un grupo alquilo C₁₋₆, más preferiblemente un grupo alquilo C₁₋₃. Los grupos alquilo particularmente preferidos incluyen, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo, pentilo y hexilo. Los sustituyentes adecuados incluyen, por ejemplo, uno o más grupos que se seleccionan a partir de OH, O-alquilo, halógeno, NH₂, NH-alquilo, N-(alquilo)₂, CF₃, NO₂, CN, COO-alquilo, COOH, CONH₂, CO-NH-alquilo, CO-N

30 (alquilo)₂, SO₂-alquilo, SO₂NH₂ y SO₂-NH-alquilo.

35 Según se usa en la presente, el término "arilo" se refiere a un grupo aromático C₆₋₁₂ que puede sustituirse (mono- o poli-) o no sustituirse. Los ejemplos comunes incluyen fenilo y naftilo, etc. Los sustituyentes adecuados incluyen, por ejemplo, uno o más grupos que se seleccionan a partir de OH, O-alquilo, halógeno, NH₂, NH-alquilo, N-(alquilo)₂, CF₃, NO₂, CN, COO-alquilo, COOH, CONH₂, CO-NH-alquilo, CO-N(alquilo)₂, SO₂-alquilo, SO₂NH₂ y SO₂-NH-alquilo.

El término "aralquilo" se usa como una conjunción de los términos alquilo y arilo según se indican anteriormente.

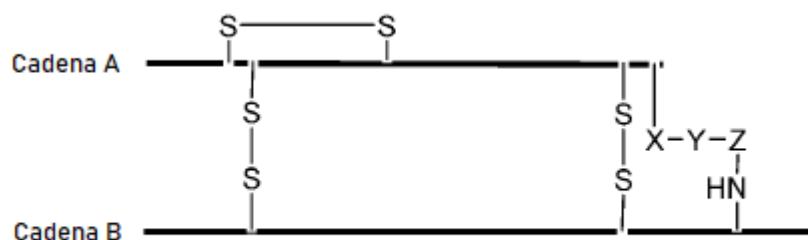
40 Los aminoácidos naturales incluyen alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, y valina.

Según se usa en la presente, el término "aminoácido no natural" o "aminoácido innatural" incluye aminoácidos alfa y alfa disustituido, N-alkil aminoácidos, ácido láctico, derivados de haluro de aminoácidos naturales tal como trifluorotirosina, p-Cl-fenilalanina, p-F-fenilalanina, p-Br-fenilalanina, p-NO₂-fenilalanina, fenilglicina, sarcosina, penicilamina, D-2-metilriptófano, fosfoserina, fosfotreonina, fosfotirosina, p-l-fenilalanina, L-alil-glicina, β-alanina, ácido β-aspártico, β-ciclohexilalanina, citrulina, homoserina, homocisteína, ácido piroglutámico, ácido L-α-aminobutírico, ácido L-γ-aminobutírico, ácido L-α-amino isobutírico, α-ciclohexilglicina, ácido diaminobutírico, ácido diaminopimélico, N-ε-dinitrofenil-lisina, L-1-naftilalanina, L-2-naftilalanina, 3-(2-piridil)-L-alanina, 3-(3-piridil)-L-alanina, 3-(4-piridil)-L-alanina, N-ε-metil-lisina, N,N-ε-dimetil-lisina, N,N,N-ε-trimetil-lisina, ácido 3-mercaptopropiónico, ácido L-ε-amino caproico, ácido 7-amino heptanoico, ácido 6-amino hexanoico L-metionina sulfona, ornitina, L-norleucina, L-norvalina, p-nitro-L-fenilalanina, L-hidroxiprolina, ácido γ-glutámico, ácido γ-amino butírico L-tioprolina, derivados de metilo de fenilalanina (Phe) tal como 4-metil-Phe, pentametil-Phe, L-Phe (4-amino), L-Tyr (metil), L-Phe (4-isopropil), L-Tic (ácido 1,2,3,4tetrahidroisoquinolina-3-carboxilo), ácido L-diaminopropiónico y L-Phe (4-bencilo).

De manera ventajosa, la introducción de aminoácidos no naturales conduce a un aumento de la estabilidad enzimática de los péptidos.

Los análogos de insulina de la presente invención pueden comprender aminoácidos en la forma L o D, a saber, uno o más residuos, preferiblemente todos los residuos, pueden estar en la forma L o D. En una realización preferida, la ligación entre las cadenas se forma entre el aminoácido C-terminal de la cadena A de la insulina humana o animal, o análogo o derivado de esta, y la cadena lateral del residuo de lisina en la posición 29 de la cadena B de la insulina humana o animal, o análogo o derivado de esta.

En una realización preferida, el grupo ligador L se encuentra entre un grupo carboxilo de cadena lateral de un amino diácido presente en la parte C-terminal de la cadena A y la cadena lateral de un diaminoácido posicionado en la posición B29 de la cadena B (ver estructura 3). Según se usa en la presente, la expresión "parte C-terminal" se refiere a los últimos 10 aminoácidos de la cadena A incluyendo posibles extensiones de péptidos.



estructura 3= conexión de cadena lateral en insulinas de cadena sencilla

El ligador puede ser de cualquier longitud siempre que el ligador proporcione la conformación estructural necesaria para el análogo de insulina de cadena sencilla para tener un efecto de captación de glucosa y de unión con el receptor de insulina.

El grupo ligador L se incorpora en la cadena lateral Lys(B29). En una realización altamente preferida, el ligador comprende un modificador lipófilico, o comprende un modificador que combina propiedades lipófilicas e hidrofílicas.

En una realización preferida, la cadena A comprende los aminoácidos 1 a 21 de la insulina humana contando desde el extremo N-terminal de la cadena A.

En una realización preferida, la cadena A consiste en los aminoácidos 1 a 21 de la insulina humana contando desde el extremo N-terminal de la cadena A.

En otra realización preferida, la cadena A comprende los aminoácidos 1 a 20 de la insulina humana contando desde el extremo N-terminal de la cadena A.

En otra realización preferida, la cadena A consiste en los aminoácidos 1 a 20 de la insulina humana contando desde el extremo N-terminal de la cadena A.

En una realización preferida, la cadena B comprende los aminoácidos 1 a 29 de la insulina humana contando desde el extremo N-terminal de la cadena B

En una realización preferida, la cadena B consiste en los aminoácidos 1 a 29 de la insulina humana contando desde el extremo N-terminal de la cadena B.

En una realización preferida, la cadena B de insulina comprende además hasta 20 aminoácidos naturales o no naturales adicionales en el extremo C-terminal. Preferiblemente, la cadena B comprende además de 1 a 10, o más preferiblemente de 1 a 5 aminoácidos naturales o no naturales adicionales en el extremo C-terminal. En una realización altamente preferida, la cadena B comprende, además, 1, 2 o 3 aminoácidos naturales o no naturales adicionales en el extremo C-terminal. Todavía más preferiblemente, la cadena B comprende además 1, 2 o 3 aminoácidos naturales adicionales en el extremo C-terminal.

El análogo de insulina de cadena sencilla comprende uno o más de:

(i) un enlace disulfuro intermolecular entre la cisteína en la posición 7 de la cadena A de insulina y la cisteína en posición 7 de la cadena B de insulina;

(ii) un enlace disulfuro intermolecular entre la cisteína en la posición 20 de la cadena A de insulina y la cisteína en la posición 19 de la cadena B de insulina;

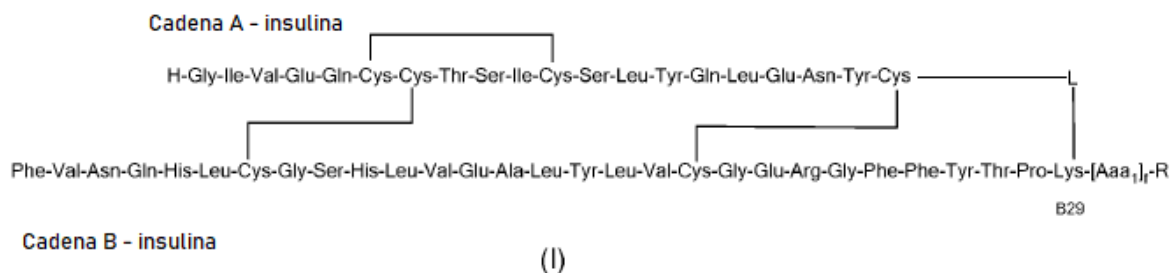
(iii) un enlace disulfuro intramolecular entre la cisteína en la posición 6 y la cisteína en la posición 11 de la cadena A de insulina.

En una realización preferida, el análogo de insulina de cadena sencilla comprende uno de (i), (ii) y (iii) anteriores.

En otra realización preferida, el análogo de insulina de cadena sencilla comprende dos de (i), (ii) y (iii) anteriores.

En otra realización preferida, el análogo de insulina de cadena sencilla comprende (i), (ii) y (iii) anteriores.

En una realización preferida, el análogo de insulina de cadena sencilla es de fórmula (I),



en el que:

L es según se define anteriormente;

cada Aaa₁ es de manera independiente un aminoácido natural o no natural;

f es de 0 a 20;

R es OH o NH₂.

En una realización preferida, R es OH, f es 0, 1, 2 o 3 y cada Aaa₁ es de manera independiente un aminoácido natural. Más preferiblemente, el aminoácido natural se selecciona a partir de Arg y Thr.

En una realización preferida, L se selecciona a partir de los siguientes grupos:

(i) -(X)_a-(Y)_b-(Z)_c-

(ii) -(Y)_b-(X)_a-(Z)_c-

(iii) -(Y)_b-(Z)_c-(X)_a-

(iv) -(X)_a-(Z)_c-(Y)_b-

(v) -(Z)_c-(X)_a-(Y)_b-

(vi) -(Z)_c-(Y)_b-(X)_a-

donde a, b y c son cada uno de manera independiente un número entero que se selecciona a partir de 0 a 5.

En una realización preferida, a, b y c son cada uno de manera independiente 0, 1 o 2.

En una realización preferida, L es $-(X)_a-(Y)_b-(Z)_c-$ donde a es 1, y b y c son ambos 0.

5 En otra realización preferida, L es $-(X)_a-(Y)_b-(Z)_c-$ donde a y b son 1, y c es 0.

En otra realización preferida, L es $-(X)_a-(Y)_b-(Z)_c-$ donde a es 1, b es 2, y c es 0.

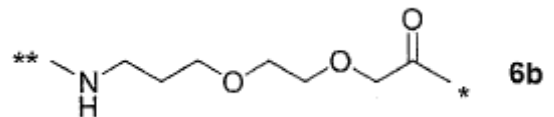
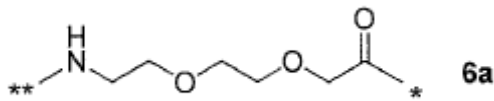
En otra realización preferida, L es $-(X)_a-(Y)_b-(Z)_c-$ donde a es 1, b es 0 y c es 2.

10 En otra realización preferida, L es $-(X)_a-(Y)_b-(Z)_c-$ donde a es 0, b es 0 y c es 1 o 2.

En una realización preferida, X es un grupo de fórmula 1a según se define anteriormente.

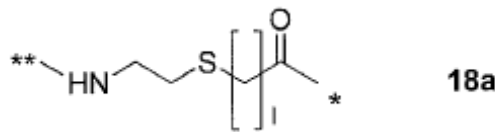
15 En una realización preferida, Y es un grupo de fórmula 6 según se define anteriormente.

En una realización preferida, Y es un grupo de fórmula 6a o 6b.



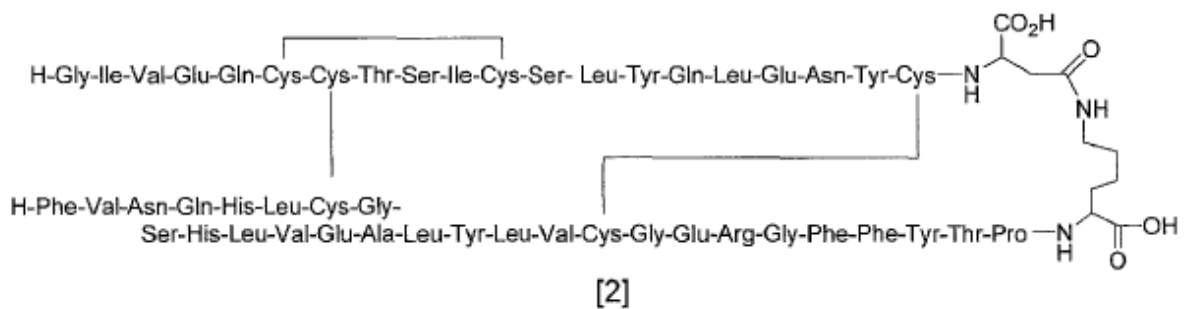
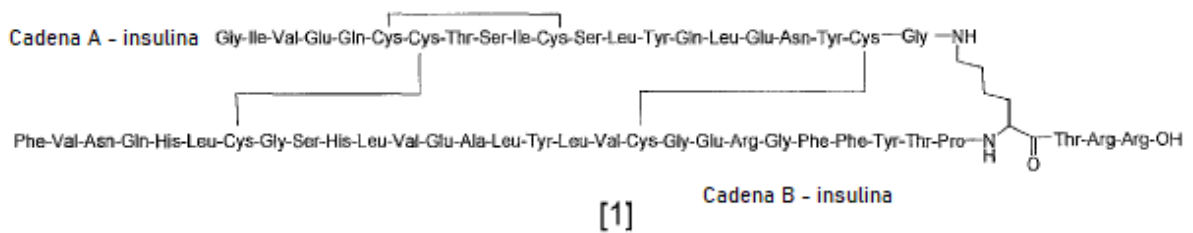
20 donde * y ** indican los puntos de unión con los grupos adyacentes respectivos. En una realización preferida, Y es un grupo de fórmula 18 según se define anteriormente.

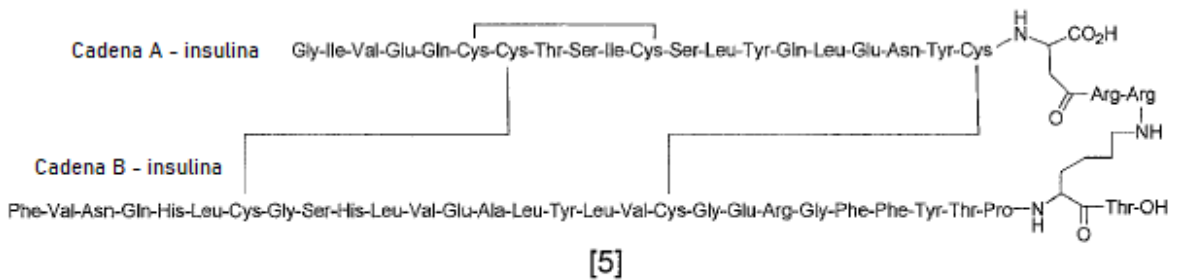
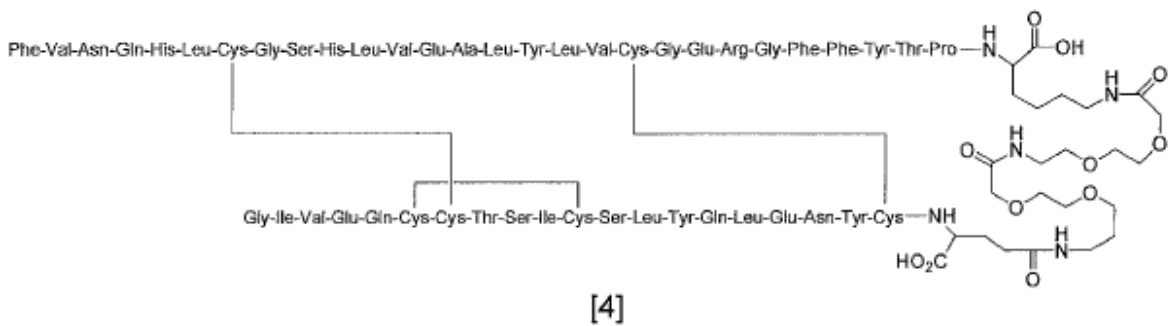
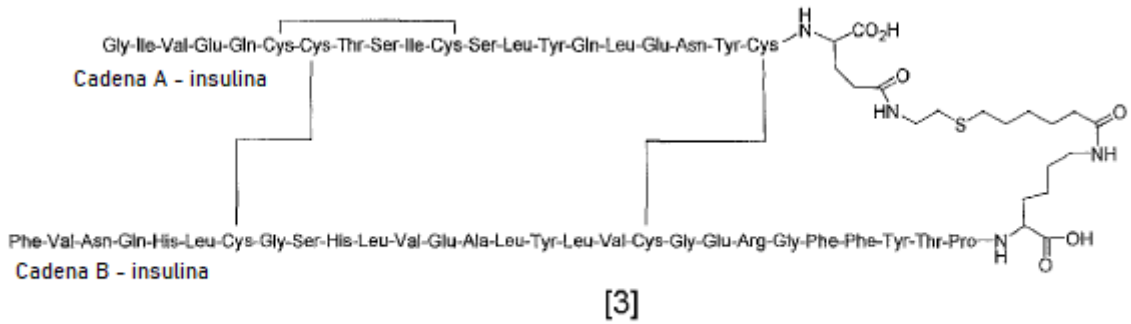
25 En una realización preferida, Y es un grupo de fórmula 18a, donde l es 1, 2, 3, 4 o 5.



donde * y ** indican los puntos de unión con los grupos adyacentes respectivos.

30 En una realización preferida, la insulina de cadena sencilla se selecciona a partir de lo siguiente:





5 Composiciones farmacéuticas

Un aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un análogo de insulina según se define en las reivindicaciones mezclado con un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, o una mezcla de estos. Aunque los análogos de la presente invención (incluyendo sus sales farmacéuticamente aceptables, ésteres y solvatos farmacéuticamente aceptables) pueden administrarse individualmente, se administrarán, de manera general, mezclados con un vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico, particularmente para terapia humana. Las composiciones farmacéuticas pueden ser para uso en humanos o animales en medicina humana y veterinaria.

15 Ejemplos de dichos excipientes adecuados para las diversas formas diferentes de composiciones farmacéuticas que se describen en la presente pueden encontrarse en "Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2da. edición, (1994), editado por A Wade y PJ Weller.

Los vehículos o diluyentes aceptables para su uso terapéutico se conocen bien en la técnica farmacéutica, y se describen en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (edición de A. R. Gennaro. 1985).

Ejemplos de vehículos adecuados incluyen lactosa, almidón, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, manitol, sorbitol y similares. Ejemplos de diluyentes adecuados incluyen etanol, glicerol y agua.

25 La elección del vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico puede llevarse a cabo con respecto a la vía de administración y práctica farmacéutica convencional previstas. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender, como vehículo, excipiente o diluyente, o de manera adicional a estos, cualquiera de los aglutinantes, lubricantes, agentes de suspensión, agentes de recubrimiento, agentes solubilizantes adecuados.

Ejemplos de aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa, lactosa anhidra, lactosa de flujo libre, beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas, tales como acacia, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa y polietilenglicol.

5 Ejemplos de lubricantes adecuados incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares.

10 Se pueden proporcionar conservantes, estabilizantes, colorantes e incluso agentes aromatizantes en la composición farmacéutica. Los ejemplos de conservantes incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. Se pueden usar, además, antioxidantes y agentes de suspensión.

Sales/ésteres

15 Los análogos de insulina de la presente invención pueden presentarse como sales o ésteres, en particular, sales o ésteres farmacéuticamente aceptables.

20 Las sales farmacéuticamente aceptables de los análogos de la invención incluyen sales de adición de ácidos o sales básicas de estos adecuadas. Se puede encontrar una revisión de sales farmacéuticas adecuadas en Berge et al., J Pharm Sci, 66, 1-19 (1977). Las sales se forman, por ejemplo, con ácidos inorgánicos fuertes tales como ácidos minerales, por ejemplo, ácido sulfúrico, ácido fosfórico o haluros de hidrógeno; con ácidos carboxílicos orgánicos fuertes, tales como ácidos alcanocarboxílicos de 1 a 4 átomos de carbono que no se sustituyen o se sustituyen (por ejemplo, por halógeno), tal como ácido acético; con ácidos dicarboxílicos saturados o insaturados, por ejemplo oxálico, malónico, succínico, maleico, fumárico, ftálico o tetraftálico; con ácidos hidroxicarboxílicos, por ejemplo, ácido ascórbico, glicólico, láctico, málico, tartárico o cítrico; con aminoácidos, por ejemplo ácido aspártico o glutámico; con ácido benzoico; o con ácidos sulfónicos orgánicos, tales como ácidos (C₁-C₄)-alquil- o aril-sulfónicos que no se sustituyen o se sustituyen (por ejemplo, por un halógeno) tal como ácido metano o p-toluenosulfónico.

30 Los ésteres se forman usando ya sea ácidos orgánicos o alcoholes/hidróxidos, lo que depende del grupo funcional bajo esterificación. Los ácidos orgánicos incluyen ácidos carboxílicos, tales como ácidos alcanocarboxílicos de 1 a 12 átomos de carbono que no se sustituyen o se sustituyen (por ejemplo, por halógeno), tal como ácido acético; con ácido dicarboxílico saturado o no saturado, por ejemplo oxálico, malónico, succínico, maleico, fumárico, ftálico o tetraftálico; con ácidos hidroxicarboxílicos, por ejemplo, ácido ascórbico, glicólico, láctico, málico, tartárico o cítrico; con aminoácidos, por ejemplo ácido aspártico o glutámico; con ácido benzoico; o con ácidos sulfónicos orgánicos, tales como ácidos (C₁-C₄) -alquil- o aril-sulfónicos que no se sustituyen o se sustituyen (por ejemplo, por un halógeno) tal como ácido metano o p-tolueno sulfónico. Los hidróxidos adecuados incluyen hidróxidos inorgánicos, tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, hidróxido de aluminio. Los alcoholes incluyen alcanolcoholes de 1-12 átomos de carbono que pueden no sustituirse o sustituirse, por ejemplo, por un halógeno).

40 Enantiómeros/tautómeros

45 En todos los aspectos de la presente invención que se analizan con anterioridad, la invención incluye, cuando resulta apropiado, todos los enantiómeros y tautómeros de los análogos de la invención. El experto en la técnica reconocerá compuestos que poseen propiedades ópticas (uno o más átomos de carbono quirales) o características tautoméricas. Los enantiómeros correspondientes y/o los tautómeros pueden aislarse/prepararse mediante métodos que se conocen en la técnica.

50 Estereoisómeros e isómeros geométricos

55 Algunos de los análogos de la invención pueden existir como estereoisómeros y/o isómeros geométricos, por ejemplo, estos pueden poseer uno o más centros asimétricos y/o geométricos de manera que pueden existir en dos o más estereoisómeros y/o formas geométricas. La presente invención contempla el uso de todos los estereoisómeros e isómeros geométricos individuales de aquellos análogos, y mezclas de estos. Los términos que se usan en las reivindicaciones abarcan estas formas, siempre que dichas formas conserven la actividad funcional adecuada (aunque no necesariamente en la misma medida).

60 La presente invención incluye además todas las variaciones isotópicas adecuadas de los análogos o sales farmacéuticamente aceptables de estos. Una variación isotópica se define como aquella en la que al menos un átomo se reemplaza por un átomo que tiene el mismo número atómico pero una masa atómica diferente con respecto a la masa atómica que se encuentra normalmente en la naturaleza. Ejemplos de isótopos que pueden incorporarse al agente y sales farmacéuticamente aceptables de estos incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor y cloro tales como ²H, ³H, ¹³C, ¹⁴C, ¹⁵N, ¹⁷O, ¹⁸O, ³¹P, ³²P, ³⁵S, ¹⁸F y ³⁶Cl, respectivamente. Determinadas variaciones isotópicas, por ejemplo, aquellas en las que se incorpora un isótopo radiactivo tal como ³H o ¹⁴C, son útiles en estudios de distribución de fármacos y/o tejidos de sustrato. Los isótopos tritados, a saber, ³H, y carbono-14, a saber, ¹⁴C, son particularmente preferidos por su facilidad de preparación y

capacidad de ser detectados. Además, la sustitución con isótopos tales como deuterio, a saber, ^2H , puede proporcionar determinadas ventajas terapéuticas que resultan de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, vida media *in vivo* aumentada o requisitos de dosificación reducidos y, por lo tanto, puede preferirse en algunas circunstancias. Variaciones isotópicas de los análogos de la presente invención y sales farmacéuticamente aceptables de estos de esta invención puede prepararse, de manera general, mediante procedimientos convencionales usando variaciones isotópicas apropiadas de reactivos adecuados.

Solvatos

La presente invención incluye además formas de solvato de los análogos de la presente invención. Los términos que se usan en las reivindicaciones abarcan estas formas.

Polimorfos

La invención se refiere, además, a análogos de la presente invención en sus diversas formas cristalinas, formas polimórficas y formas anhidras. Se conoce bien dentro de la industria farmacéutica que los compuestos químicos pueden aislarse en cualquiera de dichas formas variando ligeramente el método de purificación y/o aislamiento de los solventes que se usan en la preparación sintética de dichos compuestos.

Profármacos

La invención incluye además análogos de la presente invención en forma de profármaco. Dichos profármacos son, de manera general, análogos de la invención en los que uno o más grupos apropiados se han modificado de manera tal que la modificación puede revertirse tras la administración a un sujeto humano o mamífero. Dicha reversión se realiza, de manera general, por una enzima que se presenta naturalmente en dicho sujeto, aunque es posible que se administre un segundo agente junto con un profármaco como tal con el fin de realizar la reversión *in vivo*. Ejemplos de dichas modificaciones incluyen éster (por ejemplo, cualquiera de aquellos que se describen con anterioridad), en los que la reversión puede llevarse a cabo por una esterasa, etc. Otros sistemas como tales se conocerán bien por aquellos expertos en la técnica.

Administración

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden adaptarse para vías de administración oral, rectal, vaginal, parenteral, intramuscular, intraperitoneal, intraarterial, intratecal, intrabronquial, subcutánea, intradérmica, intravenosa, nasal, bucal o sublingual.

Para la administración oral, se hace uso particular de tabletas comprimidas, píldoras, comprimidos, cápsulas de gel, gotas y cápsulas. Preferiblemente, estas composiciones contienen de 1 a 250 mg y más preferiblemente de 10-100 mg, de ingrediente activo por dosis.

Otras formas de administración comprenden soluciones o emulsiones que pueden inyectarse por vía intravenosa, intraarterial, intratecal, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal o intramuscular, y que se preparan a partir de soluciones estériles o esterilizables. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden encontrarse, además, en forma de supositorios, pesarios, suspensiones, emulsiones, lociones, ungüentos, cremas, geles, aerosoles, soluciones o polvos para uso externo.

Un medio alternativo de administración transdérmica consiste en el uso de un parche para la piel. Por ejemplo, el ingrediente activo puede incorporarse en una crema que consiste en una emulsión acuosa de polietilenglicoles o parafina líquida. El ingrediente activo puede incorporarse además, a una concentración de entre 1 y 10% en peso, en una pomada que consiste en una cera blanca o una base de parafina blanda blanca junto con los estabilizadores y conservantes que se requieran.

Las formas inyectables pueden contener entre 10 - 1000 mg, preferiblemente entre 10 - 250 mg, de ingrediente activo por dosis.

Las composiciones pueden formularse en forma de dosificación unitaria, a saber, en forma de porciones discretas que contienen una dosis unitaria, o una unidad múltiple o subunidad de una dosis unitaria.

Dosificación

Una persona de capacidad ordinaria en la técnica puede determinar fácilmente una dosis apropiada de una de las composiciones instantáneas para administración a un sujeto sin experimentación excesiva. Comúnmente, un médico determinará la dosificación real que será la más adecuada para un paciente individual y dependerá de una variedad de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el modo y tiempo de administración, la tasa de excreción, la combinación de medicamentos, la severidad de la condición en particular, y

el individuo que se somete a terapia. Las dosificaciones que se describen en la presente son de ejemplo del caso promedio. Pueden existir, por supuesto, casos individuales que ameriten rangos de dosificación más altos o más bajos, y dichos casos se encuentran dentro del alcance de esta invención.

- 5 Dependiendo de la necesidad, el agente puede administrarse a una dosis de 0,01 a 30 mg/kg de peso corporal, tal como de 0,1 a 10 mg/kg, más preferiblemente de 0,1 a 1 mg/kg de peso corporal.

En una realización de ejemplo, se administrarán una o más dosis de 10 a 150 mg/día al paciente.

10 **Uso terapéutico**

Otro aspecto de la invención se refiere a análogos de insulina de cadena sencilla según se definen en las reivindicaciones para su uso como un medicamento.

- 15 Otro aspecto de la invención se refiere a análogos de insulina de cadena sencilla según se definen en las reivindicaciones para su uso en el tratamiento o prevención de la diabetes, o el tratamiento o la prevención de la hiperglucemia.

- 20 Otro aspecto de la invención se refiere a análogos de insulina de cadena sencilla según se definen en las reivindicaciones en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes, o el tratamiento o la prevención de la hiperglucemia.

- 25 Según se usa en la presente, la frase "preparación de un medicamento" incluye el uso de un análogo de la invención directamente como el medicamento, además de su uso en un programa de detección para agentes terapéuticos adicionales o en cualquier etapa de la fabricación de un medicamento como tal.

- 30 Otro aspecto de la invención se refiere a un método para el tratamiento de la diabetes o el tratamiento o la prevención de la hiperglucemia en un sujeto que así lo necesita, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un análogo de insulina de cadena sencilla según se define en las reivindicaciones.

La presente invención se describe de manera adicional mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

35 **Abreviaturas**

Boc	t-butiloxicarbonilo
CTC	cloruro de clorotritilo
NMP	N-metilpirrolidona
DCM	diclorometano
TFA	ácido trifluoroacético
RE	evaporador rotativo
DEE	dietil éter
DIC	N,N'-diisopropilcarbodiimida
HOBt	hidroxibenzotriazol
HOSu	N-hidroxisuccinimida
DMF	dimetilformamida
EDAC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
RT	temperatura ambiente

DTT	ditiotreitolo
DMSO	dimetilsulfóxido
MMt	monometoxitritilo
Trt	tritilo
DIPEA	N,N-diisopropiletilamina
Fmoc	fluorenilmetiloxicarbonilo
MeOH	metanol
AcOH	ácido acético
TFE	alcohol trifluoroetilico
Dde	N-(1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)etil)

Ejemplo 1

Síntesis de insulina de cadena sencilla de estructura 10.

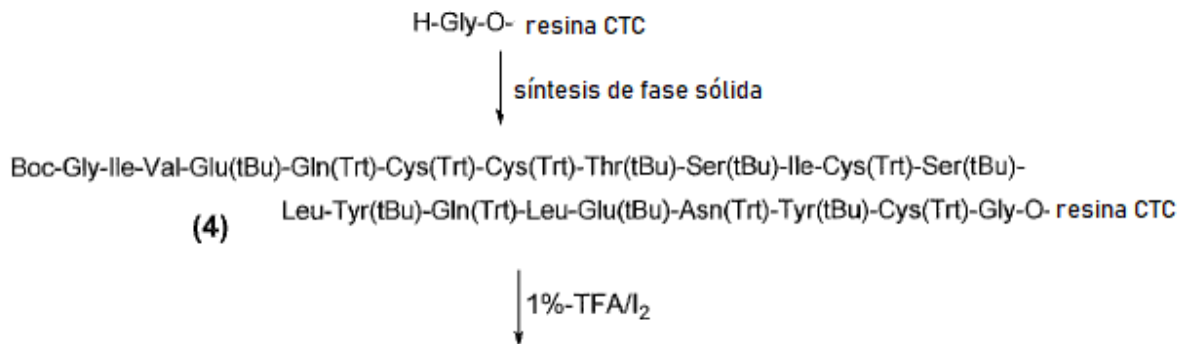
5

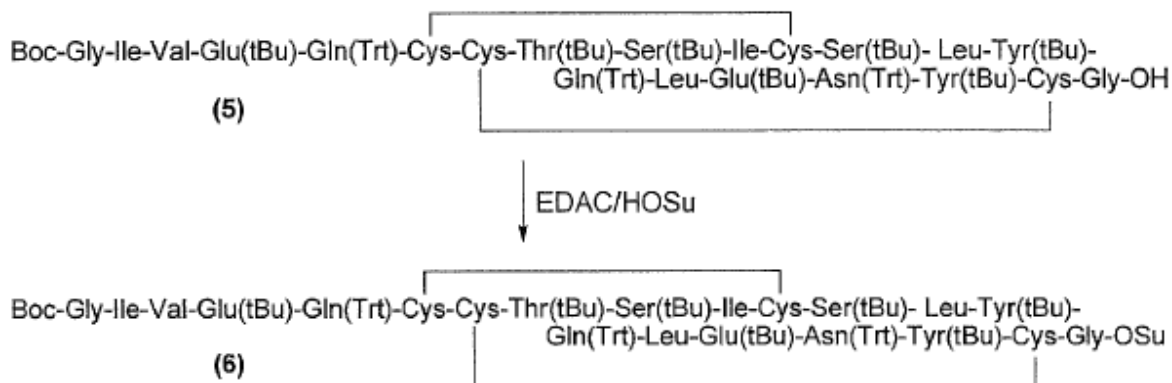
(A) Síntesis de cadena de insulina Gly(A21) de grupo carboxilo activado y parcialmente protegida de estructura 6

10

3,0 g (1,0 mmol) de H-Gly-O-resina CTC (disponible comercialmente, producto de CBL-Patras) se elongaron a la cadena Gly(A21) protegida unida a resina usando aminoácidos Fmoc (productos de CBL-Patras) y DIC/HOBt para la activación de los aminoácidos a excepción del residuo Gly(A1) que se introdujo usando Boc-Gly-OH. Luego se lavó la resina 4X con NMP y 6X con DCM y luego, el péptido protegido se escindió de la resina y se oxidó de manera simultánea mediante lavado 8X con TFA al 1% en DCM que contiene 20,0 mmol de yodo. Los filtrados de los lavados con TFA al 1% se dejaron caer en una solución de Na₂S₂O₃ al 3%, la capa de DCM se lavó con la solución de Na₂S₂O₃ y agua, se concentró en el RE y el péptido protegido se precipitó luego con la adición de DEE, se lavó con DEE y se secó al vacío hasta un peso constante. Rendimiento 3,04 g (90,0%).

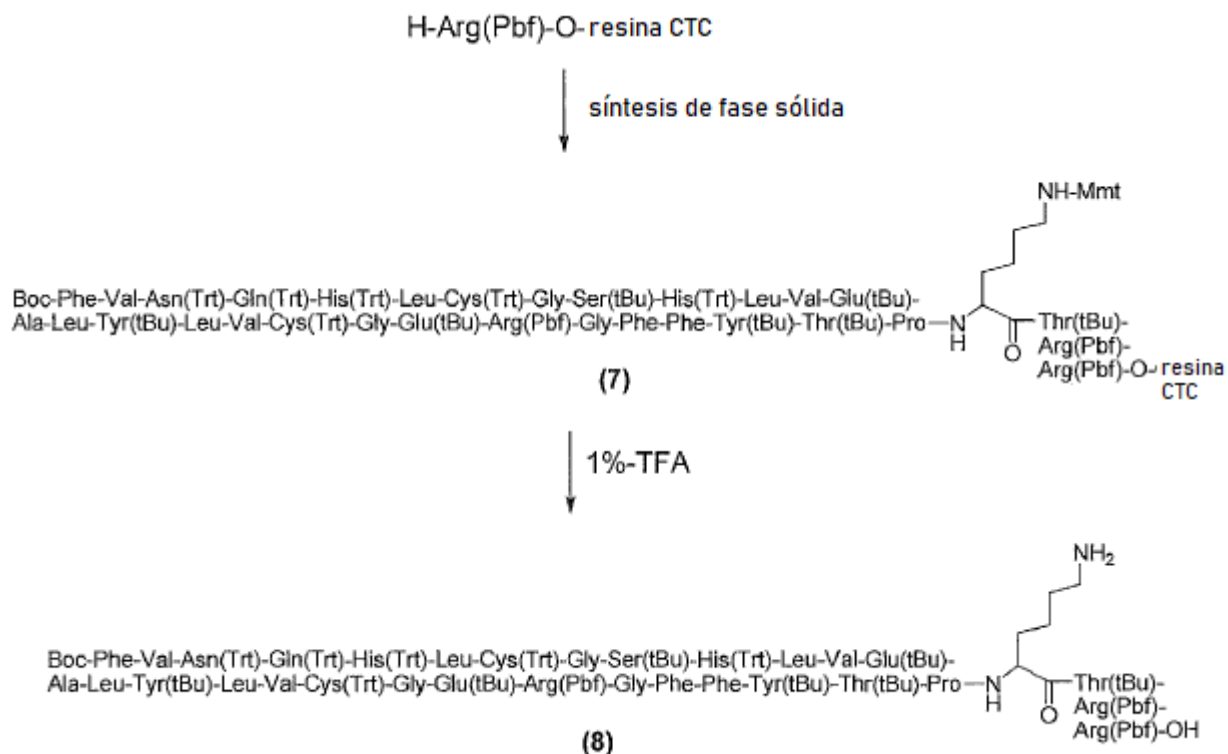
15





(B) Síntesis de fase sólida de cadena B de la insulina humana, B(Arg31), B(Arg32) desprotegida de manera selectiva en Lys²⁹ de estructura 8.

- 5 4,0 g (1,0 mmol) de H-Arg (Pbf)-O-resina CTC (disponible comercialmente de CBL-Patras), se elongaron a la cadena Arg(B31), Arg(B32) protegida, unida a resina, usando aminoácidos Fmoc y DIC/HOBt para la activación de los aminoácidos a excepción del residuo Phe(B1) que se introdujo usando Boc-Phe-OH. La resina se lavó luego 4X con NMP y 6X con DCM y luego, el péptido protegido se escindió de la resina mediante lavado 8X con TFA al 1% en DCM. Los filtrados de los lavados con TFA al 1% se dejaron caer en una solución de agua de piridina al 1%, la capa de DCM se lavó con agua, se concentró en el RE y el péptido protegido se precipitó luego con la adición de DEE, se lavó con DEE y se secó al vacío hasta peso constante. Rendimiento 5,61 g (90,2%).
- 10



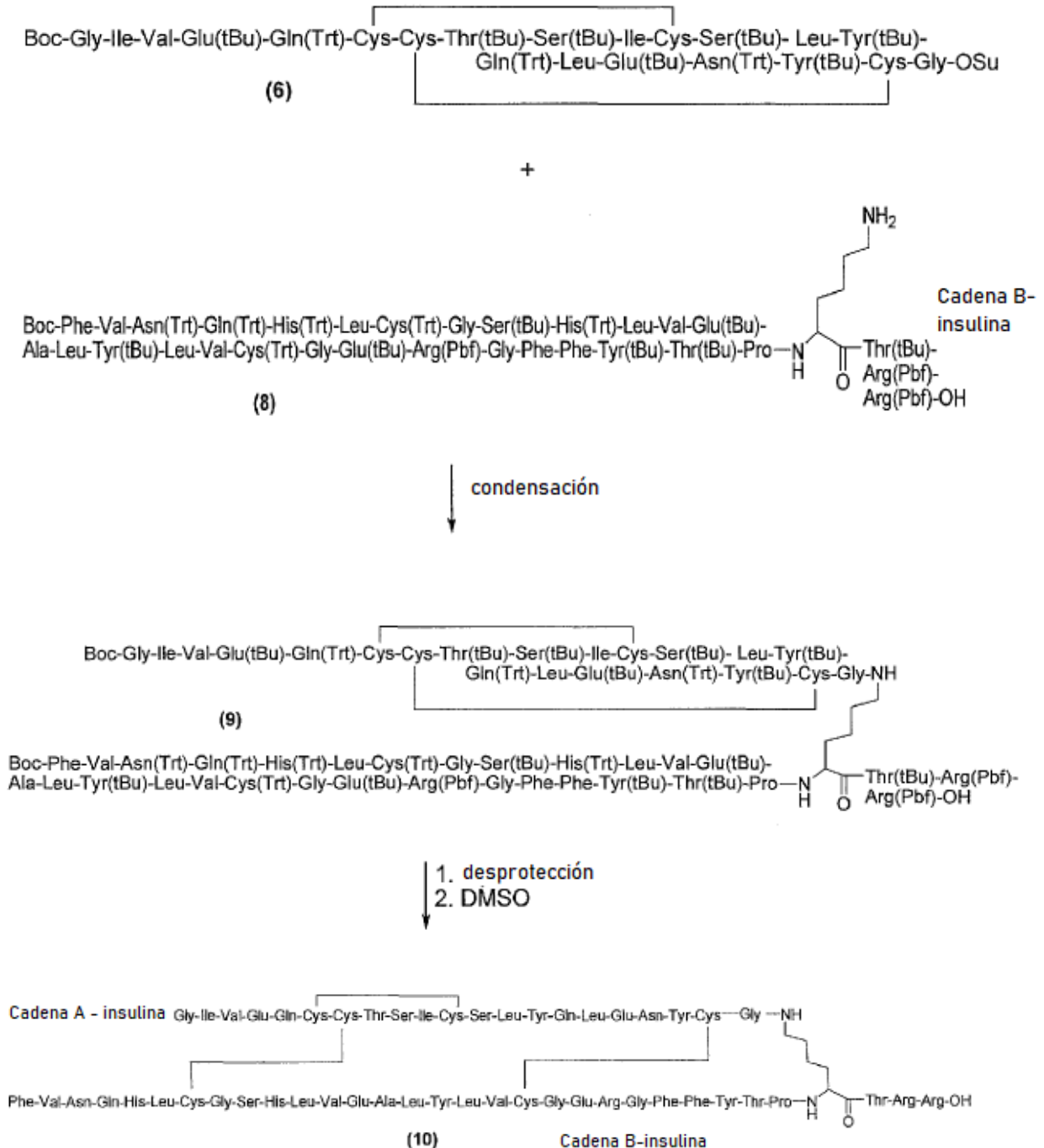
- 15 (C) Condensación en solución - Síntesis de insulina de cadena sencilla No. 10

A una solución de 427,1 mg (0,1 mmol) de la cadena A No. 6 protegida en 10,0 ml de DMF se añadieron 0,12 (0,1 mmol) de HOSu y 0,17 g (0,1 mmol) de EDAC y la mezcla se agitó durante 20 minutos a RT. Luego, se añadieron 621,9 mg (0,1 mmol) de la cadena B de insulina No. 8 desprotegida de manera selectiva en la cadena B, y la mezcla resultante se agitó durante 6 h adicionales a RT. La solución resultante se dejó caer luego en 100 ml de agua helada y el sólido resultante se filtró, se lavó con agua y se secó al vacío. Luego, el sólido se disolvió en 30 ml de una mezcla que se enfrió previamente a 0°C de TFA/DTT/agua (94:3:3) y se agitó durante 1 h y luego, la mezcla se calentó a RT y se agitó durante 3 h adicionales a RT. La mezcla se concentró luego al vacío en un RE hasta

20

aproximadamente 5 ml y se añadieron 100 ml de DEE congelado. El sólido precipitado se filtró y se lavó con DEE y se secó al vacío hasta peso constante. Luego, la insulina cruda se disolvió en DMSO al 20% en una solución de Na₂HPO₄ a pH= 7,8 y se agitó durante 48 h adicionales a RT. La solución obtenida se acidificó luego y se cargó en una columna C18 Chromasil y se purificó mediante HPLC. Las fracciones que contenían el producto principal se recolectaron y liofilizaron. Rendimiento: 62,3 mg de péptido neto (10,7%).

5



10

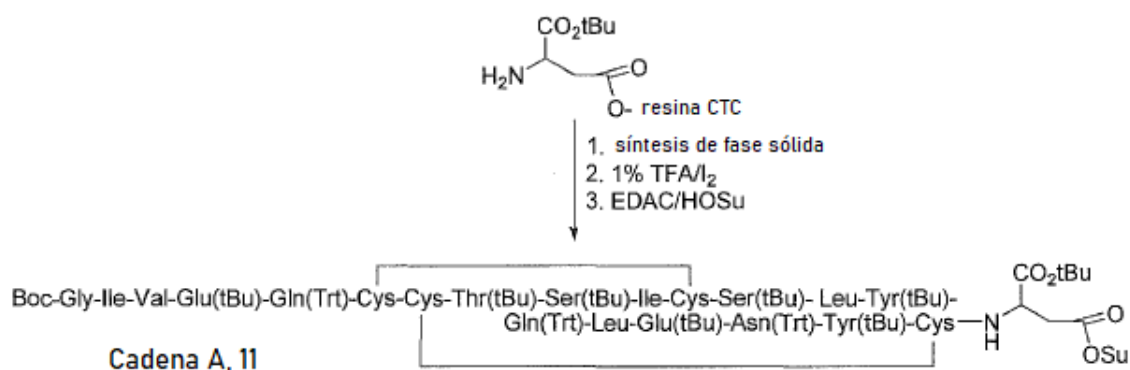
Ejemplo 2

Síntesis de insulina de cadena sencilla con estructura 15.

15

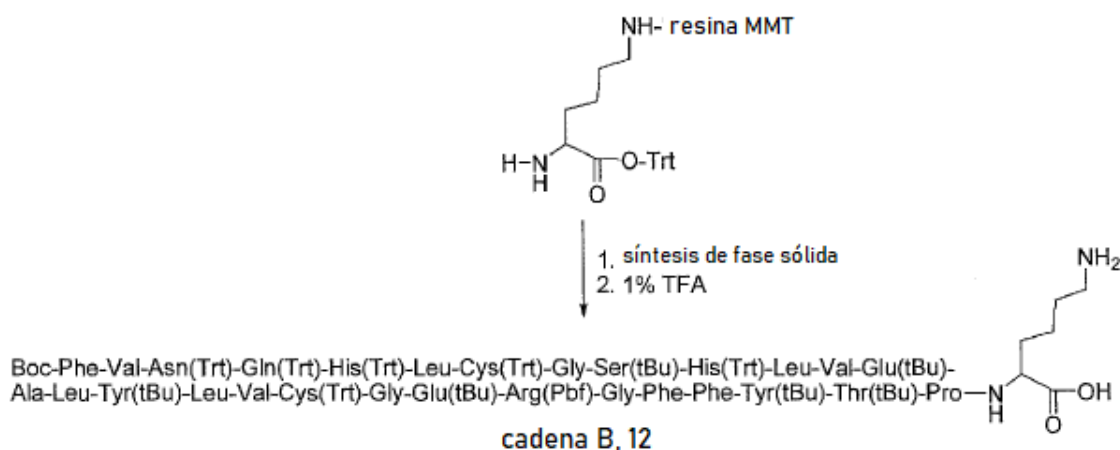
(A) Síntesis de cadena A de insulina Asp²¹ protegida, de grupo carboxilo oxidado y activado de estructura 11.

4,0 g (1,0 mmol) de H-Asp(resina CTC)-O^tBu (disponible comercialmente, producto de CBL-Patras) se elongaron a la cadena Asp(A21) protegida unida a resina usando aminoácidos Fmoc (productos de CBL-Patras) y DIC/HOBt para la activación de los aminoácidos a excepción del residuo Gly(A1) que se introdujo usando Boc-Gly-OH. Luego, se lavó la resina 4X con NMP y 6X con DCM y luego, el péptido protegido se escindió de la resina y se oxidó de manera simultánea mediante lavado 8X con TFA al 1% en DCM que contiene 20,0 mmol de yodo. Los filtrados de los lavados con TFA al 1% se dejaron caer en una solución de Na₂S₂O₃ al 3%, la capa de DCM se lavó con la solución de Na₂S₂O₃ y agua, se concentró en el RE y el péptido protegido se precipitó luego con la adición de DEE, se lavó con DEE y se secó al vacío hasta peso constante. Rendimiento 2,97 g (87,5%).



(B) Síntesis de la insulina humana des-Thr³⁰ desprotegida de manera selectiva en la cadena lateral Lys²⁹ de estructura 12.

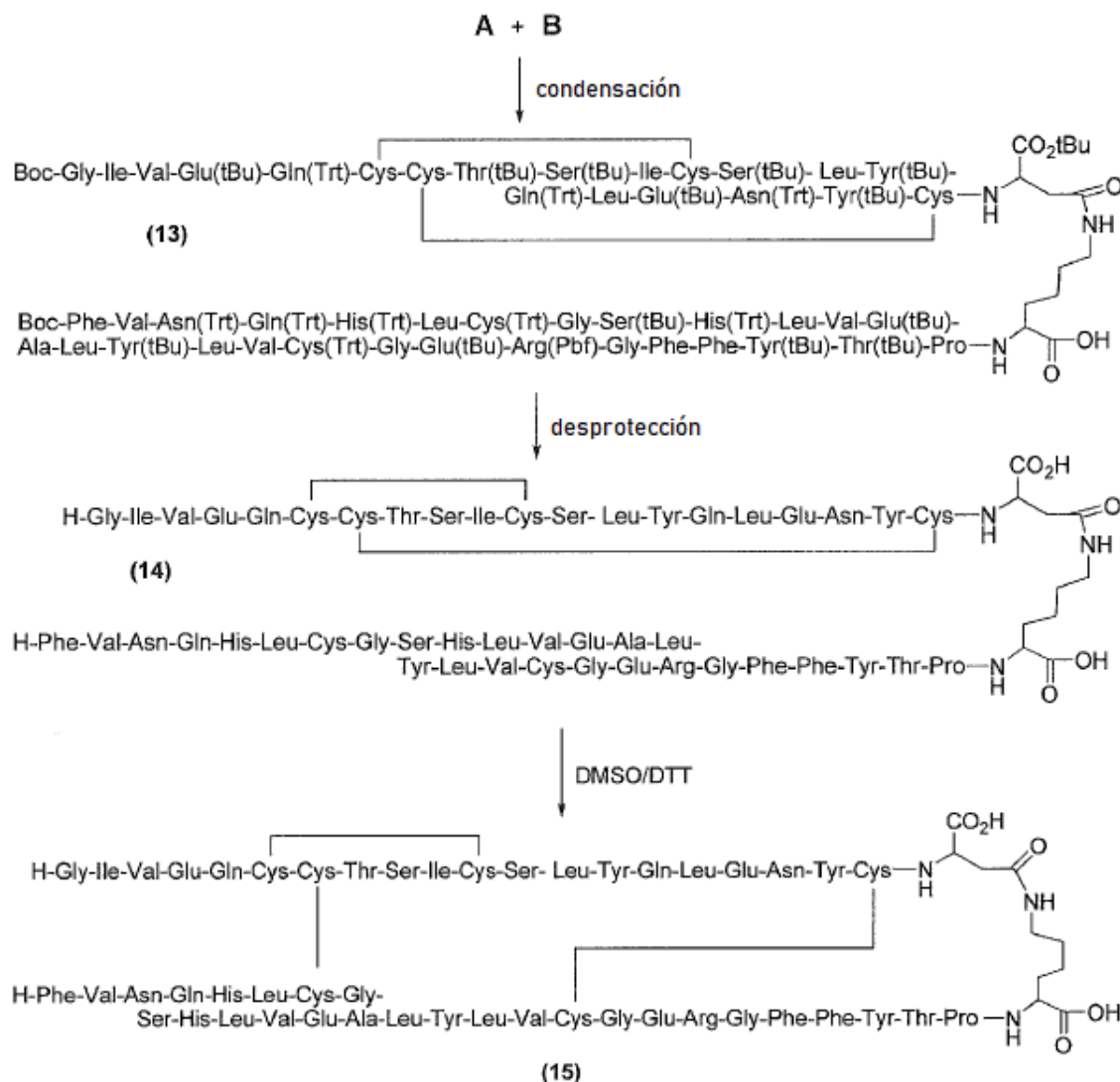
3,2 g (1,0 mmol) de H-Lys (resina MMT)-OTrt (producida haciendo reaccionar Fmoc-Lys-OH con resina de cloruro de MMT y DIPEA en DCM, continuando con la esterificación del Fmoc-Lys-OH unido a resina obtenido con cloruro de Trt) se elongaron a la cadena B de la insulina humana desThr(B30) protegida unida a resina usando Fmoc-aminoácidos (productos de CBL-Patras) y DIC/HOBt para la activación de los aminoácidos, a excepción del residuo Phe(B1) que se introdujo usando Boc-Phe-OH. La resina se lavó luego 4X con NMP y 6X con DCM y luego, el péptido protegido se escindió de la resina mediante lavado 8X con TFA AL 1% en DCM. Los filtrados de los lavados con TFA al 1% se colocaron en una solución de agua de piridina al 1%, la capa de DCM se lavó con agua, se concentró en el RE y el péptido protegido se precipitó luego con la adición de DEE, se lavó con DEE y se secó al vacío hasta peso constante. Rendimiento 4,93 g (94,1%).



(C) Condensación de las cadenas de insulina A y B parcialmente protegidas en solución

A una solución de 339,6 mg (0,1 mmol) de la cadena A No. 11 protegida en 10,0 ml de DMF se añadieron 0,12 (0,1 mmol) de HOSu y 0,17 g (0,1 mmol) de EDAC y la mezcla se agitó durante 20 minutos a RT. Luego, se añadieron 524,5 mg (0,1 mmol) de la cadena B de insulina No. 12 desprotegida de manera selectiva en la cadena B, y la mezcla resultante se agitó durante 6 h adicionales a RT. La solución resultante se dejó caer luego en 100 ml de agua helada y el sólido resultante se filtró, se lavó con agua y se secó al vacío. Luego, el sólido se disolvió en 30 ml de una mezcla que se enfrió previamente a 0°C de TFA/DTT/agua (94:3:3) y se agitó durante 1 h y la mezcla se calentó luego a RT y se agitó durante 3 h adicionales a RT. La mezcla se concentró luego al vacío en un RE hasta

aproximadamente 5 ml y se añadieron 100 ml de DEE congelado. El sólido precipitado se filtró y se lavó con DEE y se secó al vacío hasta peso constante. Luego, la insulina cruda se disolvió en DMSO al 20% en una solución de Na₂HPO₄ a pH= 7,8 y se agitó durante 48 h adicionales a RT. La solución obtenida se acidificó luego y se cargó en una columna C18 Chromasil y se purificó mediante HPLC. Las fracciones que contenían el producto principal se recolectaron y liofilizaron. Rendimiento: 78,9 mg de péptido neto (14,5%).



Ejemplo 3

10

Síntesis de insulina de cadena sencilla con estructura 19.

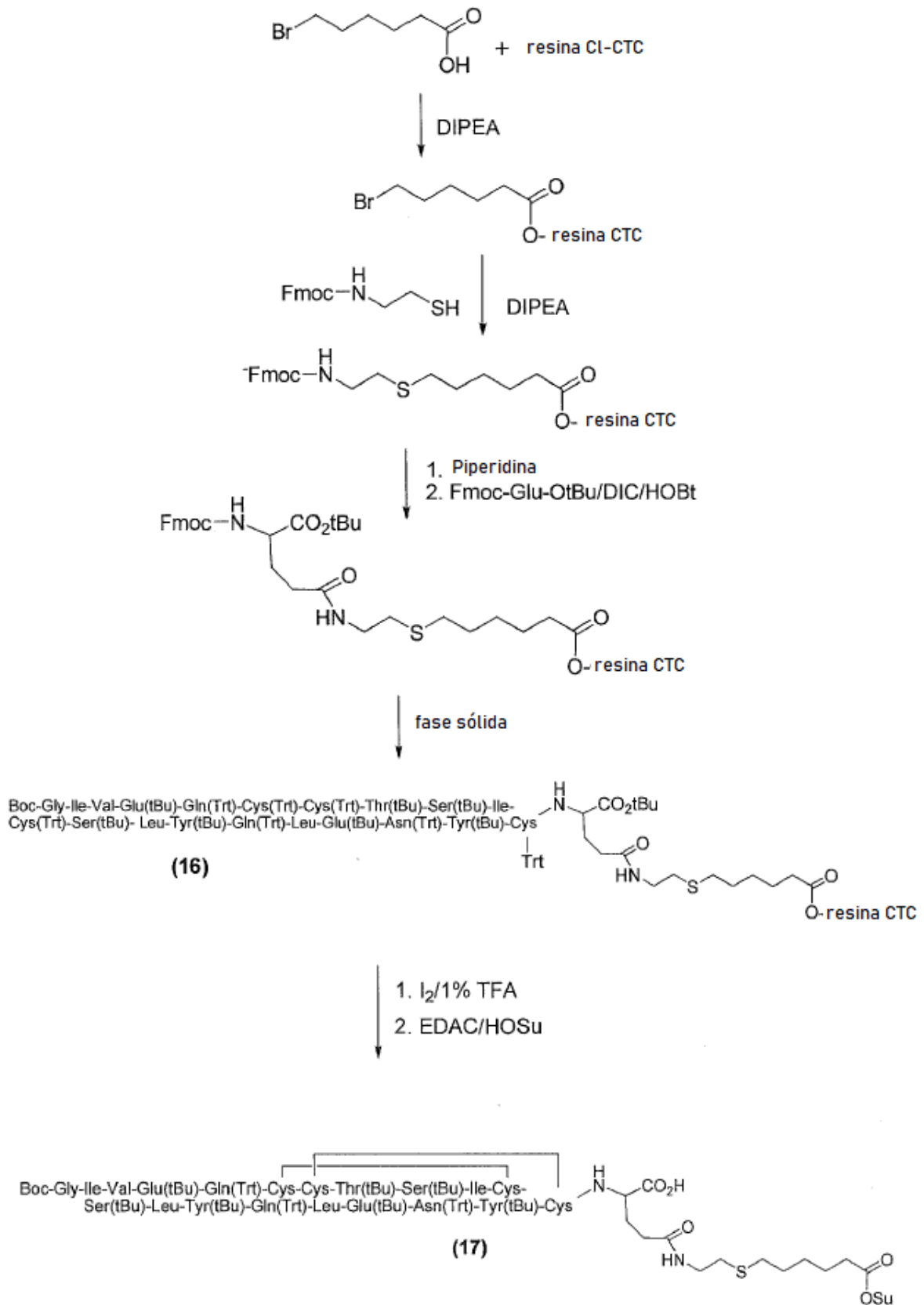
(A) Síntesis de cadena A de insulina protegida con estructura 17.

15

4,13 g (10,0 mmol) de ácido 6-Fmoc-amino(etil)iohexanoico, obtenidos por procedimientos que se conocen bien en la técnica a partir de Fmoc-cisteamina y ácido 6-bromohexanoico, se disolvieron en 200 ml de DCM y luego, se añadieron 20,0 g (1,6 mmol/g) de resina de cloruro-CTC y 7,75 g (60 mmol) de DIPEA y la mezcla se agitó durante 2 h a RT. Luego, se añadieron 10,0 ml de MeOH y la mezcla se agitó durante una h adicional. La resina se filtró y se lavó 3X con DCM/DIPEA/MeOH, 6X con DCM. El aminoácido unido a la resina obtenido se elongó a la cadena con acoplamiento secuencial de Fmoc-aminoácidos y DIC/HOBt para su activación al péptido 16 protegido unido a resina. La resina 16 se lavó luego 4X con NMP y 6X con DCM y luego, el péptido protegido se escindió de la resina y se oxidó de manera simultánea mediante lavado 8X con TFA al 1% en DCM que contenía 200,0 mmol de yodo. Los filtrados de los lavados con TFA al 1% se dejaron caer en una solución acuosa de piridina al 1%, la capa de DCM se lavó con agua, se concentró en el RE y el péptido protegido se precipitó luego con la adición de DEE, se lavó con DEE y se secó al vacío hasta peso constante. Rendimiento 34,7 g (90,8%).

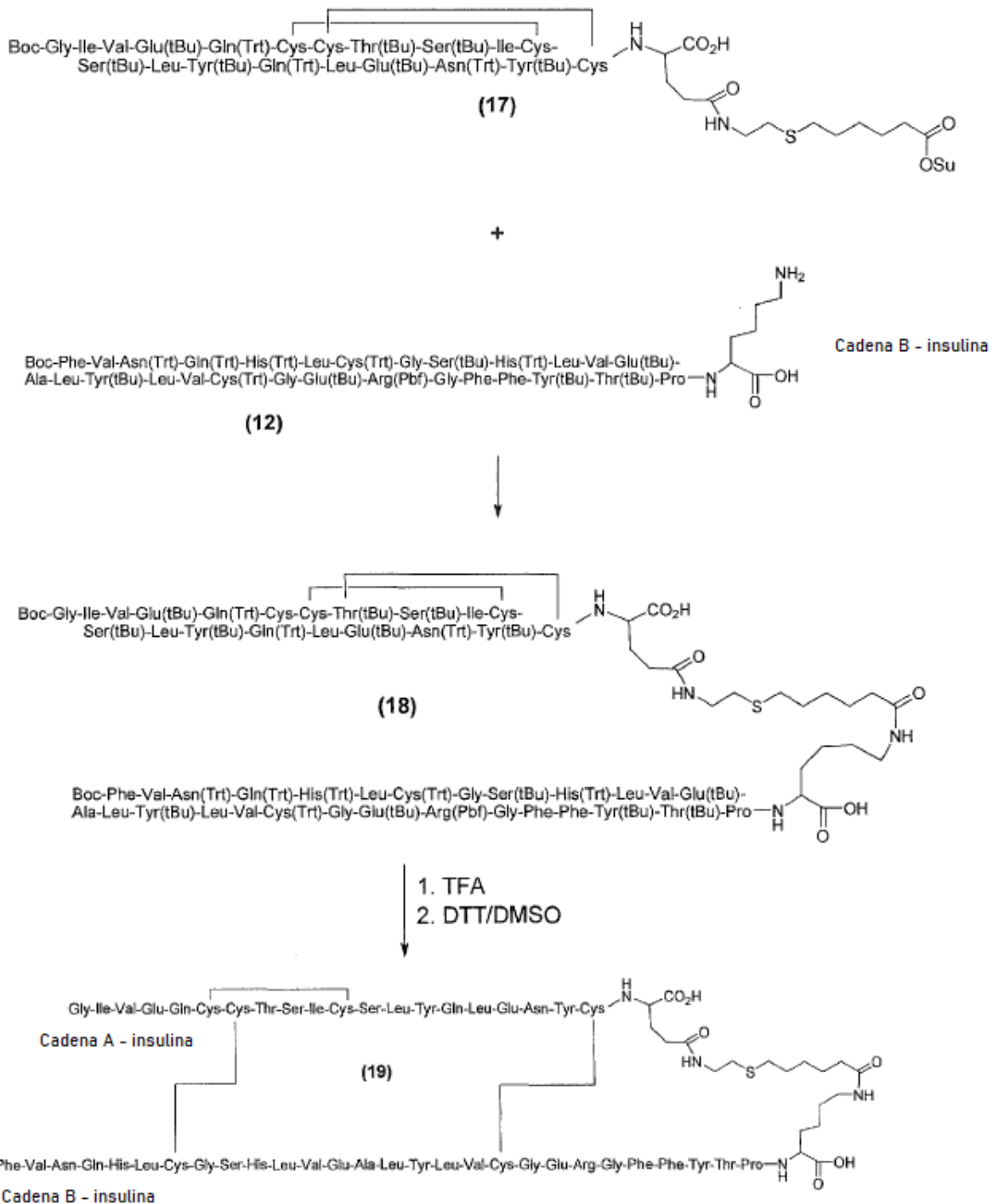
20

25



(B) Condensación en solución de la cadena A de insulina parcialmente protegida y modificada de estructura 17 con la cadena B de insulina des Thr (B30) parcialmente protegida de estructura 12.

5 A una solución de 382,3 mg (0,1 mmol) de la cadena A No. 17 protegida en 10,0 ml de DMF se añadieron 0,12 (0,1 mmol) de HOSu y 0,17 g (0,1 mmol) de EDAC y la mezcla se agitó durante 20 minutos a RT. Luego, se añadieron 524,5 mg (0,1 mmol) de la cadena B de insulina No. 12 desprotegida des(B30) de manera selectiva en la cadena lateral de Lys(B29), y la mezcla resultante se agitó durante 6 h adicionales a RT. La solución resultante se colocó
 10 luego en 100 ml de agua helada y el sólido resultante se filtró, se lavó con agua y se secó al vacío. Luego, el sólido se disolvió en 30 ml de una mezcla que se enfrió previamente a 0°C de TFA/DTT/agua (94:3:3) y se agitó durante 1 h y la mezcla se calentó luego a RT y se agitó durante 3 h adicionales a RT. La mezcla se concentró luego al vacío en un RE hasta aproximadamente 5 ml y se añadieron 100 ml de DEE congelado. El sólido precipitado se filtró y se lavó con DEE y se secó al vacío hasta peso constante. Luego, la insulina cruda se disolvió en DMSO al 20% en una solución de Na₂HPO₄ a pH= 7,8 y se agitó durante 48 h adicionales a RT. La solución obtenida se acidificó luego y se cargó en una columna C18 Chromasil y se purificó mediante HPLC. Las fracciones que contenían el producto principal se recolectaron y liofilizaron. Rendimiento: 127,4 mg de péptido neto (22,8%).

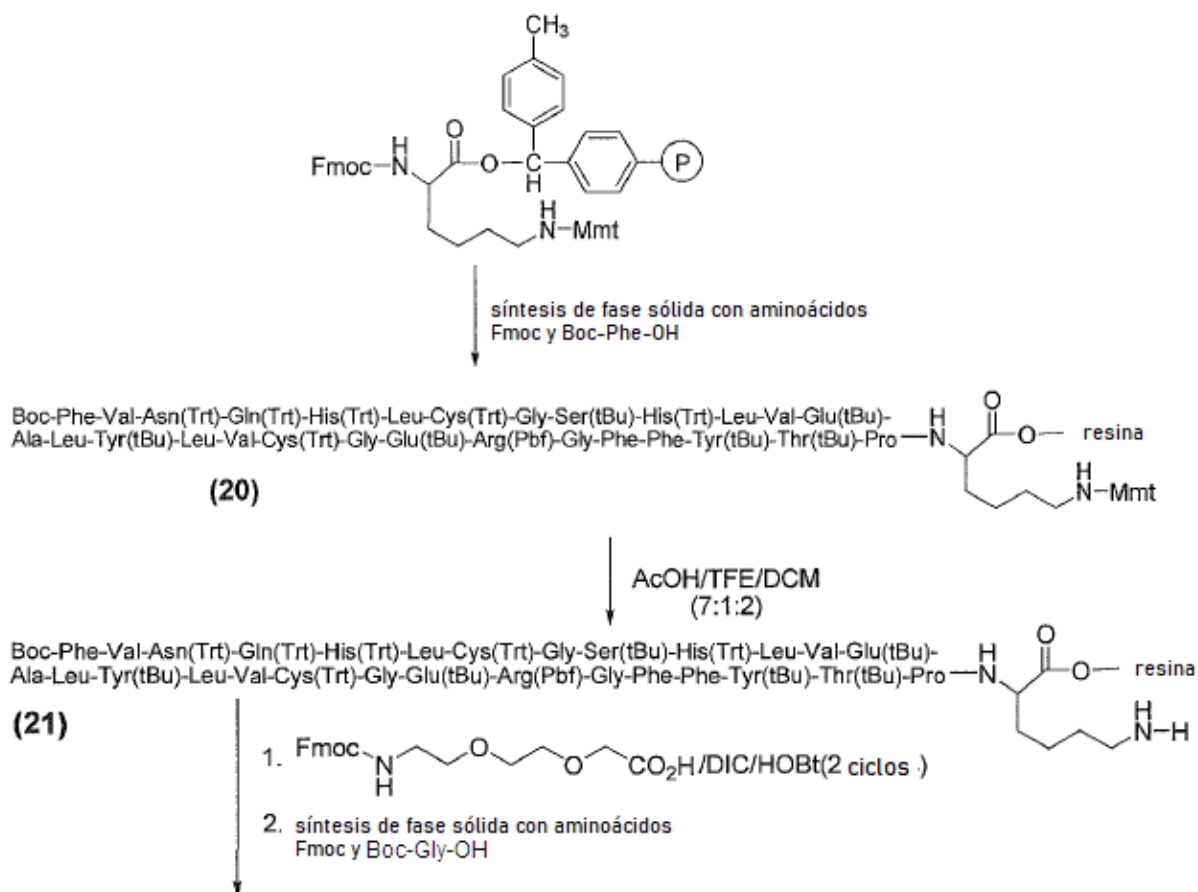


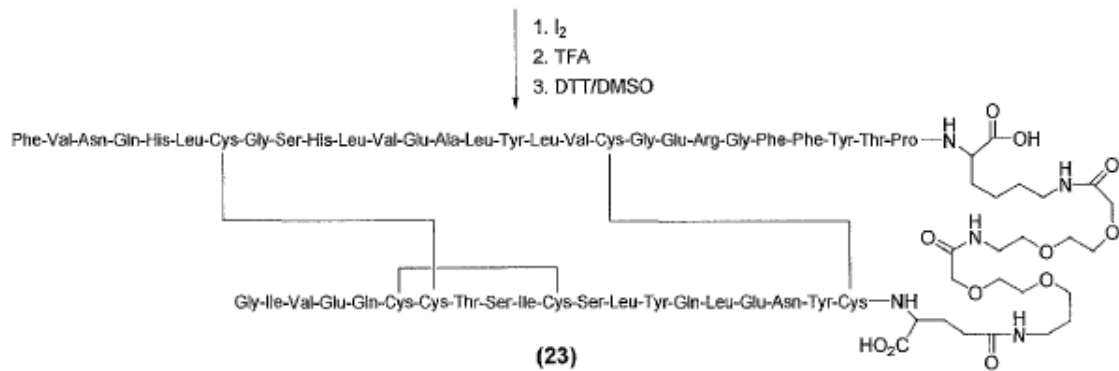
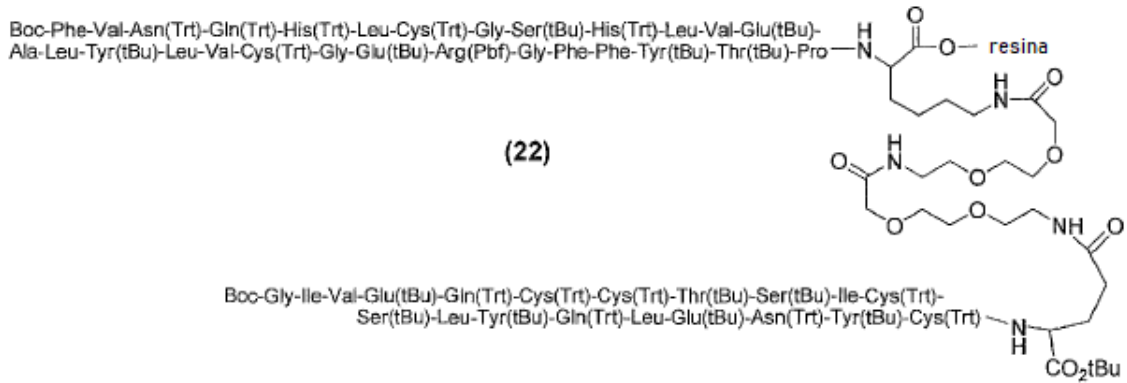
Ejemplo 4

Síntesis de insulina de cadena sencilla de estructura 23.

- 5 Síntesis de fase sólida de la insulina de cadena sencilla Glu(A21), des Thr (B30) donde las cadenas de insulina se conectan a través de las cadenas laterales de Glu(A21) y Lys(B29) y el modificador de oligoetilenglicol.

La síntesis se inició con la síntesis de fase sólida de la cadena B en la resina 4-metil-benzhidrido(difenilmetilo). Después de completar la síntesis, la función Mmt de cadena lateral Lys B29 se retiró mediante el tratamiento de resina con DCM/TFE/AcOH (7:2:1) durante 3 h a RT para proporcionar el péptido de estructura 21 parcialmente protegido unido a resina. Luego, en la cadena lateral de Lys, se introdujeron dos grupos de ácido 2-(2-(2-aminoetoxi) etoxi) acético usando los derivados de Fmoc correspondientes continuando con el acoplamiento con Fmoc-Glu-OtBu. En la función Na de Glu(A21) el resto de la A se ensambló usando aminoácidos Fmoc. Después de la finalización de la síntesis, el péptido unido a resina se trató con I₂ al 1% en DCM/TFE (9:1) para construir los enlaces disulfuro. La resina se lavó luego con DCM y se trató con TFA/DTT/H₂O (94:3:3) durante 15 minutos a 0 °C y se filtró. La resina se lavó 3X con la solución de TFA y los filtrados combinados se dejaron a 0 °C durante 3 h adicionales. La solución se concentró en un RE y el aceite restante se colocó en DEE congelado. El material precipitado se filtró, se lavó con DEE y se secó al vacío. Luego, la insulina cruda se disolvió en DMSO al 20% en una solución de Na₂HPO₄ a pH= 7,8 y se agitó durante 48 h adicionales a RT. La solución obtenida se acidificó luego y se cargó en una columna C18 Chromasil y se purificó mediante HPLC. Las fracciones que contenían el producto principal 23 se recolectaron y liofilizaron. Rendimiento: 82,4 mg de péptido neto (14,29%).

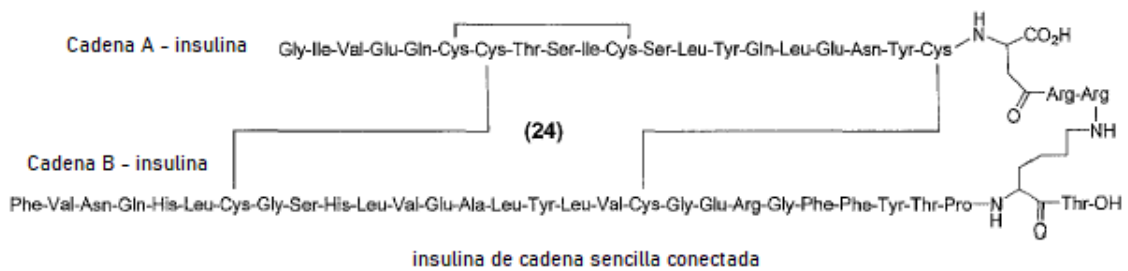




Ejemplo 5

Síntesis de la síntesis de insulina de cadena sencilla de estructura 24 en resina de 2-clorotritilo

5 La síntesis se inició a partir de 1,00 mmol de resina H-Thr(tBu)-O-CTC y se realizó según se describe en el ejemplo 3 a excepción de que en lugar de Fmoc-Lys(Mmt)-OH para la introducción de Lys(B29) se usó Fmoc-Lys(Dde)-OH y el retiro selectivo de Dde se realizó según lo usual con 2% de hidrazina en NMP. Rendimiento: 94,3 mg (15,4%).



REIVINDICACIONES

1. Un análogo de insulina de cadena sencilla que comprende:

5 (A) la cadena A de la insulina humana o animal, o un análogo de esta, que es una variante en la que (a) un residuo de aminoácido se reemplaza por un aminoácido que existe de manera natural o no natural, (b) el orden de los dos residuos de aminoácidos se encuentra invertido, o (c) ambos (a) y (b) se presentan en conjunto;

10 (B) la cadena B de la insulina humana o animal, o un análogo de esta, que es una variante en la que (a) un residuo de aminoácido se reemplaza por un aminoácido que existe de manera natural o no natural, (b) el orden de los dos residuos de aminoácidos se encuentra invertido, o (c) ambos (a) y (b) se presentan en conjunto;

(C) uno o más de:

15 (i) un enlace disulfuro intermolecular entre la cisteína en la posición 7 de la cadena A de insulina y la cisteína en la posición 7 de la cadena B de insulina;

(ii) un enlace disulfuro intermolecular entre la cisteína en la posición 20 de la cadena A de insulina y la cisteína en la posición 19 de la cadena B de insulina;

20 (iii) un enlace disulfuro intramolecular entre la cisteína en la posición 6 y la cisteína en la posición 11 de la cadena A de insulina; y

25 (D) una ligación covalente adicional, L, entre el aminoácido carboxilo terminal de la cadena A de la insulina humana o animal, o análogo de esta, y la cadena lateral del residuo de lisina en la posición 29 de la cadena B de la insulina humana o animal, o análogo de esta, en la que L es un grupo que comprende:

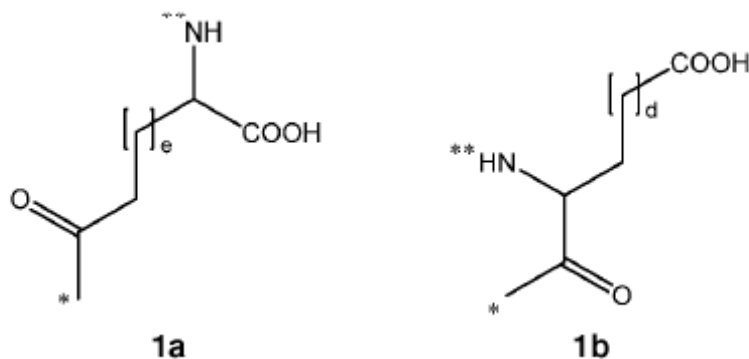
(i) al menos un grupo X; y/o

30 (ii) al menos un grupo Y; y/o

(iii) al menos un grupo Z;

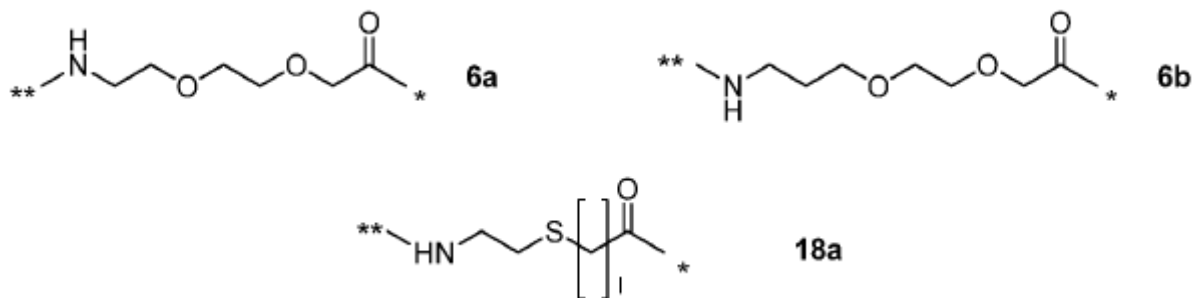
en el que:

35 X es un grupo de fórmula 1a o 1b



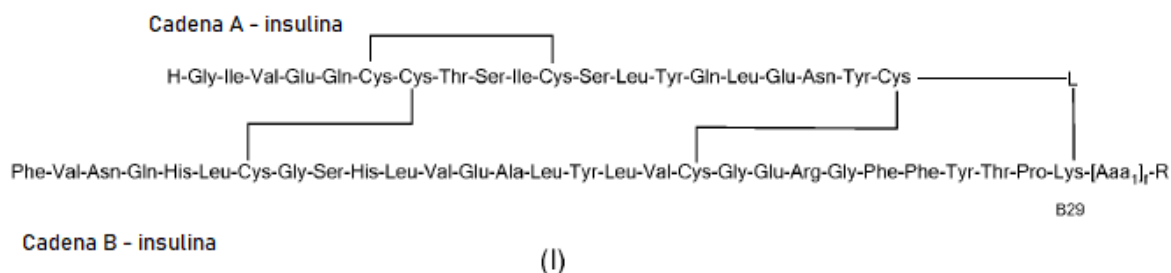
40 en el que d y e son cada uno de manera independiente un número entero que se selecciona a partir de 0 a 10, y * y ** indican los puntos de unión con los grupos adyacentes respectivos;

Y es un grupo que se selecciona a partir de los siguientes:

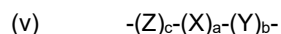
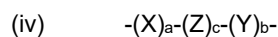


5 en el que l es 1, 2, 3, 4 o 5, y * y ** indican los puntos de unión con los grupos adyacentes respectivos; y Z es un aminoácido natural o no natural; en el que dicho análogo de insulina de cadena sencilla realiza la misma acción que la insulina humana en lo que se refiere a control glucémico.

2. Un análogo de insulina de cadena sencilla de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cadena A comprende los aminoácidos 1 a 21 o 1 a 20 de la insulina humana contando desde el extremo N-terminal de la cadena A.
- 10 3. Un análogo de insulina de cadena sencilla de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cadena B comprende los aminoácidos 1 a 29 de la insulina humana contando desde el extremo N-terminal de la cadena B.
- 15 4. Un análogo de insulina de cadena sencilla de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la cadena B de insulina comprende además hasta 20 aminoácidos naturales o no naturales adicionales en el extremo C-terminal.
5. Un análogo de insulina de cadena sencilla de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que es de fórmula (I),



- 20 en el que:
- 25 L es según se define en la reivindicación 1;
- cada Aaa₁ es de manera independiente un aminoácido natural o no natural;
- f es un número entero que se selecciona a partir de 0 a 20;
- 30 R es OH o NH₂.
6. Un análogo de insulina de cadena sencilla de acuerdo con la reivindicación 5, en el que R es OH, f es 0, 1, 2 o 3 y cada Aaa₁ es de manera independiente un aminoácido natural, más preferiblemente que se selecciona a partir de Arg y Thr.
- 35 7. Un análogo de insulina de cadena sencilla de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que L se selecciona a partir de los siguientes grupos:
- 40 (i) -(X)_a-(Y)_b-(Z)_c-
- (ii) -(Y)_b-(X)_a-(Z)_c-
- (iii) -(Y)_b-(Z)_c-(X)_a-



donde a, b y c son cada uno de manera independiente un número entero que se selecciona a partir de 0 a 5.

10 8. Un análogo de insulina de cadena sencilla de acuerdo con la reivindicación 7, en el que a, b y c son cada uno de manera independiente 0, 1 o 2.

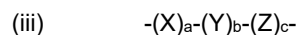
9. Un análogo de insulina de cadena sencilla de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en el que L se selecciona a partir de:



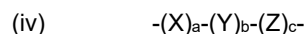
donde a es 1, y b y c son ambos 0;



donde a y b son 1, y c es 0;



25 donde a es 1, b es 2 y c es 0;



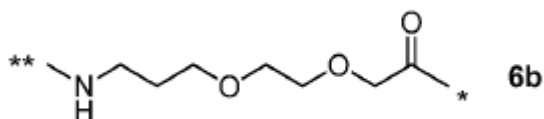
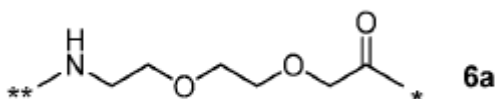
donde a es 1, b es 0 y c es 2; y



donde a es 0, b es 0 y c es 1.

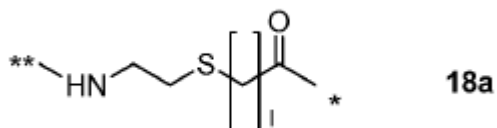
35 10. Un análogo de insulina de cadena sencilla de acuerdo con la reivindicación 1, en el que X es un grupo de fórmula 1a.

11. Un análogo de insulina de cadena sencilla de acuerdo con la reivindicación 1, en el que Y es un grupo de fórmula 6a o 6b



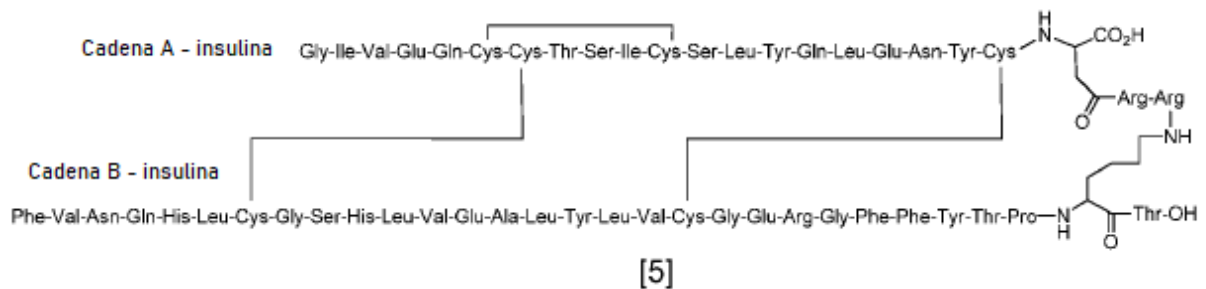
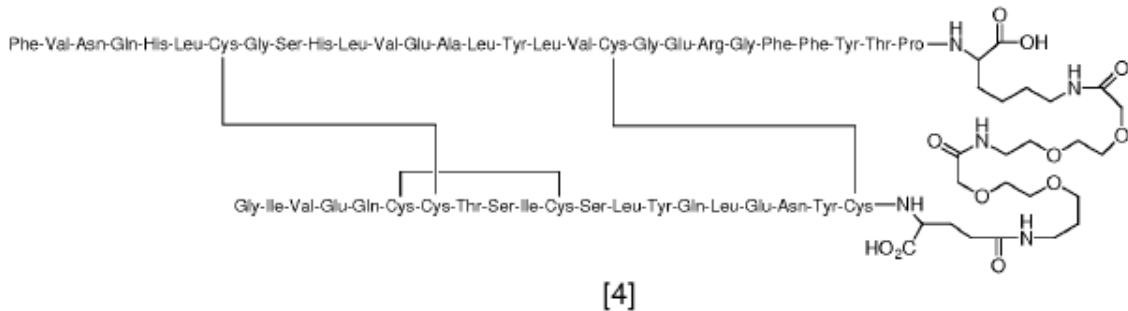
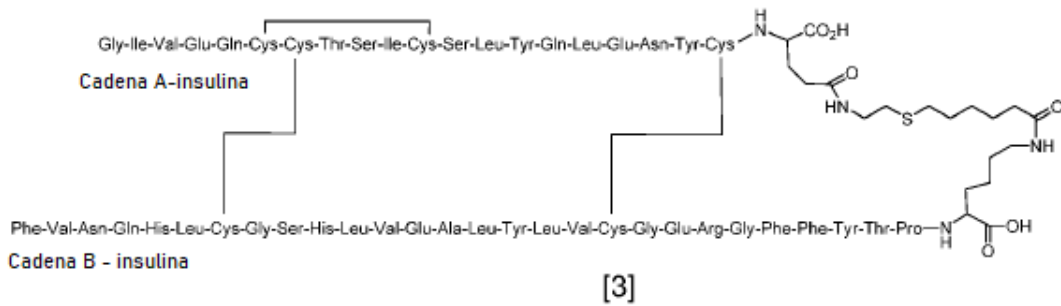
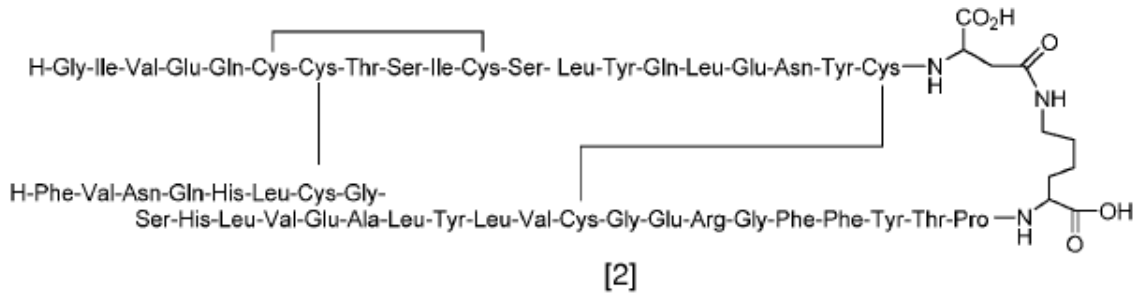
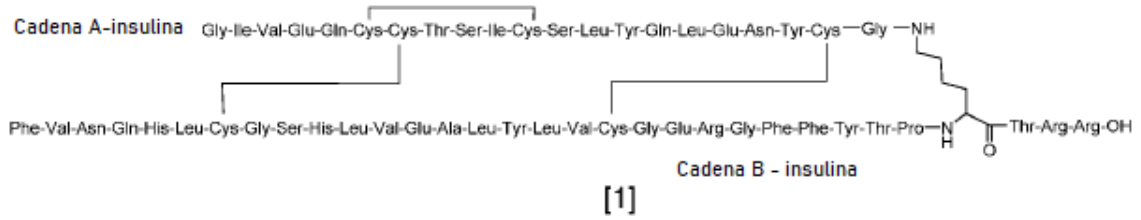
donde * y ** indican los puntos de unión con los grupos adyacentes respectivos.

45 12. Un análogo de insulina de cadena sencilla de acuerdo con la reivindicación 1, en el que Y es un grupo de fórmula 18a, donde l es 1, 2, 3, 4 o 5



donde * y ** indican los puntos de unión con los grupos adyacentes respectivos.

50 13. Un análogo de insulina de cadena sencilla de acuerdo con la reivindicación 1, que se selecciona a partir de los siguientes:



- 5 14. Una composición farmacéutica que comprende un análogo de insulina de cadena sencilla de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

15. Un análogo de insulina de cadena sencilla de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para su uso como un medicamento.

5 16. Un análogo de insulina de cadena sencilla de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para su uso en el tratamiento o prevención de la diabetes, o para su uso en el tratamiento o prevención de la hiperglucemia.