

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 603**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

C07K 14/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.06.2016 PCT/EP2016/062514**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2016 WO16193380**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2016 E 16726866 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020 EP 3303380**

54 Título: **Insulinas con extensiones recombinantes polares**

30 Prioridad:

02.06.2015 EP 15170337
10.07.2015 EP 15176207

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.09.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

KJELDSSEN, THOMAS BØRGLUM;
HOEG-JENSEN, THOMAS;
VINTHER, TINE NYGAARD;
HUBALEK, FRANTISEK y
PETTERSSON, INGRID

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 784 603 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

Insulinas con extensiones recombinantes polares

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a insulinas novedosas o análogos de insulinas que se extienden con secuencias de residuos de aminoácidos predominantemente polares con el fin de mejorar la vida media y la estabilidad del fármaco. La invención proporciona, además, composiciones farmacéuticas que comprenden tales fármacos, y se refiere al uso de tales fármacos para el tratamiento o prevención de trastornos metabólicos.

Antecedentes de la técnica

15 Existe un deseo pronunciado de proporcionar insulinas de acción prolongada, estables y activas para el tratamiento de la diabetes, y los métodos establecidos para obtener una prolongación de acción incluyen, a saber, depósitos precipitados, la acilación con derivados de (di)ácidos grasos para imponer la unión a albúmina, y la formación de multihexameros solubles. La PEGilación (conjugación de proteínas con polietilenglicol polidispersado de alto peso molecular) es también una tecnología establecida, pero el PEG, sin embargo, no es biodegradable, y el PEG puede, en algunos casos, acumularse en el cuerpo cuando se usa de manera crónica. Además, se prefieren los polímeros 20 homogéneos, pero la mayoría de los polímeros de cadena larga están disponibles solamente en forma polidispersa.

Por lo tanto, los polímeros biodegradables con propiedades similares a PEG son de interés para la ingeniería de fármacos de proteínas. Los polímeros deben ser polares con el fin de preservar la solubilidad acuosa e imponer una mayor duración de la acción terapéutica en el cuerpo, por ejemplo, al aumentar el volumen hidrodinámico de las 25 proteínas modificadas genéticamente. El polímero tiene que unirse covalentemente a la proteína/insulina, que puede obtenerse como un conjugado químico o por expresión recombinante en una célula huésped adecuada (como una fusión). El principal efecto *in vivo* de prolongar las proteínas extendidas puede atribuirse a una fase de absorción prolongada después de la administración subcutánea debido a un gran volumen hidrodinámico.

30 Se han sugerido varias soluciones con polímeros biodegradables de vidas medias aumentadas. Por lo tanto, el documento núm. WO 2008 049931 describe ciertas insulinas extendidas con péptidos que muestran una vida media *in vivo* adecuada; el documento núm. DD 257197 describe un método para obtener un producto de insulina activa inmovilizada mediante la adición de poliaminoácidos; el documento núm. DD 286509 describe un método para una preparación de insulina para la aplicación rectal, cuya preparación es de actividad estable y de actividad prolongada; 35 Arakawa y otros, Nature Biotechnology 1998, 16, 934-938, describen una subunidad de la toxina B del cólera basada en planta-proteína de fusión insulínica que protege contra el desarrollo de diabetes autoinmunitaria; el documento núm. WO 2008 019368 A2 describe determinadas proteínas de fusión albúmina-insulina.

Sin embargo, las insulinas y análogos de insulina de acuerdo con esta invención nunca se han descrito.

40

Breve resumen de la invención

Aunque las extensiones recombinantes polares descritas en la técnica anterior, que frecuentemente sugieren el uso de múltiples residuos de Ser y Thr, pueden funcionar bien en los sistemas de producción basados en bacterias, tales residuos 45 de aminoácidos tienden a glicosilarse en sistemas de expresión basados en levaduras, lo que disminuye así el rendimiento total de las proteínas que contienen tales extensiones. Además, cuando la eliminación de los subproductos glicosilados durante la purificación de proteínas es difícil y consume recursos, se desea la provisión de soluciones alternativas de extensiones por consideración a una optimización de los procesos de producción basados en levaduras.

50 Además, se ha descubierto que los productos oligoméricos extendidos de la presente descripción, que comprenden los aminoácidos polares Gln y/o His, son menos propensos a proporcionar alta viscosidad cuando se compara con otros productos, por ejemplo, secuencias que contienen múltiples Glu (E).

Finalmente, las insulinas extendidas con oligómeros o análogos de insulina de esta descripción producen perfiles de 55 insulina que han demostrado una duración y estabilidad *in vivo* que puede permitir una administración una vez al día, o incluso una vez a la semana.

Por lo tanto, en su primer aspecto, esta descripción proporciona insulinas extendidas con oligómeros o análogos de 60 insulina, cuyas insulinas o análogos de insulina se extienden en el extremo N-terminal de la cadena B, y/o a partir del extremo C-terminal de la cadena A con una extensión que consiste solamente en residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en His (H), Gln (Q), Ala (A), Asp (D), Glu (E), Gly (G), Pro (P), Ser (S) y Thr (T); en cuya extensión:

65 I) uno o ambos residuos de aminoácidos se seleccionan del grupo que consiste en His (H) y Gln (Q); la cantidad de residuos de aminoácidos del Grupo I se combina con

II) no más de tres veces este número de los residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en Ala (A), Asp (D), Glu (E), Gly (G), Pro (P), Ser (S), y Thr (T); para producir una insulina extendida con oligómero o análogo de insulina, con una extensión que comprende de aproximadamente 100 a aproximadamente 800 residuos de aminoácidos contiguos.

5

En otro aspecto la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina de la invención, junto con uno o más adyuvantes, excipientes, portadores y/o diluyentes.

10 En aspectos adicionales la invención se refiere al uso de la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina de la invención como un medicamento, y a métodos de tratamiento, prevención o alivio de una enfermedad o trastorno metabólico o afección de un cuerpo de animal vivo, que incluye un ser humano, cuyo método comprende la etapa de administrar a dicho cuerpo de un animal vivo que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina.

15

Otros objetivos de esta descripción serán evidentes para la persona experta en la técnica a partir de la siguiente descripción detallada y ejemplos.

Descripción detallada de la invención

20

Insulinas o análogos de insulina extendidas con oligómero

25 En una 1^{ra} modalidad, en la presente descripción se describe una insulina extendida con oligómero o análogo de insulina, cuya insulina o análogo de insulina es una molécula de insulina de dos cadenas que comprende una cadena A- y una cadena B-, y cuya insulina o análogo de insulina se extiende en el extremo N-terminal de la cadena B, y/o a partir del extremo C-terminal de la cadena A, con una extensión que consiste solamente en residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en His (H), Gln (Q), Ala (A), Asp (D), Glu (E), Gly (G), Pro (P), Ser (S) y Thr (T); en cuya extensión:

30 I) uno o ambos de los (dos) residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en His (H) y Gln (Q) (es decir Grupo I); cuyo número (es decir, uno o dos) de residuos de aminoácidos del Grupo I se combina con

35 II) no más de tres veces este número (es decir tres o seis) de los residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en Ala (A), Asp (D), Glu (E), Gly (G), Pro (P), Ser (S), y Thr (T) (es decir, Grupo II);

para producir una insulina extendida con oligómero o análogo de insulina, con una extensión que comprende de aproximadamente 100 a aproximadamente 800 residuos de aminoácidos contiguos.

40 Esto implica que los aminoácidos que se seleccionan de acuerdo con la invención pueden repetirse según sea necesario con el fin de obtener una extensión de la longitud y tamaño deseados.

45 En otra modalidad, en la presente descripción se describe una insulina extendida con oligómero o análogo de insulina, cuya insulina o análogo de insulina es una molécula de insulina de dos cadenas que comprende una cadena A- y una cadena B, y cuya insulina o análogo de insulina se extiende en el extremo N-terminal de la cadena B, y/o desde el extremo C-terminal de la cadena A, con una extensión que consiste solamente en residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en His (H), Gln (Q), Ala (A), Asp (D), Glu (E), Gly (G), Pro (P), Ser (S) y Thr (T); cuya extensión se compone de:

50 I) uno o ambos de los (dos) residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en His (H) y Gln (Q) (es decir Grupo I); cuyo número (es decir, uno o dos) de residuos de aminoácidos del Grupo I se combina con

55 II) no más de tres veces este número (es decir tres o seis) de los residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en Ala (A), Asp (D), Glu (E), Gly (G), Pro (P), Ser (S), y Thr (T) (es decir, Grupo II);

para producir un motivo estructural, en donde los números indican las proporciones estequiométricas de los residuos de aminoácidos mencionados anteriormente, y cuya composición puede repetirse o extenderse para producir una insulina extendida con oligómero o análogo de insulina con una extensión que comprende de aproximadamente 100 a aproximadamente 800 residuos de aminoácidos contiguos.

60 Los residuos polares se prefieren principalmente en consideración a la solubilidad y el tamaño hidrodinámico del producto final. Además, Gln y His, que son ambos aminoácidos polares, carecen de los problemas de glicosilación asociados con Ser y Thr, particularmente en relación con los sistemas de expresión de levaduras. Finalmente, las extensiones con secuencias que involucran un equilibrio de determinados de Gln y/o His han demostrado disminuir la viscosidad cuando se comparan con extensiones con otras secuencias, por ejemplo, secuencias que contienen

65 múltiples Glu (E).

Por lo tanto, en una tercera modalidad, la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina no contiene más de un Glu (E) en su motivo estructural, como se definió anteriormente.

En una cuarta modalidad, la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina es un producto en donde:

5 I) uno de los (dos) residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en His (H) y Gln (Q) (es decir, Grupo I); se combina con

10 II) no más de tres de los residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en Ala (A), Asp (D), Glu (E), Gly (G), Pro (P), Ser (S) y Thr (T) (es decir, Grupo II).

En una quinta modalidad, la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina es un producto en donde:

15 I) uno de los (dos) residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en His (H) y Gln (Q) (es decir, Grupo I); se combina con

II) no más de tres de los residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en Ala (A), Glu (E), Gly (G), y Pro (P), (es decir, Grupo II).

20 En una sexta modalidad, la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina es un producto en donde:

I) ambos de los (dos) residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en His (H) y Gln (Q) (es decir, Grupo I); se combinan con

25 II) no más de seis de los residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en Ala (A), Asp (D), Glu (E), Gly (G), Pro (P), Ser (S) y Thr (T) (es decir, Grupo II).

En una séptima modalidad, la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina es un producto en donde:

30 I) ambos de los (dos) residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en His (H) y Gln (Q) (es decir, Grupo I); se combinan con

35 II) no más de seis de los residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en Ala (A), Glu (E), Gly (G), y Pro (P) (es decir, Grupo II).

En una octava modalidad, uno o ambos residuos de aminoácidos del Grupo I se combinan con la misma cantidad de residuos de aminoácidos que se seleccionan del Grupo II.

40 En una novena modalidad, uno o ambos residuos de aminoácidos del Grupo I se combinan con 1½ veces la cantidad de residuos de aminoácidos que se seleccionan del Grupo II.

En una décima modalidad, uno o ambos residuos de aminoácidos del Grupo I se combinan con 2 veces la cantidad de residuos de aminoácidos que se seleccionan del Grupo II.

45 En una decimoprimera modalidad, uno o ambos residuos de aminoácidos del Grupo I se combinan con 2,5 veces la cantidad de residuos de aminoácidos que se seleccionan del Grupo II.

En una duodécima modalidad, uno o ambos residuos de aminoácidos del Grupo I se combinan con 3 veces la cantidad de residuos de aminoácidos que se seleccionan del Grupo II.

50 La extensión que se lleva a cabo de acuerdo con la presente descripción puede aplicarse a una molécula de insulina de cualquier origen, y en particular de origen recombinante, bovino o porcino, o a cualquier análogo de insulina a mano.

En una modalidad adicional, el producto extendido con oligómero es la insulina humana extendida con oligómero.

55 En una 2^{da} modalidad, el producto extendido con oligómero es un análogo de insulina extendido con oligómero que se selecciona del grupo que consiste en

60 insulina humana A14E, A21G, B16E, B25H, desB30;
insulina humana A14E, A21G, B16H, B25H, desB27, desB30;
insulina humana A14E, A21G, B16H, B25H, desB30;
insulina humana A14E, A21G, B25H, desB30;
insulina humana A14E, A21G, desB30;
insulina humana A14E, A21Q, B16E, B25H, desB30;
65 insulina humana A14E, A21Q, B16H, B25H, desB27, desB30;
insulina humana A14E, A21Q, B16H, B25H, desB30;

- insulina humana A14E, A21G, B25H, desB27, desB30;
 insulina humana A14E, A21Q, B25H, desB27, desB30;
 insulina humana A14E, A21Q, B25H, desB30;
 insulina humana A14E, A21Q, desB30;
- 5 insulina humana A14E, B16E, B25H, desB30;
 insulina humana A14E, B16H, B25H, desB27, desB30;
 insulina humana A14E, B16H, B25H, desB30;
 insulina humana A14E, B25H, desB27, desB30;
 insulina humana A14E, B25H, desB30;
- 10 insulina humana A21G, A22A, A23P, A24Q, desB30;
 insulina humana A21G, A22A, A23Q, A24P, desB30;
 insulina humana A21G, A22G;
 insulina humana A21G, A22K, B29R, desB30;
 insulina humana A21G, A22P, A23A, A24Q, desB30;
- 15 insulina humana A21G, A22P, A23Q, A24A, desB30;
 insulina humana A21G, A22Q, A23A, A24P, desB30;
 insulina humana A21G, A22Q, A23P, A24A, desB30;
 insulina humana A21G, A22Q, A23P, desB30;
 insulina humana A21G, B1F, desB30;
- 20 insulina humana A21G, B3K, B29E;
 insulina humana A21G, desB27, desB30;
 insulina humana A21G, B28D;
 insulina humana A21G, B28D, desB30;
 insulina humana A21G, B28K, B29P;
- 25 insulina humana A21G, desB30;
 insulina humana A21Q, A22G;
 insulina humana A21Q, A22K, B29R, desB30;
 insulina humana A21Q, B3K, B29E;
 insulina humana A21Q, desB27, desB30;
- 30 insulina humana A21Q, B28D;
 insulina humana A21Q, B28D, desB30;
 insulina humana A21Q, B28K, B29P;
 insulina humana A21Q, desB30;
 insulina humana A22K, B29R, desB30;
- 35 insulina humana B3K, B29E;
 insulina humana B28D;
 insulina humana B28D, desB30;
 insulina humana B28K, B29P; o
 insulina humana desB30.
- 40 En una modalidad, el análogo de insulina se selecciona del grupo que consiste en
- insulina humana A14E, A21G, B25H, desB30;
 insulina humana A21G, A22A, A23P, A24Q, desB30;
- 45 insulina humana A21G, A22A, A23Q, A24P, desB30;
 insulina humana A21G, A22P, A23A, A24Q, desB30;
 insulina humana A21G, A22P, A23Q, A24A, desB30;
 insulina humana A21G, A22Q, A23A, A24P, desB30;
 insulina humana A21G, A22Q, A23P, A24A, desB30;
- 50 insulina humana A21G, A22Q, A23P, desB30;
 insulina humana A21G, B1F, desB30;
 insulina humana A21G, desB30; y
 insulina humana A21Q, desB30.
- 55 En otra modalidad, el análogo de insulina se selecciona del grupo que consiste en
- insulina humana A14E, A21G, B25H, desB30;
 insulina humana A21G, desB30; y
 insulina humana A21Q, desB30.
- 60 En una tercera modalidad, el análogo de insulina es insulina humana A14E, A21G, B25H, desB30.
- En una cuarta modalidad, el análogo de insulina es insulina humana A21G, A22A, A23P, A24Q, desB30.
- 65 En una quinta modalidad, el análogo de insulina es insulina humana A21G, A22A, A23Q, A24P, desB30.

- En una sexta modalidad, el análogo de insulina es insulina humana A21G, A22P, A23A, A24Q, desB30.
- En una séptima modalidad, el análogo de insulina es insulina humana A21G, A22P, A23Q, A24A, desB30.
- 5 En una octava modalidad, el análogo de insulina es insulina humana A21G, A22Q, A23A, A24P, desB30.
- En una novena modalidad, el análogo de insulina es insulina humana A21G, A22Q, A23P, A24A, desB30.
- En una décima modalidad, el análogo de insulina es insulina humana A21G, A22Q, A23P, desB30.
- 10 En una undécima modalidad, el análogo de insulina es insulina humana A21G, B1F, desB30.
- En una duodécima modalidad, el análogo de insulina es insulina humana A21G, desB30.
- 15 En una decimotercera modalidad, el análogo de insulina es insulina humana A21Q, desB30.
- Si la extensión comienza con un residuo Gly (G), entonces el análogo de insulina seleccionado puede ser preferentemente un análogo que contiene A21Gly (G), o un análogo que contiene A21Gln (Q).
- 20 Por lo tanto, en una modalidad, el producto extendido con oligómero es un análogo de insulina extendido con oligómero que comprende la mutación A21Gly (G) o A21Gln (Q), y la extensión comienza con un residuo Gly (G).
- Además, aún en otra modalidad, si el análogo de insulina contiene la posición nativa A21N, entonces el primer aminoácido del extremo N-terminal del oligómero de la extensión no debe ser un residuo Gly (G).
- 25 En una 3^{ra} modalidad, la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina se extiende en el extremo N-terminal de la cadena B.
- En una 4^{ta} modalidad, la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina se extiende en el extremo C-terminal de la cadena A.
- 30 En una 5^{ta} modalidad, la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina se extiende en el extremo N-terminal de la cadena B y desde el extremo C-terminal de la cadena A.
- 35 En una 6^{ta} modalidad, la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina se extiende con
- A) residuos de aminoácidos contiguos que comprenden residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en [A, G, y H o Q]; o del grupo [E, G, y H o Q]; o del grupo [G, P, y H o Q]; (es decir, Grupo A); o
- 40 B) residuos de aminoácidos contiguos que comprenden residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en [A, G, P, y H o Q]; o del grupo [E, G, P, y H o Q]; o del grupo [G, K, P, y H o Q]; o del grupo [E, G, H, y Q]; (es decir, Grupo B); o
- C) residuos de aminoácidos contiguos que comprenden residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en [A, G, P, H, y Q]; o del grupo [E, G, P, H, y Q]; (es decir, Grupo C); o
- 45 D) residuos de aminoácidos contiguos que comprenden residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en [A, E, G, P, H y Q]; (es decir, Grupo D);
- 50 y/o cualquier combinación de Grupos A, B, C y D.
- En una 7^{ma} modalidad, la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina se extiende con secuencias no repetidas, es decir secuencias de orden aleatorio.
- 55 En una modalidad, la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina se extiende con una secuencia de residuos de aminoácidos que comprenden A, D, E, G, H, P, Q, S, y T, en orden aleatorio.
- En otra modalidad, la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina se extiende con una secuencia de residuos de aminoácidos que comprenden A, D, E, G, H, P, y Q, en orden aleatorio.
- 60 En una tercera modalidad, la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina se extiende con una secuencia de residuos de aminoácidos que comprenden A, E, G, H, P, Q, S, y T, en orden aleatorio.
- En una cuarta modalidad, la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina se extiende con una secuencia de residuos de aminoácidos que comprenden A, E, G, H, P, y Q, en cantidades aproximadamente iguales, pero en orden aleatorio.
- 65

ES 2 784 603 T3

En una 8^{va} modalidad la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina se extiende con repeticiones de determinados motivos, tales motivos pueden repetirse según sea necesario con el fin de obtener una extensión de la longitud y tamaño deseados. En dependencia del motivo en cuestión, el número de repeticiones puede estar dentro del intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 400.

En una modalidad, el número de repeticiones está dentro del intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 250.

En otra modalidad, el número de repeticiones está dentro del intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 200.

En una tercera modalidad, el número de repeticiones es 10, 12, 13, 15, 20, 25, 30, 31, 33, 37, 40, 44, 49, 50, 56, 60, 62, 65, 66, 67, 69, 70, 75, 80, 90, 100, 125, o 150.

En una 9^{na} modalidad los residuos de aminoácidos del Grupo A se representan por residuos de aminoácidos contiguos que se seleccionan del grupo que consiste en [A, G, y H o Q] (es decir, Grupo A1).

En una modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo A1 se seleccionan del grupo que consiste en [A, G, y H].

En otra modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo A1, que se seleccionan del grupo que consiste en [A, G, y H], se representan por uno o más de los siguientes motivos: [GHA]; [HAG]; [AGH]; [GAH]; [AHG]; y [HGA]; y cualquier combinación de estos.

En una tercera modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo A1 se seleccionan del grupo que consiste en [A, G, y Q].

En una cuarta modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo A1, que se seleccionan del grupo que consiste en [A, G, y Q], se representan por uno o más de los siguientes motivos: [GQA]; [QAG]; [AGQ]; [GAQ]; [AQG]; y [QGA]; y cualquier combinación de estos.

En una quinta modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo A1, que se seleccionan del grupo que consiste en [A, G, y Q], se representan por uno o ambos de los siguientes motivos: [GQA]; y [GAQ]; y cualquier combinación de estos.

En una sexta modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo A1, que se seleccionan del grupo que consiste en [A, G, y Q], se representan por el motivo: [GAQ]; en cualquier combinación.

En una 10^{ma} modalidad los residuos de aminoácidos del Grupo A se representan por residuos de aminoácidos contiguos que se seleccionan del grupo que consiste en [E, G, y H o Q] (es decir, Grupo A2).

En una modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo A2 se seleccionan del grupo que consiste en [E, G, y H].

En otra modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo A2, que se seleccionan del grupo que consiste en [E, G, y H], se representan por uno o más de los siguientes motivos: [GEH]; [EHG]; [HGE]; [GHE]; [HEG]; y [EGH]; y cualquier combinación de estos.

En una tercera modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo A2, que se seleccionan del grupo que consiste en [E, G, y H], se representan por uno o ambos de los siguientes motivos: [GEH]; y [GHE]; y cualquier combinación de estos.

En una cuarta modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo A2, que se seleccionan del grupo que consiste en [E, G, y H], se representan por el motivo: [GEH], en cualquier combinación.

En una quinta modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo A2 se seleccionan del grupo que consiste en [E, G, y Q].

En una sexta modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo A2, que se seleccionan del grupo que consiste en [E, G, y Q], se representan por uno o más de los siguientes motivos: [GEQ]; [EQG]; [QGE]; [GQE]; [QEG]; y [EGQ]; y cualquier combinación de estos.

En una séptima modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo A2, que se seleccionan del grupo que consiste en [E, G, y Q], se representan por uno o ambos de los siguientes motivos: [GEQ]; y [GQE]; y cualquier combinación de estos.

En una 11^{ra} modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo A se representan por residuos de aminoácidos contiguos que se seleccionan del grupo que consiste en [G, P, y H o Q] (es decir, Grupo A3).

En una modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo A3 se seleccionan del grupo que consiste en [G, P, y H].

ES 2 784 603 T3

En otra modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo A3, que se seleccionan del grupo que consiste en [G, P, y H], se representan por uno o más de los siguientes motivos: [GHPH]; [HPHG]; [PHGH]; y [HGHP]; y cualquier combinación de estos.

- 5 En una tercera modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo A3, que se seleccionan del grupo que consiste en [G, P, y H], se representan por el motivo: [GHPH].

En una cuarta modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo A3 se seleccionan del grupo que consiste en [G, P, y Q].

- 10 En una quinta modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo A3, que se seleccionan del grupo que consiste en [G, P, y Q], se representan por uno o más de los siguientes motivos: [GQP]; [QPQ]; y [PGQ]; y cualquier combinación de estos.

En una sexta modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo A3, que se seleccionan del grupo que consiste en [G, P, y Q], se representan por uno o más de los siguientes motivos: [GQPQ]; [QPQG]; [PQGQ]; y [QGQP]; y cualquier combinación de estos.

- 15

En una séptima modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo A se seleccionan del grupo que consiste en uno o más de los siguientes motivos: [GAQ]; [GEH]; [GEQ]; [GQA]; [GQE]; y/o [GQP]; y cualquier combinación de estos.

- 20 En una 12^{da} modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo B se representan por residuos de aminoácidos contiguos que se seleccionan del grupo que consiste en [A, G, P, y H o Q] (es decir, Grupo B1).

En una modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo B1 se seleccionan del grupo [A,G,P,H].

- 25 En otra modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo B1, que se seleccionan del grupo que consiste en [A,G,P,H], se representan por uno o más de los siguientes motivos: [GAPH]; [APHG]; [PHGA]; [HGAP]; [GAHP]; [AHPG]; [HPGA]; [PGAH]; [GPAH]; [PAHG]; [AHGP]; [HGPA]; [GHAP]; [HAPG]; [APGH]; [PGHA]; [GHPA]; [HPAG]; [PAGH]; [AGHP]; [PHAG]; [HAGP]; [AGPH]; y [GPHA]; y cualquier combinación de estos.

- 30 En una tercera modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo B1, que se seleccionan del grupo que consiste en [A,G,P,H], se representan por el siguiente motivo: [GAPH].

En una cuarta modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo B1 se seleccionan del grupo [A,G,P,Q].

- 35 En una quinta modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo B1, que se seleccionan del grupo que consiste en [A,G,P,Q], se representan por uno o más de los motivos siguientes: [GAPQ]; [APQG]; [PQGA]; [QGAP]; [GAQP]; [AQPG]; [QPGA]; [PGAQ]; [GPAQ]; [PAQG]; [AQGP]; [QGPA]; [GQAP]; [QAPG]; [APGQ]; [PGQA]; [GQPA]; [QPAG]; [PAGQ]; [AGQP]; [PQAG]; [QAGP]; [AGPQ]; y [GPQA]; y cualquier combinación de estos.

- 40 En una sexta modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo B1, que se seleccionan del grupo que consiste en [A,G,P,Q], se representan por uno o más de los motivos siguientes: [GAPQ]; [GAQP]; [GPAQ]; [GQAP]; [GQPA]; [PQAG]; y [GPQA]; y cualquier combinación de estos.

En una 13^{ra} modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo B se representan por residuos de aminoácidos contiguos

- 45 que se seleccionan del grupo que consiste en [E, G, P, y H o Q] (es decir, Grupo B2).

En una modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo B2 se seleccionan del grupo que consiste en [E,G,P,H].

En otra modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo B2, que se seleccionan del grupo que consiste en [E,G,P,H], se representan por uno o más de los siguientes motivos: [GEHP]; [EHPG]; [HPGE]; [PGEH]; [GEPH]; [EPHG]; [PHGE]; [HGEP]; [GHPE]; [HPEG]; [PEGH]; [EGHP]; [GHPE]; [HEPG]; [EPGH]; [PGHE]; [GHHP]; [HHPG]; [HPGH]; [PGHH]; [GPEH]; [PEHG]; [EHGP]; [HGPE]; [GPHE]; [PHEG]; [HEGP]; y [EGPH]; y cualquier combinación de estos.

- 50 En una tercera modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo B2, que se seleccionan del grupo que consiste en [E,G,P,H], se representan por uno o más de los siguientes motivos: [GEHP]; [GEPH]; [GHPE]; [GHPE]; [GHHP]; [GPEH]; y [GPHE]; y cualquier combinación de estos.

En una cuarta modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo B2 se seleccionan del grupo que consiste en [E,G,P,Q].

- 60 En una quinta modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo B2, que se seleccionan del grupo que consiste en [E,G,P,Q], se representan por uno o más de los motivos siguientes: [GEQP]; [EQPG]; [QPGE]; [PGEQ]; [GEPQ]; [EPQG]; [PQGE]; [QGEQ]; [GQPE]; [QPEG]; [PEGQ]; [EGQP]; [GQEP]; [QEPG]; [EPGQ]; [PGQE]; [GQQP]; [QQPG]; [QPGQ]; [PGQQ]; [GPEQ]; [PEQG]; [EQGP]; [QGPE]; [GPQE]; [PQEG]; [QEGP]; y [EGPQ]; y cualquier combinación de estos.

En una sexta modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo B2, que se seleccionan del grupo que consiste en [E,G,P,Q], se representan por uno o más de los motivos siguientes: [GEQP]; [GEPQ]; [GQPE]; [GQEP]; [GPEQ]; y [GPQE]; y cualquier combinación de estos.

- 5 En una 14^a modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo B se representan por residuos de aminoácidos contiguos que se seleccionan del grupo que consiste en [E, G, H, y Q] (es decir, Grupo B4).

En una modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo B4 se seleccionan del grupo [E,G,H,Q].

- 10 En otra modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo B4, que se seleccionan del grupo que consiste en [E,G,H,Q], se representan por uno o más de los motivos siguientes: [GEQH]; [EQHG]; [QHGE]; [HGEG]; [GEHQ]; [EHQG]; [HQGE]; [QGEH]; [GHEQ]; [HEQG]; [EQGH]; [QGHE]; [GHQE]; [HQEG]; [QEGH]; [EGHQ]; [GQHP]; [QHQP]; [HPGQ]; [PGQH]; [GQEH]; [QEHG]; [EHGQ]; [HGQE]; [GQHE]; [QHEG]; [HEGQ]; [EGQH]; [GHQP]; [HQPG]; [QPGH]; y [PGHQ]; y cualquier combinación de estos.

- 15 En una tercera modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo B4, que se seleccionan del grupo que consiste en [E,G,H,Q], se representan por uno o más de los motivos siguientes: [GEQH]; [GEHQ]; [GHEQ]; [GHQE]; [GQHP]; [GQEH]; y [GQHE]; y cualquier combinación de estos.

- 20 En una cuarta modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo B se seleccionan del grupo que consiste en uno o más de los siguientes motivos: [GAPH]; [GAPQ]; [GAQP]; [GPAQ]; [GQAP]; [GQPA]; [PQAG]; [GPQA]; [GEHP]; [GEPH]; [GHPE]; [GHEP]; [GHHP]; [GPEH]; [GPHE]; [GEQP]; [GEPQ]; [GQPE]; [GQEP]; [GPEQ]; [GPQE]; [GEQH]; [GEHQ]; [GHEQ]; [GHQE]; [GQHP]; [GQEH]; y/o [GQHE]; y cualquier combinación de estos.

- 25 En una 15^a modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo C se representan por residuos de aminoácidos contiguos que se seleccionan del grupo que consiste en [A, G, P, H, y Q] (es decir, Grupo C1).

En una modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo C1, que se seleccionan del grupo que consiste en [A, G, P, H, y Q], se representan por uno o más de los siguientes motivos: [GHAPGHHP]; [HAPGHHPG]; [APGHHPGH];

- 30 [PGHHPGHA]; [GHHPGHAP]; [HHPGHAPG]; [HPGHAPGH]; [PGHAPGHH]; [GHAPGQHP]; [HAPGQHPG]; [APGQHPGH]; [PGQHPGHA]; [GQHPGHAP]; [QHPGHAPG]; [HPGHAPGQ]; [PGHAPGQH]; [GQAPGQHP]; [QAPGQHPG]; [APGQHPGQ]; [PGQHPGQA]; [GQHPGQAP]; [QHPGQAPG]; [HPGQAPGQ]; y [PGQAPGQH]; y cualquier combinación de estos.

- 35 En otra modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo C1, que se seleccionan del grupo que consiste en [A, G, P, H, y Q], se representan por uno o más de los siguientes motivos:

- 40 [GQAPGQAPGAPHGAPH]; [HGQAPGQAPGAPHGAP]; [PHGQAPGQAPGAPHGA]; [APHGQAPGQAPGAPHG]; [GAPHGQAPGQAPGAPG]; [HGAPHGQAPGQAPGAPG]; [PHGAPHGQAPGQAPGAPGA]; [APHGAPHGQAPGQAPG]; [GAPHGAPHGQAPGQAPG]; [PGAPHGAPHGQAPGQA]; [APGAPHGAPHGQAPGQ]; [QAPGAPHGAPHGQAPG]; [GQAPGAPHGAPHGAPG]; [PGQAPGAPHGAPHGQA]; [APGQAPGAPHGAPHGQ]; [GQAPGAPHGAPHGAPH]; [QAPGAPHGAPHGAPHG]; [APGAPHGAPHGAPHGQ]; [PGAPHGAPHGAPHGQA]; [GAPHGAPHGAPHGQAPG]; [GAPHGAPHGQAPGAPG]; [APHGAPHGQAPGAPHG]; [PHGAPHGQAPGAPHGA]; [HGAPHGQAPGAPHGAP]; [GAPHGQAPGAPHGAPH];
- 45 [APHGQAPGAPHGAPHG]; [PHGQAPGAPHGAPHGA]; [HGQAPGAPHGAPHGAP]; y [QAPGQAPGAPHGAPHG]; y cualquier combinación de estos.

En una tercera modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo C1, que se seleccionan del grupo que consiste en [A, G, P, H, y Q], se representan por uno o más de los siguientes motivos:

- 50 [GQAPGQAPGQAPGAPH]; [HGQAPGQAPGQAPGAP]; [PHGQAPGQAPGQAPGA]; [APHGQAPGQAPGQAPG]; [GAPHGQAPGQAPGQAPG]; [PGAPHGQAPGQAPGQA]; [APGAPHGQAPGQAPGQ]; [QAPGAPHGQAPGQAPG]; [GQAPGAPHGQAPGQAPG]; [PGQAPGAPHGQAPGQA]; [APGQAPGAPHGQAPGQ]; [QAPGQAPGAPHGQAPG]; [GQAPGQAPGAPHGQAPG]; [PGQAPGQAPGAPHGQA]; [APGQAPGQAPGAPHGQ]; y [QAPGQAPGQAPGAPHG]; y cualquier combinación de estos.

En una 16^a modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo C se representan por residuos de aminoácidos contiguos que se seleccionan del grupo que consiste en [E, G, P, H, y Q] (es decir, Grupo C2).

- 60 En una modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo C2, que se seleccionan del grupo que consiste en [E, G, P, H, y Q], se representan por uno o más de los siguientes motivos: [GHEPGHHP]; [HEPGHHPG]; [EPGHHPGH]; [PGHHPGHE]; [GHHPGHEP]; [HHPGHEPG]; [HPGHEPGH]; [PGHEPGHH]; [GHEPGQHP]; [HEPGQHPG]; [EPGQHPGH]; [PGQHPGHE]; [GQHPGHEP]; [QHPGHEPG]; [HPGHEPGQ]; [PGHEPGQH]; [GQEPGQHP]; [QEHPGHPG]; [EPGQHPGQ]; [PGQHPGQE]; [GQHPGQEP]; [QHPGQEPG]; [HPGQEPGQ]; y [PGQEPGQH]; y cualquier combinación de estos.
- 65

En otra modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo C, que se seleccionan del grupo que consiste en [E, G, P, H, y Q], se representan por uno o más de los siguientes motivos: [GHEPGHHP]; [GHEPGQHP]; y [GQEPGQHP]; y cualquier combinación de estos.

- 5 En una tercera modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo C se seleccionan del grupo que consiste en uno o más de los siguientes motivos: [GHEPGHHP]; [GHEPGQHP]; [GQEPGQHP]; [GQAPGAPHGAPHGAPH]; [GQAPGQAPGAPHGAPH]; y/o [GQAPGQAPGQAPGAPH]; y cualquier combinación de estos.

- 10 En una 17^{ma} modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo D se representan por residuos de aminoácidos contiguos que se seleccionan del grupo que consiste en [A, E, G, P, H, y Q], (es decir, Grupo D1); o el grupo [A, E, G, H, P, Q] (en orden aleatorio) (es decir, Grupo D2).

- En una modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo D1, que se seleccionan del grupo que consiste en [A, E, G, P, H, y Q], se representan por uno o más de los siguientes motivos: [GEHPGAPHGQEPGQAP]; [EHPGAPHGQEPGQAPG];
- 15 [HPGAPHGQEPGQAPGE]; [PGAPHGQEPGQAPGEH]; [GAPHGQEPGQAPGEHP]; [APHGQEPGQAPGEHPG];
 [PHGQEPGQAPGEHPGA]; [HGQEPGQAPGEHPGAP]; [GQEPGQAPGEHPGAPH]; [QEPGQAPGEHPGAPHG];
 [EPGQAPGEHPGAPHGQ]; [PGQAPGEHPGAPHGQE]; [GQAPGEHPGAPHGQEP]; [QAPGEHPGAPHGQEPG];
 [APGEHPGAPHGQEPGQ]; [PGEHPGAPHGQEPGQA]; [GQAPGQAPGAPHGAPH]; [QAPGQAPGAPHGAPHG];
 [APGQAPGAPHGAPHGQ]; [PGQAPGAPHGAPHGQA]; [GQAPGAPHGAPHGQAP]; [QAPGAPHGAPHGQAPG];
- 20 [APGAPHGAPHGQAPGQ]; [PGAPHGAPHGQAPGQA]; [GAPHGAPHGQAPGQAP]; [APHGAPHGQAPGQAPG];
 [PHGAPHGQAPGQAPGA]; [HGAPHGQAPGQAPGAP]; [GAPHGQAPGQAPGAPH]; [APHGQAPGQAPGAPHG];
 [PHGQAPGQAPGAPHGA]; [HGQAPGQAPGAPHGAP]; [GQAPGQAPGQAPGAPH]; [QAPGQAPGQAPGAPHG];
 [APGQAPGQAPGAPHGQ]; [PGQAPGQAPGAPHGQA]; [GQAPGQAPGAPHGQAP]; [QAPGQAPGAPHGQAPG];
 [APGQAPGAPHGQAPGQ]; [PGQAPGAPHGQAPGQA]; [GQAPGAPHGQAPGQAP]; [QAPGAPHGQAPGQAPG];
- 25 [APGAPHGQAPGQAPGQ]; [PGAPHGQAPGQAPGQA]; [GAPHGQAPGQAPGQAP]; [APHGQAPGQAPGQAPG];
 [PHGQAPGQAPGQAPGA]; [HGQAPGQAPGQAPGAP]; [GQEPGAPHGAPHGAPH]; [QEPGAPHGAPHGAPHG];
 [EPGAPHGAPHGAPHGQ]; [PGAPHGAPHGAPHGQE]; [GAPHGAPHGAPHGQEP]; [APHGAPHGAPHGQEPG];
 [PHGAPHGQEPGQEPGA]; [HGAPHGQEPGQEPGAP]; [GAPHGQEPGQEPGAPH]; [APHGQEPGQEPGAPHG];
 [PHGQEPGAPHGAPHGA]; [HGQEPGAPHGAPHGAP]; [GQEPGQEPGAPHGAPH]; [QEPGQEPGAPHGAPHG];
- 30 [EPGQEPGAPHGAPHGQ]; [PGQEPGAPHGAPHGQE]; [GQEPGAPHGAPHGQEP]; [QEPGAPHGAPHGQEPG];
 [EPGAPHGAPHGQEPGQ]; [PGAPHGAPHGQEPGQE]; [GAPHGAPHGQEPGQEP]; [APHGAPHGQEPGQEPG];
 [PHGAPHGQEPGQEPGA]; [HGAPHGQEPGQEPGAP]; [GAPHGQEPGQEPGAPH]; [APHGQEPGQEPGAPHG];
 [PHGQEPGQEPGAPHGA]; [HGQEPGQEPGAPHGAP]; [GQEPGQEPGQEPGAPH]; [QEPGQEPGQEPGAPHG];
 [EPGQEPGQEPGAPHGQ]; [PGQEPGQEPGAPHGQE]; [GQEPGQEPGAPHGQEP]; [QEPGQEPGAPHGQEPG];
 [EPGAPHGQEPGQEPGQ]; [PGAPHGQEPGQEPGQE]; [GAPHGQEPGQEPGQEP]; [APHGQEPGQEPGQEPG];
- 35 [EPGQEPGQEPGAPHGQ]; [PGQEPGQEPGAPHGQE]; [GQEPGQEPGAPHGQEP]; [QEPGQEPGAPHGQEPG];
 [EPGQEPGAPHGQEPGQ]; [PGQEPGAPHGQEPGQE]; [GQEPGAPHGQEPGQEP]; [QEPGAPHGQEPGQEPG];
 [EPGAPHGQEPGQEPGQ]; [PGAPHGQEPGQEPGQE]; [GAPHGQEPGQEPGQEP]; [APHGQEPGQEPGQEPG];
 [PHGQEPGQEPGQEPGA]; y [HGQEPGQEPGQEPGAP]; y cualquier combinación de estos.

- 40 En otra modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo D1, que se seleccionan del grupo que consiste en [A, E, G, P, H, y Q], se representan por uno o más de los siguientes motivos: [GEHPGAPHGQEPGQAP]; [GQAPGAPHGAPHGAPH]; [GQAPGQAPGAPHGAPH]; [GQAPGQAPGQAPGAPH]; [GQEPGAPHGAPHGAPH]; [GQEPGQEPGAPHGAPH]; y [GQEPGQEPGQEPGAPH]; y cualquier combinación de estos.

- 45 En otra modalidad, los residuos de aminoácidos del Grupo D se seleccionan del grupo que consiste en uno o más de los siguientes motivos: [GEHPGAPHGQEPGQAP]; [GQEPGAPHGAPHGAPH]; [GQEPGQEPGAPHGAPH]; y [GQEPGQEPGQEPGAPH]; y cualquier combinación de estos.

En una 18^{va} modalidad, la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina se extiende con

- 50 un motivo del Grupo A que se selecciona del grupo que consiste en [GEH]; [GQA]; [GQE]; [GHE]; [GEQ]; [GAQ]; y [GQP]; y/o cualquier combinación de estas; y/o

- un motivo del Grupo B que se selecciona del grupo que consiste en [GAPH]; [GAPQ]; [GEHP]; [GEPH]; [GEQH]; [GHEP];
 55 [GHHP]; [PQAG]; [GQAP]; [GQEP]; [GQHP]; [GQPE]; [GEQP]; [GEPQ]; [GPEQ]; [GPQE]; [GQPA]; [GAQP]; [GPAQ]; [GPQA]; [GHPE]; [GPEH]; [GPHE]; [GQEH]; [GQHE]; [GEHQ]; [GHEQ]; y [GHQE]; y/o cualquier combinación de estas; y/o

- un motivo del Grupo que se selecciona del grupo que consiste en [GHEP-GHHP]; [GHEP-GQHP]; y [GQEP-GQHP]; y/o
 60 cualquier combinación de estos; y/o

- un motivo del Grupo D que se selecciona del grupo que consiste en [GEHP-GAPH-GQEP-GQAP]; [GQAP-GAPH-GAPH-GAPH]; [GQAP-GQAP-GAPH-GAPH]; [GQAP-GQAP-GQAP-GAPH]; [GQEP-GAPH-GAPH-GAPH]; [GQEP-GQEP-GAPH-GAPH]; y [GQEP-GQEP-GQEP-GAPH]; y/o cualquier combinación de estos; y/o

- 65 cualquier combinación de motivos de los Grupos A, B, C y D;

cuyo motivo puede repetirse según sea necesario para obtener una extensión de la longitud y tamaño deseados.

- En una 19^{na} modalidad, la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina se extiende con
- 5 un motivo del Grupo A que se selecciona de [GAQ]; [GEH]; [GEQ]; [GQA]; [GQE]; y [GQP]; y/o cualquier combinación de estos; y/o
- 10 un motivo del Grupo B que se selecciona de [GAPH]; [GAPQ]; [GAQP]; [GEHP]; [GEPH]; [GEPQ]; [GEQH]; [GEQP]; [GHEP]; [GHEQ]; [GHPE]; [GHQE]; [GPAQ]; [GPEH]; [GPEQ]; [GPHE]; [GPQA]; [GPQE]; [GQAP]; [GQEH]; [GQEP]; [GQHE]; [GQPA]; y [GQPE]; y/o cualquier combinación de estos; y/o
- 15 un motivo del Grupo C que se selecciona de [GHEPGQHP]; [GQEPGQHP]; [GQAPGQAPGQAPGAPH]; y [GQAPGQAPGAPHGAPH]; y/o cualquier combinación de estos; y/o
- 20 un motivo del Grupo D que se selecciona de [GEHPGAPHGQEPGQAP]; [GQEPGQEPGQEPGAPH]; [GQEPGQEPGAPHGAPH]; y [A,E,G,P,H,Q]; y/o cualquier combinación de estos.
- La insulina o el análogo de insulina pueden extenderse con uno o más residuos de aminoácidos identificados anteriormente, y la repetición en cuestión no tiene que comenzar con Gly (G).
- La insulina o el análogo de insulina pueden extenderse con uno o más residuos de aminoácidos identificados anteriormente, y la repetición en cuestión puede comenzar con cualquier aminoácido de la repetición (por ejemplo, el análogo de insulina extendido con repetición GAPH puede comenzar con APH, PH o H, seguido de repeticiones de GAPH).
- 25 En una 20^{ma} modalidad, la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina comprende de aproximadamente 100 a aproximadamente 800 residuos de aminoácidos contiguos en su extensión.
- 30 En una modalidad, la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina comprende al menos aproximadamente 100 residuos de aminoácidos contiguos.
- En otra modalidad, la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina comprende menos de aproximadamente 800 residuos de aminoácidos contiguos.
- 35 En una tercera modalidad, la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina comprende de aproximadamente 100 a aproximadamente 700 residuos de aminoácidos contiguos.
- En una cuarta modalidad, la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina comprende de aproximadamente 100 a aproximadamente 600 residuos de aminoácidos contiguos.
- 40 En una quinta modalidad, la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina comprende de aproximadamente 100 a aproximadamente 500 residuos de aminoácidos contiguos.
- 45 En una sexta modalidad, la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina comprende de aproximadamente 100 a aproximadamente 400 residuos de aminoácidos contiguos.
- En una séptima modalidad, la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina comprende de aproximadamente 100 a aproximadamente 300 residuos de aminoácidos contiguos.
- 50 En una octava modalidad, la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina comprende de aproximadamente 150 a aproximadamente 300 residuos de aminoácidos contiguos.
- En una novena modalidad, la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina comprende de aproximadamente 150 a aproximadamente 250 residuos de aminoácidos contiguos.
- 55 En una décima modalidad, la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina comprende de aproximadamente 175 a aproximadamente 225 residuos de aminoácidos contiguos.
- 60 En una undécima modalidad, la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina comprende de aproximadamente 185 a aproximadamente 215 residuos de aminoácidos contiguos.
- En una duodécima modalidad, la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina comprende de aproximadamente 190 a aproximadamente 210 residuos de aminoácidos contiguos; y en particular 124, 148, 176, 196, 198, 200, 201, 208, 224, 248, 276, 300, 400, 500, o 600 residuos de aminoácidos contiguos.
- 65

ES 2 784 603 T3

En una decimotercera modalidad, la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina comprende de aproximadamente 190 a aproximadamente 210 residuos de aminoácidos contiguos; y en particular 200, 201, 208 residuos de aminoácidos contiguos.

- 5 En una 21^{ra} modalidad, la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina es un compuesto de la Fórmula general I

Ins-Ext (I)

en donde:

- 10 "Ins" representa un análogo de la insulina humana como se identifica en la Tabla 1 a continuación; y
"Ext" indica una extensión como se describe en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

15	Ej. N.º	Análogo de insulina	Extensión*** (repetición)	N.º**
	1	A21Q*, desB30	GQEP	200
	2	A21Q*, desB30	GAPQ	200
	3	A21Q*, desB30	GQAP	200
20	4	A21Q*, desB30	GEPH	200
	5	A21Q*, desB30	GEHP	200
	6	A14E, A21G*, B25H, desB30	GQEP	200
	7	A14E, A21G*, B25H, desB30	GAPQ	200
	9	A14E, A21G*, B25H, desB30	GEPH	200
25	10	A14E, A21G*, B25H, desB30	GEHP	200
	11	A14E, A21G*, B25H, desB30	GAPH	200
	12	A21G*, desB30	GEHPGAPHGQEPGQAP	208
	13	A21G*, desB30	GEH	201
	14	A21G*, desB30	GQA	201
30	15	A21G*, desB30	GQE	201
	16	A21G*, desB30	GEQH	200
	17	A21G*, desB30	GQEPGQEPGQEPGAPH	200
	18	A21G*, desB30	GQEPGQEPGAPHGAPH	200
	20	A21G*, desB30	GQAPGQAPGQAPGAPH	200
35	21	A21G*, desB30	GQAPGQAPGAPHGAPH	200
	23	A21G*, desB30	[A,E,G,H,P,Q] (en orden aleatorio)	200
	24	A21G*, desB30	GHEPGQHP	200
	25	A21G*, desB30	GQEPGQHP	200
	32	A21G*, desB30	GQPE	200
40	33	A21G*, desB30	GEQP	200
	34	A21G*, desB30	GEPQ	200
	35	A21G*, desB30	GPEQ	200
	36	A21G*, desB30	GPQE	200
	37	A21G*, desB30	GQPA	200
45	38	A21G*, desB30	GAQP	200
	39	A21G*, desB30	GPAQ	200
	40	A21G*, desB30	GPQA	200
	41	A21G*, desB30	GHEP	200
	42	A21G*, desB30	GHPE	200
50	43	A21G*, desB30	GPEH	200
	44	A21G*, desB30	GPHE	200
	45	A21G*, desB30	GQEH	200
	46	A21G*, desB30	GQHE	200
	48	A21G*, desB30	GHEQ	200
55	49	A21G*, desB30	GHQE	200
	51	A21G*, desB30	GEQ	201
	52	A21G*, desB30	GAQ	201
	53	A21G*, desB30	GQAP	248
	54	A21G*, desB30	GQAP	300
60	55	A21G*, desB30	GQAP	400
	56	A21G*, desB30	GQAP	200
	57	A21G*, desB30	GQAP	500
	58	A21G*, desB30	GQAP	600
	59	A14E, A21G*, B25H, desB30	GQAP	200
65	60	A14E, A21G*, B25H, desB30	GQAP	300
	61	A14E, A21G*, B25H, desB30	GQAP	600

62	A21G, B1F*, desB30	GQAP	200
63	A21G, B1F*, desB30	GQAP	400
64	A21G, A22A, A23P, A24Q*, desB30	GAPQ	196
65	A21G, A22A, A23Q, A24P*, desB30	GAQP	196
5 66	A21G, A22Q, A23A, A24P*, desB30	GQAP	196
67	A21G, A22Q, A23P, A24A*, desB30	GQPA	196
68	A21G, A22P, A23A, A24Q*, desB30	GPAQ	196
69	A21G, A22P, A23Q, A24A*, desB30	GPQA	196
70	A21G*, desB30	GQAP	224
10 71	A21G*, desB30	GQAP	276
72	A21G*, desB30	GQAP	124
73	A21G*, desB30	GQAP	148
74	A21G*, desB30	GQAP	176
75	A21G, A22Q, A23P*, desB30	GQP	198
15 76	A21G, A22A, A23Q, A24P*, desB30	GAQP	148
77	A21G, A22A, A23Q, A24P*, desB30	GAQP	248

* indica el punto de extensión

** indica la cantidad de residuos de aminoácidos en la extensión

20 *** en el orden especificado (a menos que se indique de otra manera)

En una 22^{da} modalidad, la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina es un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en

- 25 insulina humana A21Q(GQEP)₅₀, desB30;
insulina humana A21Q(GAPQ)₅₀, desB30;
insulina humana A21Q(GQAP)₅₀, desB30;
insulina humana A21Q(GEPH)₅₀, desB30;
insulina humana A21Q(GEHP)₅₀, desB30;
- 30 insulina humana A14E, A21G(GQEP)₅₀, B25H, desB30;
insulina humana A14E, A21G(GAPQ)₅₀, B25H, desB30;
insulina humana A14E, A21G(GEPH)₅₀, B25H, desB30;
insulina humana A14E, A21G(GEHP)₅₀, B25H, desB30;
insulina humana A14E, A21G(GAPH)₅₀, B25H, desB30;
- 35 insulina humana A21G(GEHPGAPHGQEPGQAP)₁₃, desB30;
insulina humana A21G(GEH)₆₇, desB30;
insulina humana A21G(GQA)₆₇, desB30;
insulina humana A21G(GQE)₆₇, desB30;
insulina humana A21G(GEQH)₅₀, desB30;
- 40 insulina humana A21G(GQEPGQEPGQEPGAPH)₁₂GQEPGQEP, desB30;
insulina humana A21G(GQEPGQEPGAPHGAPH)₁₂GQEPGQEP, desB30;
insulina humana A21G(GQAPGQAPGQAPGAPH)₁₂GQAPGQAP, desB30;
insulina humana A21G(GQAPGQAPGAPHGAPH)₁₂GQAPGQAP, desB30;
insulina humana A21G[A,E,G,H,P,Q] (200 amino ácidos aleatorios), desB30;
- 45 insulina humana A21G(GHEPGQHP)₂₅, desB30;
insulina humana A21G(GQEPGQHP)₂₅, desB30;
insulina humana A21G(GQPE)₅₀, desB30;
insulina humana A21G(GEQP)₅₀, desB30;
insulina humana A21G(GEPQ)₅₀, desB30;
- 50 insulina humana A21G(GPEQ)₅₀, desB30;
insulina humana A21G(GPQE)₅₀, desB30;
insulina humana A21G(GQPA)₅₀, desB30;
insulina humana A21G(GAQP)₅₀, desB30;
insulina humana A21G(GPAQ)₅₀, desB30;
- 55 insulina humana A21G(GPQA)₅₀, desB30;
insulina humana A21G(GHEP)₅₀, desB30;
insulina humana A21G(GHPE)₅₀, desB30;
insulina humana A21G(GPEH)₅₀, desB30;
insulina humana A21G(GPHE)₅₀, desB30;
- 60 insulina humana A21G(GQEH)₅₀, desB30;
insulina humana A21G(GQHE)₅₀, desB30;
insulina humana A21G(GHEQ)₅₀, desB30;
insulina humana A21G(GHQE)₅₀, desB30;
insulina humana A21G(GEQ)₆₇, desB30;
- 65 insulina humana A21G(GAQ)₆₇, desB30;
insulina humana A21G(GQAP)₆₂, desB30;

- insulina humana A21G(GQAP)₇₅, desB30;
 insulina humana A21G(GQAP)₁₀₀, desB30;
 insulina humana A21G(GQAP)₅₀, desB30;
 insulina humana A21G(GQAP)₁₂₅, desB30;
- 5 insulina humana A21G(GQAP)₁₅₀, desB30;
 insulina humana A14E, A21G(GQAP)₅₀, B25H, desB30;
 insulina humana A14E, A21G(GQAP)₇₅, B25H, desB30;
 insulina humana A14E, A21G(GQAP)₁₅₀, B25H, desB30;
 insulina humana A21G, B1F(GQAP)₅₀, desB30;
- 10 insulina humana A21G, B1F(GQAP)₁₀₀, desB30;
 insulina humana A21G, A22A, A23P, A24Q(GAPQ)₄₉, desB30;
 insulina humana A21G, A22A, A23Q, A24P(GAQP)₄₉, desB30;
 insulina humana A21G, A22Q, A23A, A24P(GQAP)₄₉, desB30;
 insulina humana A21G, A22Q, A23P, A24A(GQPA)₄₉, desB30;
- 15 insulina humana A21G, A22P, A23A, A24Q(GPAQ)₄₉, desB30;
 insulina humana A21G, A22P, A23Q, A24A(GPQA)₄₉, desB30;
 insulina humana A21G(GQAP)₅₆, desB30;
 insulina humana A21G(GQAP)₆₉, desB30;
 insulina humana A21G(GQAP)₃₁, desB30;
- 20 insulina humana A21G(GQAP)₃₇, desB30;
 insulina humana A21G(GQAP)₄₄, desB30;
 insulina humana A21G, A22Q, A23P(GQP)₆₆, desB30;
 insulina humana A21G, A22A, A23Q, A24P(GAQP)₃₇, desB30; y
 insulina humana A21G, A22A, A23Q, A24P(GAQP)₆₂, desB30.
- 25 Cualquier combinación de dos o más de las modalidades descritas en la presente descripción se considera dentro del alcance de la presente descripción.
- Nomenclatura de análogos de los insulina extendidos con oligómero
- 30 En el contexto de esta descripción, los análogos de insulina extendidos con oligómero se nombran con relación a la insulina humana por la especificación de deleciones, sustituciones, inserciones y extensiones de aminoácidos, como también se especifica por la Fórmula I general anterior.
- 35 De esta manera el compuesto del Ejemplo 2 representa un análogo de la insulina humana (A21Q*, desB30), en donde el residuo de aminoácido de origen natural localizado en posición 21 de la cadena A se ha sustituido por glutamina (Q), y en donde el residuo de aminoácido de origen natural localizado en posición B30 se ha eliminado, y cuyo análogo se ha extendido en la posición marcada con asterisco (*) con una extensión conformada por repeticiones de los cuatro residuos de aminoácidos (GAPQ en el orden especificado) para producir una extensión que consiste en un total de 200 residuos de aminoácidos (que pueden designarse, además, como (GAPQ)₅₀).
- 40 Este análogo también puede denominarse insulina humana A21Q(GAPQ)₅₀, desB30, y el compuesto se ilustra en la Figura 8.
- 45 Métodos de producción
- La insulina extendida con oligómero o análogo de insulina puede obtenerse mediante métodos convencionales para la preparación de insulina, análogos de insulina y derivados de insulina, y en particular, mediante los métodos descritos en los ejemplos de trabajo.
- 50 En breve, el ADN que codifica insulina se fusiona con el ADN que codifica las extensiones recombinantes. El ADN se transfecta en levadura y la insulina extendida se expresa y se cosecha. La insulina extendida se expresa como una proteína precursora de cadena simple, cuya proteína precursora se escinde posteriormente para obtener una insulina madura extendida de dos cadenas (cadena A y cadena B).
- 55 Actividad biológica
- En otro aspecto la invención proporciona una novedosa insulina extendida con oligómero o análogo de insulina para usar como medicamento, o para usar en la fabricación de medicamentos o composiciones farmacéuticas.
- 60 En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso médico de la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina, y en particular al uso de tales productos para el tratamiento, la prevención o el alivio de enfermedades, trastornos o afecciones que se relacionan con la diabetes, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, alteración de la tolerancia a la glucosa, hiperglicemia, dislipidemia, obesidad, síndrome metabólico (síndrome metabólico X, síndrome de resistencia a la insulina) hipertensión, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto del miocardio, accidente vascular encefálico, trastornos cardiovasculares, enfermedad coronaria, síndrome inflamatorio intestinal, dispepsia o úlceras
- 65

gástricas, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del derivado de insulina a un sujeto que lo necesita.

5 En otra modalidad, la invención se refiere al uso de tales productos para el tratamiento, prevención o alivio de enfermedades, trastornos o afecciones que se relacionan con la diabetes, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, o alteración de la tolerancia a la glucosa, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del derivado de insulina a un sujeto que lo necesita.

10 En una tercera modalidad, la invención se refiere al uso de tales productos para el tratamiento, prevención o alivio de enfermedades, trastornos o afecciones relacionados con la diabetes, y en particular diabetes tipo 1 o diabetes tipo 2.

Composiciones farmacéuticas

15 La presente invención se refiere a las insulinas extendidas con oligómero o análogos de insulina útiles como medicamentos, o para la fabricación de una composición farmacéutica/medicamento, y particularmente para su uso en el tratamiento, prevención o alivio de una enfermedad, trastorno o afección metabólica.

20 Por lo tanto, en otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas novedosas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de una insulina extendida con oligómero o análogo de insulina de acuerdo con la presente invención, opcionalmente junto con uno o más adyuvantes, excipientes, portadores y/o diluyentes.

25 Las composiciones inyectables pueden prepararse mediante el uso de técnicas convencionales, que incluyen típicamente disolver y mezclar los ingredientes según sea apropiado para dar el producto final deseado, la adición de agentes isotónicos, conservantes y/o tampones según sea necesario, y ajustar el valor de pH de la solución, por ejemplo, mediante el uso de un ácido, por ejemplo, ácido clorhídrico, o una base, por ejemplo, hidróxido de sodio acuoso, según sea necesario. Por último, el volumen de la solución puede ajustarse con agua para dar la concentración deseada de los ingredientes.

30 En una modalidad, una solución o suspensión se elabora mediante la disolución de una insulina extendida con oligómero o análogo de insulina en un medio acuoso en condiciones ligeramente ácidas, por ejemplo, a una concentración en el intervalo de aproximadamente 240 a aproximadamente 2400 $\mu\text{mol/L}$. El medio acuoso se hace isotónico, por ejemplo, mediante el uso de cloruro de sodio o glicerol. Además, el medio acuoso puede contener tampones tales como acetato o citrato, conservantes tales como m-cresol o fenol e iones zinc, por ejemplo, 2 a 5 Zn^{++} por 6 insulinas, o en una concentración de hasta aproximadamente 20 μg de Zn^{++} por unidad de actividad de insulina.

35 El valor de pH de la solución se ajusta hacia la neutralidad sin llegar demasiado cerca del punto isoeléctrico del compuesto en cuestión, con el fin de evitar la precipitación potencial. El valor de pH de la preparación final de insulina depende de la concentración de iones de zinc, y la concentración del compuesto de esta descripción. La preparación de insulina se esteriliza, por ejemplo, mediante filtración estéril.

40 Métodos de terapia

La presente invención se refiere a fármacos para uso terapéutico. Más específicamente la invención se refiere al uso de la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina de la invención para el tratamiento o prevención de afecciones médicas relacionadas con la diabetes.

45 Por lo tanto, en otro aspecto, la invención proporciona un método para el tratamiento o alivio de una enfermedad o trastorno o afección de un cuerpo de animal vivo, que incluye un ser humano, cuya enfermedad, trastorno o afección puede seleccionarse de una enfermedad, trastorno o afección que se relaciona con diabetes, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, alteración de la tolerancia a la glucosa, hiperglicemia, dislipidemia, obesidad, síndrome metabólico (síndrome metabólico X, síndrome de resistencia a la insulina), hipertensión, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto del miocardio, accidente vascular encefálico, trastornos cardiovasculares, enfermedad coronaria, síndrome de intestino inflamatorio, dispepsia, o úlceras gástricas, cuyo método comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina de la invención a un sujeto que lo necesita.

55 En otra modalidad la invención proporciona un método para el tratamiento o alivio de una enfermedad o trastorno o afección de un cuerpo de animal vivo, que incluye un ser humano, cuya enfermedad, trastorno o afección puede seleccionarse de una enfermedad, trastorno o afección que se relaciona con diabetes, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, alteración de la tolerancia a la glucosa, hiperglicemia, dislipidemia, obesidad, síndrome metabólico (síndrome metabólico X, síndrome de resistencia a la insulina), hipertensión, desórdenes cognitivos, aterosclerosis, infarto del miocardio, accidente vascular encefálico, desórdenes cardiovasculares, enfermedad coronaria, síndrome inflamatorio intestinal, dispepsia, o úlceras gástricas, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de la insulina extendida con oligómero o análogo de insulina a un sujeto que la necesita.

65 En una tercera modalidad la invención proporciona un método para el tratamiento o alivio de una enfermedad o trastorno o afección de un cuerpo de animal vivo, que incluye un ser humano, cuya enfermedad, trastorno o afección puede seleccionarse de una enfermedad, trastorno o afección relacionada con la diabetes, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2,

alteración de la tolerancia a la glucosa, hiperglicemia, dislipidemia, obesidad, o síndrome metabólico (síndrome metabólico X, síndrome de resistencia a la insulina).

- 5 En una cuarta modalidad la invención proporciona un método para el tratamiento o alivio de una enfermedad o trastorno o afección de un cuerpo de animal vivo, que incluye un ser humano, cuya enfermedad, trastorno o afección puede seleccionarse de una enfermedad, trastorno o afección con relación a la diabetes, en particular diabetes tipo 1, o diabetes tipo 2.

Breve descripción de los dibujos

10

Una modalidad ilustrativa de la presente descripción se ilustra además con referencia al dibujo adjunto, en el cual:

la Figura 1 muestra curvas de concentración de insulina en plasma (pM) después de la administración (s.c.) de los compuestos de los Ejemplos 2 y 5, respectivamente;

- 15 la Figura 2 muestra curvas de concentración de glucosa en plasma (mM) después de la administración (s.c.) de los compuestos de los Ejemplos 2 y 5, respectivamente;

la Figura 3 muestra un ejemplo de un espectro de masa deconvolucionado para un análogo que contiene la repetición GEPS, analizado por LC/MS de fase revertida en el sobrenadante. La masa esperada del compuesto es 43 963,76 Da, que es la masa principal. Una de las masas adicionales es cuatro veces más 162 Da, que es igual a cuatro porciones de hexosa;

- 20 la Figura 4 muestra un análisis de pureza UV de un análogo purificado que contiene las repeticiones GEPS mediante el uso de cromatografía LC de fase inversa. La mayor impureza observada se ha identificado como un producto glicosilado. Como resultado de la baja resolución desde el pico principal, no se eliminó durante el proceso de purificación;

- 25 la Figura 5 muestra un ejemplo de un espectro de masa desenrollado para un precursor análogo que contiene la repetición GQEP que se analizó mediante LC/MS de fase revertida en el sobrenadante. La masa esperada del compuesto es 27 602,75 Da, que es la masa principal. La masa principal adicional es igual a la mitad de la masa pico y es un artefacto del algoritmo usado para deconvolucionar el espectro de masas;

- 30 la Figura 6 muestra un ejemplo de un espectro de masa desenrollado para un precursor análogo que contiene la repetición GEHP analizada por LC/MS de fase revertida en el sobrenadante. La masa esperada del compuesto es 28 053,27 Da, que es la masa principal. La masa principal adicional es igual a la mitad de la masa pico y es un artefacto del algoritmo que se usa para deconvolucionar el espectro de masa; y

la Figura 7 muestra la secuencia de aminoácidos de la extensión del compuesto del Ejemplo 23 (A21G[A,E,G,H,P,Q] (200 residuos de aminoácidos en orden aleatorio), insulina humana desB30);

- 35 la Figura 8 muestra la estructura (secuencia) del compuesto del Ejemplo 2; y

la Figura 9 muestra la estructura (secuencia) del precursor para el compilado del Ejemplo 2.

Ejemplos

- 40 La invención se ilustra adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos, que no pretenden limitar de ninguna manera limitar el alcance de la invención, como se reivindica.

Ejemplos 1-52

- 45 Métodos de expresión y purificación

Expresión

- 50 El análogo de insulina para su uso de acuerdo con la invención se produce de manera recombinante mediante la expresión de una secuencia de ADN que codifica el análogo de insulina en cuestión en una célula huésped adecuada mediante técnicas conocidas, por ejemplo, como se describe en el documento núm. US 6500645. El análogo de insulina se expresa directamente o como una molécula precursora, que puede tener una extensión N-terminal adicional (en forma, por ejemplo, de EEAEAEAPK) en la cadena B y/o un péptido de conexión (péptido C, en forma, por ejemplo, de DMK) entre la cadena B y la cadena A. Esta extensión N-terminal y el péptido C se escinden *in vitro* mediante una
- 55 proteasa adecuada, por ejemplo, proteasa de *Achromobacter lyticus* (ALP) o tripsina, y por lo tanto tendrá un sitio de escisión al lado de la posición B1, B29 y A1, respectivamente. Las extensiones N-terminal y los péptidos C del tipo adecuado para su uso de acuerdo con esta invención se describen, por ejemplo, en los documentos núms. US 5395922, EP 765395, WO 9828429 y WO 2014/195452.

- 60 La secuencia de polinucleótidos que codifican el precursor del análogo de insulina para usar de acuerdo con la invención se preparan sintéticamente por métodos establecidos, por ejemplo el método de fosforamidita descrito por Beaucage y otros. (1981) *Tetrahedron Letters* 22 1859-1869, o el método descrito por Matthes y otros. (1984) *EMBO Journal* 3 801-805. De acuerdo con el método de fosforamidita, los oligonucleótidos se sintetizan, por ejemplo, en un sintetizador automático de ADN, se purifican, se duplican, y se ligan para formar el constructo de ADN sintético. Una
- 65 manera actualmente preferida de preparar el constructo de ADN es mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El método recombinante típicamente usará un vector capaz de replicarse en el microorganismo o célula hospedera seleccionados, y que porta una secuencia de polinucleótidos que codifica el precursor análogo de insulina para su uso de acuerdo con la presente invención. El vector recombinante puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma, o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula hospedera, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica junto con el(los) cromosoma(s) a los cuales se ha integrado. Además, se puede usar un vector único o plásmido, o dos o más vectores o plásmidos, que juntos contienen el ADN total que se introduce en el genoma de la célula hospedera, o un transposón. El vector puede ser un plásmido lineal o un plásmido circular cerrado, y contendrá preferentemente un(os) elemento(s) que permiten la integración estable del vector en el genoma de la célula hospedera o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

15 El vector de expresión recombinante puede ser capaz de replicarse en levadura. Los ejemplos de secuencias, que permiten que el vector se replique en levadura, son los genes de replicación REP 1-3 de 2 μ m del plásmido de levadura y el origen de replicación.

Los vectores pueden contener uno o más marcadores de selección que permiten la selección fácil de las células transformadas. Un marcador de selección es un gen cuyo producto proporciona resistencia a biocidas o resistencia viral, resistencia a metales pesados, prototofias a los auxótrofos etc. Ejemplos de marcadores de selección bacterianos son los genes del *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*, o los marcadores que confieren resistencia a antibióticos tales como ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Los marcadores seleccionables para usar en una célula hospedera fúngica filamentosa incluyen amDs (acetamidasa), argB (ornitina carbamoiltransferasa), pyrG (oródina-5'-fosfato deshidroxilasa) y trpC (antranilato sintasa). Los marcadores adecuados para las células hospederas de levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1, y URA3. Un marcador de selección preferido para levadura es el gen TPI de *Schizosaccharomyces pombe* (Russell (1985) *Gene* 40 125-130).

En el vector, la secuencia de polinucleótido se conecta operativamente a una secuencia promotora adecuada. El promotor puede ser cualquier secuencia de ácido nucleico que muestre actividad transcripcional en la célula hospedera de elección, incluidos promotores mutantes, truncados, e híbridos, y puede obtenerse a partir de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares ya sean homólogos o heterólogos con respecto a la célula hospedera.

Ejemplos de promotores útiles en células hospederas de levadura son los promotores de Ma1, TPI, ADH, TDH3 o PGK de *Saccharomyces cerevisiae*.

La secuencia de polinucleótidos que codifica la cadena principal del péptido de insulina para usar de acuerdo con la invención típicamente se conectará, además, operativamente a un terminador adecuado. En levadura, un terminador adecuado es el terminador TPI (Alber y otros. (1982) *J. Mol. Appl. Genet.* 1 419-434).

Los procedimientos que se usan para combinar la secuencia de polinucleótidos que codifica el análogo de insulina para su uso de acuerdo con invención, el promotor y el terminador, respectivamente, y para insertarlos en vectores adecuados que contienen la información necesaria para la replicación en el hospedero seleccionado, son bien conocidos por los expertos en la técnica. Se entenderá que el vector puede construirse ya sea mediante la preparación, primero, de un constructo de ADN que contiene la secuencia de ADN completa que codifica las cadenas principales de insulina para su uso de acuerdo con la invención, y posteriormente la inserción de este fragmento en un vector de expresión adecuado, o mediante la inserción secuencial de fragmentos de ADN que contienen información genética para los elementos individuales (tales como la señal y el propéptido (extensión N-terminal de la cadena B), péptido C, cadenas A- y B-), seguido de ligado.

Un vector que comprende la secuencia de polinucleótidos de este análogo de insulina para usar de acuerdo con la invención, se introduce en la célula hospedera, de manera que el vector se mantiene como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autorreplicativo. El término "célula hospedera" abarca cualquier progenie de una célula parental que no es idéntica a la célula parental debido a mutaciones que ocurren durante la replicación.

La célula hospedera puede ser, en particular, una célula de levadura. El organismo de levadura puede ser cualquier organismo de levadura adecuado que, en al cultivarse, secreta la cadena principal del péptido de insulina o su precursor al medio de cultivo. Ejemplos de organismos adecuados de levadura incluyen cepas que se seleccionan del grupo que consiste en *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces uvarum*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia kluyveri*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida sp.*, *Candida utilis*, *Candida cacaoui*, *Geotrichum sp.*, y *Geotrichum fermentans*.

La transformación de las células de levadura puede realizarse, por ejemplo, mediante formación de protoplastos seguido por transformación por métodos conocidos. El medio usado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para cultivar organismos de levadura.

Purificación

Los análogos de insulina o sus precursores que se secretan se recuperan del medio mediante procedimientos convencionales que incluyen la separación de las células de levadura del medio por centrifugación, por filtración o
 5 atrapamiento o adsorción del análogo de insulina o su precursor en una matriz de intercambio iónico o en una matriz de absorción de fase inversa, con la precipitación de los componentes proteicos del sobrenadante o por filtración por medio de una sal, por ejemplo sulfato de amonio, seguido de purificación mediante una variedad de procedimientos cromatográficos, por ejemplo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, etc.

10 La purificación y digestión de las cadenas principales de los péptidos de insulina de esta invención se lleva a cabo de la siguiente manera:

El precursor análogo de insulina de cadena simple, que puede contener una extensión N-terminal de la cadena B, y un péptido C modificado entre la cadena B y la cadena A, se purifica y se concentra a partir del sobrenadante del
 15 cultivo de levadura mediante intercambio catiónico (Kjeldsen y otros (1998) *Prot. Expr. Pur.* 14 309-316).

El precursor del análogo de insulina de cadena simple se madura en dos cadenas principales peptídicas de insulina mediante digestión con proteasa específica de lisina inmovilizada de *Achromobacter lyticus* (ALP) (Kristensen y otros. (1997) *J. Biol. Chem.* 20 12978-12983) o mediante el uso de tripsina para escindir la extensión N-terminal de la cadena
 20 B, si está presente, y el péptido C.

Digestión con tripsina

El eluato de la etapa de cromatografía de intercambio catiónico que contiene el precursor análogo de insulina se diluye
 25 con agua hasta una concentración de etanol de 15-20 %. La glicina se agrega hasta una concentración de 50 mM y el pH se ajusta a 9,0-9,5 con NaOH. La tripsina se agrega en una proporción de 1:300 (p:p) y se permite que ocurra la digestión a 4 grados. La digestión se monitorea mediante análisis cada 20 minutos hasta que se completa la digestión. La digestión termina con adición de ácido cítrico 1 M en una proporción de 3:100 (v:v). Para algunos análogos puede necesitarse ajustar la cantidad exacta de tripsina.

30 La reacción de digestión se analiza mediante cromatografía líquida analítica (LC) en un sistema Waters Acquity Ultra-Performance Liquid Chromatography mediante el uso de una columna C18 y el peso molecular se confirma por espectrometría de masa MALDI-TOF (MS) (Bruker Daltonics Autoflex II TOF/TOF o UltraflexExtreme).

35 El análogo de insulina de dos cadenas se purifica mediante HPLC de fase inversa (sistema Waters 600) en una columna C18 mediante el uso de un gradiente de acetonitrilo. El análogo de insulina deseado se recupera posteriormente mediante liofilización.

40 La pureza del producto puede determinarse mediante HPLC analítica, por ejemplo, en un sistema Waters Acquity Ultra-Performance Liquid Chromatography mediante el uso de una columna C18, y el peso molecular puede confirmarse por MALDI-TOF MS o LC-MS (Orbitrap, Thermo Scientific o G2S Synapt, Waters A/S).

Digestión con ALP

45 El precursor de insulina de cadena simple se madura en insulina de dos cadenas de insulina mediante digestión con proteasa específica de lisina inmovilizada de *Achromobacter lyticus* (ALP; Kristensen y otros, (1997), *J. Biol. Chem.* 20, 12978-12983).

50 El eluato de la etapa de cromatografía de intercambio catiónico que contiene el precursor de insulina se diluye con agua hasta una concentración de etanol de 15-20 %. Se añade glutamato de sodio a una concentración de 15 mM y el pH se ajusta a 9,7 con NaOH. La ALP inmovilizada se añade en una proporción de 1:100 (v:v), y se permite que la digestión ocurra con agitación leve a temperatura ambiente durante toda la noche.

55 La reacción de digestión se analiza mediante LC analítica en un sistema Waters Acquity Ultra-Performance Liquid Chromatography mediante el uso de una columna C4 y el peso molecular se confirma por espectrometría de masa de tiempo de vuelo de iones desorbidos por láser asistida por matriz (Bruker Daltonics Autoflex II TOF/TOF). El ALP inmovilizado se elimina por filtración con un filtro de 0,2 µm.

60 La molécula de insulina de dos cadenas se purifica mediante HPLC de fase inversa (sistema Waters 600) en una columna C18 mediante el uso de un gradiente de acetonitrilo. La insulina deseada o el análogo de insulina se recuperan mediante liofilización.

65 La pureza se determina mediante LC analítica en un sistema Waters Acquity Ultra-Performance Liquid Chromatography mediante el uso de una columna C4, y el peso molecular se confirma por espectrometría de masa de tiempo de vuelo de iones desorbidos por láser asistida por matriz.

Determinación LC-MS

La identidad de los precursores análogos se verificó en los sobrenadantes mediante espectrometría de masa mediante el uso de HPLC analítica en un sistema de Waters Acquity Ultra-Performance Liquid Chromatography, acoplado a un espectrómetro de masas (Synapt G2, Waters A/S). La masa promedio se calculó mediante el uso del algoritmo de deconvolución MaxEnt1 en MassLynx (Waters A/S).

Los parámetros utilizados para los análisis de HPLC fueron los siguientes: Columna: Waters ACQUITY UPLC® BEH300 C4 1,7 µm, Temp. de columna: 40 °C, Solvente: A:0,1% FA, B: TFA al 0,1 % en MeCN.

Los resultados de esta determinación se presentan en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 2
Gradiente

Ej. Núm.	Tiempo (min)	Velocidad de flujo	%A	%B
1	Inicial	0,100	90,0	10,0
2	1:00	0,100	90,0	10,0
3	31:00	0,100	60,0	40,0
4	31:50	0,100	5,0	95,0
5	32:00	0,100	5,0	95,0
6	32:50	0,100	90,0	10,0
7	80:00	0,010	50,0	50,0

Determinación de las Afinidades del Receptor de Insulina

La afinidad de unión relativa de los análogos de insulina para el receptor de insulina humana (IR) se determina mediante unión competitiva en un ensayo de proximidad de centelleo (SPA) (de acuerdo con Glendorf T y otros (2008) *Bioquímica* **47** 4743-4751).

En resumen, la serie de dilución de un estándar de insulina humana y el análogo de insulina a probar se realizó en placas Optiplates de 96 pocillos (Perkin-Elmer Life Sciences) seguido por la adición de [¹²⁵I-A14Y]-insulina humana, anticuerpo de ratón anti-IR 83-7, IR-A humano solubilizado (semipurificado por cromatografía de aglutinina de germen de trigo de células de riñón de bebé hámster (BHK) que sobreexpresan el holorreceptor IR-A), y perlas de ensayo de proximidad de centelleo (SPA) (perlas de poliviniltolueno SPA anti-ratón, GE Healthcare) en tampón de unión que consiste en HEPES 100 mM (pH 7,8), NaCl 100 mM, MgSO₄ 10 mM, y Tween 20 0,025 % (v/v). Las placas se incuban con agitación suave durante 22-24 h a 22 °C, se centrifugan a 2000 rpm durante 2 minutos y se cuentan en un TopCount NXT (Perkin-Elmer Life Sciences).

Los datos del SPA se analizan de acuerdo con el modelo logístico de cuatro parámetros (Vølund A (1978) *Biometrics* **34** 357-365), y las afinidades de unión de los análogos se calculan con relación a la del estándar de insulina humana medida dentro de la misma placa.

Los resultados de esta determinación se presentan en la Tabla 3 a continuación.

Este ejemplo demuestra que los compuestos representativos de la invención ciertamente se dirigen al receptor de insulina humana.

Determinación de la potencia metabólica

Para investigar la capacidad de los análogos para generar una respuesta in vitro, se seleccionaron análogos para probar su potencia metabólica, rFFC, se determinaron por lipogénesis de acuerdo con técnicas conocidas (Moody A. J. y otros (1974) *Metab. Res.* **6** 12-16 y Rodbell M (1964) *J. Biol. Chem.* **239** 375-365).

Los adipocitos primarios de rata se aíslan de las almohadillas de grasa del epidídimo y se incuban con 3H-glucosa en tampón que contiene HSA 1 % libre de grasa y un estándar (HI) o ligando. La glucosa marcada se convierte en lípidos extraíbles en una forma dosis dependiente, lo que resulta en curvas dosis respuesta completas para ambos ligandos. Los datos se analizaron de acuerdo con un modelo logístico de cuatro parámetros y las afinidades se expresaron con relación a un estándar de insulina humana. El resultado se expresa como potencia relativa del ligando en comparación con el estándar.

Tabla 3

Afinidades del receptor de insulina y datos de LC-MS de masa

ES 2 784 603 T3

Ej. Núm.	Unión del receptor (hIRA) SPA, sup % con relación a HI	rFFC % con relación a HI	Masa precursora calculada (Da)	Masa medida (Da)
1	8,54	8,0	27 602,8	27 602,4
2	7,52	7,1	24 700,9	24 700,6
3	6,55	4,9	24 700,9	24 700,6
4	5,09	7,0	28 053,3	28 053,3
5	5,41	6,5	28 053,3	28 053,4
6	3	3,3	27 487,2	27 486,6
7	3,13	3,8	24 585,7	24 584,8
9	3,3	2,9	27 938,1	27 938
10	3,1	3,0	27 938,1	27 938
12	6,97	4,4	27 079,8	27 079,2
13	4,85	8,6	28 622,6	28 622,4
14	4,11	-	24 130,4	24 129,5
15	6,6	5,2	28 018,9	28 018,1
16	7,77	7,4	29 532,3	29 532,8
17	4,51	7,2	26 943,4	26 942,3
18	4,53	8,0	26 355,0	26 354,6
20	4,17	5,9	24 737,6	24 737,1
21	7,59	-	24 845,8	24 845,2
23	2,84	-	26 551,1	26 550,6
25	4,06	5,2	27 732,3	27 732,1
32	4,09	-	27 531,7	27 531,5
33	9,04	-	27 531,7	27 531,5
34	8,24	-	27 531,7	27 531,5
35	8,18	-	27 531,7	27 531,5
36	6,53	-	27 531,7	27 531,5
37	4,26	8,5	24 629,8	24 629,6
38	4,66	6,6	24 629,8	24 629,8
39	6,5	8,2	24 629,8	24 629,8
40	5,05	9,4	24 629,8	24 629,8
41	4,67	-	27 982,2	27 981,9
42	3,47	-	27 982,2	27 982
43	10,08	-	27 982,2	27 981,9
44	7,85	-	27 982,2	27 981,4
45	5,99	-	29 532,9	29 532,7
46	7,83	-	29 532,9	29 532,6
48	6,7	-	29 532,9	29 532,6
49	9,41	-	29 532,9	29 533,1
51	8,48	-	28 018,9	28 018,1
52	6,99	-	24 130,4	24 129,5
53	4,45	-	28 870,4	28 869,6
54	4,19	-	33 464,3	33 464
55	3,19	-	42 298,7	42 298,6
56	4,56	-	24 629,8	24 629,2

57	2,65	-	51 133,2	51 132,9
58	2,87	-	59 967,6	59 967
59	3,15	-	24 585,7	24 584,9
60	2,41	-	33 420,2	33 419,8
61	2,1	-	59 923,6	59 923,4
62	8,38	-	24 629,8	24 629,1
63	4,98	-	42 298,7	42 297,4
64	9,98	-	24 572,8	24 572,4
65	4,38	-	24 572,8	24 572,1
66	4,92	-	24 572,8	24 571,6
67	5,53	-	24 572,8	24 572,4
68	5,7	-	24 572,8	24 572,3
69	5,26	-	24 572,8	24 572,1
70	3,49	-	26 750,1	26 749,7
71	4,2	-	30 990,6	30 636,9
72	4,55	-	22 509,6	22 509,5
73	5,33	-	20 035,9	20 035,3
74	6,34	-	17 904,4	17 904,4
75	0,08	-	25 817,9	25 816,9
76	5,71	-	20 332,2	20 331,6
77	3,89	-	29 166,7	29 166,6

Determinación del tamaño en cromatografía por exclusión del tamaño nativo

- 35 El efecto de las repeticiones de aminoácidos diferentes sobre el volumen hidrodinámico grande se evaluó por cromatografía por exclusión de tamaño nativo. El solvente usado fue NaCl 140 mM, Tris-HCl 10 mM, isopropanol al 5 % (v/v), pH 7,3; y la columna: Waters Acquity UPLC BEH450 SEC, 4,6X150 mm, 2,5 µM.
- 40 El método se corrió a 37 °C con un flujo de 0,3 ml/min y se midió a una longitud de onda de 280 nm. Los análogos seleccionados se analizaron en soluciones de 200 µM. Para la conversión del tiempo de retención de elución a una masa correspondiente para una proteína, aquí denominado tamaño de SEC, se usó un estándar para el cálculo del tamaño: Mezcla estándar de proteína SEC BEH450 (P/N18600842).
- 45 Se realiza un ajuste no lineal ($Y=Y_0 \cdot \exp(k \cdot X)$) en GraphPad Prism mediante el uso del tiempo de retención y los tamaños de las proteínas individuales en el estándar. Se encuentran las constantes Y_0 y k , y se calcula el tamaño SEC (Y) al insertar el tiempo de retención (X) del pico principal en la ecuación.

Tabla 4

50 Tamaño SEC

Ej. Núm.	Tamaño SEC (kDa)	Masa calculada (kDa)	Tamaño/masa de SEC
1	275	26,3	10
2	165	23,3	7
3	125	23,3	5
4	275	26,7	10
37	170	23,3	7
38	140	23,3	6
39	145	23,3	6
40	135	23,3	6

- 65 En este sistema la insulina humana se encuentra como equilibrio entre el monómero y el dímero, así que esto podría ser el caso de estos constructos. El tamaño de SEC es más de 5-10 veces mayor que el tamaño esperado del monómero. El tamaño de SEC está influenciado por la composición de aminoácidos y también por el orden de aminoácidos en el motivo.

Ejemplo 53

Determinación de la media de los tiempos de residencia y efecto sobre la glucosa en sangre

5

Media de los tiempos de residencia en perro

Se investigaron los perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos después de dosificación única s.c. de 4 nmol/kg de análogo de insulina a perros Beagle.

10

Ocho perros Beagle se dividieron en dos grupos de cuatro animales y se dosificaron en paralelo con el compuesto del Ejemplo 2 o el compuesto del Ejemplo 5.

Una dosis única subcutánea de ambos análogos se toleró bien en perros Beagle sin signos clínicos de hipoglucemia.

15

Las muestras de sangre se recolectaron y analizaron mediante la tecnología LOCI. Las curvas de concentración de insulina en plasma se muestran en las Figuras 1-2. La media del tiempo de residencia calculada (media±SD) se muestra en la Tabla 5 a continuación.

20 Media de los tiempos de residencia en rata

Se investigaron los perfiles farmacocinéticos después de la dosificación única s.c. de 20 nmol/kg de análogo de insulina a ratas Sprague-Dawley masculinas.

25 Las ratas sin ayuno se dosificaron por vía s.c. en el cuello con 20 nmol/kg de insulina mediante el uso de aguja y jeringa con un volumen de dosis de 1 ml/kg. Las ratas estaban despiertas durante el experimento con acceso libre al agua pero no a la comida durante las primeras 8 horas después de la dosificación. Las muestras de sangre para el análisis de insulina se recolectaron regularmente durante 48 horas después de la dosificación, mientras que la glucosa en sangre se midió hasta 8 horas después de la dosificación. Las muestras de sangre se analizaron mediante la tecnología LOCI. Las medias de los tiempos de permanencia calculadas (media±SD) se muestran en la Tabla 5 a continuación.

30

Este ejemplo demuestra que los compuestos representativos de la invención no sólo actúan sobre el receptor de insulina humana diana, sino que también son capaces de disminuir eficazmente la glucosa en sangre, como se muestra en las Figuras 1-2.

35

Tabla 5

Media del tiempo de residencia

40

Ej. Núm.	MRT _{sc} (h) Perro	MRT _{sc} (h) Rata
1	8,1±1,3	5,5 ± 0,4
2	13,4±3,0	5,4 ± 0,7
3	11,2±2,2	3,8 ± 0,8
4	11,0±4,0	5,3 ± 0,3
5	9,2 ± 2,2	5,3 ± 0,7
6	-	7,1 ± 0,1
7	-	6,0 ± 0,4
9	-	5,8 ± 1
15	-	8,7 ± 3,2
16	-	4,9 ± 1,2
17	-	5,9 ± 1,3
18	-	4,8 ± 0,3
20	-	5,7 ± 0,5
25	-	5,4 ± 0,5
37	-	5,2 ± 0,6
38	-	3,8 ± 0,5
39	-	4,3 ± 1,2
40	-	3,6 ± 0,9

45

50

55

60

Ejemplo 54

65 Determinación de la glicosilación

El análogo de insulina extendido aparece en MS con un único perfil de masa. Si los residuos de serina están presentes en la secuencia de la extensión, como los ejemplos de repetición GEPS, se observa glicosilación (ver la Figura 3). Múltiples cargas negativas en la secuencia reducen la cantidad de porciones de azúcar para implicar principalmente hasta 4 residuos de azúcar mientras que la falta de cargas negativas resulta en la glicosilación con múltiples porciones de azúcar.

La cantidad de glicosilación para un análogo con las repeticiones GEPS se encuentra en el intervalo entre 10 y 30 %, en dependencia del número de residuos de serina, por ejemplo, la longitud de la secuencia de extensión (ver la Figura 4). Es difícil eliminar esta glicosilación durante el proceso de purificación debido a la baja resolución de la energía de la fase inversa.

La eliminación de residuos de serina de la secuencia como se observa para los análogos que contienen G, E, A, H, Q y P resulta en extensión no glicosilada (ver Figuras 5 y 6).

15 Ejemplo 55

Determinación de viscosidad

Este ejemplo representa un ejemplo comparativo que muestra los resultados de una determinación de viscosidad de los análogos de insulina extendidos con oligómero representativos de la invención (es decir los compuestos de los Ejemplos 1-5) en comparación con la viscosidad de un análogo de insulina extendido con un oligómero representativo de la técnica anterior, es decir, el Compuesto A de la Fórmula general I, en donde "Ins" representa [A21Q*, desB30]; * indica el punto de extensión, "Ext" representa la extensión "GEPS", y la cantidad de residuos de aminoácidos en la extensión es 200.

La viscosidad se estimó por dispersión dinámica de luz (DLS) mediante el uso de DyNapro PR™ (Wyatt technology, Santa Barbara, CA, Estados Unidos). En DLS, se determina el coeficiente de difusión, y a partir de eso puede obtenerse el radio hidrodinámico a partir de la ecuación de Stoke-Einstein. La viscosidad se incluye en la ecuación de Stoke-Einstein, y se necesita la viscosidad correcta para una determinación precisa del radio hidrodinámico. Mediante la utilización de una molécula de tamaño conocido (perlas de nanoesfera estándar de poliestireno; diámetro medio: 147 nm) y determinar el tamaño aparente (cambios con viscosidad) de este estándar en las soluciones de insulina extendida oligómero, la viscosidad real puede calcularse en una condición dada. El radio aparente de la perla se convirtió en viscosidad (cP): (radio aparente de la perla PS [nm] / radio real de la perla PS [nm]) x viscosidad del solvente (por ejemplo 0,893 cP a 25 °C).

Los resultados de esta determinación se presentan en la Tabla 6 a continuación, y las figuras muestran claramente que el compuesto representativo de la invención tiene menor viscosidad en comparación con el compuesto representativo de la técnica anterior.

40 Tabla 6

Viscosidad en una solución de 600 µm

Ej. Núm.	Viscosidad η (cP) (7 °C, sin Zn)	Viscosidad η (cP) (25 °C, sin Zn)	Viscosidad η (cP) (7 °C, con Zn)	Viscosidad η (cP) (25 °C, con Zn)
1	4,49±0,09	2,70±0,03	6,14±0,12 ^c	3,76 ± 0,03 ^b
2	2,41±0,02	1,45 ± 0,01	2,55 ± 0,01 ^c	1,51 ± 0,02 ^b
3	2,23 ± 0,01	1,36 ± 0,01	2,35±0,03 ^c	1,42 ± 0,00 ^b 1,51 ± 0,00 ^d
4	2,99±0,01	1,87 ± 0,01	3,13±0,02 ^c	2,04±0,01 ^b
5	3,43 ± 0,00	2,06 ± 0,00	2,88 ± 0,00 ^c	1,83 ± 0,00 ^b
37	-	-	-	1,64±0,02 ^d
38	-	-	-	1,49±0,01 ^d
39	-	-	-	1,66 ± 0,00 ^d
40	-	-	-	1,61 ± 0,01 ^d
Cp. A	6,22 ± 0,71	3,14±0,10	8,66 ± 0,91 ^c	5,73 ± 0,60 ^c

b) Tampón fosfato 10 mM, pH 7,4, m-cresol 28 mM, 3 Zn²⁺/6 Ins;

c) Tampón fosfato 10 mM, pH 7,4, fenol 58 mM, 3 Zn²⁺/6 Ins; y

d) NaCl 20 mM, pH 7,4, glicerol 1,4 %, fenol 19 mM, m-cresol 19 mM, 4 Zn²⁺/6 Ins.

REIVINDICACIONES

1. Una insulina extendida con oligómero o análogo de insulina, cuya insulina o análogo de insulina es una molécula de insulina de dos cadenas que comprende una cadena A y una cadena B, y cuya insulina o análogo de insulina se extiende en el extremo N-terminal de la cadena B, y/o desde el extremo C-terminal de la cadena A con una extensión que consiste solamente en los residuos de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en His (H), Gln (Q), Ala (A), Asp (D), Glu (E), Gly (G), Pro (P), Ser (S) y Thr (T); en cuya extensión:
- 5 l) uno o ambos de los (dos) residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en His (H) y Gln (Q); cuya cantidad de residuos de aminoácidos del Grupo I se combina con
- 10 II) no más de tres veces este número de los residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en Ala (A), Asp (D), Glu (E), Gly (G), Pro (P), Ser (S) y Thr (T); para producir una insulina extendida con oligómero o análogo de insulina, con una extensión que comprende de aproximadamente 100 a aproximadamente 800 residuos de aminoácidos contiguos;
- 15 en donde la insulina o el análogo de insulina se extiende con un motivo del Grupo A que se selecciona de [GAQ]; [GEH]; [GEQ]; [GQA]; [GQE]; y [GQP]; y/o cualquier combinación de estos; y/o un motivo del Grupo B que se selecciona de [GAPH]; [GAPQ]; [GAQP]; [GEHP]; [GEPH]; [GEPQ]; [GEQH]; [GEQP]; [GHEP]; [GHEQ]; [GHPE]; [GHQE]; [GPAQ]; [GPEH]; [GPEQ]; [GPHE]; [GPQA]; [GPQE]; [GQAP]; [GQEH]; [GQEP]; [GQHE]; [GQPA]; y [GQPE]; y/o cualquier combinación de estos; y/o
- 20 un motivo del Grupo C que se selecciona de [GHEPGQHP]; [GQEPGQHP]; [GQAPGQAPGQAPGAPH]; y [GQAPGQAPGAPHGAPH]; y/o cualquier combinación de estos; y/o un motivo del Grupo D que se selecciona de [GEHPGAPHGQEPGQAP]; [GQEPGQEPGQEPGAPH]; [GQEPGQEPGAPHGAPH]; y [A,E,G,P,H,Q]; y/o cualquier combinación de estos.
- 25 2. La insulina extendida con oligómero o análogo de insulina de conformidad con la reivindicación 1, que es un análogo de insulina que se selecciona del grupo que consiste en insulina humana A14E, A21G, B16E, B25H, desB30; insulina humana A14E, A21G, B16H, B25H, desB27, desB30; insulina humana A14E, A21G, B16H, B25H, desB30;
- 30 insulina humana A14E, A21G, B25H, desB30; insulina humana A14E, A21G, desB30; insulina humana A14E, A21Q, B16E, B25H, desB30; insulina humana A14E, A21Q, B16H, B25H, desB27, desB30; insulina humana A14E, A21Q, B16H, B25H, desB30;
- 35 insulina humana A14E, A21G, B25H, desB27, desB30; insulina humana A14E, A21Q, B25H, desB27, desB30; insulina humana A14E, A21Q, B25H, desB30; insulina humana A14E, A21Q, desB30; insulina humana A14E, B16E, B25H, desB30;
- 40 insulina humana A14E, B16H, B25H, desB27, desB30; insulina humana A14E, B16H, B25H, desB30; insulina humana A14E, B25H, desB27, desB30; insulina humana A14E, B25H, desB30;
- 45 insulina humana A21G, A22A, A23P, A24Q, desB30; insulina humana A21G, A22A, A23Q, A24P, desB30; insulina humana A21G, A22G; insulina humana A21G, A22K, B29R, desB30; insulina humana A21G, A22P, A23A, A24Q, desB30;
- 50 insulina humana A21G, A22P, A23Q, A24A, desB30; insulina humana A21G, A22Q, A23A, A24P, desB30; insulina humana A21G, A22Q, A23P, A24A, desB30; insulina humana A21G, A22Q, A23P, desB30; insulina humana A21G, B1F, desB30; insulina humana A21G, B3K, B29E;
- 55 insulina humana A21G, desB27, desB30; insulina humana A21G, B28D; insulina humana A21G, B28D, desB30; insulina humana A21G, B28K, B29P; insulina humana A21G, desB30;
- 60 insulina humana A21Q, A22G; insulina humana A21Q, A22K, B29R, desB30; insulina humana A21Q, B3K, B29E; insulina humana A21Q, desB27, desB30; insulina humana A21Q, B28D;
- 65 insulina humana A21Q, B28D, desB30; insulina humana A21Q, B28K, B29P;

- insulina humana A21Q, desB30;
 insulina humana A22K, B29R, desB30;
 insulina humana B3K, B29E;
 insulina humana B28D;
 5 insulina humana B28D, desB30;
 insulina humana B28K, B29P; o
 insulina humana desB30.
3. La insulina extendida con oligómero o análogo de insulina de conformidad con la reivindicación 1, que se
 10 extiende en el extremo N-terminal de la cadena B.
4. La insulina extendida con oligómero o análogo de insulina de conformidad con la reivindicación 1, que se
 extiende en el extremo C-terminal de la cadena A.
- 15 5. La insulina extendida con oligómero o análogo de insulina de conformidad con la reivindicación 1, que se
 extiende en el extremo N-terminal de la cadena B y desde el extremo C-terminal de la cadena A.
6. La insulina extendida con oligómero o análogo de insulina de conformidad con la reivindicación 1, cuya insulina
 o análogo de insulina se extiende con secuencias no repetidas, es decir, secuencias de orden aleatorio.
 20
7. La insulina extendida con oligómero o análogo de insulina de conformidad con la reivindicación 1, cuya
 extensión comprende de aproximadamente 100 a aproximadamente 800 residuos de aminoácidos contiguos
 en su extensión.
- 25 8. La insulina extendida con oligómero o análogo de insulina de conformidad con la reivindicación 1, que es un
 compuesto de la Fórmula general I

Ins-Ext (I)

en donde:

- 30 “**Ins**” representa un análogo de la insulina humana que se selecciona del grupo que consiste en
 A14E, A21G*, B25H, desB30;
 A21G*, desB30;
 A21G, B1F*, desB30;
 A21G, A22A, A23P, A24Q*, desB30;
 A21G, A22A, A23Q, A24P*, desB30;
 35 A21G, A22P, A23A, A24Q*, desB30;
 A21G, A22P, A23Q, A24A*, desB30;
 A21G, A22Q, A23A, A24P*, desB30;
 A21G, A22Q, A23P, A24A*, desB30;
 A21G, A22Q, A23P*, desB30; y
 40 A21Q*, desB30; y
 “**Ext.**” indica una extensión compuesta por un motivo que se selecciona del grupo que consiste en
 [GAQ]; [GEH]; [GEQ]; [GQA]; [GQE]; [GQP]; [GAPH]; [GAPQ]; [GAQP]; [GEHP]; [GEPH]; [GEPQ]; [GEQH];
 [GEQP]; [GHEP]; [GHEQ]; [GHPE]; [GHQE]; [GPAQ]; [GPEH]; [GPEQ]; [GPHE]; [GPQA]; [GPQE]; [GPAP];
 45 [GQEH]; [GQEP]; [GQHE]; [GQPA]; [GQPE]; [GHEPGQHP]; [GQEPGQHP]; [GQAPGQAPGQAPGAPH];
 [GQAPGQAPGAPHGAPH]; [GEHPGAPHGQEPGQAP]; [GQEPGQEPGQEPGAPH];
 [GQEPGQEPGAPHGAPH]; y [A, E, G, P, H, Q] (en aleatorio);
 repetido o extendido para producir una insulina extendida con oligómero o análogo de insulina con una extensión
 que comprende de aproximadamente 100 a aproximadamente 800 residuos de aminoácidos contiguos.
- 50 9. La insulina extendida con oligómero o análogo de insulina de conformidad con la reivindicación 1, que es
 insulina humana A21Q(GQEP)₅₀, desB30;
 insulina humana A21Q(GAPQ)₅₀, desB30;
 insulina humana A21Q(GQAP)₅₀, desB30;
 insulina humana A21Q(GEPH)₅₀, desB30;
 55 insulina humana A21Q(GEHP)₅₀, desB30;
 insulina humana A14E, A21G(GQEP)₅₀, B25H, desB30;
 insulina humana A14E, A21G(GAPQ)₅₀, B25H, desB30;
 insulina humana A14E, A21G(GEPH)₅₀, B25H, desB30;
 insulina humana A14E, A21G(GEHP)₅₀, B25H, desB30;
 60 insulina humana A14E, A21G(GAPH)₅₀, B25H, desB30;
 insulina humana A21G(GEHPGAPHGQEPGQAP)₁₃, desB30;
 insulina humana A21G(GEH)₆₇, desB30;
 insulina humana A21G(GQA)₆₇, desB30;
 insulina humana A21G(GQE)₆₇, desB30;
 65 insulina humana A21G(GEQH)₅₀, desB30;
 insulina humana A21G(GQEPGQEPGQEPGAPH)₁₂GQEPGQEP, desB30;

- insulina humana A21G(GQEPGQEPGAPHGAPH)₁₂GQEPGQEP, desB30;
 insulina humana A21G(GQAPGQAPGQAPGAPH)₁₂GQAPGQAP, desB30;
 insulina humana A21G(GQAPGQAPGAPHGAPH)₁₂GQAPGQAP, desB30;
 5 insulina humana A21G[A,E,G,H,P,Q] (200 amino ácidos aleatorios), desB30;
 insulina humana A21G(GHEPGQHP)₂₅, desB30;
 insulina humana A21G(GQEPGQHP)₂₅, desB30;
 insulina humana A21G(GQPE)₅₀, desB30;
 insulina humana A21G(GEQP)₅₀, desB30;
 10 insulina humana A21G(GEPQ)₅₀, desB30;
 insulina humana A21G(GPEQ)₅₀, desB30;
 insulina humana A21G(GPQE)₅₀, desB30;
 insulina humana A21G(GQPA)₅₀, desB30;
 insulina humana A21G(GAQP)₅₀, desB30;
 15 insulina humana A21G(GPAQ)₅₀, desB30;
 insulina humana A21G(GPQA)₅₀, desB30;
 insulina humana A21G(GHEP)₅₀, desB30;
 insulina humana A21G(GHPE)₅₀, desB30;
 insulina humana A21G(GPEH)₅₀, desB30;
 20 insulina humana A21G(GPHE)₅₀, desB30;
 insulina humana A21G(GQEH)₅₀, desB30;
 insulina humana A21G(GQHE)₅₀, desB30;
 insulina humana A21G(GHEQ)₅₀, desB30;
 insulina humana A21G(GHQE)₅₀, desB30;
 25 insulina humana A21G(GEQ)₆₇, desB30;
 insulina humana A21G(GAQ)₆₇, desB30;
 insulina humana A21G(GQAP)₆₂, desB30;
 insulina humana A21G(GQAP)₇₅, desB30;
 insulina humana A21G(GQAP)₁₀₀, desB30;
 30 insulina humana A21G(GQAP)₅₀, desB30;
 insulina humana A21G(GQAP)₁₂₅, desB30;
 insulina humana A21G(GQAP)₁₅₀, desB30;
 insulina humana A14E, A21G(GQAP)₅₀, B25H, desB30;
 insulina humana A14E, A21G(GQAP)₇₅, B25H, desB30;
 35 insulina humana A14E, A21G(GQAP)₁₅₀, B25H, desB30;
 insulina humana A21G, B1F(GQAP)₅₀, desB30;
 insulina humana A21G, B1F(GQAP)₁₀₀, desB30;
 insulina humana A21G, A22A, A23P, A24Q(GAPQ)₄₉, desB30;
 insulina humana A21G, A22A, A23Q, A24P(GAQP)₄₉, desB30;
 40 insulina humana A21G, A22Q, A23A, A24P(GQAP)₄₉, desB30;
 insulina humana A21G, A22Q, A23P, A24A(GQPA)₄₉, desB30;
 insulina humana A21G, A22P, A23A, A24Q(GPAQ)₄₉, desB30;
 insulina humana A21G, A22P, A23Q, A24A(GPQA)₄₉, desB30;
 45 insulina humana A21G(GQAP)₅₆, desB30;
 insulina humana A21G(GQAP)₆₉, desB30;
 insulina humana A21G(GQAP)₃₁, desB30;
 insulina humana A21G(GQAP)₃₇, desB30;
 insulina humana A21G(GQAP)₄₄, desB30;
 50 insulina humana A21G, A22Q, A23P(GQP)₆₆, desB30;
 insulina humana A21G, A22A, A23Q, A24P(GAQP)₃₇, desB30; y
 insulina humana A21G, A22A, A23Q, A24P(GAQP)₆₂, desB30.
10. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una insulina extendida con oligómero o análogo de insulina de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, o una sal farmacéuticamente aceptable de esta, junto con uno o más adyuvantes, excipientes, portadores y/o diluyentes.
- 55 11. La insulina extendida con oligómero o análogo de insulina de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para usar como un medicamento.
- 60 12. La insulina extendida con oligómero o análogo de insulina de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para usar en el tratamiento de la diabetes tipo 1 o la diabetes tipo 2.

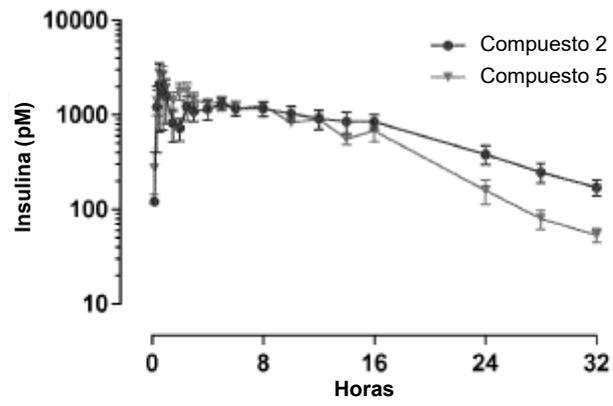


Fig. 1/9

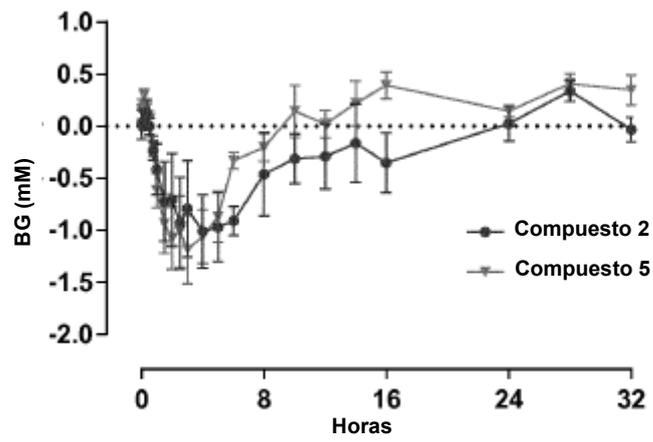


Fig. 2/9

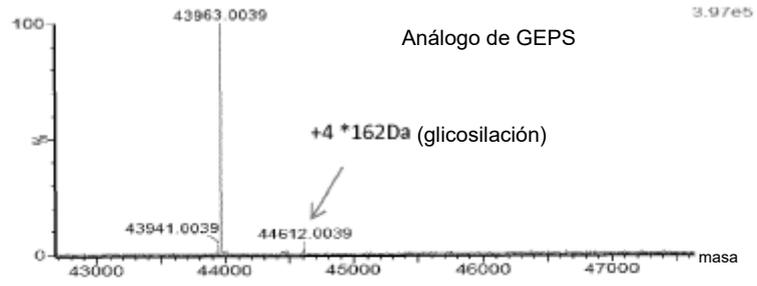


Fig. 3/9

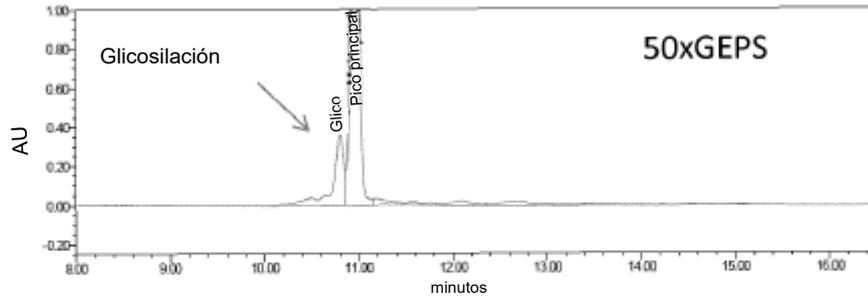


Fig. 4/9

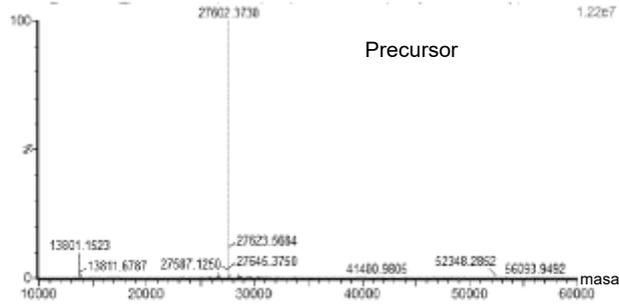


Fig. 5/9

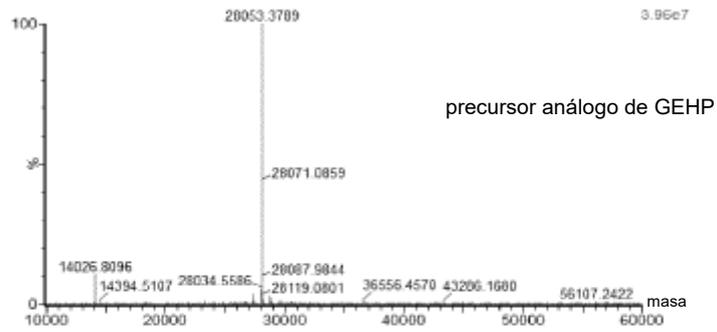


Fig. 6/9

GQEPGAPHGE PHGAPHGEPH GAPQGQEPGQ EPGQEPGQAP GQEPGEHPGA PQGAPQGQEP
 GAPQGQEPGA PHGEHPGEHP GQEPGAPHGE PHGAPHGEPH GAPQGQEPGQ EPGQEPGQAP
 GQEPGEHPGA PQGAPQGQEP GAPQGQEPGA PHGEHPGEHP GQEPGAPHGE PHGAPHGEPH
 GAPQGQEPGQ EPGQEPGQAP

Fig. 7/9

```

1 EVNQHLCCSHLVEALYLVCGERCFFVYTPKG
31 LVEQCCISICSLYQLENYCQGAPQGA
61 PQGAPQGA
91 GAPQGA
121 PQGAPQGA
151 GAPQGA
181 PQGAPQGA
211 GAPQGA
241 PQGAPQGA
    
```

Fig. 8/9

```

1 EEAEAAAPKPVNQHLCCSHLVEALYLVCGERCFFVYTPKDMKGLVEQCCIS
51 ICSLYQLENYCQGAPQGA
101 PQGAPQGA
151 GAPQGA
201 PQGAPQGA
251 GAPQGA
    
```

Fig. 9/9