

AGONISTAS PARCIALES DEL RECEPTOR DE INSULINA

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

(1) Campo de la invención

La presente invención se refiere a dímeros de insulina y dímeros de análogos de insulina que actúan como agonistas parciales en el receptor de insulina.

10 (2) Descripción de la técnica relacionada

La insulina es una terapia esencial para pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) y muchos con diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), prescrita para cerca de un tercio de todos los pacientes de Estados Unidos entre todos los usuarios de fármacos anti-diabéticos en la pasada década. La comercialización mundial de insulinas fue de 20,4 mil millones de dólares americanos en 2013 y está creciendo a una velocidad más rápida que todos los demás agentes anti-diabéticos combinados. Sin embargo, los retos de las actuales terapias con insulina, incluyendo estrecha TI a hipoglucemia y ganancia de peso corporal, limitan su mayor amplitud de adopción y potencial para que los pacientes consigan un control glucémico ideal.

Además de la secreción de insulina prandial en respuesta a comidas, el páncreas libera insulina a una tasa “basal”, gobernada por los niveles plasmáticos de glucosa para mantener la regulación apropiada de glucosa en ayunas. Esto se consigue principalmente controlando la liberación de glucosa hepática, a través de la acción hepato-preferente de la insulina endógena. Los análogos moderno de insulina incluyen insulinas de rápida acción y basales, así como mezclas de estas dos. Los análogos de insulina de acción rápida (RAA) se desarrollan para controlar la hiperglucemia post-prandial mientras que las insulinas con duración prolongada de acción regulan los niveles basales de glucosa. Las insulinas de larga acción se usan por todos los pacientes con DMT1 (en combinación con inyecciones prandiales) y la mayoría de los pacientes con DMT2 empiezan su terapia con insulina a partir de un producto basal. El consumo de insulina basal está creciendo rápidamente según aumenta la población mundial con diabetes (particularmente DMT2).

A pesar de los continuos esfuerzos de desarrollo en las varias décadas pasadas, las insulinas de larga acción disponible aún no están optimizadas en comparación con la insulina basal fisiológica. Esto se debe parcialmente a que un enfoque principal fue sobre la mejora de la PK plana de estos análogos pero sin fijar la sobre-insulinización relativa de tejidos periféricos, que contribuye a un riesgo aumentado de hipoglucemia. Como resultado, la hipoglucemia sigue siendo un riesgo médico clave con enorme carga sobre los pacientes y causa morbilidad y mortalidad significativas.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona compuestos que comprenden dos moléculas de insulina unidas covalentemente para formar un dímero de moléculas de insulina que puede activar el receptor de insulina con potencia tipo insulina normal pero con actividad máxima reducida. Estos compuestos son agonistas parciales del receptor de insulina (IPRA): se comportan como otros análogos de insulina para disminuir la concentración de glucosa de forma eficaz pero con riesgo inferior de hipoglucemia.

Se proporcionan dímeros de insulina covalentes agonistas parciales receptores de insulina formulados como insulinas basales nuevas y transformadoras (administración una vez al día) que manifiestan un índice terapéutico (TI) mejorado sobre las actuales insulinas basales de tratamiento habitual (SOC). En una realización, los IPRA de la presente invención pueden disminuir la concentración de glucosa de forma eficaz con riesgo reducido de hipoglucemia en cerdos enanos diabéticos y tienen la propiedad de una insulina basal una vez al día (QD). El TI mejorado puede habilitar a los médicos a dosificar de forma más agresiva los IPRA de la presente invención para conseguir los objetivos diana para el control de la glucosa en ayunas. El estricto control de la glucosa en ayunas y HbA1c por un IPRA le puede permitir servir como 1) una insulina de larga acción independiente con un perfil potenciado de eficacia y seguridad en DMT2 y 2) una insulina basal fundamental mejorada en DMT1 (y algunas DMT2) para su uso con dosis adicionales de análogos de insulina de rápida acción (RAA) prandial. Por tanto, la presente invención proporciona las siguientes realizaciones.

La presente invención proporciona un agonista parcial del receptor de insulina o dímero de insulina que comprende un primer heterodímero de insulina o análogo de insulina y un segundo heterodímero de insulina o análogo de insulina, incluyendo cada heterodímero un

polipéptido de cadena A y un polipéptido de cadena B, en el que el polipéptido de cadena A y el polipéptido de cadena B están unidos juntos a través de enlaces disulfuro intercatenarios; en el que el primero y segundo heterodímeros de insulina o análogo de insulina están unidos covalentemente juntos a través de un resto de unión que conecta la cadena lateral de un aminoácido en o cerca del extremo carboxi terminal de los dos polipéptidos respectivos de cadena B; y en el que al menos un extremo amino terminal de los polipéptidos de cadena A y los polipéptidos de cadena B está unido covalentemente a un sustituyente, con la condición de que el resto de unión no incluya un enlace disulfuro. En aspectos particulares, al menos un extremo amino terminal del polipéptido de cadena A y el polipéptido de cadena B de la primera insulina o análogo de insulina está unido covalentemente a un sustituyente.

En aspectos particulares del agonista parcial del receptor de insulina o dímero de insulina, el extremo amino terminal de cada polipéptido de cadena A y cada polipéptido de cadena B está unido covalentemente a un sustituyente. En aspectos particulares, el extremo amino terminal del polipéptido de cadena A y el polipéptido de cadena B de la primera insulina o análogo de insulina y el extremo amino terminal del polipéptido de cadena A y el polipéptido de cadena B de la segunda insulina o análogo de insulina están unidos cada uno covalentemente a un sustituyente. En realizaciones en que los extremos amino terminales de la primera y segunda insulinas o análogos de insulina están unidos covalentemente a un sustituyente, el sustituyente en los extremos amino terminales de los polipéptidos de cadena A y cadena B de la primera insulina o análogo de insulina puede ser igual que el sustituyente en los extremos amino terminales de los polipéptidos de cadena A y cadena B de la segunda insulina o análogo de insulina. En realizaciones en que los extremos amino terminales de la primera y segunda insulinas o análogos de insulina están unidos covalentemente a un sustituyente, el sustituyente en los extremos amino terminales de los polipéptidos de cadena A y cadena B de la primera insulina o análogo de insulina puede ser diferente del sustituyente en los extremos amino terminales de los polipéptidos de cadena A y cadena B de la segunda insulina o análogo de insulina.

En un aspecto adicional del agonista parcial del receptor de insulina o dímero de insulina, el primero y segundo heterodímeros de insulina o análogo de insulina son iguales o en el que el primero y segundo heterodímeros de insulina o análogo de insulina son diferentes.

En un aspecto adicional más del agonista parcial del receptor de insulina o dímero de insulina, el resto de unión une covalentemente el primer heterodímero de insulina o análogo

de insulina y el segundo heterodímero de insulina o análogo de insulina mediante un grupo amino épsilon de un residuo de lisina en o cerca del extremo carboxi terminal de sus respectivos polipéptidos de cadena B.

En un aspecto adicional más del agonista parcial del receptor de insulina o dímero de insulina, el sustituyente tiene una fórmula general $RC(O)-$, en la que R puede ser $R'CH_2$, $R'NH$, $R'O$ y R' puede ser H, cadena alquilo lineal, aminoácido, péptido, PEG, sacáridos, que en aspectos particulares $RC(O)-$ puede ser acetilo, fenilacetilo, carbamoilo, *N*-alquil carbamoilo, o alcóxicarbonilo. En aspectos particulares, el sustituyente se selecciona del grupo que consiste en acetilo, fenilacetilo, carbamoilo, *N*-alquil carbamoilo, isobutilo, isobutilo, metoxiacetilo, glicina, aminoetilglucosa (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, *N*-dimetilo, y alcóxicarbonilo.

En aspectos particulares del agonista parcial del receptor de insulina o dímero de insulina, cada polipéptido de cadena A comprende independientemente la secuencia de aminoácidos $GX_2X_3EQCCX_8SICSLYQLX_{17}NX_{19}CX_{23}$ (SEC ID N.º: 3) y cada polipéptido de cadena B comprende independientemente la secuencia de aminoácidos $X_{25}LCGX_{29}X_{30}LVEALYLVCGERGFX_{27}YTX_{31}X_{32}$ (SEC ID N.º: 4) o $X_{22}VNQX_{25}X_{26}CGX_{29}X_{30}LVEALYLVCGERGFX_{27}YTX_{31}X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}$ (SEC ID N.º: 5) en la que X_2 es isoleucina o treonina; X_3 es valina, glicina, o leucina; X_8 es treonina o histidina; X_{17} es ácido glutámico o glutamina; X_{19} es tirosina, 4-metoxi-fenilalanina, alanina, o 4-amino fenilalanina; X_{23} es asparagina o glicina; X_{22} es fenilalanina y desamino-fenilalanina; X_{25} es histidina o treonina; X_{26} es leucina o glicina; X_{27} es fenilalanina o ácido aspártico; X_{29} es alanina, glicina, o serina; X_{30} es histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, ácido homocisteico, o ácido cisteico; X_{31} es ácido aspártico, prolina, o lisina; X_{32} es lisina o prolina; X_{33} es treonina, alanina, o está ausente; X_{34} es arginina o está ausente; y X_{35} es arginina o está ausente; con la condición de que al menos uno de X_{31} o X_{32} sea lisina.

En aspectos particulares del agonista parcial del receptor de insulina o dímero de insulina, la primera y segunda insulinas o análogos de insulina son independientemente insulina humana nativa, insulina lispro, insulina aspart, desB30 insulina, o insulina glargina.

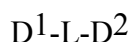
En aspectos particulares de los agonistas parciales del receptor de insulina o dímero de insulina, el resto de unión puede ser un grupo opcionalmente sustituido seleccionado entre el grupo que consiste en acilo, alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo y heterocíclico. El

resto de unión puede ser una cadena de hidrocarburo C1-C20 bivalente, lineal o ramificada, saturada o insaturada, opcionalmente sustituida en la que una o más unidades de metileno están remplazadas opcional e independientemente por -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)₂-, -N(R)SO₂-, SO₂N(R)-, un grupo heterocíclico, un grupo arilo, o un grupo heteroarilo, en el que cada aparición de R es independientemente hidrógeno, un grupo protector adecuado, un resto acilo, resto arilalquilo, resto alifático, resto arilo, resto heteroarilo, o resto heteroalifático.

En un aspecto adicional más del agonista parcial del receptor de insulina o dímero de insulina, el resto de unión es un resto acilo, -C(O)RC(O)-, en el que R es cadena de alquilo, cadena de poli(etilenglicol) (PEG), cadena que contiene amida, cadena que contiene triazol(es), resto que contiene ciclooctino, una cadena acilo sustituida, o una cadena de polietilenglicol (PEG).

En un aspecto adicional, el resto de unión es un alquildioílo, -C(O)(CH₂)_nC(O)-, en el que n = 0-45, incluyendo aunque sin limitación un resto oxalilo (C2), un resto succinilo (C4), un resto adipoílo (C6), un resto suberoílo (C8), un resto decanodioílo (C10), un resto dodecanodioílo (C12), un resto tetradecanodioílo (C14), o un resto hexadecanodioílo (C16).

La presente invención proporciona adicionalmente un agonista parcial del receptor de insulina o dímero de insulina que comprende la fórmula



en la que D¹ y D² son cada uno independientemente un polipéptido de insulina o análogo de insulina, en la que cada polipéptido de insulina es un heterodímero que comprende un polipéptido de cadena A y un polipéptido de cadena B unidos juntos a través de enlaces disulfuro intercatenarios; L es un resto de unión en el que un extremo del resto de unión está unido a un residuo de aminoácido en o cerca del grupo carboxilo de D¹ y el otro extremo del resto de unión está unido a un residuo de aminoácido en o cerca del extremo carboxilo de D² con la condición de que L no incluya un enlace disulfuro; y en la que el primero y segundo polipéptidos de insulina o análogo de insulina incluyen un sustituyente unido al extremo amino terminal del polipéptido de cadena A y el polipéptido de cadena B.

En un aspecto adicional del agonista parcial del receptor de insulina o dímero de insulina, D¹ y D² son iguales o en el que D¹ y D² son diferentes.

En un aspecto adicional del agonista parcial del receptor de insulina o dímero de insulina, el resto de unión une covalentemente D¹ y D² mediante el grupo amino épsilon de un residuo de lisina en o cerca del extremo carboxi terminal de D¹ y D².

En un aspecto adicional más del agonista parcial del receptor de insulina o dímero de insulina, el sustituyente tiene una fórmula general RC(O)-, en la que R puede ser R'CH₂, R'NH, R'O y R' puede ser H, cadena alquilo lineal, aminoácido, péptido, PEG, sacáridos, que en aspectos particulares RC(O)- puede ser acetilo, fenilacetilo, carbamoilo, *N*-alquil carbamoilo, o alcóxicarbonilo. En aspectos particulares, el sustituyente se selecciona del grupo que consiste en acetilo, fenilacetilo, carbamoilo, *N*-alquil carbamoilo, isobutilo, isobutilo, metoxiacetilo, glicina, aminoetilglucosa (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, *N*-dimetilo, y alcóxicarbonilo.

En aspectos particulares del agonista parcial del receptor de insulina o dímero de insulina, cada polipéptido de cadena A comprende independientemente la secuencia de aminoácidos GX₂X₃EQCCX₈SICSLYQLX₁₇NX₁₉CX₂₃ (SEC ID N.º: 3) y cada polipéptido de cadena B comprende independientemente la secuencia de aminoácidos X₂₅LCGX₂₉X₃₀LVEALYLVCGERGFX₂₇YTX₃₁X₃₂ (SEC ID N.º: 4) o X₂₂VNQX₂₅X₂₆CGX₂₉X₃₀LVEALYLVCGERGFX₂₇YTX₃₁X₃₂X₃₃X₃₄X₃₅ (SEC ID N.º: 5) en la que X₂ es isoleucina o treonina; X₃ es valina, glicina, o leucina; X₈ es treonina o histidina; X₁₇ es ácido glutámico o glutamina; X₁₉ es tirosina, 4-metoxi-fenilalanina, alanina, o 4-amino fenilalanina; X₂₃ es asparagina o glicina; X₂₂ es fenilalanina y desamino-fenilalanina; X₂₅ es histidina o treonina; X₂₆ es leucina o glicina; X₂₇ es fenilalanina o ácido aspártico; X₂₉ es alanina, glicina, o serina; X₃₀ es histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, ácido homocisteico, o ácido cisteico; X₃₁ es ácido aspártico, prolina, o lisina; X₃₂ es lisina o prolina; X₃₃ es treonina, alanina, o está ausente; X₃₄ es arginina o está ausente; y X₃₅ es arginina o está ausente; con la condición de que al menos uno de X₃₁ o X₃₂ sea lisina.

En un aspecto adicional del agonista parcial del receptor de insulina o dímero de insulina, en el que D¹ y D² son independientemente insulina humana nativa, insulina lispro, insulina aspart, desB30 insulina, o insulina glargina.

En aspectos particulares de los agonistas parciales del receptor de insulina o dímero de insulina, el resto de unión puede ser un grupo opcionalmente sustituido seleccionado

entre el grupo que consiste en acilo, alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo y heterocíclico. El resto de unión puede ser una cadena de hidrocarburo C1-C20 bivalente, lineal o ramificada, saturada o insaturada, opcionalmente sustituida en la que una o más unidades de metileno están remplazadas opcional e independientemente por -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)₂-, -N(R)SO₂-, SO₂N(R)-, un grupo heterocíclico, un grupo arilo, o un grupo heteroarilo, en el que cada aparición de R es independientemente hidrógeno, un grupo protector adecuado, un resto acilo, resto arilalquilo, resto alifático, resto arilo, resto heteroarilo, o resto heteroalifático.

En un aspecto adicional más del agonista parcial del receptor de insulina o dímero de insulina, el resto de unión es un resto acilo, -C(O)RC(O)-, en el que R es cadena de alquilo, cadena de poli(etilenglicol) (PEG), cadena que contiene amida, cadena que contiene triazol(es), resto que contiene ciclooctino, una cadena acilo sustituida, o una cadena de polietilenglicol (PEG).

En un aspecto adicional del agonista parcial del receptor de insulina o dímero de insulina, el resto de unión es un alquildioílo, -C(O)(CH₂)_nC(O)-, en el que n = 0-45, incluyendo aunque sin limitación un resto oxalilo (C2), un resto succinilo (C4), un resto adipoílo (C6), un resto suberoílo (C8), un resto decanodioílo (C10), un resto dodecanodioílo (C12), un resto tetradecanodioílo (C14), o un resto hexadecanodioílo (C16).

Se proporcionan adicionalmente composiciones que comprenden uno cualquiera de los agonistas parciales del receptor de insulina o dímero de insulina mencionados anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona adicionalmente un agonista parcial del receptor de insulina o dímero de insulina que comprende un primer heterodímero de insulina o análogo de insulina y un segundo heterodímero de insulina o análogo de insulina, incluyendo cada heterodímero un polipéptido de cadena A y un polipéptido de cadena B, en el que el polipéptido de cadena A y el polipéptido de cadena B están unidos juntos a través de enlaces disulfuro intercatenarios; en el que el primero y segundo heterodímeros de insulina o análogo de insulina están unidos covalentemente juntos a través de un resto de unión que conecta la cadena lateral de un aminoácido en o cerca del extremo carboxi terminal de los dos polipéptidos respectivos de cadena B; y opcionalmente en el que al menos el extremo amino terminal de al menos uno de los polipéptidos de cadena A y los polipéptidos de cadena B del primer polipéptido de insulina o

segundo polipéptido de insulina está unido covalentemente a un sustituyente, con la condición de que (1) el resto de unión no incluya un enlace disulfuro y (2) cuando la insulina o análogo de insulina no sea insulina o análogo de insulina de un humano y el extremo amino terminal del polipéptido de cadena A y el polipéptido de cadena B no incluyen un sustituyente entonces el

5 resto de unión no es un resto oxalilo (C2), un resto suberoílo (C8), o un resto dodecanodioílo (C12).

En un aspecto adicional del agonista parcial del receptor de insulina o dímero de insulina, el primero y segundo heterodímeros de insulina o análogo de insulina son iguales o en el que el primero y segundo heterodímeros de insulina o análogo de insulina son diferentes.

10 En un aspecto adicional del agonista parcial del receptor de insulina o dímero de insulina, el resto de unión une covalentemente el primer heterodímero de insulina o análogo de insulina y el segundo heterodímero de insulina o análogo de insulina mediante un grupo amino epsilon de un residuo de lisina en o cerca del extremo carboxi terminal de sus respectivos polipéptidos de cadena B.

15 En un aspecto adicional más del agonista parcial del receptor de insulina o dímero de insulina, el sustituyente tiene una fórmula general $RC(O)-$, en la que R puede ser $R'CH_2$, $R'NH$, $R'O$ y R' puede ser H, cadena alquilo lineal, aminoácido, péptido, PEG, sacáridos, que en aspectos particulares $RC(O)-$ puede ser acetilo, fenilacetilo, carbamoílo, *N*-alquil carbamoílo, o alcóxicarbonilo. En aspectos particulares, el sustituyente se selecciona del grupo que consiste en

20 acetilo, fenilacetilo, carbamoílo, *N*-alquil carbamoílo, isobutilo, isobutilo, metoxiacetilo, glicina, aminoetilglucosa (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, *N*-dimetilo, y alcóxicarbonilo.

En un aspecto adicional del agonista parcial del receptor de insulina o dímero de insulina, la primera y segunda insulinas o análogos de insulina son independientemente insulina humana nativa, insulina lispro, insulina aspart, desB30 insulina, o insulina glargina.

25 En aspectos particulares del agonista parcial del receptor de insulina o dímero de insulina, cada polipéptido de cadena A comprende independientemente la secuencia de aminoácidos $GX_2X_3EQCCX_8SICSLYQLX_{17}NX_{19}CX_{23}$ (SEC ID N.º: 3) y cada polipéptido de cadena B comprende independientemente la secuencia de aminoácidos

$X_{25}LCGX_{29}X_{30}LVEALYLVCGERGFX_{27}YTX_{31}X_{32}$ (SEC ID N.º: 4) o

30 $X_{22}VNQX_{25}X_{26}CGX_{29}X_{30}LVEALYLVCGERGFX_{27}YTX_{31}X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}$ (SEC ID N.º: 5) en la que X_2 es isoleucina o treonina; X_3 es valina, glicina, o leucina; X_8 es treonina o

histidina; X₁₇ es ácido glutámico o glutamina; X₁₉ es tirosina, 4-metoxi-fenilalanina, alanina, o 4-amino fenilalanina; X₂₃ es asparagina o glicina; X₂₂ es fenilalanina y desamino-fenilalanina; X₂₅ es histidina o treonina; X₂₆ es leucina o glicina; X₂₇ es fenilalanina o ácido aspártico; X₂₉ es alanina, glicina, o serina; X₃₀ es histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, ácido

- 5 homocisteico, o ácido cisteico; X₃₁ es ácido aspártico, prolina, o lisina; X₃₂ es lisina o prolina; X₃₃ es treonina, alanina, o está ausente; X₃₄ es arginina o está ausente; y X₃₅ es arginina o está ausente; con la condición de que al menos uno de X₃₁ o X₃₂ sea lisina.

- En aspectos particulares de los agonistas parciales del receptor de insulina o dímero de insulina, el resto de unión puede ser un grupo opcionalmente sustituido seleccionado
10 entre el grupo que consiste en acilo, alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo y heterocíclico. El resto de unión puede ser una cadena de hidrocarburo C1-C20 bivalente, lineal o ramificada, saturada o insaturada, opcionalmente sustituida en la que una o más unidades de metileno están remplazadas opcional e independientemente por -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)₂-, -N(R)SO₂-, SO₂N(R)-, un grupo heterocíclico, un
15 grupo arilo, o un grupo heteroarilo, en el que cada aparición de R es independientemente hidrógeno, un grupo protector adecuado, un resto acilo, resto arilalquilo, resto alifático, resto arilo, resto heteroarilo, o resto heteroalifático.

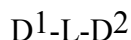
- En un aspecto adicional más del agonista parcial del receptor de insulina o dímero de insulina, el resto de unión es un resto acilo, -C(O)RC(O)-, en el que R es cadena de alquilo, cadena de poli(etilenglicol) (PEG), cadena que contiene amida, cadena que contiene triazol(es),
20 resto que contiene ciclooctino, una cadena acilo sustituida, o una cadena de polietilenglicol (PEG).

En un aspecto adicional del agonista parcial del receptor de insulina o dímero de insulina, el resto de unión es un resto acilo C2-C20.

- 25 En aspectos particulares, el resto de unión es un alquildioilo, -C(O)(CH₂)_nC(O)-, en el que n = 0-45, incluyendo aunque sin limitación un resto oxalilo (C2), un resto succinilo (C4), un resto adipóilo (C6), un resto suberoílo (C8), un resto decanodioílo (C10), un resto dodecanodioílo (C12), un resto tetradecanodioílo (C14), o un resto hexadecanodioílo (C16).

Se proporcionan adicionalmente composiciones que comprenden uno cualquiera de los agonistas parciales del receptor de insulina o dímeros de insulina mencionados anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona adicionalmente un agonista parcial del receptor de insulina o dímero de insulina que comprende la fórmula



en la que D^1 y D^2 son cada uno independientemente un polipéptido de insulina o análogo de insulina, en la que cada polipéptido de insulina es un heterodímero que comprende un polipéptido de cadena A y un polipéptido de cadena B unidos juntos a través de enlaces disulfuro intercatenarios; L es un resto de unión en el que un extremo del resto de unión está unido a un residuo de aminoácido en o cerca del grupo carboxilo de D^1 y el otro extremo del resto de unión está unido a un residuo de aminoácido en o cerca del extremo carboxilo de D^2 con la condición de que L no incluya un enlace disulfuro; y opcionalmente, en la que al menos uno de D^1 o D^2 incluye un sustituyente unido al extremo amino terminal del polipéptido de cadena A o el polipéptido de cadena B de D^1 o D^2 ; con la condición de que (1) el resto de unión no incluya un enlace disulfuro y (2) cuando el extremo amino terminal del polipéptido de cadena A y el polipéptido de cadena B no incluye un sustituyente entonces el resto de unión no es un resto oxalilo (C2), un resto suberoílo (C8), o un resto dodecanodioílo (C12).

En un aspecto adicional del agonista parcial del receptor de insulina o dímero de insulina, D^1 y D^2 son iguales o en el que D^1 y D^2 son diferentes.

En un aspecto adicional del agonista parcial del receptor de insulina o dímero de insulina, el resto de unión une covalentemente D^1 y D^2 mediante el grupo amino épsilon de un residuo de lisina en o cerca del extremo carboxi terminal de D^1 y D^2 .

En un aspecto adicional más del agonista parcial del receptor de insulina o dímero de insulina, el sustituyente tiene una fórmula general $RC(O)-$, en la que R puede ser $R'CH_2$, $R'NH$, $R'O$ y R' puede ser H, cadena alquilo lineal, aminoácido, péptido, PEG, sacáridos, que en aspectos particulares $RC(O)-$ puede ser acetilo, fenilacetilo, carbamoílo, *N*-alquil carbamoílo, o alcóxicarbonilo. En aspectos particulares, el sustituyente se selecciona del grupo que consiste en acetilo, fenilacetilo, carbamoílo, *N*-alquil carbamoílo, isobutilo, isobutilo, metoxiacetilo, glicina, aminoetilglucosa (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, *N*-dimetilo, y alcóxicarbonilo.

En un aspecto adicional del agonista parcial del receptor de insulina o dímero de insulina, D¹ y D² son independientemente insulina humana nativa, insulina lispro, insulina aspart, desB30 insulina, o insulina glargina.

En aspectos particulares del agonista parcial del receptor de insulina o dímero de insulina, cada polipéptido de cadena A comprende independientemente la secuencia de aminoácidos GX₂X₃EQCCX₈SICSLYQLX₁₇NX₁₉CX₂₃ (SEC ID N.º: 3) y cada polipéptido de cadena B comprende independientemente la secuencia de aminoácidos X₂₅LCGX₂₉X₃₀LVEALYLVCGERGFX₂₇YTX₃₁X₃₂ (SEC ID N.º: 4) o X₂₂VNQX₂₅X₂₆CGX₂₉X₃₀LVEALYLVCGERGFX₂₇YTX₃₁X₃₂X₃₃X₃₄X₃₅ (SEC ID N.º: 5) en la que X₂ es isoleucina o treonina; X₃ es valina, glicina, o leucina; X₈ es treonina o histidina; X₁₇ es ácido glutámico o glutamina; X₁₉ es tirosina, 4-metoxi-fenilalanina, alanina, o 4-amino fenilalanina; X₂₃ es asparagina o glicina; X₂₂ es fenilalanina y desamino-fenilalanina; X₂₅ es histidina o treonina; X₂₆ es leucina o glicina; X₂₇ es fenilalanina o ácido aspártico; X₂₉ es alanina, glicina, o serina; X₃₀ es histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, ácido homocisteico, o ácido cisteico; X₃₁ es ácido aspártico, prolina, o lisina; X₃₂ es lisina o prolina; X₃₃ es treonina, alanina, o está ausente; X₃₄ es arginina o está ausente; y X₃₅ es arginina o está ausente; con la condición de que al menos uno de X₃₁ o X₃₂ sea lisina.

En aspectos particulares de los agonistas parciales del receptor de insulina o dímero de insulina, el resto de unión puede ser un grupo opcionalmente sustituido seleccionado entre el grupo que consiste en acilo, alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo y heterocíclico. El resto de unión puede ser una cadena de hidrocarburo C1-C20 bivalente, lineal o ramificada, saturada o insaturada, opcionalmente sustituida en la que una o más unidades de metileno están remplazadas opcional e independientemente por -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)₂-, -N(R)SO₂-, SO₂N(R)-, un grupo heterocíclico, un grupo arilo, o un grupo heteroarilo, en el que cada aparición de R es independientemente hidrógeno, un grupo protector adecuado, un resto acilo, resto arilalquilo, resto alifático, resto arilo, resto heteroarilo, o resto heteroalifático.

En un aspecto adicional más del agonista parcial del receptor de insulina o dímero de insulina, el resto de unión es un resto acilo, -C(O)RC(O)-, en el que R es cadena de alquilo,

cadena de poli(etilenglicol) (PEG), cadena que contiene amida, cadena que contiene triazol(es), resto que contiene ciclooctino, una cadena acilo sustituida, o una cadena de polietilenglicol (PEG).

5 En un aspecto adicional del agonista parcial del receptor de insulina o dímero de insulina, el resto de unión es un resto acilo C2-C20.

En aspectos particulares, el resto de unión es un alquildioílo, $-C(O)(CH_2)_n C(O)-$, en el que $n = 0-45$, incluyendo aunque sin limitación un resto oxalilo (C2), un resto succinilo (C4), un resto adipoílo (C6), un resto suberoílo (C8), un resto decanodioílo (C10), un resto dodecanodioílo (C12), un resto tetradecanodioílo (C14), o un resto hexadecanodioílo (C16).

10 La presente invención proporciona adicionalmente un dímero de análogo de insulina que comprende:

un primer heterodímero de análogo de insulina y un segundo heterodímero de insulina o análogo de insulina incluyendo cada heterodímero un polipéptido de cadena A y un polipéptido de cadena B, en el que el polipéptido de cadena A y el polipéptido de cadena B están
15 unidos juntos a través de enlaces disulfuro intercatenarios; en el que el primero y segundo heterodímeros de insulina o análogo de insulina están unidos covalentemente juntos a través de un resto de unión que conecta la cadena lateral de un aminoácido en o cerca del extremo carboxi terminal de los dos polipéptidos respectivos de cadena B; en el que el análogo de insulina se selecciona entre insulina lispro, insulina aspart e insulina glargina; y opcionalmente en el que el
20 extremo amino terminal de al menos uno de los polipéptidos de cadena A y los polipéptidos de cadena B del primer polipéptido de insulina o el segundo polipéptido de insulina está unido covalentemente a un sustituyente, con la condición de que el resto de unión no incluya un enlace disulfuro.

25 En un aspecto adicional del agonista parcial del receptor de insulina, el primero y segundo heterodímeros de insulina o análogo de insulina son iguales o en el que el primero y segundo heterodímeros de insulina o análogo de insulina son diferentes.

En un aspecto adicional del agonista parcial del receptor de insulina, el resto de unión une covalentemente el primer heterodímero de insulina o análogo de insulina y el segundo heterodímero de insulina o análogo de insulina mediante un grupo amino épsilon de un residuo
30 de lisina en o cerca del extremo carboxi terminal de sus respectivos polipéptidos de cadena B.

En un aspecto adicional más del agonista parcial del receptor de insulina, el sustituyente tiene una fórmula general $RC(O)-$, en la que R puede ser $R'CH_2$, $R'NH$, $R'O$ y R' puede ser H, cadena alquilo lineal, aminoácido, péptido, PEG, sacáridos, que en aspectos particulares $RC(O)-$ puede ser acetilo, fenilacetilo, carbamoilo, *N*-alquil carbamoilo, o

5 alcoxycarbonilo. En aspectos particulares, el sustituyente se selecciona del grupo que consiste en acetilo, fenilacetilo, carbamoilo, *N*-alquil carbamoilo, isobutilo, isobutilo, metoxiacetilo, glicina, aminoetilglucosa (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, *N*-dimetilo, y alcoxycarbonilo.

10 En un aspecto adicional del agonista parcial del receptor de insulina, al menos uno de la primera y segunda insulina o análogo de insulina está conjugada adicionalmente con un polietilenglicol, un resto de azúcar, o un heterociclo.

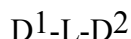
En aspectos particulares de los agonistas parciales del receptor de insulina, el resto de unión puede ser un grupo opcionalmente sustituido seleccionado entre el grupo que consiste en acilo, alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo y heterocíclico. El resto de unión puede ser
 15 una cadena de hidrocarburo C1-C20 bivalente, lineal o ramificada, saturada o insaturada, opcionalmente sustituida en la que una o más unidades de metileno están remplazadas opcional e independientemente por -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)₂-, -N(R)SO₂-, SO₂N(R)-, un grupo heterocíclico, un grupo arilo, o un grupo heteroarilo, en el que cada aparición de R es independientemente hidrógeno, un grupo protector
 20 adecuado, un resto acilo, resto arilalquilo, resto alifático, resto arilo, resto heteroarilo, o resto heteroalifático.

En un aspecto adicional más del agonista parcial del receptor de insulina, el resto de unión es un resto acilo, -C(O)RC(O)-, en el que R es cadena de alquilo, cadena de poli(etilenglicol) (PEG), cadena que contiene amida, cadena que contiene triazol(es), resto que
 25 contiene ciclooctino, una cadena acilo sustituida, o una cadena de polietilenglicol (PEG).

En un aspecto adicional del agonista parcial del receptor de insulina, el resto de unión es un resto acilo C2-C20.

En aspectos particulares, el resto de unión es un alquildioilo, -C(O)(CH₂)_nC(O)-, en el que n = 0-45, incluyendo aunque sin limitación un resto oxalilo (C2), un resto succinilo (C4), un resto adipoilo (C6), un resto suberoilo (C8), un resto decanodioilo (C10), un resto
 30 dodecanodioilo (C12), un resto tetradecanodioilo (C14), o un resto hexadecanodioilo (C16).

La presente invención proporciona adicionalmente un dímero de análogo de insulina que comprende la fórmula



5 en la que D^1 y D^2 son cada uno independientemente un polipéptido de insulina o análogo de insulina, en la que cada polipéptido de insulina es un heterodímero que comprende un polipéptido de cadena A y un polipéptido de cadena B unidos juntos a través de enlaces disulfuro intercatenarios; L es un resto de unión en el que un extremo del resto de unión está unido a un residuo de aminoácido en o cerca del grupo carboxilo de D^1 y el otro extremo del resto de unión está unido a un residuo de aminoácido en o cerca del extremo carboxilo de D^2 con la condición
10 de que L no incluya un enlace disulfuro; en la que el resto de insulina se selecciona entre insulina lispro, insulina aspart e insulina glargina; y opcionalmente, en la que al menos uno de D^1 o D^2 incluye un sustituyente unido al extremo amino terminal del polipéptido de cadena A o el polipéptido de cadena B de D^1 o D^2 ; con la condición de que el resto de unión no incluya un enlace disulfuro.

15 En un aspecto adicional del agonista parcial del receptor de insulina, D^1 y D^2 son iguales o en el que D^1 y D^2 son diferentes.

En un aspecto adicional del agonista parcial del receptor de insulina, el resto de unión une covalentemente D^1 y D^2 mediante el grupo amino épsilon de un residuo de lisina en o cerca del extremo carboxi terminal de D^1 y D^2 .

20 En un aspecto adicional más del agonista parcial del receptor de insulina, el sustituyente tiene una fórmula general $RC(O)-$, en la que R puede ser $R'CH_2$, $R'NH$, $R'O$ y R' puede ser H, cadena alquilo lineal, aminoácido, péptido, PEG, sacáridos, que en aspectos particulares $RC(O)-$ puede ser acetilo, fenilacetilo, carbamoilo, *N*-alquil carbamoilo, o alcóxicarbonilo. En aspectos particulares, el sustituyente se selecciona del grupo que consiste en
25 acetilo, fenilacetilo, carbamoilo, *N*-alquil carbamoilo, isobutilo, isobutilo, metoxiacetilo, glicina, aminoetilglucosa (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, *N*-dimetilo, y alcóxicarbonilo.

En aspectos particulares de los agonistas parciales del receptor de insulina, el resto de unión puede ser un grupo opcionalmente sustituido seleccionado entre el grupo que consiste en acilo, alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo y heterocíclico. El resto de unión puede ser
30 una cadena de hidrocarburo C1-C20 bivalente, lineal o ramificada, saturada o insaturada,

opcionalmente sustituida en la que una o más unidades de metileno están remplazadas opcional e independientemente por -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)₂-, -N(R)SO₂-, SO₂N(R)-, un grupo heterocíclico, un grupo arilo, o un grupo heteroarilo, en el que cada aparición de R es independientemente hidrógeno, un grupo protector adecuado, un resto acilo, resto arilalquilo, resto alifático, resto arilo, resto heteroarilo, o resto heteroalifático.

En un aspecto adicional más del agonista parcial del receptor de insulina, el resto de unión es un resto acilo, -C(O)RC(O)-, en el que R es cadena de alquilo, cadena de poli(etilenglicol) (PEG), cadena que contiene amida, cadena que contiene triazol(es), resto que contiene ciclooctino, una cadena acilo sustituida, o una cadena de polietilenglicol (PEG).

En un aspecto adicional del agonista parcial del receptor de insulina, el resto de unión es un resto acilo C₂-C₂₀.

En aspectos particulares, el resto de unión es un alquildioílo, -C(O)(CH₂)_nC(O)-, en el que n = 0-45, incluyendo aunque sin limitación un resto oxalilo (C₂), un resto succinilo (C₄), un resto adipoílo (C₆), un resto suberoílo (C₈), un resto decanodioílo (C₁₀), un resto dodecanodioílo (C₁₂), un resto tetradecanodioílo (C₁₄), o un resto hexadecanodioílo (C₁₆).

La presente invención proporciona un agonista parcial del receptor de insulina, que comprende

un primer heterodímero de insulina o análogo de insulina y un segundo heterodímero de insulina o análogo de insulina incluyendo cada heterodímero un polipéptido de cadena A y un polipéptido de cadena B, en el que el polipéptido de cadena A y el polipéptido de cadena B están unidos juntos a través de enlaces disulfuro intercatenarios; en el que el primero y segundo heterodímeros de insulina o análogo de insulina están unidos covalentemente juntos a través de un resto de unión que conecta la cadena lateral de un aminoácido en o cerca del extremo carboxi terminal de los dos polipéptidos respectivos de cadena B; opcionalmente en el que el extremo amino terminal de al menos uno de los polipéptidos de cadena A y los polipéptidos de cadena B del primer polipéptido de insulina o segundo polipéptido de insulina está unido covalentemente a un sustituyente; y en el que el agonista parcial del receptor de insulina tiene una respuesta máxima hacia el receptor de insulina (IR) humana que es aproximadamente el 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, o 70% de la

respuesta máxima de insulina humana nativa hacia el IR según se determina por un ensayo de fosforilación funcional; o

5 un primer heterodímero de insulina o análogo de insulina y un segundo heterodímero de insulina o análogo de insulina incluyendo cada heterodímero un polipéptido de cadena A y un polipéptido de cadena B, en el que el polipéptido de cadena A y el polipéptido de cadena B están unidos juntos a través de enlaces disulfuro intercatenarios; en el que el primero y segundo heterodímeros de insulina o análogo de insulina están unidos covalentemente juntos a través de un resto de unión que conecta la cadena lateral de un aminoácido en o cerca del extremo carboxi terminal de los dos polipéptidos respectivos de cadena B; opcionalmente en el que el extremo amino terminal de al menos uno de los polipéptidos de cadena A y los polipéptidos de cadena B del primer polipéptido de insulina o segundo polipéptido de insulina está unido covalentemente a un sustituyente; y en el que el agonista parcial del receptor de insulina tiene una respuesta máxima hacia el receptor de insulina (IR) humana que está entre el 20% y el 70%, el 40% y el 70%, el 50% y el 70%, el 40% y el 60%, o el 20% y el 40% de la respuesta máxima de insulina humana nativa hacia el IR según se determina por un ensayo de fosforilación funcional; o

15 un primer heterodímero de insulina o análogo de insulina y un segundo heterodímero de insulina o análogo de insulina incluyendo cada heterodímero un polipéptido de cadena A y un polipéptido de cadena B, en el que el polipéptido de cadena A y el polipéptido de cadena B están unidos juntos a través de enlaces disulfuro intercatenarios; en el que el primero y segundo heterodímeros de insulina o análogo de insulina están unidos covalentemente juntos a través de un resto de unión que conecta la cadena lateral de un aminoácido en o cerca del extremo carboxi terminal de los dos polipéptidos respectivos de cadena B; opcionalmente en el que el extremo amino terminal de al menos uno de los polipéptidos de cadena A y los polipéptidos de cadena B del primer polipéptido de insulina o segundo polipéptido de insulina está unido covalentemente a un sustituyente; y en el que el agonista parcial del receptor de insulina tiene una respuesta máxima hacia el receptor de insulina (IR) humana que es al menos el 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, o 70% de la respuesta máxima de insulina humana nativa hacia el IR según se determina por un ensayo de fosforilación funcional;

25

30 o

un primer heterodímero de insulina o análogo de insulina y un segundo heterodímero de insulina o análogo de insulina, incluyendo cada heterodímero un polipéptido de cadena A y un polipéptido de cadena B, en el que el polipéptido de cadena A y el polipéptido de cadena B están unidos juntos a través de enlaces disulfuro intercatenarios; en el que el primero y segundo heterodímeros de insulina o análogo de insulina están unidos covalentemente juntos a través de un resto de unión que conecta la cadena lateral de un aminoácido en o cerca del extremo carboxi terminal de los dos polipéptidos respectivos de cadena B; opcionalmente en el que el extremo amino terminal de al menos uno de los polipéptidos de cadena A y los polipéptidos de cadena B del primer polipéptido de insulina o segundo polipéptido de insulina está unido covalentemente a un sustituyente; y en el que el agonista parcial del receptor de insulina tiene una respuesta máxima hacia el receptor de insulina (IR) humana que es de menos del 70% de la respuesta máxima de insulina humana nativa hacia el IR según se determina por un ensayo de fosforilación funcional; o

un primer heterodímero de insulina o análogo de insulina y un segundo heterodímero de insulina o análogo de insulina incluyendo cada heterodímero un polipéptido de cadena A y un polipéptido de cadena B, en el que el polipéptido de cadena A y el polipéptido de cadena B están unidos juntos a través de enlaces disulfuro intercatenarios; en el que el primero y segundo heterodímeros de insulina o análogo de insulina están unidos covalentemente juntos a través de un resto de unión que conecta la cadena lateral de un aminoácido en o cerca del extremo carboxi terminal de los dos polipéptidos respectivos de cadena B; opcionalmente en el que el extremo amino terminal de al menos uno de los polipéptidos de cadena A y los polipéptidos de cadena B del primer polipéptido de insulina o segundo polipéptido de insulina está unido covalentemente a un sustituyente; y en el que el agonista parcial del receptor de insulina tiene una respuesta máxima hacia el receptor de insulina (IR) humana que es aproximadamente el 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, o 70% de la respuesta máxima de insulina humana nativa hacia el IR según se determina por un ensayo de fosforilación funcional.

En las realizaciones anteriores, el ensayo de fosforilación funcional puede ser un ensayo de fosforilación por AKT del receptor de insulina (IR).

En un aspecto adicional del agonista parcial del receptor de insulina, el resto de unión no incluye un enlace disulfuro y cuando el extremo amino terminal del polipéptido de

cadena A y el polipéptido de cadena B no incluye un sustituyente el resto de unión no es un resto oxalilo (C2), un resto suberoílo (C8), o un resto dodecanodioílo (C12).

En un aspecto adicional del agonista parcial del receptor de insulina, el primero y segundo heterodímeros de insulina o análogo de insulina son iguales o en el que el primero y segundo heterodímeros de insulina o análogo de insulina son diferentes.

En un aspecto adicional del agonista parcial del receptor de insulina, en el que el resto de unión une covalentemente el primer heterodímero de insulina o análogo de insulina y el segundo heterodímero de insulina o análogo de insulina mediante un grupo amino épsilon de un residuo de lisina en o cerca del extremo carboxi terminal de sus respectivos polipéptidos de cadena B.

En un aspecto adicional más del agonista parcial del receptor de insulina, el sustituyente tiene una fórmula general $RC(O)-$, en la que R puede ser $R'CH_2$, $R'NH$, $R'O$ y R' puede ser H, cadena alquilo lineal, aminoácido, péptido, PEG, sacáridos, que en aspectos particulares $RC(O)-$ puede ser acetilo, fenilacetilo, carbamoílo, *N*-alquil carbamoílo, o alcóxicarbonilo. En aspectos particulares, el sustituyente se selecciona del grupo que consiste en acetilo, fenilacetilo, carbamoílo, *N*-alquil carbamoílo, isobutilo, isobutilo, metoxiacetilo, glicina, aminoetilglucosa (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, *N*-dimetilo, y alcóxicarbonilo.

En un aspecto adicional del agonista parcial del receptor de insulina, la primera y segunda insulinas o análogos de insulina son independientemente insulina humana nativa, insulina lispro, insulina aspart, desB30 insulina, o insulina glargina.

En aspectos particulares del agonista parcial del receptor de insulina, cada polipéptido de cadena A comprende independientemente la secuencia de aminoácidos $GX_2X_3EQCCX_8SICSLYQLX_{17}NX_{19}CX_{23}$ (SEC ID N.º: 3) y cada polipéptido de cadena B comprende independientemente la secuencia de aminoácidos $X_{25}LCGX_{29}X_{30}LVEALYLVCGERGFX_{27}YTX_{31}X_{32}$ (SEC ID N.º: 4) o $X_{22}VNQX_{25}X_{26}CGX_{29}X_{30}LVEALYLVCGERGFX_{27}YTX_{31}X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}$ (SEC ID N.º: 5) en la que X_2 es isoleucina o treonina; X_3 es valina, glicina, o leucina; X_8 es treonina o histidina; X_{17} es ácido glutámico o glutamina; X_{19} es tirosina, 4-metoxi-fenilalanina, alanina, o 4-amino fenilalanina; X_{23} es asparagina o glicina; X_{22} es fenilalanina y desamino-fenilalanina; X_{25} es histidina o treonina; X_{26} es leucina o glicina; X_{27} es fenilalanina o ácido aspártico; X_{29}

es alanina, glicina, o serina; X₃₀ es histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, ácido homocisteico, o ácido cisteico; X₃₁ es ácido aspártico, prolina, o lisina; X₃₂ es lisina o prolina; X₃₃ es treonina, alanina, o está ausente; X₃₄ es arginina o está ausente; y X₃₅ es arginina o está ausente; con la condición de que al menos uno de X₃₁ o X₃₂ sea lisina.

5 En aspectos particulares de los agonistas parciales del receptor de insulina, el resto de unión puede ser un grupo opcionalmente sustituido seleccionado entre el grupo que consiste en acilo, alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo y heterocíclico. El resto de unión puede ser una cadena de hidrocarburo C1-20 bivalente, lineal o ramificada, saturada o insaturada, opcionalmente sustituida en la que una o más unidades de metileno están remplazadas opcional e
10 independientemente por -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)₂-, -N(R)SO₂-, SO₂N(R)-, un grupo heterocíclico, un grupo arilo, o un grupo heteroarilo, en el que cada aparición de R es independientemente hidrógeno, un grupo protector adecuado, un resto acilo, resto arilalquilo, resto alifático, resto arilo, resto heteroarilo, o resto heteroalifático.

15 En un aspecto adicional más del agonista parcial del receptor de insulina, el resto de unión es un resto acilo, -C(O)RC(O)-, en el que R es cadena de alquilo, cadena de poli(etilenglicol) (PEG), cadena que contiene amida, cadena que contiene triazol(es), resto que contiene ciclooctino, una cadena acilo sustituida, o una cadena de polietilenglicol (PEG).

20 En un aspecto adicional del agonista parcial del receptor de insulina, el resto de unión es un resto acilo C2-C20.

En aspectos particulares, el resto de unión es un alquildioilo, -C(O)(CH₂)_nC(O)-, en el que n = 0-45, incluyendo aunque sin limitación un resto oxalilo (C2), un resto succinilo (C4), un resto adipoilo (C6), un resto suberoilo (C8), un resto decanodioilo (C10), un resto dodecanodioilo (C12), un resto tetradecanodioilo (C14), o un resto hexadecanodioilo (C16).

25 La presente invención proporciona adicionalmente un dímero de insulina que comprende una primera Lys B28 o B29 de una molécula de primer heterodímero de insulina que tiene un primer polipéptido de cadena A y primer polipéptido de cadena B y una segunda Lys B28 o B29 de un segundo heterodímero de insulina que tiene un segundo polipéptido de cadena A y segundo polipéptido de cadena B conjugadas conjuntamente por un enlazador bifuncional
30 seleccionado del grupo que consiste en **Enlazador 1, Enlazador 2, Enlazador 3, Enlazador 10,**

Enlazador 11, Enlazador 12, Enlazador 13, Enlazador 14, Enlazador 15, Enlazador 16, Enlazador 17, Enlazador 18, Enlazador 19, Enlazador 20, Enlazador 21, Enlazador 22, Enlazador 23, Enlazador 24, Enlazador 25, Enlazador 26, Enlazador 27, Enlazador 28, Enlazador 29, Enlazador 30, Enlazador 31, Enlazador 32, Enlazador 33, Enlazador 34, Enlazador 35, Enlazador 36, Enlazador 37, Enlazador 38, Enlazador 39, Enlazador 40, Enlazador 41, Enlazador 42, Enlazador 43, Enlazador 44, Enlazador 45, Enlazador 46, Enlazador 47, Enlazador 48, Enlazador 49, y Enlazador 50 con la condición de que cuando el enlazador bifuncional sea **Enlazador 10, Enlazador 11, Enlazador 12, Enlazador 13, o Enlazador 14**, al menos uno de los primer o segundo polipéptidos de cadena A o de cadena B esté conjugado en su aminoácido *N*-terminal con un sustituyente o al menos los aminoácidos *N*-terminales de la molécula de primer heterodímero de insulina estén conjugados con un sustituyente o los aminoácidos *N*-terminales de tanto el primer heterodímero de insulina como el segundo heterodímero de insulina estén conjugados con un sustituyente.

En realizaciones particulares, el sustituyente comprende un éster de *N*-hidroxisuccinimida unido a un grupo que tiene la fórmula general $RC(O)-$, donde R puede ser $R'CH_2$, $R'NH$, $R'O$, y R' puede ser H, cadena alquilo lineal, aminoácido, péptido, poli(etilenglicol) (PEG), sacáridos. En realizaciones particulares, el sustituyente es un grupo carbamoilo, grupo acetilo, glicina, grupo metilo, grupo metoxi, grupo dimetilo, grupo isobutilo, grupo PEG1, grupo AEG, grupo alquilo C6-AEG o grupo PEG2.

La presente invención proporciona adicionalmente un dímero de insulina que comprende una primera Lys B28 o B29 de una molécula de primer heterodímero de insulina que tiene un primer polipéptido de cadena A y primer polipéptido de cadena B está conjugada con un primer enlazador seleccionado del grupo que consiste en **Enlazador 5 y Enlazador 7** y una segunda Lys B28 o B29 de un segundo heterodímero de insulina que tiene un segundo polipéptido de cadena A y segundo polipéptido de cadena B conjugada con un segundo enlazador seleccionado del grupo que consiste en **Enlazador 4, Enlazador 6, Enlazador 8, y Enlazador 9** conjugados conjuntamente a través del primer enlazador y el segundo enlazador.

En una realización adicional, la presente invención proporciona un dímero de análogo de insulina, que comprende una primera Lys B28 o B29 de una molécula de primer heterodímero de insulina que tiene un primer polipéptido de cadena A y primer polipéptido de cadena B conjugada con un primer enlazador seleccionado del grupo que consiste en **Enlazador**

5 y Enlazador 7 y una segunda Lys B28 o B29 de un segundo heterodímero de insulina que tiene un segundo polipéptido de cadena A y segundo polipéptido de cadena B conjugada con un segundo enlazador seleccionado del grupo que consiste en **Enlazador 5 y Enlazador 7**, en el que los primer y segundo enlazadores están conjugados conjuntamente a través de un enlazador en puente que tiene una estructura



en el que R es un enlace covalente, un átomo de carbono, un fenilo, un heteroátomo, o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado del grupo que consiste en acilo, alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo, y heterociclilo. En aspectos particulares R es un grupo acilo C2, C3, C4, C6, C7, C8, C9 o C10 o un PEG2, PEG3, PEG4, PEG5, PEG6, PEG7, PEG8, PEG9, PEG10, PEG11, PEG12, PEG13, o PEG25.

En realizaciones particulares, el sustituyente comprende un éster de *N*-hidroxisuccinimida unido a un grupo que tiene la fórmula general RC(O)-, donde R puede ser R'CH₂, R'NH, R'O, y R' puede ser H, cadena alquilo lineal, aminoácido, péptido, poli(etilenglicol) (PEG), sacáridos. En realizaciones particulares, el sustituyente es un grupo carbamoilo, grupo acetilo, glicina, grupo metilo, grupo metoxi, grupo dimetilo, grupo isobutilo, grupo PEG1, grupo AEG, grupo alquilo C6-AEG o grupo PEG2.

En una realización particular, la presente invención proporciona un dímero de análogo de insulina, que comprende una primera Lys B28 o B29 de una molécula de primer heterodímero de insulina que tiene un primer polipéptido de cadena A y primer polipéptido de cadena B conjugada con un primer enlazador seleccionado del grupo que consiste en **Enlazador 4, Enlazador 6, Enlazador 8, y Enlazador 9** y una segunda Lys B28 o B29 de un segundo heterodímero de insulina que tiene un segundo polipéptido de cadena A y segundo polipéptido de cadena B conjugada con un segundo enlazador seleccionado del grupo que consiste en **Enlazador 4, Enlazador 6, Enlazador 8, y Enlazador 9**, en el que los primer y segundo enlazadores están conjugados conjuntamente a través de un enlazador en puente que tiene una estructura



en el que R es un enlace covalente, un átomo de carbono, un fenilo, un heteroátomo, o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado del grupo que consiste en acilo, alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo, y heterociclilo. En aspectos particulares R es un grupo acilo C2, C3, C4, C6,

C7, C8, C9 o C10 o un PEG2, PEG3, PEG4, PEG5, PEG6, PEG7, PEG8, PEG9, PEG10, PEG11, PEG12, PEG13, o PEG25.

En realizaciones particulares, el sustituyente comprende un éster de *N*-hidroxisuccinimida unido a un grupo que tiene la fórmula general RC(O)-, donde R puede ser R'CH₂, R'NH, R'O, y R' puede ser H, cadena alquilo lineal, aminoácido, péptido, poli(etilenglicol) (PEG), sacáridos. En realizaciones particulares, el sustituyente es un grupo carbamoilo, grupo acetilo, glicina, grupo metilo, grupo metoxi, grupo dimetilo, grupo isobutilo, grupo PEG1, grupo AEG, grupo alquilo C6-AEG o grupo PEG2.

La presente proporciona adicionalmente composiciones que comprenden uno cualquiera de los agonistas parciales del receptor de insulina divulgados en el presente documento y una sal farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona un procedimiento para tratar la diabetes que comprende administrar a un individuo con diabetes una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende uno cualquiera de los agonistas parciales del receptor de insulina mencionados anteriormente. En aspectos particulares la diabetes es diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, o diabetes gestacional.

La presente invención proporciona el uso de una composición para el tratamiento de la diabetes que comprende uno cualquiera de los agonistas parciales del receptor de insulina mencionados anteriormente. En aspectos particulares, la diabetes es diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, o diabetes gestacional.

La presente invención proporciona el uso de uno cualquiera de los agonistas parciales del receptor de insulina divulgados en el presente documento para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes. En aspectos particulares la diabetes es diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, o diabetes gestacional.

Definiciones

Insulina - como se usa en el presente documento, el término indica el principio activo del páncreas que afecta al metabolismo de carbohidratos en el organismo animal y que es valioso en el tratamiento de la diabetes mellitus. El término incluye productos sintéticos y derivados de forma biotecnológica que son iguales que, o similares a, insulinas de origen natural en estructura, uso y efecto pretendido y son valiosos en el tratamiento de la diabetes mellitus.

El término es un término genérico que denomina el heterodímero de 51 aminoácidos que comprende el péptido de cadena A que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 1 y el péptido de cadena B que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 2, en la que los residuos de cisteína en las posiciones 6 y 11 de la cadena A están unidos en un enlace disulfuro, los residuos de cisteína en la posición 7 de la cadena A y la posición 7 de la cadena B están unidos en un enlace disulfuro y los residuos de cisteína en la posición 20 de la cadena A y 19 de la cadena B están unidos en un enlace disulfuro.

Análogo de insulina - el término, como se usa en el presente documento, incluye cualquier análogo de heterodímero o análogo de cadena sencilla que comprende una o más modificaciones del péptido de cadena A y/o péptido de cadena B nativos. Las modificaciones incluyen aunque sin limitación sustituir un aminoácido en el lugar del aminoácido nativo en una posición seleccionada entre A4, A5, A8, A9, A10, A12, A13, A14, A15, A16, A17, A18, A19, A21, B1, B2, B3, B4, B5, B9, B10, B13, B14, B15, B16, B17, B18, B20, B21, B22, B23, B26, B27, B28, B29 y B30; delecionar cualquier o todos los de las posiciones B1-4 y B26-30; o conjugar directamente o mediante un enlazador polimérico o no polimérico uno o más de acilo, polietilglicina (PEG), o resto (restos) de sacárido; o cualquier combinación de los mismos. Según se ejemplifica por los análogos de insulina *N*-glucosilados divulgados en el presente documento, el término incluye adicionalmente cualquier análogo de heterodímero y cadena sencilla de insulina que se ha modificado para tener al menos un sitio de glucosilación ligada a *N* y en particular, realizaciones en que el sitio de glucosilación ligada a *N* está unido a u ocupado por un *N*-glucano. Los ejemplos de análogos de insulina incluyen aunque sin limitación los análogos de heterodímero y cadena sencilla divulgados en la solicitud internacional publicada WO20100080606, WO2009/099763 y WO2010080609, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia. Los ejemplos de análogos de insulina de cadena sencilla también incluyen aunque sin limitación los divulgados en las solicitudes internacionales publicadas WO9634882, WO95516708, WO2005054291, WO2006097521, WO2007104734, WO2007104736, WO2007104737, WO2007104738, WO2007096332, WO2009132129; las patentes de Estados Unidos N.ºs: 5.304.473 y 6.630.348; y Kristensen y col., Biochem. J. 305: 981-986 (1995), cuyas divulgaciones de cada una se incorporan en el presente documento por referencia.

El término incluye adicionalmente moléculas polipeptídicas de cadena sencilla y heterodiméricas que tienen poca o ninguna actividad detectable en el receptor de insulina pero que se han modificado para incluir una o más modificaciones o sustituciones de aminoácidos para tener una actividad en el receptor de insulina que tiene al menos un 1%, 10%, 50%, 75%, o 90% de la actividad en el receptor de insulina en comparación con la insulina nativa y que incluye adicionalmente al menos un sitio de glucosilación ligada a N. En aspectos particulares, el análogo de insulina es un agonista parcial que tiene menos del 80% (o 70%) de actividad en el receptor de insulina que la insulina nativa. Estos análogos de insulina, que tienen actividad reducida en el receptor de la hormona de crecimiento tipo insulina y actividad potenciada en el receptor de insulina, incluyen análogos tanto de heterodímeros como de cadena sencilla.

Insulina de cadena sencilla o análogo de insulina de cadena sencilla - como se usa en el presente documento, el término abarca un grupo de proteínas estructuralmente relacionadas en las que el péptido de cadena A o análogo funcional y el péptido de cadena B o análogo funcional están unidos covalentemente mediante un péptido o polipéptido de 2 a 35 aminoácidos o enlazador no peptídico polimérico o no polimérico y que tienen al menos un 1%, 10%, 50%, 75%, o 90% de la actividad de insulina en el receptor de insulina en comparación con la insulina nativa. La insulina o el análogo de insulina de cadena sencilla incluye adicionalmente tres enlaces disulfuro: el primer enlace disulfuro está entre los residuos de cisteína en las posiciones 6 y 11 de la cadena A o análogo funcional de la misma, el segundo enlace disulfuro está entre los residuos de cisteína en la posición 7 de la cadena A o análogo funcional de la misma y la posición 7 de la cadena B o análogo funcional de la misma y el tercer enlace disulfuro está entre los residuos de cisteína en la posición 20 de la cadena A o análogo funcional de la misma y la posición 19 de la cadena B o análogo funcional de la misma.

Péptido de conexión o péptido C - como se usa en el presente documento, el término se refiere al resto de conexión "C" de la secuencia de polipéptidos B-C-A de una molécula tipo preproinsulina de cadena sencilla. Específicamente, en la cadena de insulina natural, el péptido C conecta el aminoácido en la posición 30 de la cadena B y el aminoácido en la posición 1 de la cadena A. El término puede referirse tanto al péptido C de insulina nativa, el péptido C de mono, como a cualquier otro péptido de 3 a 35 aminoácidos que conecte la cadena B a la cadena A y por tanto se entiende que abarca cualquier péptido que una el péptido de cadena B al péptido de cadena A en un análogo de insulina de cadena sencilla (véanse, por

ejemplo, las solicitudes publicadas de Estados Unidos N.^{os}: 20090170750 y 20080057004 y el documento WO9634882) y en moléculas precursoras de insulina tales como las divulgadas en el documento WO9516708 y la patente de Estados Unidos N.^o: 7.105.314.

5 Modificación de aminoácido - como se usa en el presente documento, el término se refiere a una sustitución de un aminoácido, o a la derivación de un aminoácido por la adición y/o eliminación de grupos químicos al/del aminoácido e incluye la sustitución con cualquiera de los 20 aminoácidos habitualmente encontrados en proteínas humanas, así como con aminoácidos atípicos o de origen no natural. Las fuentes comerciales de aminoácidos atípicos incluyen Sigma-
10 Aldrich (Milwaukee, WI), ChemPep Inc. (Miami, FL) y Genzyme Pharmaceuticals (Cambridge, MA). Los aminoácidos atípicos pueden adquirirse de proveedores comerciales, sintetizarse de novo, o modificarse o derivarse químicamente a partir de aminoácidos de origen natural.

Sustitución de aminoácido - como se usa en el presente documento se refiere al remplazo de un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido diferente.

15 Sustitución conservadora de aminoácido - como se usa en el presente documento, el término se define en el presente documento como intercambios dentro de uno de los siguientes cinco grupos:

I. Residuos alifáticos pequeños, no polares o ligeramente polares:

Ala, Ser, Thr, Pro, Gly;

II. Residuos polares, cargados negativamente y sus amidas:

20 Asp, Asn, Glu, Gln, ácido cisteico y ácido homocisteico;

III. Residuos polares, cargados positivamente:

His, Arg, Lys; ornitina (Orn)

IV. Residuos grandes, alifáticos, no polares:

Met, Leu, Ile, Val, Cys, norleucina (Nle), homocisteína

25 V. Residuos grandes, aromáticos:

Phe, Tyr, Trp, acetyl fenilalanina

Tratar – como se usa en el presente documento, el término “tratar” (o “tratando”, “tratado”, “tratamiento”, etc.) se refiere a la administración de un IRPA de la presente divulgación a un sujeto que lo necesita con el propósito de mitigar, aliviar, alterar, corregir,
30 mejorar o afectar a una afección (por ejemplo, diabetes), un síntoma o síntomas de una afección (por ejemplo, hiperglucemia), o la predisposición hacia una afección. Por ejemplo, como se usa

en el presente documento la expresión "tratar la diabetes" se referirá en general a mantener los niveles sanguíneos de glucosa cerca de los niveles normales y puede incluir aumentar o disminuir los niveles sanguíneos de glucosa dependiendo de una situación dada.

Vehículo farmacéuticamente aceptable – como se usa en el presente documento, el término incluye cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales, tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsión de aceite en agua o agua en aceite y diversos tipos de agentes humectantes adecuados para administración a o por un individuo en necesidad. El término también abarca cualquiera de los agentes aprobados por una agencia reguladora del gobierno federal de Estados Unidos o enumerados en la farmacopea de Estados Unidos para su uso en animales, incluyendo seres humanos.

Sal farmacéuticamente aceptable - como se usa en el presente documento, el término se refiere a sales de compuestos que retienen la actividad biológica del compuesto precursor y que no son biológicamente indeseables o indeseables de otro modo. Muchos de los compuestos divulgados en el presente documento son capaces de formar sales de ácidos y/o bases en virtud de la presencia de grupos amino y/o carboxilo o grupos similares a los mismos.

Pueden prepararse sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables a partir de bases inorgánicas y orgánicas. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen, a modo de ejemplo solamente, sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, cinc y magnesio. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen, aunque sin limitación, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias.

Pueden prepararse sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables a partir de ácidos inorgánicos y orgánicos. Las sales derivadas de ácidos inorgánicos incluyen ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. Las sales derivadas de ácidos orgánicos incluyen ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-tolueno-sulfónico, ácido salicílico y similares.

Cantidad efectiva o terapéuticamente efectiva - como se usa en el presente documento se refiere a una cantidad no tóxica pero suficiente de un análogo de insulina para proporcionar el efecto deseado. Por ejemplo un efecto deseado sería la prevención o tratamiento

de la hiperglucemia. La cantidad que es "eficaz" variará de un sujeto a otro, dependiendo de la edad y estado general del individuo, el modo de administración y similares. Por tanto, no siempre es posible especificar una "cantidad eficaz" exacta. No siempre es posible determinar la cantidad eficaz óptima antes de la administración a o por un individuo en necesidad del mismo. Sin embargo, una cantidad "eficaz" apropiada en cualquier caso individual puede determinarla un especialista en la técnica usando experimentación rutinaria.

Parenteral – como se usa en el presente documento, el término significa no a través del canal alimentario sino por alguna otra vía tal como tal como intranasal, inhalación, subcutánea, intramuscular, intraespinal, o intravenosa.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** muestra el efecto de disminución de la concentración de glucosa de los **Dímeros 24, 18 y 40** en comparación con RHI cuando se administra a cerdos enanos diabéticos a 0,69 nmol/kg.

La **Figura 2A** muestra los resultados de un ensayo de tolerancia de insulina (ITT) en ratones que compara el compuesto A con RHI (Humulina). El compuesto A se administró a una dosis de 72 U/kg y una dosis de 300 U/kg y la Humulina se administró a una dosis de 18 U/kg y una dosis de 72 U/kg.

La **Figura 2B** muestra los resultados de un ensayo de tolerancia de insulina (ITT) en ratones que compara el compuesto B con RHI (Humulina). El compuesto B se administró a una dosis de 72 U/kg y una dosis de 300 U/kg y la Humulina se administró a una dosis de 18 U/kg y una dosis de 72 U/kg.

La **Figura 2C** muestra los resultados de un ensayo de tolerancia de insulina (ITT) en ratones que compara el **Dímero 24** con RHI (Humulina). El **Dímero 24** se administró a una dosis de 72 U/kg y una dosis de 300 U/kg y la Humulina se administró a una dosis de 18 U/kg y una dosis de 72 U/kg.

La **Figura 2D** muestra los resultados de **Dímero 55** en un ensayo de tolerancia de insulina (ITT) en ratones. El **Dímero 55** se administró a una dosis de 120 nmol/kg y una dosis de 300 nmol/kg.

La **Figura 2E** muestra los resultados de **Dímero 58** en un ensayo de tolerancia de insulina (ITT) en ratones. El **Dímero 58** se administró a una dosis de 60 nmol/kg y una dosis de 300 nmol/kg.

5 La **Figura 2F** muestra los resultados de **Dímero 60** en un ensayo de tolerancia de insulina (ITT) en ratones. El **Dímero 60** se administró a una dosis de 72 nmol/kg y una dosis de 300 nmol/kg.

La **Figura 2G** muestra los resultados de **Dímero 67** en un ensayo de tolerancia de insulina (ITT) en ratones. El **Dímero 67** se administró a una dosis de 120 nmol/kg y una dosis de 300 nmol/kg.

10 La **Figura 3** muestra que el dímero de insulina Compuesto A se degradaba a monómeros de insulina a las 2 horas de incubación con membranas celulares de riñón de rata (RKCM) sin glutatión (GSH). El % de valores precursores son semicuantitativos únicamente debido a las diferencias potenciales en las eficiencias de ionización.

15 La **Figura 4** muestra que el dímero de insulina Compuesto A se degradaba a monómeros de insulina a las 2 horas de incubación con membranas celulares de riñón de rata (RKCM) con glutatión(GSH). El % de valores precursores son semicuantitativos únicamente debido a las diferencias potenciales en las eficiencias de ionización.

20 La **Figura 5** muestra que **Dímero 24** perdió cierto polipéptido de cadena A, pero no se degradó a monómeros a las 2 horas de incubación con membranas celulares de riñón de rata (RKCM) sin glutatión (GSH). El % de valores precursores son semicuantitativos únicamente debido a las diferencias potenciales en las eficiencias de ionización.

25 La **Figura 6** muestra que **Dímero 24** perdió cierto polipéptido de cadena A, pero no se degradó a monómeros a las 2 horas de incubación con membranas celulares de riñón de rata (RKCM) con glutatión (GSH). El % de valores precursores son semicuantitativos únicamente debido a las diferencias potenciales en las eficiencias de ionización.

La **Figura 7A** muestra el efecto de disminución de la concentración de glucosa de **Dímeros 4, 5, 7, 8, y 9** en comparación con RHI cuando se administra a cerdos enanos diabéticos a 0,69 nmol/kg.

30 La **Figura 7B** muestra el efecto de disminución de la concentración de glucosa de **Dímeros 18, 19, 20, 21, y 22** en comparación con RHI cuando se administra a cerdos enanos diabéticos a 0,69 nmol/kg.

La **Figura 7C** muestra el efecto de disminución de la concentración de glucosa de **Dímeros 23, 24, 26, 27, y 28** en comparación con RHI cuando se administra a cerdos enanos diabéticos a 0,69 nmol/kg.

5 La **Figura 7D** muestra el efecto de disminución de la concentración de glucosa de **Dímeros 29, 32, 37, 38, y 39** en comparación con RHI cuando se administra a cerdos enanos diabéticos a 0,69 nmol/kg.

La **Figura 7E** muestra el efecto de disminución de la concentración de glucosa de **Dímeros 40, 41, 43, 44, y 48** en comparación con RHI cuando se administra a cerdos enanos diabéticos a 0,69 nmol/kg.

10 La **Figura 7F** muestra el efecto de disminución de la concentración de glucosa de **Dímeros 55, 57, 58, 60, y 61** en comparación con RHI cuando se administra a cerdos enanos diabéticos a 0,69 nmol/kg.

La **Figura 7G** muestra el efecto de disminución de la concentración de glucosa de **Dímeros 62, 64, 67, 69, y 71** en comparación con RHI cuando se administra a cerdos enanos diabéticos a 0,69 nmol/kg.

La **Figura 7H** muestra el efecto de disminución de la concentración de glucosa de **Dímeros 72, 77, y 78** en comparación con RHI cuando se administra a cerdos enanos diabéticos a 0,69 nmol/kg.

20 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona compuestos que comprenden dos moléculas de insulina unidas covalentemente para formar un dímero de insulina unido covalentemente que puede activar el receptor de insulina con potencia tipo insulina normal y actividad máxima reducida. Estos compuestos son agonistas parciales del receptor de insulina (IPRA): se

25 comportan como otros análogos de insulina para disminuir la concentración de glucosa de forma eficaz pero con riesgo inferior de hipoglucemia.

Los dímeros de insulina se han divulgado en Brandenburg y col. en la patente de Estados Unidos N.º: 3.907.763 (1973); Tatnell y col., Biochem J. 216: 687-694 (1983); Shüttler y Brandenburg, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem, 363, 317-330, 1982; Weiland y col., Proc

30 Natl. Acad. Sci. (USA) 87: 1154-1158 (1990); Deppe y col., Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (1994) 350:213-217; Brandenburg y Havenith en la patente de Estados Unidos N.º:

6.908.897(B2) (2005); Knudsen y col., PLOS ONE 7: e51972 (2012); DiMarchi y col. en el documento WO2011/159895; DiMarchi y col., en el documento WO 2014/052451; y Herrera y col., documento WO2014141165. Más recientemente, se han descrito dímeros de insulina en Brant- *Synthesis and Characterization of Insulin Receptor Partial Agonists as a Route to*
5 *Improved Diabetes Therapy*, Ph.D. Dissertation, Universidad de Indiana (abril de 2015) y Zaykov and DiMarchi, Poster P212-*Exploration of the structural and mechanistic basis for partial agonism of insulin dimers*, American Peptide Symposium, Orlando FL (20-25 de junio (2015). Sin embargo, los autores de la presente invención han descubierto que el nivel de actividad de insulina y la actividad agonista parcial de los dímeros es una función de la estructura
10 dimérica, la secuencia del análogo de insulina, la longitud del enlazador de dimerización y el sitio de dimerización que conecta los dos polipéptidos de insulina. Los autores de la invención han descubierto que los dímeros de insulina de la presente invención tienen riesgo reducido de promoción de la hipoglucemia cuando se administran en dosis altas con respecto a la insulina nativa u otros análogos de insulina cuando se administran a dosis altas.

15 La presente invención proporciona dímeros de insulina unidos covalentemente agonistas parciales formulados como una insulina basal nueva y transformadora (administración una vez al día) que manifiesta índice terapéutico (TI) mejorado sobre las actuales insulinas basales de tratamiento habitual (SOC). Estas moléculas pueden disminuir la glucosa de forma eficaz con riesgo reducido de hipoglucemia en cerdos enanos diabéticos y tienen la propiedad de
20 una insulina basal una vez al día (QD). El TI mejorado puede posibilitar que los médicos dosifiquen de forma más agresiva el dímero de IRPA para conseguir los objetivos diana para el control de la glucosa en ayunas. El estricto control de la glucosa en ayunas y HbA1c puede permitir que estas moléculas sirvan como 1) una insulina de larga acción independiente con un perfil potenciado de eficacia y seguridad en diabetes mellitus Tipo 2 (DMT2) y 2) una insulina
25 basal fundamental mejorada en diabetes mellitus Tipo 1 (DMT1) (y algunas DMT2) para uso con dosis de análogos de insulina de rápida acción (RAA) prandial adicionales.

Una insulina de larga acción ideal proporciona un control continuo de la glucosa en ayunas en diabéticos con PK/PD altamente estable y reproducible . Sin embargo, las insulinas basales actualmente disponibles, incluso aquellas con estabilidad y reproducibilidad mejorada de
30 PK/PD siguen teniendo un estrecho índice terapéutico y las incidencias de hipoglucemia aumentan según los niveles de glucosa se aproximan a la diana de euglucemia. Esto a menudo

puede conducir a sub-dosificación para evitar la hipoglucemia. Se espera que el tratamiento con un IRPA de la presente invención altere esta relación eficacia : hipoglucemia atenuando la tasa de cambio en la disminución de glucosa según se aumenta la dosificación.

5 Cadenas A y B de insulina

Se divulgan en el presente documento dímeros de insulina o análogo de insulina que tienen actividad agonista del receptor de insulina. El nivel de actividad de insulina de los dímeros es una función de la estructura dimérica, la secuencia del análogo de insulina, la longitud del enlazador de dimerización y el sitio de dimerización que conecta los dos polipéptidos de insulina. Los polipéptidos de insulina de la presente invención pueden comprender las secuencias nativas de cadena B y A de la insulina humana (SEC ID N.ºs: 1 y 2, respectivamente) o cualquiera de los análogos conocidos o derivados de las mismas que muestran actividad agonista de insulina cuando se unen entre sí en un heterodúplex. Dichos análogos incluyen, por ejemplo, proteínas que tienen una cadena A y una cadena B que difieren de la cadena A y cadena B de insulina humana por tener una o más deleciones de aminoácido, una o más sustituciones de aminoácido y/o una o más inserciones de aminoácido que no destruyen la actividad de insulina del análogo de insulina.

Un tipo de análogo de insulina, "análogo de insulina monomérica", se conoce bien en la técnica. Estos son análogos de acción rápida de insulina humana incluyendo, por ejemplo, análogos de insulina en los que:

(a) el residuo aminoácido en la posición B28 está sustituido con Asp, Lys, Leu, Val, o Ala y el residuo aminoácido en la posición B29 es Lys o Pro;

(b) los residuos aminoácido en cualquiera de las posiciones B27 y B30 están delecionados o sustituidos con un aminoácido no nativo.

En una realización se proporciona un análogo de insulina que comprende una Asp sustituida en la posición B28 (por ejemplo, insulina aspart (NOVOLOG); véase la SEC ID N.º: 9) o una Lys sustituida en la posición 28 y una prolina sustituida en la posición B29 (por ejemplo, insulina lispro (HUMALOG); véase la SEC ID N.º: 6). Se divulgan análogos adicionales de insulina monomérica en Chance y col., patente de Estados Unidos N.º: 5.514.646; Chance y col., solicitud de patente de Estados Unidos N.º de serie 08/255.297; Brems y col., Protein Engineering, 5:527-533 (1992); Brange y col., publicación EPO N.º: 214.826 (publicada

el 18 de marzo de 1987); y Brange y col., *Current Opinion in Structural Biology*, 1:934-940 (1991). Estas divulgaciones se incorporan expresamente en el presente documento por referencia para describir análogos de insulina monomérica.

Los análogos de insulina también pueden tener remplazos de los aminoácidos
 5 amidados con formas ácidas. Por ejemplo, Asn puede remplazarse con Asp o Glu. Asimismo, Gln puede remplazarse con Asp o Glu. En particular, Asn(A18), Asn(A21), o Asp(B3), o cualquier combinación de esos residuos, puede remplazarse por Asp o Glu. Además, Gln(A15) o Gln(B4), o ambas, puede remplazarse por Asp o Glu.

Como se divulga en el presente documento se proporcionan análogos de insulina
 10 de cadena sencilla que comprenden una cadena B y una cadena A de insulina humana, o análogos o derivados de las mismas, en los que el extremo carboxi terminal de la cadena B está unido al extremo amino terminal de la cadena A mediante un resto de unión. En una realización la cadena A es la secuencia de aminoácidos GIVEQCCTSICSLYQLENYCN (SEC ID N.º: 1) y la cadena B comprende la secuencia de aminoácidos FVNQHLCGSH
 15 LVEALYLVCGERGFFYTPKT (SEC ID N.º: 2) o una secuencia carboxi acortada de la misma que tiene B30 deletado y análogos de esas secuencias en los que cada secuencia está modificada para comprender de una a cinco sustituciones de aminoácido en las posiciones correspondientes a las posiciones de insulina nativa seleccionadas entre A5, A8, A9, A10, A14, A15, A17, A18, A21, B1, B2, B3, B4, B5, B9, B10, B13, B14, B20, B22, B23, B26, B27, B28,
 20 B29 y B30, con la condición de que al menos uno de B28 o B29 sea lisina. En una realización las sustituciones de aminoácido son sustituciones conservadoras de aminoácido. Las sustituciones adecuadas de aminoácidos en estas posiciones que no afectan de forma adversa a las actividades deseadas de insulina son conocidas para los especialistas en la técnica, como se demuestra, por ejemplo, en Mayer y col., *Insulin Structure and Function*, *Biopolymers*. 2007;88(5):687-713,
 25 cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia.

De acuerdo con una realización los péptidos análogos de insulina pueden comprender una cadena A de insulina y una cadena B de insulina o análogos de las mismas, en los que la cadena A comprende una secuencia de aminoácidos que comparte al menos el 70% de identidad de secuencia (por ejemplo, el 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%) sobre la longitud del
 30 péptido nativo, con GIVEQCCTSICSLYQLENYCN (SEC ID N.º: 1) y la cadena B comprende una secuencia de aminoácidos que comparte al menos el 60% de identidad de secuencia (por

ejemplo, el 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%) sobre la longitud del péptido nativo, con FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (SEC ID N.º: 2) o una secuencia acortada carboxi de la misma que tiene B30 delecionado.

Pueden añadirse secuencias adicionales de aminoácidos al extremo amino terminal de la cadena B o al extremo carboxi terminal de la cadena A de los polipéptidos de insulina de la presente invención. Por ejemplo, puede añadirse una serie de aminoácidos cargados negativamente al extremo amino terminal de la cadena B incluyendo por ejemplo un péptido de 1 a 12, 1 a 10, 1 a 8 o 1 a 6 aminoácidos de longitud y que comprende uno o más aminoácidos cargados negativamente incluyendo por ejemplo ácido glutámico y ácido aspártico.

En una realización la extensión amino terminal de la cadena B comprende de 1 a 6 aminoácidos cargados. De acuerdo con una realización los polipéptidos de insulina divulgados comprenden una amida o éster C-terminal en lugar de un carboxilato C-terminal en la cadena A.

En diversas realizaciones, el análogo de insulina tiene un punto isoeléctrico que se ha desplazado respecto a la insulina humana. En algunas realizaciones, el desplazamiento en el punto isoeléctrico se consigue añadiendo uno o más residuos de arginina, lisina, o histidina al extremo N-terminal del péptido de cadena A de insulina y/o al extremo C-terminal del péptido de cadena B de insulina. Los ejemplos de dichos polipéptidos de insulina incluyen Arg^{A0}-insulina humana, Arg^{B31}Arg^{B32}-insulina humana, Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}-insulina humana, Arg^{A0}Arg^{B31}Arg^{B32}-insulina humana, y Arg^{A0}Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}-insulina humana. A modo de ejemplo adicional, la insulina glargina (LANTUS; véanse las SEC ID N.ºs: 7 y 8) es un análogo de insulina de acción larga ejemplar en el que Asn^{A21} se ha remplazado por glicina y dos residuos de arginina se han unido covalentemente al extremo C-terminal del péptido B. El efecto de estos cambios aminoacídicos fue desplazar el punto isoeléctrico de la molécula, produciendo de este modo una molécula que es soluble a pH ácido (por ejemplo, pH 4 a 6,5) pero insoluble a pH fisiológico. Cuando se inyecta una solución de insulina glargina en el músculo, el pH de la solución se neutraliza y la insulina glargina forma microprecipitados que liberan lentamente la insulina glargina durante el periodo de 24 horas después de la inyección sin máximo pronunciado de insulina y por tanto sin un riesgo reducido de inducción de hipoglucemia. Este perfil permite una dosificación una vez al día para proporcionar una insulina basal del paciente. Por tanto, en algunas realizaciones, el análogo de insulina comprende un péptido de cadena A en el que el aminoácido en la posición A21 es glicina y un péptido de

cadena B en el que los aminoácidos en la posición B31 y B32 son arginina. La presente divulgación abarca todas las combinaciones individuales y múltiples de estas mutaciones y cualquier otra mutación que se describa en el presente documento (por ejemplo, Gly^{A21}-insulina humana, Gly^{A21} Arg^{B31}-insulina humana, Arg^{B31} Arg^{B32}-insulina humana, Arg^{B31}-insulina humana).

En aspectos particulares de los agonistas parciales del receptor de insulina, uno o más aminoácidos amidados del análogo de insulina se remplazan con un aminoácido ácido, u otro aminoácido. Por ejemplo, la asparagina puede remplazarse con ácido aspártico o ácido glutámico, u otro residuo. Asimismo, la glutamina puede remplazarse con ácido aspártico o ácido glutámico, u otro residuo. En particular, Asn^{A18}, Asn^{A21}, o Asn^{B3}, o cualquier combinación de esos residuos, puede remplazarse por ácido aspártico o ácido glutámico, u otro residuo. . Gln^{A15} o Gln^{B4}, o ambos, puede remplazarse por ácido aspártico o ácido glutámico, u otro residuo. En aspectos particulares de los agonistas parciales del receptor de insulina, los análogos de insulina tienen un ácido aspártico, u otro residuo, en la posición A21 o ácido aspártico, u otro residuo, en la posición B3, o ambas.

Un especialista en la técnica reconocerá que es posible remplazar aún otros aminoácidos en el análogo de insulina con otros aminoácidos reteniendo al mismo tiempo la actividad biológica de la molécula. Por ejemplo, sin limitación, las siguientes modificaciones también están ampliamente aceptadas en la técnica: remplazo del residuo de histidina de la posición B10 con ácido aspártico (His^{B10} a Asp^{B10}); remplazo del residuo de fenilalanina en la posición B1 con ácido aspártico (Phe^{B1} a Asp^{B1}); remplazo del residuo de treonina en la posición B30 con alanina (Thr^{B30} a Ala^{B30}); remplazo del residuo de tirosina en la posición B26 con alanina (Tyr^{B26} a Ala^{B26}); y remplazo del residuo de serina en la posición B9 con ácido aspártico (Ser^{B9} a Asp^{B9}).

En diversas realizaciones, el análogo de insulina tiene un perfil prolongado de acción. Por tanto, en ciertas realizaciones, el análogo de insulina puede acilarse con un ácido graso. Es decir, se forma un enlace amida entre un grupo amino en el análogo de insulina y el grupo ácido carboxílico del ácido graso. El grupo amino puede ser el grupo alfa-amino de un aminoácido *N*-terminal del análogo de insulina, o puede ser el grupo épsilon-amino de un residuo de lisina del análogo de insulina. El análogo de insulina puede acilarse en uno o más de los tres grupos amino que están presentes en insulina humana de tipo silvestre en el residuo de lisina que

se ha introducido en la secuencia de insulina humana de tipo silvestre. En aspectos particulares de los agonistas parciales del receptor de insulina, el análogo de insulina puede acilarse en la posición A1, B1, o tanto A1 como B1. En ciertas realizaciones, el ácido graso se selecciona entre ácido mirístico (C14), ácido pentadecílico (C15), ácido palmítico (C16), ácido heptadecílico (C17) y ácido esteárico (C18).

Pueden encontrarse ejemplos de análogos de insulina por ejemplo en la solicitud internacional publicada WO9634882, WO95516708; WO20100080606, WO2009/099763 y WO2010080609, la patente de Estados Unidos N.º: 6.630.348 y Kristensen *y col.*, Biochem. J. 305: 981-986 (1995), cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia. En realizaciones adicionales, los análogos de insulina glucosilados *in vitro* o N-glucosilados *in vivo* pueden acilarse y/o pegilarse.

De acuerdo con una realización, se proporciona un análogo de insulina en el que la cadena A del péptido de insulina comprende la secuencia

GIVEQCCX₈SICSLYQLX₁₇NX₁₉CX₂₃ (SEC ID N.º: 3) y la cadena B comprende la

secuencia X₂₅LCGX₂₉X₃₀LVEALYLVCGERGFFYTX₃₁X₃₂ (SEC ID N.º: 4) en las que

X₈ es treonina o histidina;

X₁₇ es ácido glutámico o glutamina;

X₁₉ es tirosina, 4-metoxi-fenilalanina, o 4-amino fenilalanina;

X₂₃ es asparagina o glicina;

X₂₅ es histidina o treonina;

X₂₉ es alanina, glicina o serina;

X₃₀ es histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, ácido homocisteico, o ácido cisteico;

X₃₁ es prolina o lisina; y

X₃₂ es prolina o lisina, con la condición de que al menos uno de X₃₁ o X₃₂ sea lisina.

En una realización adicional, la cadena B comprende la secuencia

X₂₂VNQX₂₅LCGX₂₉X₃₀LVEALYLVCGERGFFYT-X₃₁X₃₂X₃₃X₃₄X₃₅ (SEC ID N.º: 5) en la que

X₂₂ es o fenilalanina y desamino-fenilalanina;

X₂₅ es histidina o treonina;

X₂₉ es alanina, glicina, o serina;

X₃₀ es histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, ácido homocisteico, o ácido cisteico;

X₃₁ es ácido aspártico, prolina, o lisina;

X₃₂ es lisina o prolina;

5 X₃₃ es treonina, alanina, o está ausente;

X₃₄ es arginina o está ausente; y

X₃₅ es arginina o está ausente;

con la condición de que al menos uno de X₃₁ o X₃₂ sea lisina.

10 Resto de unión

Los dímeros de insulina divulgados en el presente documento se forman entre un primero y segundo polipéptido de insulina en los que cada polipéptido de insulina comprende una cadena A y una cadena B. El primero y segundo polipéptidos de insulina pueden ser análogos de insulina de dos cadenas (es decir, en los que las cadenas A y B están unidas solamente mediante enlaces disulfuro intercatenarios entre residuos de cisteína internos) en los que el primero y segundo polipéptidos de insulina están unidos entre sí para formar el dímero mediante un enlace covalente, enlazador bifuncional, o usando química clic de cicloadición de alquino-azida catalizada por cobre(I) (CuAAC) o química clic libre de cobre para ligar restos de unión en las respectivas cadenas B. De acuerdo con una realización el primero y segundo polipéptidos de insulina están unidos entre sí mediante un enlazador bifuncional que conecta la cadena lateral de la lisina B28 o B29 de la cadena B del primer polipéptido de insulina con la cadena lateral del aminoácido B28 o B29 de la cadena B del segundo polipéptido de insulina.

En aspectos particulares de los agonistas parciales del receptor de insulina, el resto de unión puede ser un grupo opcionalmente sustituido seleccionado entre el grupo que consiste en acilo, alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo y heterocíclico. El resto de unión puede ser una cadena de hidrocarburo C1-C20 bivalente, lineal o ramificada, saturada o insaturada, opcionalmente sustituida en la que una o más unidades de metileno están remplazadas opcional e independientemente por -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)₂-, -N(R)SO₂-, SO₂N(R)-, un grupo heterocíclico, un grupo arilo, o un grupo heteroarilo, en el que cada aparición de R es independientemente hidrógeno, un grupo protector

adecuado, un resto acilo, resto arilalquilo, resto alifático, resto arilo, resto heteroarilo, o resto heteroalifático.

En una realización, el resto de unión comprende un enlazador PEG, un polímero lineal corto de aproximadamente 2 -25 unidades de etilenglicol o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 25 unidades de etilenglicol y opcionalmente uno o más aminoácidos. En aspectos particulares de los agonistas parciales del receptor de insulina, el enlazador PEG comprende la estructura (PEG)₂, (PEG)₃, (PEG)₄, (PEG)₅, (PEG)₆, (PEG)₇, (PEG)₈, (PEG)₉, (PEG)₁₀, (PEG)₁₁, (PEG)₁₂, (PEG)₁₃, (PEG)₁₄, (PEG)₁₅, (PEG)₁₆ o (PEG)₂₅. El enlazador PEG puede ser un enlazador bifuncional que puede conjugarse covalentemente o unirse covalentemente al grupo amino épsilon de los residuos de lisina de la posición B29 o B28 del primero y segundo polipéptidos de insulina. La estructura de un enlazador PEG bifuncional conjugado con el grupo amino épsilon de los grupos de lisina en la posición B29 o B28 del primero y segundo polipéptidos de insulina puede representarse por la siguiente fórmula general

15

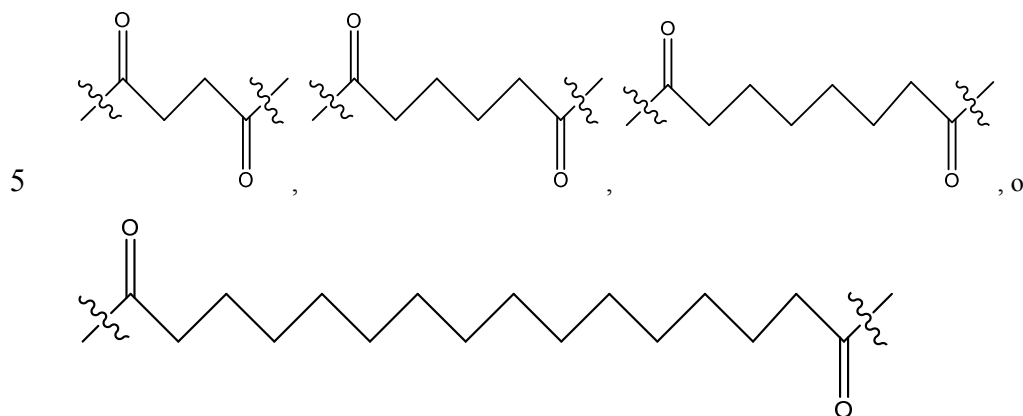
en la que $n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, \text{ o } 25$ y las líneas onduladas indican el enlace entre el enlazador y el grupo amino épsilon. Los procedimientos para conjugar PEG con el grupo amino épsilon de lisina se conocen bien en la técnica, véase por ejemplo, Veronese, Biomaterials 22: 405-417 (2001).

20

En aspectos particulares de los agonistas parciales del receptor de insulina, el resto de unión PEG que conjuga el grupo amino épsilon de la lisina en la posición B29 o B28 del primer polipéptido de insulina con el aminoácido épsilon de la lisina en la posición B29 o B28 del segundo polipéptido de insulina es

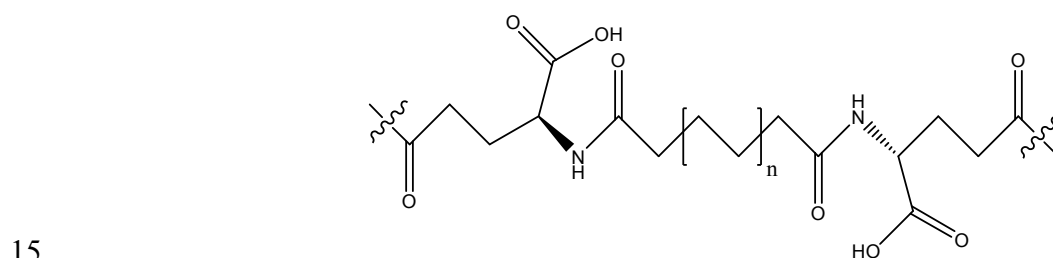
25

En aspectos particulares de los agonistas parciales del receptor de insulina, el resto de unión acilo que conjuga el grupo amino épsilon de la lisina en la posición B29 o B28 del primer polipéptido de insulina con el aminoácido épsilon de la lisina en la posición B29 o B28 del segundo polipéptido de insulina es



en los que las líneas onduladas indican el enlace entre el enlazador y el grupo amino épsilon de la lisina en la posición B29 o B28 de los polipéptidos de insulina.

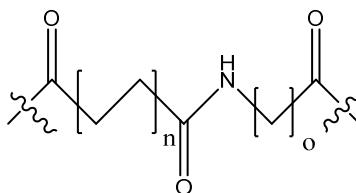
10 En aspectos particulares de los agonistas parciales del receptor de insulina, el enlazador acilo bifuncional puede incluir adicionalmente uno o dos aminoácidos en uno o ambos extremos del enlazador acilo. Por ejemplo, en aspectos particulares de los agonistas parciales del receptor de insulina, el aminoácido en uno o ambos extremos del enlazador es ácido gamma glutámico (γ E), que puede estar representado por la siguiente fórmula general



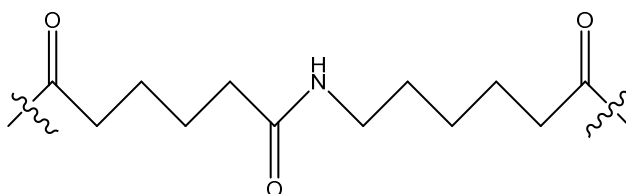
en la que $n=0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11$, o 12 y las líneas onduladas indican el enlace entre el enlazador y el grupo amino épsilon de la lisina en la posición B29 o B28 de los polipéptidos de insulina.

20 En otra realización, el resto de unión comprende un enlazador bifuncional decadena de alquilo que contiene amida puede conjugarse covalentemente o unirse

covalentemente al grupo amino épsilon de los residuos de lisina de la posición B29 o B28 del primero y segundo polipéptidos de insulina que puede estar representado por la siguiente fórmula general



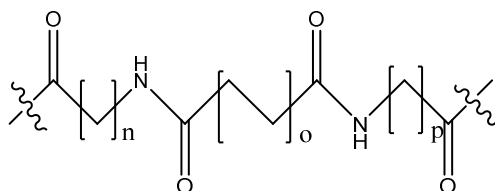
5 en la que $n=1$ o 2 , $o=1, 2, 3, 4$, o 5 y las líneas onduladas indican el enlace entre el enlazador y el grupo amino épsilon de la lisina en la posición B29 o B28 de los polipéptidos de insulina. En una realización particular, el resto de unión puede tener la estructura



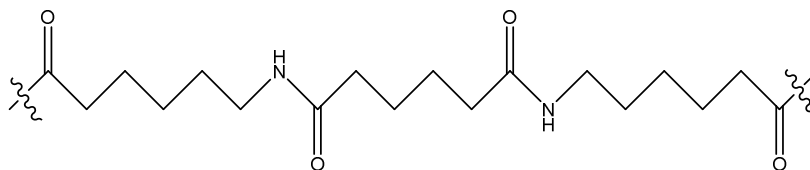
10 en la que las líneas onduladas indican el enlace entre el enlazador y el grupo amino épsilon de la lisina en la posición B29 o B28 de los polipéptidos de insulina.

En otra realización, el resto de unión comprende un enlazador bifuncional decadena de alquilo que contiene amida puede conjugarse covalentemente o unirse

15 covalentemente al grupo amino épsilon de los residuos de lisina de la posición B29 o B28 del primero y segundo polipéptidos de insulina que puede estar representado por la siguiente fórmula general



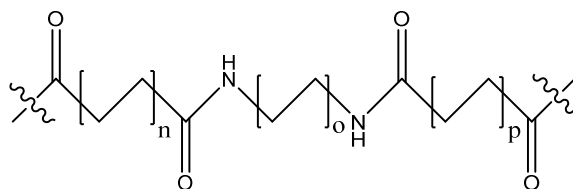
20 en la que $n=1, 2, 3, 4$, o 5 , $o=1$ o 2 , $p=1, 2, 3, 4$, o 5 y las líneas onduladas indican el enlace entre el enlazador y el grupo amino épsilon de la lisina en la posición B29 o B28 de los polipéptidos de insulina. En una realización particular, el resto de unión puede tener la estructura



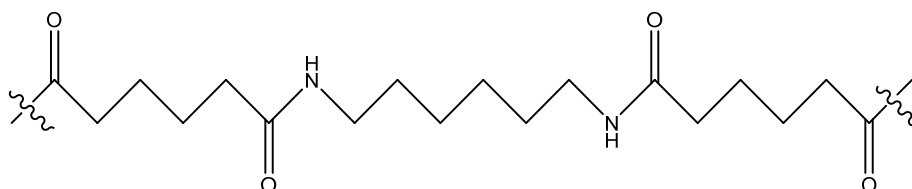
en la que las líneas onduladas indican el enlace entre el enlazador y el grupo amino épsilon de la lisina en la posición B29 o B28 de los polipéptidos de insulina.

En otra realización, el resto de unión comprende un enlazador bifuncional

- 5 decadena de alquilo que contiene amida puede conjugarse covalentemente o unirse covalentemente al grupo amino épsilon de los residuos de lisina de la posición B29 o B28 del primero y segundo polipéptidos de insulina que puede estar representado por la siguiente fórmula general



- 10 en la que $n=1$ o 2 , $o=1, 2$, o 3 , $p=1$ o 2 y las líneas onduladas indican el enlace entre el enlazador y el grupo amino épsilon de la lisina en la posición B29 o B28 de los polipéptidos de insulina. En una realización particular, el resto de unión puede tener la estructura



- 15 en la que las líneas onduladas indican el enlace entre el enlazador y el grupo amino épsilon de la lisina en la posición B29 o B28 de los polipéptidos de insulina.

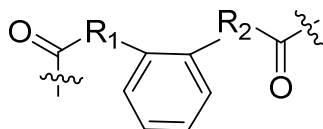
- En realizaciones particulares, el resto de unión comprende una estructura de anillo, que proporciona rigidez al resto de unión. En realizaciones particulares, la estructura de anillo comprende un grupo bencilo o un grupo alicíclico saturado o insaturado que tiene 3, 4, 5, 6, 7, u 8 carbonos. En realizaciones particulares, el grupo alicíclico comprende a ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclopentil, o ciclooctilo. En realizaciones particulares, el grupo alicíclico insaturado (cicloalcano) comprende un grupo ciclopropenilo, ciclobutenilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo, cicloheptenilo, o ciclooctenilo. En realizaciones particulares, la
- 20

estructura de anillo puede comprender adicionalmente una o más cadenas laterales alifáticas saturadas o insaturadas. En realizaciones particulares, la estructura de anillo puede comprender adicionalmente una o más cadenas laterales alifáticas que comprende uno o más heteroátomos. En realizaciones particulares, el heteroátomo es O, S, o N.

5 En realizaciones particulares, la estructura de anillo comprende un heteroátomo. En realizaciones particulares, el heteroátomo puede ser O, S, o N. En realizaciones particulares, la estructura de anillo comprende un grupo bencilo o un grupo alicíclico saturado o insaturado que tiene 3, 4, 5, 6, 7, o 8 carbonos en que uno o más carbonos están sustituidos con un heteroátomo seleccionado de N, O, y S. Los ejemplos de estructuras de anillo que incluyen un

10 heteroátomo incluyen, pero no están limitadas a óxido de etileno, etilenimina, trimetilóxido, furano, tetrahydrofurano, tiofeno, pirrolidina, pirano, piperidina, imidazol, tiazol, dioxano, morfolina, pirimidina, triazol, tietano, 1,3-diazetina, 2,3-dihidroazeto, 1,2-oxatolano, isoxazol, oxazol, silol, oxepano, tiepina, 3, 4, 5, 6-tetrahydro-2H-azepina, 1,4-tiazepina, azocano, y tiocano.

15 En otra realización, el resto de unión comprende un enlazador bifuncional que puede conjugarse o unirse covalentemente a un grupo amino épsilon de los residuos de lisina en la posición B29 o B28 de los primer y segundo polipéptidos de insulina que pueden estar representados por un benceno-1,1 diacilo que tiene la siguiente fórmula general

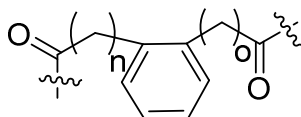


20 en la que R₁ y R₂ pueden ser iguales o diferentes en la que R₁ y R₂ son independientemente un enlace, una cadena de alquilo C1-C20 o C1-C6 saturado o no saturado en la que una o más unidades de metileno están remplazadas opcional e independientemente por -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)₂-, -N(R)SO₂-, SO₂N(R)-, un

25 grupo heterocíclico, un grupo arilo, o un grupo heteroarilo, en la que cada aparición de R es independientemente hidrógeno, un grupo protector adecuado, un resto acilo, resto arilalquilo, resto alifático, resto arilo, resto heteroarilo, o resto heteroalifático, cadena de poli(etilenglicol) (PEG) PEG)₂, (PEG)₃, (PEG)₄, (PEG)₅, (PEG)₆, (PEG)₇, (PEG)₈, (PEG)₉, (PEG)₁₀, (PEG)₁₁,

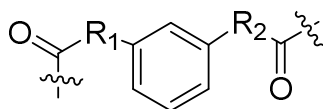
(PEG)₁₂, (PEG)₁₃, (PEG)₁₄, (PEG)₁₅, (PEG)₁₆, o (PEG)₂ y en la que las líneas onduladas indican el enlace entre el enlazador y el grupo amino épsilon de la lisina en la posición B29 o B28 de los polipéptidos de insulina.

En otra realización, el resto de unión comprende un enlazador bifuncional que puede conjugarse o unirse covalentemente al grupo amino épsilon de los residuos de lisina en la posición B29 o B28 de los primer y segundo polipéptidos de insulina que pueden estar representados por un benceno-1,1 diacilo que tiene la siguiente fórmula general



en la que n y o son independientemente 0, 1, 2, 3, 4, o 5 en la que las líneas onduladas indican el enlace entre el enlazador y el grupo amino épsilon de la lisina en la posición B29 o B28 de los polipéptidos de insulina.

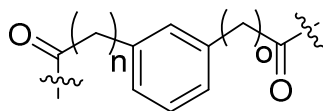
En otra realización, el resto de unión comprende un enlazador bifuncional que puede conjugarse o unirse covalentemente al grupo amino épsilon de los residuos de lisina en la posición B29 o B28 de los primer y segundo polipéptidos de insulina que pueden estar representados por un benceno-1,3 diacilo que tiene la siguiente fórmula general



en la que R₁ y R₂ pueden ser iguales o diferentes en la que R₁ y R₂ son independientemente un enlace, una cadena de alquilo C1-C20 o C1-C6 saturado o no saturado en la que una o más unidades de metileno están remplazadas opcional e independientemente por -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)₂-, -N(R)SO₂-, SO₂N(R)-, un grupo heterocíclico, un grupo arilo, o un grupo heteroarilo, en la que cada aparición de R es independientemente hidrógeno, un grupo protector adecuado, un resto acilo, resto arilalquilo, resto alifático, resto arilo, resto heteroarilo, o resto heteroalifático, cadena de poli(etilenglicol) (PEG) PEG)₂, (PEG)₃, (PEG)₄, (PEG)₅, (PEG)₆, (PEG)₇, (PEG)₈, (PEG)₉, (PEG)₁₀, (PEG)₁₁, (PEG)₁₂, (PEG)₁₃, (PEG)₁₄, (PEG)₁₅, (PEG)₁₆, o (PEG)₂ y en la que las líneas onduladas

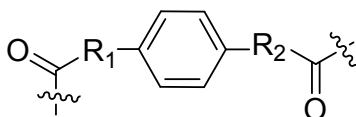
indican el enlace entre el enlazador y el grupo amino épsilon de la lisina en la posición B29 o B28 de los polipéptidos de insulina.

En otra realización, el resto de unión comprende un enlazador bifuncional que puede conjugarse o unirse covalentemente al grupo amino épsilon de los residuos de lisina en la posición B29 o B28 de los primer y segundo polipéptidos de insulina que pueden estar representados por un benceno-1,3 diacilo que tiene la siguiente fórmula general



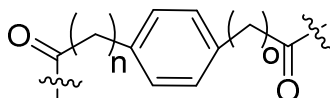
en la que n y o son independientemente 0, 1, 2, 3, 4, o 5 en la que las líneas onduladas indican el enlace entre el enlazador y el grupo amino épsilon de la lisina en la posición B29 o B28 de los polipéptidos de insulina.

En otra realización, el resto de unión comprende un enlazador bifuncional que puede conjugarse o unirse covalentemente al grupo amino épsilon de los residuos de lisina en la posición B29 o B28 de los primer y segundo polipéptidos de insulina que pueden estar representados por un benceno-1,4 diacilo que tiene la siguiente fórmula general



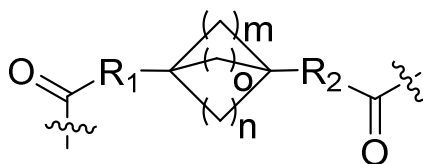
en la que R₁ y R₂ pueden ser iguales o diferentes en la que R₁ y R₂ son independientemente un enlace, una cadena de alquilo C1-C20 o C1-C6 saturado o no saturado en la que una o más unidades de metileno están remplazadas opcional e independientemente por -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)₂-, -N(R)SO₂-, SO₂N(R)-, un grupo heterocíclico, un grupo arilo, o un grupo heteroarilo, en la que cada aparición de R es independientemente hidrógeno, un grupo protector adecuado, un resto acilo, resto arilalquilo, resto alifático, resto arilo, resto heteroarilo, o resto heteroalifático, cadena de poli(etilenglicol) (PEG) PEG)₂, (PEG)₃, (PEG)₄, (PEG)₅, (PEG)₆, (PEG)₇, (PEG)₈, (PEG)₉, (PEG)₁₀, (PEG)₁₁, (PEG)₁₂, (PEG)₁₃, (PEG)₁₄, (PEG)₁₅, (PEG)₁₆, o (PEG)₂ y en la que las líneas onduladas indican el enlace entre el enlazador y el grupo amino épsilon de la lisina en la posición B29 o B28 de los polipéptidos de insulina.

En otra realización, el resto de unión comprende un enlazador bifuncional que puede conjugarse o unirse covalentemente al grupo amino épsilon de los residuos de lisina en la posición B29 o B28 de los primer y segundo polipéptidos de insulina que pueden estar representados por un benceno-1,4 diacilo que tiene la siguiente fórmula general



en la que n y o son independientemente 0, 1, 2, 3, 4, o 5 en la que las líneas onduladas indican el enlace entre el enlazador y el grupo amino épsilon de la lisina en la posición B29 o B28 de los polipéptidos de insulina.

En otra realización, el resto de unión comprende un enlazador bifuncional que puede conjugarse o unirse covalentemente al grupo amino épsilon de los residuos de lisina en la posición B29 o B28 de los primer y segundo polipéptidos de insulina que pueden estar representados por un benceno-1,3 diacilo que tiene la siguiente fórmula general

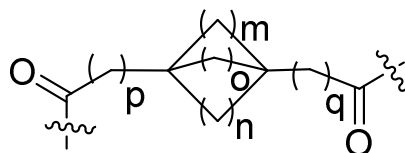


en la que m, n, y o son cada una independientemente 1 o 2; R₁ y R₂ pueden ser iguales o

diferentes en la que R₁ y R₂ son independientemente un enlace, una cadena de alquilo C1-C20 o C1-C6 saturado o no saturado en la que una o más unidades de metileno están remplazadas opcional e independientemente por -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)₂-, -N(R)SO₂-, SO₂N(R)-, un grupo heterocíclico, un grupo arilo, o un grupo heteroarilo, en la que cada aparición de R es independientemente hidrógeno, un grupo protector adecuado, un resto acilo, resto arilalquilo, resto alifático, resto arilo, resto heteroarilo, o resto heteroalifático, cadena de poli(etilenglicol) (PEG) PEG₂, (PEG)₃, (PEG)₄, (PEG)₅, (PEG)₆, (PEG)₇, (PEG)₈, (PEG)₉, (PEG)₁₀, (PEG)₁₁, (PEG)₁₂, (PEG)₁₃, (PEG)₁₄, (PEG)₁₅, (PEG)₁₆, o (PEG)₂ y en la que las líneas onduladas indican el enlace entre el enlazador y el grupo amino épsilon de la lisina en la posición B29 o B28 de los polipéptidos de insulina.

En otra realización, el resto de unión comprende un enlazador bifuncional que puede conjugarse o unirse covalentemente al grupo amino épsilon de los residuos de lisina en la

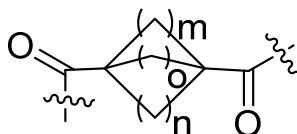
posición B29 o B28 de los primer y segundo polipéptidos de insulina que pueden estar representados por un benceno-1,3 diacilo que tiene la siguiente fórmula general



en la que m, n, y o son cada una independientemente 1 o 2; en la que p y q son

5 independientemente 0, 1, 2, 3, 4, o 5 en la que las líneas onduladas indican el enlace entre el enlazador y el grupo amino épsilon de la lisina en la posición B29 o B28 de los polipéptidos de insulina.

En otra realización, el resto de unión comprende un enlazador bifuncional que puede conjugarse o unirse covalentemente al grupo amino épsilon de los residuos de lisina en la posición B29 o B28 de los primer y segundo polipéptidos de insulina que pueden estar representados por un benceno-1,3 diacilo que tiene la siguiente fórmula general



15 en la que m, n, y o son cada una independientemente 1 o 2; en la que las líneas onduladas indican el enlace entre el enlazador y el grupo amino épsilon de la lisina en la posición B29 o B28 de los polipéptidos de insulina.

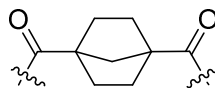
En otra realización, el resto de unión comprende un enlazador bifuncional que puede conjugarse o unirse covalentemente al grupo amino épsilon de los residuos de lisina en la posición B29 o B28 de los primer y segundo polipéptidos de insulina que pueden estar representados por un ciclohexano-1,4 diacilo que tiene la siguiente fórmula general



20 y en la que las líneas onduladas indican el enlace entre el enlazador y el grupo amino épsilon de la lisina en la posición B29 o B28 de los polipéptidos de insulina.

En otra realización, el resto de unión comprende un enlazador bifuncional que puede conjugarse o unirse covalentemente al grupo amino épsilon de los residuos de lisina en la

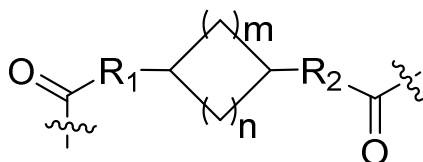
posición B29 o B28 de los primer y segundo polipéptidos de insulina que pueden estar representados por un ciclohexano-1,4 diacilo que tiene la siguiente fórmula general



- 5 y en la que las líneas onduladas indican el enlace entre el enlazador y el grupo amino épsilon de la lisina en la posición B29 o B28 de los polipéptidos de insulina.

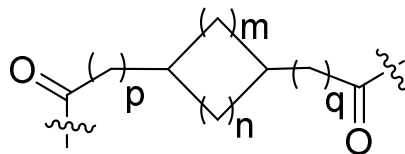
En otra realización, el resto de unión comprende un enlazador bifuncional que puede conjugarse o unirse covalentemente al grupo amino épsilon de los residuos de lisina en la posición B29 o B28 de los primer y segundo polipéptidos de insulina que pueden estar

- 10 representados por un benceno-1,3 diacilo que tiene la siguiente fórmula general



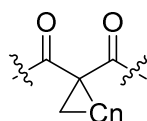
- en la que m y n son cada una independientemente 0, 1, o 2 con la condición de que tanto m como n no sean 0; R₁ y R₂ pueden ser iguales o diferentes en la que R₁ y R₂ son independientemente un enlace, una cadena de alquilo C1-C20 o C1-C6 saturado o no saturado en la que una o más unidades de metileno están remplazadas opcional e independientemente por -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)₂-, -N(R)SO₂-, SO₂N(R)-, un grupo heterocíclico, un grupo arilo, o un grupo heteroarilo, en la que cada aparición de R es independientemente hidrógeno, un grupo protector adecuado, un resto acilo, resto arilalquilo, resto alifático, resto arilo, resto heteroarilo, o resto heteroalifático, cadena de poli(etilenglicol) (PEG) PEG)₂, (PEG)₃, (PEG)₄, (PEG)₅, (PEG)₆, (PEG)₇, (PEG)₈, (PEG)₉, (PEG)₁₀, (PEG)₁₁, (PEG)₁₂, (PEG)₁₃, (PEG)₁₄, (PEG)₁₅, (PEG)₁₆, o (PEG)₂ y en la que las líneas onduladas indican el enlace entre el enlazador y el grupo amino épsilon de la lisina en la posición B29 o B28 de los polipéptidos de insulina.

- 25 En otra realización, el resto de unión comprende un enlazador bifuncional que puede conjugarse o unirse covalentemente al grupo amino épsilon de los residuos de lisina en la posición B29 o B28 de los primer y segundo polipéptidos de insulina que pueden estar representados por un benceno-1,3 diacilo que tiene la siguiente fórmula general

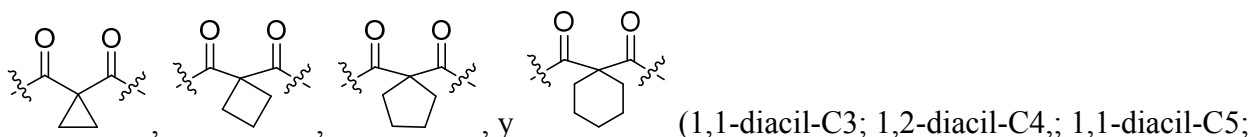


en la que m y n son cada una independientemente 1 o 2; en la que p y q son independientemente 0, 1, 2, 3, 4, o 5 en la que las líneas onduladas indican el enlace entre el enlazador y el grupo amino épsilon de la lisina en la posición B29 o B28 de los polipéptidos de insulina.

- 5 En otra realización, el resto de unión comprende un enlazador bifuncional que puede conjugarse o unirse covalentemente al grupo amino épsilon de los residuos de lisina en la posición B29 o B28 de los primer y segundo polipéptidos de insulina que pueden estar representados por un 1,1 diacilo que tiene la siguiente fórmula general

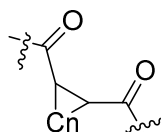


- 10 en la que n es 1, 2, 3, o 4 en la que las líneas onduladas indican el enlace entre el enlazador y el grupo amino épsilon de la lisina en la posición B29 o B28 de los polipéptidos de insulina. En realizaciones específicas, el 1,1 diacilo puede tener una estructura seleccionada de

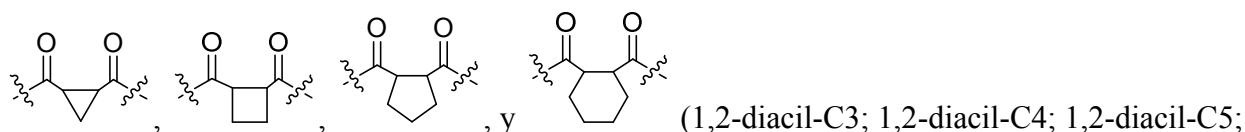


- 15 en la que las líneas onduladas indican el enlace entre el enlazador y el grupo amino épsilon de la lisina en la posición B29 o B28 de los polipéptidos de insulina.

- 20 En otra realización, el resto de unión comprende un enlazador bifuncional que puede conjugarse o unirse covalentemente al grupo amino épsilon de los residuos de lisina en la posición B29 o B28 de los primer y segundo polipéptidos de insulina que pueden estar representados por un 1,2 diacilo que tiene la siguiente fórmula general

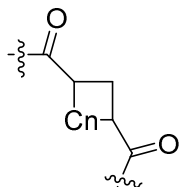


en la que n es 1, 2, 3, o 4 en la que las líneas onduladas indican el enlace entre el enlazador y el grupo amino épsilon de la lisina en la posición B29 o B28 de los polipéptidos de insulina. En realizaciones específicas, el 1,2 diacilo puede tener una estructura seleccionada de

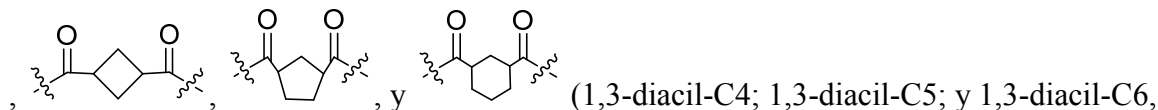


y 1,2-diacil-C6, respectivamente) en la que las líneas onduladas indican el enlace entre el enlazador y el grupo amino épsilon de la lisina en la posición B29 o B28 de los polipéptidos de insulina.

- 5 En otra realización, el resto de unión comprende un enlazador bifuncional que puede conjugarse o unirse covalentemente al grupo amino épsilon de los residuos de lisina en la posición B29 o B28 de los primer y segundo polipéptidos de insulina que pueden estar representados por un 1,3 diacilo que tiene la siguiente fórmula general

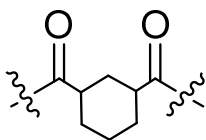


- 10 en la que n es 1, 2, o 3 en la que las líneas onduladas indican el enlace entre el enlazador y el grupo amino épsilon de la lisina en la posición B29 o B28 de los polipéptidos de insulina. En realizaciones específicas, el 1,3 diacilo puede tener una estructura seleccionada de



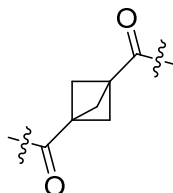
- respectivamente) en la que las líneas onduladas indican el enlace entre el enlazador y el grupo amino épsilon de la lisina en la posición B29 o B28 de los polipéptidos de insulina.

- 15 En otra realización, el resto de unión comprende un enlazador bifuncional que puede conjugarse o unirse covalentemente al grupo amino épsilon de los residuos de lisina en la posición B29 o B28 de los primer y segundo polipéptidos de insulina que pueden estar representados por un 1,4 diacilo que tiene la siguiente fórmula general



- 20 (1,4-diacil-C6) en la que las líneas onduladas indican el enlace entre el enlazador y el grupo amino épsilon de la lisina en la posición B29 o B28 de los polipéptidos de insulina.

En otra realización, el resto de unión comprende un enlazador bifuncional que puede conjugarse o unirse covalentemente al grupo amino épsilon de los residuos de lisina en la posición B29 o B28 de los primer y segundo polipéptidos de insulina que pueden estar representados por un ciclobutil-1,3 diacilo que tiene la siguiente fórmula general



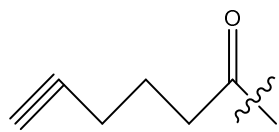
y en la que las líneas onduladas indican el enlace entre el enlazador y el grupo amino épsilon de la lisina en la posición B29 o B28 de los polipéptidos de insulina.

En un aspecto adicional de la presente invención, el primero y segundo polipéptidos de insulina pueden conjugarse juntos usando cicloadición de Huisgen de azida-alquino catalizada por cobre (CuAAC), en particular química clic CuAAC. En este aspecto, el grupo amino épsilon de la lisina B29 o B28 del primer polipéptido de insulina se conjuga con un resto enlazador que tiene un extremo proximal y un extremo distal en el que el extremo proximal del resto enlazador se conjuga con el grupo amino épsilon y el distal comprende un grupo azida. En este aspecto, el grupo amino épsilon de la lisina B29 o B28 del segundo polipéptido de insulina se conjuga con un resto enlazador que tiene un extremo proximal y un extremo distal en el que el extremo proximal del resto enlazador se conjuga con el grupo amino épsilon y el distal comprende un grupo alquino. En presencia de Cu^{2+} y un agente reductor, los grupos azida y alquino formarán un resto contiguo de unión que comprende un resto triazol. Véase la patente de Estados Unidos N.º: 8.129.542, que se incorpora en el presente documento en su totalidad, para una descripción de la química clic CuAAC.

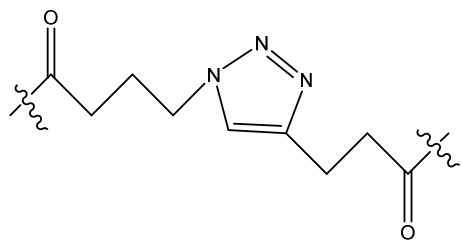
En aspectos particulares de los agonistas parciales del receptor de insulina, el primer polipéptido de insulina puede haber conjugado con el grupo amino épsilon de la lisina B29 o B28 un enlazador que tiene la fórmula



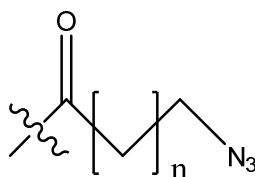
y el segundo polipéptido de insulina puede haber conjugado con el grupo amino épsilon de la lisina B29 o B28 un enlazador que tiene la fórmula



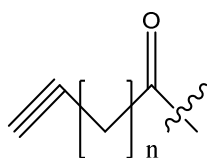
. En presencia de Cu^{2+} y un agente reductor, los enlazadores se combinan para proporcionar un resto de unión que tiene la estructura



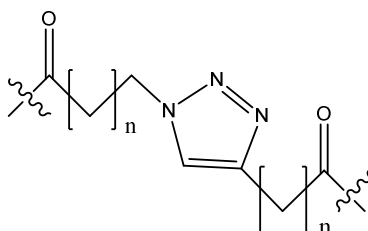
- 5 En aspectos particulares de los agonistas parciales del receptor de insulina, el primer polipéptido de insulina puede haber conjugado con el grupo amino épsilon de la lisina B29 o B28 un enlazador que tiene la fórmula



- 10 en la que $n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$, o 10 y el segundo polipéptido de insulina puede haber conjugado con el grupo amino épsilon de la lisina B29 o B28 un enlazador que tiene la fórmula

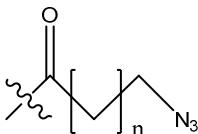


en la que $n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$, o 10. En presencia de Cu^{2+} y un agente reductor, los enlazadores se combinan para proporcionar un resto de unión que tiene la estructura



- 15 en la que cada n es independientemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10.

En un aspecto adicional, tanto el primer polipéptido de insulina como el segundo polipéptido de insulina pueden haber conjugado con su respectivo grupo amino épsilon de la lisina B29 o B28 un enlazador que tiene la fórmula

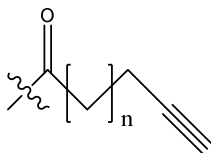


- 5 en la que cada n es independientemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10. La conjugación de los enlazadores para formar un resto de unión puede conseguirse proporcionando una molécula que tiene una estructura (enlazador en puente o intermedio)



- 10 en la que R es un enlace covalente, un átomo de carbono, un fenilo, un heteroátomo, o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado entre el grupo que consiste en acilo, alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo y heterocíclico. En aspectos particulares R es un grupo acilo C2, C3, C4, C6, C7, C8, C9 o C10 o un PEG2, PEG3, PEG4, PEG5, PEG6, PEG7, PEG8, PEG9, PEG10, PEG11, PEG12, PEG13 o PEG25.

- 15 En un aspecto adicional, tanto el primer polipéptido de insulina como el segundo polipéptido de insulina pueden haber conjugado con su respectivo grupo amino épsilon de la lisina B29 o B28 un enlazador que tiene la fórmula



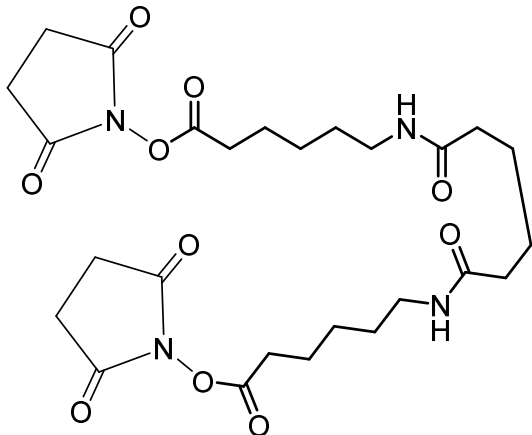
- 20 en la que cada n es independientemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10. La conjugación de los enlazadores para formar un resto de unión puede conseguirse proporcionando una molécula que tiene una estructura (enlazador en puente o intermedio)

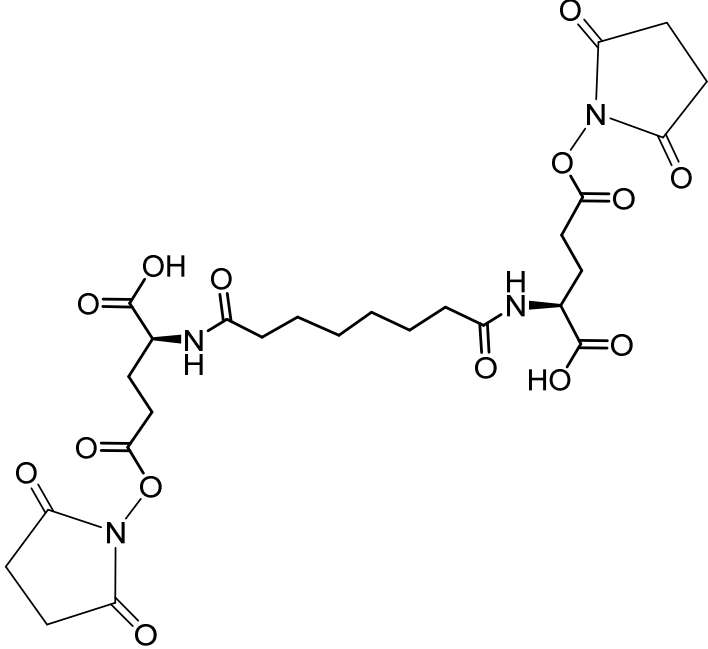
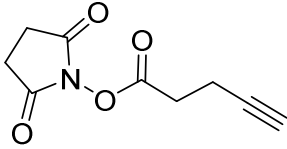
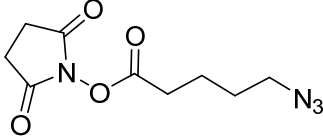
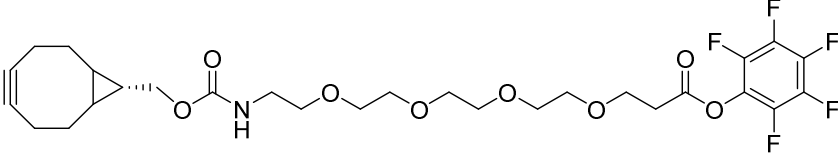
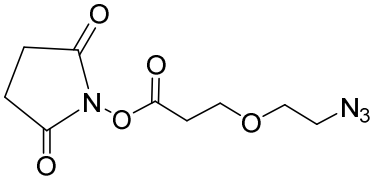


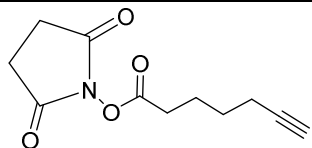
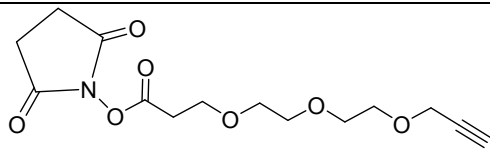
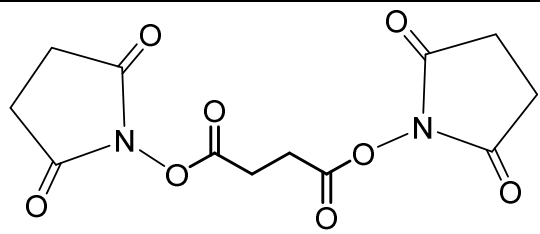
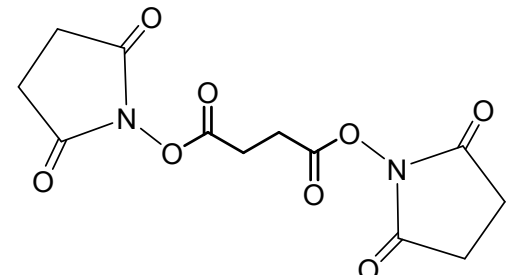
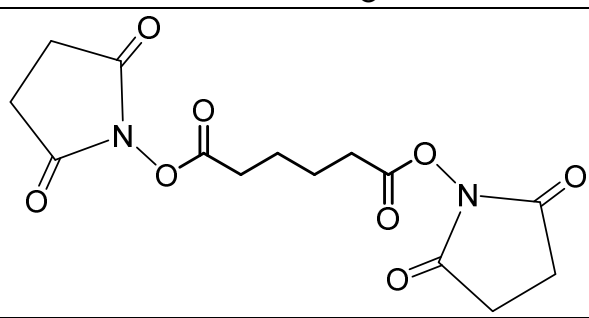
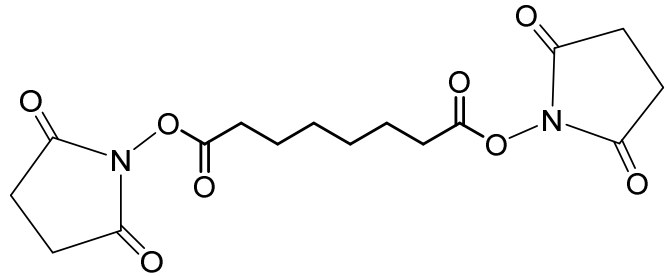
- 25 en la que R es un enlace covalente, un átomo de carbono, un fenilo, un heteroátomo, o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado entre el grupo que consiste en acilo, alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo y heterocíclico. En aspectos particulares R es un grupo acilo C2, C3, C4, C6, C7, C8, C9 o C10 o un PEG2, PEG3, PEG4, PEG5, PEG6, PEG7, PEG8, PEG9, PEG10, PEG11, PEG12, PEG13 o PEG 25.

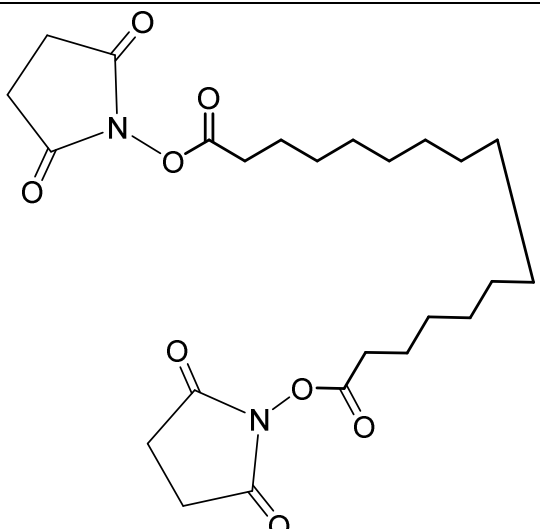
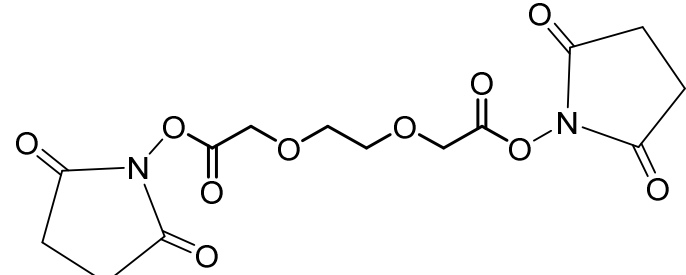
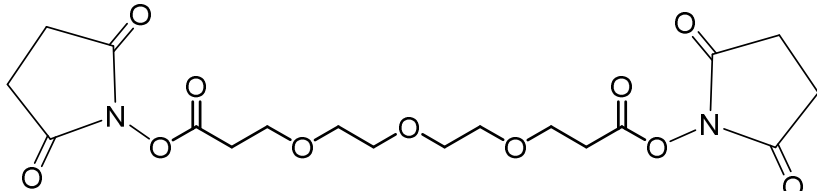
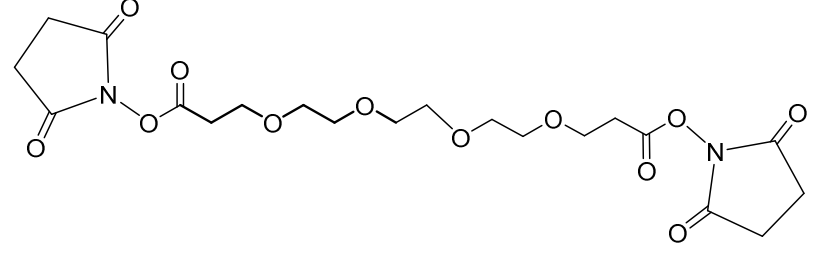
En aspectos particulares, el primer polímero de insulina se conjuga en el grupo amino épsilon de la lisina B29 o B28 con un enlazador terminado en azida como anteriormente y el segundo polipéptido de insulina se conjuga en el grupo amino épsilon de la lisina B29 o B28 con un enlazador terminado con un resto ciclooctino y los enlazadores se conjugan para formar un resto de unión usando química clic de cicloadición sin cobre. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º: 7.807.619, que se incorpora en el presente documento en su totalidad.

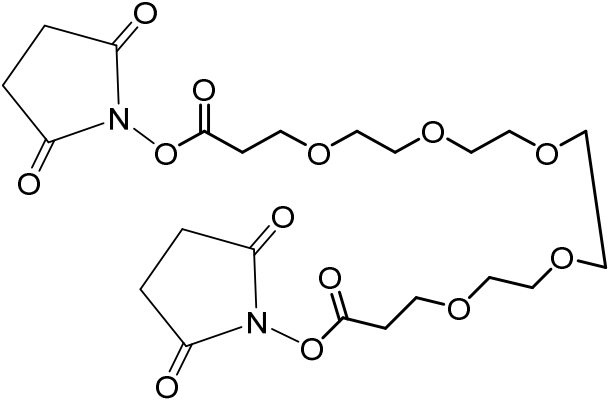
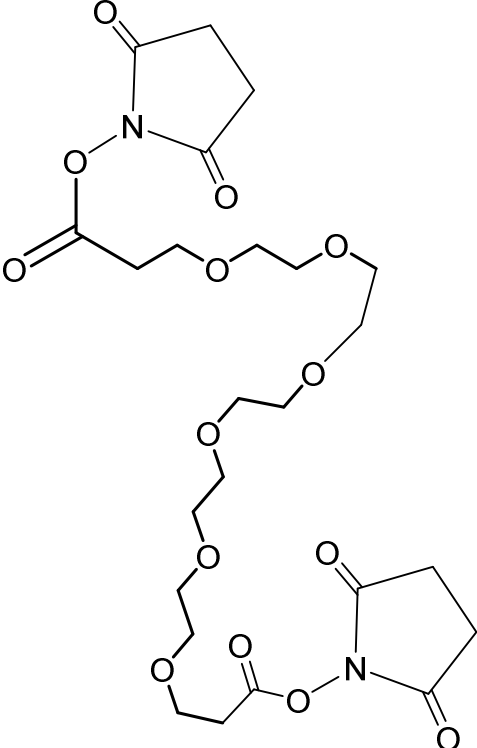
La siguiente tabla muestra enlazadores ejemplares, que se pueden usar para construir los dímeros de la presente invención. Los dímeros mostrados comprenden grupos 2,5-dioxopirrolidinilo para conjugar el grupo amino épsilon de la lisina B29 o B29.

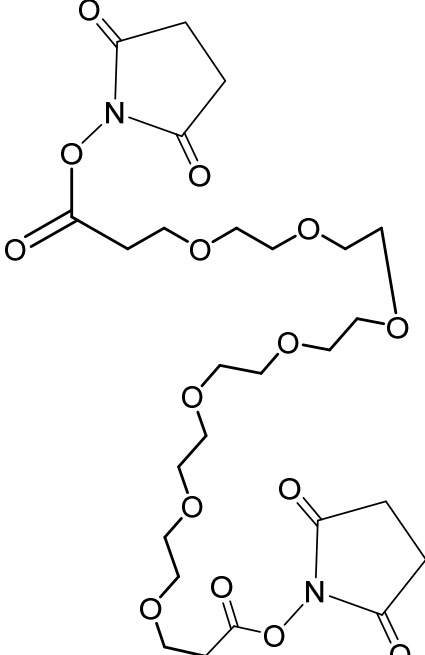
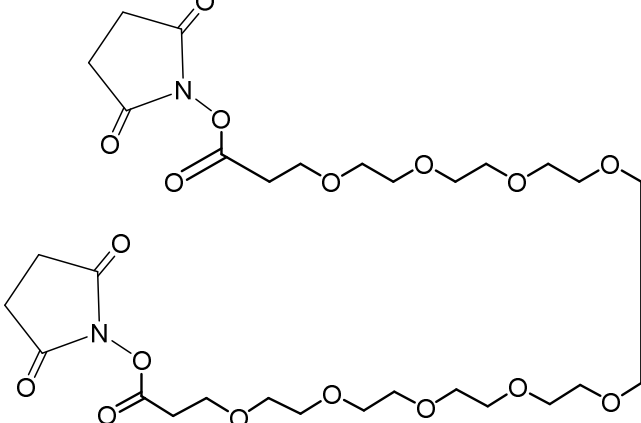
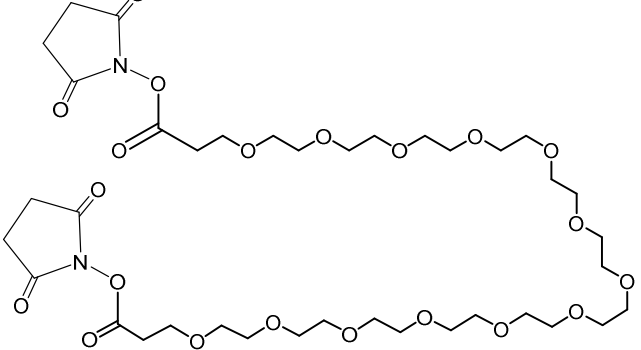
Tabla de Enlazadores		
	Enlazador	Nombre
1	clic	C6+Nc6
2		C6N+C6+NC 6

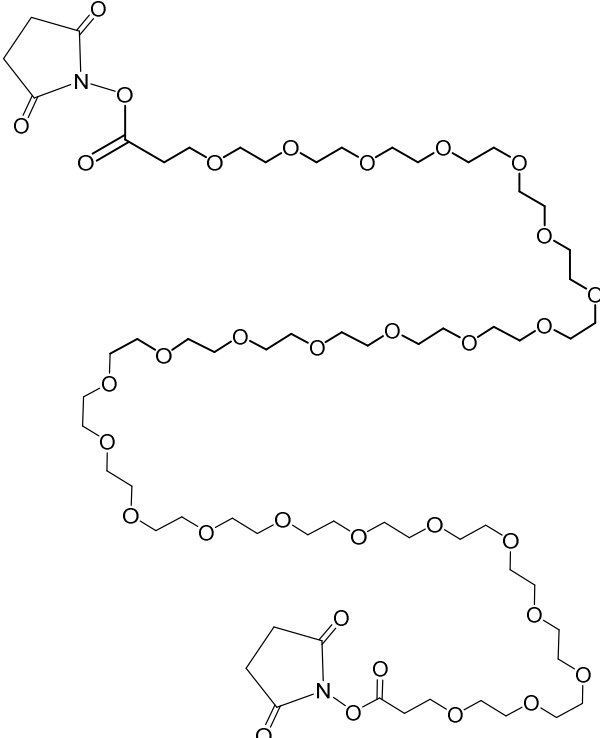
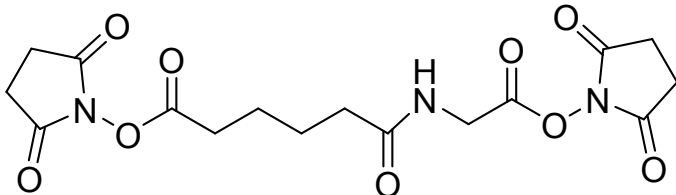
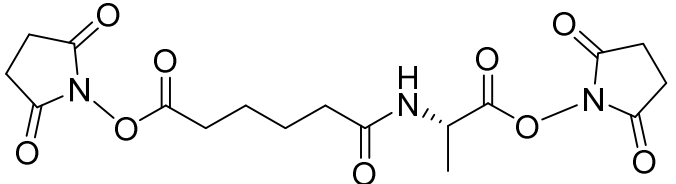
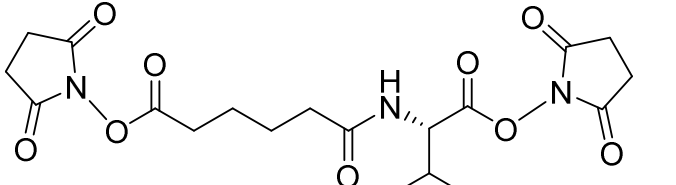
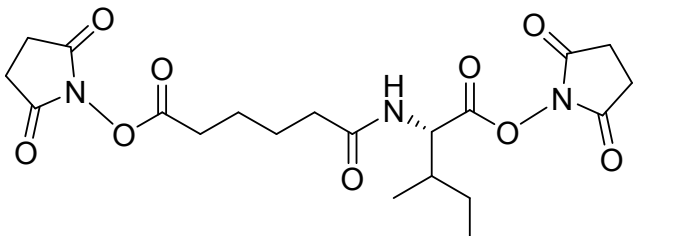
3		γ E-C8- γ E
4		Clic-1
5		Clic-2
6		Clic-3
7		Clic-4

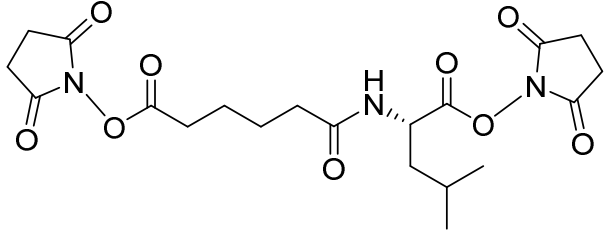
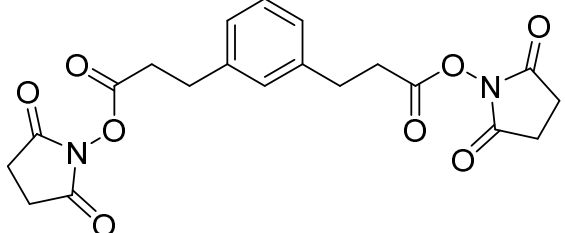
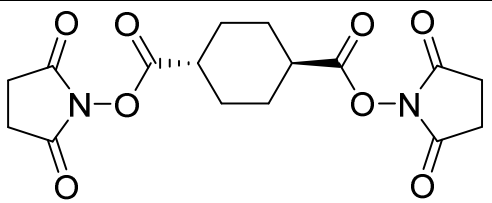
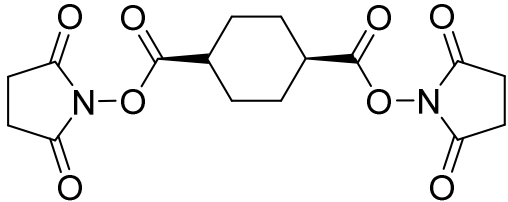
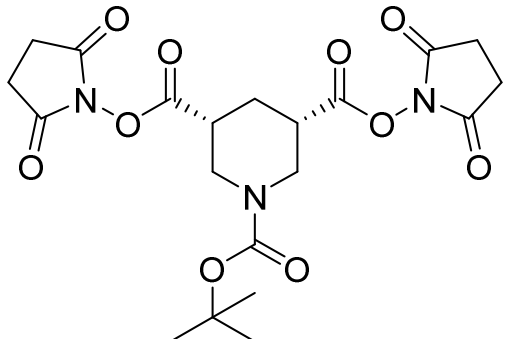
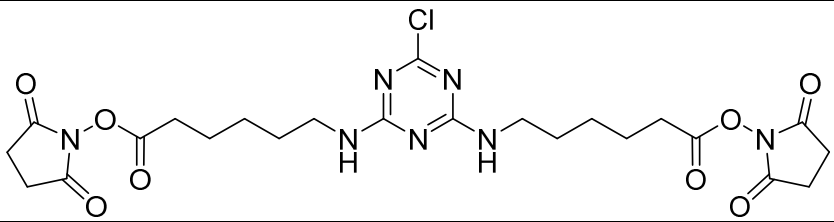
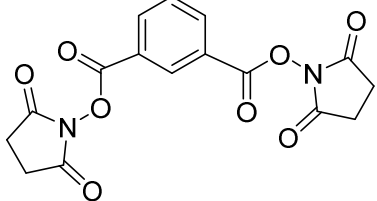
8		Clic-5
9		Clic-6
10		C2
11		C4
12		C6
13		C8

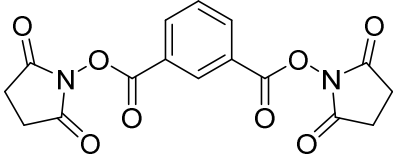
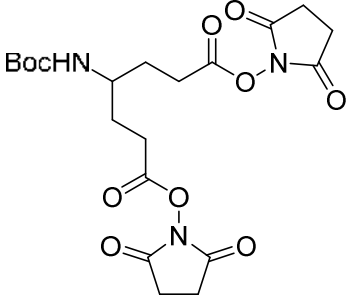
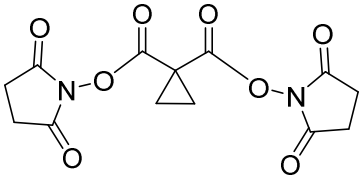
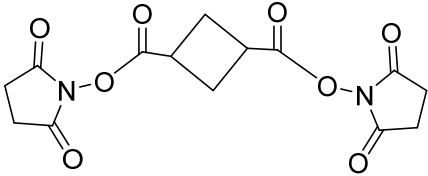
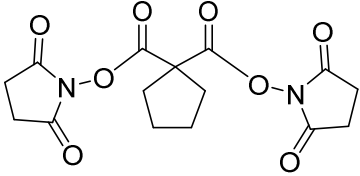
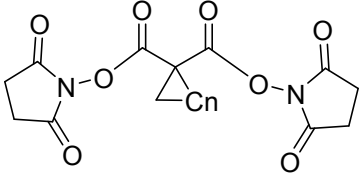
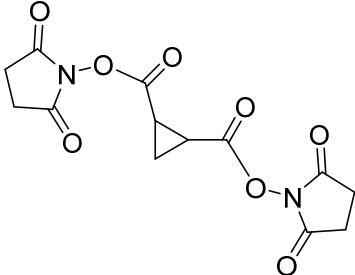
14		C16
15		PEG2
16		PEG3
17		PEG4

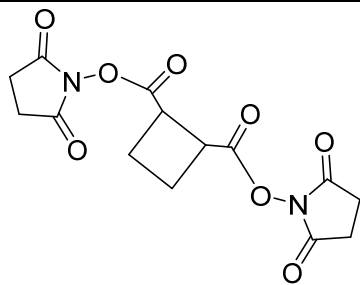
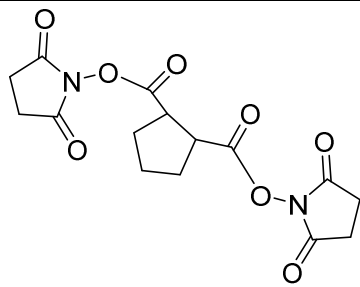
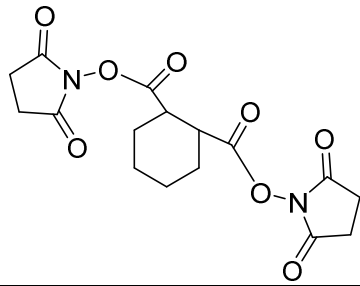
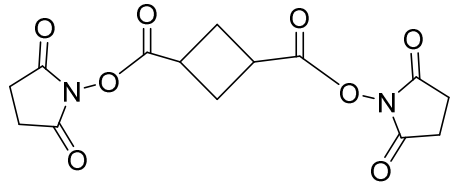
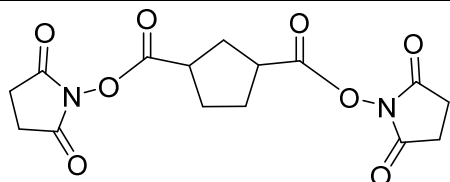
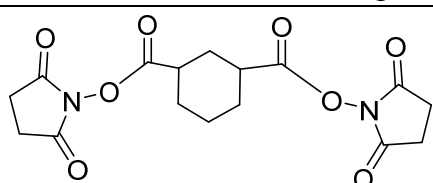
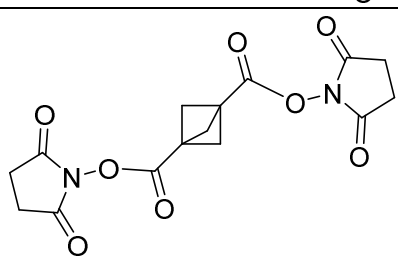
18		PEG5
19		PEG6

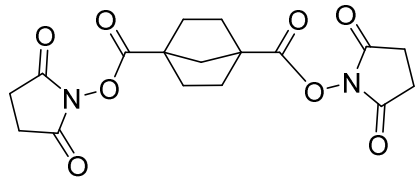
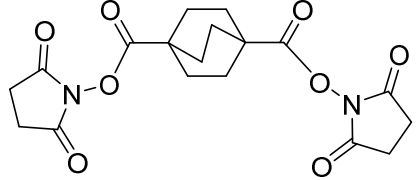
20		PEG7
21		PEG9
22		PEG13

23		PEG25
24		C6-glicina
25		C6-alanina
26		C6-isoleucina
27		C6-leucina

28		C6-valina
29		Dipropilfenol
30		Trans-ciclohexano 1,4-diácido
31		Cis-ciclohexano 1,4-diácido
32		Terc-butil-piperidin-tricarb
33		C6N-cloro-1,3,5-triazin-NC6
34		Tereftalato

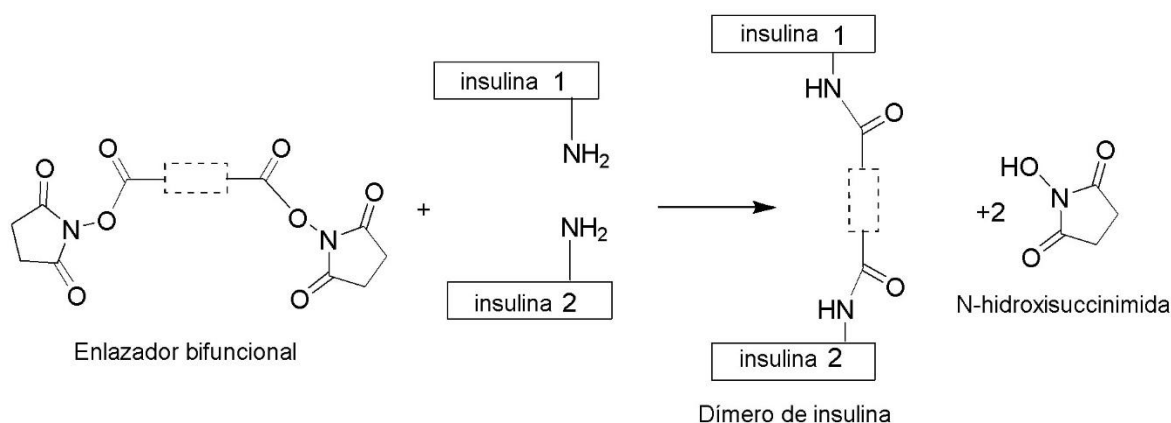
35		isofthalato
36		Heptanodi-oato
37		1,1-diacil-C3
38		1,1-diacil-C4
39		1,1-diacil-C5
40	 n=1,2,3,or 4	1,1-diacil-C6
41		1,2-diacil-C3

42		1,2-diacil-C4
43		1,2-diacil-C5
44		1,2-diacil-C6
45		1,3-diacil-C4
46		1,3-diacil-C5
47		1,3-diacil-C6
48		1,4-diacil-ciclobutil-C1

49		1,4-ciclohexil-C1
50		1,4-ciclohexil-C2

La conjugación de un enlazador bifuncional al grupo amino épsilon del residuo de lisina en la posición B29 o B28 del polipéptido de cadena B de dos moléculas de insulina o análogo de insulina para formar el dímero de insulina unido por un resto de unión se puede mostrar

5 esquemáticamente como



en la que las moléculas de insulina 1 e insulina 2 pueden ser iguales o diferentes y el enlazador bifuncional y resto de unión y resultante tras la conjugación puede tener la estructura de cualquier enlazador y resto de unión resultante divulgados en el presente documento.

Modificación de polipéptidos de insulina

En algunas realizaciones, al menos uno de los polipéptidos de cadena A o polipéptidos de cadena B del agonista parcial del receptor de insulina se modifica para comprender un grupo acilo. El grupo acilo puede unirse covalentemente de forma directa a un aminoácido del polipéptido de insulina, o de forma indirecta a un aminoácido del polipéptido de

insulina mediante un espaciador, en el que el espaciador se posiciona entre el aminoácido del polipéptido de insulina y el grupo acilo. El polipéptido de insulina puede acilarse en la misma posición de aminoácido donde se une un resto hidrófilo, o en una posición diferente de aminoácido. Por ejemplo, la acilación puede suceder en cualquier posición incluyendo cualquier aminoácido de los polipéptidos de cadena A o B así como una posición dentro del resto de unión, con la condición de que la actividad mostrada por el polipéptido de insulina no acilado se retenga tras la acilación. Ejemplos no limitantes incluyen acilación en la posición A1 de la cadena A y la posición B1 de la cadena B.

En un aspecto específico de la invención, el primero y/o segundo polipéptido de insulina (o derivado o conjugado del mismo) se modifica para comprender un grupo acilo por acilación directa de una amina, hidroxilo, o tiol de una cadena lateral de un aminoácido del polipéptido de insulina. En algunas realizaciones, el primero y/o segundo polipéptido de insulina se acila directamente a través de la amina, hidroxilo o tiol de cadena lateral de un aminoácido. A este respecto, puede proporcionarse un polipéptido de insulina que se ha modificado por una o más sustituciones de aminoácido en la secuencia del polipéptido de cadena A o B, incluyendo por ejemplo en las posiciones A1, A14, A15, B1, B10, o B22 o en cualquier posición del resto de unión con un aminoácido que comprende una amina, hidroxilo, o tiol de cadena lateral.

En algunas realizaciones, el espaciador entre el primero y/o segundo polipéptido de insulina y el grupo acilo es un aminoácido que comprende una amina, hidroxilo, o tiol de cadena lateral (o un dipéptido o tripéptido que comprende un aminoácido que comprende una amina, hidroxilo, o tiol de cadena lateral). En algunas realizaciones, el espaciador comprende un espaciador bifuncional hidrófilo. En una realización específica, el espaciador comprende un amino poli(alquiloxi)carboxilato. A este respecto, el espaciador puede comprender, por ejemplo, $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$, en el que m es cualquier entero de 1 a 6 y n es cualquier entero de 2 a 12, tal como, por ejemplo, ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico, que está disponible en el mercado en Peptides International, Inc. (Louisville, KY). En una realización, el espaciador bifuncional hidrófilo comprende dos o más grupos reactivos, por ejemplo, un grupo amina, un grupo hidroxilo, un grupo tiol y un grupo carboxilo o cualquier combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófilo comprende un grupo hidroxilo y un carboxilato. En otras realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófilo comprende un grupo

amina y un carboxilato. En otras realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófilo comprende un grupo tiol y un carboxilato.

En algunas realizaciones, el espaciador entre el primero y/o segundo polipéptido de insulina y el grupo acilo es un espaciador bifuncional hidrófobo. Espaciadores bifuncionales hidrófobos se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Bioconjugate Techniques, G. T. Hermanson (Academic Press, San Diego, CA, 1996), que se incorpora por referencia en su totalidad. En ciertas realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófobo comprende dos o más grupos reactivos, por ejemplo, un grupo amina, un grupo hidroxilo, un grupo tiol y un grupo carboxilo o cualquier combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófobo comprende un grupo hidroxilo y un carboxilato. En otras realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófobo comprende un grupo amina y un carboxilato. En otras realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófobo comprende un grupo tiol y un carboxilato. Los espaciadores bifuncionales hidrófobos adecuados que comprenden un carboxilato y un grupo hidroxilo o un grupo tiol se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, ácido 8-hidroxi octanoico y ácido 8-mercapto octanoico.

De acuerdo con ciertas realizaciones el espaciador bifuncional puede ser un aminoácido sintético o de origen natural que comprende una estructura de aminoácido que es de 3 a 10 átomos de longitud (por ejemplo, ácido 6-amino hexanoico, ácido 5-aminovalérico, ácido 7-aminoheptanoico y ácido 8-amino octanoico). Como alternativa, el espaciador puede ser un espaciador dipeptídico o tripeptídico que tiene una estructura peptídica que es de 3 a 10 átomos (por ejemplo, 6 a 10 átomos) de longitud. Cada aminoácido del espaciador dipeptídico o tripeptídico unido al polipéptido de insulina puede seleccionarse independientemente entre el grupo que consiste en: aminoácidos de origen natural y/u origen no natural incluyendo, por ejemplo, cualquiera de los isómeros D o L de los aminoácidos de origen natural (Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr), o cualquiera de los isómeros D o L de los aminoácidos de origen no natural seleccionados entre el grupo que consiste en: β -alanina (β -Ala), *N*- α -metil-alanina (Me-Ala), ácido aminobutírico (Abu), ácido α -aminobutírico (γ -Abu), ácido aminohexanoico (ϵ -Ahx), ácido aminoisobutírico (Aib), ácido aminometilpirrol carboxílico, ácido aminopiperidinacarboxílico, aminoserina (Ams), ácido aminotetrahidropiran-4-carboxílico, *N*-metoxi-*N*-metil amida de arginina, ácido β -aspártico (β -Asp), ácido azetidina carboxílico, 3-(2-benzotiazolil)alanina, α -terc-butilglicina, ácido 2-amino-

5-ureido-n-valérico (citrulina, Cit), β -ciclohexilalanina (Cha), acetamidometil-cisteína, ácido diaminobutanoico (Dab), ácido diaminopropiónico (Dpr), dihidroxifenilalanina (DOPA), dimetiltiazolidina (DMTA), ácido γ -glutámico (γ -Glu), homoserina (Hse), hidroxiprolina (Hyp), *N*-metoxi-*N*-metil amida de isoleucina, metil-isoleucina (MeIle), ácido isonipecótico (Isn), metil-leucina (MeLeu), metil-lisina, dimetil-lisina, trimetil-lisina, metanoprolina, metionina-sulfóxido (Met(O)), metionina-sulfona (Met(O₂)), norleucina (Nle), metil-norleucina (Me-Nle), norvalina (Nva), ornitina (Orn), ácido para-aminobenzoico (PABA), penicilamina (Pen), metilfenilalanina (MePhe), 4-clorofenilalanina (Phe(4-Cl)), 4-fluorofenilalanina (Phe(4-F)), 4-nitrofenilalanina (Phe(4-NO₂)), 4-cianofenilalanina ((Phe(4-CN))), fenilglicina (Phg), piperidinilalanina, piperidinilglicina, 3,4-deshidroprolina, pirrolidinilalanina, sarcosina (Sar), selenocisteína (Sec), U-bencil-fosfofoserina, ácido 4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoico (Sta), ácido 4-amino-5-ciclohexil-3-hidroxipentanoico (ACHPA), ácido 4-amino-3-hidroxi-5-fenilpentanoico (AHPPA), ácido 1,2,3,4,-tetrahidro-isoquinolina-3-carboxílico (Tic), tetrahidropiranglicina, tienilalanina (Thi), U-bencil-fosfotirosina, O-fosfotirosina, metoxitirosina, etoxitirosina, O-(bis-dimetilamino-fosfono)-tirosina, tetrabutilamina de sulfato de tirosina, metil-valina (MeVal), ácido 1-amino-1-ciclohexano carboxílico (Acx), ácido aminovalérico, beta-ciclopropil-alanina (Cpa), propargilglicina (Prg), alilglicina (Alg), ácido 2-amino-2-ciclohexil-propanoico (2-Cha), tercbutilglicina (Tbg), vinilglicina (Vg), ácido 1-amino-1-ciclopropano carboxílico (Acp), ácido 1-amino-1-ciclopentano carboxílico (Acpe), ácido 3-mercaptopropiónico alquilado, ácido 1-amino-1-ciclobutano carboxílico (Acb). En algunas realizaciones el espaciador dipeptídico se selecciona entre el grupo que consiste en: Ala-Ala, β -Ala- β -Ala, Leu-Leu, Pro-Pro, ácido γ -aminobutírico-ácido γ -aminobutírico y γ -Glu- γ -Glu.

El primero y/o segundo polipéptido de insulina puede modificarse para comprender un grupo acilo por acilación de un alcano de cadena larga. En aspectos específicos, el alcano de cadena larga comprende un grupo amina, un grupo hidroxilo, o un grupo tiol (por ejemplo, octadecilamina, tetradecanol y hexadecanotiol) que reacciona con un grupo carboxilo, o forma activada del mismo, del polipéptido de insulina. El grupo carboxilo, o forma activada del mismo, del polipéptido de insulina puede ser parte de una cadena lateral de un aminoácido (por ejemplo, ácido glutámico, ácido aspártico) del polipéptido de insulina o puede ser parte de la estructura peptídica.

En ciertas realizaciones, el primero y/o segundo polipéptido de insulina se modifica para comprender un grupo acilo por acilación del alcano de cadena larga mediante un espaciador que se une al polipéptido de insulina. En aspectos específicos, el alcano de cadena larga comprende un grupo amina, hidroxilo, o tiol que reacciona con un grupo carboxilo, o forma
 5 activada del mismo, del espaciador. En el presente documento se describen espaciadores adecuados que comprenden un grupo carboxilo, o forma activada del mismo e incluyen, por ejemplo, espaciadores bifuncionales, por ejemplo, aminoácidos, dipéptidos, tripéptidos, espaciadores bifuncionales hidrófilos y espaciadores bifuncionales hidrófobos. Como se usa en el presente documento, la expresión “forma activada de un grupo carboxilo” se refiere a un grupo
 10 carboxilo con la fórmula general $R(C=O)X$, en la que X es un grupo saliente y R es el polipéptido de insulina o el espaciador. Por ejemplo, las formas activadas de un grupo carboxilo pueden incluir, aunque sin limitación, cloruros de acilo, anhídridos y ésteres. En algunas realizaciones, el grupo carboxilo activado es un éster con un grupo saliente *N*-hidroxisuccinimida (NHS).

Con respecto a estos aspectos de la invención, en que se acila un alcano de cadena larga por el péptido, el polipéptido de insulina o el espaciador, el alcano de cadena larga puede ser de cualquier tamaño y puede comprender cualquier longitud de cadena de carbonos. El alcano de cadena larga puede ser lineal o ramificado. En ciertos aspectos, el alcano de cadena larga es un alcano C_4 a C_{30} . Por ejemplo, el alcano de cadena larga puede ser cualquiera de un
 20 alcano C_4 , alcano C_6 , alcano C_8 , alcano C_{10} , alcano C_{12} , alcano C_{14} , alcano C_{16} , alcano C_{18} , alcano C_{20} , alcano C_{22} , alcano C_{24} , alcano C_{26} , alcano C_{28} , o un alcano C_{30} . En algunas realizaciones, el alcano de cadena larga comprende un alcano C_8 a C_{20} , por ejemplo, un alcano C_{14} , alcano C_{16} , o un alcano C_{18} .

En algunas realizaciones, un grupo amina, un grupo hidroxilo, o un grupo tiol del
 25 primero y/o segundo polipéptido de insulina se acila con un ácido de colesterol. En una realización específica, el péptido se une al ácido de colesterol a través de un espaciador des-amino Cys alquilado, es decir, un espaciador de ácido 3-mercaptopropiónico alquilado. Los procedimientos adecuados de acilación de péptidos mediante aminas, hidroxilos y tioles se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Miller, *Biochem Biophys Res Commun* 218: 377-382
 30 (1996); Shimohigashi y Stammer, *Int J Pept Protein Res* 19: 54-62 (1982); y Previero y col., *Biochim Biophys Acta* 263: 7-13 (1972) (para procedimientos de acilación a través de un

hidroxilo); y San y Silvius, J Pept Res 66: 169-180 (2005) (para procedimientos de acilación a través de un tiol); Bioconjugate Chem. "Chemical Modifications of Proteins: History and Applications" páginas 1, 2-12 (1990); Hashimoto y col., Pharmacuetical Res. "Synthesis of Palmitoyl Derivatives of Insulin and their Biological Activity" Vol. 6, N.º: 2 pág.171-176 (1989).

5 El grupo acilo del péptido acilado del primero y/o segundo polipéptido de insulina puede ser de cualquier tamaño, por ejemplo, cualquier longitud de cadena de carbonos y puede ser lineal o ramificado. En algunas realizaciones específicas de la invención, el grupo acilo es un ácido graso C₄ to C₃₀. Por ejemplo, el grupo acilo puede ser cualquiera de un ácido graso C₄, ácido graso C₆, ácido graso C₈, ácido graso C₁₀, ácido graso C₁₂, ácido graso C₁₄, ácido graso
10 C₁₆, ácido graso C₁₈, ácido graso C₂₀, ácido graso C₂₂, ácido graso C₂₄, ácido graso C₂₆, ácido graso C₂₈, o un ácido graso C₃₀. En algunas realizaciones, el grupo acilo es un ácido graso C₈ a C₂₀, por ejemplo, un ácido graso C₁₄ o un ácido graso C₁₆. En algunas realizaciones, el grupo acilo es urea.

En una realización alternativa, el grupo acilo es un ácido biliar. El ácido biliar
15 puede ser cualquier ácido biliar adecuado, incluyendo, aunque sin limitación, ácido cólico, ácido quenodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido litocólico, ácido taurocólico, ácido glicocólico y ácido de colesterol.

El primero y/o segundo polipéptido de insulina acilado descritos en el presente documento pueden modificarse adicionalmente para comprender un resto hidrófilo. En algunas
20 realizaciones específicas, el resto hidrófilo puede comprender una cadena de polietilenglicol (PEG). La incorporación de un resto hidrófilo puede conseguirse a través de cualquier medio adecuado, tal como cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el análogo de cadena sencilla acilado comprende un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en Cys, Lys, Orn, homo-Cys, o Ac-Phe y la cadena
25 lateral del aminoácido está unida covalentemente a un resto hidrófilo (por ejemplo, PEG). En una realización, el grupo acilo se une a la posición A1, A14, A15, B1, B2, B10 o B22 (de acuerdo con la numeración de aminoácidos de las cadenas A y B de insulina nativa), opcionalmente mediante un espaciador que comprende Cys, Lys, Orn, homo-Cys, o Ac-Phe.

Como alternativa, el primero y/o segundo polipéptido de insulina acilado
30 comprende un espaciador, en el que el espaciador está tanto acilado como modificado para

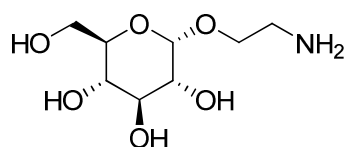
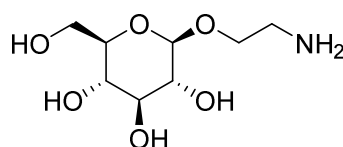
comprender el resto hidrófilo. Los ejemplos no limitantes de espaciadores adecuados incluyen un espaciador que comprende uno o más aminoácidos seleccionados entre el grupo que consiste en Cys, Lys, Orn, homo-Cys y Ac-Phe.

En algunas realizaciones, el extremo amino terminal de al menos un aminoácido *N*-terminal de al menos uno de los polipéptidos de cadena A y los polipéptidos de cadena B del agonista parcial del receptor de insulina se modifica para comprender un sustituyente. El sustituyente puede unirse covalentemente de forma directa al grupo amino del aminoácido *N*-terminal o de forma indirecta al grupo amino mediante un espaciador, en el que el espaciador está posicionado entre el grupo amino del aminoácido *N*-terminal del polipéptido de insulina y el sustituyente. El sustituyente puede ser un resto acilo como se ha analizado supra. El sustituyente puede tener la fórmula general $RC(O)-$, en la que R puede ser $R'CH_2$, $R'NH$, $R'O$ y R' puede ser H, cadena alquilo lineal, aminoácido, péptido, poli(etilenglicol) (PEG), sacáridos, que en aspectos particulares $RC(O)-$ puede ser acetilo, fenilacetilo, carbamoílo, *N*-alquil carbamoílo, o alcoxycarbonilo. En aspectos particulares, el sustituyente es un grupo carbamoílo, grupo acetilo, glicina, grupo metilo, grupo metoxi, grupo dimetilo, grupo isobutilo, grupo PEG1 o grupo PEG2 (véanse Ejemplos en el presente documento para las estructuras de los sustituyentes). La carbamoilación de insulina ha sido divulgada por Oimoni y col., Nephron 46: 63-66 (1987) y los dímeros de insulina que comprenden grupos carbamoílo en el extremo *N* terminal han sido divulgados en la solicitud PCT publicada N.º: WO2014052451 (p. ej., MIU-90).

En realizaciones particulares, al menos un aminoácido *N*-terminal se conjuga a través del nitrógeno *N*2 con un sustituyente que comprende un éster de *N*-hidroxisuccinimida unido a un grupo que tiene la fórmula general $RC(O)-$, donde R puede ser $R'CH_2$, $R'NH$, $R'O$, y R' puede ser H, cadena alquilo lineal, aminoácido, péptido, poli(etilenglicol) (PEG), sacáridos, que en aspectos particulares $RC(O)-$ puede ser acetilo, fenilacetilo, carbamoílo, *N*-alquil carbamoílo o alcoxycarbonilo. En realizaciones particulares, el sustituyente es un grupo carbamoílo, grupo acetilo, glicina, grupo metilo, grupo metoxi, grupo dimetilo, grupo isobutilo, grupo PEG1 o grupo PEG2.

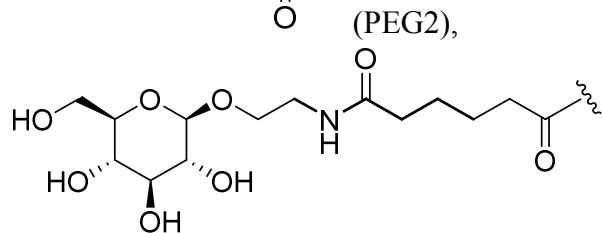
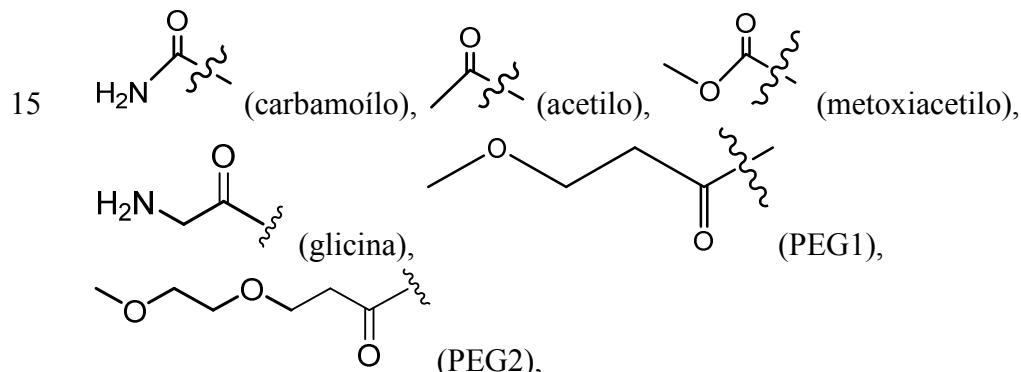
En realizaciones particulares, el sacárido covalentemente unido a uno o más extremos amino terminales del primero y segundo polipéptidos de insulina puede ser un monosacárido, véase por ejemplo el **Dímero 51**. En algunas realizaciones, el sacárido comprende uno o más grupos amina. En ciertas realizaciones, el sacárido y grupo amina están separados por

un grupo alquilo C1-C6, por ejemplo, un grupo alquilo C1-C3. En algunas realizaciones, el
 sacárido es aminoetilglucosa (AEG). En ciertas realizaciones, un ligando sacárido es de la
 configuración “D”. En otras realizaciones, un ligando sacárido es de la configuración “L”. A
 continuación mostramos estructuras de estos sacáridos ejemplares. Los especialistas en la técnica
 5 reconocerán otros sacáridos ejemplares.

**AEG-alfa****AEG-beta**

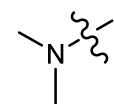
En general, los sacáridos puede conjugarse directa o indirectamente mediante un enlazador con
 10 el extremo amino terminal de uno o más del primero y segundo polipéptidos de insulina. En
 aspectos particulares, el enlazador es un alquildioílo, $-C(O)(CH_2)_nC(O)-$, en el que $n = 0-45$, $0-20$, $0-10$, o $0-5$.

Los sustituyentes ejemplares conjugados con el grupo amino *N*-terminal pueden
 ser



(AEG-C6), e, (isobutilo), en los que la

línea ondulada indica el enlace entre el sustituyente y el grupo amino *N*-terminal. El sustituyente
 20 también puede ser



(Me₂; *N*-dimetilo) en los que la línea ondulada indica el enlace entre Me₂ y el alfa
 carbono del aminoácido *N*-terminal.

Dímeros de insulina ejemplares

En realizaciones particulares, la presente invención proporciona dímeros de insulina en los que una primera Lys B28 o B29 de una molécula de primer heterodímero de insulina que tiene un primer polipéptido de cadena A y primer polipéptido de cadena B y una

5 segunda Lys B28 o B29 de un segundo heterodímero de insulina que tiene un segundo polipéptido de cadena A y segundo polipéptido de cadena B están conjugadas conjuntamente por un enlazador bifuncional seleccionado del grupo que consiste en **Enlazador 1, Enlazador 2, Enlazador 3, Enlazador 10, Enlazador 11, Enlazador 12, Enlazador 13, Enlazador 14, Enlazador 15, Enlazador 16, Enlazador 17, Enlazador 18, Enlazador 19, Enlazador 20,**

10 **Enlazador 21, Enlazador 22, Enlazador 23, Enlazador 24, Enlazador 25, Enlazador 26, Enlazador 27, Enlazador 28, Enlazador 29, Enlazador 30, Enlazador 31, Enlazador 32, Enlazador 33, Enlazador 34, Enlazador 35, Enlazador 36, Enlazador 37, Enlazador 38, Enlazador 39, Enlazador 40, Enlazador 41, Enlazador 42, Enlazador 43, Enlazador 44, Enlazador 45, Enlazador 46, Enlazador 47, Enlazador 48, Enlazador 49, y Enlazador 50**

15 con la condición de que cuando el enlazador bifuncional sea **Enlazador 10, Enlazador 11, Enlazador 12, Enlazador 13, o Enlazador 14**, al menos uno de los primer o segundo polipéptidos de cadena A o de cadena B esté conjugado en su aminoácido *N*-terminal con un sustituyente como se divulga en el presente documento o al menos los aminoácidos *N*-terminales de la molécula de primer heterodímero de insulina estén conjugados con un sustituyente como se

20 divulga en el presente documento o los aminoácidos *N*-terminales de tanto el primer heterodímero de insulina como el segundo heterodímero de insulina estén conjugados con un sustituyente. En realizaciones particulares, el sustituyente comprende un éster de *N*-hidroxisuccinimida unido a un grupo que tiene la fórmula general $RC(O)-$, donde R puede ser $R'CH_2$, $R'NH$, $R'O$, y R' puede ser H, cadena alquilo lineal, aminoácido, péptido,

25 poli(etilenglicol) (PEG), sacáridos, que en aspectos particulares $RC(O)-$ puede ser acetilo, fenilacetilo, carbamoilo, *N*-alquil carbamoilo o alcoxycarbonilo. En aspectos particulares, el sustituyente es un grupo carbamoilo, grupo acetilo, glicina, grupo metilo, grupo metoxi, grupo dimetilo, grupo isobutilo, grupo PEG1, grupo AEG, grupo alquilo C6-AEG o grupo PEG2.

En realizaciones particulares, la presente invención proporciona dímeros de

30 insulina en los que una primera Lys B28 o B29 de una molécula de primer heterodímero de insulina que tiene un primer polipéptido de cadena A y primer polipéptido de cadena B está

conjugada con un primer enlazador seleccionado del grupo que consiste en **Enlazador 5** y **Enlazador 7** y una segunda Lys B28 o B29 de un segundo heterodímero de insulina que tiene un segundo polipéptido de cadena A y segundo polipéptido de cadena B conjugada con un segundo enlazador seleccionado del grupo que consiste en **Enlazador 4**, **Enlazador 6**, **Enlazador 8**, y **Enlazador 9** están conjugados conjuntamente a través del primer enlazador y el segundo enlazador. En realizaciones particulares, al menos uno de los primer o segundo polipéptidos de cadena A o de cadena B está conjugado en su aminoácido N-terminal con un sustituyente como se divulga en el presente documento o al menos los aminoácidos N-terminales de la molécula de primer heterodímero de insulina están conjugados con un sustituyente como se divulga en el presente documento o los aminoácidos N-terminales de tanto el primer heterodímero de insulina como el segundo heterodímero de insulina están conjugados con un sustituyente. En realizaciones particulares, el sustituyente comprende un éster de *N*-hidroxisuccinimida unido a un grupo que tiene la fórmula general $RC(O)-$, donde R puede ser $R'CH_2$, $R'NH$, $R'O$, y R' puede ser H, cadena alquilo lineal, aminoácido, péptido, poli(etilenglicol) (PEG), sacáridos, que en aspectos particulares $RC(O)-$ puede ser acetilo, fenilacetilo, carbamoilo, *N*-alquil carbamoilo o alcoxicarbonilo. En aspectos particulares, el sustituyente es un grupo carbamoilo, grupo acetilo, glicina, grupo metilo, grupo metoxi, grupo dimetilo, grupo isobutilo, grupo PEG1, grupo AEG, grupo alquilo C6-AEG o grupo PEG2.

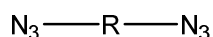
En realizaciones particulares, la presente invención proporciona dímeros de insulina en los que una primera Lys B28 o B29 de una molécula de primer heterodímero de insulina que tiene un primer polipéptido de cadena A y primer polipéptido de cadena B está conjugada con un primer enlazador seleccionado del grupo que consiste en **Enlazador 5** y **Enlazador 7** y una segunda Lys B28 o B29 de un segundo heterodímero de insulina que tiene un segundo polipéptido de cadena A y segundo polipéptido de cadena B está conjugada con un segundo enlazador seleccionado del grupo que consiste en **Enlazador 5** y **Enlazador 7**, en el que los primer y segundo enlazadores están conjugados conjuntamente a través de un enlazador en puente que tiene una estructura



en los que R es un enlace covalente, un átomo de carbono, un fenilo, un heteroátomo, o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado del grupo que consiste en acilo, alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo, y heterociclilo. En aspectos particulares R es un grupo acilo C2, C3, C4, C6,

C7, C8, C9 o C10 o un PEG2, PEG3, PEG4, PEG5, PEG6, PEG7, PEG8, PEG9, PEG10, PEG11, PEG12, PEG13, o PEG25. En realizaciones particulares, al menos uno de los primer o segundo polipéptidos de cadena A o de cadena B está conjugado en su aminoácido N-terminal con un sustituyente como se divulga en el presente documento o al menos los aminoácidos N-terminales de la molécula de primer heterodímero de insulina están conjugados con un sustituyente como se divulga en el presente documento o los aminoácidos N-terminales de tanto el primer heterodímero de insulina como el segundo heterodímero de insulina están conjugados con un sustituyente. En realizaciones particulares, el sustituyente comprende un éster de *N*-hidroxisuccinimida unido a un grupo que tiene la fórmula general RC(O)-, donde R puede ser R'CH₂, R'NH, R'O, y R' puede ser H, cadena alquilo lineal, aminoácido, péptido, poli(etilenglicol) (PEG), sacáridos, que en aspectos particulares RC(O)- puede ser acetilo, fenilacetilo, carbamoilo, *N*-alquil carbamoilo o alcoxycarbonilo. En aspectos particulares, el sustituyente es un grupo carbamoilo, grupo acetilo, glicina, grupo metilo, grupo metoxi, grupo dimetilo, grupo isobutilo, grupo PEG1, grupo AEG, grupo alquilo C6-AEG o grupo PEG2.

En realizaciones particulares, la presente invención proporciona dímeros de insulina en los que una primera Lys B28 o B29 de una molécula de primer heterodímero de insulina que tiene un primer polipéptido de cadena A y primer polipéptido de cadena B está conjugada con un primer enlazador seleccionado del grupo que consiste en **Enlazador 4**, **Enlazador 6**, **Enlazador 8**, y **Enlazador 9** y una segunda Lys B28 o B29 de un segundo heterodímero de insulina que tiene un segundo polipéptido de cadena A y segundo polipéptido de cadena B conjugada con un segundo enlazador seleccionado del grupo que consiste en **Enlazador 4**, **Enlazador 6**, **Enlazador 8**, y **Enlazador 9**, en el que los primer y segundo enlazadores están conjugados conjuntamente a través de un enlazador en puente que tiene una estructura

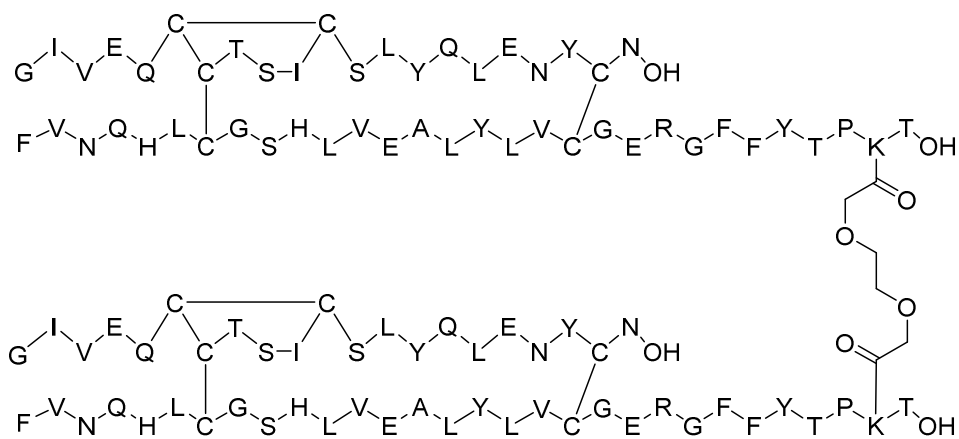


en los que R es un enlace covalente, un átomo de carbono, un fenilo, un heteroátomo, o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado del grupo que consiste en acilo, alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo, y heterociclilo. En aspectos particulares R es un grupo acilo C2, C3, C4, C6, C7, C8, C9 o C10 o un PEG2, PEG3, PEG4, PEG5, PEG6, PEG7, PEG8, PEG9, PEG10, PEG11, PEG12, PEG13, o PEG25. En realizaciones particulares, al menos uno de los primer o segundo polipéptidos de cadena A o de cadena B está conjugado en su aminoácido N-terminal con un

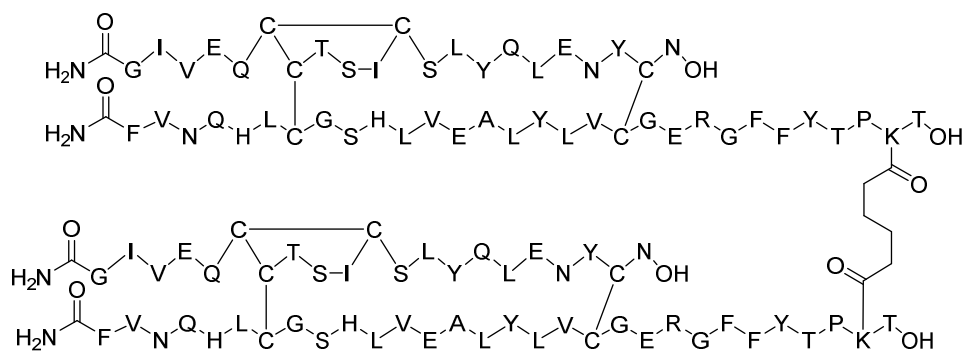
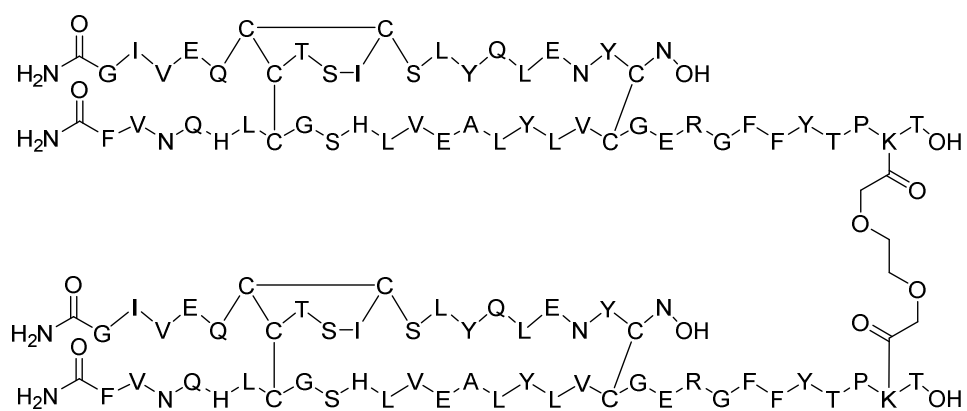
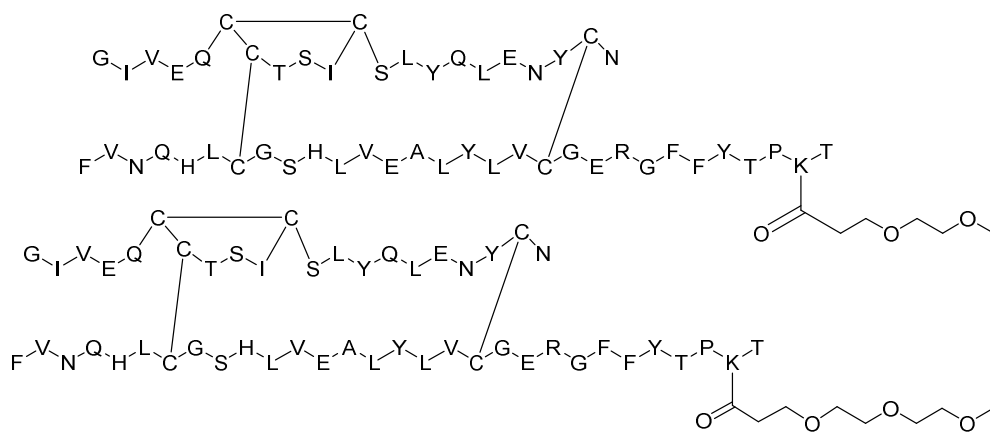
sustituyente como se divulga en el presente documento o al menos los aminoácidos N-terminales de la molécula de primer heterodímero de insulina están conjugados con un sustituyente como se divulga en el presente documento o los aminoácidos N-terminales de tanto el primer heterodímero de insulina como el segundo heterodímero de insulina están conjugados con un sustituyente. En realizaciones particulares, el sustituyente comprende un éster de *N*-hidroxisuccinimida unido a un grupo que tiene la fórmula general $RC(O)-$, donde R puede ser $R'CH_2$, $R'NH$, $R'O$, y R' puede ser H, cadena alquilo lineal, aminoácido, péptido, poli(etilenglicol) (PEG), sacáridos, que en aspectos particulares $RC(O)-$ puede ser acetilo, fenilacetilo, carbamoilo, *N*-alquil carbamoilo o alcocarbonilo. En aspectos particulares, el sustituyente es un grupo carbamoilo, grupo acetilo, glicina, grupo metilo, grupo metoxi, grupo dimetilo, grupo isobutilo, grupo PEG1, grupo AEG, grupo alquilo C6-AEG o grupo PEG2.

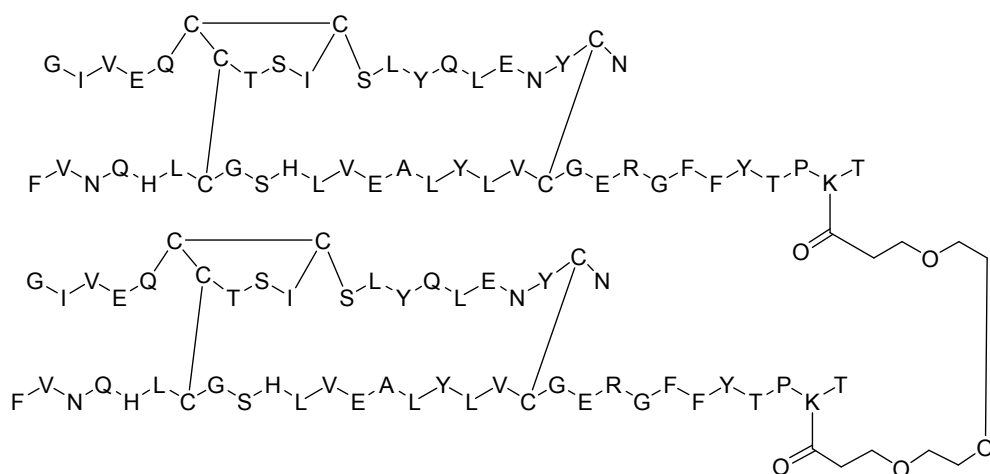
En realizaciones adicionales, los primer y segundo heterodímeros de insulina pueden comprender cualquiera de las moléculas de insulina o análogo de insulina divulgadas en el presente documento.

La presente invención también proporciona dímeros de insulina seleccionados entre

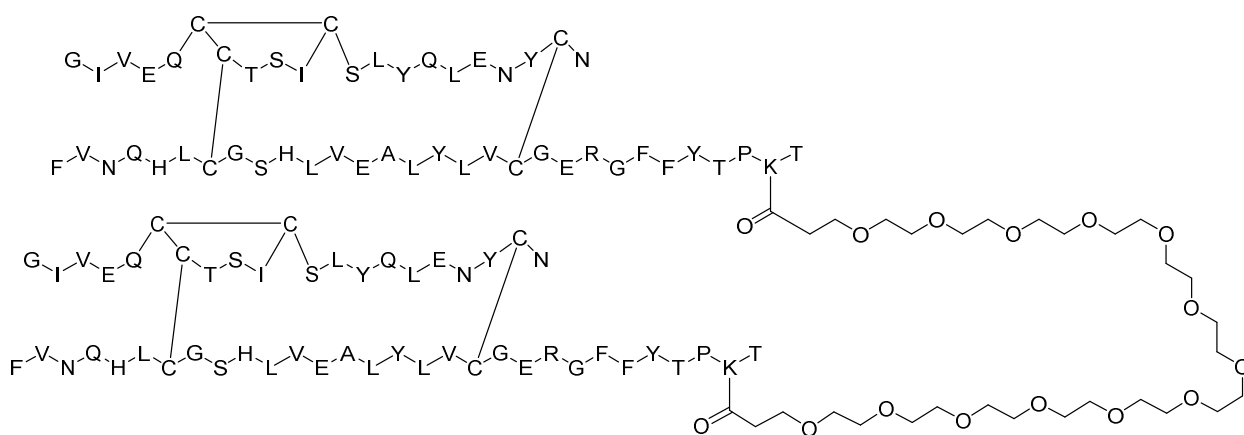
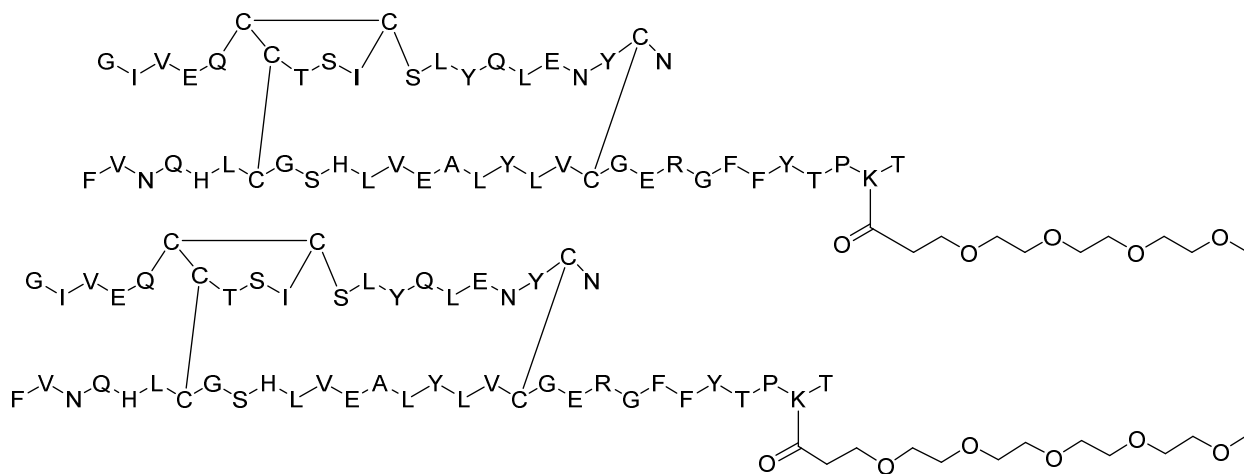


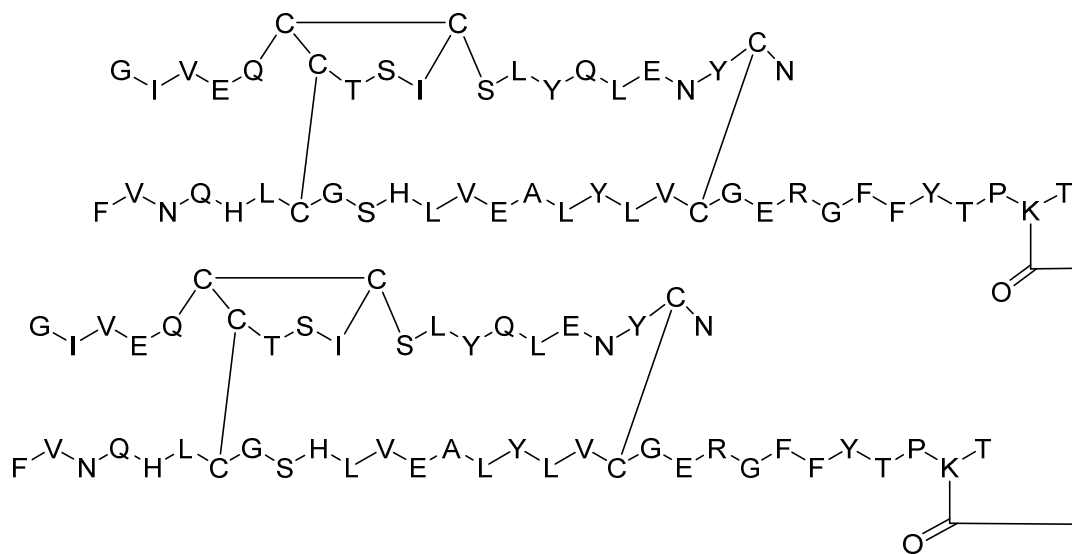
Dímero 1;

**Dímero 2;****Dímero 3;****Dímero 4;**

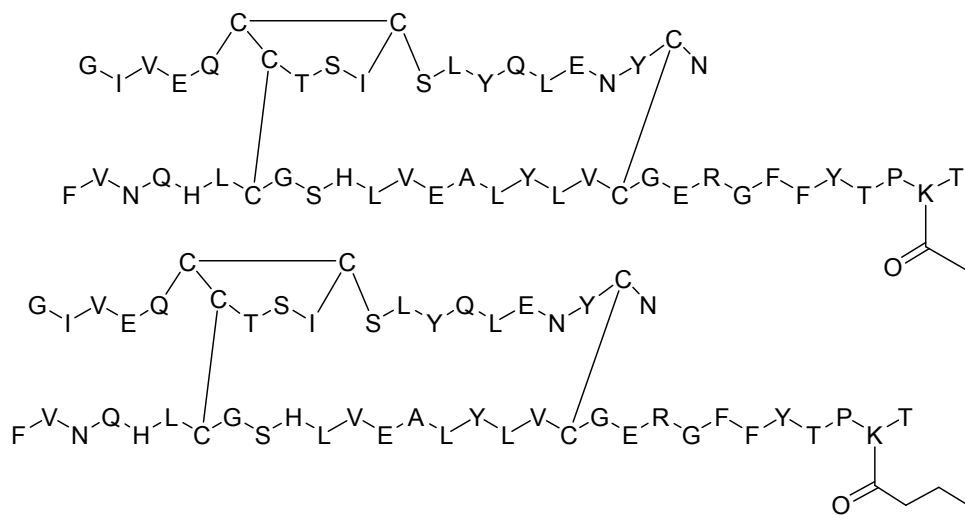
**Dímero 5;**

5

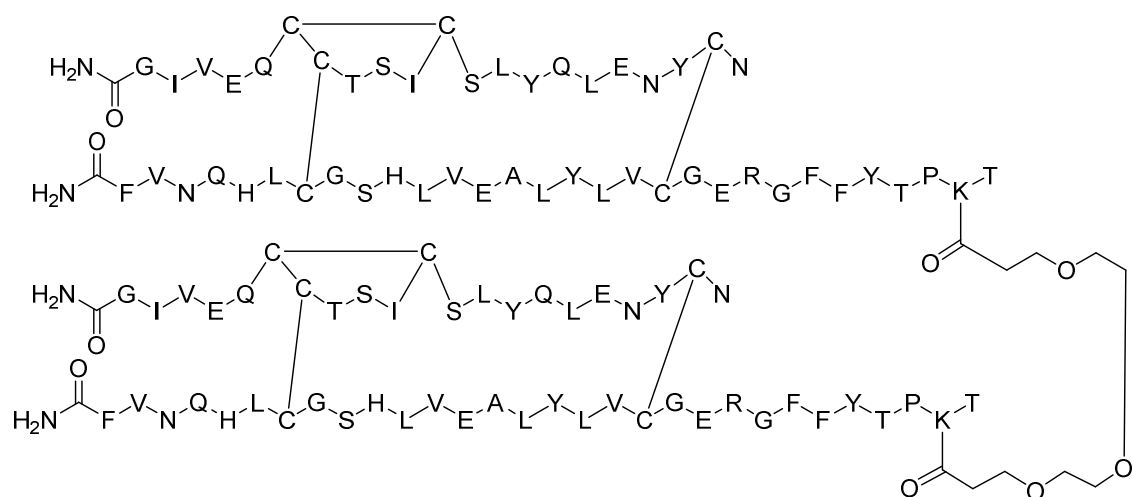
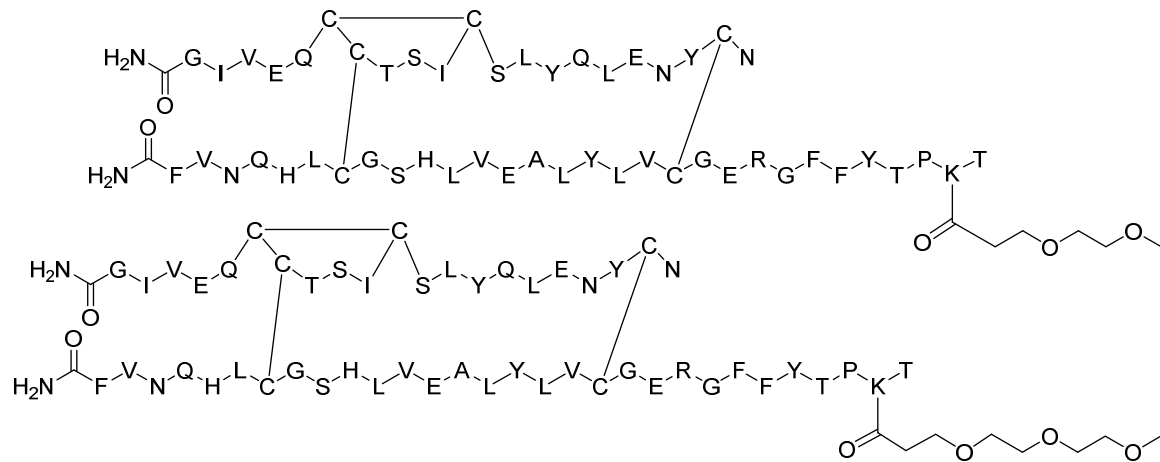
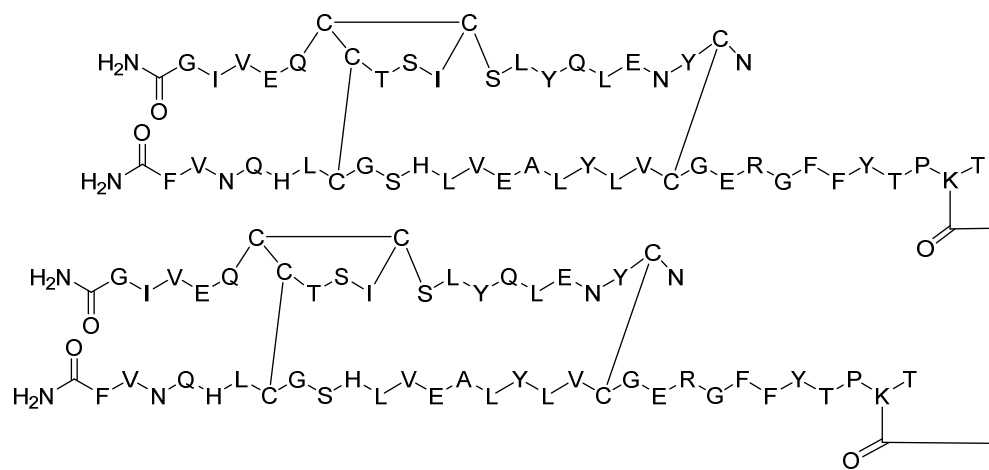
**Dímero 6;**

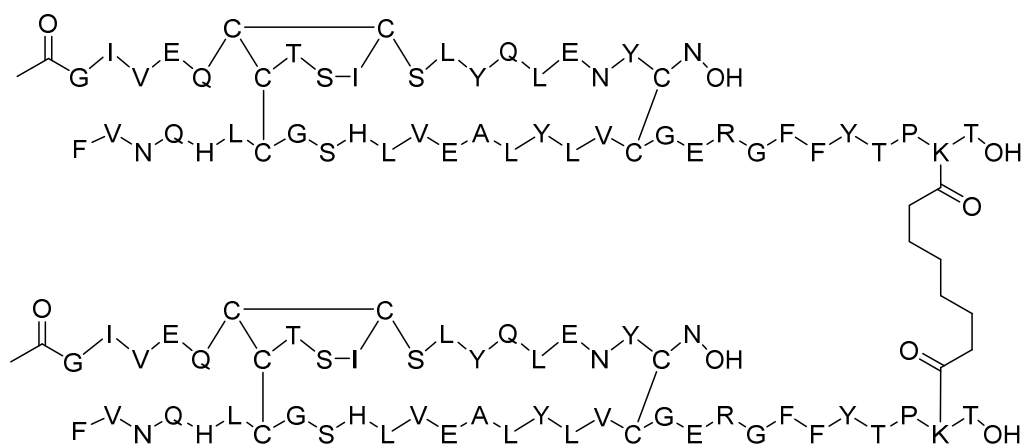
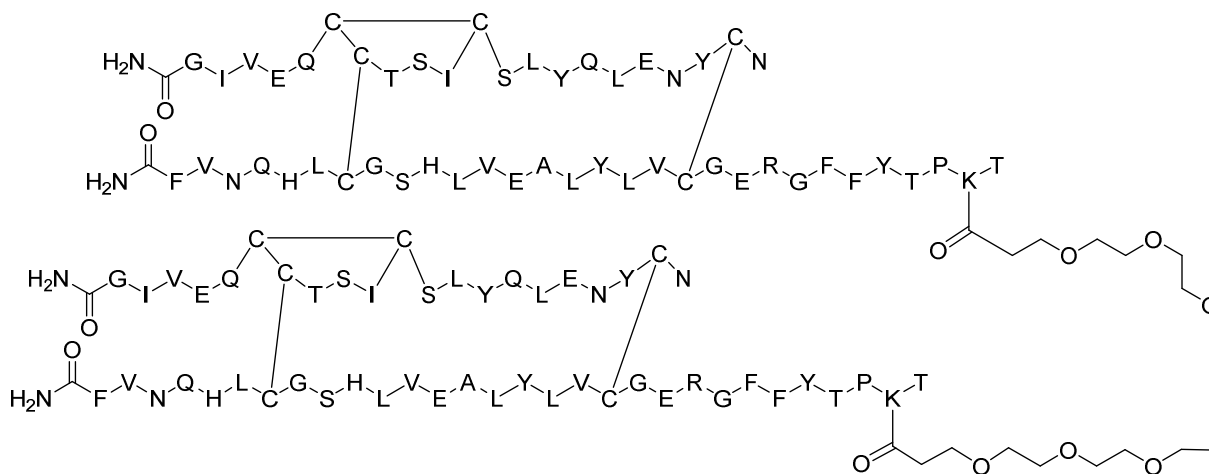
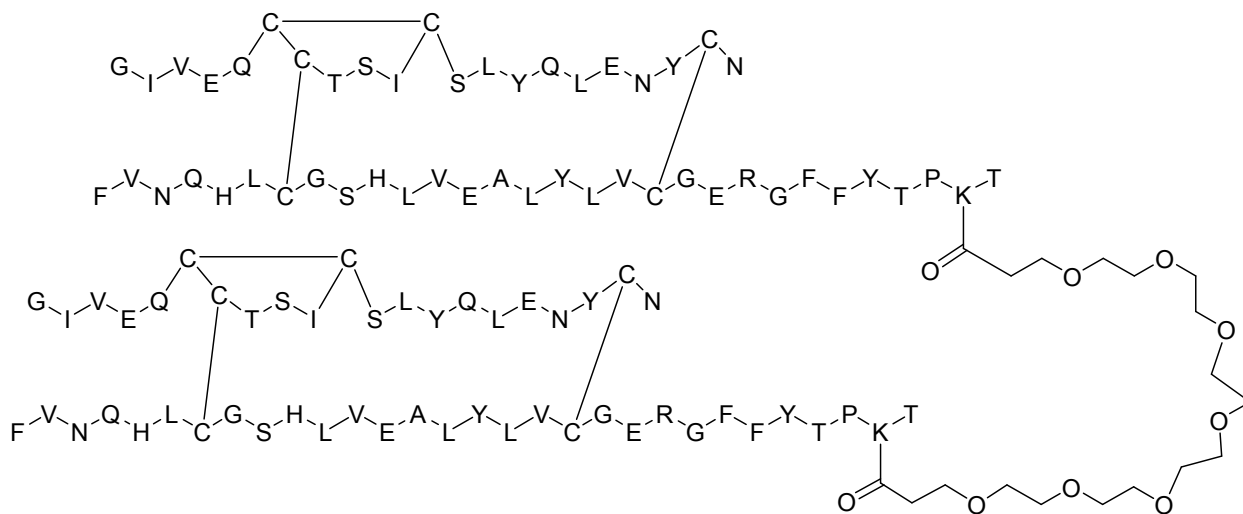
Dímero 7;**Dímero 8;**

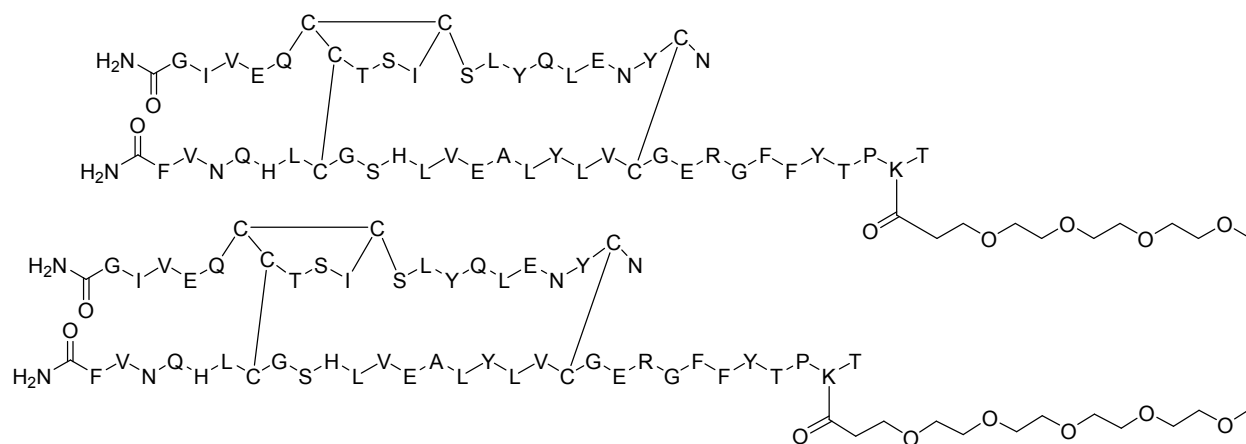
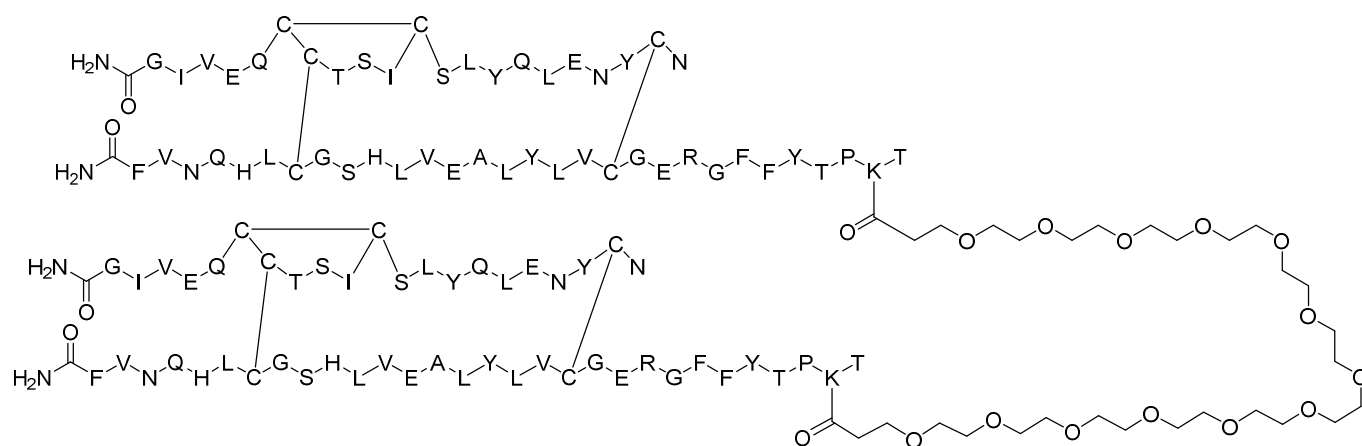
5

**Dímero 9;**

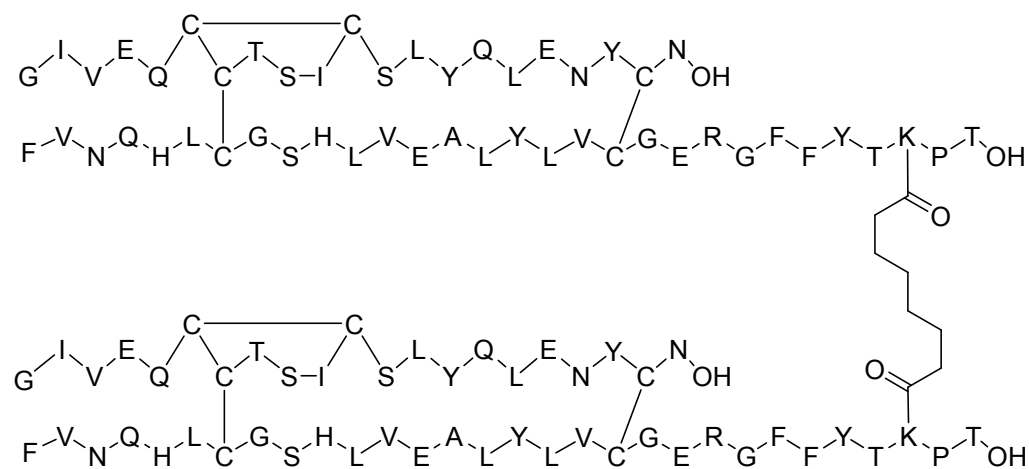
10

**Dímero 10;****5 Dímero 11;****Dímero 12;**

**Dímero 13;****5 Dímero 14;****Dímero 15;**

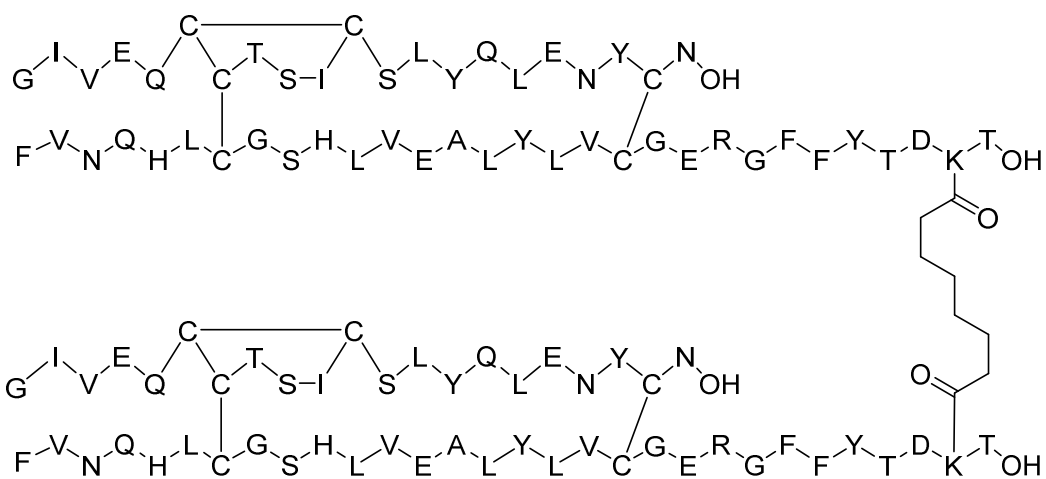
**Dímero 16;**

5

Dímero 17;

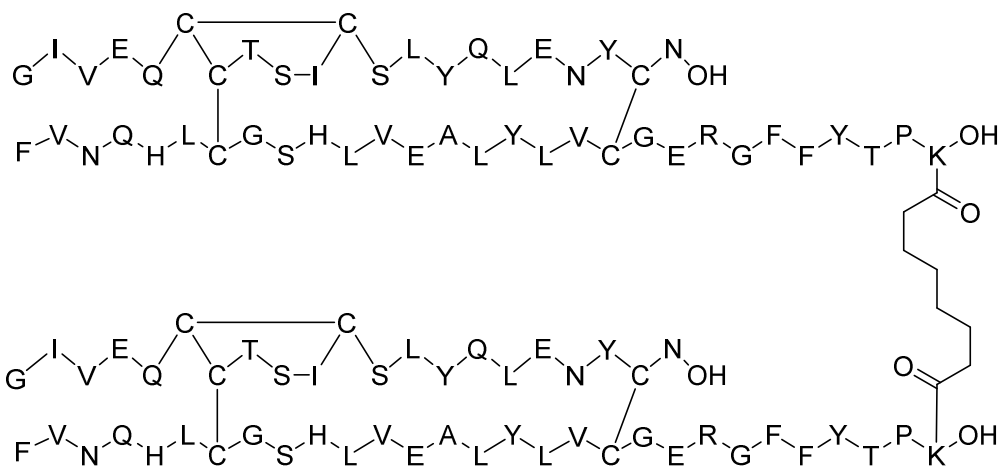
10

Dímero 18;

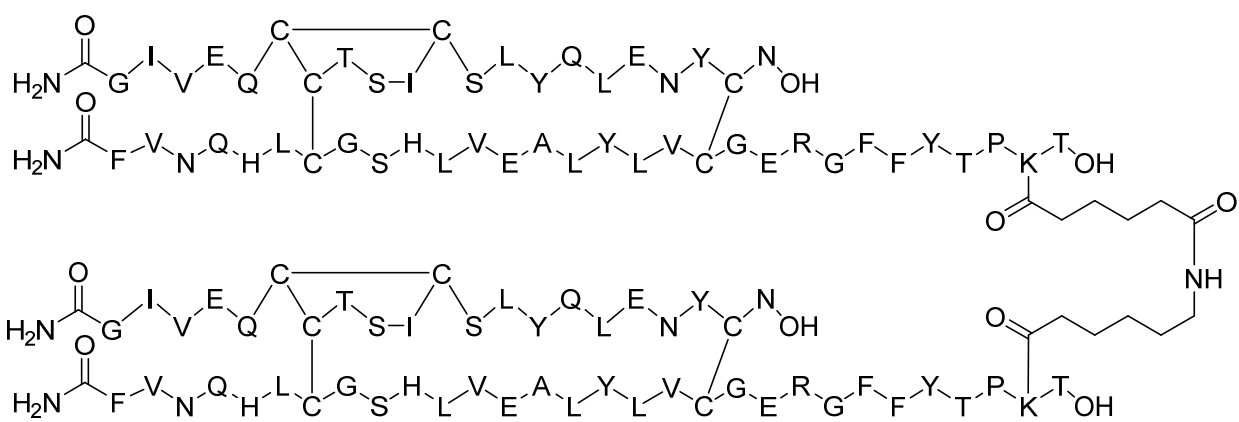


Dímero 19;

5



Dímero 20;



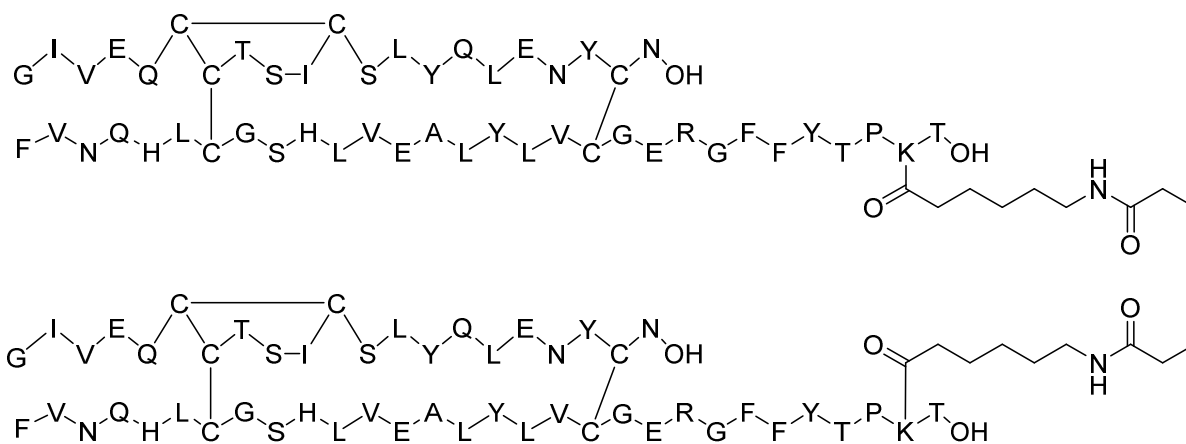
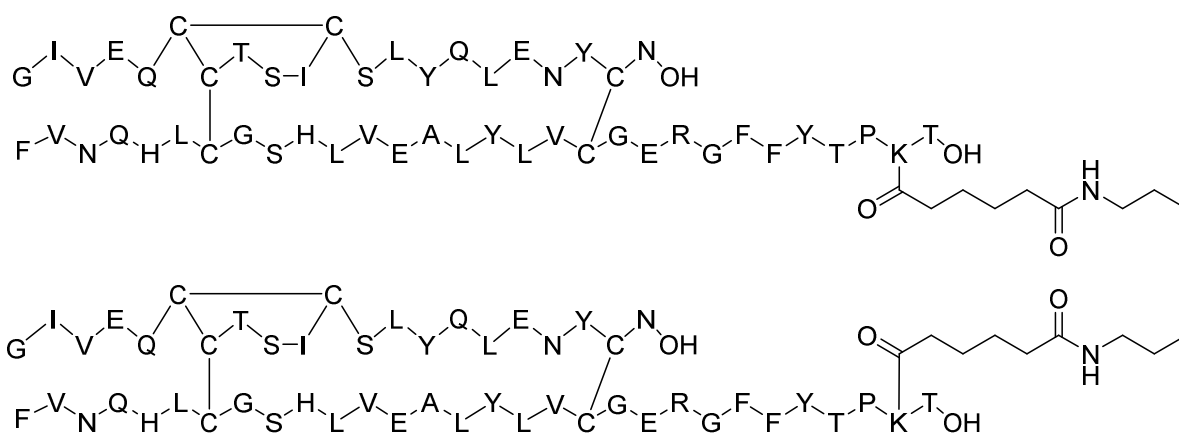
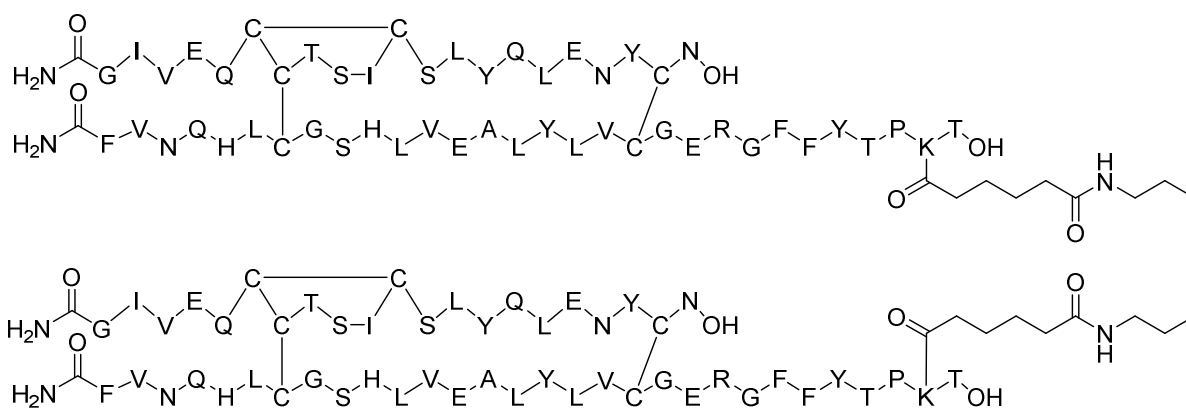
Dímero 21;

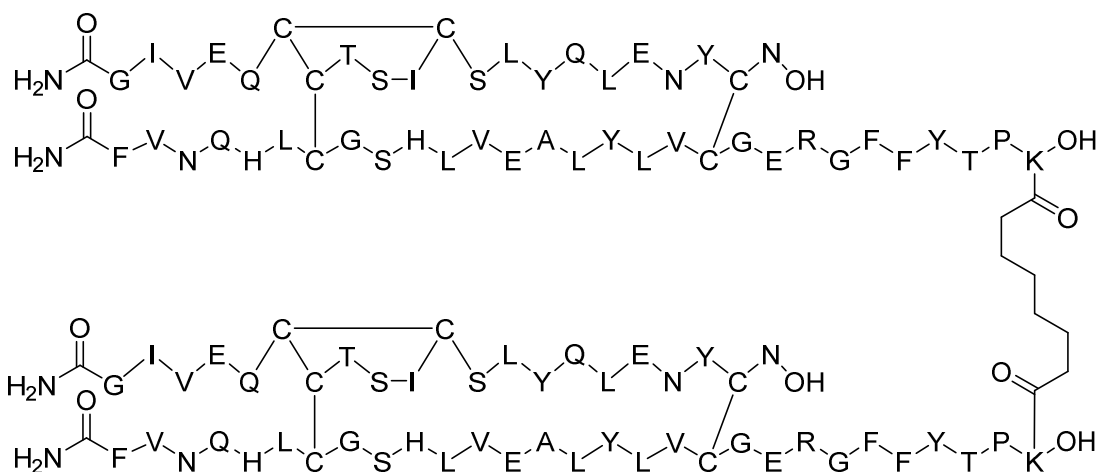
10

Chemical structures of two peptide derivatives, 1 and 2, showing their primary and secondary structures. Structure 1 is a linear peptide with a disulfide bridge between two cysteine residues. Structure 2 is a linear peptide with a disulfide bridge between two cysteine residues and a side chain modification on a lysine residue.

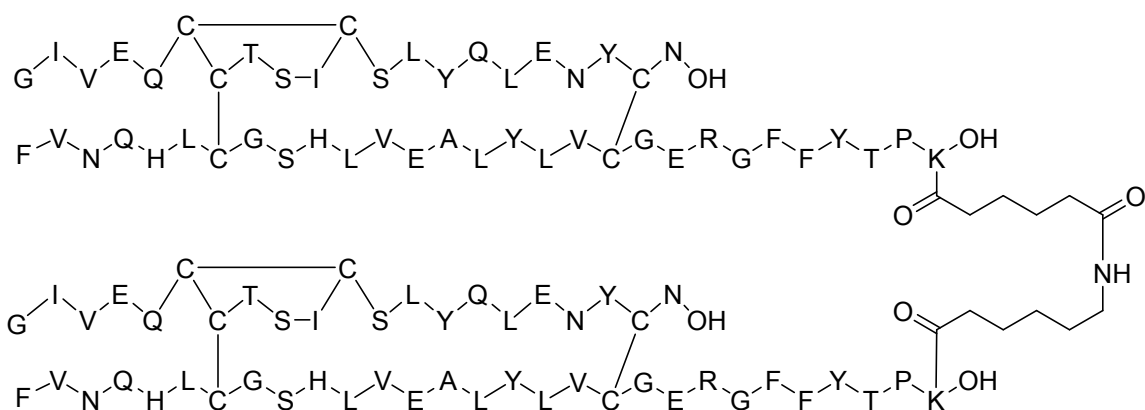
The chemical structure shows a bisphosphonate derivative of a bisphosphonic acid. It consists of two phosphonic acid groups, each represented as $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{O})-\text{X}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})_2$, where X is a variable group. These two groups are linked via a bisphosphonate bridge, $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})_2-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})_2-$. The variable groups X are defined as $\text{I}-\text{V}-\text{E}-\text{Q}-\text{C}(\text{C})-\text{T}-\text{S}-\text{I}-\text{S}-\text{L}-\text{Y}-\text{Q}-\text{L}-\text{E}-\text{N}-\text{Y}-\text{C}(\text{NHOH})$, where C(C) indicates a carbon atom bonded to two other carbon atoms, and C(NHOH) indicates a carbon atom bonded to a nitrogen atom which is bonded to a hydroxyl group.

-82-

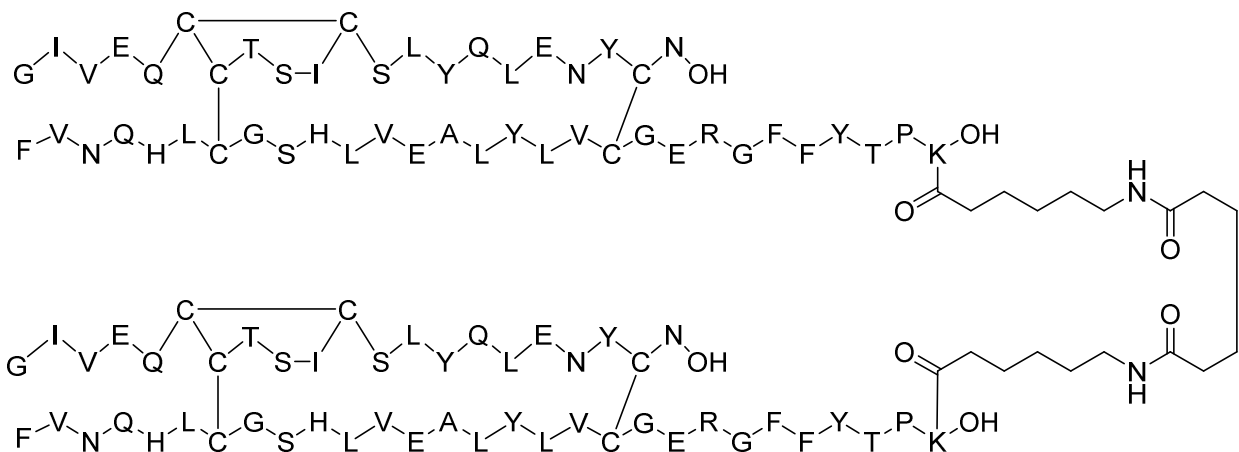
**Dímero 25;****5 Dímero 26;****Dímero 27;**



Dímero 28;



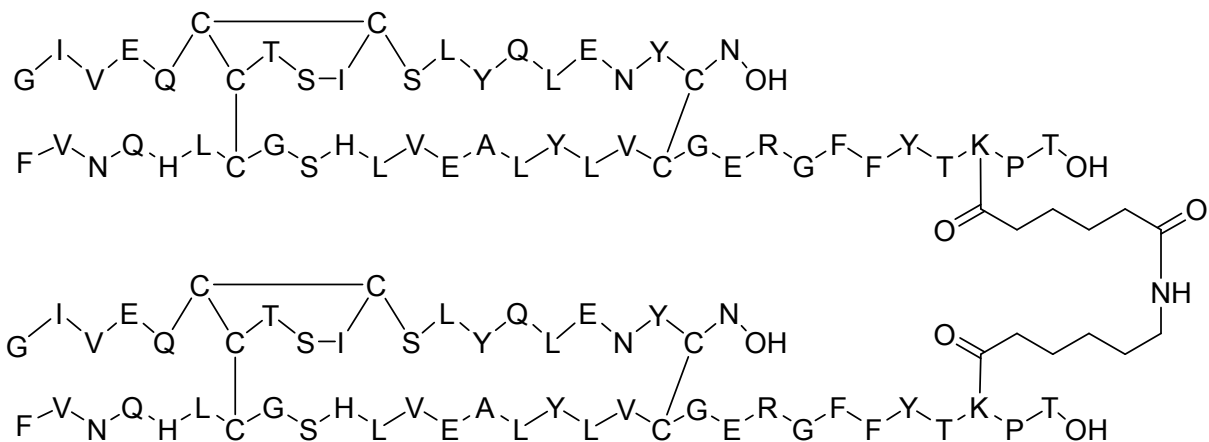
Dímero 29;



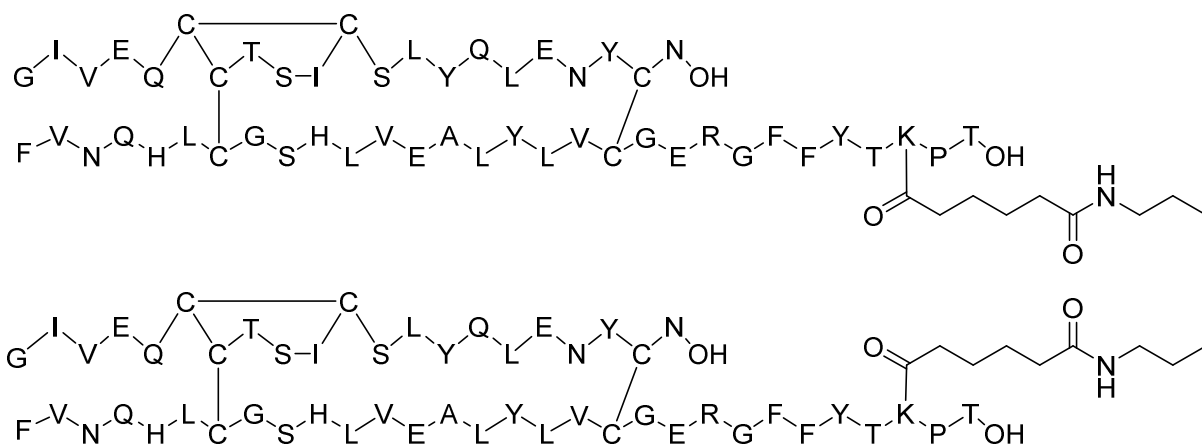
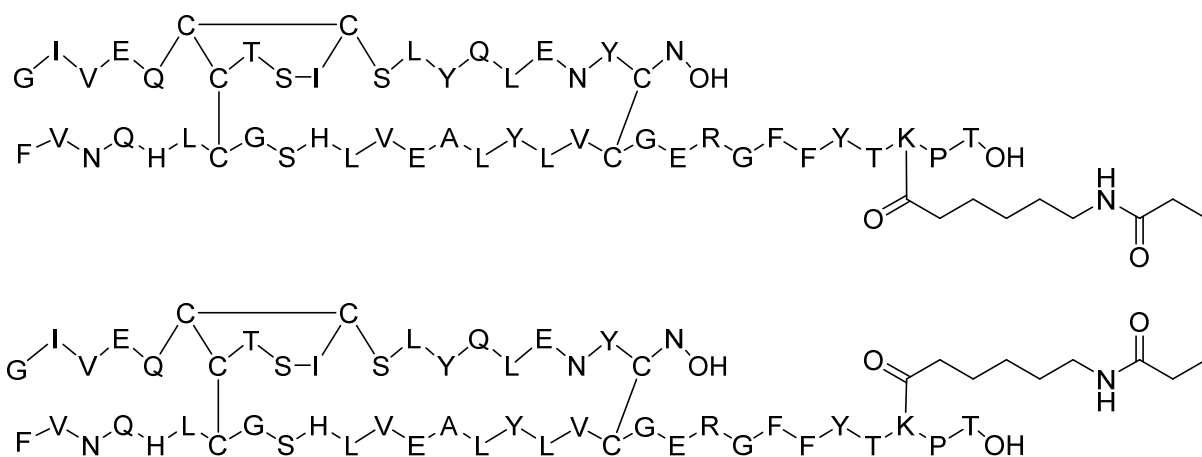
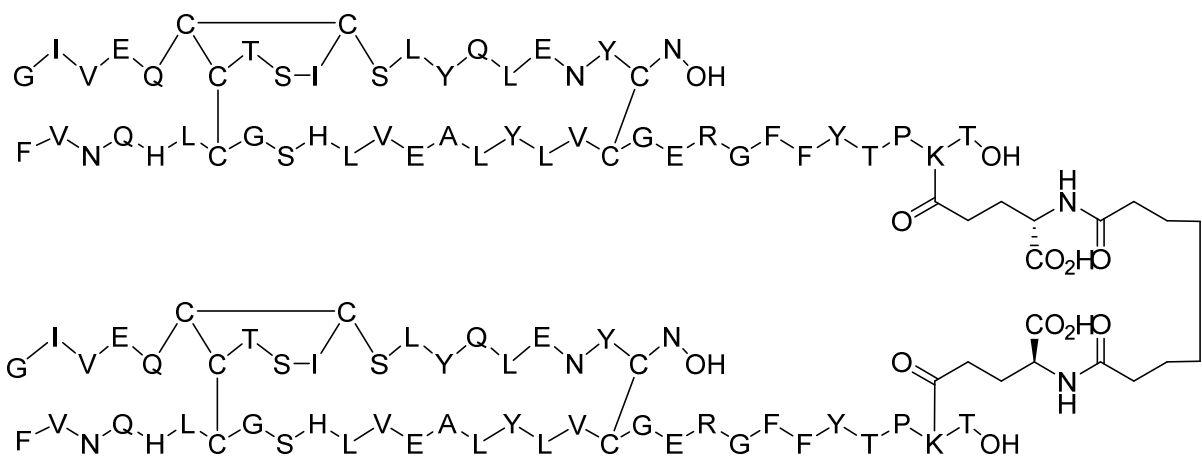
Dímero 30;

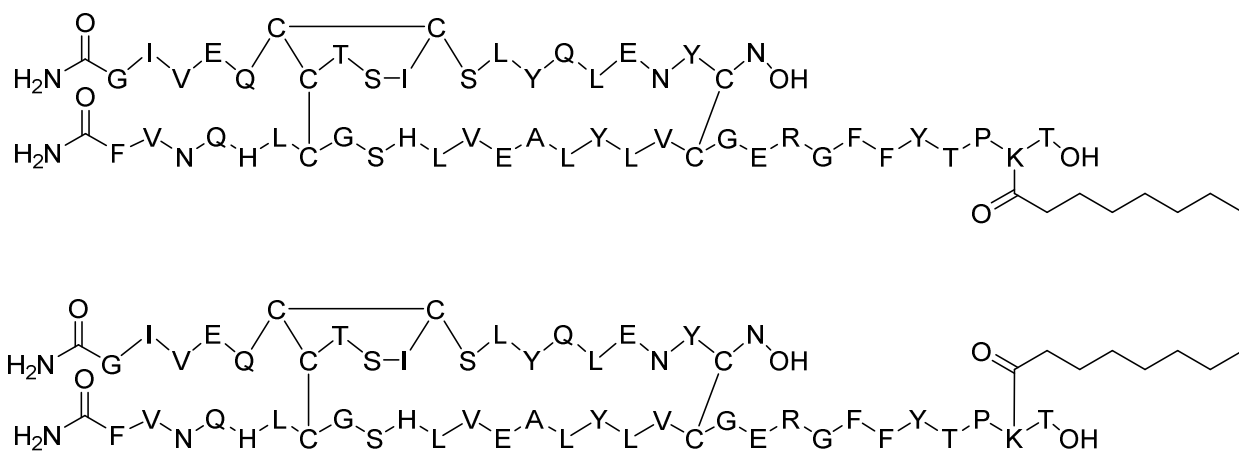
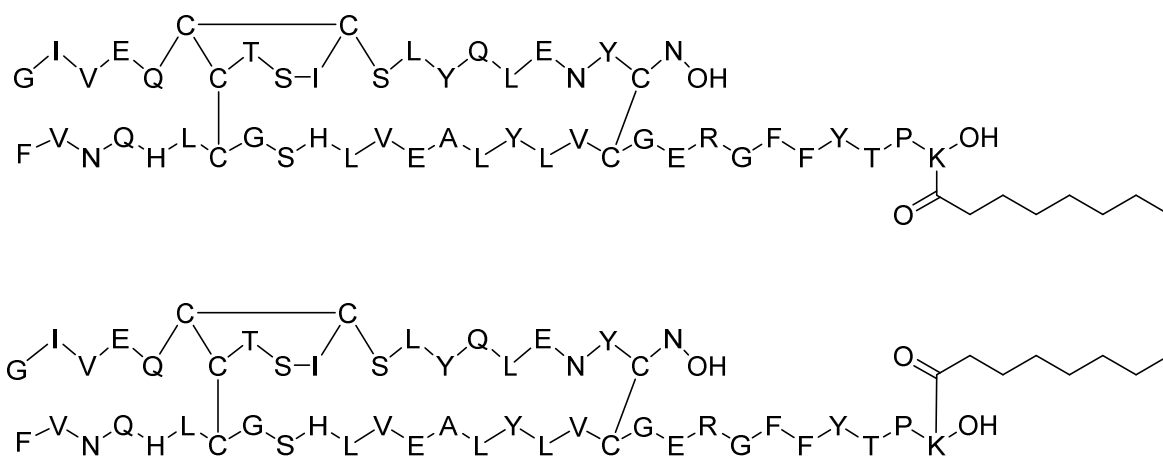
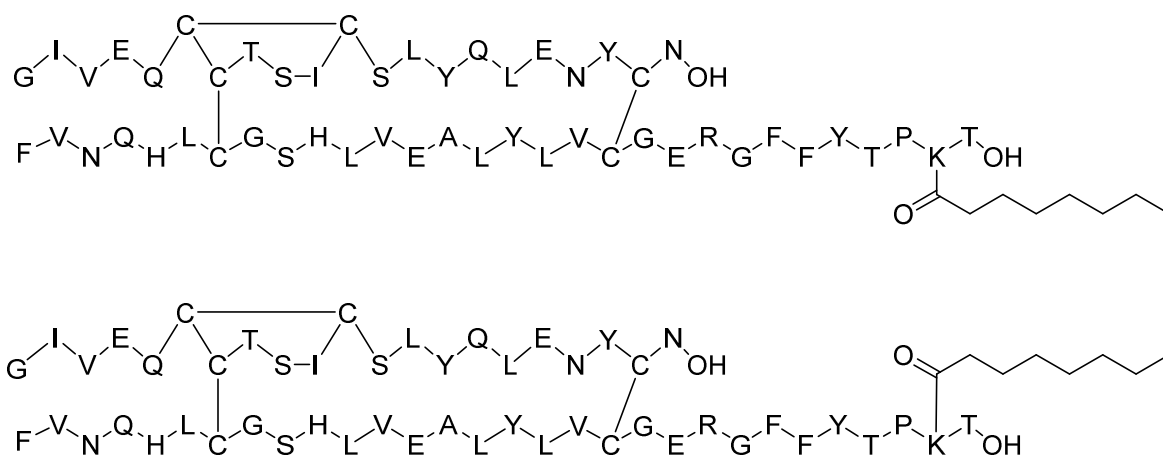
[illegible]

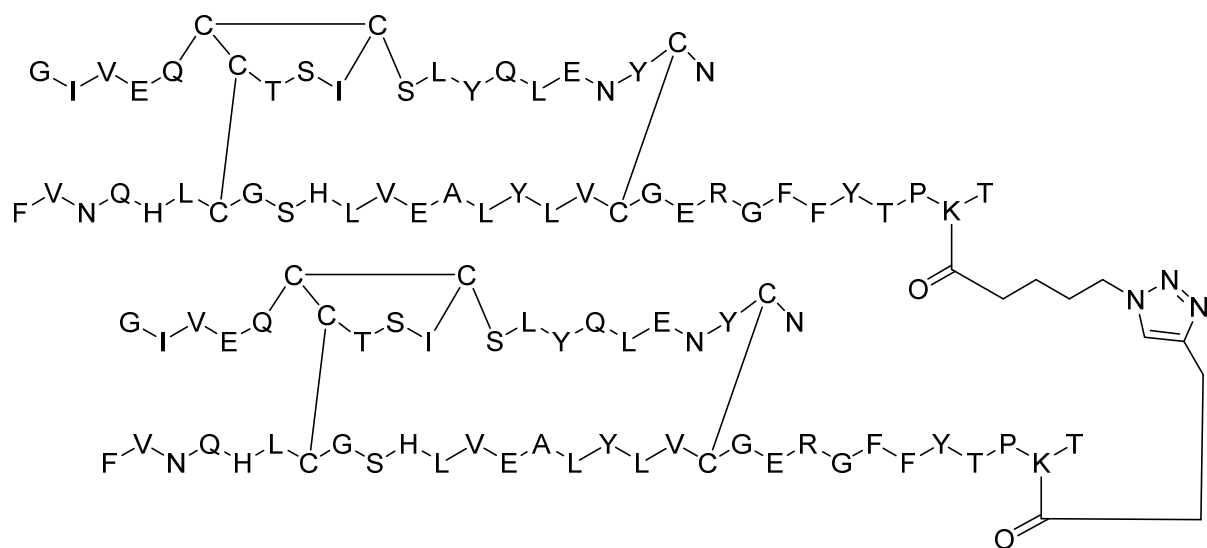
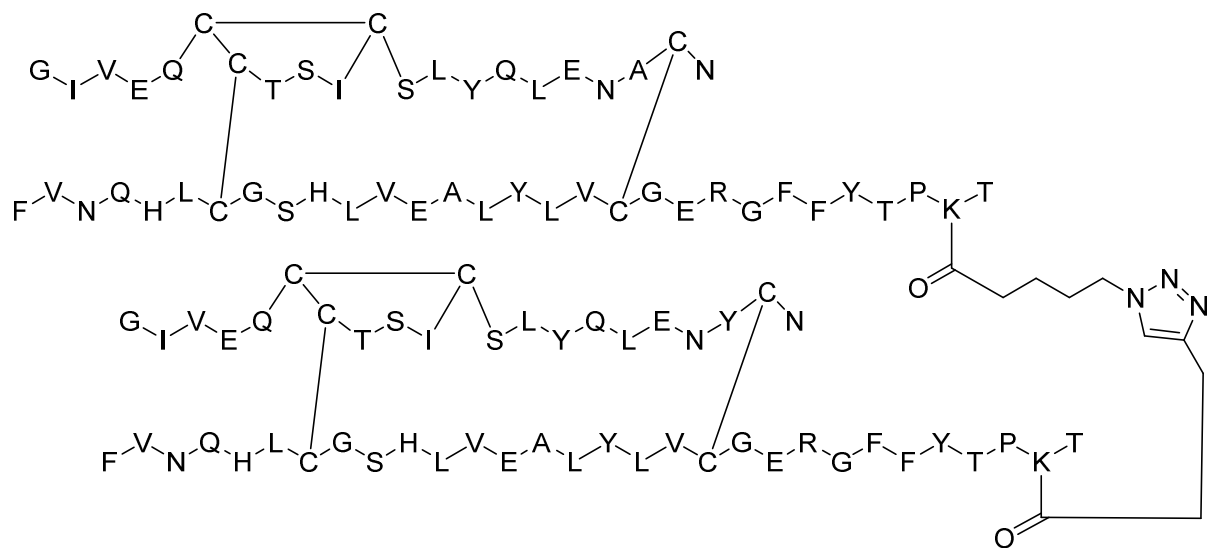
Dímero 32;

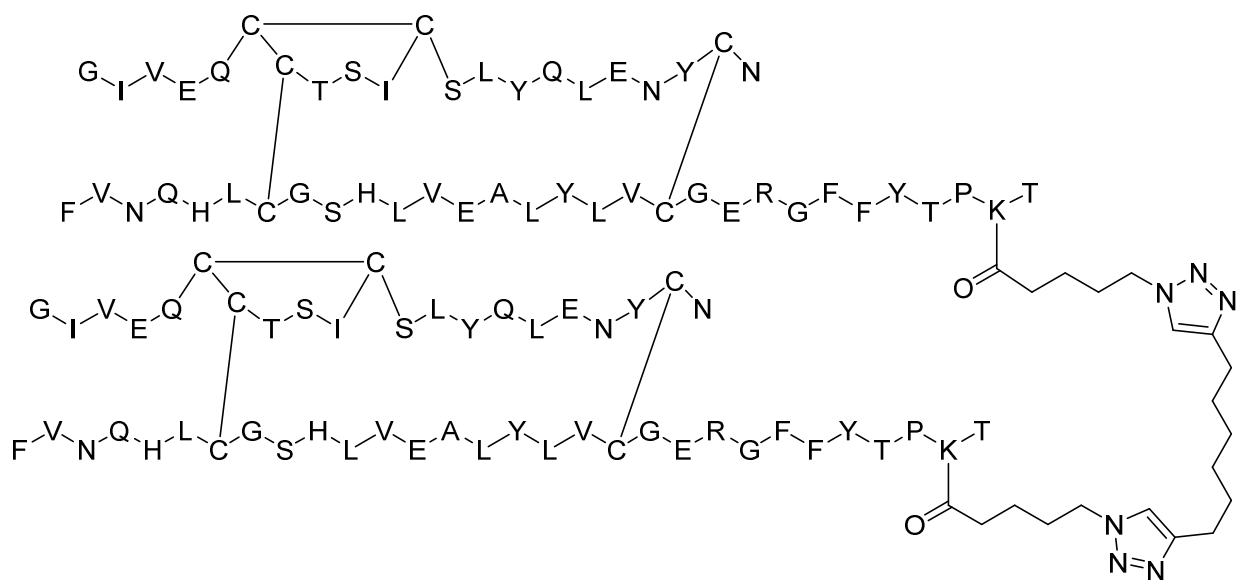
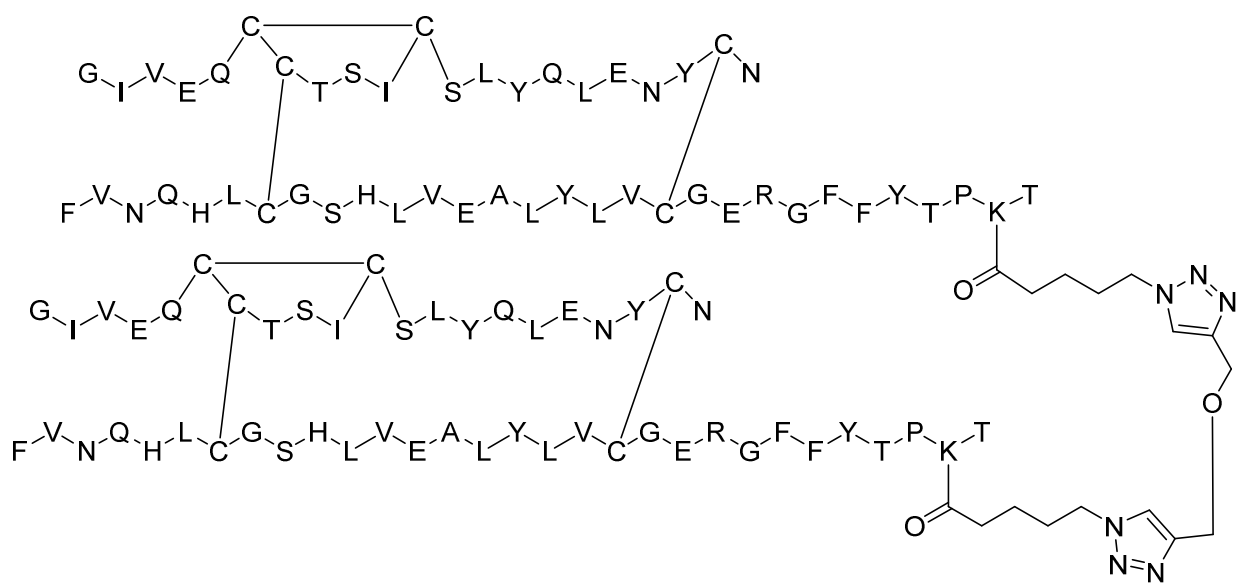


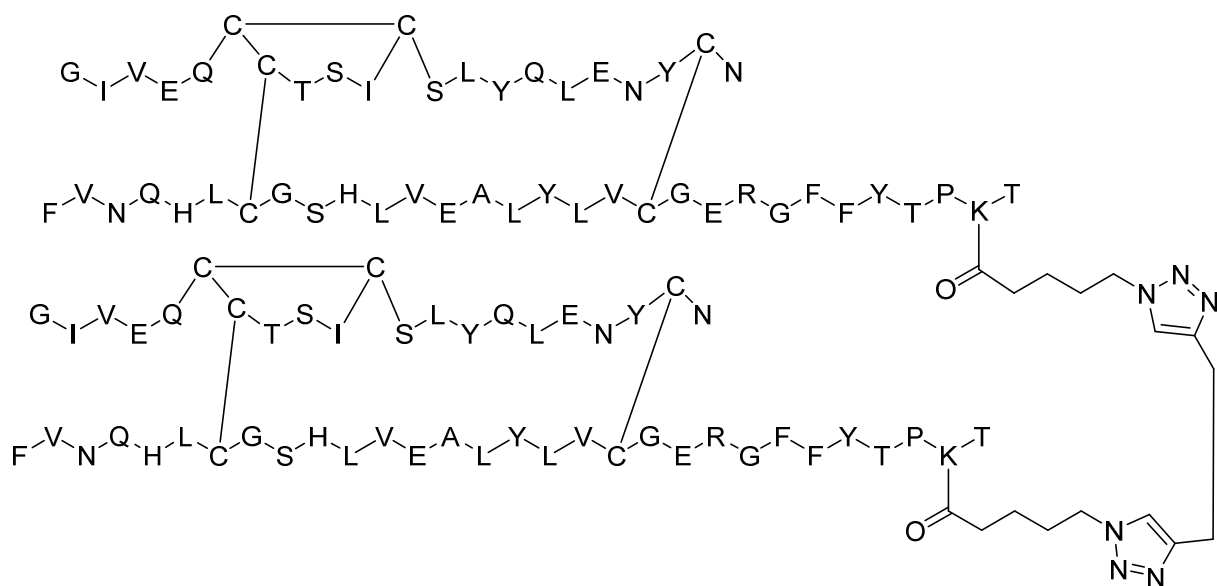
-85-

**Dímero 34;**5 **Dímero 35;****Dímero 36;**

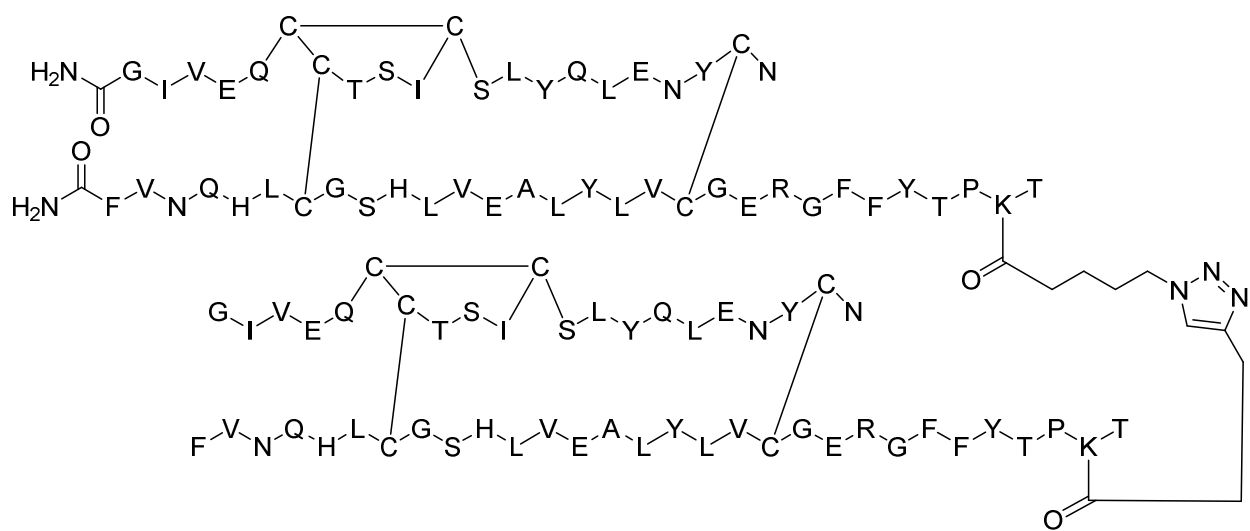
**Dímero 37;**5 **Dímero 38;****Dímero 39;**

**Dímero 40;****5 Dímero 41;**

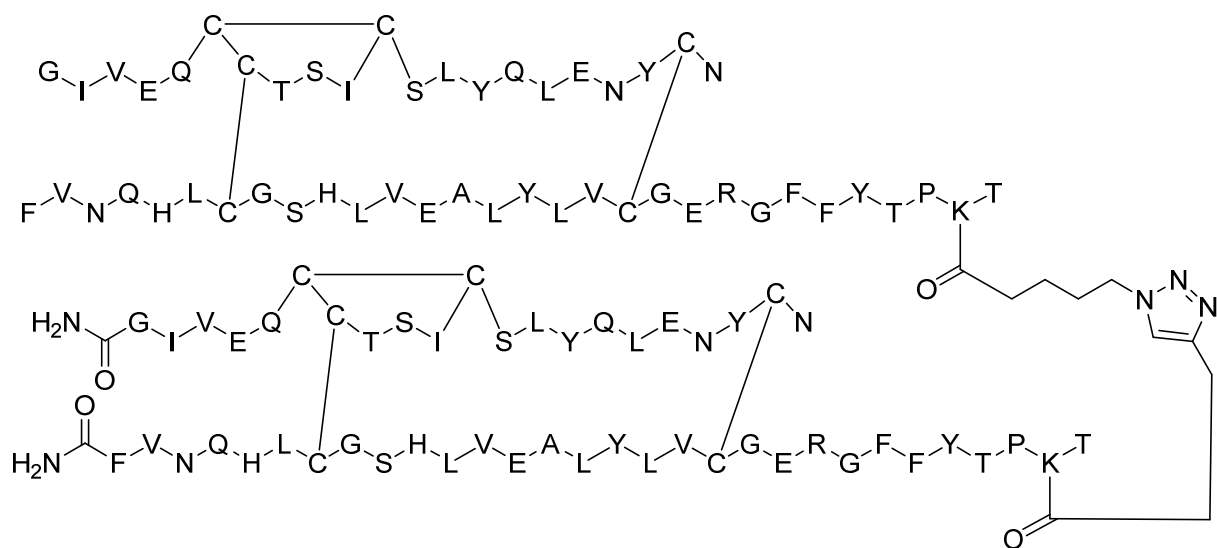
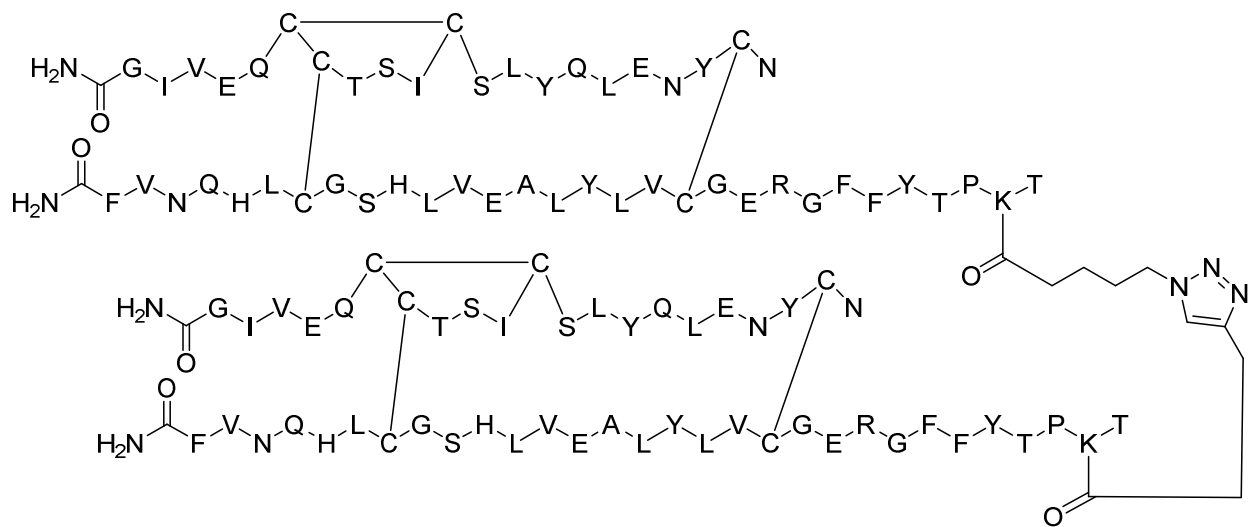
**Dímero 42;****5 Dímero 43;**

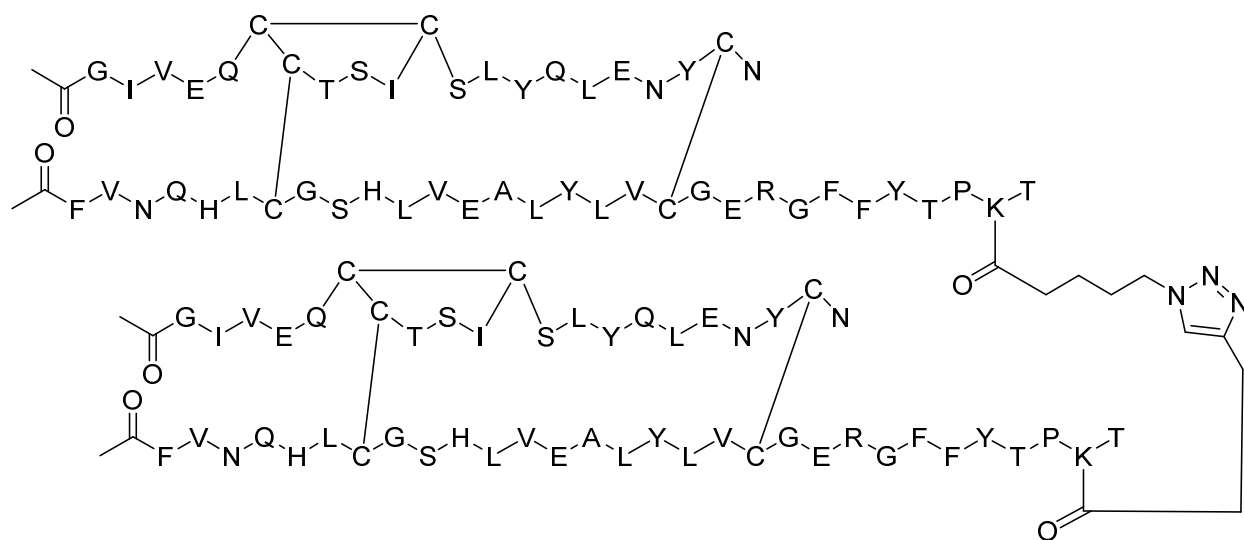
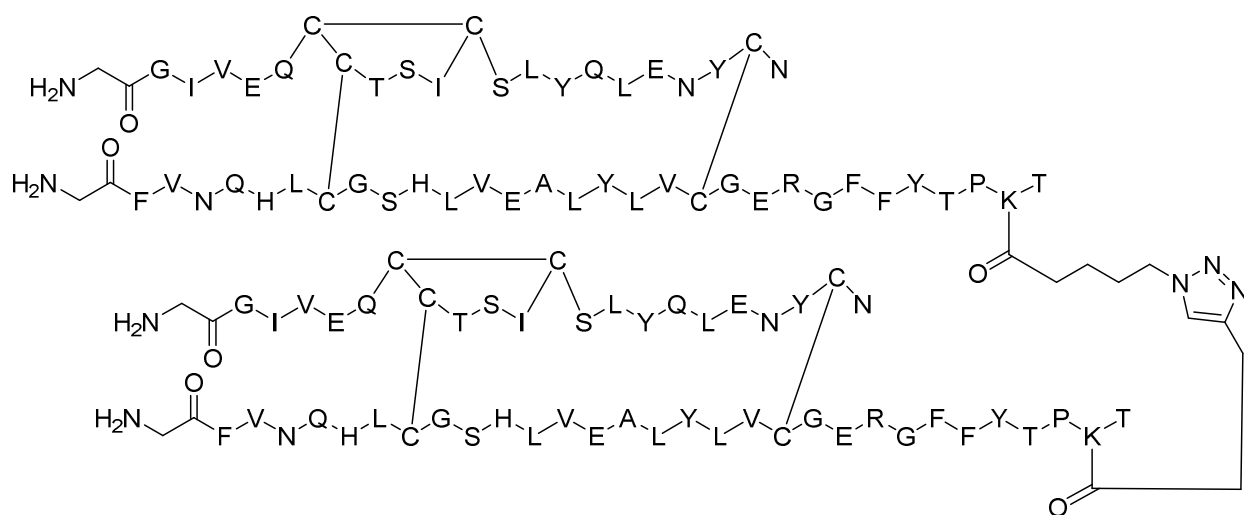
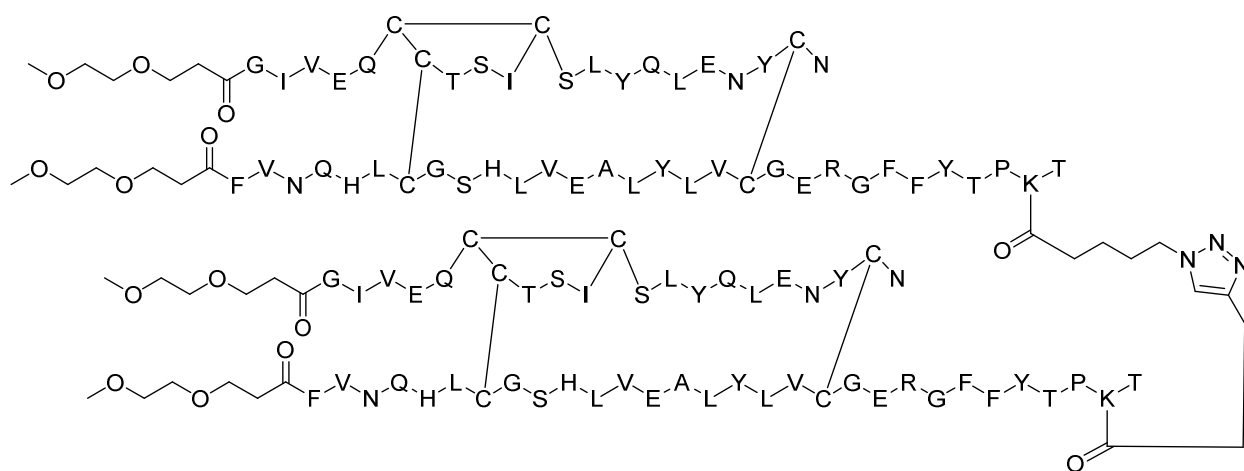


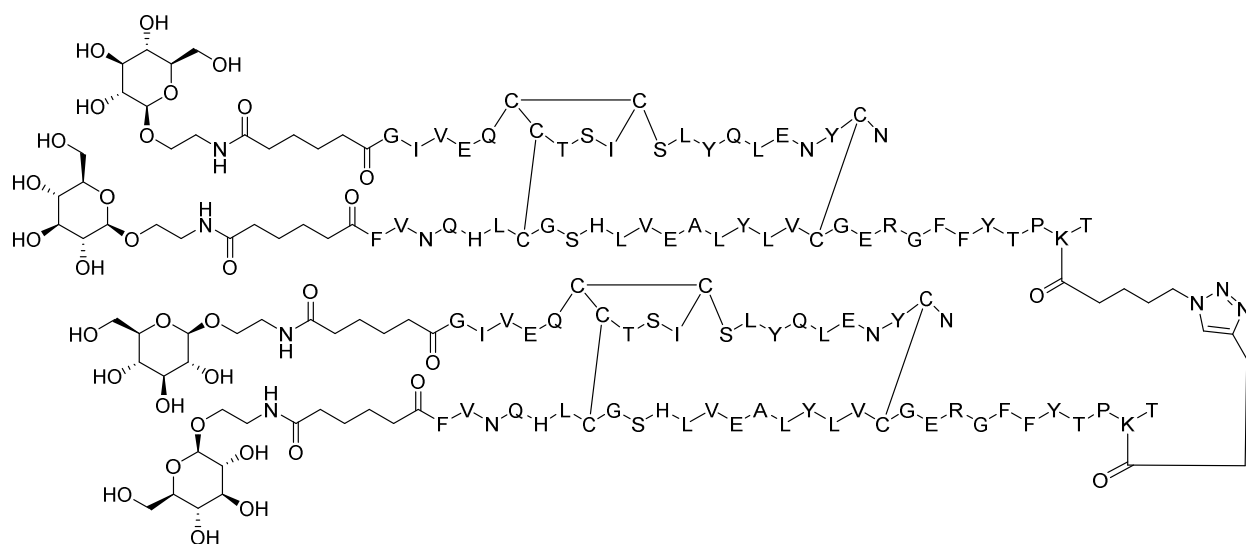
Dímero 44;



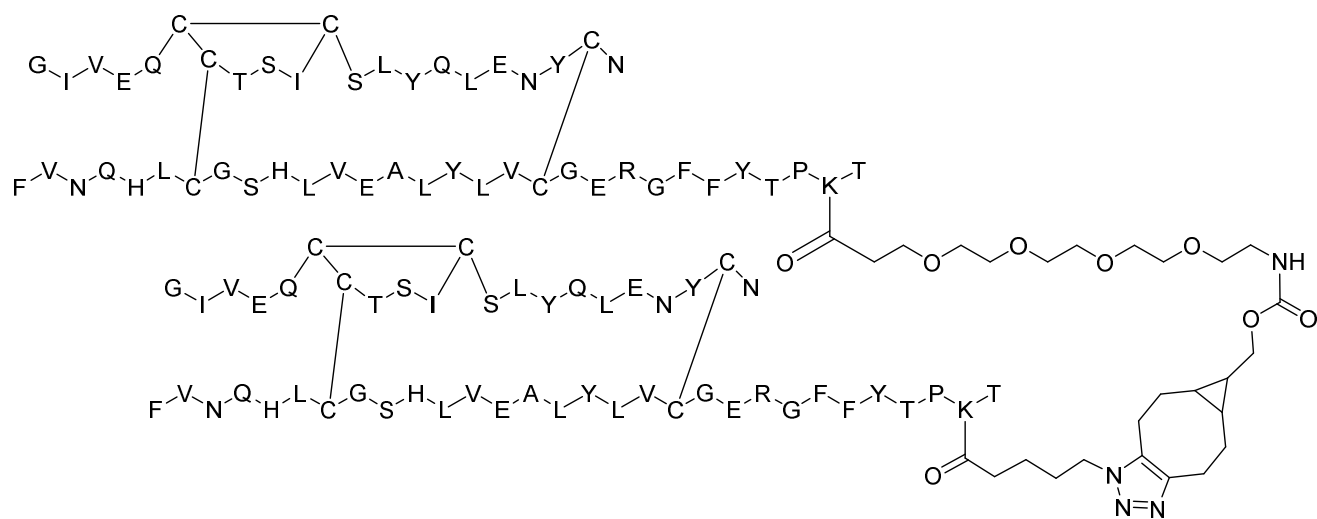
5 Dímero 45;

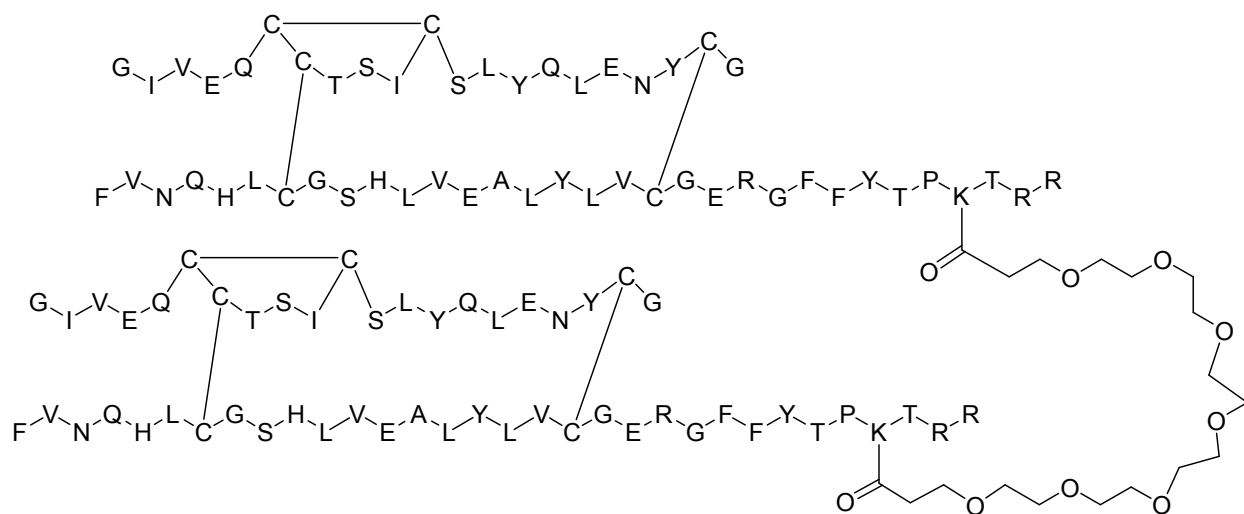
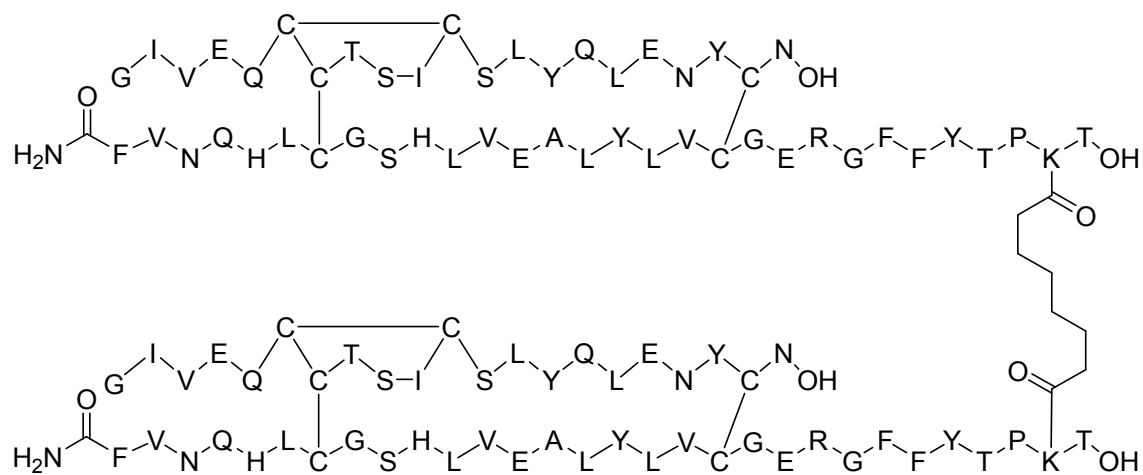
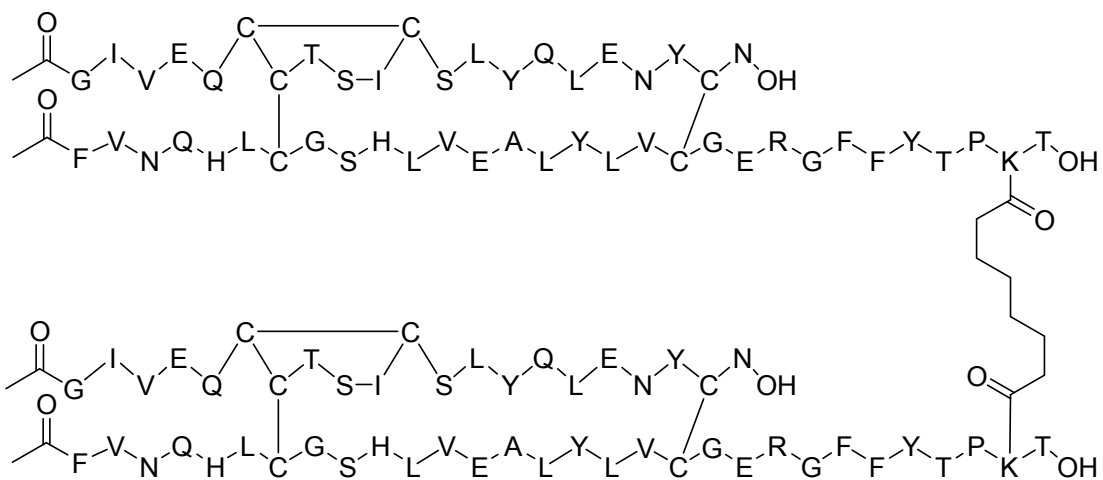
**Dímero 46;****5 Dímero 47;**

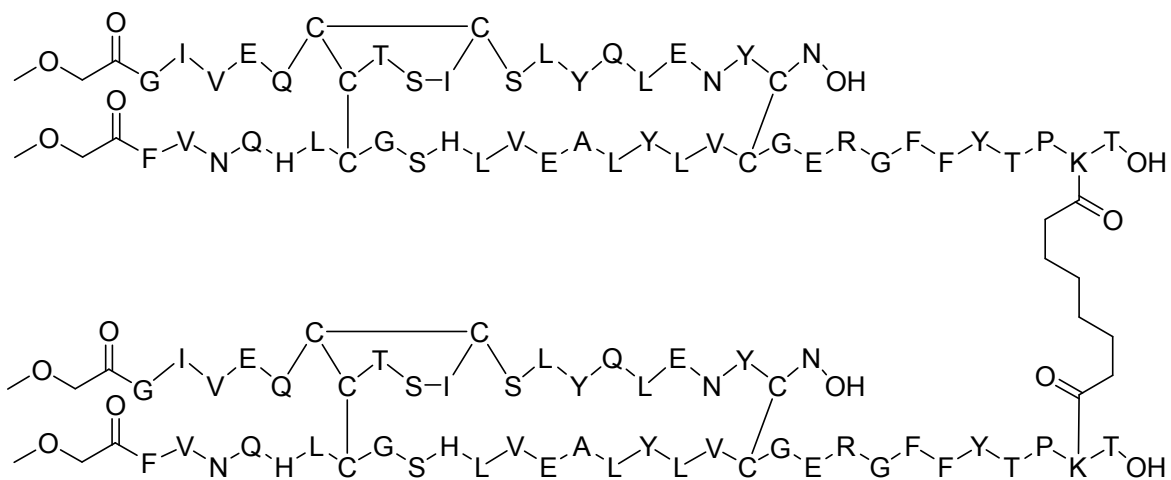
**Dímero 48;****5 Dímero 49;****Dímero 50;**

**Dímero 51;**

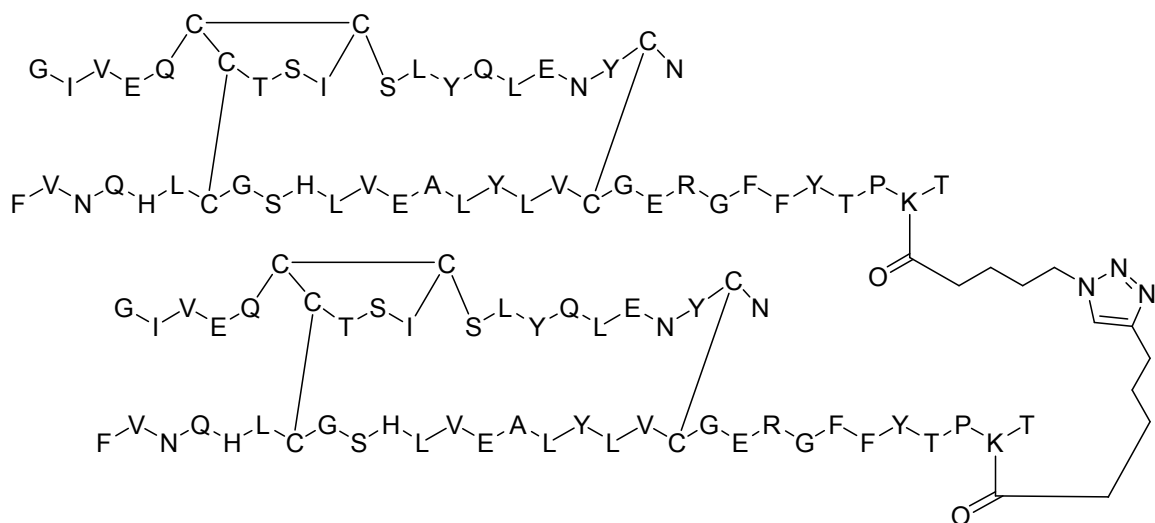
5

**Dímero 52;**

**Dímero 53;****Dímero 54;****Dímero 55;**

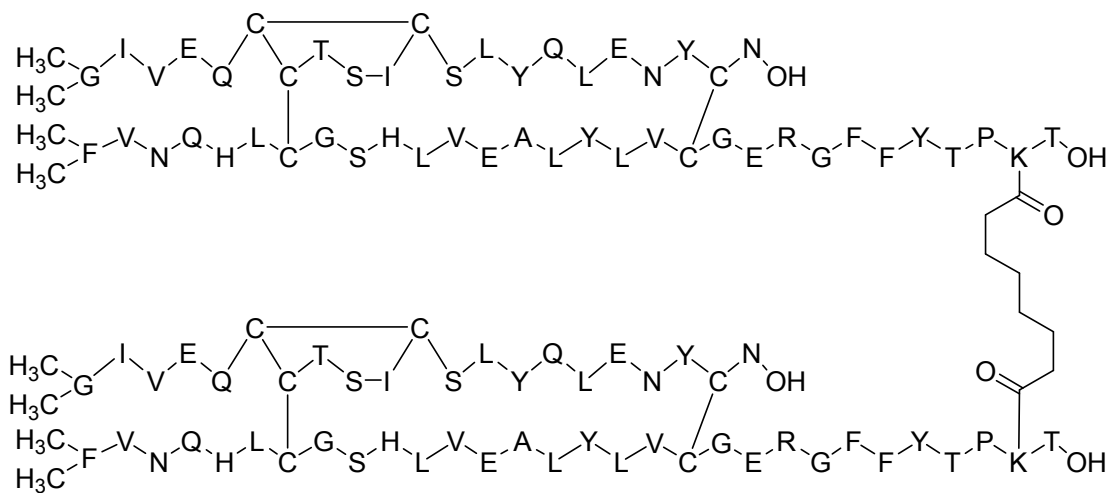


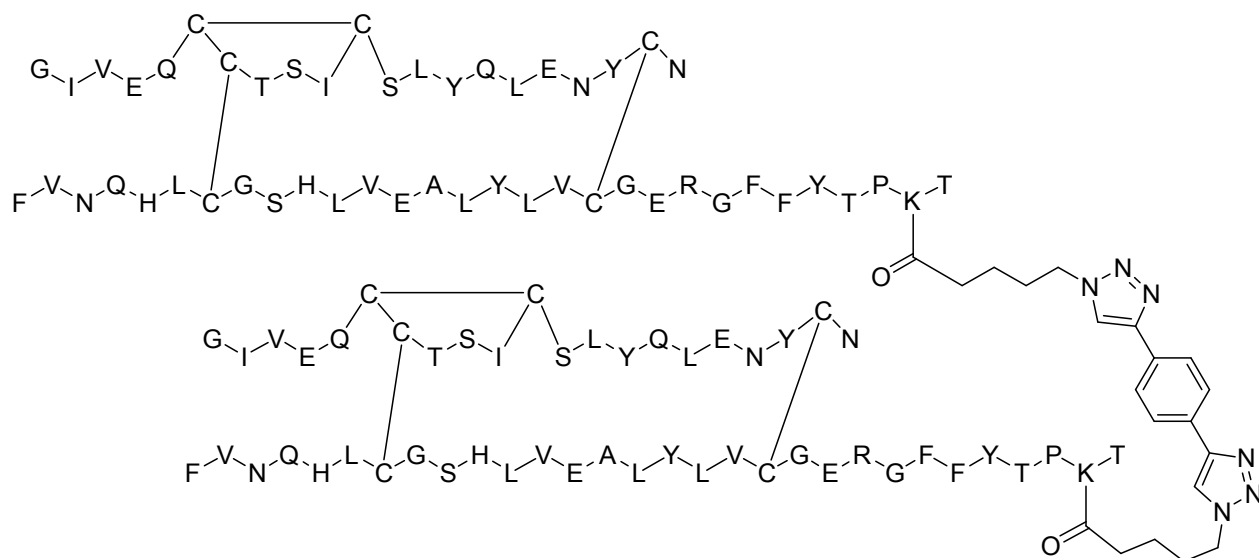
Dímero 56;



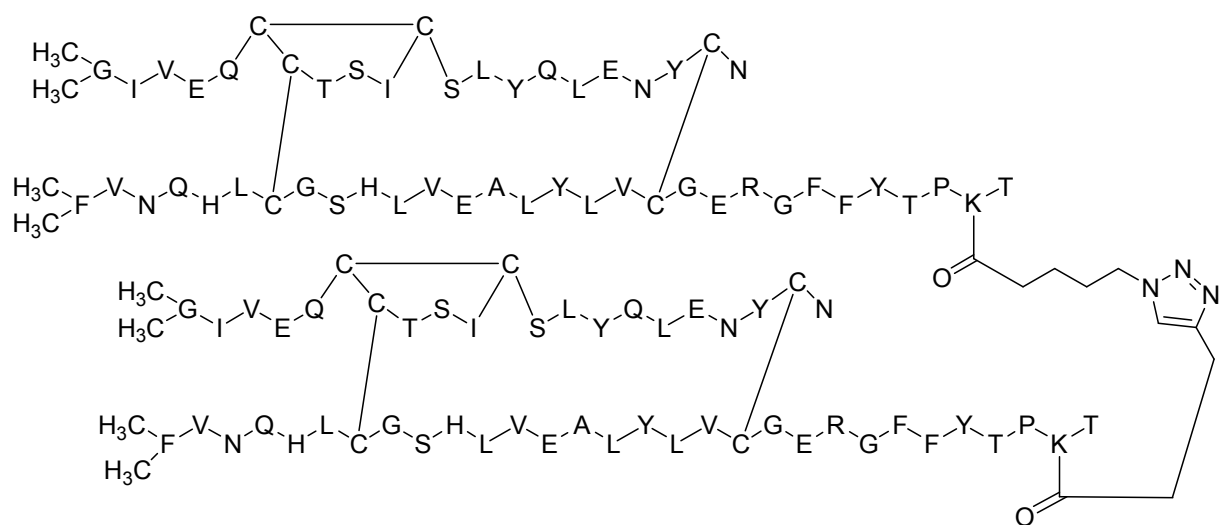
5

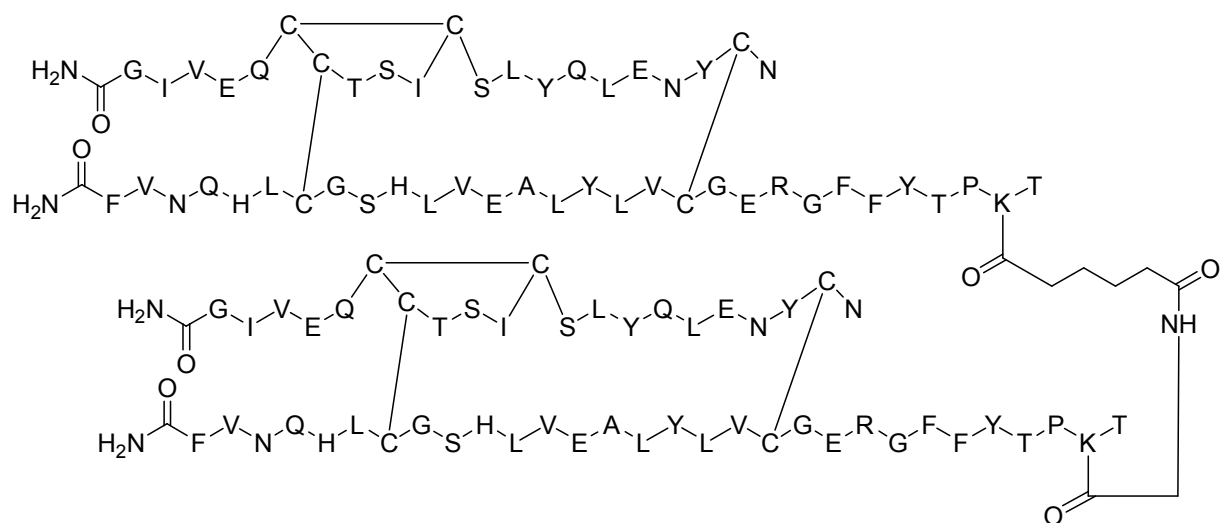
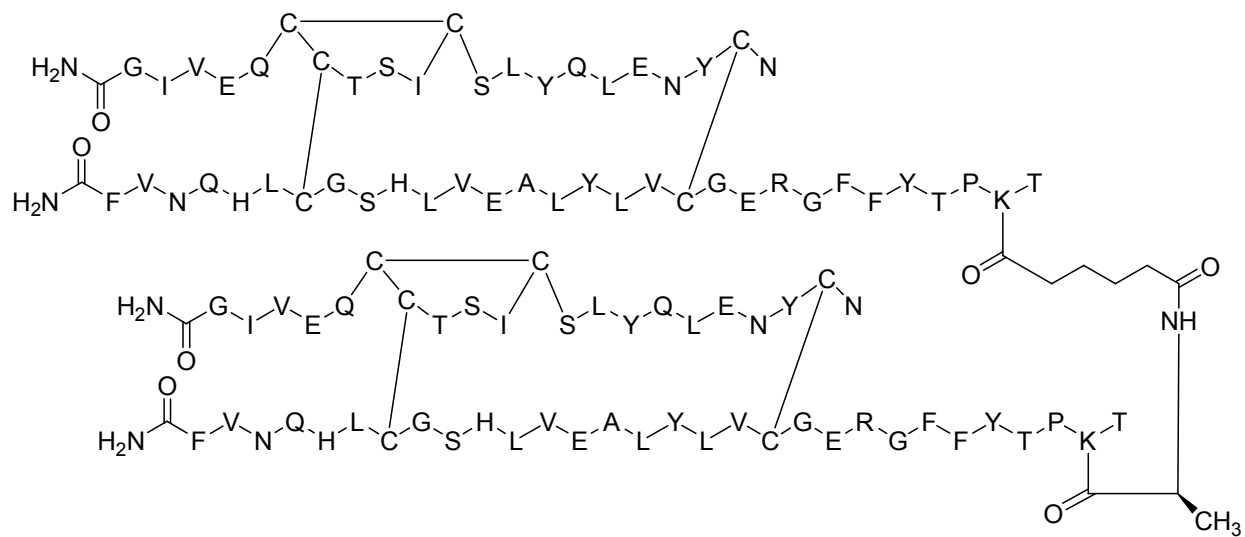
Dímero 57;

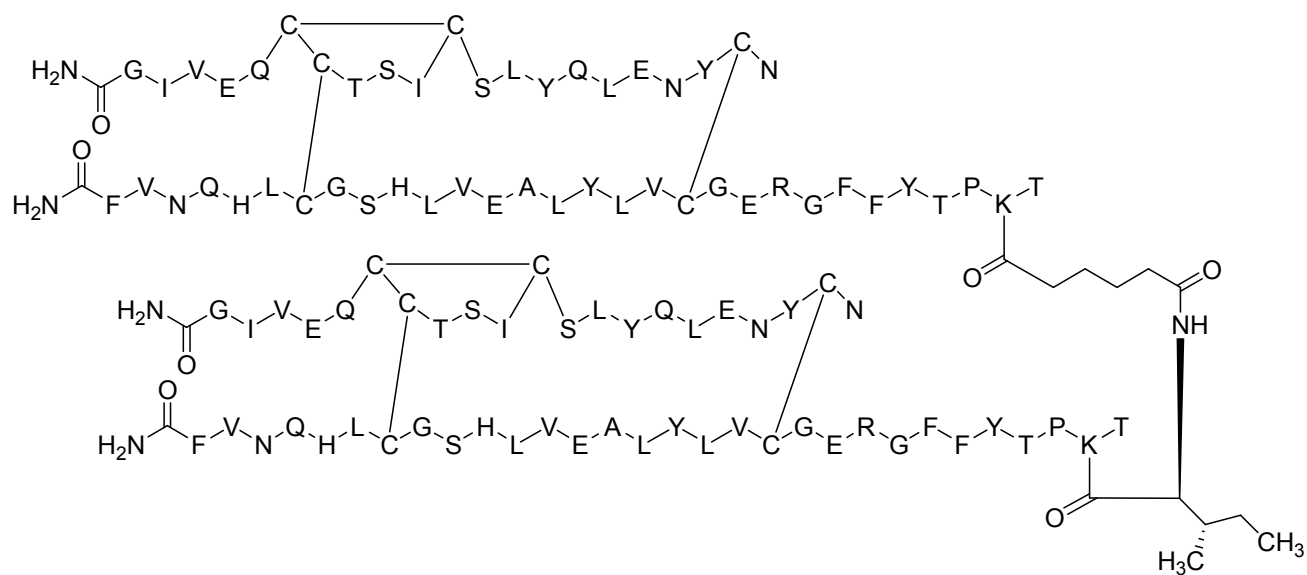
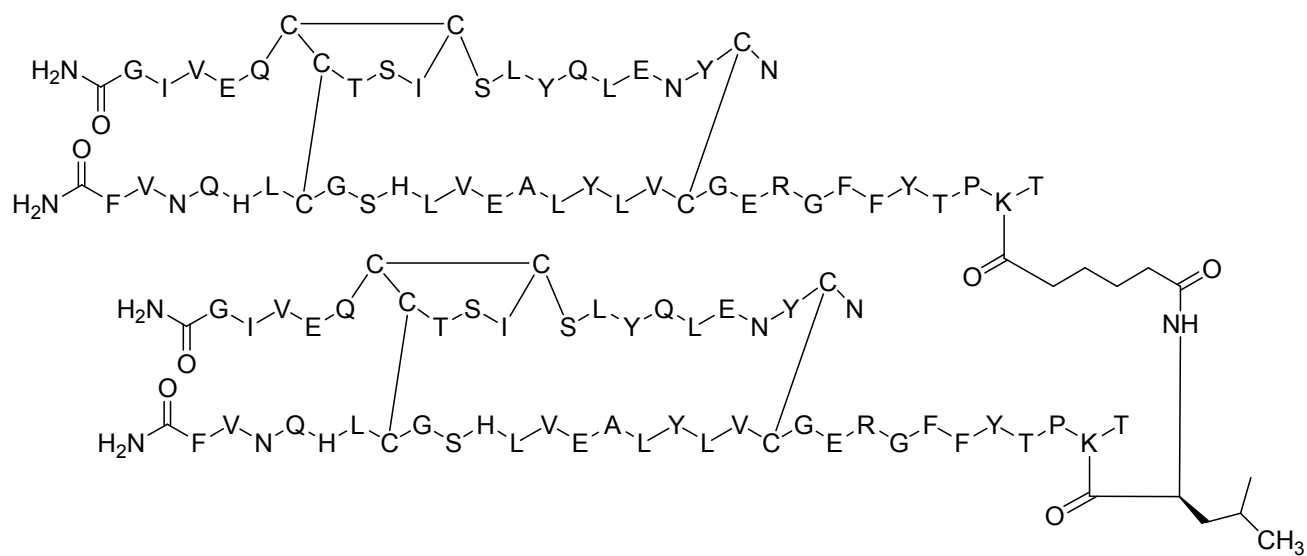


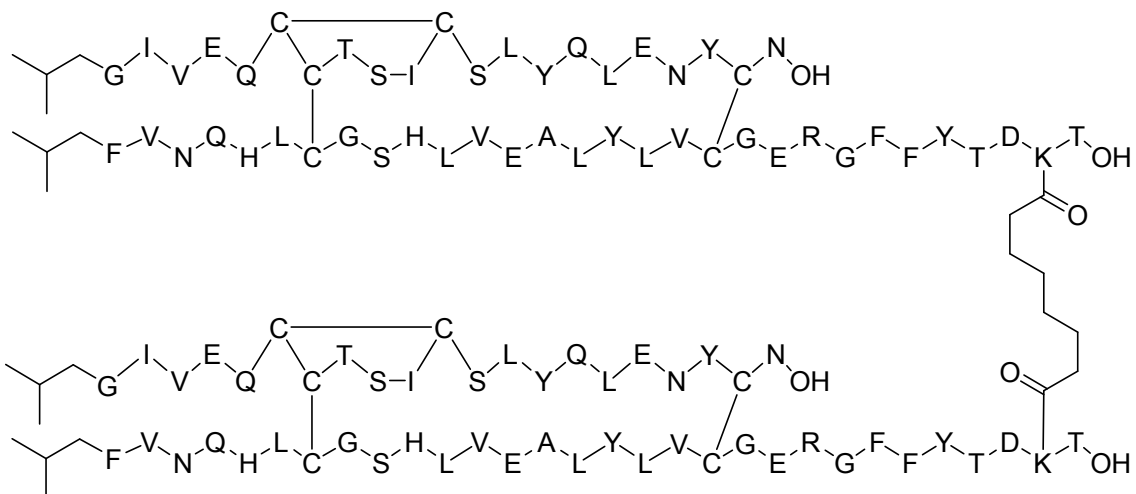
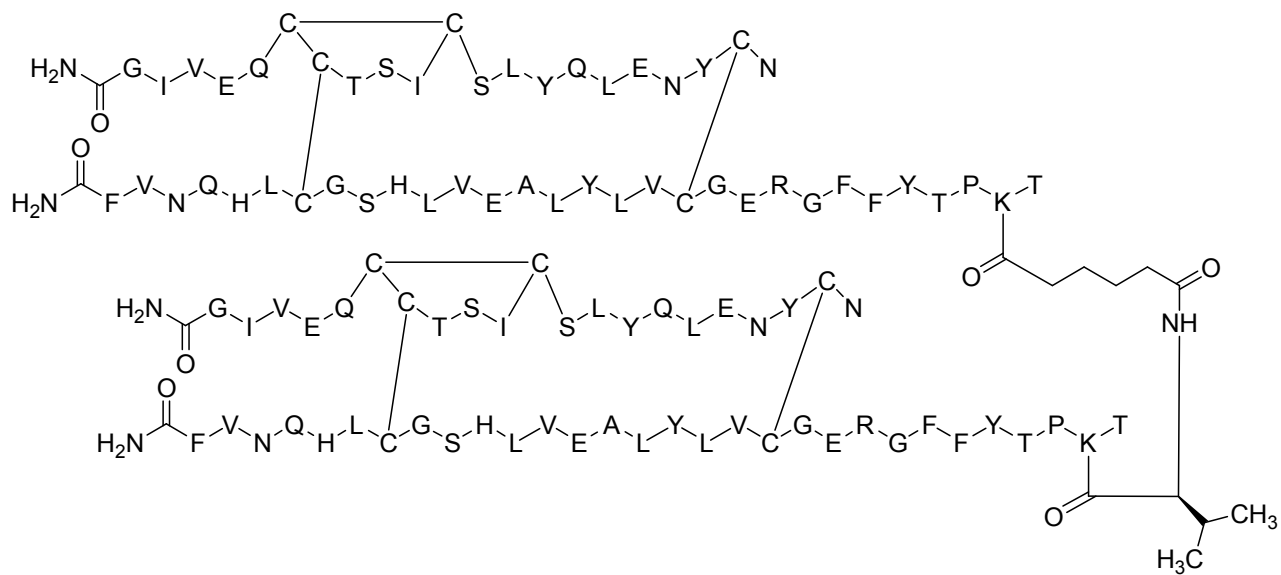
Dímero 58;**Dímero 59;**

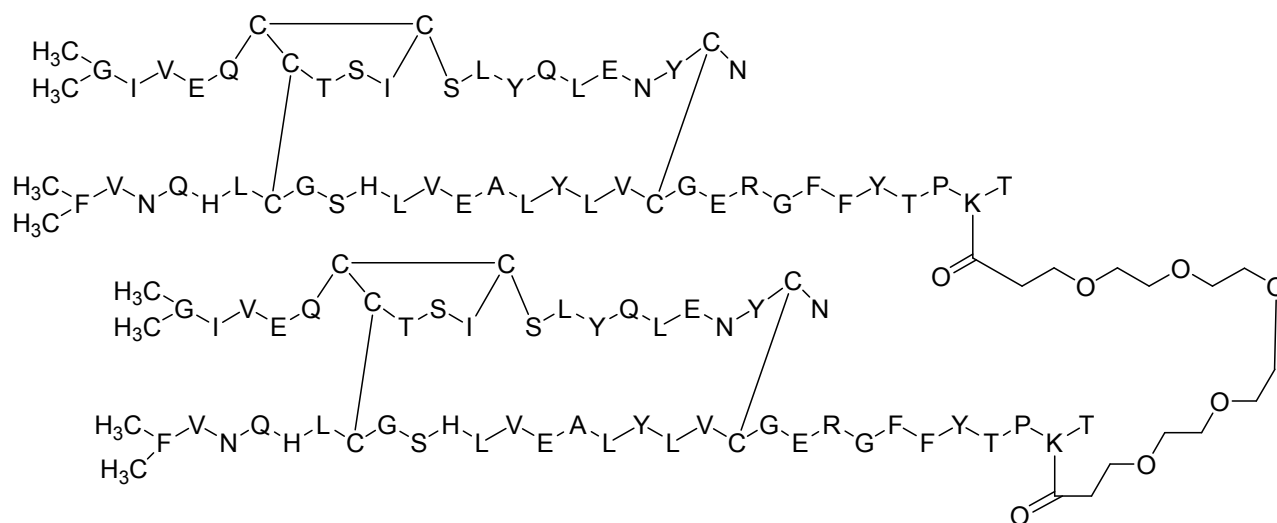
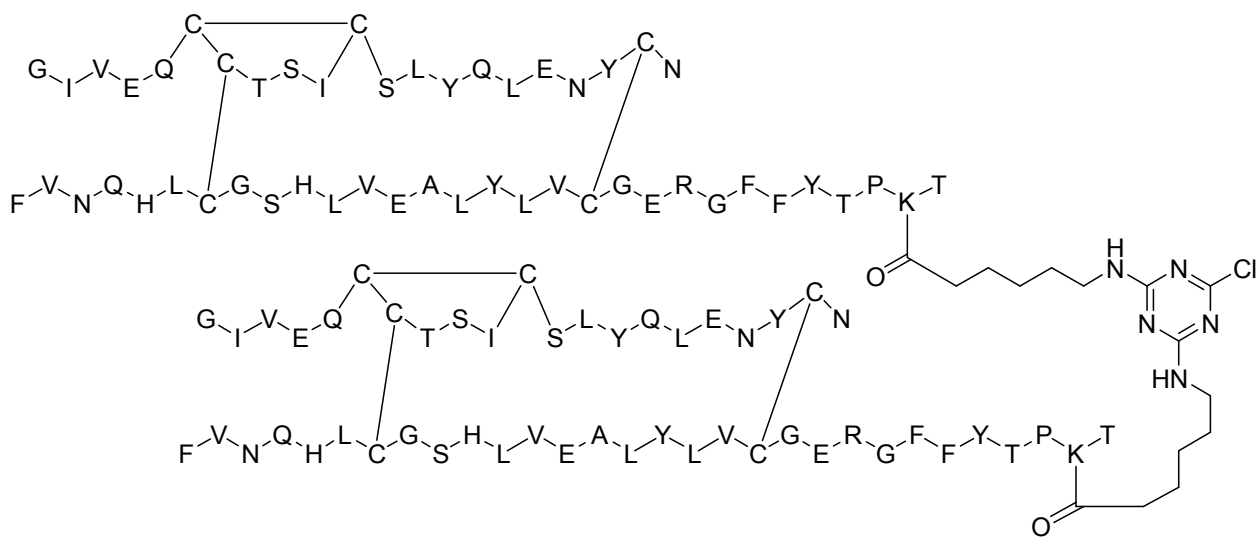
5

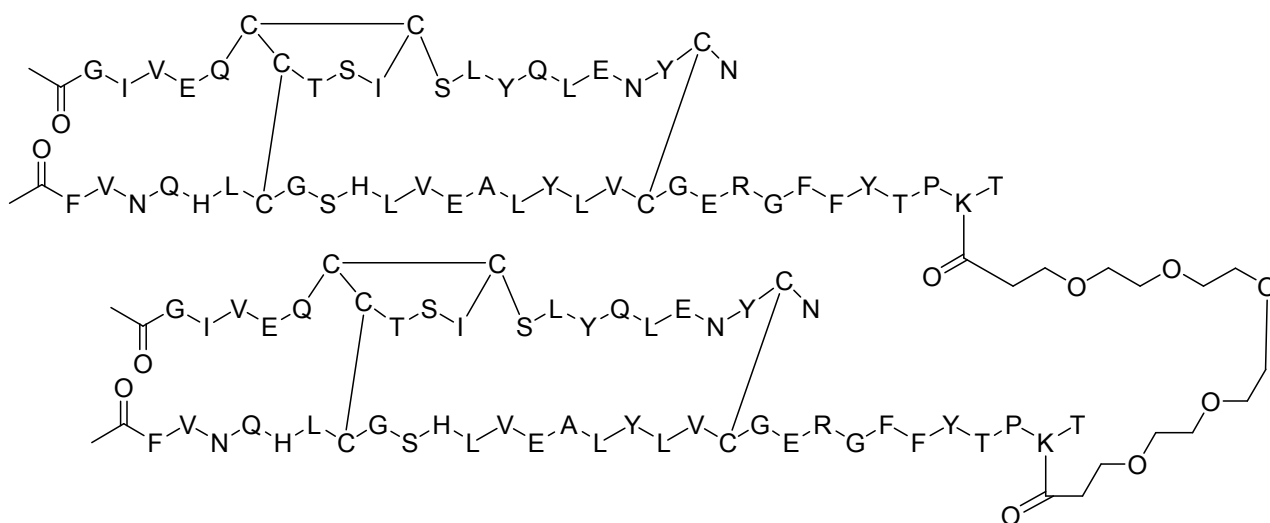
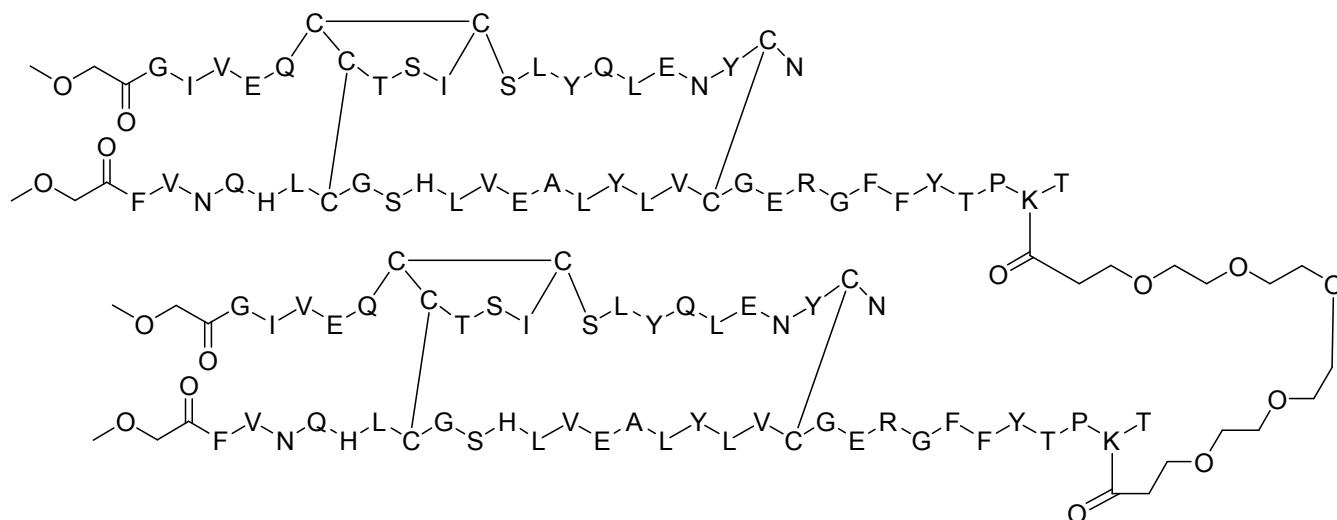
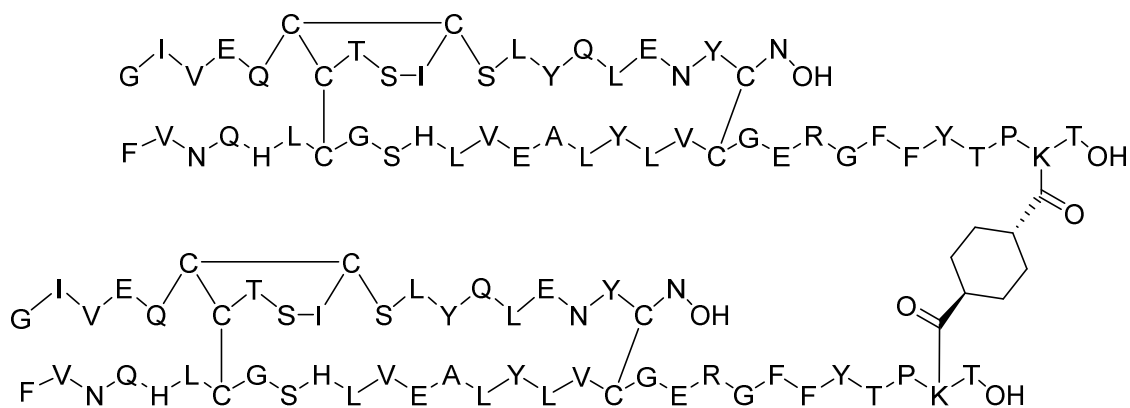
**Dímero 60;**

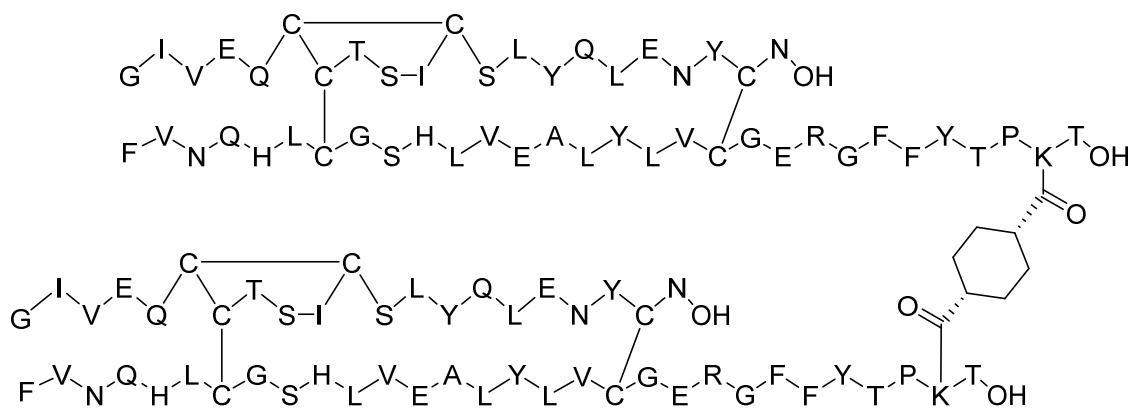
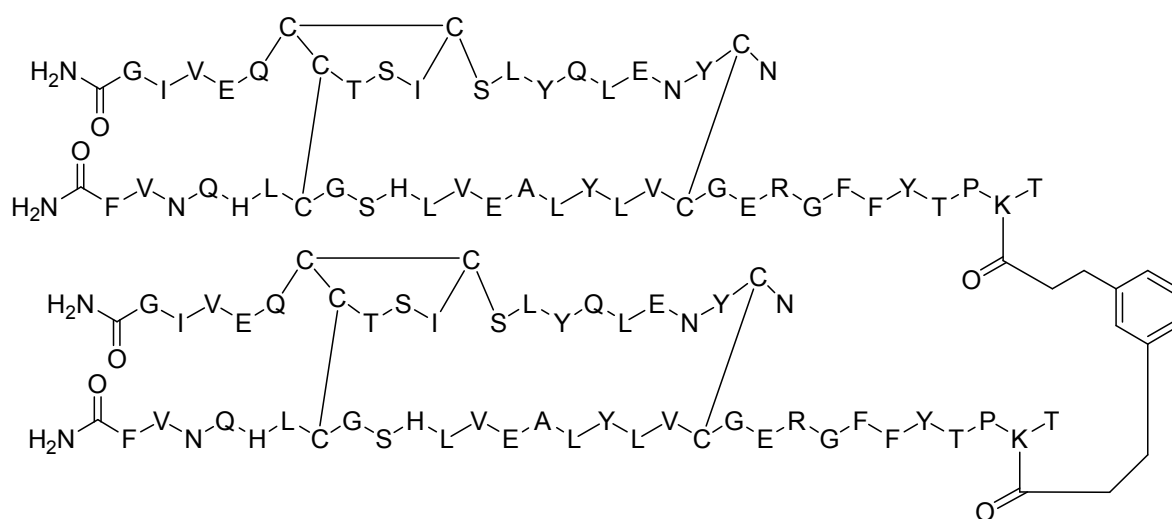
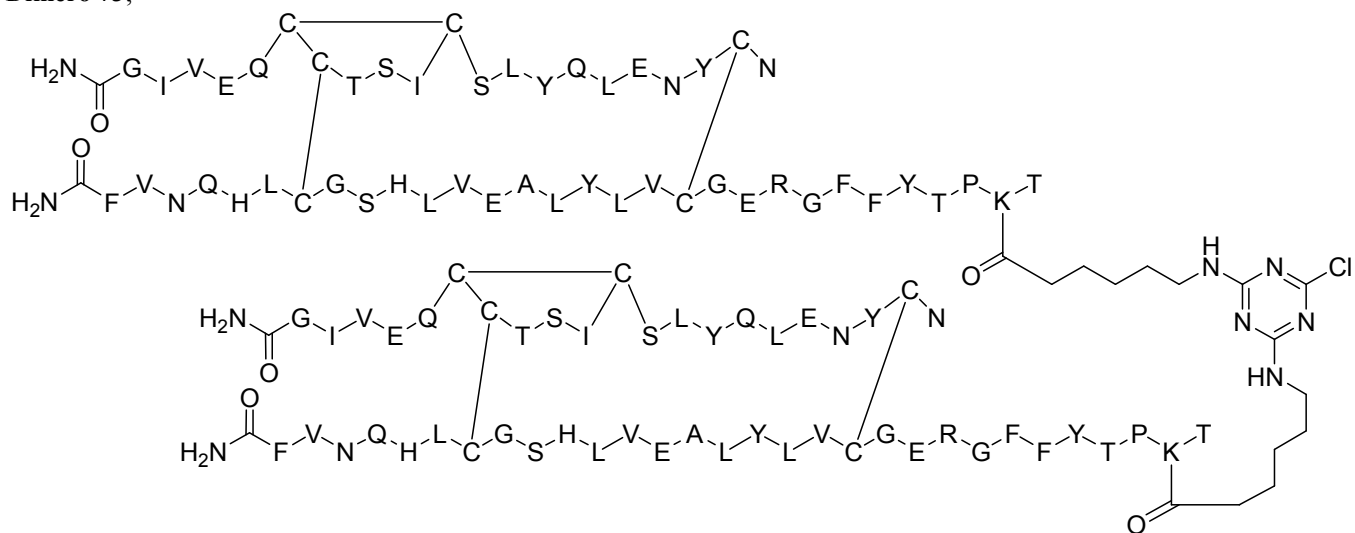
**Dímero 61;****5 Dímero 62;**

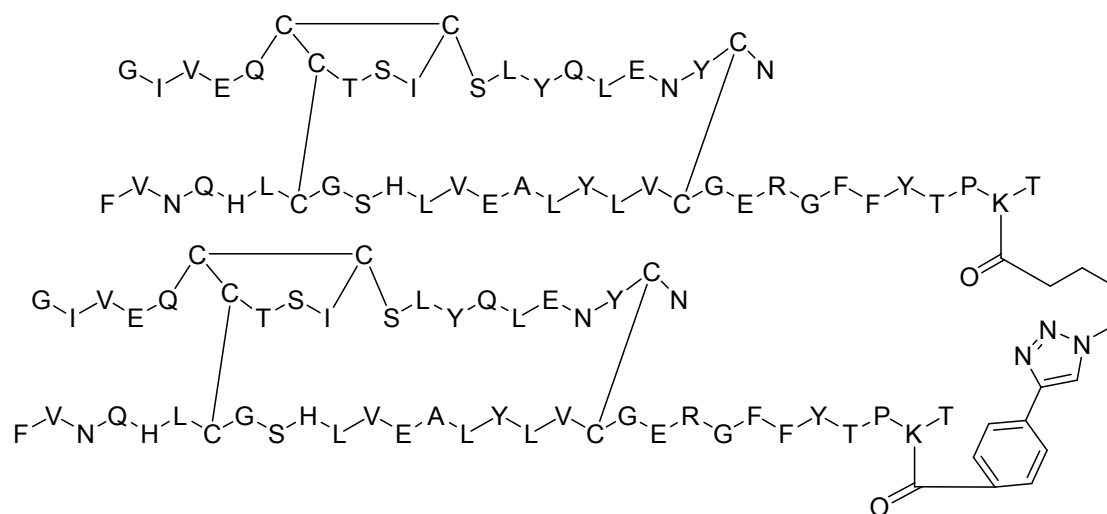
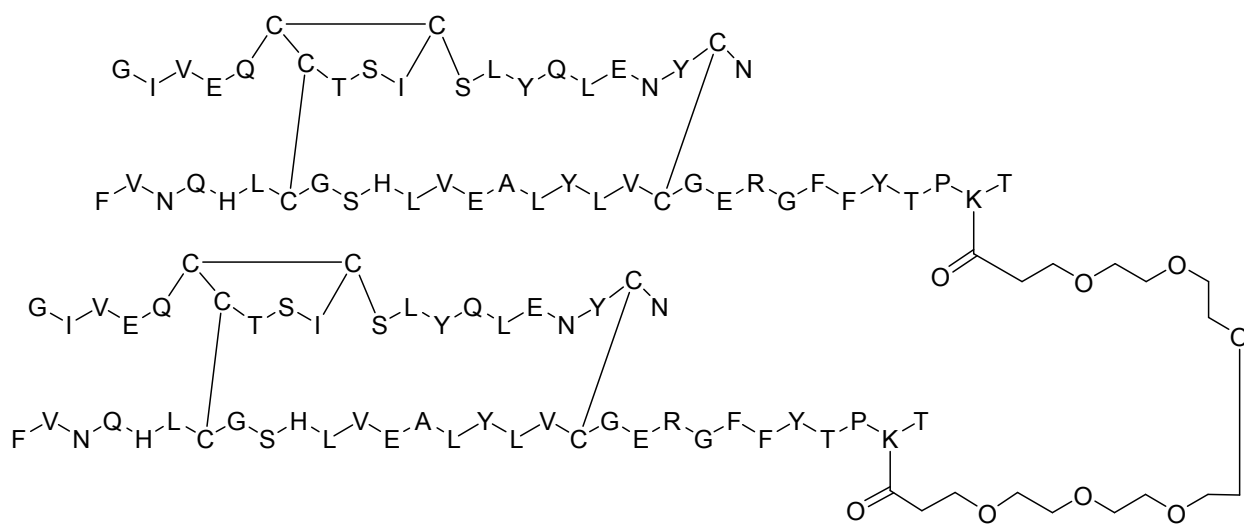
**Dímero 63;****5 Dímero 64;**

**Dímero 65;****5 Dímero 66;**

**Dímero 67;****5 Dímero 68;**

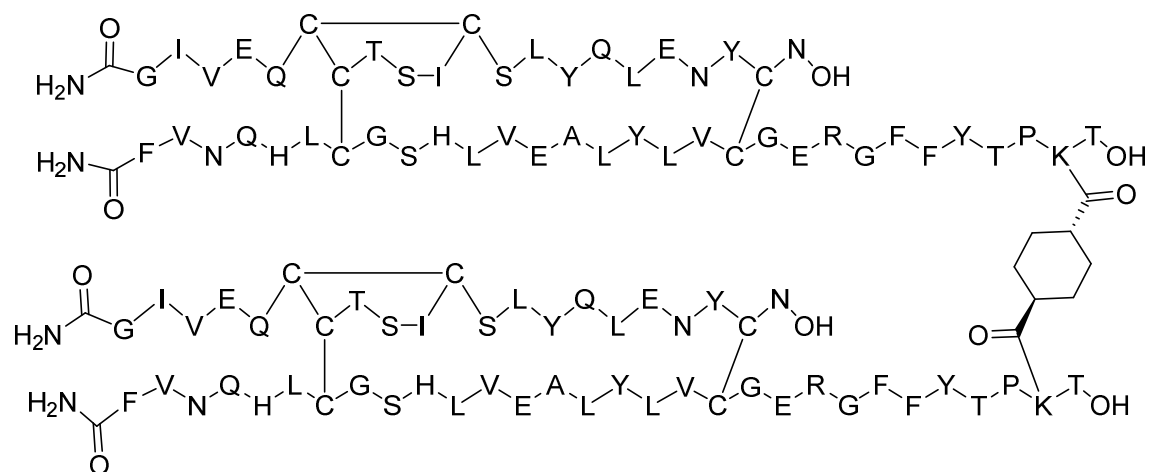
**Dímero 69;****5 Dímero 70;****Dímero 71;**

**Dímero 72;****5 Dímero 73;****Dímero 74;**

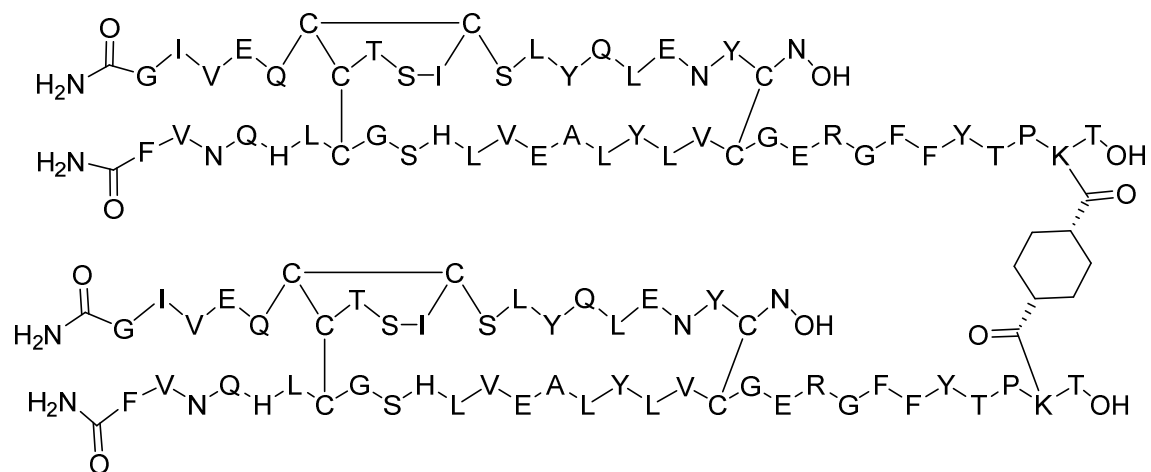
**Dímero 75;**

5

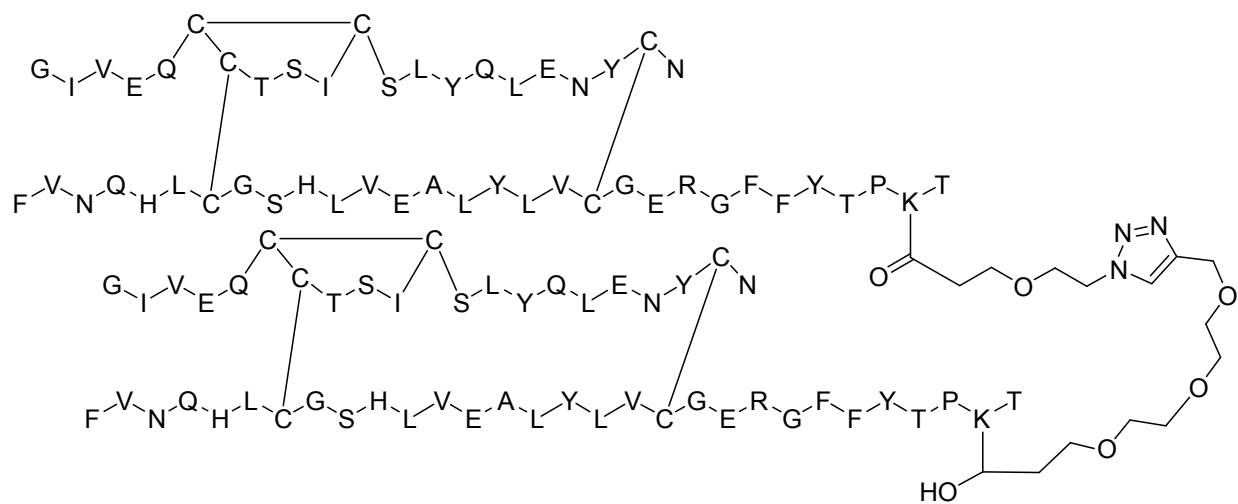
Dímero 76;



Dímero 77;

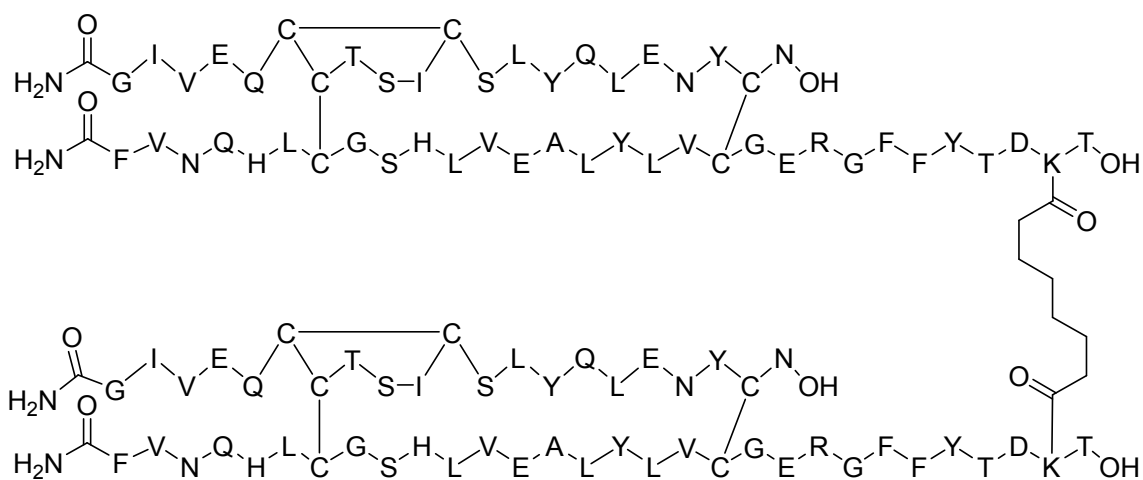
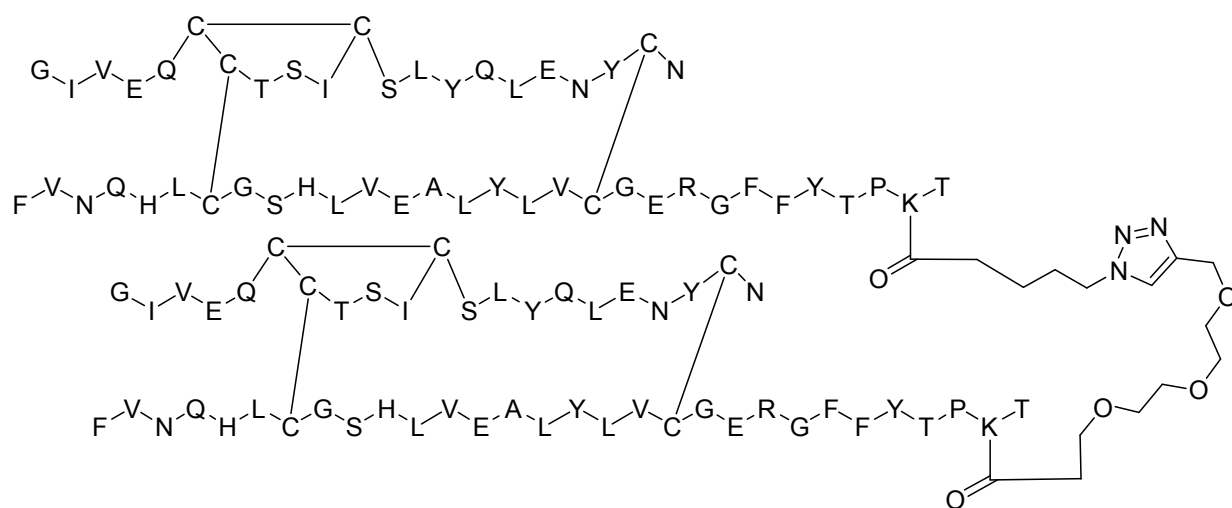


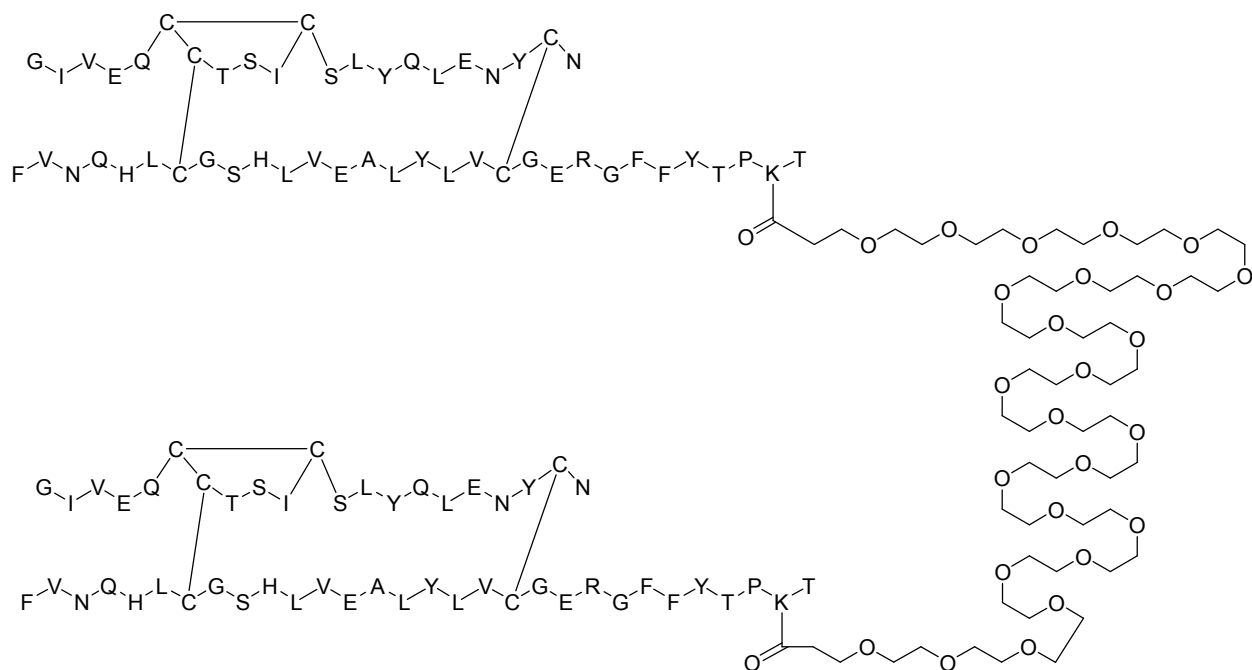
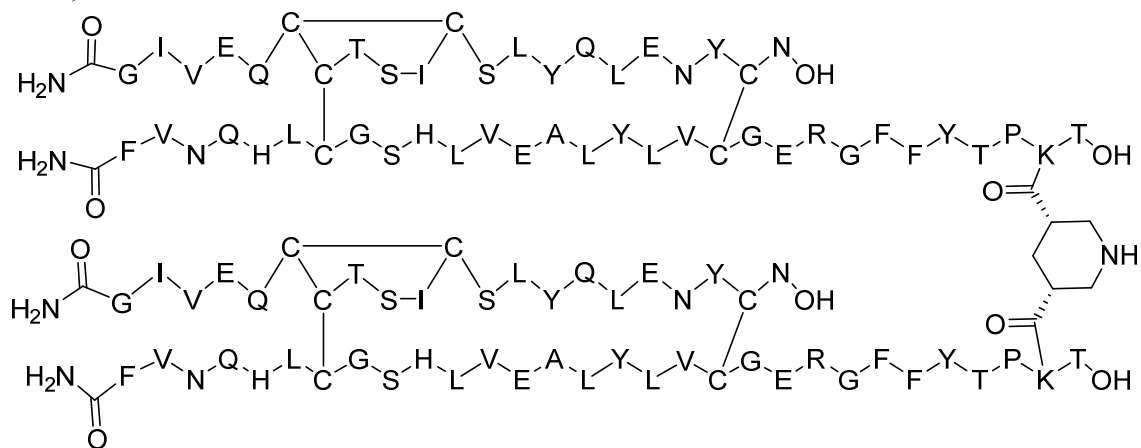
5 Dimer78;

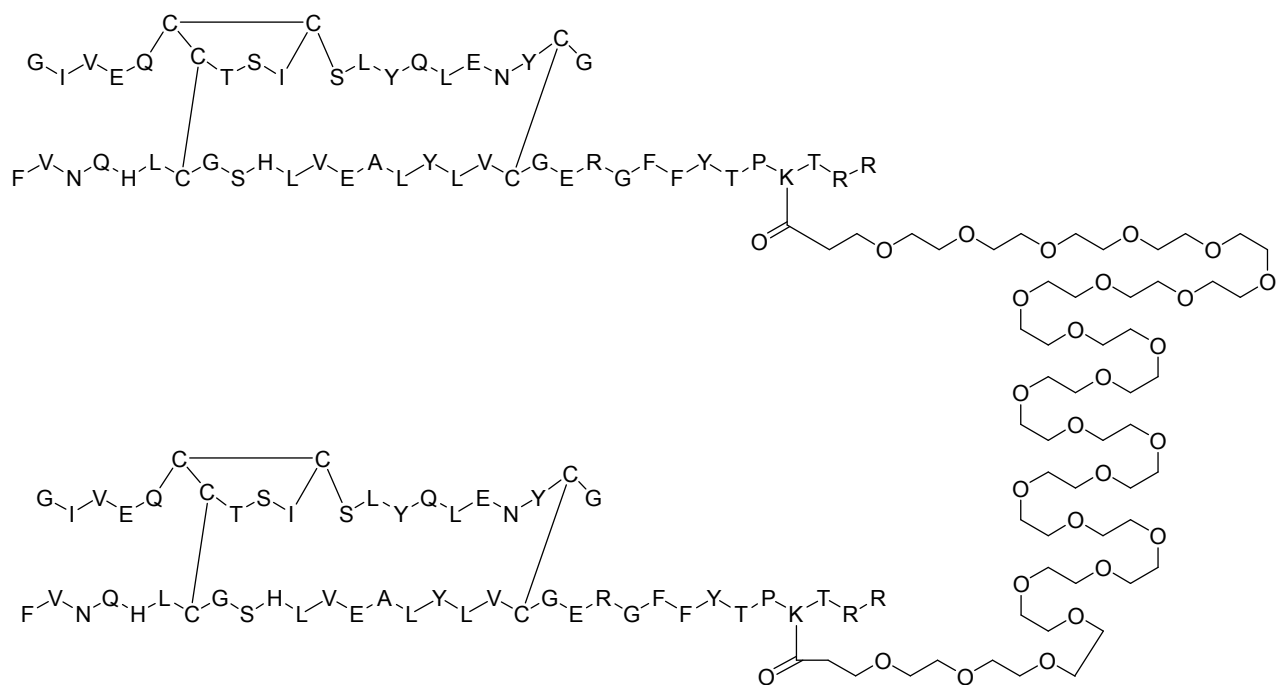


Dímero 79;

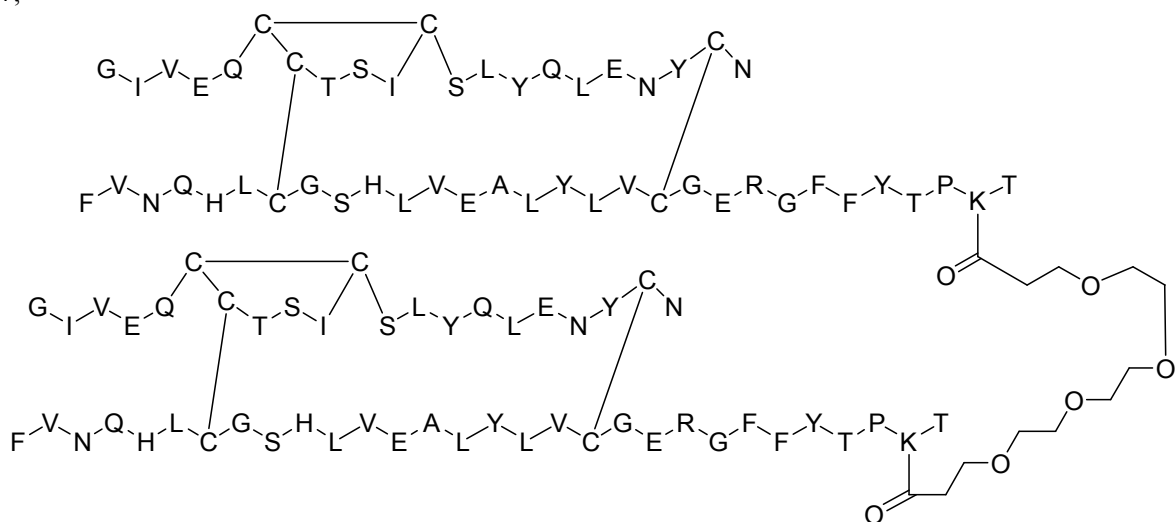
-105-

**Dímero 83;****5 Dímero 84;**

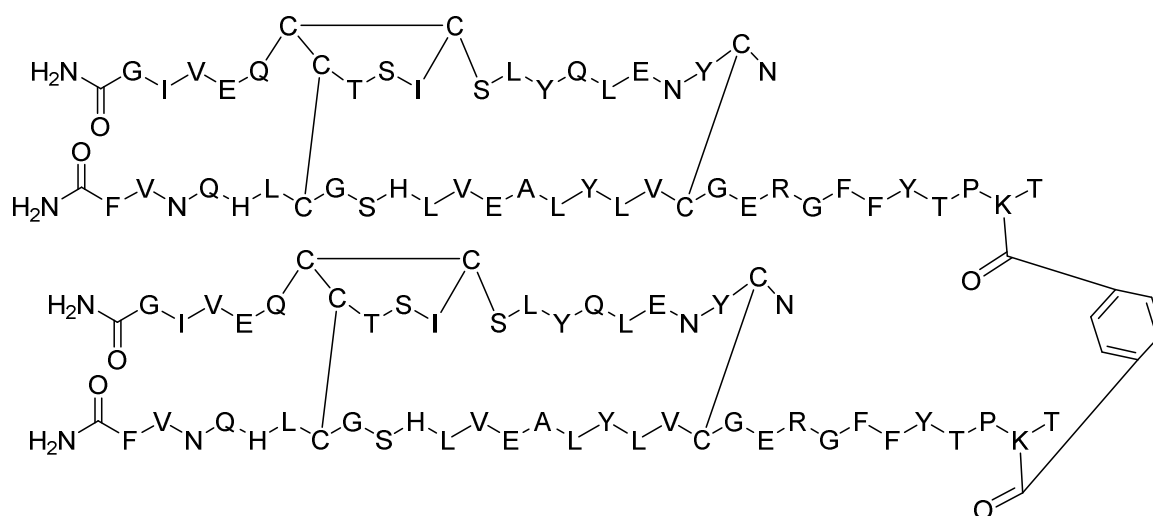
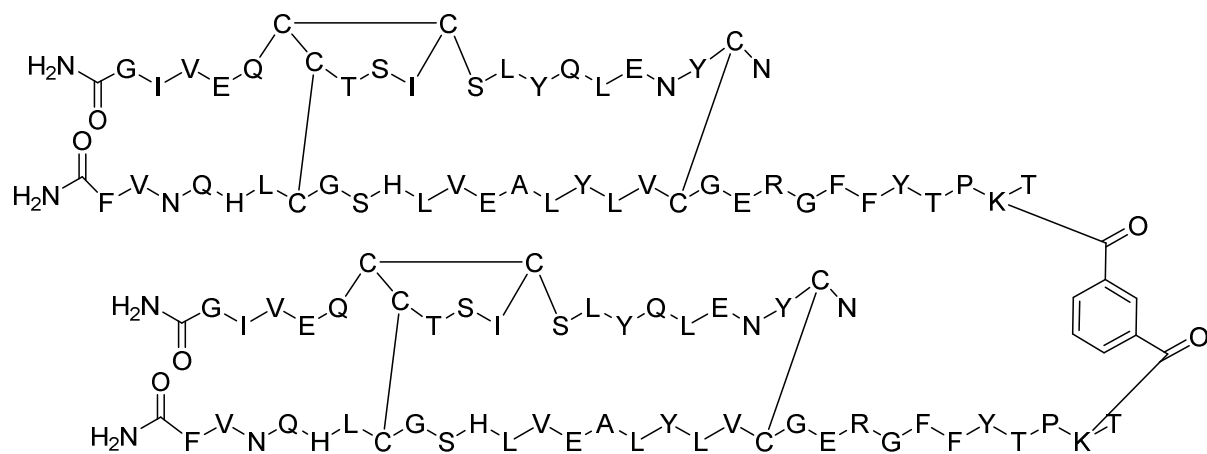
**Dímero 85;****Dímero 86;**

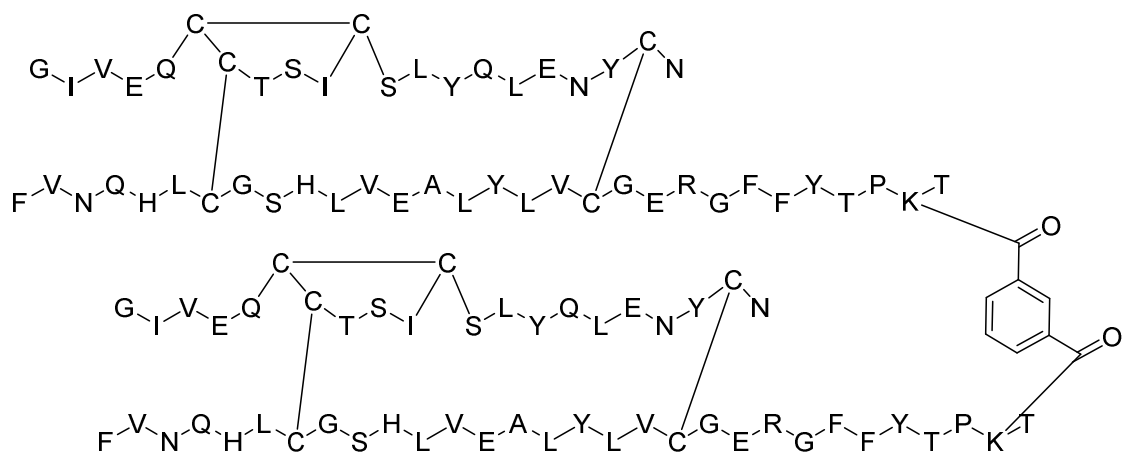
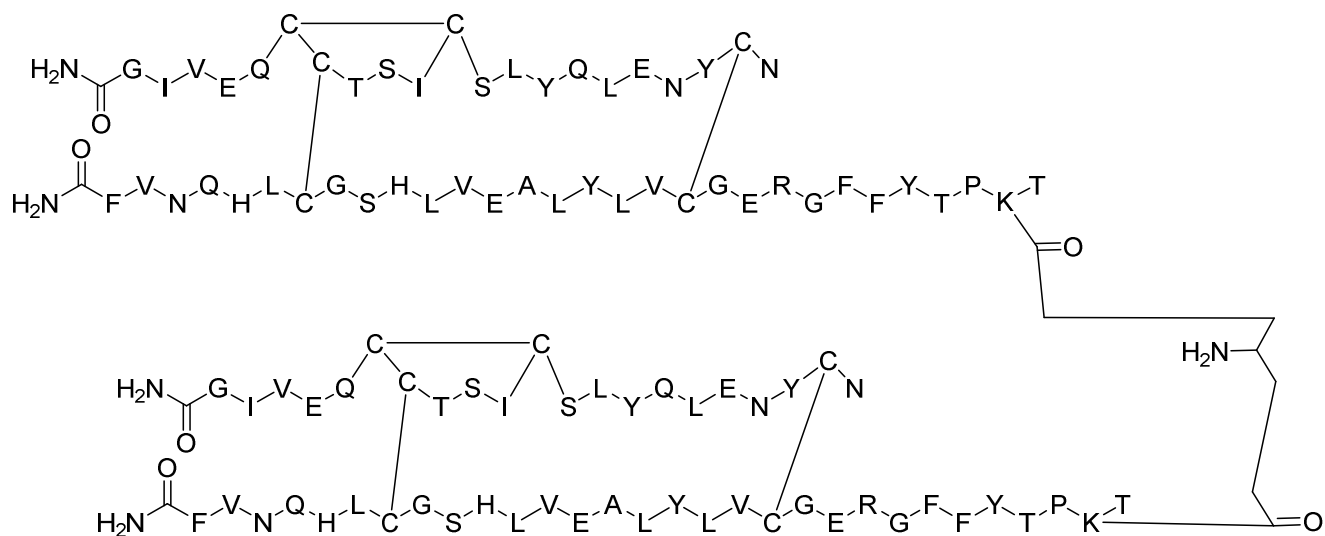


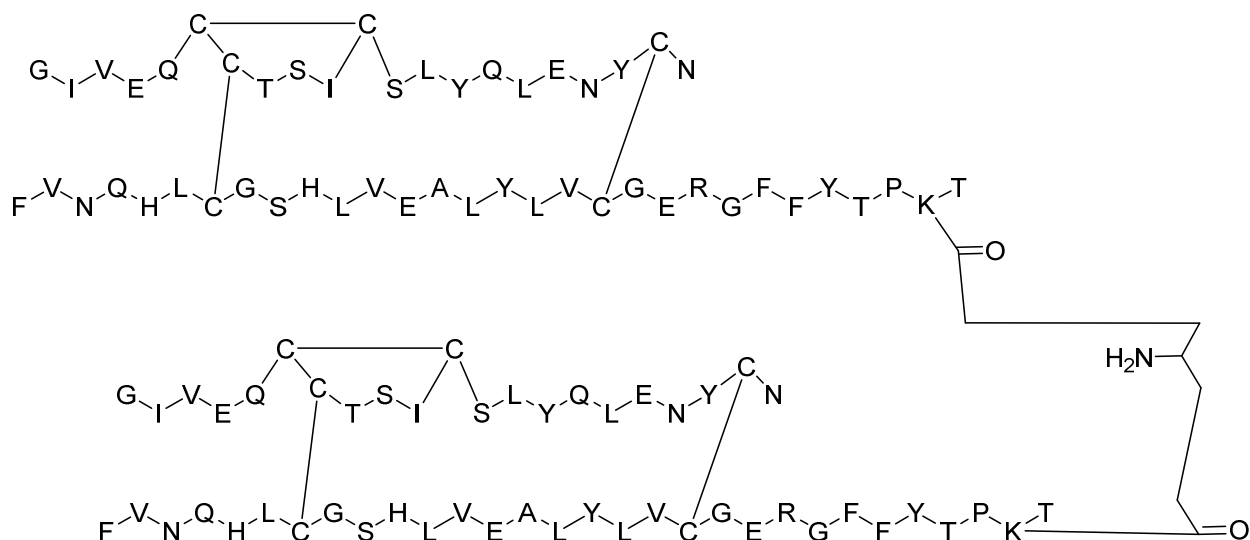
Dímero 87;



Dímero 88;

**Dímero 89;****5 Dímero 90;**

**Dímero 91;**5 **Dímero 93;** y

**Dímero 94**

En los que los enlaces disulfuro entre los residuos Cys₆ y Cys₁₁ del polipéptido de cadena A y los enlaces disulfuro entre la Cys₇ y Cys₂₀ de la cadena A con la Cys₇ y Cys₁₉ del polipéptido de cadena B, respectivamente, están representados por la línea sólida entre los mismos; en los que los restos de unión están unidos covalentemente al aminoácido épsilon del residuo de lisina mostrado, en los que el polipéptido de cadena A para los **Dímeros 1-40, 42-52, 54-86, y 88-94** tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 1; el polipéptido de cadena A para el **Dímero 56** tiene la secuencia de aminoácidos mostrada para la SEC ID N.º: 11; el polipéptido de cadena B para los **Dímeros 1-17, 21-27, 36, 37, 39-40 y 42-52, 54-82, 84-86, y 88-94** tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 2; el polipéptido de cadena B para los **Dímeros 18 y 32-35** tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 6; el polipéptido de cadena B para los **Dímeros 19 y 83** tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 9; el polipéptido de cadena B para los **Dímeros 20, 28-31 y 38** tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 10; y el polipéptido de cadena A y el polipéptido de cadena B para los **Dímeros 53 y 87** son SEC ID N.º: 7 y SEC ID N.º: 8, respectivamente.

20 Composiciones farmacéuticas

De acuerdo con una realización se proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los nuevos dímeros de insulina divulgados en el presente documento,

preferentemente a un nivel de pureza de al menos el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones pueden contener un dímero de insulina divulgado en el presente documento a una concentración de al menos 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml, 11 mg/ml, 12 mg/ml, 13 mg/ml, 14 mg/ml, 15 mg/ml, 16 mg/ml, 17 mg/ml, 18 mg/ml, 19 mg/ml, 20 mg/ml, 21 mg/ml, 22 mg/ml, 23 mg/ml, 24 mg/ml, 25 mg/ml o mayor. En una realización las composiciones farmacéuticas comprenden soluciones acuosas que se esterilizan y opcionalmente se almacenan contenidas dentro de diversos recipientes de envase. En otras realizaciones las composiciones farmacéuticas comprenden un polvo liofilizado. Las composiciones farmacéuticas puede envasarse adicionalmente como parte de un kit que incluye un dispositivo desechable para administrar la composición a un paciente. Los recipientes o kits pueden etiquetarse para almacenamiento a temperatura ambiente de la ambiente o a temperatura refrigerada.

Se cree que los dímeros de insulina divulgados son adecuados para cualquier uso que se haya descrito previamente para péptidos de insulina. Por consiguiente, los dímeros de insulina divulgados en el presente documento pueden usarse para tratar la hiperglucemia, o tratar otras enfermedades metabólicas que resultan de niveles de glucosa sanguíneos altos. Por consiguiente, la presente invención abarca composiciones farmacéuticas que comprenden un dímero de insulina divulgado en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de un paciente que padece niveles de glucosa sanguíneos altos. De acuerdo con una realización, el paciente a tratarse usando un dímero de insulina divulgado en el presente documento es un animal doméstico y en otra realización el paciente a tratarse es un ser humano.

Un procedimiento para tratar la hiperglucemia de acuerdo con la presente divulgación comprende las etapas de administrar los dímeros de insulina actualmente divulgados a un paciente usando cualquier vía convencional de administración, incluyendo vía parenteral, tal como intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular, intratecal, transdérmica, rectal, oral, nasal o por inhalación. En una realización, la composición se administra por vía subcutánea o intramuscular. En una realización, la composición se administra por vía parenteral y el polipéptido de insulina, o derivado profármaco del mismo, se pre-ensava en una jeringa.

Los dímeros de insulina divulgados en el presente documento pueden administrarse solos o en combinación con otros agentes anti-diabéticos. Los agentes anti-diabéticos conocidos en la técnica o en investigación incluyen insulina nativa, glucagón nativo y análogos funcionales del mismo, sulfonilureas, tales como tolbutamida (Orinase), acetohexamida (Dymelor), tolazamida (Tolinase), clorpropamida (Diabinese), glipizida (Glucotrol), gliburida (Diabeta, Micronase, Glynase), glimepirida (Amaril), o gliclazida (Diamicron); meglitinidas, tales como repaglinida (Prandin) o nateglinida (Starlix); biguanidas tales como metformina (Glucophage) o fenformina; tiazolidinadionas tales como rosiglitazona (Avandia), pioglitazona (Actos), o troglitazona (Rezulin), u otros inhibidores de PPAR γ ; inhibidores de alfa glucosidasa que inhiben la digestión de carbohidratos, tales como miglitol (Glyset), acarbosa (Precose/Glucobay); exenatida (Byetta) o pramlintida; inhibidores de dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) tales como vildagliptina o sitagliptina; inhibidores de SGLT (transportador 1 de glucosa dependiente de sodio); o inhibidores de FBPasa (fructosa 1,6-bisfosfatasa).

Las composiciones farmacéuticas que comprenden los dímeros de insulina divulgados en el presente documento pueden formularse y administrarse a los pacientes usando vehículos farmacéuticamente aceptables convencionales y vías de administración conocidas para los especialistas en la técnica. Por consiguiente, la presente divulgación también abarca composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los dímeros de insulina divulgados en el presente documento, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas que comprenden los dímeros de insulina divulgados en el presente documento pueden contener opcionalmente iones cinc, conservantes (por ejemplo, fenol, cresol, parabenos), agentes de isotonicidad (por ejemplo, manitol, sorbitol, lactosa, dextrosa, trehalosa, cloruro sódico, glicerol), sustancias tamponantes, sales, ácidos y álcalis y también excipientes adicionales. Estas sustancias pueden en cada caso presentarse individualmente o alternativamente como mezclas. Glicerol, dextrosa, lactosa, sorbitol y manitol se presentan habitualmente en la preparación farmacéutica en una concentración de 100-250 mM, el NaCl en una concentración de hasta 150 mM. Las sustancias tamponantes tales como, por ejemplo, tampón fosfato, acetato, citrato, arginina, glicilglicina o TRIS (es decir, 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol) y sales correspondientes, se presentan en una concentración de 5-250 mM, comúnmente de aproximadamente 10-100 mM. Excipientes adicionales pueden ser, inter alia, sales o arginina.

En una realización la composición farmacéutica comprende una concentración de 1 mg/ml del dímero de insulina a un pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 7,0 en un sistema de tampón fosfato. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender el dímero de insulina como el único componente farmacéuticamente activo, o el dímero de insulina puede combinarse con uno o más agentes activos adicionales.

Todos los procedimientos terapéuticos, composiciones farmacéuticas, kits y otras realizaciones similares descritas en el presente documento contemplan que los dímeros de insulina incluyen todas las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En una realización el kit se proporciona con un dispositivo para administrar la composición de dímeros de insulina a un paciente. El kit puede incluir adicionalmente una diversidad de recipientes, por ejemplo, viales, tubos, frascos y similares. Preferentemente, los kits también incluirán instrucciones para su uso. De acuerdo con una realización, el dispositivo del kit es un dispositivo dispensador de aerosol, en el que la composición está pre-ensada dentro del dispositivo de aerosol. En otra realización, el kit comprende una jeringa y una aguja y en una realización, la composición de dímero de insulina está pre-ensada dentro de la jeringa.

Los compuestos de la presente invención pueden prepararse por procedimientos sintéticos convencionales, técnicas de ADN recombinante, o cualquier otro procedimiento de preparación de péptidos y proteínas de fusión. Aunque ciertos aminoácidos no naturales no pueden expresarse mediante técnicas convencionales de ADN recombinante, las técnicas para su preparación son conocidas en la técnica. Los compuestos de la presente invención que abarcan partes no peptídicas pueden sintetizarse por reacciones convencionales de química orgánica, además de reacciones de química de péptidos convencionales cuando sea aplicable.

Los siguientes ejemplos pretenden promover una comprensión adicional de la presente invención.

EJEMPLOS

Procedimientos generales

Todos los agentes químicos se adquirieron de fuentes comerciales, salvo que se indique de otro modo. Las reacciones se realizaron habitualmente a temperatura ambiente o a temperatura de la habitación salvo que se indique de otro modo. Las reacciones sensibles a la

humedad o el aire se realizaron en atmósfera de nitrógeno o argón usando disolventes y reactivos anhidros. El progreso de las reacciones se controló por cromatografía en capa fina (CCF) analítica y cromatografía líquida de ultrarendimiento-espectrometría de masas (CLUP-EM). La CCF se realizó en placas de CCF de E. Merck pre-recubiertas con gel de sílice 60F-254, grosor de capa de 0,25 mm. Las placas se visualizaron usando UV de 254 nm y/o por exposición a molibdato de cerio amonio (CAM) o solución de tinción con *p*-anisaldehído seguido por carbonización. La cromatografía líquida de ultra producción (CLUP) se realizó en un sistema Waters Acquity™ UPLC®.

CLUP-EM Procedimiento A: Waters Acquity™ UPLC® BEH C18 1,7 µm columna de 1,0x50 mm con gradiente 10:90-95:5 v/v CH₃CN/H₂O + v 0,05% TFA en 2,0 min; caudal 0,3 ml/min, UV longitud de onda 215 nm; CLUP-EM;

Procedimiento B: Waters Acquity™ UPLC® BEH C18 1,7 µm columna de 2,1x100 mm con gradiente 60:40-100:0 v/v CH₃CN/H₂O + v 0,05% TFA en 4,0 min y 100:0-95:5 v/v CH₃CN/H₂O + v 0,05% TFA en 40 segundos; caudal 0,3 ml/min, UV longitud de onda 200-300 nm; CLUP-EM;

Procedimiento C: Waters Acquity™ UPLC® BEH C18 1,7 µm columna de 2,1x100 mm con gradiente 20:80-90:10 v/v CH₃CN/H₂O + v 0,05% TFA en 4,0 min y 90:10-95:5 v/v CH₃CN/H₂O + v 0,05% TFA en 0,5 min; caudal 0,3 ml/min, UV longitud de onda 200-300 nm; CLUP-EM;

Procedimiento D: Waters Acquity™ UPLC® BEH C8 1,7 µm columna de 2,1x100 mm con gradiente 10:90-55:45 v/v CH₃CN/H₂O + v 0,05% TFA en 4,0 min y 55:45-95:5 v/v CH₃CN/H₂O + v 0,05% TFA en 40 segundos; caudal 0,3 ml/min, UV longitud de onda 200-300 nm; CLUP-EM;

Procedimiento E: Waters Acquity™ UPLC® BEH300 C4 1,7 µm columna de 2,1x100 mm con gradiente 10:90-50:50 v/v CH₃CN/H₂O + v 0,05% TFA en 4,3 min y 50:50-70:30 v/v CH₃CN/H₂O + v 0,05% TFA en 0,5 min; caudal 0,3 ml/min, UV longitud de onda 200-300 nm; CLUP-EM;

Procedimiento F: Waters Acquity™ UPLC® BEH C8 1,7 µm columna de 2,1x100 mm con gradiente 20:80-72,5:27,5 v/v CH₃CN/H₂O + v 0,05% TFA en 4,3 min y

72,5:27,5-95:5 v/v CH₃CN/H₂O + v 0,05% TFA en 0,5 min; caudal 0,3 ml/min, UV longitud de onda 200-300 nm y CLUP-EM;

Procedimiento G: Waters Acquity™ UPLC® BEH C8 1,7 µm columna de 2,1x100 mm con gradiente 20:80-90:10 v/v CH₃CN/H₂O + v 0,1% TFA en 4,0 min y 90:10-95:5 v/v CH₃CN/H₂O + v 0,1% TFA en 0,4 min; caudal 0,3 ml/min, UV longitud de onda 200-300 nm.

El análisis de masas se realizó en un Detector Waters SQ con ionización por electronebulización en modo de detección de iones positiva y el intervalo de escaneo de la proporción de masa-a-carga fue 170-900 o un Waters Micromass® LCT Premier™ XE con ionización por electronebulización en modo de detección de iones positiva y el intervalo de escaneo de la proporción de masa-a-carga fue 300-2000. La identificación de los conjugados de insulina producidos o IRPA se confirmó comparando el peso molecular teórico con el valor experimental que se midió usando CLUP-EM. Para la determinación de las posiciones de enlace, específicamente, los dímeros de insulina se sometieron a tratamiento con DTT (para cadena a/b) o digestión con Glu-C (con o sin reducción y alquilación) y después los péptidos resultantes se analizaron por CL-EM. En base a las masas medidas, se dedujeron las posiciones de enlace.

Se realizó cromatografía ultrarrápida usando bien un aparato de cromatografía ultrarrápida Biotage (Dyx Corp.) o bien un instrumento CombiFlash® Rf (Teledyne Isco). La cromatografía en fase normal se realizó en gel de sílice (20-70 µm, tamaño de poro de 60 Å) en cartuchos pre-compactados del tamaño indicado. La cromatografía de intercambio iónico se realizó en un material basado en sílice con un recubrimiento unido de una poli(2-sulfoetil aspartamida) aniónica hidrófila (columna PoliSULFOETIL A, PolyLC Inc., 250x21 mm, 5 m, tamaño de poro de 1000 Å). La cromatografía en fase inversa se realizó en gel de sílice C-18 unido (20-60 µm, tamaño de poro de 60-100 Å) en cartuchos pre-compactados del tamaño indicado. La HPLC a escala preparativa se realizó en sistema binario Gilson 333-334 usando Waters DELTA PAK C4 15 µm, 300 Å, columna de 50x250 mm o KROMASIL® C8 10 µm, 100 Å, columna de 50x250 mm, caudal 85 ml/min, con gradiente indicado. La concentración de las soluciones se realizó en un evaporador rotatorio a presión reducida o se secaron por congelación en un liofilizador VirTis Freezemobile (SP Scientific).

Abreviaturas: acetonitrilo (AcCN), acuoso (ac), *N,N*-diisopropiletilamina o base de Hünig (DIPEA), *N,N*-dimetilformamida (DMF), dimetil sulfóxido (DMSO), acetato de etilo (EtOAc), clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC), gramo(s) (g), 1-hidroxibenzotriazol hidrato (HOBt), hora(s) (h o hr), espectro de masas (em o EM),

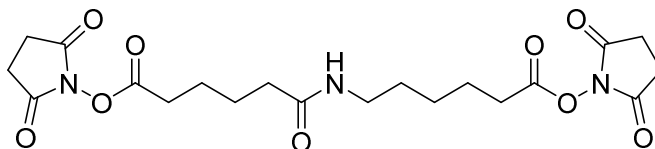
5 microgramo(s) (μg), microlitro(s) (μl), micromol (mol), miligramo(s) (mg), mililitro(s) (ml), milimol (mmol), minuto(s) (min), tiempo de retención (Tr), temperatura ambiente (ta), saturado (sat. o satdo), solución ac saturada de cloruro sódico (salmuera), trietilamina (TEA), ácido trifluoroacético (TFA) y tetrafluoroborato *N,N,N',N'*-tetrametil-*O*-(*N*-succinimidil)uronio (TSTU).

10 El término “RHI” se refiere a una insulina humana recombinante y se usa para indicar que la insulina tiene la secuencia de aminoácidos característica de la insulina humana natural, nativa. Como se usa en el presente documento en las tablas, el término indica que la secuencia de aminoácidos de la insulina que comprende el dímero es la de la insulina humana natural, nativa.

15

EJEMPLO 1

Se describe la síntesis de 6-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxohexil)amino)-6-oxohexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (**Enlazador 1**; C6+NC6).



20 *Etapas 1* 6-((6-(benciloxi)-6-oxohexil)amino)-6-oxohexanoato de bencilo

A una mezcla de éster monobencílico de ácido adípico (600 mg, 2,54 mmol) y 4-metilbencenosulfonato de 6-(benciloxi)-6-oxohexan-1-aminio (1,0 g, 2,54 mmol) en DMF (12,71 ml) se añadió HOBt (584 mg, 3,81 mmol), base de Hunig (888 l, 5,08 mmol) y EDC (731 mg, 3,81 mmol). Después de agitar durante una noche, la mezcla de reacción se repartió entre

25 NaHCO₃ sat. y EtOAc. Se separó la fase orgánica, se lavó con HCl 1,0 M y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró para dar el compuesto del título en forma de un semi-sólido y se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. CLUP-EM Procedimiento A: Tr = 1,26 min, m/z = 440,3 [M+1]

Etapa 2 ácido 6-((5-carboxipentil)amino)-6-oxohexanoico

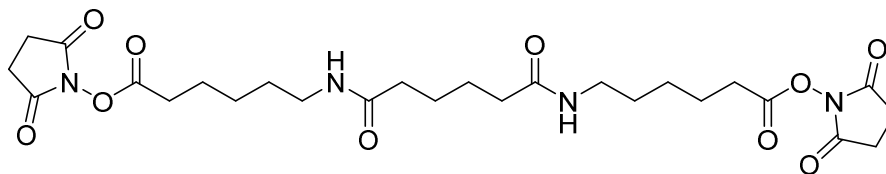
Una suspensión del producto de la Etapa 1 (1,08 g, 2,457 mmol) y catalizador de Pearlman (20% en peso sobre carbono, 173 mg, 0,246 mmol) en MeOH (50 ml) se agitó en atmósfera de 344,64 kPa (50 psi) de H₂ durante una noche. El catalizador se retiró por filtración y el filtrado se sometió a cromatografía en fase inversa en fase C8 (Kromasil, C8 10µm 100 Å, 250 x 50 mm; disolvente A = agua/0,05%TFA, disolvente B = AcCN/0,05%TFA), caudal = 85 ml/min, gradiente de B en A 5-30% en 30 min. CLUP-EM Procedimiento A: Tr = 0,40 min, m/z = 260,15 [M+1].

Etapa 3 6-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxohexil)amino)-6-oxohexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo

A una solución del producto de la Etapa 2 (50 mg, 0,193 mmol) en DMF (964 µl) se añadió TSTU (116 mg, 0,386 mmol). Después de enfriar hasta 0°C, a la mezcla se añadió trietilamina (53,8 µl, 0,386 mmol). Después de agitar durante 45 minutos, se observó formación del compuesto deseado: CLUP-EM Procedimiento A: Tr = 0,71 min, m/z = 453,4 [M+1]. El 6-((6-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-6-oxohexil)amino)-6-oxohexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo resultante se usó como una solución 0,2 M en DMF sin purificación.

EJEMPLO 2

Se describe la síntesis de 6,6'-(adipoilbis(azanodiil))dihexanoato de bis(2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) (**Enlazador 2**; C₆N+C₆+NC₆).



Etapa 1 6,6'-(adipoilbis(azanodiil))dihexanoato de dibencilo

A una solución de 4-metilbencenosulfonato de 6-(benciloxi)-6-oxohexan-1-aminio (2,693 g, 6,84 mmol) y ácido adípico (500 mg, 3,42 mmol) en DMF (17,1 ml) se añadió base de Hunig (1,793 ml, 10,26 mmol), HOBt (1,572 g, 10,26 mmol) y EDC (1,968 g, 10,26 mmol). Después de agitar durante una noche, la mezcla de reacción se vertió en agua (500 ml) y se agitó durante 30 minutos. El compuesto del título se recogió a través de filtración en forma de

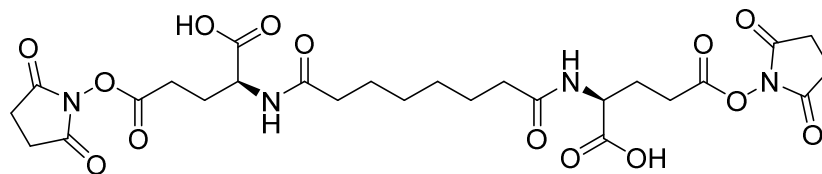
un sólido y se secó por succión de aire. CLUP-EM Procedimiento A: Tr = 1,23 min, m/z = 553,5 [M+1].

Etapas 2 6,6'-(adipoilbis(azanodiil))dihexanoato de bis(2,5-dioxopirrolidin-1-ilo)

- 5 El compuesto del título se preparó usando el procedimiento análogo al descrito para el EJEMPLO 1 sustituyendo 6,6'-(adipoilbis(azanodiil))dihexanoato de dibencilo en el lugar de 6-((6-(benciloxi)-6-oxohexil)amino)-6-oxohexanoato de bencilo en la Etapa 2. CLUP-EM Procedimiento A: Tr = 0,74 min, m/z = 567,4 [M+1].

10 EJEMPLO 3

Se describe la síntesis de ácido (2*S*,2'*S*)-2,2'-(octanodioilbis(azanodiil))bis(5-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-5-oxopentanoico) (**Enlazador 3**; gamma-Glu-subérico-gamma-Glu).



- 15 *Etapas 1 ácido (S)-5-(benciloxi)-4-(8-(((S)-1-(benciloxi)-4-carboxi-1-oxobutan-2-il)amino)-8-oxooctanamido)-5-oxopentanoico*

- A una solución de H-GLU-OBZL (1,00 g, 4,21 mmol) en DMF (10,5 ml) se añadió trietilamina (5,875 ml, 42,1 mmol) seguido por suberato de disuccinimidilo (776 mg, 2,107 mmol). Después de agitar durante 1 hora, se concentró la mezcla de reacción y el residuo resultante se purificó en columna C18 (ISCO 44 g), flujo = 37 ml/min; gradiente de AcCN en agua con 0,05%TFA: 2%-20% en 20 min seguido por un periodo de espera. Después de la liofilización, se obtuvo el intermedio ácido bis-carboxílico. CLUP-EM Procedimiento B: Tr = 2,66 min, m/z = 613,3 [M+1].

- 25 *Etapas 2 éster de bis-N-hidroxisuccinimida del ácido (S)-5-(benciloxi)-4-(8-(((S)-1-(benciloxi)-4-carboxi-1-oxobutan-2-il)amino)-8-oxooctanamido)-5-oxopentanoico*

A una suspensión del producto de la Etapa 1 (455 mg, 0,743 mmol) en acetonitrilo (7,4 ml) se añadió TSTU (492 mg, 1,634 mmol) en forma de un sólido seguido por trietilamina (228 µl, 1,634 mmol), punto en el que se disolvió la suspensión. Se agitó la mezcla

de reacción durante 1,5 h y se concentró en el rotavapor a temperatura ambiente. El producto se purificó por cromatografía en fase inversa en fase C-8 (columna Kromasil, C8 10 m 100A, tamaño 250 x 50mm; disolvente A=agua/0,05%TFA, disolvente B=AcCN/0,05%TFA), flujo=85 ml/min, gradiente de B en A 10-80% en 30 min. Después de la liofilización de las fracciones, se obtuvo el éster bis-NHS. CLUP-EM Procedimiento B: Tr = 2,77 min, m/z = 807 [M+1].

Etapas 3 ácido (2S,2'S)-2,2'-(octanodioilbis(azanodiil))bis(5-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-5-oxopentanoico)

El producto de la Etapa 2 (250 mg, 0,310 mmol) se hidrogenó usando paladio sobre carbono (66,0 mg, 0,031 mmol) como catalizador y acetona que contenía TFA al 0,1% como el disolvente (6,2 ml) en 1 atmósfera de hidrógeno, durante una noche. Se retiró por filtración el catalizador y el filtrado se concentró para dar el compuesto del título. Se bombeó a alto vacío durante una noche. CLUP-EM Procedimiento C: Tr = 3,61 min, m/z = 627,3 [M+1].

15 EJEMPLO 4

Procedimiento general A: Síntesis de Conjugados (**Análogos**) de N⁶,B²⁹ insulina

En un recipiente de tamaño apropiado, se disolvió insulina o análogo de insulina, con agitación suave, a temperatura ambiente en un disolvente mixto: 2:3 v/v Na₂CO₃ 0,1 M:AcCN. Después de que se aclarara la mezcla, se ajustó el pH hasta el valor de 10,5-10,8 usando solución alcalina, por ejemplo, NaOH 0,1 N. En un vial diferente, se disolvió un intermedio éster activado (resto de unión) en un disolvente orgánico, por ejemplo, DMSO, a temperatura ambiente. Se añadieron alícuotas de la solución del éster activado (Enlazador) durante un periodo de tiempo a la solución que contenía insulina hasta que el cromatograma de CLUP mostró que la mayoría de la insulina no modificada había reaccionado y que una parte sustancial de la mezcla de reacción se había convertido en insulina B²⁹-conjugada. La reacción se interrumpió mediante la adición de un nucleófilo de amina, por ejemplo, 2-aminoetanol. La solución de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución resultante se diluyó cuidadosamente con H₂O fría (20x) a 0°C y se ajustó su pH hasta un pH final de 2,5 usando HCl 1 N (y NaOH 0,1 N si fuera necesario). La solución primero se concentró por ultrafiltración, a través de un sistema de filtración de flujo tangencial (FFT) o usando unidades de centrifugación Amicon Ultra-15, con membrana de 1K, 3K o 10K de PCPM. La solución

concentrada habitualmente se sometió primero a cromatografía de intercambio iónico (columna PoliSULFOETIL A, PolyLC Inc., 250x21 mm, 5 µm, 1000 Å; Tampón A: 0,1%(v/v) H₃PO₄/25%AcCN; Tampón B: 0,1%(v/v)H₃PO₄/25%AcCN/NaCl 0,5 M). Las fracciones que contenían el conjugado B29 con la pureza deseada se combinaron y concentraron usando sistema de FFT o Amicon Ultra-15. La solución resultante después se purificó adicionalmente por HPLC en fase inversa (Waters C4 columna de 250x50 mm, 10 m, columna de 1000 Å o Kromasil C8 250x50 mm, 10 µm, columna de 100Å; Tampón A: 0,05-0,1%TFA en agua; Tampón B: 0,05-0,1%TFA en AcCN). Las fracciones que contenían el conjugado del título se combinaron y secaron por congelación o se les intercambió el tampón usando sistema de FFT y/o Amicon Ultra-15 para dar el producto del título.

EJEMPLO 5

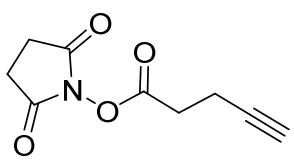
Se describe la síntesis de N⁶,B29-5-azido-pentanoil desB30 insulina (A:Y19A) (Análogo 1).

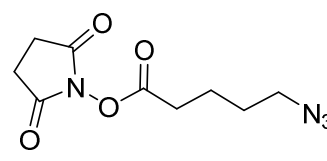
En un vial de centelleo de 20 ml, se disolvió desB30 A:Y19A insulina (112 mg, 0,020 mmol), con agitación suave, a temperatura ambiente en un disolvente mixto (2 ml, 2:3 v/v Na₂CO₃ 0,1 M:AcCN). Después de que se aclarara la mezcla, se ajustó el pH hasta el valor de 10,5-10,8 usando solución alcalina, por ejemplo, NaOH 0,1 N. En un vial de centelleo diferente de 8 ml, se disolvió 5-azidopentanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (**Enlazador 5**; véase el ejemplo 6) (4,79 mg, 0,020 mmol) en DMSO (500 µl) a temperatura ambiente. Se añadieron alícuotas de la solución del éster activado durante un periodo de tiempo a la solución que contenía insulina hasta que el cromatograma de CLUP mostró que la mayoría de la insulina no modificada había reaccionado y que una parte sustancial de la mezcla de reacción se había convertido en insulina B29-conjugada. La reacción se interrumpió mediante la adición de un nucleófilo de amina, por ejemplo, 2-aminoetanol. La solución de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución resultante se diluyó cuidadosamente con H₂O fría (20x) a 0°C y se ajustó su pH hasta un pH final de 2,5 usando HCl 1,0 N (y NaOH 0,1 N si fuera necesario). La solución se concentró primero por ultrafiltración usando unidades de centrifugación Amicon Ultra-15 con membrana de 3K o 10K de PCPM. La solución concentrada se sometió a HPLC en fase inversa (KROMASIL C8 250x50 mm, 10 m, columna de 100Å, 25-35% de Tampón B en Tampón A en 20 min; Tampón A: 0,05%TFA en agua; Tampón B:

0,05%TFA en AcCN). Se combinaron las fracciones que contenían el **Análogo 1** y después se secaron por congelación. CLUP-EM Procedimiento D: Tr = 3,91 min, m/z = 1435,86 [(M+4)/4].

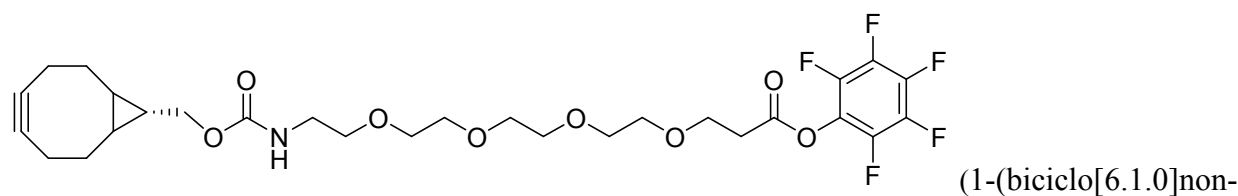
EJEMPLO 6

5 El **Análogo 2**, **Análogo 3** y **Análogo 4** de RHI N⁶,B²⁹-acilada se prepararon para su uso en la construcción de dímeros usando química “clic” y se prepararon usando el procedimiento general A o el procedimiento análogo a los descritos para el EJEMPLO 4 pero

sustituyendo la insulina humana recombinante y  (pent-4-inoato de 2,5-

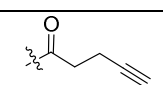
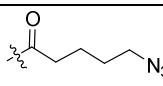
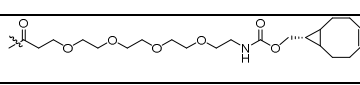
dioxopirrolidin-1-ilo; **enlazador 4**);  (2,5-dioxopirrolidin-1-il-

10 azidopentanoato; **enlazador 5**); o



4-in-9-il)-3-oxo-2,7,10,13,16-pentaoxa-4-azonadecan-19-oato de perfluorofenilo; **enlazador 6**) para preparar el **Análogo 2**, **Análogo 3**, o **Análogo 4**, respectivamente. Los análogos se caracterizaron usando CLUP-EM Procedimiento D excepto para el Análogo 5, que se caracterizó

15 usando el Procedimiento F CLUP-EM.

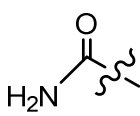
Tabla 1			
Análogo	Resto de unión	Tr (min)	(M+4)/4
2		4,08	1472,56
3		4,10	1483,89
4		3,94	1558,58
La línea ondulada indica el enlace entre el grupo amino épsilon de Lys B29 de la molécula			

de insulina.

EJEMPLO 7

Se describe la síntesis de $N^{2,1A},N^{2,1B}$ -bis(carbamóil) insulina humana (**Análogo 5**).

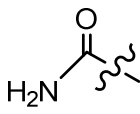
A una suspensión de RHI (1g, 0,172 mmol) en agua (50 ml) se añadió una
 5 solución de fosfato de potasio, dibásico (0,249 g, 1,429 mmol) en agua (5,0 ml). Después de
 agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos, a la mezcla resultante se añadió cianato de
 potasio (0,279 g, 3,44 mmol). Se dejó que la mezcla de reacción se agitara durante 16 horas. Para
 detener la reacción, se retiró el cianato de potasio sin reaccionar por FFT usando un dispositivo
 de diafiltración de 3K de PCPM y el producto se aisló en forma de un sólido por liofilización. El
 10 producto contenía aproximadamente un 10-35% de A1/B1/B29-tris-urea-RHI, que
 opcionalmente podría retirarse por cromatografía en fase inversa en fase C8 (columna
 KROMASIL, C8 10 μ m 100Å, 250 x 50 mm; disolvente A=agua/0,05%TFA, disolvente
 B=AcCN/0,05%TFA), caudal= 85 ml/min, gradiente de B en A 26-34% en 30 min). CLUP-EM
 Procedimiento D: Tr = 4,29 min, m/z = 1474,6 (z = 4). El sustituyente N terminal tiene la

15 estructura  (carbamóilo) en la que la línea ondulada indica el enlace entre el
 sustituyente y el nitrógeno $N2$ del aminoácido N terminal.

EJEMPLO 8

Se describe la síntesis de $N^{2,1A},N^{2,1B}$ -bis(carbamóil) desB30 insulina humana
 20 (**Análogo 6**).

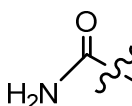
El compuesto del título se preparó usando el procedimiento análogo a los
 descritos para el EJEMPLO 7 sustituyente desB30 insulina en el lugar de RHI. CLUP-EM
 Procedimiento D: Tr = 4,10 min, m/z = 1448,9 (z = 4). El sustituyente N terminal tiene la

25 estructura  (carbamóilo) en la que la línea ondulada indica el enlace entre el
 sustituyente y el nitrógeno $N2$ del aminoácido N terminal.

EJEMPLO 9

Se describe la síntesis de *N*^{2,1A},*N*^{2,1B}-bis(carbamóil) insulina lispro (**Análogo 7**).

El compuesto del título se preparó usando el procedimiento análogo a los descritos para el EJEMPLO 7 sustituyendo insulina lispro en el lugar de RHI. CLUP-EM Procedimiento D: Tr = 4,07 min, m/z = 1473,6 (z = 4). El sustituyente N terminal tiene la

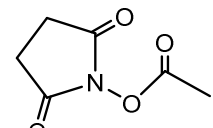
estructura  (carbamóil) en la que la línea ondulada indica el enlace entre el sustituyente y el nitrógeno N2 del aminoácido N terminal.

10

EJEMPLO 10

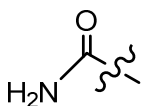
Se describe la síntesis de *N*^{2,1A}-acetil insulina humana (**Análogo 8**).

A una solución de RHI (400 mg, 0,069 mmol) en DMSO (4,6 ml) se añadió gota a

gota una solución de acetato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo  (10,82 mg, 0,069 mmol) en 100 µl de DMSO. Después de agitar durante 3 horas, la mezcla de reacción se diluyó

con agua (95 ml), se acidificó hasta pH de aproximadamente 3 y después se diafiltró a través de unidades de centrifugación Amicon Ultra-15 con membrana de 3 o 10K de PCPM para retirar la mayoría del DMSO. La solución resultante se sometió primero a cromatografía de intercambio iónico (columna PoliSULFOETIL A, PolyLC Inc., 250x21 mm, 5 µm, 1000 Å, caudal 15 ml/min; Tampón A: 0,1%(v/v)H₃PO₄/25%AcCN; Tampón B:

0,1%(v/v)H₃PO₄/25%AcCN/NaCl 0,5 M) usando gradiente del 10-40% de Tampón B en Tampón A en 24 minutos. Las fracciones que contenían la *N*^{2,1A}-acetil-RHI deseada se combinaron y concentraron y después se sometieron a cromatografía en fase inversa en (KROMASIL, C8 10m 100 Å, 250 x 50 mm; disolvente A = agua/0,05%TFA, disolvente B = AcCN/0,05%TFA, gradiente del 26-30% de B en A). La posición de modificación se confirmó usando análisis de DTT. CLUP-EM Procedimiento D: Tr = 3,5 min y m/z = 1463,5 (z = 4). El

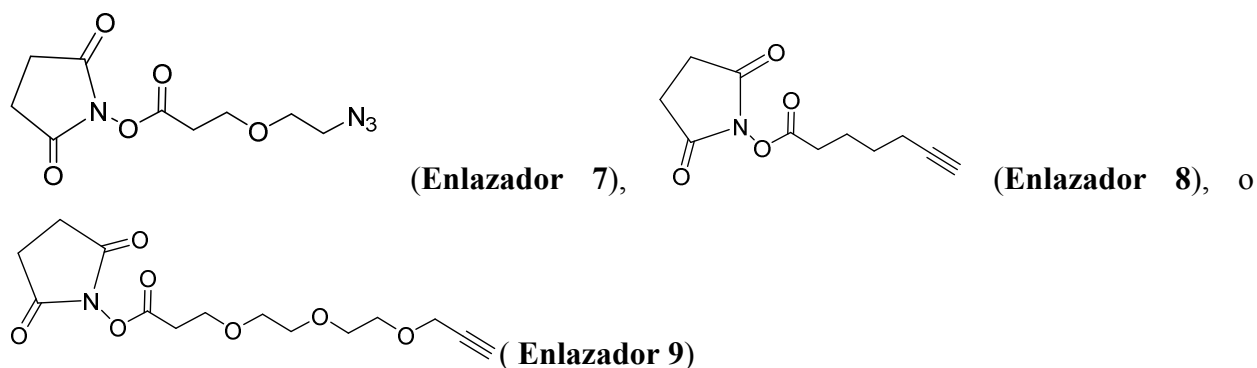
sustituyente N terminal tiene la estructura  (carbamóilo) en la que la línea ondulada indica el enlace entre el sustituyente y el nitrógeno N2 del aminoácido N terminal.

EJEMPLO 11

5 Se describe la síntesis de $N^{2,1A},N^{2,1B}$ -bis(carbamóilo) RHI $N^{6,29B}$ -acilada .

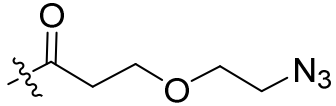
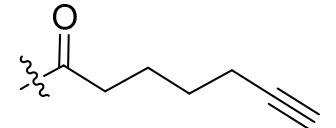
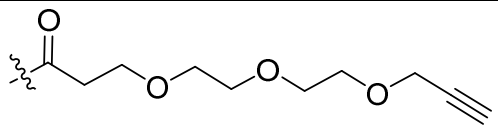
Se preparó el **Análogo 5** conjugado con 2,5-dioxopirrolidin-1-il-azidopentanoato (**Enlazador 5**) para construir el **Análogo 9** o pent-4-inoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (**Enlazador 4**) para construir el **Análogo 10** usando el procedimiento general A o el procedimiento análogo a los descritos para el EJEMPLO 4.

10 EJEMPLO 12 Los siguientes análogos de RHI $N^{6,29B}$ -acilados (**Análogo 11**, **Análogo 12** y **Análogo 13**) se prepararon para su uso en la construcción de dímeros usando química “clic”. Los análogos se prepararon usando el Procedimiento General A o procedimientos análogos a los descritos en el EJEMPLO 4 pero sustituyendo la insulina humana recombinante (RHI) y el resto de unión apropiado seleccionado de



para preparar el **Análogo 11**, **Análogo 12** o **Análogo 13**, respectivamente. Los análogos se caracterizaron usando el Procedimiento D CLUP-EM excepto para el **Análogo 12**, que se caracterizó usando el Procedimiento F CLUP-EM.

Tabla 2			
Análogo	Resto de unión	Tr (min)	(M+4)/4

11		3,26	1488,11
12		3,97	1479,30
13		3,27	1502,26
La línea ondulada indica el enlace entre el grupo amino épsilon de Lys B29 de la molécula de insulina.			

EJEMPLO 13

Procedimiento general B: Síntesis de dímeros de $N^{6,29B}, N^{6,29B'}$ -insulina usando condiciones de base orgánica

- 5 En un recipiente de tamaño apropiado, se suspende insulina o análogo de insulina a temperatura ambiente en un disolvente orgánico o disolventes acuosos/orgánicos mixtos, por ejemplo, DMSO, en presencia de una base, por ejemplo, TEA. Se deja que la mezcla se agite suavemente hasta que la insulina esté completamente disuelta. A la solución resultante se añade un intermedio éster activado (enlazador) en solución de disolventes orgánicos, tal como DMSO o
- 10 DMF. Después de CLUP el cromatograma muestra que una parte sustancial de la mezcla de reacción se ha convertido en dímero de $N^{6,29B}, N^{6,29B'}$ -insulina (o dímero de $N^{6,28B}, N^{6,28B'}$ -insulina lispro). La mezcla de reacción puede someterse directamente a purificación por HPLC en fase inversa (columna Waters C4 250x50 mm, 10 μ m, columna de 1000 Å o KROMASIL C8 250x50 mm, 10 μ m, columna de 100Å; Tampón A: 0,05-0,1%TFA en agua desionizada; Tampón B: 0,05-0,1%TFA en AcCN), o la reacción puede interrumpirse
- 15 mediante dilución cuidadosa con H₂O ácida fría (20x, pH aproximadamente 3,0) a 0°C y su pH se ajusta hasta un pH final de 2,5 usando HCl 1 N (y NaOH 0,1 N si fuera necesario). La solución primero puede concentrarse por ultrafiltración, bien a través de un sistema de filtración de flujo tangencial (FFT) o bien usando unidades de centrifugación Amicon Ultra-15, con
- 20 membrana de 1K, 3K o 10K de PCPM. La solución concentrada habitualmente se somete primero a cromatografía de intercambio iónico (columna PoliSULFOETIL A, PolyLC Inc., 250x21 mm, 5 μ m, 1000 Å; Tampón A: 0,1%(v/v)H₃PO₄/25%AcCN; Tampón B:

0,1%(v/v)H₃PO₄/25%AcCN/NaCl 0,5 M). Las fracciones que contenían el conjugado B29 con la pureza deseada se combinan y concentran usando sistema de FFT o Amicon Ultra-15. La solución concentrada después se somete a purificación por HPLC en fase inversa (columna Waters C4 250x50 mm, 10 µm, columna de 1000 Å o KROMASIL C8 250x50 mm, 10 µm, columna de 100Å; Tampón A: 0,05-0,1%TFA en agua desionizada; Tampón B: 0,05-0,1%TFA en AcCN). Las fracciones que contienen el dímero de insulina deseado se combinan y secan por congelación o se les intercambio el tampón usando sistema de FFT y/o Amicon Ultra-15 para dar los dímeros de N^{6,29B},N^{6,29B'}-insulina.

10 EJEMPLO 14

Procedimiento general C: Síntesis de dímeros de N^{6,29B},N^{6,29B'}-insulina usando condiciones de base acuosa.

En un recipiente de tamaño apropiado, se disuelve insulina o análogo de insulina, con agitación suave, a temperatura ambiente en un disolvente mixto: 2:3 v/v Na₂CO₃ 0,1

15 M:AcCN. Después de que se aclare la mezcla, se ajusta el pH hasta el valor de 10,5-10,8 usando solución alcalina, por ejemplo, NaOH 0,1 N. En un vial diferente, se disuelve un intermedio éster activado (enlazador) en un disolvente orgánico, por ejemplo, DMSO, a temperatura ambiente. Se añaden alícuotas de la solución del éster activado durante un periodo de tiempo a la solución que contiene insulina hasta que el cromatograma de CLUP muestra que la mayoría de la insulina sin
20 modificar ha reaccionado y que una parte sustancial de la mezcla de reacción se ha convertido en dímero de N^{6,B29},N^{6,B29'}-insulina (o dímero de N^{6,28B},N^{6,28B'}-insulina lispro). La reacción se interrumpe mediante la adición de un nucleófilo de amina, por ejemplo, 2-aminoetanol. La solución de reacción se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución resultante se diluye cuidadosamente con H₂O fría (20x) a 0°C y se ajusta su pH hasta un pH final de 2,5
25 usando HCl 1 N (y NaOH 0,1 N si fuera necesario). La solución primero se concentra por ultrafiltración, bien a través de un sistema de filtración de flujo tangencial (FFT) o bien usando unidades de centrifugación Amicon Ultra-15, con membrana de 1K, 3K o 10K de PCPM. La solución concentrada habitualmente se somete primero a cromatografía de intercambio iónico (columna PoliSULFOETIL A, PolyLC Inc., 250x21 mm, 5 µm, 1000 Å; Tampón A:
30 0,1%(v/v)H₃PO₄/25%AcCN; Tampón B: 0,1%(v/v) H₃PO₄/25%AcCN/NaCl 0,5 M). Las

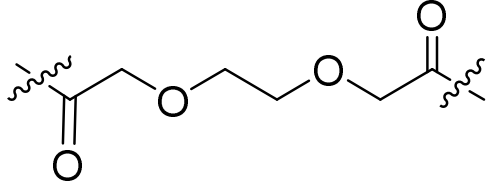
fracciones que contenían el conjugado B29 con la pureza deseada se combinan y concentran usando sistema de FFT o Amicon Ultra-15. La solución resultante después se purifica adicionalmente por HPLC en fase inversa (columna Waters C4 250x50 mm, 10 µm, columna de 1000 Å o KROMASIL C8 250x50 mm, 10 µm, columna de 100Å; Tampón A: 0,05-0,1%TFA en agua; Tampón B: 0,05-0,1%TFA en AcCN). Las fracciones que contienen el dímero de insulina del título se combinan y secan por congelación o se les intercambia el tampón usando sistema de TFF y/o Amicon Ultra-15 para dar los dímeros de N^{6,29}B,N^{6,29}B'-insulina.

EJEMPLO 15

Este ejemplo ilustra la síntesis de N^{6,29}B,N^{6,29}B'-(2,2'-(etano-1,2-diilbis(oxi))diacetil)bis[insulina humana] (**Dímero 1**).

Se disolvió RHI (2,6 g, 0,448 mmol) en una mezcla de Na₂CO₃ (0,1 M) (15,8 ml) y AcCN (10,5 ml) y se añadieron 0,895 ml (0,179 mmol) de solución 0,2 M en DMF de 2,2'-(etano-1,2-diilbis(oxi))diacetato de bis(2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) (**Enlazador 8**). Se agitó la mezcla de reacción durante 30 min y se añadió una porción adicional de 0,895 ml (0,179 mmol) de solución 0,2 M en DMF de 2,2'-(etano-1,2-diilbis(oxi))diacetato de bis(2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) y se agitó la mezcla de reacción durante 30 min más. La mezcla de reacción se vertió en 60 ml de 20%AcCN/0,1%TFA/agua, se ajustó el pH hasta 2,5 y se diafiltró usando Amicon Ultra-15 con membrana de 10K de PCPM para concentrarla hasta que el volumen resultante fuera de aproximadamente 10 ml. La solución resultante se sometió a cromatografía de intercambio iónico (columna PoliSULFOETIL A, 250x21 mm, 5 m, 1000 Å, gradiente del 10-80% de Tampón B en Tampón A en 30 min; Tampón A: 0,1%(v/v)H₃PO₄/25%AcCN; Tampón B: 0,1%(v/v)H₃PO₄/25%AcCN/NaCl 0,5 M). Las fracciones que contenían el compuesto del título se combinaron y concentraron. La solución resultante después se sometió a cromatografía en fase inversa (KROMASIL C8 250x50 mm, 10 µm, columna de 100 Å; gradiente del 27-35% de AcCN con TFA al 0,05% en agua con TFA al 0,05%). CLUP-EM Procedimiento E: Tr = 2,75 min, m/z = 1960,4 (z = 6), 1680,4 (z = 7).

Dímero N.º	Estructura del dímero que muestra el resto de unión entre los residuos B29 y B29' Lisina	Tipo de insulina; Extremos N terminales de insulina	Tr (min)	(M+6)/6 o (M+7)/7
---------------	---	--	-------------	-------------------------

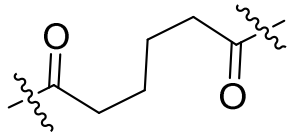
1		RHI; A1,A1', B1,B1' =H	2,75	1960,4
La línea ondulada indica el enlace entre el grupo amino épsilon de Lys B29 y Lys B29', respectivamente.				

EJEMPLO 16

Este ejemplo ilustra la síntesis de $N^{2,1A},N^{2,1A'},N^{2,1B},N^{2,1B'}$.

- 5 tetraquis(carbamoil)- $N^{6,29B},N^{6,29B'}$ -(hexanodioil)bis[insulina humana] (**Dímero 2**).

Se disolvió $N^{2,1A},N^{2,1B}$ -bis(carbamoil) RHI (150 mg, 0,025 mmol) en DMSO (1 ml) y se añadió trietilamina (0,106 ml, 0,764 mmol) seguido por adición gota a gota de adipato de di(N-succinimidilo) (**Enlazador 12**) (4,33 mg, 0,013 mmol) disuelto en 100 μ l de DMSO. Se agitó 1 hora y la mezcla de reacción se vertió en 20 ml de agua. Se acidificó hasta pH=2 y se diafiltró usando Amicon Ultra 15 10K. El producto se purificó por cromatografía de intercambio iónico usando un gradiente del 10-40% de Disolvente B en Disolvente A en 24 minutos y se re-purificó por cromatografía en fase inversa en fase C-8 con gradiente de B en A del 26-36% en 30 minutos. CLUP-EM Procedimiento E: Tr = 3,75 minutos, m/z = 1983,9 (z = 6).

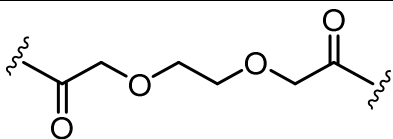
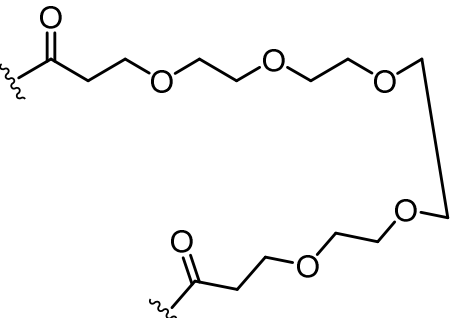
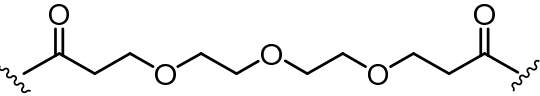
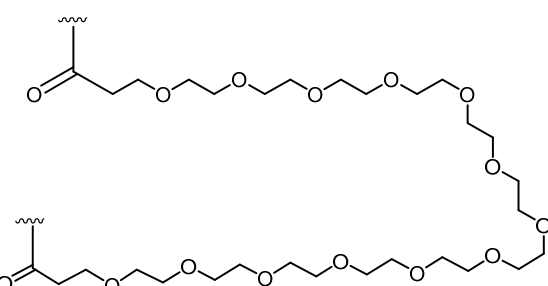
Dímero N.º	Estructura del dímero que muestra el resto de unión entre los residuos Lisina B29 y B29'	Tipo de insulina; Extremos N terminales de insulina	Tr (min)	(M+6)/6 o (M+7)/7
2		RHI; A1,A1', B1,B1' = carbamóilo	3,75	1983,9
La línea ondulada indica el enlace entre el grupo amino épsilon de Lys B29 y Lys B29', respectivamente.				

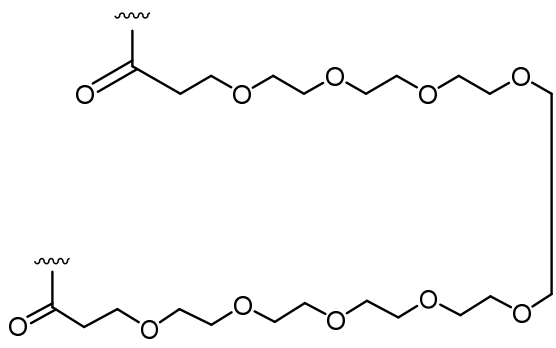
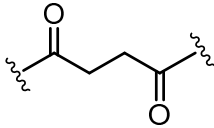
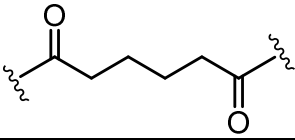
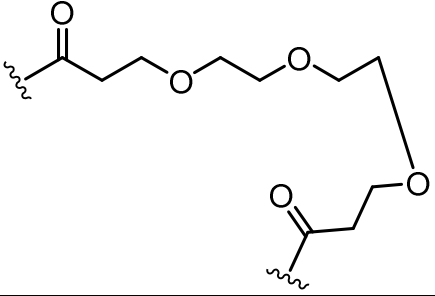
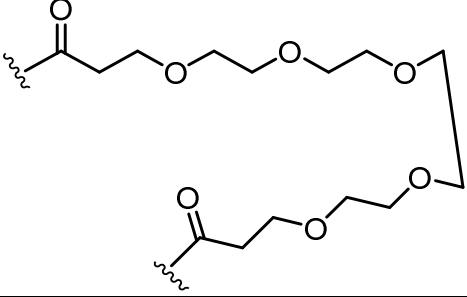
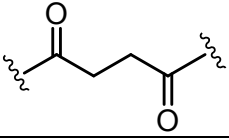
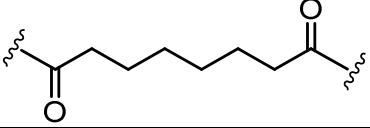
15

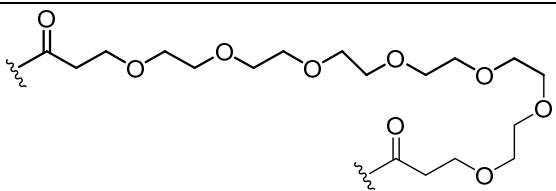
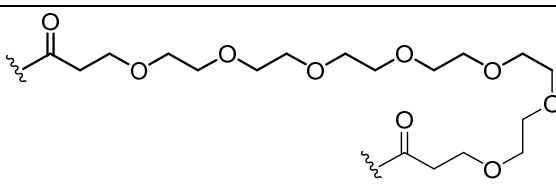
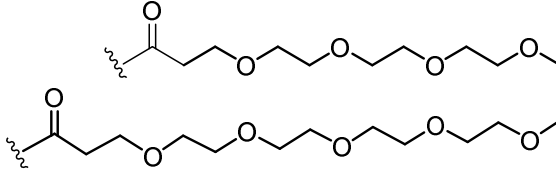
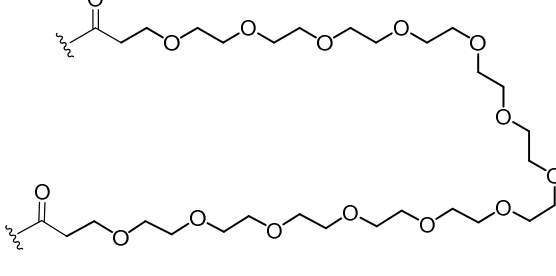
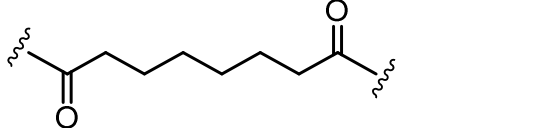
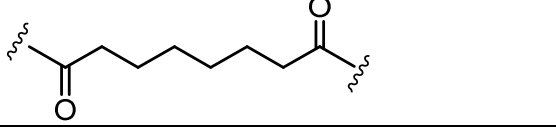
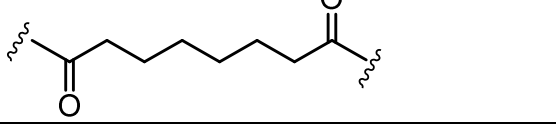
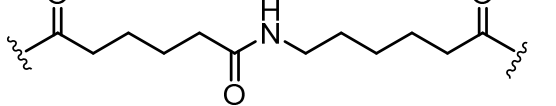
EJEMPLOS 17

La Tabla 2 muestra los dímeros que se prepararon usando intermedios apropiados (enlazadores) siguiendo el procedimiento general B o procedimiento general C según se indica usando la RHI, DesB30 RHI, insulina lispro, insulina aspart, insulina glargine o el análogo apropiado. Los dímeros se caracterizaron usando CLUP-EM Procedimiento D o CLUP-EM

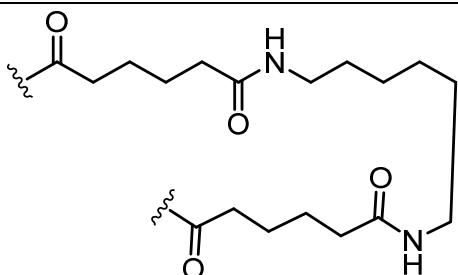
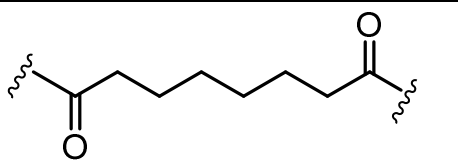
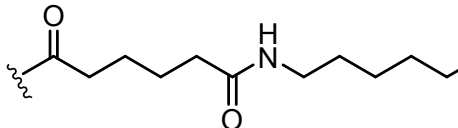
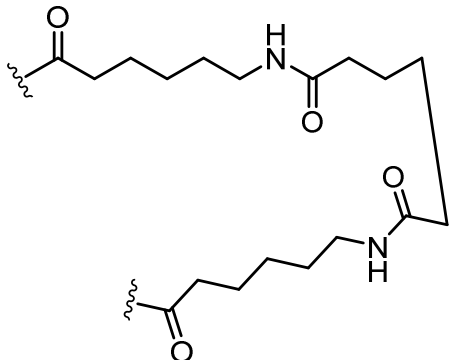
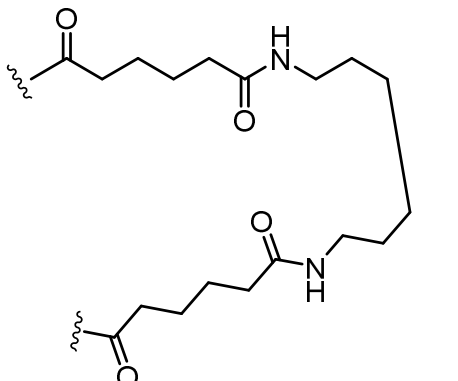
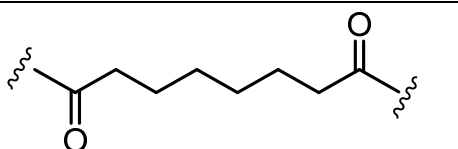
5 Procedimiento E, que muestran seis especies cargadas, es decir, $[(M+6)/6]$, (o siete especies cargadas, es decir, $[(M+7)/7]$) del compuesto precursor a un cierto tiempo de retención (Tr). La insulina y las moléculas de insulina unidas por el resto de unión son las mismas para cada uno de los dímeros mostrados en la Tabla 3.

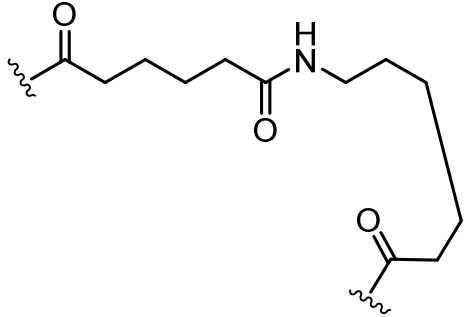
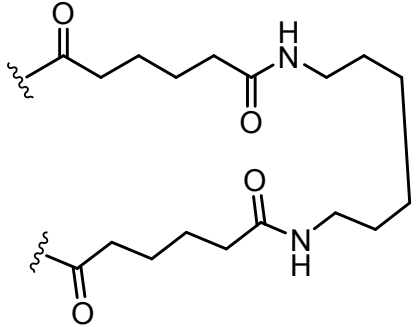
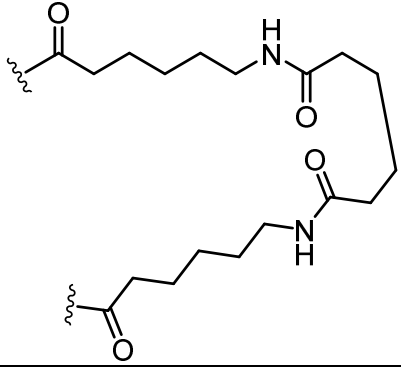
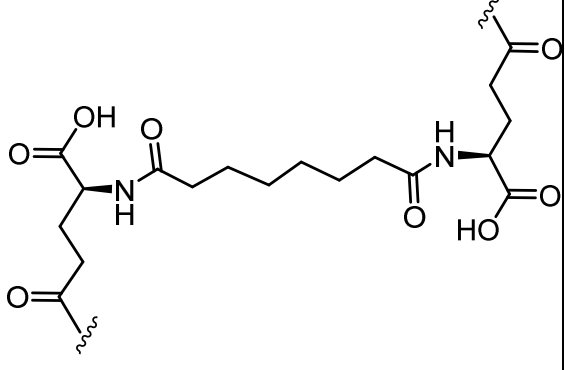
Tabla 3					
Dímero N.º	Estructura del dímero que muestra el resto de unión entre los residuos Lisina B29 y B29'	Tipo de insulina; Extremos N terminales de insulina	Proced. de Prep.	Tr (min)	(M+6)/6 o (M+7)/7
3		RHI; A1,B1,A1',B1' = carbamoílo	B	4,41	1988,745
4		RHI; A1,B1,A1',B1' = H	C	3,76	1986,88
5		RHI; A1,B1,A1',B1' = H	C	3,74	1972,6
6		RHI; A1,B1,A1',B1' = H	C	3,80	1754,2

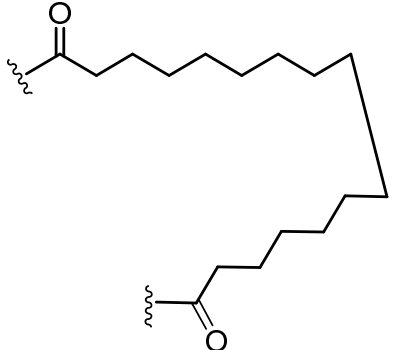
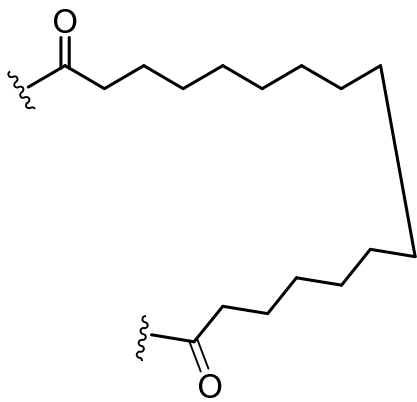
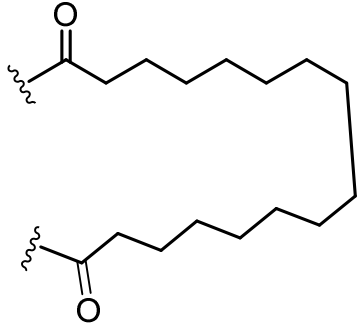
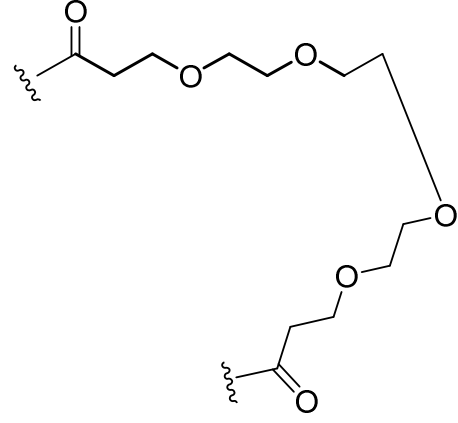
7		RH1; A1,B1,A1',B 1' = H	C	3,87	1728,8
8		RH1; A1,B1,A1',B 1' = H	C	3,70	1950,65
9		RH1; A1,B1,A1',B 1' = H	C	3,70	1954,9
10		RH1; A1,B1,A1',B 1' = carbamoilo	B	3,97	1715,3
11		RH1; A1,B1,A1',B 1' = carbamoilo	B	3,98	1727,9
12		RH1; A1,B1,A1',B 1' = carbamoilo	B	3,73	1978,8
13		RH1; A1,A1' = acetilo, B1,B1' = H	B	3,83	1973,8

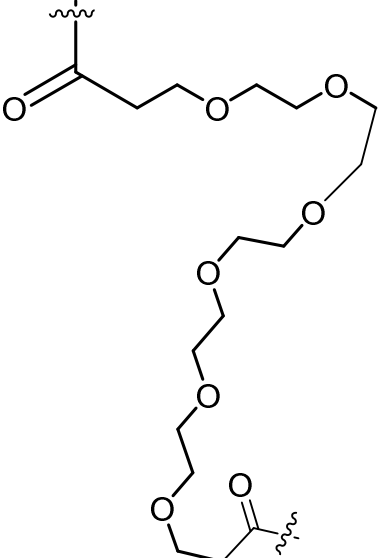
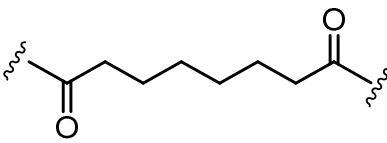
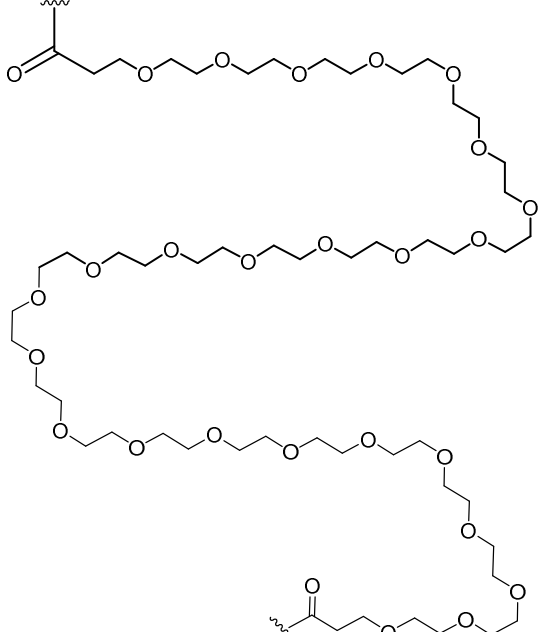
14		RHI; A1,B1,A1',B 1' = carbamoílo	B	4,10	1740,5
15		RHI; A1,B1,A1',B 1' = H	C	3,97	1716,0
16		RHI; A1,B1,A1',B 1' = carbamoílo	B	3,80	1752,4
17		RHI; A1,B1,A1',B 1' = carbamoílo	B	4,13	1778,7
18		Insulina lispro; A1,B1,A1',B 1' = H	C	3,74	1960,54
19		Insulina aspart; A1,B1,A1',B 1' = H	C	3,74	1966,13
20		RHI desB30; A1,B1,A1',B 1' = H	C	4,57	1926,04
21		RHI; A1,B1,A1',B 1' = carbamoílo	B	4,48	1716,7

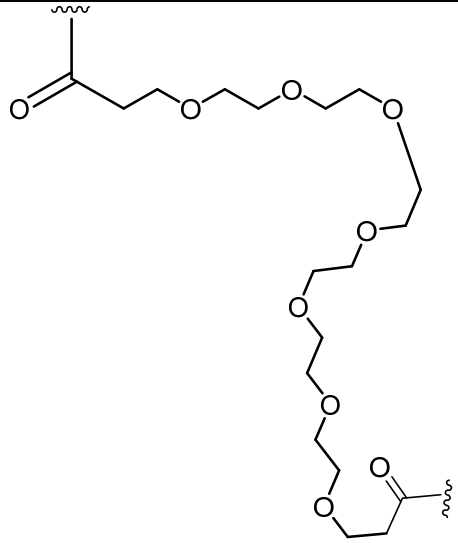
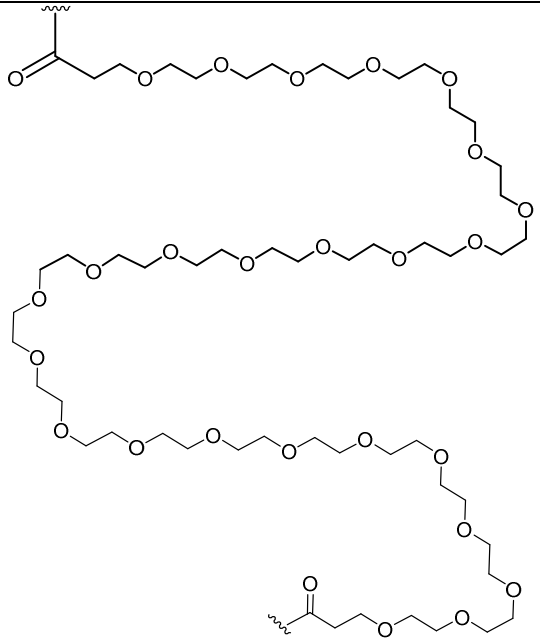
22		RH1; A1,B1,A1',B 1' = H	C	4,32	1974,06
23		RH1; A1,B1,A1',B 1' = carbamoílo	B	3,38	1733,11
24		RH1; A1,B1,A1',B 1' = carbamoílo	B	3,59	1988,4
25		RH1; A1,B1,A1',B 1' = H	C	4,31	1708,35
26		RH1; A1,B1,A1',B 1' = H	C	4,08	1993,02

27		RHI; A1,B1,A1',B 1' = carbamóilo	B	4,18	1732,48
28		RHI desB30; A1,B1,A1',B 1' = carbamóilo	B	3,86	1954,9
29		RHI desB30; A1,B1,A1',B 1' = H	C	3,75	1940,76
30		RHI desB30; A1,B1,A1',B 1' = H	C	3,77	1959,02
31		RHI desB30; A1,B1,A1',B 1' = H	C	4,00	1959,4
32		Insulina lispro; A1,B1,A1',B 1' = carbamóilo	B	3,81	1988,42

33		Insulina lispro; A1,B1,A1',B 1' = H	C	3,70	1974,04
34		Insulina lispro; A1,B1,A1',B 1' = H	C	3,80	1992,89
35		Insulina lispro; A1,B1,A1',B 1' = H	C	3,76	1992,86
36		RHI; A1,B1,A1',B 1' = H	C	4,29	1717,28

37		RHI; A1,B1,A1',B 1' = carbamoílo	B	4,01	1720,6
38		RHI desB30; A1,B1,A1',B 1' = H	C	3,88	1944,96
39		RHI; A1,B1,A1',B 1' = H	C	3,87	1978,88
88		RHI; A1,B1,A1',B 1' = H	D	3,39	1697,36

76		RHI; A1,B1,A1',B 1' = H	D	3,50	1709,73
83		Insulin aspart; A1,B1,A1',B 1' = carbamoilo	B	3,50	1994,39
85		RHI; A1,B1,A1',B 1' = H	D	3,46	1829,31

53		Insulin glargine; A1,B1,A1',B 1' = H	D	3,37	1788,87
87		Insulin glargine; A1,B1,A1',B 1' = H	D	3,43	1902,16
La línea ondulada indica el enlace entre el grupo amino épsilon de Lys B29 y Lys B29', respectivamente.					

EJEMPLO 18

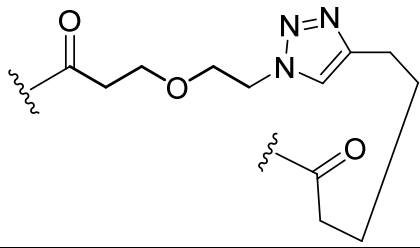
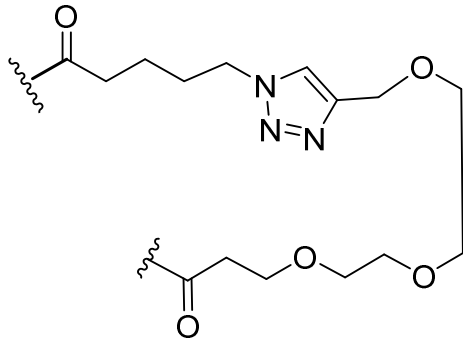
Procedimiento general D: Síntesis de dímeros de $N^6,29B,N^6,29B'$ -insulina usando química clic catalizada por Cu^{2+} .

En un recipiente de tamaño apropiado, se disolvió el intermedio apropiado de insulina que contiene acetileno (Análogo), con agitación suave, a temperatura ambiente en un disolvente mixto de DMSO y tampón acetato de trietilamonio ac. (pH 7,0, concentración final 0,2 mM). En otro recipiente de tamaño apropiado, se disolvió el intermedio apropiado de

insulina que contiene azido (Análogo), con agitación suave, a temperatura ambiente en un disolvente mixto de DMSO y agua. Ambas soluciones se combinaron, se mezclaron minuciosamente, se desgasificaron por burbujeo suave de N₂ directo. A la solución resultante se añadió solución recién preparada de ascorbato sódico o ácido ascórbico (concentración final de 0,5 mM) y después de mezclarse minuciosamente, una solución de CuSO₄ 10 mM y tris[(1-bencil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil]amina (es decir, ligando TBTA) en DMSO al 55%. Después de desgasificarse por burbujeo suave de N₂ directo y mezclarse minuciosamente, la mezcla se almacenó a temperatura ambiente, con mezcla ocasional, durante una noche. La mezcla de reacción se diluyó cuidadosamente con un disolvente mixto (v/v 7:3 AcCN/agua con TFA al 0,05%) a 0 °C y se ajustó el pH hasta 2,50 usando HCl 1,0 N (y NaOH 0,1 N si fuera necesario). La solución primero se concentró por ultrafiltración, bien a través de un sistema de filtración de flujo tangencial (FFT) o bien usando unidades de centrifugación Amicon Ultra-15, con membrana de 1K, 3K o 10K de PCPM. La solución concentrada habitualmente se sometió primero a cromatografía de intercambio iónico (columna PoliSULFOETIL A, PolyLC Inc., 250x21 mm, 5 m, 1000 Å; Tampón A: 0,1%(v/v)H₃PO₄/25%AcCN; Tampón B: 0,1%(v/v) H₃PO₄/25%AcCN/NaCl 0,5 M). Las fracciones que contenían el producto deseado con la pureza deseada se combinaron y concentraron usando sistema de TFF o Amicon Ultra-15. La solución resultante después se purificó adicionalmente por HPLC en fase inversa (Waters C4 columna de 250x50 mm, 10 m, columna de 1000 Å o KROMASIL C8 250x50 mm, 10 m, columna de 100Å; Tampón A: 0,05-0,1%TFA en agua; Tampón B: 0,05-0,1%TFA en AcCN). Las fracciones que contenían el producto deseado con la pureza deseada se combinaron y secaron por congelación o se les intercambiò el tampón usando sistema de TFF y/o Amicon Ultra-15 para dar los dímeros de insulina.

La **Tabla 4** enumera los **Dímeros 40, 41, 45, 46, 47, 59, 57, 79, 80, 82 y 84** que se prepararon usando los intermedios apropiados siguiendo el procedimiento general D. Estos dímeros se caracterizaron usando CLUP-EM Procedimiento D o CLUP-EM Procedimiento E o CLUP-EM Procedimiento G, que muestran seis especies cargadas, es decir [(M+6)/6], (o siete especies cargadas, es decir [(M+7)/7]) del compuesto precursor a un cierto tiempo de retención (Tr).

Tabla 4					
Dímero N.º	Primer esqueleto de insulina	Segundo esqueleto de insulina (')	Estructura del dímero que muestra el resto de unión entre los residuos Lisina B29 y B29'	Tr (min)	(M+6)/6 o (M+7)/7
40	Análogo 3	Análogo 2		3,83	1970,38
41	Análogo 1	Análogo 2		3,88	1938,84
45	Análogo 9	Análogo 2		4,28	1985,30
46	Análogo 3	Análogo 10		4,50	1985,43
47	Análogo 9	Análogo 10		4,59	1714,34
75	Análogo 3	Análogo 2		3,40	1696,35
57	Análogo 3	Análogo 12		3,57	1975,90
79	Análogo 11	Análogo 13		3,38	1993,39
80	Análogo 11	Análogo 2		3,37	1973,83

82	Análogo 11	Análogo 12		3,34	1978,33
84	Análogo 3	Análogo 13		3,40	1990,54
La línea ondulada indica el enlace entre el grupo amino épsilon de Lys B29 y Lys B29', respectivamente.					

EJEMPLO 19

Procedimiento General E: Síntesis de dímeros $N^{6,29B}, N^{6,29B'}$ -insulina usando

5 química clic de Cu^{2+} -catalizado doble.

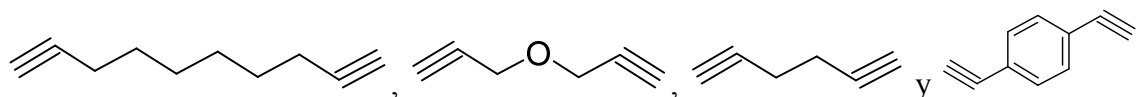
En un recipiente dimensionado apropiado, se disolvió el intermedio apropiado de insulina que contiene azido (Análogo), con agitación suave, a temperatura ambiente en un disolvente mezclado de DMSO y tampón de acetato de trietilamonio ac. (pH 7,0, concentración final 0,2 mM). En otro recipiente dimensionado apropiado, se disolvió el enlazador intermedio o

10 en puente que contiene bis-acetileno apropiado, con agitación suave, a temperatura ambiente en un disolvente mezclado de DMSO y agua. Se combinaron ambas soluciones, se mezclaron bien, se degasificaron con burbujeo suave a través de N_2 . A la solución resultante se le añadió solución de ácido ascórbico o ascorbato de sodio recién preparada (la concentración final es de 0,5 mM)y, después de mezclar bien, una solución de $CuSO_4$ 10 mM y tris[(1-bencil-1*H*-1,2,3-

15 triazol-4-il)metil]amina (es decir, ligando TBTA) en DMSO al 55 %. Después de degasificar por burbujeo suave a través de N_2 y mezclar bien, se almaceno la muestra a temperatura ambiente, con mezclado ocasional, durante la noche. Se diluyó cuidadosamente la mezcla de reacción con un disolvente mixto (v/v 7:3 AcCN/agua con TFA al 0,05 %) a 0 °C y se ajustó el pH a 2,50 usando HCl 0,1, 1,0 N (y NaOH 0,1 N NaOH en caso necesario). En primer lugar se

concentró la solución por ultrafiltración, a través de un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) o bien usando unidades centrífugas Amicon Ultra-15, con membrana MWCO de 1K, 3K, o 10K. Normalmente, en primer lugar, se sometió la solución concentrada a cromatografía de intercambio iónico (columna PolySULFOETHYL A, PolyLC Inc., 250x21 mm, 5 μ m, 1000 Å; 5 Tampón A: 0,1 %(v/v)H₃PO₄/25 %AcCN; Tampón B: 0,1%(v/v)H₃PO₄/25%AcCN/0,5 M NaCl). Se combinaron las fracciones que contenían el producto deseado con la pureza deseada y se concentraron usando el sistema TFF o Amicon Ultra-15. A continuación, se purificó adicionalmente la solución resultante por HPLC de fase inversa (columna Waters C4 250x50 mm, 10 μ m, columna 1000 Å o KROMASIL C8 250x50 mm, 10 μ m, columna 100Å; Tampón 10 A: 0,05-0,1% TFA en agua; Tampón B: 0,05-0,1% TFA en AcCN). Se combinaron las fracciones que contenían el producto deseado con la pureza deseada y se secaron por congelación o se sometieron a intercambio con tampón usando el sistema TFF y/o Amicon Ultra-15 para dar los dímeros de insulina.

La **Tabla 5** enumera los **Dímeros 42-44 y 54** que se prepararon usando los 15 intermedios apropiados siguiendo el Procedimiento General E. Los enlazadores intermedios o en puente de bis-acetileno fueron



Se caracterizaron estos dímeros usando CLUP-EM Procedimiento D o CLUP-EM Procedimiento E, que muestra seis especies cargadas, es decir [(M+6)/6], (o siete especies cargadas, es decir 20 [(M+7)/7]) del compuesto precursor en un cierto tiempo de retención (Tr).

Tabla 5					
Dímero N.º	Primer esqueleto de insulina	Segundo esqueleto de insulina (')	Estructura del dímero que muestra el resto de unión entre los residuos Lisina B29 y B29'	Tr (min)	(M+6)/6 o (M+7)/7

42	Análogo 3	Análogo 3		4,07	1501,00
43	Análogo 3	Análogo 3		4,47	1993,95
44	Análogo 3	Análogo 3		4,22	1494,14
59	Análogo 3	Análogo 3		3,78	1714,17
La línea ondulada indica el enlace entre el grupo amino épsilon de Lys B29 y Lys B29', respectivamente.					

EJEMPLO 20

Este ejemplo ilustra la síntesis de los dímeros $N^{2,1A}, N^{2,1A'}, N^{2,1B}, N^{2,1B'}$ -tetraquis(acetilo o PEG1 o metoxiacetilo) (**Dímeros 48, 55, 56, 69 y 70**).

A una solución de **Dímero 40, 19 o 14** (21 mg, 1,777 μmol) en DMSO (2 ml) a temperatura ambiente se le añadió TEA (3,96 μl , 0,028 mmol) y después una solución de acetato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (2,23 mg, 0,014 mmol) en DMSO (100 μl) u otro éster activado de N-hidroxisuccinimida apropiado (metoxiacetato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo o acetato de 2,5-

dioxopirrolidin-1-ilo PEG1) en DMSO (100 μ l). Después de 3 horas, se diluyó la mezcla de reacción con 12 ml de mezcla de agua/AcCN = 7/3 con 0,1%TFA y se ajustó el pH hasta 2,5. La solución transparente resultante se concentró mediante filtros de centrifuga Amicon Ultra 15 con membrana de 10K de PCPM. La solución resultante se sometió primero a cromatografía de intercambio iónico (PoliSULFOETIL A, 250x21 mm, 5 μ m, 1000 Å, 15 ml/min, gradiente del 5% al 45% en 30 min; Tampón A: 0,1% (v/v) H₃PO₄/25%Acetonitrilo en agua; Tampón B: 0,1% (v/v) H₃PO₄/25%Acetonitrilo/NaCl 0,5 M en agua). Las fracciones que contenían el producto deseado con la pureza deseada se combinaron y concentraron usando Amicon Ultra-15 con membrana de 10K de PCPM. La solución resultante después se sometió a HPLC en fase inversa (KROMASIL C8 250x50 mm, 10 μ m, columna de 100 Å; Tampón A: 0,05%TFA en AcCN/H₂O; Tampón B: 0,05% AcCN; caudal 85 ml/min). Las fracciones deseadas se combinaron y secaron por congelación para dar el **Dímero 48, 55, 56, 69 o 70** como se muestra en la **Tabla 6**. Se usó CLUP-EM Procedimiento F o G.

Los sustituyentes *N* terminales tienen la estructura

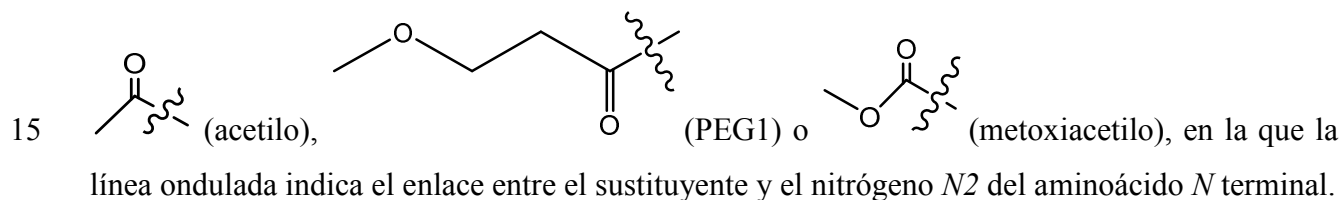
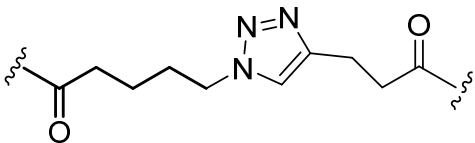
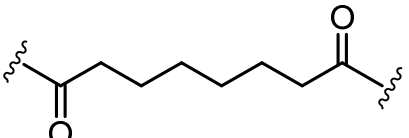
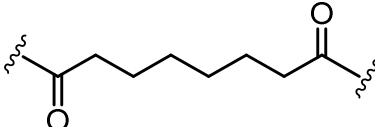
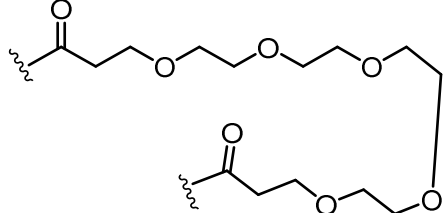
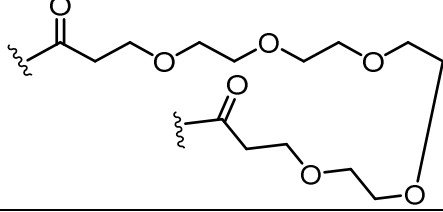
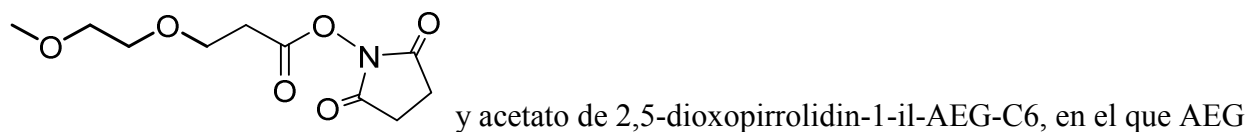
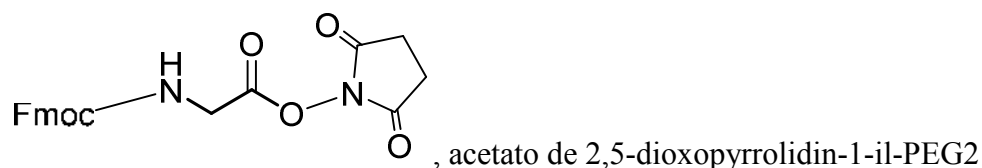


Tabla 6				
Dímero N.º	Estructura del dímero que muestra el resto de unión entre los residuos Lisina B29 y B29'	Tipo de insulina; Extremos <i>N</i> terminales de insulina	Tr (min)	(M+6)/6 o (M+7)/7
48		RHI; A1,B1,A1',B' = acetilo	4,71	1998,93
55		RHI; A1,B1,A1',B' = acetilo	3,61	1987,97

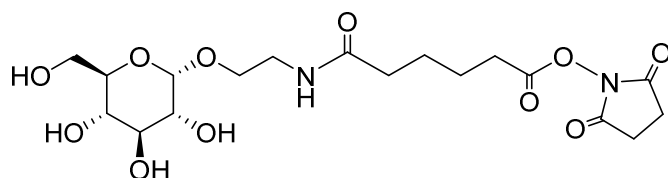
56		RHI; A1,B1,A1',B' = PEG1	3,53	1729,22
69		RHI; A1,B1,A1',B' = acetilo	3,55	1727,31
70		RHI; A1,B1,A1',B' = metoxiacetilo	3,67	1744,71
La línea ondulada indica el enlace entre el grupo amino épsilon de Lys B29 y Lys B29', respectivamente.				

EJEMPLO 21

La Tabla 7 enumera los **Dímeros 49, 50 y 51** y muestra los grupos acilo (X) unidos a los grupos amino de $N^2,1A,N^2,B1,N^2,A1'$ y $N^2,B1'$. Estos dímeros se prepararon a partir del **Dímero 48** pero sustituyendo los ésteres activados apropiados de N-hidroxisuccinimida por acetato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo para producir los **Dímeros 49, 50 y 51**. Los ésteres activados fueron acetato de 2,5-dioxopirrolidin-1-il-Fmoc-glicina



es aminoetilglucosa



. Estos dímeros se caracterizaron usando CLUP-EM Procedimiento F (**Dímeros 50 y 51**) o CLUP-EM Procedimiento G (**Dímero 49**) que

muestran seis especies cargadas, es decir $[(M+6)/6]$, (o siete especies cargadas, es decir $[(M+7)/7]$) del compuesto precursor a un cierto tiempo de retención (Tr). Los dímeros se muestran en la **Tabla 7**.

Los sustituyentes *N* terminales tienen la estructura

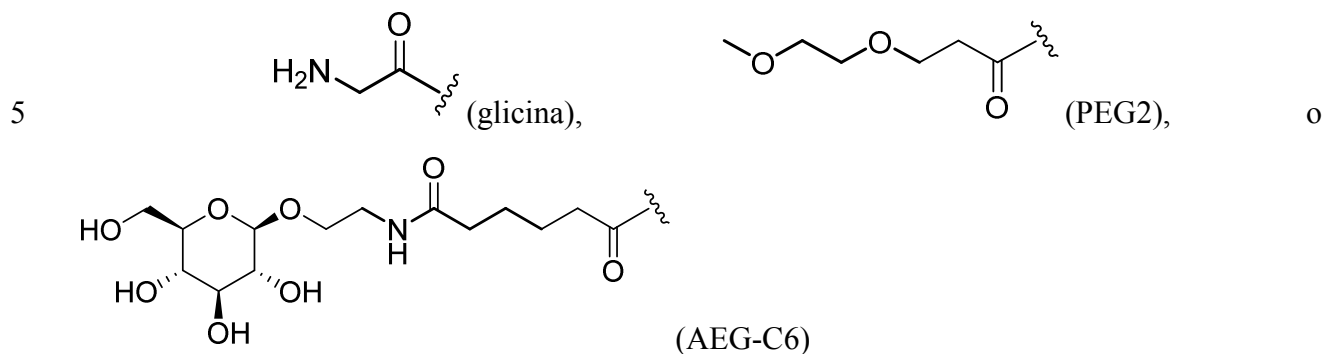


Tabla 7				
Dímero N.º	Estructura del dímero que muestra el resto de unión entre los residuos Lisina B29 y B29'	Tipo de insulina; Extremos <i>N</i> terminales de insulina	Rt (min)	$(M+6)/6$ o $(M+7)/7$
49		RHI; A1,A1', B1,B1' = glicina	3.62	1722.06
50		RHI; A1,A1', B1,B1' = PEG2	4.85	1764.16
51		RHI; A1,A1', B1,B1' = AEM-C6	4.06	1880.19
La línea ondulada indica el enlace entre el grupo amino épsilon de Lys B29 y Lys B29', respectivamente.				

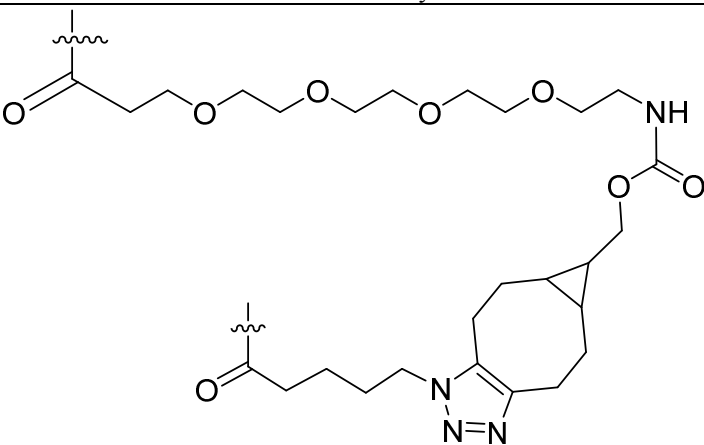
EJEMPLO 22

10 Este ejemplo ilustra la síntesis de **Dímero 52** usando química clic sin cobre.

A una solución de **Análogo 3** (10 mg, 1,686 μ mol) en 1,0 ml de 3:2 v/v

H₂O/AcCN a temperatura ambiente se añadió una solución de **Análogo 4** (10,5 mg, 1,686 mol)

- en 1,0 ml de 3:2 v/v H₂O/AcCN. Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas, la mezcla de reacción se sometió primero a cromatografía de intercambio iónico (PoliSULFOETIL A, 250x21 mm, 5 µm, 1000 Å, 15 ml/min, gradiente del 5% al 45% en 30 min; Tampón A: 0,1% (v/v) H₃PO₄/25%Acetonitrilo en agua; Tampón B: 0,1% (v/v) H₃PO₄/25%Acetonitrilo/NaCl
- 5 0,5 M en agua). Las fracciones que contenían el producto deseado con la pureza deseada se combinaron y concentraron usando Amicon Ultra-15 con membrana de 3K o 10K de PCPM. La solución resultante después se sometió a HPLC en fase inversa (KROMASIL C8 250x50 mm, 10 m, columna de 100 Å; Tampón A: 0,05%TFA en AcCN/H₂O; Tampón B: 0,05% AcCN; caudal
- 85 ml/min). Las fracciones deseadas se combinaron y secaron por congelación para dar el
- 10 **Dímero 52**. CLUP-EM Procedimiento F: Tr = 3,73 min, m/z = 1738,59 [(M+7)/7 +1]. Los resultados se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8				
Dímero N.º	Estructura del dímero que muestra el resto de unión entre los residuos Lisina B29 y B29'.	Tipo de insulina; Extremos N terminales de insulina	Tr (min)	(M+6)/6 o (M+7)/7
52		RHI; A1,A1'=H, B1,B1' = carbamoilo	3,73	1738,59
La línea ondulada indica el enlace entre el grupo amino épsilon de Lys B29 y Lys B29', respectivamente.				

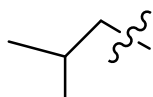
EJEMPLO 23

- 15 Este ejemplo ilustra la síntesis de dímeros N₂,1A,N₂,1A',N₂,1B,N₂,1B'-Tetraquis(dimetil o isobutilo) (**Dímeros 60, 58, 65 y 67**).

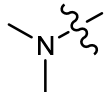
Se disolvió el **Dímero 40, 19 o 4** (100 mg, 8,46 µmol) (suspensión) en agua (10 ml) y se ajustó a pH=4,0 por solución de ácido acético, a continuación se añadieron

formaldehído (0,013 ml, 0,169 mmol) o isobutiraldehído (0,025 ml, 0,272 mmol), seguido de la adición de una solución recién preparada de cianoborohidruro de sodio (10,63 mg, 0,169 mmol) en agua (500 µl). Se formó el precipitado. Se agitó suavemente la mezcla. Después de la finalización de la reacción de aproximadamente 1 hora, se acidificó cuidadosamente la mezcla por la adición gota a gota de HCl 1 N a pH 2,9. La suspensión se volvió una solución transparente. Se sometió a purificación la mezcla por HPLC prep. de fase inversa (columna C-8, 50X250 cm, 85 ml/min, gradiente del 29 % al 36 % en 25 min). (Agua con TFA al 0,1 % y MeCN con TFA al 0,05 %). Se liofilizaron las fracciones deseadas para dar los dímeros (19,9 mg, 1,506 µmol, rendimiento del 17,80 %). CLUP-EM Procedimiento D: Rt = 3,31 min, m/z = 1989,44 [(M+6)/6 + 1].

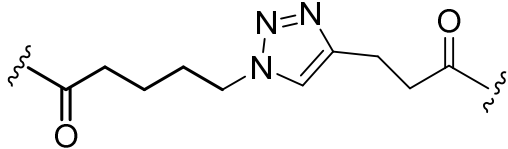
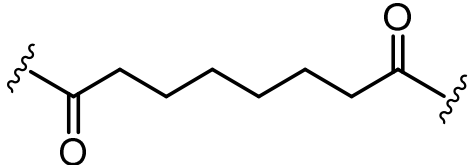
Los sustituyentes *N* terminales tienen la estructura

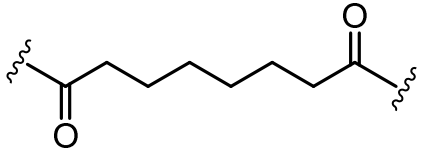
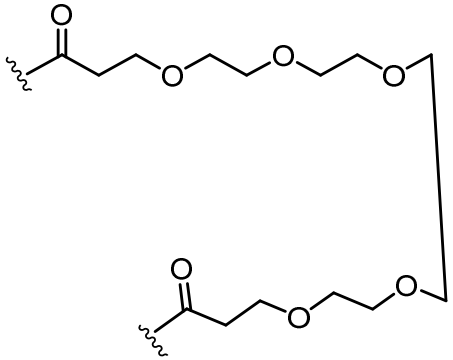


(isobutilo), en la que la línea ondulada indica el enlace entre el sustituyente y el

nitrógeno *N*2 del aminoácido *N* terminal, o  (*N*-dimetil; Me₂), en la que la línea ondulada indica el enlace entre el nitrógeno *N*2 y el carbono C2 del aminoácido *N* terminal.

Los dímeros se muestran en la **Tabla 9**.

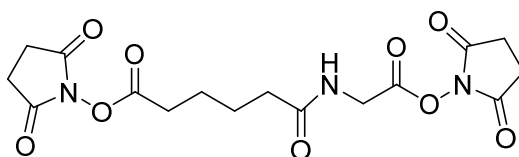
Tabla 9				
Dímero N.º	Estructura del dímero que muestra el resto de unión entre los residuos Lisina B29 y B29'.	Tipo de insulina; Extremos N terminales de insulina	Tr (min)	(M+6)/6 o (M+7)/7
60		RHI; A1,B1,A1',B' = Me ₂	3,31	1989,44
58		RHI; A1,B1,A1',B' = Me ₂	3,42	1978,48

65		RHI; A1,B1,A1',B ' = isobutilo	4,13	1997,04
67		RHI; A1,B1,A1',B ' = Me2	3,42	1719,39
La línea ondulada indica el enlace entre el grupo amino épsilon de Lys B29 y Lys B29', respectivamente.				

EJEMPLO 24

La síntesis de los **Dímeros 61, 62, 63, 64, y 66** fue como sigue.

Se describe la síntesis de 6-((2-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-2-oxoetil)amino)-6-oxohexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (enlazador C6-glicina; **Enlazador 24**).



Etapas 1 Adipato de bencil(2,5-dioxopirrolidin-1-ilo)

A una solución de ácido 6-(benciloxi)-6-oxohexanoico (5g, 21,16 mmol) en DMF (10 ml) a 0 °C se le añadió *N*-etil-*N*-isopropilpropan-2-amina (4,44 ml, 25,4 mmol) seguido de TSTU (7,01g, 23,28 mmol). Se agitó la reacción a 0 °C durante 1 hora y a temperatura ambiente durante 1 hora. Se vertió la mezcla en una mezcla de hielo-agua/éter etílico (1/1, 100 ml). Se extrajo la mezcla con éter etílico (3 x 50 ml), se lavó con agua (2x 10 ml) y salmuera (10 ml). Se secó la capa orgánica sobre MgSO₄, se filtró a través de una almohadilla de celite y se concentró para dar el compuesto del título como un jarabe incoloro (5,2 g, 15,6 mmol, 74 %). CL-EM 2 min: Tr = 1,05 min, m/z = 334,1 [M+1].

Etapas ácido 2-((carboximetil)amino)-6-oxohexanoico

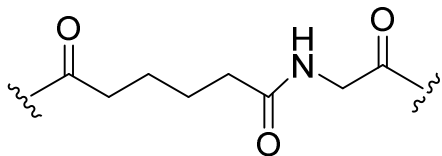
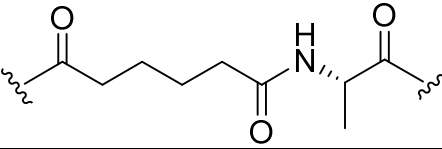
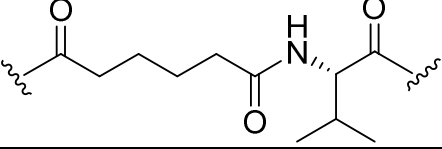
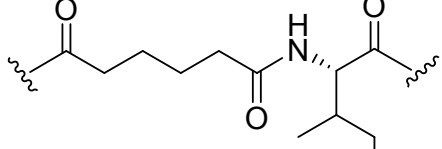
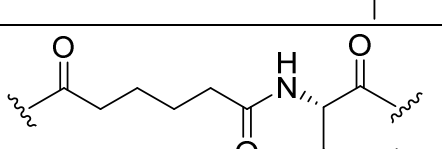
A una solución de glicina (225 mg, 3,0 mmol) en DMF (2,5 ml) se le añadió el producto de la Etapa 1 (1,0 g, 3,0 mmol) en DMF (2,5 ml) gota a gota seguido de TEA (418 µl, 3,0 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 18 h. Se retiró el DMF a presión reducida. Se purificó el producto en bruto por cromatografía de fase inversa C18 (elución con 0-40 % AcCN/agua en 16 volúmenes de columna (VC)). Se combinaron las fracciones que contienen el producto deseado, se concentró y se liofilizó para dar el intermedio (6-(benciloxi)-6-oxohexanoil)glicina. Al intermedio anterior en agua (3 ml), se le añadió Pd/C (10 %, 160 mg, 0,15 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente en un balón de hidrógeno durante 18 h. Se filtró la mezcla a través de una almohadilla de celite, se lavó con MeOH/agua (1/1, 10 ml). Se concentró el filtrado y se liofilizó para dar el compuesto del título (400 mg, 2,2 mmol, 66 %). CL-EM 2 min: Tr = 0,28 min, m/z = 204,03 [M+1].

Etapas 3. 6-((2-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-2-oxoetil)amino)-6-oxohexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo

Al producto de la etapa 2 (10 mg, 0,049 mmol) en DMF (0,5 ml) a 0 °C se le añadió TEA (0,015 ml, 0,108 mmol) seguido de TSTU (31,1 mg, 0,103 mmol). Se calentó la reacción hasta temperatura ambiente y se agitó a esa temperatura durante 1 h. La TLC (EtOAc/MeOH/Agua/AcCN: 2:1:1:1 (v:v:v:v)) mostró la formación del producto deseado (Rf: 0,25) y no quedó material de partida. Se usó el material en bruto para construir los dímeros sin purificación.

El **Enlazador 25** (C6-alanina), **Enlazador 26** (C6-isoleucina), **Enlazador 27** (C6-leucina) y el **Enlazador 28** (C6-valina) en los que el aminoácido que comprende el enlazador de C6-aminoácido es alanina, isoleucina, leucina y valina, respectivamente, se sintetizaron de forma similar al procedimiento mostrado anteriormente. Se construyeron los dímeros usando los enlazadores anteriores usando prep. Procedimiento D. Los resultados se muestran en la **Tabla 10**.

Tabla 10				
Dímero N.º	Estructura del dímero que muestra el resto de unión entre los residuos Lisina B29 y B29'.	Tipo de insulina; Extremos N terminales	Tr (min)	(M+6)/6 o (M+7)/7

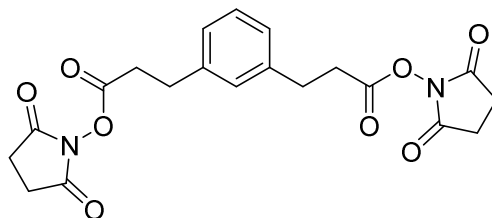
		de insulina		
61		RHI; A1,B1,A1',B 1' = Carbamoilo	3,90	1993,24
62		RHI; A1,B1,A1',B 1' = Carbamoilo	3,91	1995,62
63		RHI; A1,B1,A1',B 1' = Carbamoilo	4,02	1714,70
64		RHI; A1,B1,A1',B 1' = Carbamoilo	3,80	1716,61
66		RHI; A1,B1,A1',B 1' = Carbamoilo	3,73	1716,93

La línea ondulada indica el enlace entre el grupo amino épsilon de Lys B29 y Lys B29', respectivamente.

EJEMPLO 25

La síntesis de los **Dímeros 73, 89, 90, 91, 92 y 93** fue como sigue.

Se describe la síntesis de 3,3'-(1,3-fenileno)dipropionato de bis(2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) (dipropilfenilo; **Enlazador 29**).



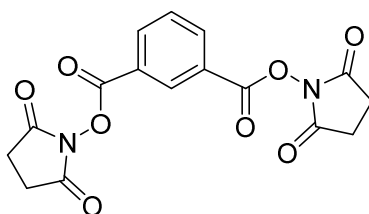
Etapas 1. 3,3'-(1,3-fenileno)dirpropionato de Bis(2,5-dioxopirrolidin-1-ilo)

A una solución de ácido 3,3'-(1,3-fenileno)dipropiónico (21,8 mg, 0,098 mmol) en DMF (0,6 ml) a 0°C se le añadió TEA (29 ml, 0,206 mmol) seguido de TSTU (62,0 mg, 0,206

mmol). Se calentó la reacción hasta temperatura ambiente y se agitó a esa temperatura durante 1 hora. La TLC (EtOAc/MeOH/Agua/AcCN: 2/1/1/1) mostró la formación del producto deseado (Rf: 0,25) y no quedó material de partida. CLUP-EM Procedimiento B: Tr = 3,47 min, m/z = 417,19 [M+1]. Se usó el producto sin purificación adicional para la construcción del **Dímero 73**

5 usando el **Análogo 5** usando el procedimiento D.

Se describe la síntesis de benceno-1,3-dicarboxilato de bis(2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) (tereftalato; **Enlazador 34**).

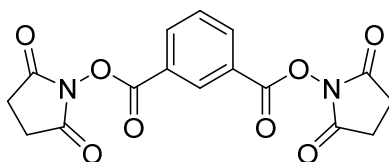


Etapas 1. benceno-1,3-dicarboxilato de bis(2,5-dioxopirrolidin-1-ilo)

10 A 0 °C, a una solución de ácido tereftálico (100 mg, 0,602 mmol) en THF (2 ml) se le añadió 2-tetrafluoroborato de (2,5-dioxopirrolidin-1-il)-1,1,3,3-tetrametilisouronio (371 mg, 1,234 mmol) seguido de *N*-etil-*N*-isopropilpropan-2-amina (0,222 ml, 1,234 mmol)). Después de 30 minutos, se retiró el baño de hielo. Se agitó la solución a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadieron 25 ml adicionales de THF y se dejó la reacción durante la noche a

15 temperatura ambiente. Se concentró el producto hasta aproximadamente 5 ml y se usó una porción como estaba sin purificación adicional para construir el **Dímero 89** usando RHI usando el Procedimiento D. Se diluyó el material restante con acetato de etilo (200 ml) y se lavó con salmuera (10 ml), se secó la capa orgánica con Na₂SO₄, se filtró y se concentró.

20 Se describe la síntesis de isoftalato de bis(2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) (isofthalato; **Enlazador 35**).

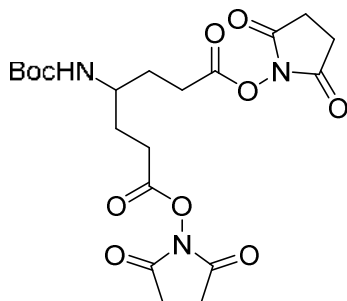


Etapas 1. Isoftalato de bis(2,5-dioxopirrolidin-1-ilo)

A ácido isoftálico (54 mg, 0,325 mmol) en DMSO (1 ml) se le añadió TSTU (215 mg, 0,715 mmol) seguido de TEA (0,137 ml, 0,975 mmol). CL-EM 2 min: Tr = 0,79 min, m/z = 721,28 [2M+1]. Se usó el producto sin purificación para construir el **Dímero 90** usando el **Análogo 5** y el **Dímero 91** usando RHI en el Procedimiento E.

25

Se describe la síntesis de 4-((terc-butoxicarbonil)amino)heptanodioato de bis(2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) (heptanodioato; **Enlazador 36**).



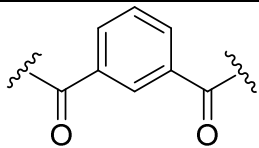
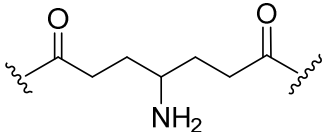
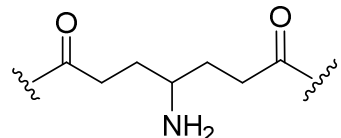
5 *Etapa 1. 4-((terc-butoxicarbonil)amino)heptanodioato de bis(2,5-dioxopirrolidin-1-ilo)*

A ácido 4-((terc-butoxicarbonil)amino)heptanodioico (16,5 mg, 0,06 mmol) en DMSO (0,5 ml) se le añadió TSTU (39,7 mg, 0,132 mmol) seguido de TEA (0,025 ml, 0,180 mmol). CL-EM 2 min: Tr = 0,90 min, m/z = 470,34 [M+1]. Se usó el producto sin purificación para construir el **Dímero 92** usando el **Análogo 5** y el **Dímero 93** usando RHI en el

10 Procedimiento E.

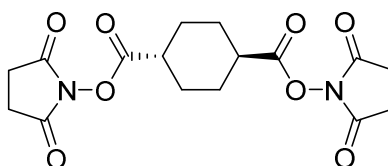
Los resultados se muestran en la **Tabla 11**.

Tabla 11				
Dímero N.º	Estructura del dímero que muestra el resto de unión entre los residuos Lisina B29 y B29'.	Tipo de insulina; Extremos N terminales de insulina	Tr (min)	(M+6)/6 o (M+7)/7
73		RHI; A1,B1,A1',B1' = Carbamoilo	3,55	1711,57
89		RHI; A1,B1,A1',B1' = H	3,43	1678,64
90		RHI; A1,B1,A1',B1' = Carbamoilo	3,67	1703,20

91		RHI; A1,B1,A1',B 1' = H	3,52	1678,69
92		RHI; A1,B1,A1',B 1' = Carbamoilo	3,56	1704,64
93		RHI; A1,B1,A1',B 1' = H	3,33	1680,18
La línea ondulada indica el enlace entre el grupo amino épsilon de Lys B29 y Lys B29', respectivamente.				

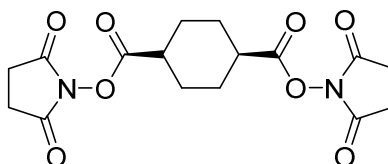
EJEMPLO 26

La síntesis de los **Dímeros 71, 72, 77, 78, 81 y 87** fue como sigue. Se describe la síntesis de (*1S,4S*)-ciclohexano-1,4-dicarboxilato de bis(2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) (**Enlazador 30**; 1,4-diácido trans-ciclohexano).



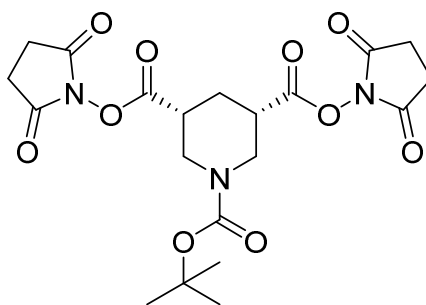
A una solución de ácido (*1S,4S*)-ciclohexano-1,4-dicarboxílico (200 mg, 1,162 mmol) en DCM (11 ml) a 0 °C se le añadió TSTU (734 mg, 2,439 mmol) y DIPEA (0,5 ml, 2,86 mmol). Se agitó la mezcla de reacción resultante a temperatura ambiente durante 1 hora. Se prensó el producto en la solución de reacción como un sólido blanco; se filtró y se lavó con DCM (2x5 ml); y se secó a vacío para obtener el compuesto del título. CLUP-EM calculada para C₁₆H₁₈N₂O₈, 366,11, m/e observado: 367,16 (M+H)⁺, (Tr: 3,20 / 5,00 minutos). CLUP-EM Procedimiento A. RMN de ¹H (500 MHz, DMSO) : δ 2,81-2,89 (m; 2 H) ; 2,80 (s; 8 H) ; 2,02-2,10 (m; 4 H) ; 1,57-1,63 (m; 4 H).

Se describe la síntesis de (*1R,4R*)-ciclohexano-1,4-dicarboxilato de bis(2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) (**Enlazador 31**; 1,4-diácido cis-ciclohexano).



A una solución de ácido (1R,4R)-ciclohexano-1,4-dicarboxílico (200 mg, 1,162 mmol) en DCM (11 ml) a 0 °C se le añadió TSTU (734 mg, 2,439 mmol) y DIPEA (0,5 ml, 2,86 mmol). Se agitó la mezcla de reacción resultante a temperatura ambiente durante 1 hora. Se purificó el residuo por cromatografía en gel de sílice (0-100 % EtOAc/hexanos) para proporcionar el compuesto del título. CLUP-EM calculada para C₁₆H₁₈N₂O₈, 366,11, m/z observado: 367,17 (M+H)⁺, (Tr: 3,17 / 5,00 minutos). CLUP-EM Procedimiento A. RMN de ¹H (500 MHz, DMSO): δ 3,02-3,08 (m; 2 H); 2,80 (s; 8 H); 1,80-1,90 (m; 8 H).

Se describe la síntesis de 3,5-bis(2,5-dioxopirrolidin-1-il)-(3R,5S)-piperidin-1,3,5-tricarboxilato de 1-(*terc*-butilo) (**Enlazador 32**).



A una solución de ácido (3R,5S)-1-(*terc*-butoxicarbonil)piperidin-3,5-dicarboxílico (200 mg, 0,734 mmol) en DMF (7 ml) a 0 °C se le añadió TSTU (485 mg, 1,611 mmol) y DIPEA (0,3 ml, 1,718 mmol). Se agitó la mezcla de reacción resultante a temperatura ambiente durante 2 horas. Se purificó el residuo por cromatografía en gel de sílice (0-100 % EtOAc/hexanos) para proporcionar el compuesto del título. CLUP-EM calculada para C₂₀H₂₅N₃O₁₀, 467.15, m/e observado: 468,30 (M+H)⁺, (Tr: 0,98 / 2,00 minutos). CLUP-EM Procedimiento A:

Procedimiento General F: Síntesis de los dímeros N6,29B,N6,29B'-insulina usando condiciones de base orgánica

En un recipiente dimensionado apropiado, se suspende insulina o análogo de insulina a temperatura ambiente en un disolvente orgánico o disolventes ac./orgánicos mezclados, por ejemplo, DMSO, en presencia de una base, por ejemplo, TEA, o 1,1,3,3-tetrametilguanidina (TMG). Se deja que se agite suavemente la mezcla hasta que la insulina esté completamente disuelta. A la solución resultante se le añade un intermedio de éster activado en solución de disolventes orgánicos, tales como DMSO o DMF. Después de CLUP, el

cromatograma muestra que una parte sustancial de la mezcla de reacción se ha convertido en el dímero *N*6,29B,*N*6,B29B'-insulina (o dímero lispro *N*6,28B,*N*6,28B'-insulina), se transfirió la solución de reacción, por medio de una autopipeta, a un tubo de centrífuga que contiene 50 ml de IPAc/MTBE (v/v 4:1) (45 ml). Se realizó la adición gota a gota. Se centrifugó la suspensión

5 blanca resultante (3000 rpm, 15 minutos, a 4 °C), para generar un sobrenadante transparente y un precipitado blanco. Se extrajo el sobrenadante y se secó el sedimento blanco a vacío. A continuación, se disolvió el sedimento blanco que contenía el intermedio en bruto en 2 ml de TFA a 0 °C y se agitó durante 10 minutos a la misma temperatura. Tras la finalización de la reacción de-boc, se transfirió la solución de reacción, por medio de una autopipeta, a un tubo de

10 centrífuga de 50 ml que contenía MTBE (45 ml). Se realizó la adición gota a gota. Se centrifugó la suspensión blanca resultante (3000 rpm, 15 minutos, a 4 °C), para generar un sobrenadante transparente y un precipitado blanco. Se extrajo el sobrenadante y se secó el sedimento blanco a vacío y se redisolvió en solución de CH₃CN/H₂O (v/v 1:4). La mezcla de reacción se puede someter directamente a purificación de HPLC de fase inversa (columna

15 Waters C4 250x50 mm, 10 µm, columna 1000 Å o KROMASIL C8 250x50 mm, 10 µm, columna 100Å; tampón A: TFA al 0,05-0,1 % en agua desionizada; tampón B: TFA al 0,05-0,1 % en AcCN), o se puede desactivar la reacción por dilución cuidadosa con H₂O ácida fría (20x, pH ~ 3,0) a 0 °C y se ajusta su pH hasta un pH final de 2,5 usando HCl 1 N (y NaOH 0,1 N si es necesario). En primer lugar, se puede concentrar la solución por ultrafiltración, a través de

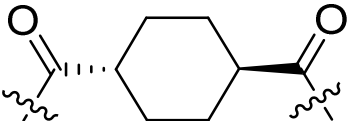
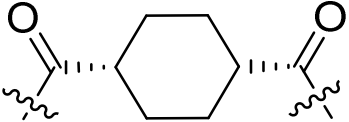
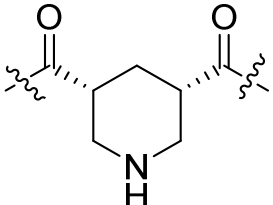
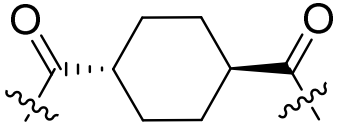
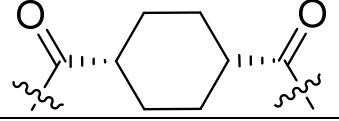
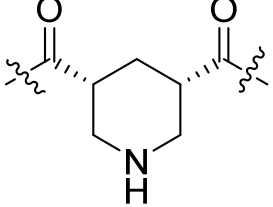
20 un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF) o bien usando unidades centrífugas Amicon Ultra-15, con membrana MWCO de 1K, 3K o 10K. Normalmente en primer lugar la solución concentrada se somete a cromatografía de intercambio iónico (columna PolySULFOETHIL A, PolyLC Inc., 250x21 mm, 5 µm, 1000 Å; tampón A: 0,1%(v/v)H₃PO₄/25%AcCN; Tampón B: 0,1%(v/v)H₃PO₄/25%AcCN/0,5 M NaCl). Se combinan las fracciones que contenían B29-

25 conjugado con pureza deseada y se concentra usando un sistema de TFF o Amicon Ultra-15. A continuación, la mezcla de reacción se somete a purificación de HPLC de fase inversa (columna Waters C4 250x50 mm, 10 µm, columna 1000 Å o KROMASIL C8 250x50 mm, 10 µm, columna 100Å; tampón A: TFA al 0,05-0,1 % en agua desionizada; tampón B: TFA al 0,05-0,1 % en AcCN). Se combinan las fracciones que contenían el dímero de insulina deseado y se

30 secó por congelación o se sometió a intercambio de tampón usando el sistema TFF y/o Amicon Ultra-15 para dar los dímeros *N*6,29B,*N*6,29B'-insulina.

La **tabla 12** enumera los **Dímeros 71, 72, 77, 78, 81 y 87**, que se prepararon usando el enlazador apropiado siguiendo el Procedimiento General B (**Dímeros 77 y 78**), el Procedimiento General C (**Dímeros 71 y 72**) o bien el Procedimiento General F (**Dímeros 81 y 87**). Estos dímeros se caracterizaron usando CLUP-EM Procedimiento D o CLUP-EM

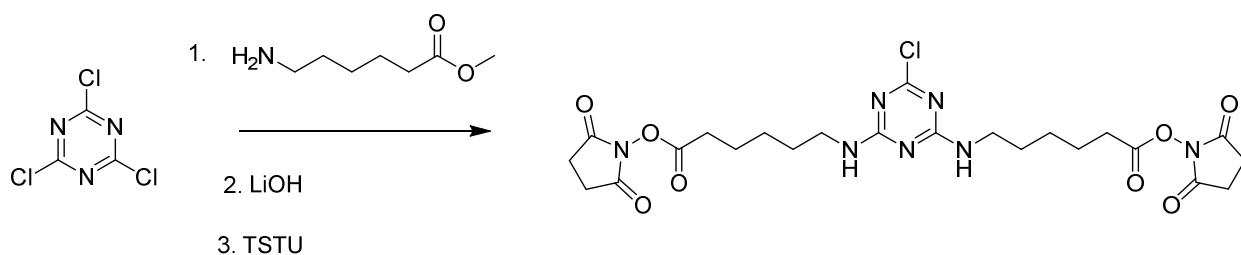
- 5 Procedimiento E, que muestra seis especies cargadas, es decir, $[(M+6)/6]$, (o siete especies cargadas, es decir, $[(M+7)/7]$) de compuesto precursor a un cierto tiempo de retención (Tr).

Tabla 12				
Dímero N.º	Estructura del dímero que muestra el resto de unión entre los residuos Lisina B29 y B29'.	Tipo de insulina; Extremos N terminales de insulina	Tr (min)	(M+6)/6 o (M+7)/7
71		RHI; A1,B1,A1',B1' = H	3,05	1959,33 1679,86
72		RHI; A1,B1,A1',B1' = H	3,07	1959,33 1679,86
81		RHI; A1,B1,A1',B1' = H	3,37	1959,48 1679,74
77		RHI; A1,B1,A1',B1' = carbamoílo	3,50	1988,07 1704,29
78		RHI; A1,B1,A1',B1' = carbamoílo	3,52	1988,08 1704,35
86		RHI; A1,B1,A1',B1' = carbamoílo	3,48	1988,18 1704,24
La línea ondulada indica el enlace entre el grupo amino épsilon de Lys B29 y Lys B29', respectivamente.				

EJEMPLO 26

La síntesis del **Dímero 68** y **Dímero 74** fue como sigue.

Se describe la síntesis de 6,6'-((6-cloro-1,3,5-triazin-2,4-diil)-bis(azandiil))dihexanoato de bis(2,5-dioxopirrolidin-1-ilo) (**Enlazador 33**; C₆N-cloro-1,3,5-Triazin-NC₆).



Se enfrió la solución de 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina (80 mg, 0,434 mmol) y 6-aminohexanoato de metilo (129 mg, 0,889 mmol), sal de HCl en CH₂Cl₂ (1 ml) a -30 °C. Se añadió gota a gota una solución de DIPEA (0,379 ml, 2,169 mmol) en CH₂Cl₂ (1 ml). Se agitó la mezcla a -30 °C-temperatura ambiente durante 5 horas. A continuación, se añadió CH₂Cl₂ (20 ml) y se lavó con HCl acuoso (1 M) (2X10 ml), NaHCO₃ acuoso (10 ml) y salmuera (10 ml). Se secó la capa orgánica sobre sulfato de sodio y se filtró, se concentró a vacío para proporcionar 6,6'-((6-cloro-1,3,5-triazin-2,4-diil)-bis(azandiil))dihexanoato de dimetilo (135 mg, 0,336 mmol).

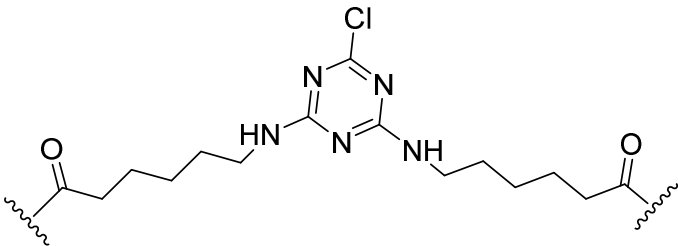
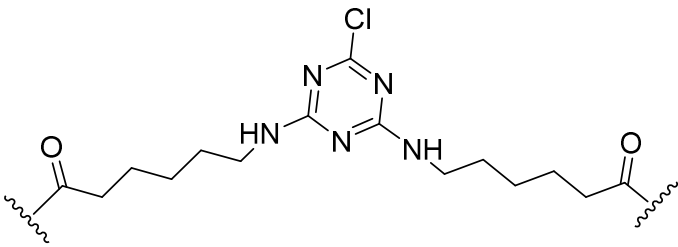
A la solución de 6,6'-((6-cloro-1,3,5-triazin-2,4-diil)-bis(azandiil))dihexanoato de dimetilo (135 mg, 0,336 mmol) en THF (0,5 ml) y metanol (0,5 ml) se le añadió LiOH acuoso (2M) (504 µl, 1,008 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora y después se concentró a vacío para producir un residuo seco. Se disolvió el residuo en agua y se neutralizó con HCl ac. Se recogió el precipitado por filtración y se lavó con agua. Se secó el sólido a vacío para proporcionar ácido 6,6'-((6-cloro-1,3,5-triazin-2,4-diil)-bis(azandiil))dihexanoico.

A una solución de ácido 6,6'-((6-cloro-1,3,5-triazin-2,4-diil)-bis(azandiil))dihexanoico (108 mg, 0,289 mmol) en DMF (2889 µl) se le añadió TSTU (174 mg, 0,578 mmol) seguido de trietilamina (81 µl, 0,578 mmol). Se agitó la reacción 1 hora. La

CLUP indica la formación de material deseado, CLUP-EM Procedimiento C: Tr = 0,99 min, m/z = 568,2 [M+1]. Se usó este reactivo (0,1M/DMF) sin purificación adicional.

Se prepararon los dímeros usando el Procedimiento General B (**Dímero 74**) o bien el Procedimiento General C (**Dímero 68**). Estos dímeros se caracterizaron usando CLUP-EM Procedimiento D o CLUP-EM Procedimiento E, que muestra seis especies cargadas, es decir, [(M+6)/6], (o siete especies cargadas, es decir, [(M+7)/7]) de compuesto precursor a un cierto tiempo de retención (Tr). Se construyó el **Dímero 68** usando el **Enlazador 33** y RHI. Se construyó el **Dímero 74** usando el **Enlazador 33** y el **Análogo 5**. Los resultados se muestran en la **Tabla 13**.

10

Tabla 13				
Dímero N.º	Estructura del dímero que muestra el resto de unión entre los residuos Lisina B29 y B29'.	Tipo de insulina; Extremos N terminales de insulina	Tr (min)	(M+6)/6 o (M+7)/7
68		A1,B1,A1',B1' = H	3,48	1993,09
74		A1,B1,A1',B1' = carbamoilo	3,56	1733,20

La línea ondulada indica el enlace entre el grupo amino épsilon de Lys B29 y Lys B29', respectivamente.

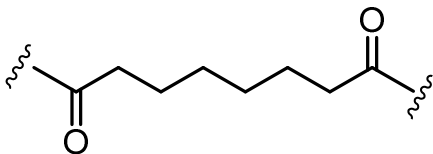
EJEMPLO 27

La síntesis del **Dímero 54** fue como sigue.

Se disolvió A1-TFA-RHI (D. Liu et. Al., Journal of Peptide Sci., 2012, 18, 336-341) (100 mg, 0,017 mmol) en una premezcla que contenía agua (5 ml) y fosfato de potasio dibásico (24,49 mg, 0,141 mmol) (el pH de la solución resultante es aproximadamente de 4). Se añadió cianato de potasio (27,5 mg, 0,339 mmol) y se agitó durante la noche. Se purificó el producto por cromatografía de fase inversa en fase C-8 (Columna KROMASIL, C8 10uM 100A,

tamaño 250 x 50mm; disolvente A=agua/0,05 %TFA, disolvente B=AcCN/0,05 %TFA), Flujo=85 ml/min, gradiente B en A 26-34 % en 30 min. CLUP-EM Procedimiento F: Rt = 4,48 min, m/z = 1486,9 [(M+4)/4 +1].

Se disolvió el producto anterior (60 mg, 10,09 μ mol) en DMSO (594 μ l) y se
 5 añadió trietilamina (28,1 μ l, 0,202 mmol) seguido de solución de enlazador suberato de disuccinimidilo (1,858 mg, 5,04 μ mol) disuelto en 100 μ l de DMSO. Se agitó durante 3 horas. La CLUP indica la finalización de la reacción. Se añadió la mezcla de reacción completa en hidróxido de amonio (2105 μ l, 15,13 mmol) (gota a gota, exotermia esperada). Se agitó suavemente durante 2 horas y se confirmó la desprotección del grupo TFA. Se diluyó la mezcla
 10 por 20 ml de agua y se retiró la mayoría de hidróxido de amonio por diafiltración usando tubos Amicon 10K. Se ajustó el pH a aproximadamente 3, y se retiraron las sales por diafiltración. Se purificó el producto por cromatografía de intercambio iónico (columna PolySULFOETHIL A, PolyLC Inc., 250x21 mm, 5 μ m, 1000 Å; tampón A: 0,1%(v/v)H₃PO₄/25%AcCN; Tampón B: 0,1%(v/v)H₃PO₄/25%AcCN/0,5 M NaCl). Se volvió a purificar el producto por cromatografía
 15 de fase inversa en fase C-8 (Columna KROMASIL, C8 10 μ M 100A, tamaño 250 x 50mm; disolvente A=agua/0,05 %TFA, disolvente B=AcCN/0,05 %TFA). El resultado se muestra a continuación. Los resultados se muestran a continuación en la **Tabla 14**.

Tabla 14				
Dímero N.º	Estructura del dímero que muestra el resto de unión entre los residuos Lisina B29 y B29'.	Tipo de insulina; Extremos N terminales de insulina	Tr (min)	(M+6)/6 o (M+7)/7
54		RHI; A1,A1'=H, B1,B1' carbamoilo =	4,57	1974,45
La línea ondulada indica el enlace entre el grupo amino épsilon de Lys B29 y Lys B29', respectivamente.				

20

EJEMPLO 28

Se realizaron ensayos de unión al receptor de insulina del siguiente modo.

Se ejecutó un ensayo de unión a IR en un ensayo de proximidad de centelleo (SPA) en formato de 384 pocillos usando membranas celulares preparadas a partir de células CHO que sobre-expresaban IR(B) humano cultivadas en medio F12 que contenía FBS al 10% y
 25 antibióticos (G418, Penicilina/Estrepavidina). Las membranas celulares se prepararon en tampón

Tris 50 mM, pH 7,8 que contenía MgCl₂ 5 mM. El tampón de ensayo contenía tampón Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 5 mM, BSA al 0,1% e inhibidores de proteasa (Complete-Mini-Roche). Las membranas celulares se añadieron a perlas WGA PVT PEI SPA (5 mg/ml de concentración final) seguido por la adición de moléculas de dímero de insulina a concentraciones apropiadas. Después de 5-15 min de incubación a temperatura ambiente, se añadió ¹²⁵[I]-insulina a 0,015 nM de concentración final para un volumen total final de 50 µl. La mezcla se incubó con agitación a temperatura ambiente durante 1 a 12 horas seguido por el recuento de centelleo para determinar la unión de ¹²⁵[I]-insulina a IR y los efectos de titulación de las moléculas de dímero de insulina sobre esta interacción.

10

EJEMPLO 29

Se realizaron ensayos de AKT-fosforilación del receptor de insulina (IR) del siguiente modo.

Ensayo de AKT-fosforilación de IR: la activación del receptor de insulina puede evaluarse midiendo la fosforilación de la proteína Akt, una etapa clave en la cascada de señalización del receptor de insulina. Se utilizaron líneas celulares CHO que sobre-expresaban IR humano en un kit de ensayo ELISA tipo sándwich de HTRF (Cisbio “kits de ensayo celular fosfo-AKT(Ser473) y fosfo-AKT(Thr308)”). Las células se cultivaron en medio F12 suplementado con FBS al 10%, 400 g/ml de G418 y HEPES 10 mM. Antes del ensayo, las células se incubaron en medio libre de suero durante 2 a 4 h. Como alternativa, las células podían congelarse y dividirse en alícuotas por adelantado en medio que contenía DMSO al 20% y usarse en el ensayo después de descongelarse, centrifugarse y resuspenderse. Las células se sembraron a 10.000 células por pocillo en 20 l del medio F12 sin suero en placas de 384 pocillos. Se ejecutaron controles de Humulina e insulina glargina en cada placa de compuestos de ensayo. Se añadieron los compuestos titulados a las células (2 l por pocillo, concentraciones finales = 1000 nM tituladas hasta 0,512 pM en diluciones de factor 1:5) y se incubaron a 37 °C durante 30 min. Las células se lisaron con 8 l del tampón de lisis preparado proporcionado en el kit CisBio y se incubaron a 25°C durante 1 h. Se prepararon los reactivos de anticuerpo diluidos (anti-AKT-d2 y anti-pAKT-Eu3/criptato) de acuerdo con las instrucciones del kit y después se añadieron 10 µl a cada pocillo de lisado celular seguido por incubación a 25 °C durante 3,5 a 5 h. La placa se leyó en un lector de placa Envision (Excitación = 320 nm; Emisión = 665 nm) para determinar la

30

actividad agonista pAkt de IR con respecto tanto a la potencia como a la respuesta máxima para cada compuesto. Como alternativa, los compuestos se ensayaron del mismo modo en presencia de 1,6 nM de Humulina para determinar el modo en que cada compuesto era capaz de competir contra la actividad agonista completa de la insulina.

5

EJEMPLO 30

La **Tabla 15** muestra la actividad biológica *in vitro* de los dímeros de insulina hacia el receptor de insulina (IR). Las actividades se midieron por ensayos de competición de ligando como se describe en el EJEMPLO 28 o ensayos de Akt-fosforilación funcional como se describe en el EJEMPLO 29.

10

Tabla 15					
Dímero N.º	Unión a IR CI ₅₀ (nM)	pAkt IR %Máx	Dímero N.º	Unión a IR CI ₅₀ (nM)	pAkt IR %Máx
1	1,50	50,5	43	2,02	35
2	3,77	33	44	1,18	33
3	1,38	59,5	45	4,00	38
4	1,62	47,5	46	0,38	25
5	2,42	43	47	4,56	30
6	1,00	83	48	5,09	35
7	3,19	60	49	5,16	58
8	7,15	47,5	50	3,61	39
9	3,29	42	51	0,59	27
10	3,59	34	52	3,93	67
11	1,37	32	54	0,49	26
12	13,1	41	55	2,02	28
13	2,51	36	56	2,94	33
14	4,42	38	57	2,02	26
15	2,53	49	58	0,61	34
16	4,76		59	0,97	53
17	5,27	62	60	1,81	60
18	5,23	36	61	20,3	33
19	1,40	25	62	5,01	32
20	0,62	36	63	26,7	41

21	1,88	41	64	15,7	34
22	1,85	41,5	65	3,05	42
23	2,48	39	66	34,5	33
24	4,29	29,3	67	0,54	24
25	1,82	46	68	4,81	34
26	3,74	44	69	4,99	18
27	3,98	31	70	14,8	21
28	1,96	25	71	2,28	45
29	1,18	30	72	2,35	42
30	1,79	30	73	37,8	35
31	1,36	31	74	73,8	33
32	21,6	33	75	1,85	52
33	2,41	38	76	1,87	35
34	0,57	67	77	42,1	23
35	1,17	66	78	167	22
36	0,53	28	79	1,47	42
37	3,52	42	80	5,48	39
38	2,18	45	81	0,3	40
39	3,17	45	82	1,73	50
40	2,03	41	83	558	21
41	0,64	35	84	2,19	50
42	2,97	49			

EJEMPLO 31

En este ejemplo, se compararon los efectos *in vivo* de varios agonistas parciales del receptor de insulina de la presente invención con el compuesto A (dímero de insulina MIU-90 divulgado en la solicitud PCT publicada N.º WO2014052451) y el compuesto B (B29,B29'-suberoil-(insulina)₂) divulgado en Deppe et al., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 350: 213-217 (1994) pero usando RHI en vez de insulina de bovino en un ensayo de prueba de tolerancia de insulina intraperitoneal (IP-ITT) realizado en ratones C57BL/6NTac macho adultos flacos.

Se aleatorizaron grupos de N=6-8 animales por grupo por peso (promedio de aproximadamente 30 gramos). Dos días antes del estudio, los ratones se acondicionaron a una dosificación con una inyección intraperitoneal de solución de cloruro de sodio al 0,9 % en un volumen de dosificación de 5 ml/kg. La mañana del estudio, se retiró el alimento dos o cuatro horas antes del estudio. Se determinaron las concentraciones de glucosa en sangre a T = 0 min

(valor de referencia) usando un Glucómetro. A continuación, a los ratones se les dosificó con el vehículo, **Dímero 24**, **dímero 55**, **Dímero 58**, **Dímero 60**, **Dímero 67**, compuesto A, compuesto B, o Humulina (RHI) a 5 ml/kg por medio de inyección intraperitoneal (véase la **Tabla 16** para las dosis usadas). Se determinaron los niveles de glucosa sanguíneos a partir de

5 extracciones de la cola tomados entre 30 a 360 minutos después de la dosis.

Tabla 16	
Compuesto	Dosis
A	72 nmol/kg 300 nmol/kg
B	72 nmol/kg 300 nmol/kg
Dímero 24	72 nmol/kg 300 nmol/kg
Dímero 55	120 nmol/kg 300 nmol/kg
Dímero 58	60 nmol/kg 300 nmol/kg
Dímero 60	120 nmol/kg 300 nmol/kg
Dímero 67	60 nmol/kg 300 nmol/kg
Humulina	18 nmol/kg 72 nmol/kg

Los resultados se muestran en las **figuras 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F y 2G**. Los resultados muestran que el perfil de glucosa para el **Dímero 24**, **Dímero 55**, **Dímero 58**, **Dímero**

10 **60 y dímero 67** son sustancialmente los mismos en ambas dosis probadas mientras que el incremento de la dosificación de los compuestos A y B provocó un incremento en la potencia de disminución de glucosa, lo que indica un menor potencial de riesgo hiperglucémico para los dímeros en comparación con RHI o los compuestos A y B.

EJEMPLO 32

15 Se comparó el efecto de disminución de la concentración de glucosa de los **Dímeros 24, 18 y 40** con la RHI en cerdos enanos Yucatán diabéticos (cerdos enanos D) del siguiente modo.

Los cerdos enanos Yucatán se volvieron diabéticos de Tipo 1 mediante inyecciones de Alloxan siguiendo un protocolo patentado desarrollado por Sinclair Research Center (Auxvasse, MO). La inducción se considera satisfactoria si los niveles basales de glucosa exceden de 150 mg/dl. Se utilizaron cerdos enanos D con niveles plasmáticos de glucosa de aproximadamente 300 mg/dl en estos experimentos.

Se usaron cerdos enanos Yucatán macho, instrumentados con dos puertos de acceso vascular (VAP) en la vena yugular, en estos estudios. En el día del estudio después de una noche en ayunas, los cerdos enanos se colocaron en eslingas y se accedió a los VAP para infusión y muestreo. A $t=0$ min y después recogiendo dos muestras de sangre iniciales para la medición de glucosa en plasma ($t=-30$ minutos y $t=0$ minutos), se administró a los cerdos enanos Humulina (insulina humana recombinante, RHI) o IRPA en forma de un único bolo IV, a 0,69 nmol/kg. La Humulina e IRPA se formularon a 69 nmol/ml en un tampón que contenía glicerina, 16 mg/ml; metacresol, 1,6 mg/ml; fenol, 0,65 mg/ml; fosfato sódico anhidro, dibásico, 3,8 mg/ml; se ajustó el pH hasta 7,4 con HCl. Después de la dosificación, continuó el muestreo durante 480 minutos; los puntos temporales para la recogida de muestras fueron -30 min, 0 min, 8 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min, 180 min, 210 min, 240 min, 270 min, 300 min, 330 min, 360 min, 420 min, 480 min. Se recogió sangre en tubos K3-EDTA, suplementados con 10 µg/ml de aprotinina y se mantuvieron en hielo hasta su procesamiento, que sucedió en 30 minutos desde la recogida. Después de centrifugación a 3000 rpm, 4°C, durante 8 min, se recogió plasma y se dividió en alícuotas para la medición de la glucosa usando un analizador Beckman Coulter AU480 Chemistry y para la medición de los niveles de compuesto.

La **Figura 1** muestra que a concentración de 0,69 nmol/kg, la RHI redujo los niveles séricos de glucosa por debajo de 50 mg/dl mientras que los dímeros de insulina no. Este resultado muestra que los dímeros de insulina presentan menos riesgo de promoción de hipoglucemia que la RHI.

EJEMPLO 33

Se comparó el efecto de disminución de la concentración de glucosa de los **Dímeros 4, 5, 7, 8, 9, 18-29, 32, 37-41, 43, 44, 48, 55,57, 58, 60, 61, 62, 64, 67, 69, 71, 72, 77 y 78** con la RHI en cerdos enanos Yucatán diabéticos (cerdos enanos D) del siguiente modo.

Los cerdos enanos Yucatán se volvieron diabéticos de Tipo 1 mediante inyecciones de Alloxan siguiendo un protocolo patentado desarrollado por Sinclair Research Center (Auxvasse, MO). La inducción se considera satisfactoria si los niveles basales de glucosa exceden de 150 mg/dl. Se utilizaron cerdos enanos D con niveles plasmáticos de glucosa de aproximadamente 300-400 mg/dl e instrumentados con dos puertos de acceso vascular en la vena yugular (VAP), en estos estudios.

En el día del estudio, después de una noche en ayunas, los cerdos enanos se colocaron en eslingas y se accedió a los VAP para infusión y muestreo. A $t=0$ min, y después de recoger dos muestras de sangre iniciales para la medición de glucosa en plasma ($t=-30$ minutos y $t=0$ minutos), se administró a los cerdos enanos Humulina (insulina humana recombinante, RHI) u otro dímero en forma de un único bolo IV, a 0,69 nmol/kg (0,35 nmol/kg para el compuesto 78). La Humulina y los dímeros se formularon a 69 nmol/ml en un tampón que contenía glicerina, 16 mg/ml; metacresol, 1,6 mg/ml; fenol, 0,65 mg/ml; fosfato sódico anhidro, dibásico, 3,8 mg/ml, se ajustó el pH hasta 7,4 con HCl. Después de la dosificación, continuó el muestreo durante 480 minutos; los puntos temporales para la recogida de muestras fueron -30 minutos, 0 minutos, 8 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos, 150 minutos, 180 minutos, 210 minutos, 240 minutos, 270 minutos, 300 minutos, 330 minutos, 360 minutos, 420 minutos y 480 minutos. Se recogió sangre en tubos K3-EDTA, suplementados con 10 μ g/ml de aprotinina, y se mantuvieron en hielo hasta su procesamiento, que sucedió en 30 minutos desde la recogida. Después de centrifugación a 3000 rpm, 4 °C, durante 8 minutos, se recogió plasma y se dividió en alícuotas para la medición de la glucosa usando un analizador Beckman Coulter AU480 Chemistry. Los resultados se muestran en la **figura 7A – 7H**. Las figuras muestran que a concentración de 0,69 nmol/kg, la RHI redujo los niveles séricos de glucosa por debajo de 50 mg/dl mientras que los dímeros de insulina no. Este resultado muestra que los dímeros de insulina presentan menos riesgo de promoción de hipoglucemia que la RHI.

EJEMPLO 34

Este experimento comparó la estabilidad del resto de unión disulfuro del compuesto A con el resto de unión suberiol (C8) del **Dímero 24**.

Se incubó 1 μ M del Compuesto A y dímero 24 cada uno por separado en membranas de células de riñón de rata (RKCM) con o sin glutatión 5mM (GSH). Se obtuvieron

muestras a tiempo 0 y tiempo de 2 horas y se desactivó la reacción con 1 volumen de MeOH al 10 % en AcCN con ácido fórmico al 0,1 %. A continuación, se centrifugaron las muestras desactivadas y se congelaron antes del análisis. A continuación, se descongelaron las muestras y se analizaron usando el sistema Thermo Orbi Velos. Se realizó el análisis MetID dirigido con cromatogramas iónicos extraídos (XIC) usando 3 isótopos de 2 estados de carga en una ventana de 10 ppm.

Se detectaron metabolitos del Compuesto A en RKCM tanto sin GSH como con GSH. Como se muestra en la **Figura 3**, el monómero era de aproximadamente un 1 % del precursor (solución madre del compuesto A) por 2 horas de incubación. Como se muestra en la **Figura 4**, el monómero era de aproximadamente un 6,5% del precursor (solución madre del compuesto A) por 2 horas de incubación. Los resultados muestran que el enlace disulfuro se rompía con el tiempo. No se observaron metabolitos en los controles de 0 horas para el compuesto A ni en las soluciones madre.

El **Dímero 24** produjo metabolitos que se detectaron en RKCM, sin embargo, aunque se observó una pérdida del polipéptido de cadena A debido a la rotura de los enlaces disulfuro entre el polipéptido de cadena A y el polipéptido de cadena B, no se detectaron monómeros. La **Figura 5** muestra que sin GSH, la pérdida de polipéptido de cadena A era menor de un 1 % del precursor (solución madre del **Dímero 24**). La **Figura 6** muestra que con GSH, la pérdida de polipéptido de cadena A era menor de un 1 % del precursor (solución madre del **Dímero 24**). No se observaron metabolitos en los controles de 0 horas para el **Dímero 24** ni en las soluciones madre. El nuevo procedimiento de desactivación con condiciones ácidas detuvo apropiadamente el intercambio disulfuro.

Tabla de secuencias		
SEC ID N.º	Descripción	Secuencia
1	Cadena A de insulina de Homo sapiens	GIVEQCCTSICSLYQLENYCN
2	Cadena B de insulina de Homo sapiens	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT
3	Cadena A de insulina de secuencia artificial	GX ₂ X ₃ EQCCX ₈ SICSLYQLX ₁₇ NX ₁₉ CX ₂₃

	X₂ es isoleucina o treonina; X₃ es valina, glicina, o leucina; X₈ es treonina o histidina; X₁₇ es ácido glutámico o glutamina; X₁₉ es tirosina, 4-metoxi-fenilalanina, alanina, o 4-amino fenilalanina; X₂₃ es asparagina o glicina;	
4	Cadena B de insulina de secuencia artificial X₂₅ es histidina o treonina; X₂₉ es alanina, glicina o serina; X₃₀ es histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, ácido homocisteico, o ácido cisteico; X₃₁ es prolina o lisina; y X₃₂ es prolina o lisina, con la condición de que al menos uno de X₃₁ o X₃₂ sea lisina	X₂₅LCGX₂₉X₃₀LVEALYLVCGERGFX₂₇YT X₃₁X₃₂
5	X₂₂ es fenilalanina o desamino-fenilalanina; X₂₅ es histidina o treonina; X₂₆ es glicina o leucina; X₂₇ es fenilalanina o ácido aspártico; X₂₉ es alanina, glicina, o serina; X₃₀ es histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, ácido homocisteico, o ácido cisteico; X₃₁ es ácido aspártico, prolina, o lisina; X₃₂ es lisina o prolina; X₃₃ es treonina, alanina, o está ausente; X₃₄ es arginina o está ausente; y X₃₅ es arginina o está ausente; con la condición de que al menos uno de X₃₁ o X₃₂ sea lisina	X₂₂VNQX₂₅X₂₆CGX₂₉X₃₀LVEALYLVCGER GFX₂₇YTX₃₁X₃₂X₃₃X₃₄X₃₅
6	Secuencia artificial cadena B de insulina lispro	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT
7	Secuencia artificial cadena A de insulina glargina	GIVEQCCTSICSLYQLENYCG

8	Secuencia artificial cadena B de insulina glargina	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT RR
9	Secuencia artificial cadena B de insulina aspart	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTDKT
10	Secuencia artificial B:des30	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPK
11	Secuencia artificial A: Y19A	GIVEQCCTSI CSLYQLENACN

Aunque la presente invención se describe en el presente documento con referencia a realizaciones ilustradas, debe entenderse que la invención no se limita a las mismas. Los especialistas en la técnica y que tengan acceso a los contenidos del presente documento

5 reconocerán modificaciones y realizaciones adicionales dentro del alcance de la misma. Por lo tanto, la presente invención está limitada solamente por las reivindicaciones adjuntas al presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Un agonista parcial del receptor de insulina que comprende:
un primer heterodímero de insulina o análogo de insulina y un segundo heterodímero de insulina o análogo de insulina incluyendo cada heterodímero un polipéptido de cadena A y un polipéptido de cadena B, en el que el polipéptido de cadena A y el polipéptido de cadena B están unidos juntos a través de enlaces disulfuro intercatenarios;
en el que el primero y segundo heterodímeros de insulina o análogo de insulina están unidos covalentemente juntos a través de un resto de unión que conecta la cadena lateral de un aminoácido en o cerca del extremo carboxi terminal de los dos polipéptidos respectivos de cadena B; y
en el que el extremo amino terminal de al menos uno de los polipéptidos de cadena A y los polipéptidos de cadena B está unido covalentemente a un sustituyente, con la condición de que el resto de unión no incluya un enlace disulfuro.
2. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 1, en el que el agonista parcial del receptor de insulina comprende un primero y segundo heterodímeros de insulina o análogo de insulina son iguales o en el que el primero y segundo heterodímeros de insulina o análogo de insulina son diferentes.
3. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 1, en el que los agonistas parciales del receptor de insulina comprenden un resto de unión una covalentemente el primer heterodímero de insulina o análogo de insulina y el segundo heterodímero de insulina o análogo de insulina mediante el grupo amino épsilon de un residuo de lisina en o cerca del extremo carboxi terminal de sus respectivos polipéptidos de cadena B.
4. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 1, en el que el sustituyente comprende una fórmula general $RC(O)-$, donde R puede ser $R'CH_2$, $R'NH$, $R'O$ y R' puede ser H, cadena alquilo lineal, aminoácido, péptido, polietilenglicol (PEG) y un sacárido.

5. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 1, en el que el agonista parcial del receptor de insulina comprende un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en acetilo, fenilacetilo, carbamoilo, isobutilo, metoxiacetilo, glicina, aminoetilglucosa (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, *N*-dimetilo, y alcóxicarbonilo.

5

6. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 1, en el que el agonista parcial del receptor de insulina comprende una primera y segunda insulinas o análogos de insulina, que están independientemente seleccionados del grupo que consiste en insulina humana nativa, insulina lispro, insulina aspart, desB30 insulina, e insulina glargina.

10

7. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 1, en el que cada polipéptido de cadena A comprende independientemente la secuencia de aminoácidos $GX_2X_3EQCCX_8SICSLYQLX_{17}NX_{19}CX_{23}$ (SEC ID N.º: 3) y cada polipéptido de cadena B comprende independientemente la secuencia de aminoácidos

15 $X_{25}LCGX_{29}X_{30}LVEALYLVCGERGFX_{27}YTX_{31}X_{32}$ (SEC ID N.º: 4) o

$X_{22}VNQX_{25}X_{26}CGX_{29}X_{30}LVEALYLVCGERGFX_{27}YTX_{31}X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}$ (SEC ID N.º:

5) en la que X_2 es isoleucina o treonina; X_3 es valina, glicina, o leucina; X_8 es treonina o histidina; X_{17} es ácido glutámico o glutamina; X_{19} es tirosina, 4-metoxi-fenilalanina, alanina, o 4-amino fenilalanina; X_{23} es asparagina o glicina; X_{22} es fenilalanina y desamino-fenilalanina; 20 X_{25} es histidina o treonina; X_{26} es leucina o glicina; X_{27} es fenilalanina o ácido aspártico; X_{29} es alanina, glicina, o serina; X_{30} es histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, ácido homocisteico, o ácido cisteico; X_{31} es ácido aspártico, prolina, o lisina; X_{32} es lisina o prolina; X_{33} es treonina, alanina, o está ausente; X_{34} es arginina o está ausente; y X_{35} es arginina o está ausente; con la condición de que al menos uno de X_{31} o X_{32} sea lisina.

25

8. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 1, en el que el resto de unión comprende una cadena de hidrocarburo C1-C20 bivalente, lineal o ramificada, saturada o insaturada opcionalmente sustituida en la que una o más unidades de metileno están remplazadas opcional e independientemente por O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -

$N(R)C(O)-$, $-C(O)N(R)-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-N(R)SO_2-$, $SO_2N(R)-$, un grupo heterocíclico, un grupo arilo, o un grupo heteroarilo, en el que cada aparición de R comprende independientemente hidrógeno, un grupo protector adecuado, un resto acilo, resto arilalquilo, resto alifático, resto arilo, resto heteroarilo, o resto heteroalifático y poli(etilenglicol) (PEG).

5

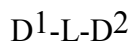
9. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 1, en el que el resto de unión comprende un alquildioílo, $-C(O)(CH_2)_n C(O)-$, en el que $n = 0-4$, un resto acilo, $-C(O)RC(O)-$, en el que R es cadena de alquilo, cadena de poli(etilenglicol) (PEG), cadena que contiene amida, cadena que contiene triazol(es), resto que contiene ciclooctino, una cadena de acilo sustituida, o una cadena de poli(etilenglicol) (PEG).

10

10. Una composición que comprende el agonista parcial del receptor de insulina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15

11. Un agonista parcial del receptor de insulina que comprende la fórmula



en la que D^1 y D^2 son cada uno independientemente un polipéptido de insulina o análogo de insulina,

20 en la que cada polipéptido de insulina es un heterodímero que comprende un polipéptido de cadena A y un polipéptido de cadena B unidos juntos a través de enlaces disulfuro intercatenarios;

L es un resto de unión en el que un extremo del resto de unión está unido a un residuo de aminoácido en o cerca del grupo carboxilo de D^1 y el otro extremo del resto de unión está unido a un residuo de aminoácido en o cerca del extremo carboxilo de D^2 con la condición de que L no incluya un enlace disulfuro; y

25

en el que el primero y segundo polipéptidos de insulina o análogo de insulina incluyen un sustituyente unido al extremo amino terminal del polipéptido de cadena A y el polipéptido de cadena B.

30

12. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 11, en el que el agonista parcial del receptor de insulina comprende un D¹ y D² que son iguales o D¹ y D² que son diferentes.
- 5 13. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 11, en el que el agonista parcial del receptor de insulina comprende un resto de unión que une covalentemente D¹ y D² mediante el grupo amino épsilon de un residuo de lisina en o cerca del extremo carboxi terminal de D¹ y D².
- 10 14. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 11, en el que el agonista parcial del receptor de insulina comprende un sustituyente que tiene una fórmula general RC(O)-, en la que R puede ser R'CH₂, R'NH, R'O y R' puede ser H, cadena alquilo lineal, aminoácido, péptido, polietilenglicol (PEG) y un sacárido.
- 15 15. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 11, en el que el agonista parcial del receptor de insulina comprende un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en acetilo, fenilacetilo, carbamoílo, *N*-alquil carbamoílo, isobutilo, metoxiacetilo, glicina, aminoetilglucosa (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, *N*-dimetilo, y alcóxicarbonilo.
- 20 16. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 11, en el que el agonista parcial del receptor de insulina comprende un D¹ y D² que están independientemente seleccionados del grupo que consiste en insulina humana nativa, insulina lispro, insulina aspart, desB30 insulina, e insulina glargina.
- 25 17. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 11, en el que cada polipéptido de cadena A comprende independientemente la secuencia de aminoácidos GX₂X₃EQCCX₈SICSLYQLX₁₇NX₁₉CX₂₃ (SEC ID N.º: 3) y cada polipéptido de cadena B comprende independientemente la secuencia de aminoácidos
- 30 X₂₅LCGX₂₉X₃₀LVEALYLVCGERGFX₂₇YTX₃₁X₃₂ (SEC ID N.º: 4) o

X₂₂VNQX₂₅X₂₆CGX₂₉X₃₀LVEALYLVCGERGFX₂₇YTX₃₁X₃₂X₃₃X₃₄X₃₅ (SEC ID N.º:

5) en la que X₂ es isoleucina o treonina; X₃ es valina, glicina, o leucina; X₈ es treonina o histidina; X₁₇ es ácido glutámico o glutamina; X₁₉ es tirosina, 4-metoxi-fenilalanina, alanina, o 4-amino fenilalanina; X₂₃ es asparagina o glicina; X₂₂ es fenilalanina y desamino-fenilalanina; X₂₅ es histidina o treonina; X₂₆ es leucina o glicina; X₂₇ es fenilalanina o ácido aspártico; X₂₉ es alanina, glicina, o serina; X₃₀ es histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, ácido homocisteico, o ácido cisteico; X₃₁ es ácido aspártico, prolina, o lisina; X₃₂ es lisina o prolina; X₃₃ es treonina, alanina, o está ausente; X₃₄ es arginina o está ausente; y X₃₅ es arginina o está ausente; con la condición de que al menos uno de X₃₁ o X₃₂ sea lisina.

10

18. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 11, en el que el resto de unión comprende una cadena de hidrocarburo C1-C20 bivalente, lineal o ramificada, saturada o insaturada opcionalmente sustituida en la que una o más unidades de metileno están remplazadas opcional e independientemente por -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)₂-, -N(R)SO₂-, SO₂N(R)-, un grupo heterocíclico, un grupo arilo, o un grupo heteroarilo, en el que cada aparición de R comprende independientemente hidrógeno, un grupo protector adecuado, un resto acilo, resto arilalquilo, resto alifático, resto arilo, resto heteroarilo, o resto heteroalifático y poli(etilenglicol) (PEG).

15

20

19. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 11, en el que el resto de unión comprende un alquildioílo, -C(O)(CH₂)_nC(O)-, en el que n = 0-4, un resto acilo, -C(O)RC(O)-, en el que R es cadena de alquilo, cadena de poli(etilenglicol) (PEG), cadena que contiene amida, cadena que contiene triazol(es), resto que contiene ciclooctino, una cadena de acilo sustituida, o una cadena de poli(etilenglicol) (PEG).

25

20. Una composición que comprende el agonista parcial del receptor de insulina de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 19 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30

21. Un agonista parcial del receptor de insulina que comprende:
un primer heterodímero de insulina o análogo de insulina y un segundo heterodímero de insulina o análogo de insulina incluyendo cada heterodímero un polipéptido de cadena A y un polipéptido de cadena B, en el que el polipéptido de cadena A y el polipéptido de cadena B están unidos juntos a través de enlaces disulfuro intercatenarios;
5 en el que el primero y segundo heterodímeros de insulina o análogo de insulina están unidos covalentemente juntos a través de un resto de unión que conecta la cadena lateral de un aminoácido en o cerca del extremo carboxi terminal de los dos polipéptidos respectivos de cadena B; y
10 opcionalmente en el que el extremo amino terminal de al menos uno de los polipéptidos de cadena A y los polipéptidos de cadena B del primer polipéptido de insulina o segundo polipéptido de insulina está unido covalentemente a un sustituyente,
con la condición de que (1) el resto de unión no incluya un enlace disulfuro y (2) cuando el extremo amino terminal del polipéptido de cadena A y el polipéptido de cadena B no
15 incluye un sustituyente entonces el resto de unión no es un resto oxalilo (C2), un resto suberoílo (C8), o un resto dodecanodioílo (C12).
22. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 21, en el que agonista parcial del receptor de insulina comprende un primero y segundo heterodímeros de
20 insulina o análogo de insulina que son iguales o en el que el primero y segundo heterodímeros de insulina o análogo de insulina son diferentes.
23. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 21, en el que el agonista parcial del receptor de insulina comprende un resto de unión que une
25 covalentemente el primer heterodímero de insulina o análogo de insulina y el segundo heterodímero de insulina o análogo de insulina mediante el grupo amino épsilon de un residuo de lisina en o cerca del extremo carboxi terminal de sus respectivos polipéptidos de cadena B.
24. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 21, en el
30 que el agonista parcial del receptor de insulina comprende un sustituyente que tiene una fórmula

general RC(O)-, en la que R puede ser R'CH₂, R'NH, R'O y R' puede ser H, cadena alquilo lineal, aminoácido, péptido, polietilenglicol (PEG) y un sacárido.

25. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 21, en el
5 que el agonista parcial del receptor de insulina comprende un sustituyente es acetilo, fenilacetilo, carbamoilo, *N*-alquil carbamoilo, isobutilo, metoxiacetilo, glicina, aminoetilglucosa (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, *N*-dimetilo, y alcóxicarbonilo.

26. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 21, en el
10 que el agonista parcial del receptor de insulina comprende una primera y segunda insulinas o análogos de insulina que están independientemente seleccionados del grupo que consiste en insulina humana nativa, insulina lispro, insulina aspart, desB30 insulina, e insulina glargina.

27. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 21, en el
15 que cada polipéptido de cadena A comprende independientemente la secuencia de aminoácidos GX₂X₃EQCCX₈SICSLYQLX₁₇NX₁₉CX₂₃ (SEC ID N.º: 3) y cada polipéptido de cadena B comprende independientemente la secuencia de aminoácidos X₂₅LCGX₂₉X₃₀LVEALYLVCGERGFX₂₇YTX₃₁X₃₂ (SEC ID N.º: 4) o X₂₂VNQX₂₅X₂₆CGX₂₉X₃₀LVEALYLVCGERGFX₂₇YTX₃₁X₃₂X₃₃X₃₄X₃₅ (SEC ID N.º:
20 5) en la que X₂ es isoleucina o treonina; X₃ es valina, glicina, o leucina; X₈ es treonina o histidina; X₁₇ es ácido glutámico o glutamina; X₁₉ es tirosina, 4-metoxi-fenilalanina, alanina, o 4-amino fenilalanina; X₂₃ es asparagina o glicina; X₂₂ es fenilalanina y desamino-fenilalanina; X₂₅ es histidina o treonina; X₂₆ es leucina o glicina; X₂₇ es fenilalanina o ácido aspártico; X₂₉ es alanina, glicina, o serina; X₃₀ es histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, ácido
25 homocisteico, o ácido cisteico; X₃₁ es ácido aspártico, prolina, o lisina; X₃₂ es lisina o prolina; X₃₃ es treonina, alanina, o está ausente; X₃₄ es arginina o está ausente; y X₃₅ es arginina o está ausente; con la condición de que al menos uno de X₃₁ o X₃₂ sea lisina.

28. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 21, en el
30 que el resto de unión comprende una cadena de hidrocarburo C1-C20 bivalente, lineal o

ramificada, saturada o insaturada opcionalmente sustituida en la que una o más unidades de metileno están remplazadas opcional e independientemente por -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)₂-, -N(R)SO₂-, SO₂N(R)-, un grupo heterocíclico, un grupo arilo, o un grupo heteroarilo, en el que cada aparición de R comprende
 5 independientemente hidrógeno, un grupo protector adecuado, un resto acilo, resto arilalquilo, resto alifático, resto arilo, resto heteroarilo, o resto heteroalifático y poli(etilenglicol) (PEG).

29. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 21, en el que el resto de unión comprende un alquildioílo, -C(O)(CH₂)_nC(O)-, en el que n = 0-4, un resto
 10 acilo, -C(O)RC(O)-, en el que R es cadena de alquilo, cadena de poli(etilenglicol) (PEG), cadena que contiene amida, cadena que contiene triazol(es), resto que contiene ciclooctino, una cadena de acilo sustituida, o una cadena de poli(etilenglicol) (PEG).

30. Una composición que comprende el agonista parcial del receptor de insulina de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 29 y un vehículo farmacéuticamente
 15 aceptable.

31. Un agonista parcial del receptor de insulina que comprende la fórmula

$$D^1-L-D^2$$

 20 en la que D¹ y D² son cada uno independientemente un polipéptido de insulina o análogo de insulina, en la que cada polipéptido de insulina es un heterodímero que comprende un polipéptido de cadena A y un polipéptido de cadena B unidos juntos a través de enlaces disulfuro intercatenarios;

L es un resto de unión en el que un extremo del resto de unión está unido a un
 25 residuo de aminoácido en o cerca del grupo carboxilo de D¹ y el otro extremo del resto de unión está unido a un residuo de aminoácido en o cerca del extremo carboxilo de D² con la condición de que L no incluya un enlace disulfuro; y

opcionalmente, en la que al menos uno de D¹ o D² incluye un sustituyente unido al extremo amino terminal del polipéptido de cadena A o el polipéptido de cadena B de D¹ o D²;

con la condición de que (1) el resto de unión no incluya un enlace disulfuro y (2) cuando la insulina o análogo de insulina no sea insulina o análogo de insulina de un humano y el extremo amino terminal del polipéptido de cadena A y el polipéptido de cadena B no incluye un sustituyente entonces el resto de unión no es un resto oxalilo (C2), un resto suberoílo (C8), o un resto dodecanodioílo (C12).

32. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 31, en el que el agonista parcial del receptor de insulina comprende un D¹ y D² que son iguales o en el que D¹ y D² son diferentes.

33. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 31, en el que el agonista parcial del receptor de insulina comprende un el resto de unión que une covalentemente D¹ y D² mediante el grupo amino épsilon de un residuo de lisina en o cerca del extremo carboxi terminal de D¹ y D².

34. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 31, en el que el sustituyente comprende una fórmula general RC(O)-, en la que R puede ser R'CH₂, R'NH, R'O y R' puede ser H, cadena alquilo lineal, aminoácido, péptido, polietilenglicol (PEG) y un sacárido.

35. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 31, en el que el agonista parcial del receptor de insulina comprende un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en acetilo, fenilacetilo, carbamoílo, *N*-alquil carbamoílo, isobutilo, metoxiacetilo, glicina, aminoetilglucosa (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, *N*-dimetilo, y alcóxicarbonilo.

36. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 31, en el que agonista parcial del receptor de insulina comprende un D¹ y D² que están independientemente seleccionados del grupo que consiste en insulina humana nativa, insulina lispro, insulina aspart, desB30 insulina, e insulina glargina.

37. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 31, en el que cada polipéptido de cadena A comprende independientemente la secuencia de aminoácidos $GX_2X_3EQCCX_8SICSLYQLX_{17}NX_{19}CX_{23}$ (SEC ID N.º: 3) y cada polipéptido de cadena B comprende independientemente la secuencia de aminoácidos $X_{25}LCGX_{29}X_{30}LVEALYLVCGERGFX_{27}YTX_{31}X_{32}$ (SEC ID N.º: 4) o $X_{22}VNQX_{25}X_{26}CGX_{29}X_{30}LVEALYLVCGERGFX_{27}YTX_{31}X_{32}X_{33}X_{34}X_{35}$ (SEC ID N.º: 5) en la que X_2 es isoleucina o treonina; X_3 es valina, glicina, o leucina; X_8 es treonina o histidina; X_{17} es ácido glutámico o glutamina; X_{19} es tirosina, 4-metoxi-fenilalanina, alanina, o 4-amino fenilalanina; X_{23} es asparagina o glicina; X_{22} es fenilalanina y desamino-fenilalanina; X_{25} es histidina o treonina; X_{26} es leucina o glicina; X_{27} es fenilalanina o ácido aspártico; X_{29} es alanina, glicina, o serina; X_{30} es histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, ácido homocisteico, o ácido cisteico; X_{31} es ácido aspártico, prolina, o lisina; X_{32} es lisina o prolina; X_{33} es treonina, alanina, o está ausente; X_{34} es arginina o está ausente; y X_{35} es arginina o está ausente; con la condición de que al menos uno de X_{31} o X_{32} sea lisina.

38. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 31, en el que el resto de unión comprende una cadena de hidrocarburo $C1-C_{20}$ bivalente, lineal o ramificada, saturada o insaturada opcionalmente sustituida en la que una o más unidades de metileno están remplazadas opcional e independientemente por $-O-$, $-S-$, $-N(R)-$, $-C(O)-$, $C(O)O-$, $OC(O)-$, $-N(R)C(O)-$, $-C(O)N(R)-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-N(R)SO_2-$, $SO_2N(R)-$, un grupo heterocíclico, un grupo arilo, o un grupo heteroarilo, en el que cada aparición de R comprende independientemente hidrógeno, un grupo protector adecuado, un resto acilo, resto arilalquilo, resto alifático, resto arilo, resto heteroarilo, o resto heteroalifático y poli(etilenglicol) (PEG)..

39. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 31, en el que el resto de unión comprende un alquildioílo, $-C(O)(CH_2)_nC(O)-$, en el que $n = 0-4$, un resto acilo, $-C(O)RC(O)-$, en el que R es cadena de alquilo, cadena de poli(etilenglicol) (PEG), cadena

que contiene amida, cadena que contiene triazol(es), resto que contiene ciclooctino, una cadena de acilo sustituida, o una cadena de poli(etilenglicol) (PEG).

5 40. Una composición que comprende el agonista parcial del receptor de insulina de una cualquiera de las reivindicaciones 31 a 39 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

41. Un dímero de análogo de insulina que comprende:
 10 un primer heterodímero de análogo de insulina y un segundo heterodímero de insulina o análogo de insulina incluyendo cada heterodímero un polipéptido de cadena A y un polipéptido de cadena B, en el que el polipéptido de cadena A y el polipéptido de cadena B están unidos juntos a través de enlaces disulfuro intercatenarios;
 en el que el primero y segundo heterodímeros de insulina o análogo de insulina están unidos covalentemente juntos a través de un resto de unión que conecta la cadena lateral de
 15 un aminoácido en o cerca del extremo carboxi terminal de los dos polipéptidos respectivos de cadena B;
 en el que el análogo de insulina se selecciona entre insulina lispro, insulina aspart, desB30 insulina e insulina glargina; y
 opcionalmente en el que el extremo amino terminal de al menos uno de los
 20 polipéptidos de cadena A y los polipéptidos de cadena B del primer polipéptido de insulina o segundo polipéptido de insulina está unido covalentemente a un sustituyente,
 con la condición de que el resto de unión no incluya un enlace disulfuro.

42. El dímero de análogo de insulina de la reivindicación 41, en el que el
 25 dímero de análogo de insulina comprende un primero y segundo heterodímeros de insulina o análogo de insulina que son iguales o en el que el primero y segundo heterodímeros de insulina o análogo de insulina son diferentes.

43. El dímero de análogo de insulina de la reivindicación 41, en el que el
 30 dímero de análogo de insulina comprende un resto de unión que une covalentemente el primer heterodímero de insulina o análogo de insulina y el segundo heterodímero de insulina o análogo

de insulina mediante el grupo amino épsilon de un residuo de lisina en o cerca del extremo carboxi terminal de sus respectivos polipéptidos de cadena B.

44. El dímero de análogo de insulina de la reivindicación 41, en el que el
5 sustituyente comprende una fórmula general $RC(O)-$, en la que R puede ser $R'CH_2$, $R'NH$, $R'O$ y R' puede ser H, cadena alquilo lineal, aminoácido, péptido, polietilenglicol (PEG) y un sacárido.

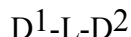
45. El dímero de análogo de insulina de la reivindicación 41, en el que el
10 dímero de insulina comprende al menos uno de la primera y segunda insulina o análogo de insulina conjugado con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en acetilo, fenilacetilo, carbamoilo, *N*-alquil carbamoilo, isobutilo, metoxiacetilo, glicina, aminoetilglucosa (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, *N*-dimetilo, y alcóxicarbonilo.

15 46. El dímero de análogo de insulina de la reivindicación 41, en el que el resto de unión comprende una cadena de hidrocarburo C1-C20 bivalente, lineal o ramificada, saturada o insaturada opcionalmente sustituida en la que una o más unidades de metileno están
remplazadas opcional e independientemente por $-O-$, $-S-$, $-N(R)-$, $-C(O)-$, $C(O)O-$, $OC(O)-$, $-N(R)C(O)-$, $-C(O)N(R)-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-N(R)SO_2-$, $SO_2N(R)-$, un grupo heterocíclico, un
20 grupo arilo, o un grupo heteroarilo, en el que cada aparición de R comprende independientemente hidrógeno, un grupo protector adecuado, un resto acilo, resto arilalquilo, resto alifático, resto arilo, resto heteroarilo, o resto heteroalifático y poli(etilenglicol) (PEG).

47. El dímero de análogo de insulina de la reivindicación 41, en el que el resto
25 de unión comprende un alquildioilo, $-C(O)(CH_2)_nC(O)-$, en el que $n = 0-4$, un resto acilo, $-C(O)RC(O)-$, en el que R es cadena de alquilo, cadena de poli(etilenglicol) (PEG), cadena que contiene amida, cadena que contiene triazol(es), resto que contiene ciclooctino, una cadena de acilo sustituida, o una cadena de poli(etilenglicol) (PEG).

30 48. Una composición que comprende el dímero de análogo de insulina de una cualquiera de las reivindicaciones 41 a 47 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

49. Un dímero de análogo de insulina que comprende la fórmula



5 en la que D^1 y D^2 son cada uno independientemente un polipéptido de insulina o análogo de insulina, en la que cada polipéptido de insulina es un heterodímero que comprende un polipéptido de cadena A y un polipéptido de cadena B unidos juntos a través de enlaces disulfuro intercatenarios;

L es un resto de unión en el que un extremo del resto de unión está unido a un residuo de aminoácido en o cerca del grupo carboxilo de D^1 y el otro extremo del resto de unión
10 está unido a un residuo de aminoácido en o cerca del extremo carboxilo de D^2 con la condición de que L no incluya un enlace disulfuro;

en el que el análogo de insulina se selecciona entre insulina lispro, insulina aspart, desB30 insulina e insulina glargina; y

opcionalmente, en la que al menos uno de D^1 o D^2 incluye un sustituyente unido
15 al extremo amino terminal del polipéptido de cadena A o el polipéptido de cadena B de D^1 o D^2 ; con la condición de que el resto de unión no incluya un enlace disulfuro.

50. El dímero de análogo de insulina de la reivindicación 49, en el que el dímero de análogo de insulina comprende un D^1 y D^2 que son iguales o en el que D^1 y D^2 son
20 diferentes.

51. El dímero de análogo de insulina de la reivindicación 49, en el que el dímero de análogo de insulina comprende un resto de unión que une covalentemente D^1 y D^2 mediante el grupo amino épsilon de un residuo de lisina en o cerca del extremo carboxi terminal
25 de D^1 y D^2 .

52. El dímero de análogo de insulina de la reivindicación 49, en el que el sustituyente comprende una fórmula general $RC(O)-$, en la que R puede ser $R'CH_2$, $R'NH$, $R'O$ y R' puede ser H, cadena alquilo lineal, aminoácido, péptido, polietilenglicol (PEG) y un
30 sacárido.

53. El dímero de análogo de insulina de la reivindicación 49, en el que el dímero de análogo de insulina comprende un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en acetilo, fenilacetilo, carbamoilo, *N*-alquil carbamoilo, isobutilo, metoxiacetilo, glicina, aminoetilglucosa (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, *N*-dimetilo, y alcóxicarbonilo.

54. El dímero de análogo de insulina de la reivindicación 49, en el que el resto de unión comprende una cadena de hidrocarburo C1-C20 bivalente, lineal o ramificada, saturada o insaturada opcionalmente sustituida en la que una o más unidades de metileno están remplazadas opcional e independientemente por -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)₂-, -N(R)SO₂-, SO₂N(R)-, un grupo heterocíclico, un grupo arilo, o un grupo heteroarilo, en el que cada aparición de R comprende independientemente hidrógeno, un grupo protector adecuado, un resto acilo, resto arilalquilo, resto alifático, resto arilo, resto heteroarilo, o resto heteroalifático y poli(etilenglicol) (PEG).

55. El dímero de análogo de insulina de la reivindicación 49, en el que el resto de unión comprende un alquildioilo, -C(O)(CH₂)_nC(O)-, en el que n = 0-4, un resto acilo, -C(O)RC(O)-, en el que R es cadena de alquilo, cadena de poli(etilenglicol) (PEG), cadena que contiene amida, cadena que contiene triazol(es), resto que contiene ciclooctino, una cadena de acilo sustituida, o una cadena de poli(etilenglicol) (PEG).

56. Una composición que comprende el dímero de análogo de insulina de una cualquiera de las reivindicaciones 49 a 55 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

57. Un agonista parcial del receptor de insulina, que comprende:
un primer heterodímero de insulina o análogo de insulina y un segundo heterodímero de insulina o análogo de insulina incluyendo cada heterodímero un polipéptido de cadena A y un polipéptido de cadena B, en el que el polipéptido de cadena A y el polipéptido de cadena B están unidos juntos a través de enlaces disulfuro intercatenarios;
en el que el primero y segundo heterodímeros de insulina o análogo de insulina están unidos covalentemente juntos a través de un resto de unión que conecta la cadena lateral de

un aminoácido en o cerca del extremo carboxi terminal de los dos polipéptidos respectivos de cadena B;

opcionalmente en el que el extremo amino terminal de al menos uno de los polipéptidos de cadena A y los polipéptidos de cadena B del primer polipéptido de insulina o segundo polipéptido de insulina está unido covalentemente a un sustituyente; y en el que el agonista parcial del receptor de insulina tiene una respuesta máxima hacia el receptor de insulina (IR) humana que es aproximadamente el 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, o 70% de la respuesta máxima de insulina humana nativa hacia el IR, determinada por un ensayo de fosforilación funcional.

10

58. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 57, en el que el agonista parcial del receptor de insulina comprende un resto de unión que no incluye un enlace disulfuro y cuando el extremo amino terminal del polipéptido de cadena A y el polipéptido de cadena B no incluye un sustituyente el resto de unión no es un resto oxalilo (C2), un resto suberoílo (C8), o un resto dodecanodioílo (C12).

15

59. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 57, en el que el agonista parcial del receptor de insulina comprende un primero y segundo heterodímeros de insulina o análogo de insulina que son iguales o en el que el primero y segundo heterodímeros de insulina o análogo de insulina son diferentes.

20

60. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 57, en el que el agonista parcial del receptor de insulina comprende un resto de unión que une covalentemente el primer heterodímero de insulina o análogo de insulina y el segundo heterodímero de insulina o análogo de insulina mediante el grupo amino épsilon de un residuo de lisina en o cerca del extremo carboxi terminal de sus respectivos polipéptidos de cadena B.

25

61. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 57, en el que el sustituyente comprende una fórmula general $RC(O)-$, en la que R puede ser $R'CH_2$, $R'NH$, $R'O$ y R' puede ser H, cadena alquilo lineal, aminoácido, péptido, polietilenglicol (PEG) y un sacárido.

30

62. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 57, en el que el agonista parcial del receptor de insulina comprende un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en acetilo, fenilacetilo, carbamoílo, *N*-alquil carbamoílo, isobutilo, metoxiacetilo, glicina, aminoetilglucosa (AEG), AEG-C6, PEG1, PEG2, *N*-dimetilo, y alcóxicarbonilo.

63. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 57, en el que el agonista parcial del receptor de insulina comprende una primera y segunda insulinas o análogos de insulina que son independientemente insulina humana nativa, insulina lispro, insulina aspart, desB30 insulina, o insulina glargina.

64. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 57, en el que cada polipéptido de cadena A comprende independientemente la secuencia de aminoácidos GX₂X₃EQCCX₈SICSLYQLX₁₇NX₁₉CX₂₃ (SEC ID N.º: 3) y cada polipéptido de cadena B comprende independientemente la secuencia de aminoácidos X₂₅LCGX₂₉X₃₀LVEALYLVCGERGFX₂₇YTX₃₁X₃₂ (SEC ID N.º: 4) o X₂₂VNQX₂₅X₂₆CGX₂₉X₃₀LVEALYLVCGERGFX₂₇YTX₃₁X₃₂X₃₃X₃₄X₃₅ (SEC ID N.º: 5) en la que X₂ es isoleucina o treonina; X₃ es valina, glicina, o leucina; X₈ es treonina o histidina; X₁₇ es ácido glutámico o glutamina; X₁₉ es tirosina, 4-metoxi-fenilalanina, alanina, o 4-amino fenilalanina; X₂₃ es asparagina o glicina; X₂₂ es fenilalanina y desamino-fenilalanina; X₂₅ es histidina o treonina; X₂₆ es leucina o glicina; X₂₇ es fenilalanina o ácido aspártico; X₂₉ es alanina, glicina, o serina; X₃₀ es histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, ácido homocisteico, o ácido cisteico; X₃₁ es ácido aspártico, prolina, o lisina; X₃₂ es lisina o prolina; X₃₃ es treonina, alanina, o está ausente; X₃₄ es arginina o está ausente; y X₃₅ es arginina o está ausente; con la condición de que al menos uno de X₃₁ o X₃₂ sea lisina.

65. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 57, en el que el resto de unión comprende una cadena de hidrocarburo C1-C20 bivalente, lineal o ramificada, saturada o insaturada opcionalmente sustituida en la que una o más unidades de

metileno están remplazadas opcional e independientemente por -O-, -S-, -N(R)-, -C(O)-, C(O)O-, OC(O)-, -N(R)C(O)-, -C(O)N(R)-, -S(O)-, -S(O)₂-, -N(R)SO₂-, SO₂N(R)-, un grupo heterocíclico, un grupo arilo, o un grupo heteroarilo, en el que cada aparición de R comprende independientemente hidrógeno, un grupo protector adecuado, un resto acilo, resto arilalquilo, resto alifático, resto arilo, resto heteroarilo, o resto heteroalifático y poli(etilenglicol) (PEG).

66. El agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 57, en el que el resto de unión comprende un alquildioílo, -C(O)(CH₂)_nC(O)-, en el que n = 0-4, un resto acilo, -C(O)RC(O)-, en el que R es cadena de alquilo, cadena de poli(etilenglicol) (PEG), cadena que contiene amida, cadena que contiene triazol(es), resto que contiene ciclooctino, una cadena de acilo sustituida, o una cadena de poli(etilenglicol) (PEG).

67. Una composición que comprende el agonista parcial del receptor de insulina de una cualquiera de las reivindicaciones 57 a 66 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

68. Un procedimiento para tratar la diabetes que comprende administrar a un individuo con diabetes una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende el agonista parcial del receptor de insulina de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, 11-19, 21-29, 31-39, 41-47, 49-55, o 57-66.

69. El procedimiento de la reivindicación 68, en el que la diabetes es diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, o diabetes gestacional.

70. Una composición para el tratamiento de la diabetes que comprende el agonista parcial del receptor de insulina de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, 11-19, 21-29, 31-39, 41-47, 49-55, o 57-66.

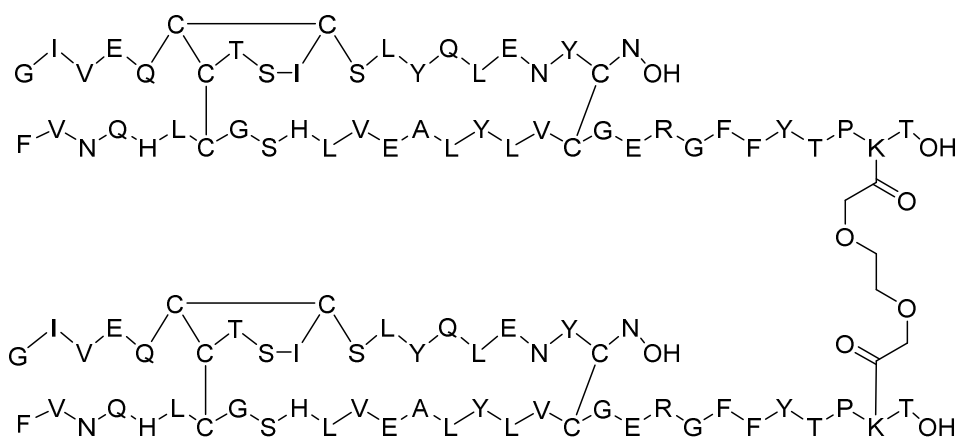
71. La composición de la reivindicación 70, en la que la diabetes es diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, o diabetes gestacional.

72. Uso del agonista parcial del receptor de insulina de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, 11-19, 21-29, 31-39, 41-47, 49-55, o 57-66 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes.

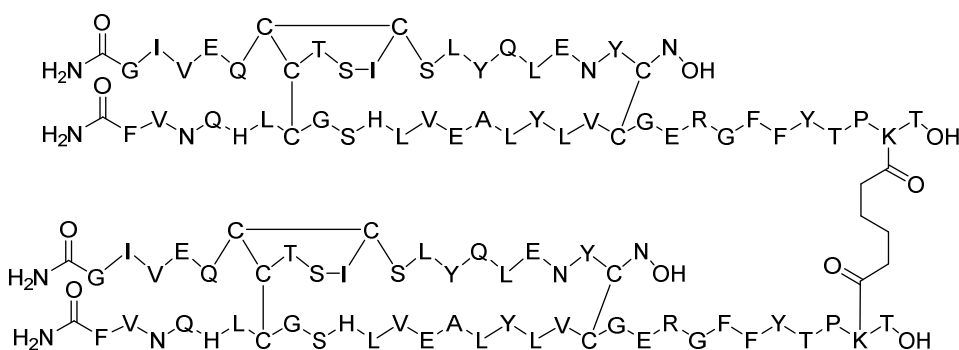
5 73. El uso de la reivindicación 72, en el que la diabetes es diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, o diabetes gestacional.

74. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en

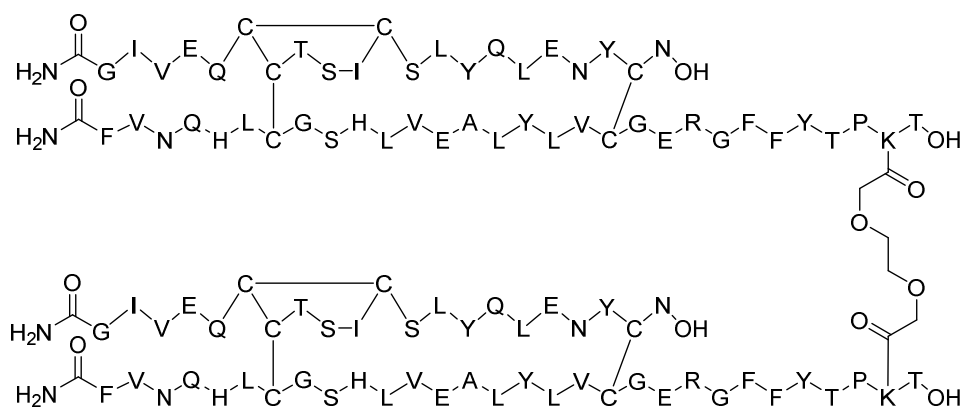
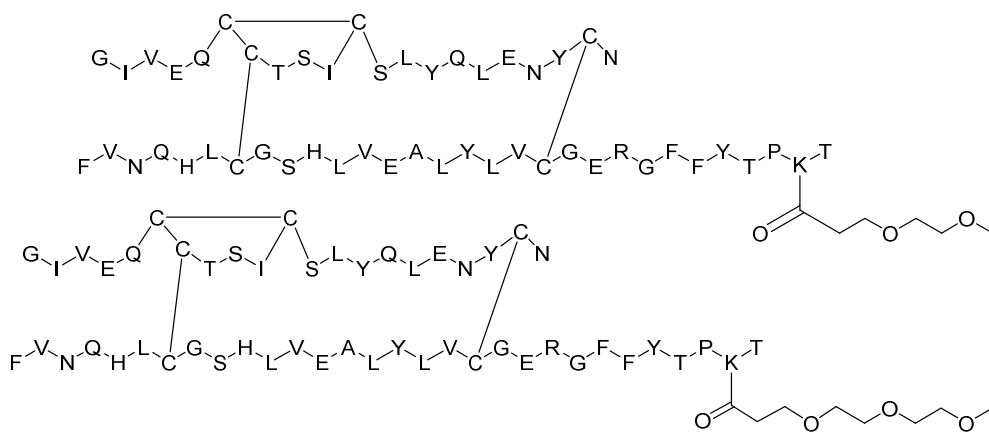
10



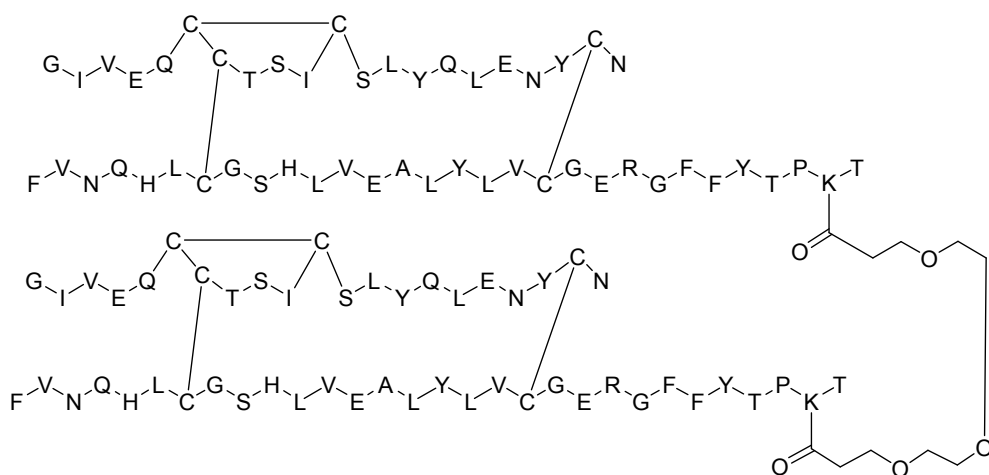
Dímero 1;



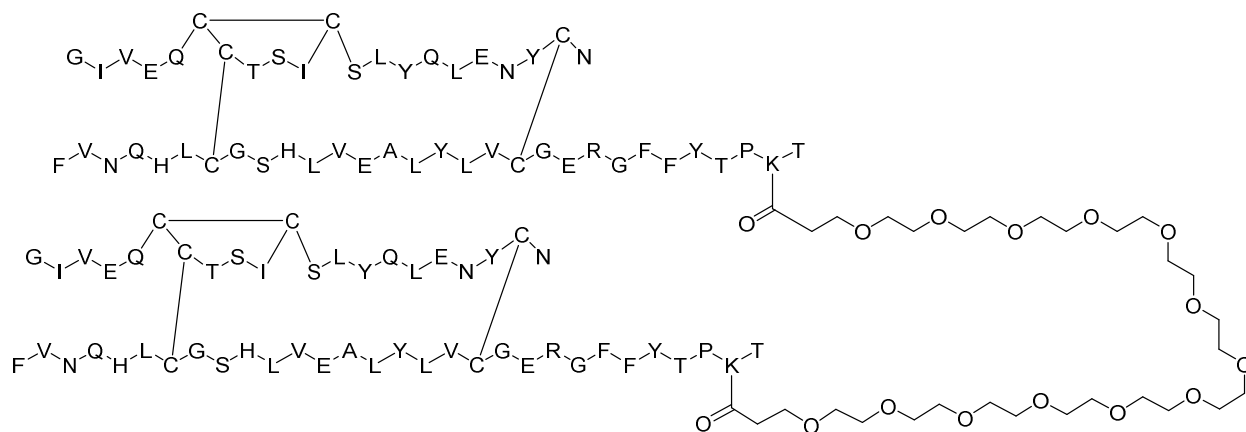
15 **Dímero 2;**

**Dímero 3;**

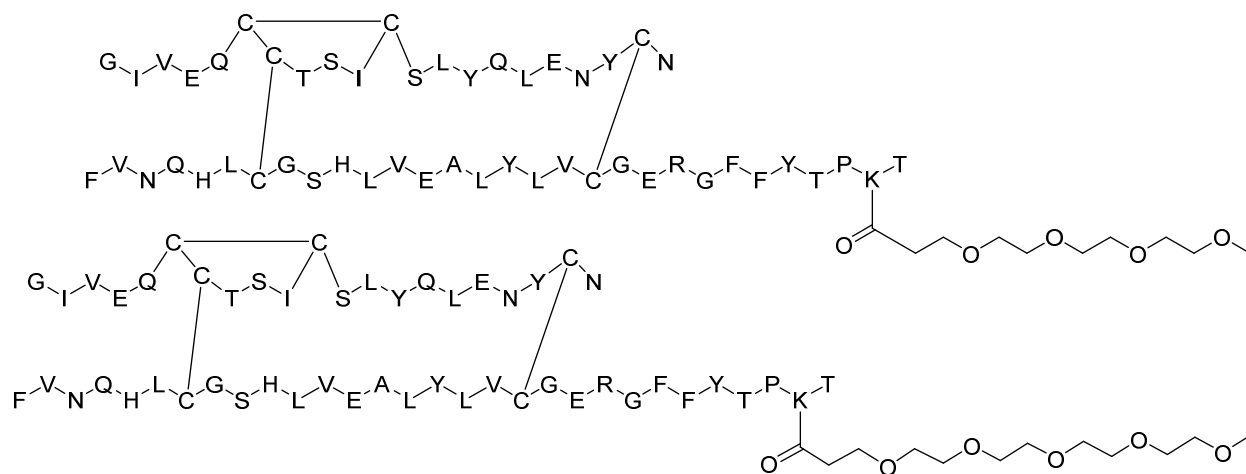
5

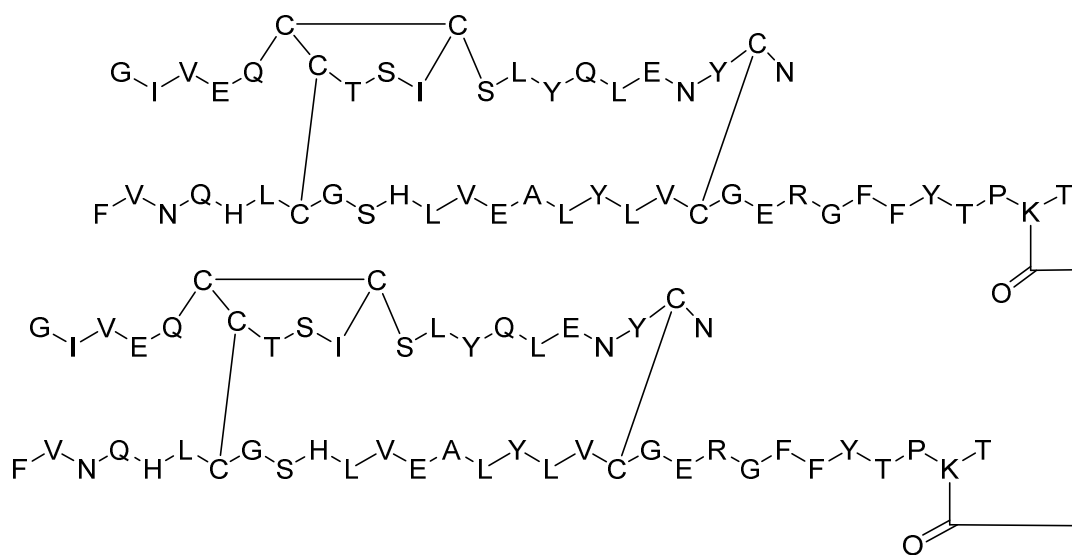
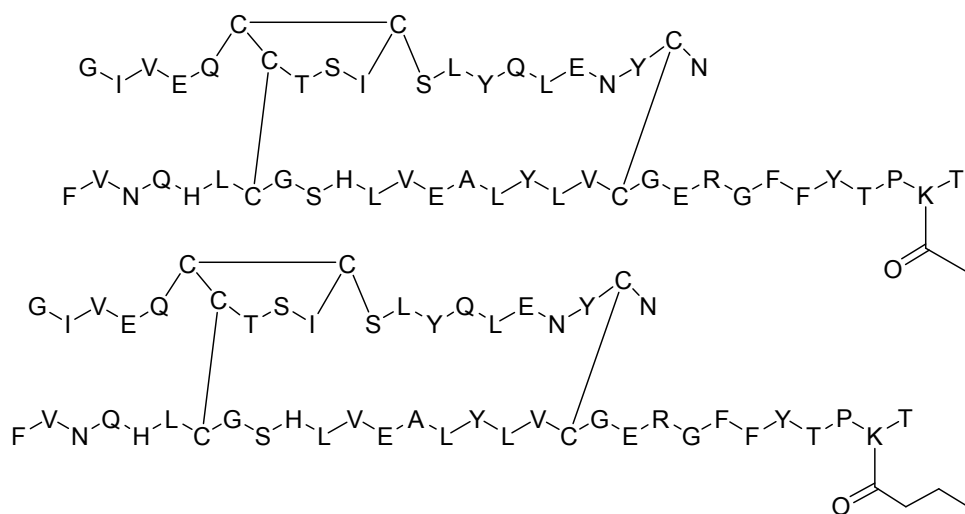
Dímero 4;**Dímero 5;**

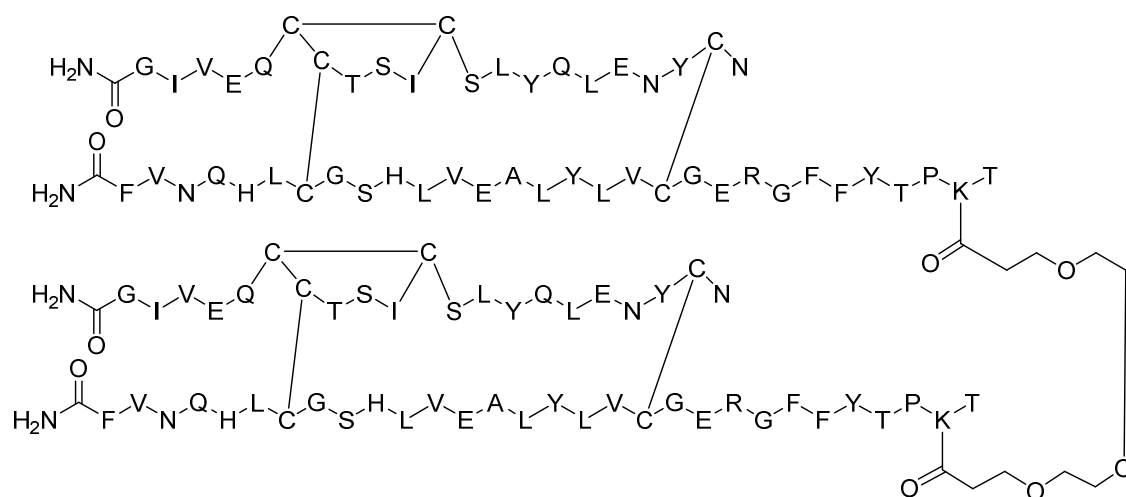
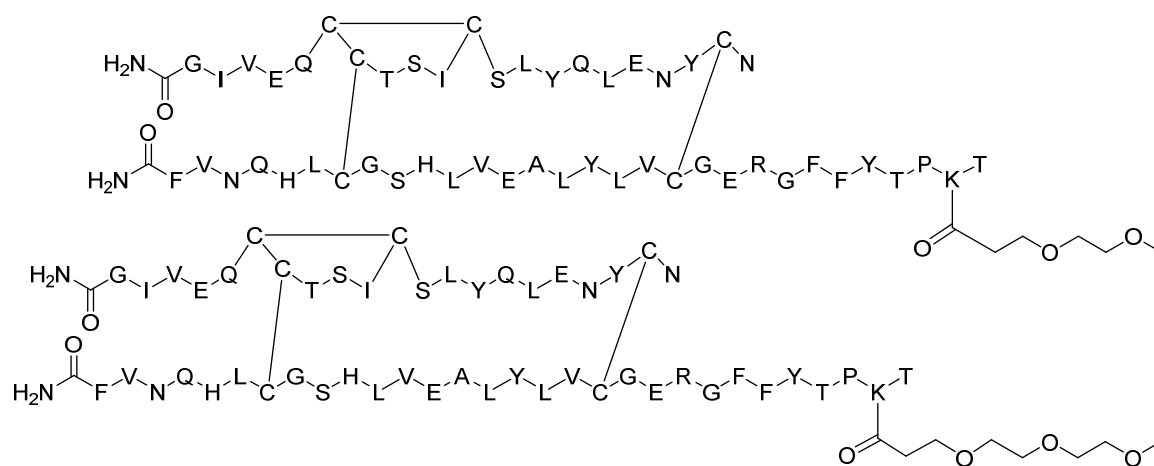
10

**Dímero 6;**

5

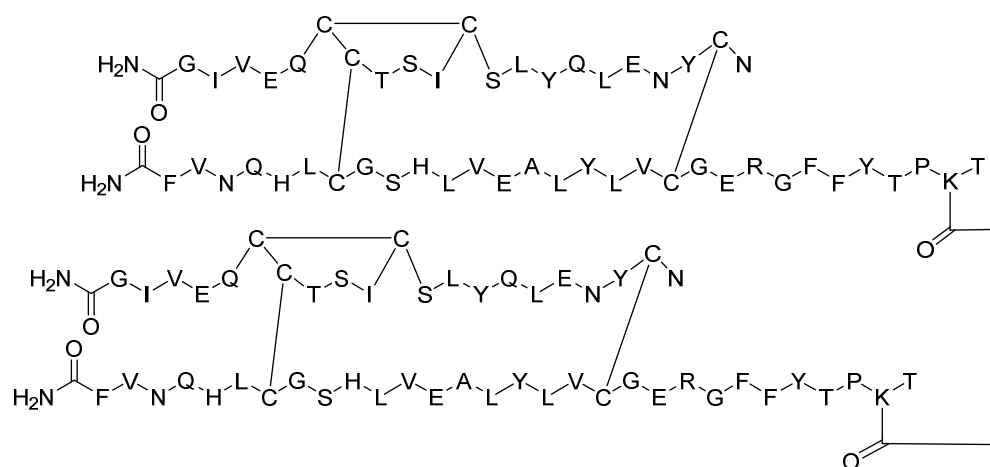
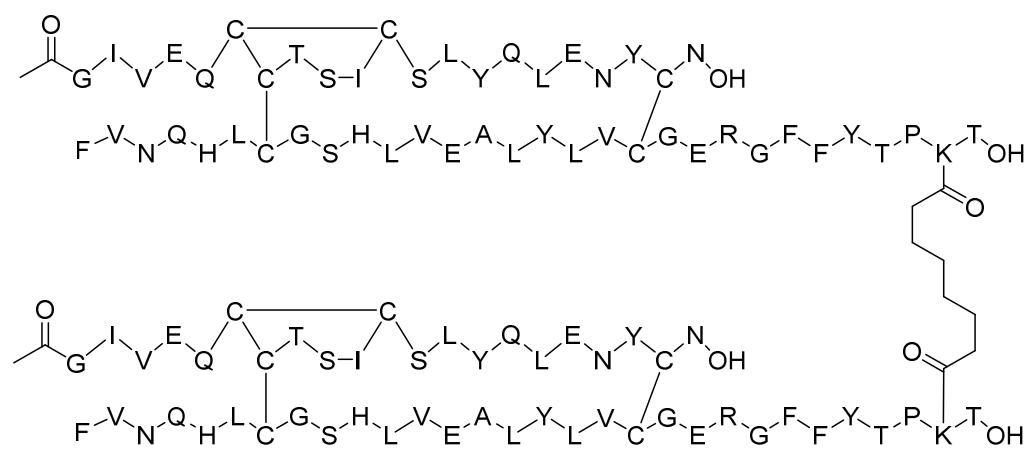
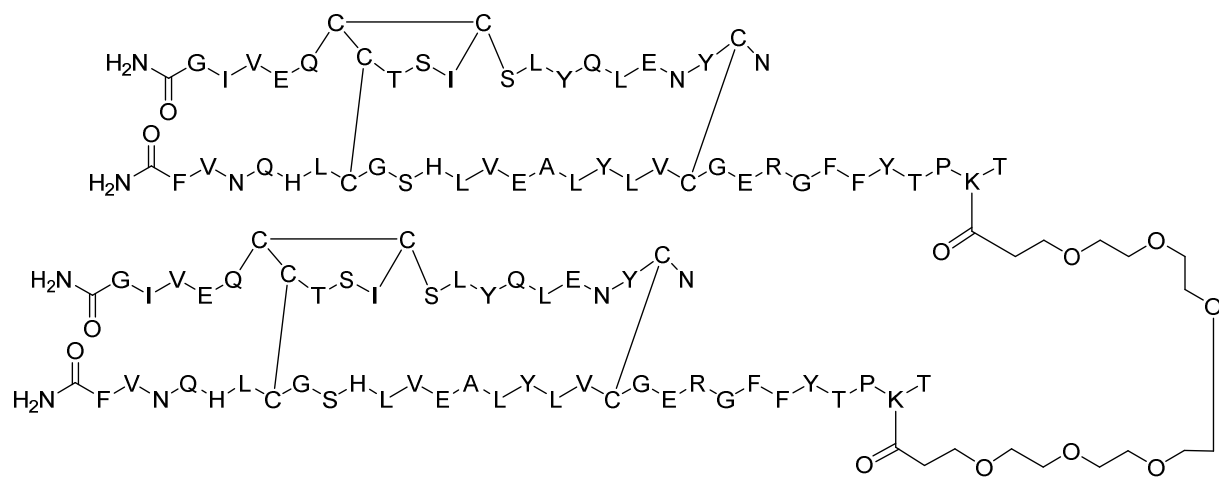
**Dímero 7;**

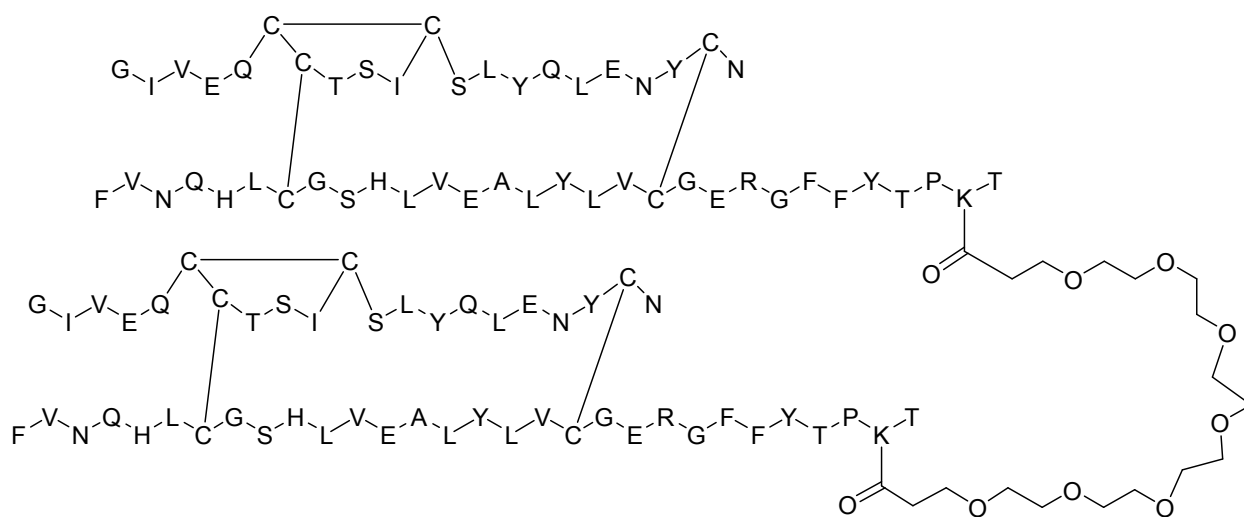
**Dímero 8;****5 Dímero 9;**

**Dímero 10;**

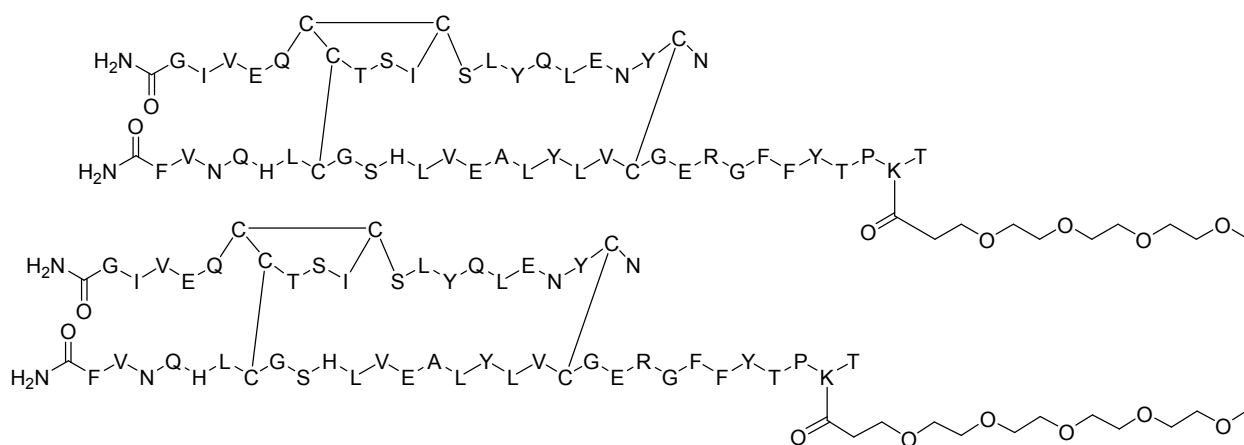
5

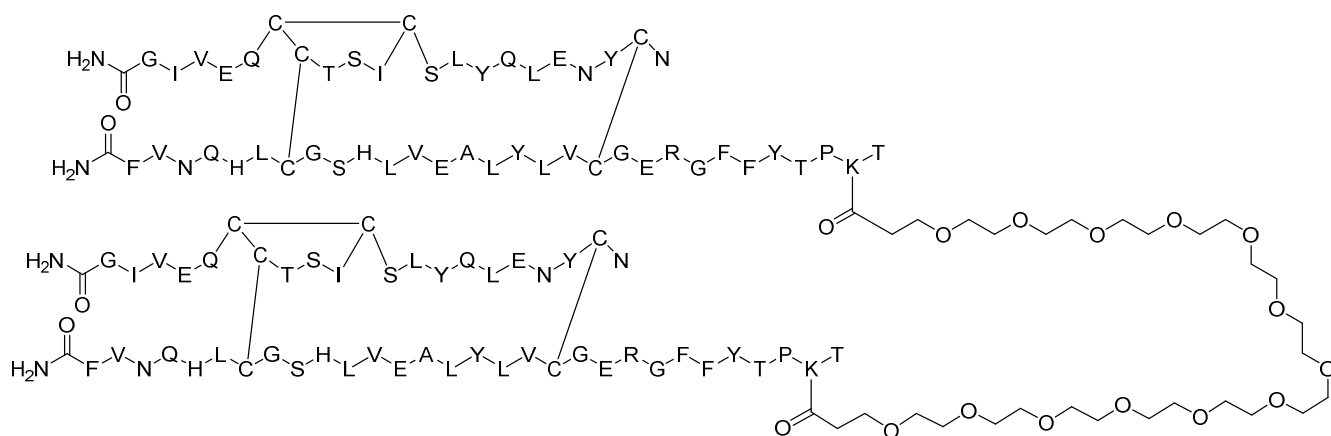
Dímero 11;

**Dímero 12;****Dímero 13;**

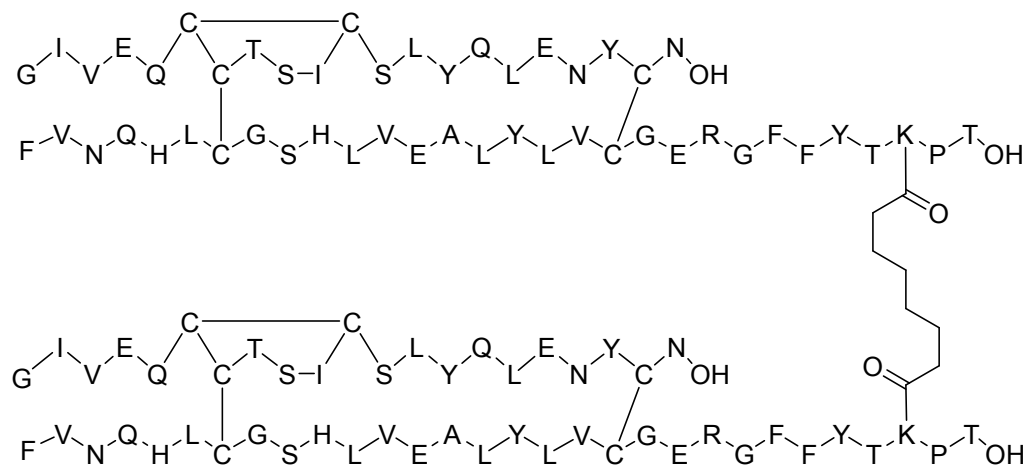
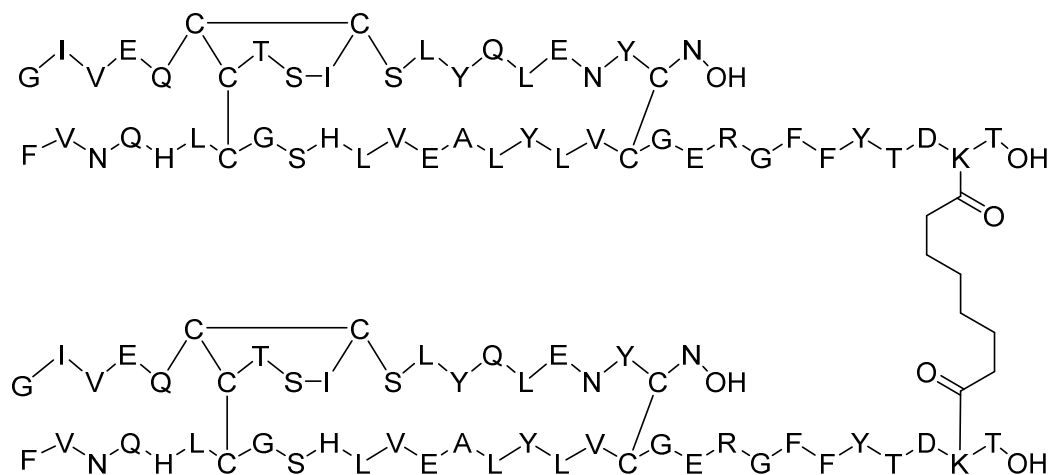
Dímero 14;

5

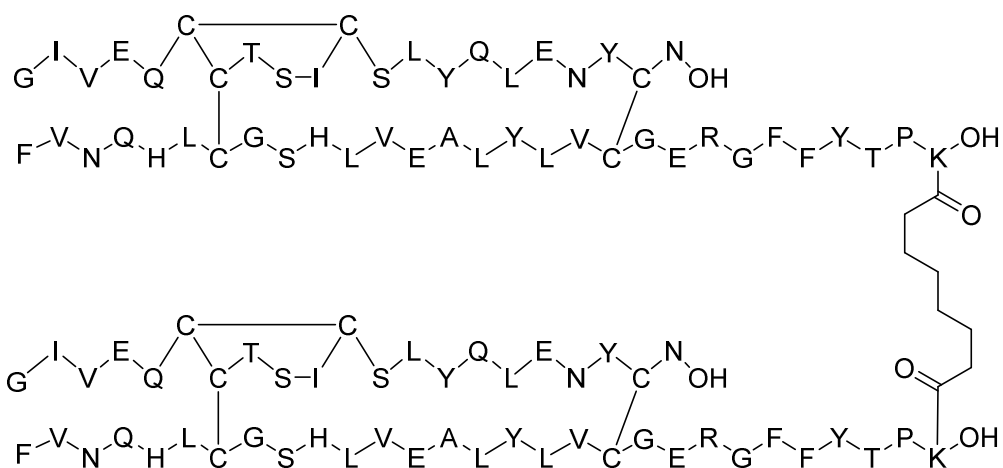
Dímero 15;10 **Dímero 16;**

**Dímero 17;**

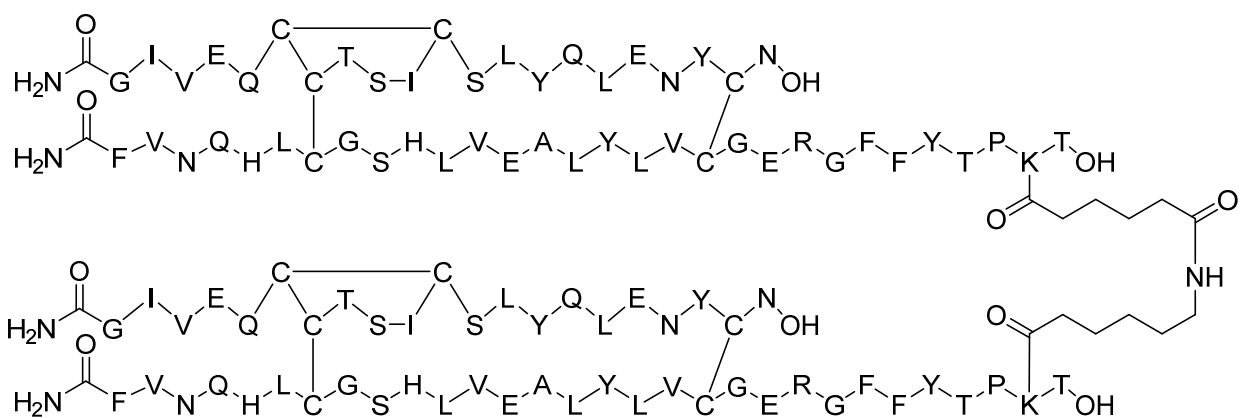
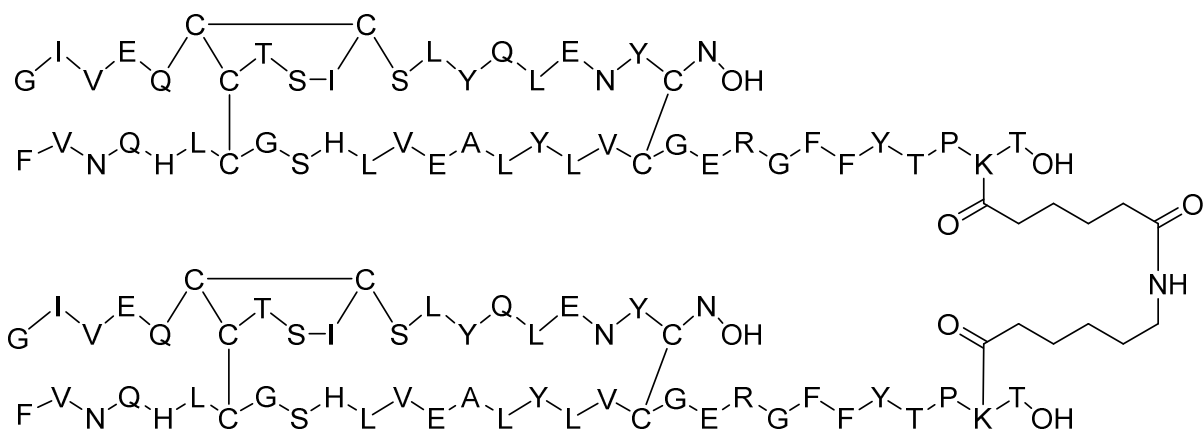
5

**Dímero 18;**

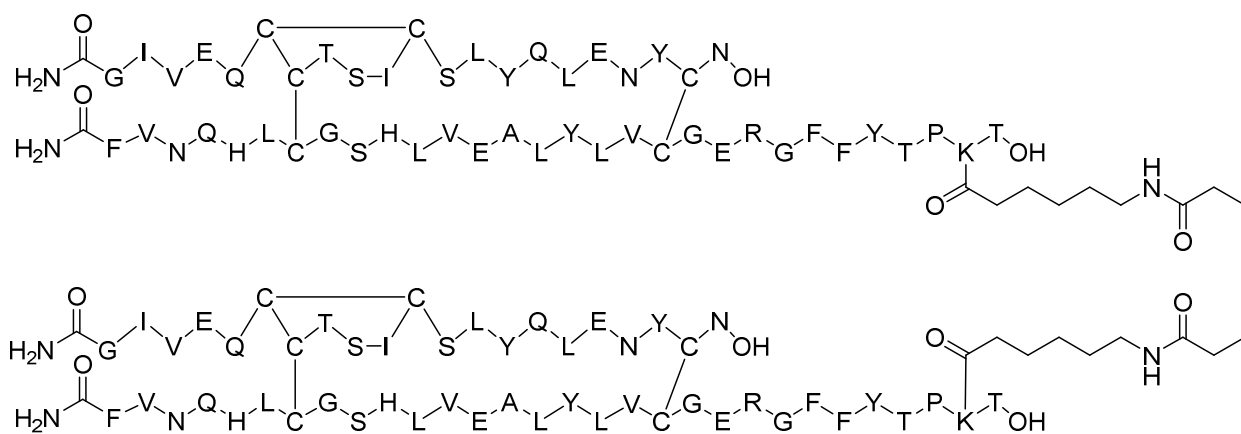
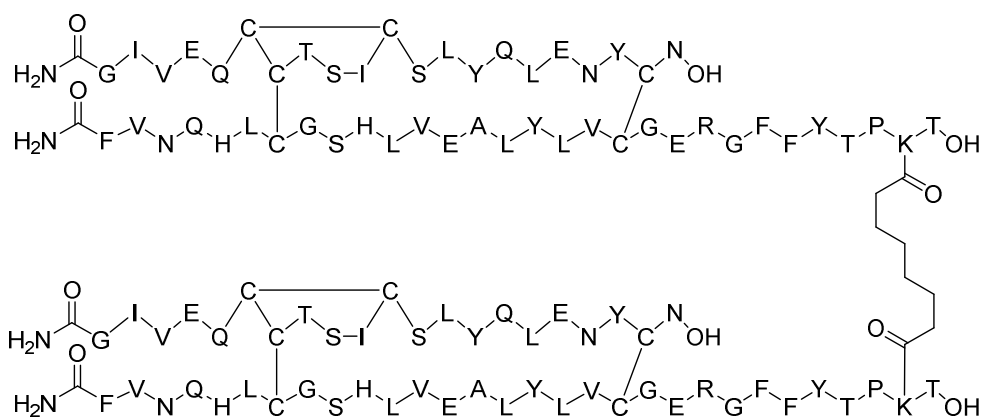
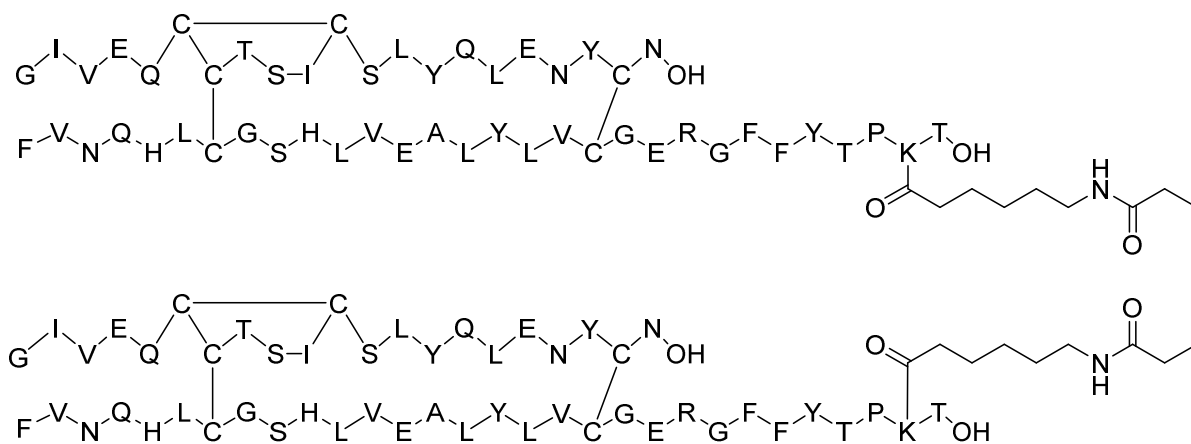
10

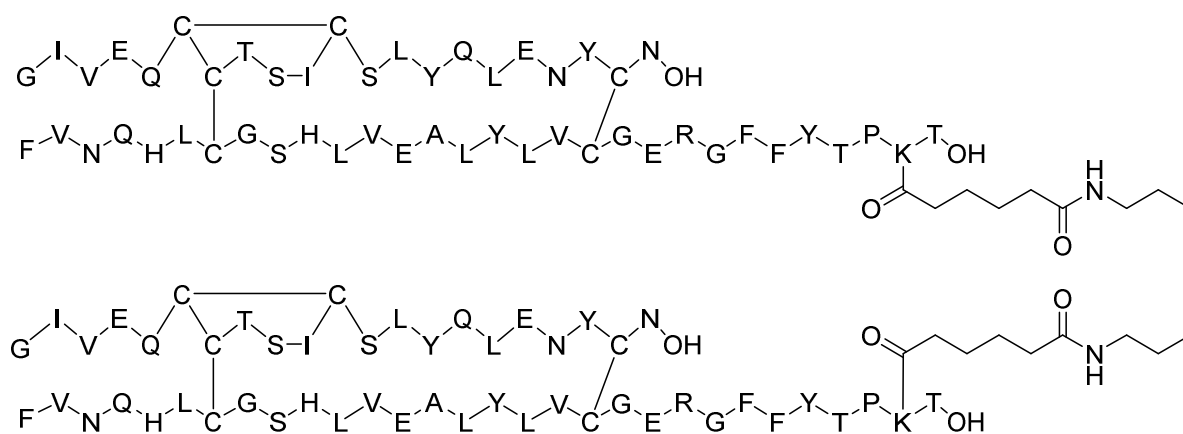
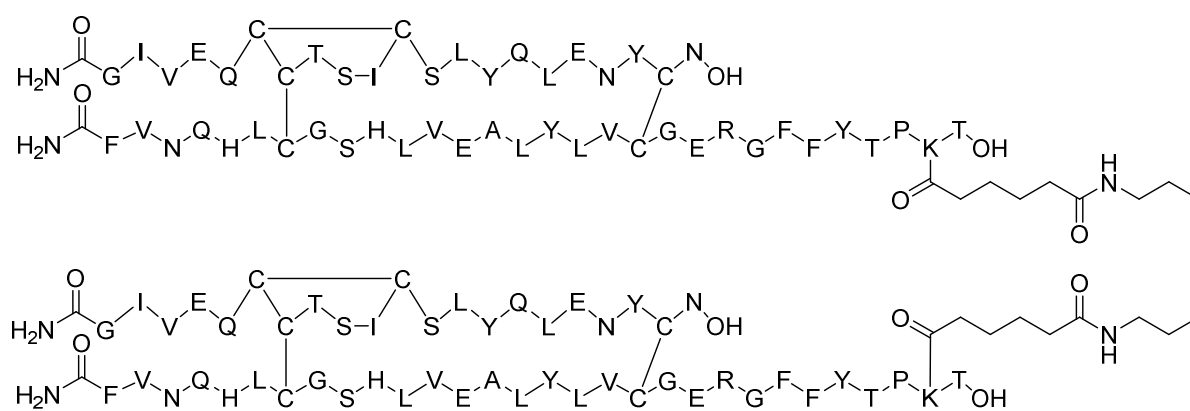
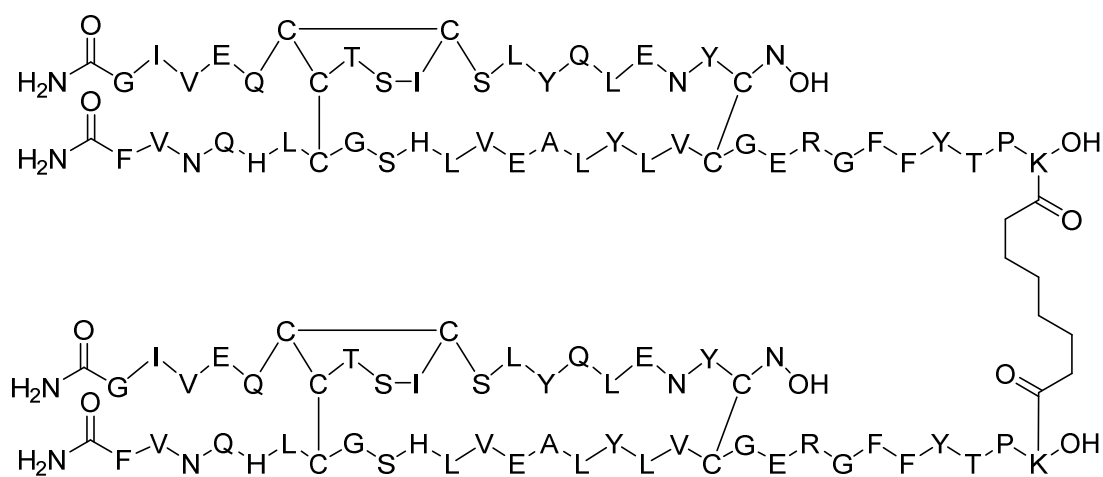
Dímero 19;**Dímero 20;**

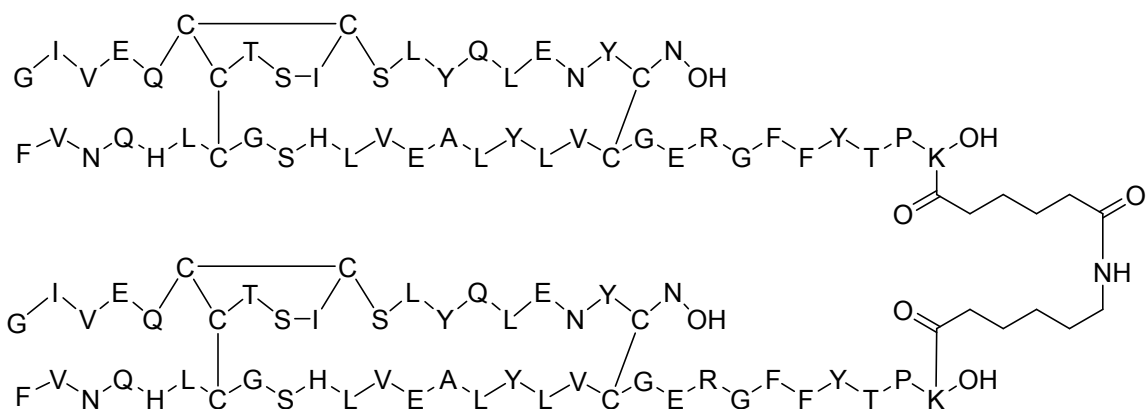
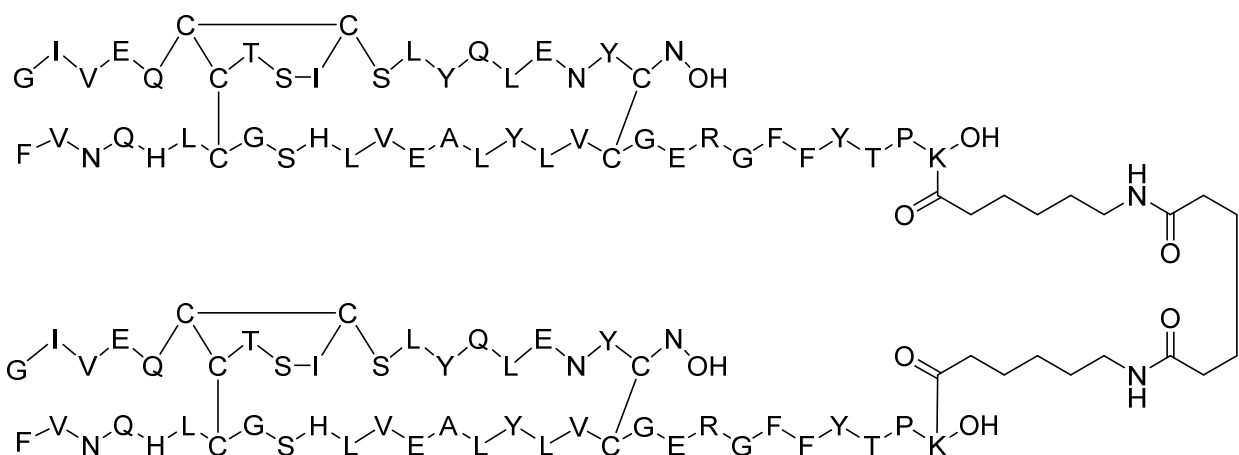
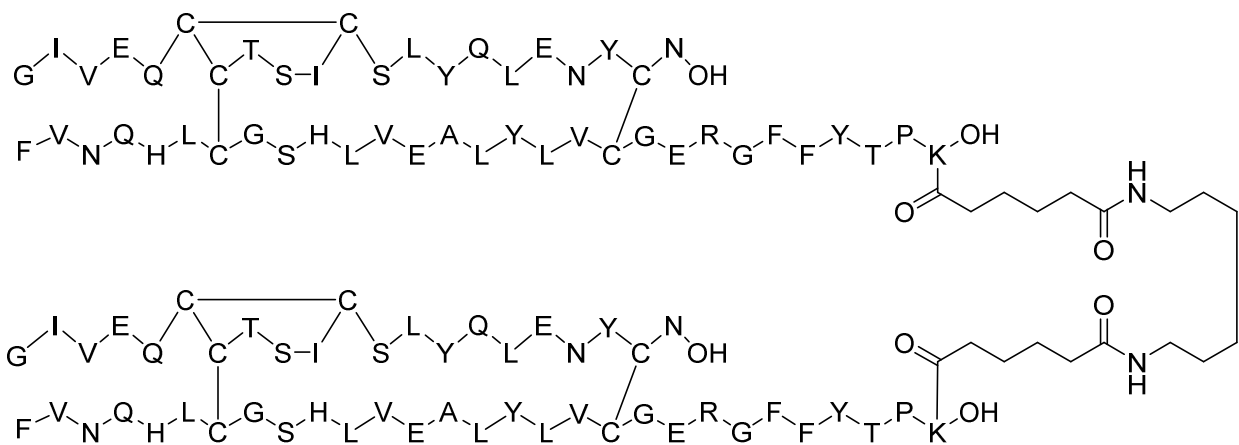
5

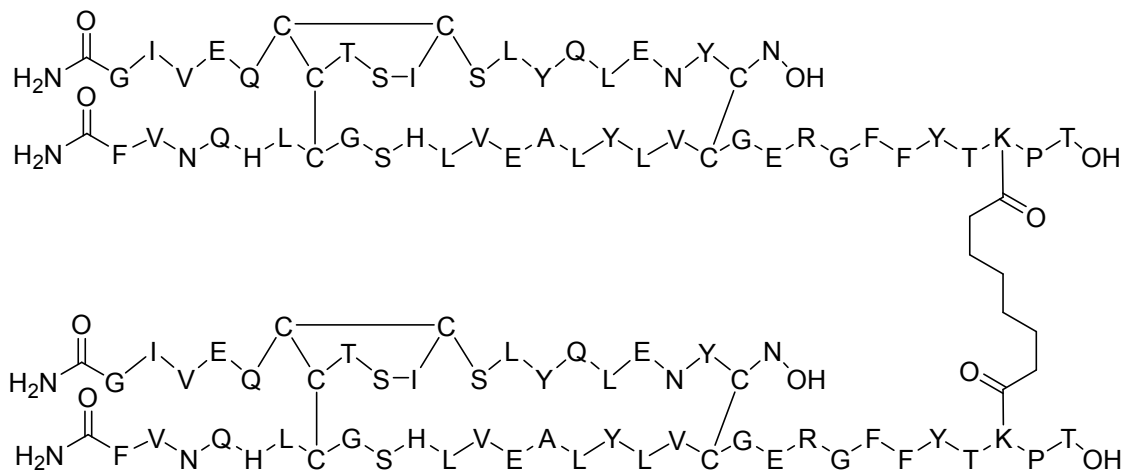
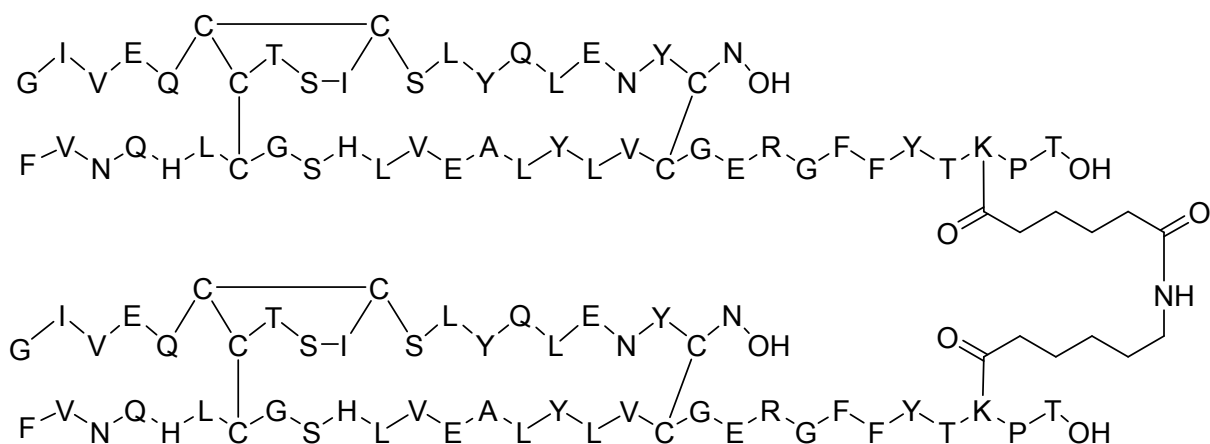
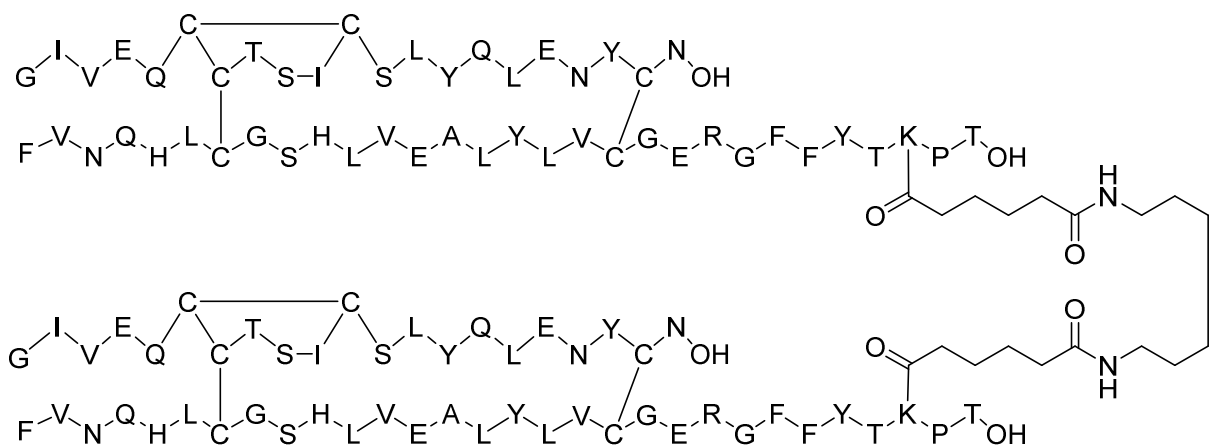
**Dímero 21;****Dímero 22;**

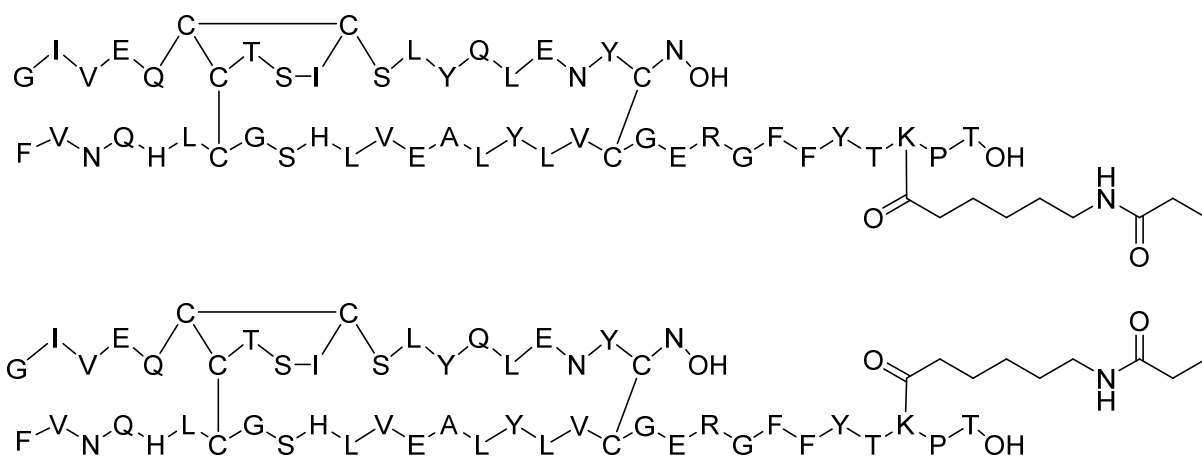
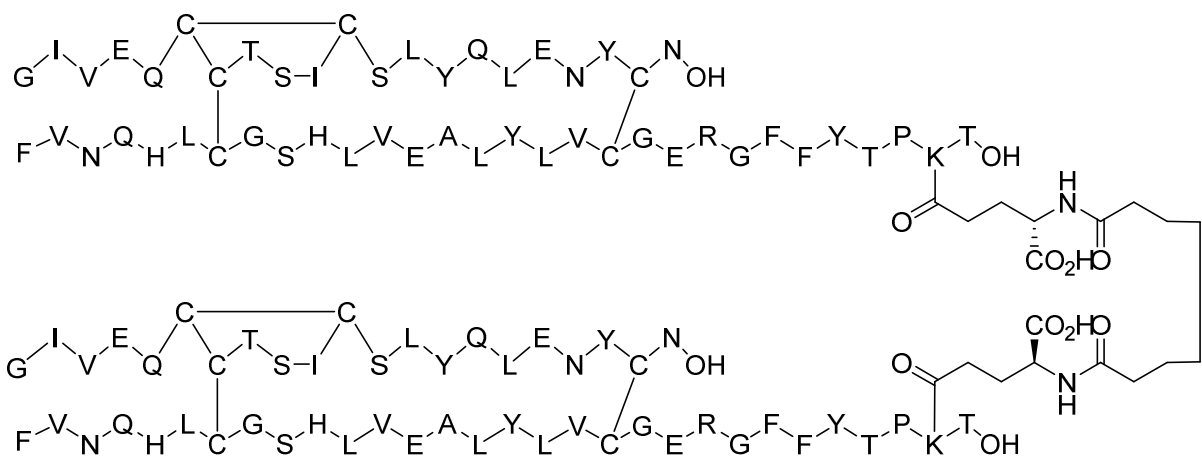
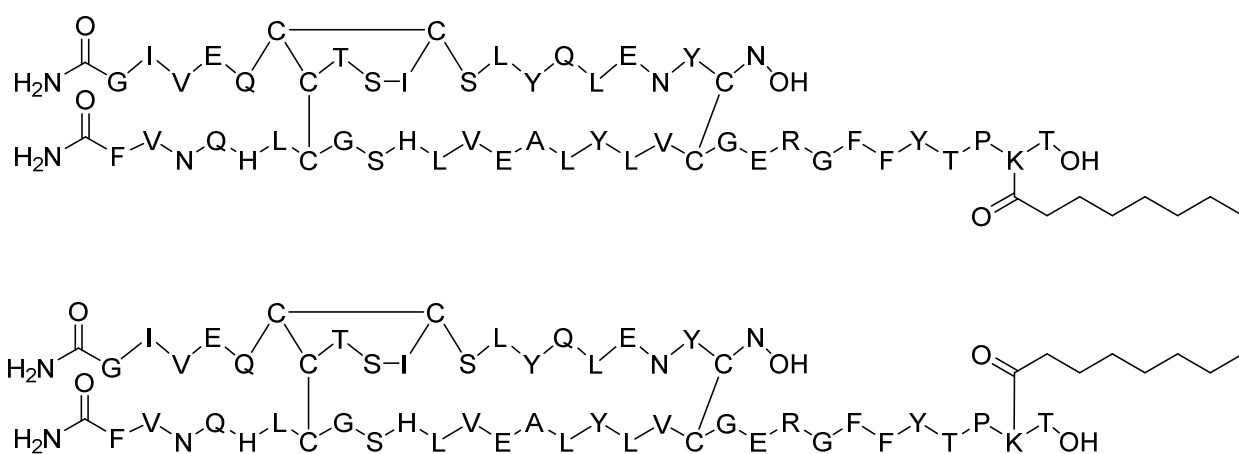
10

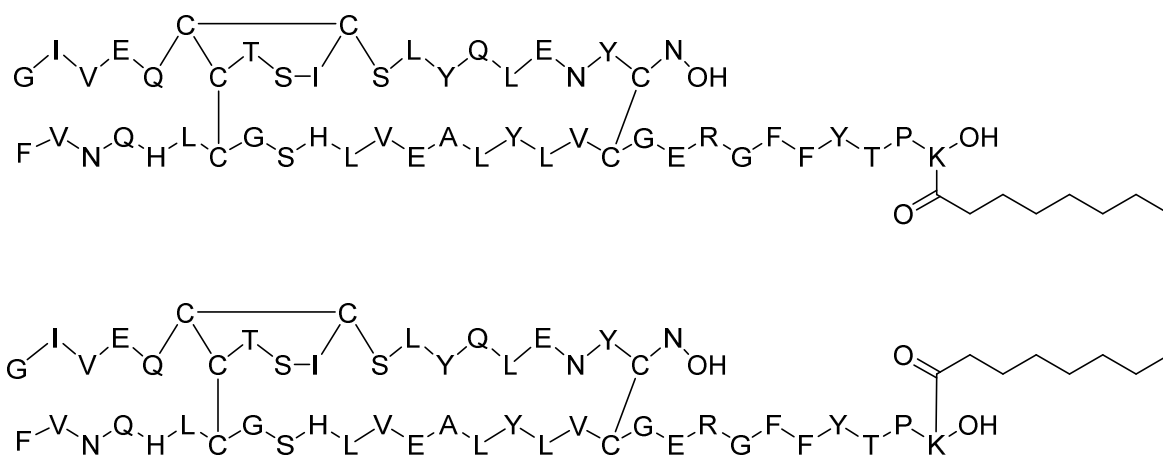
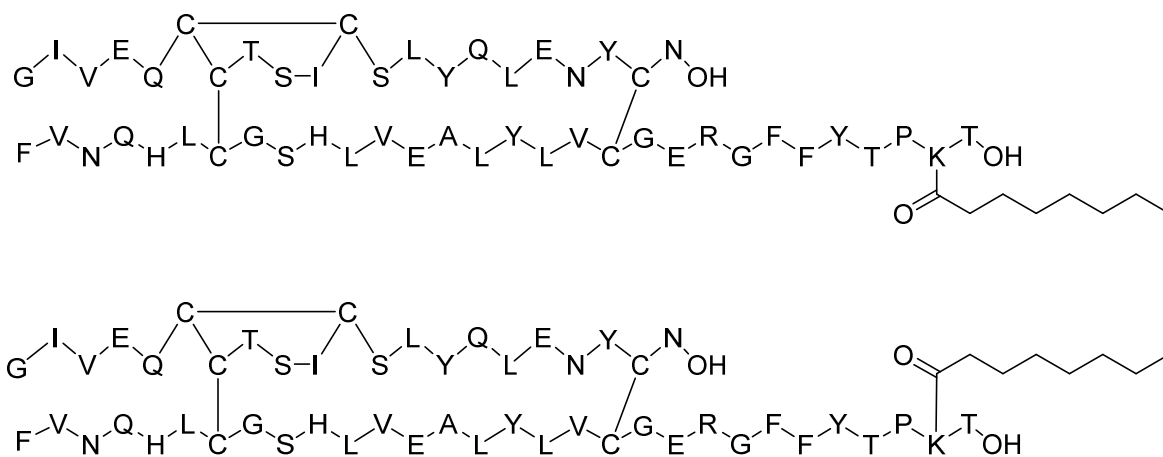
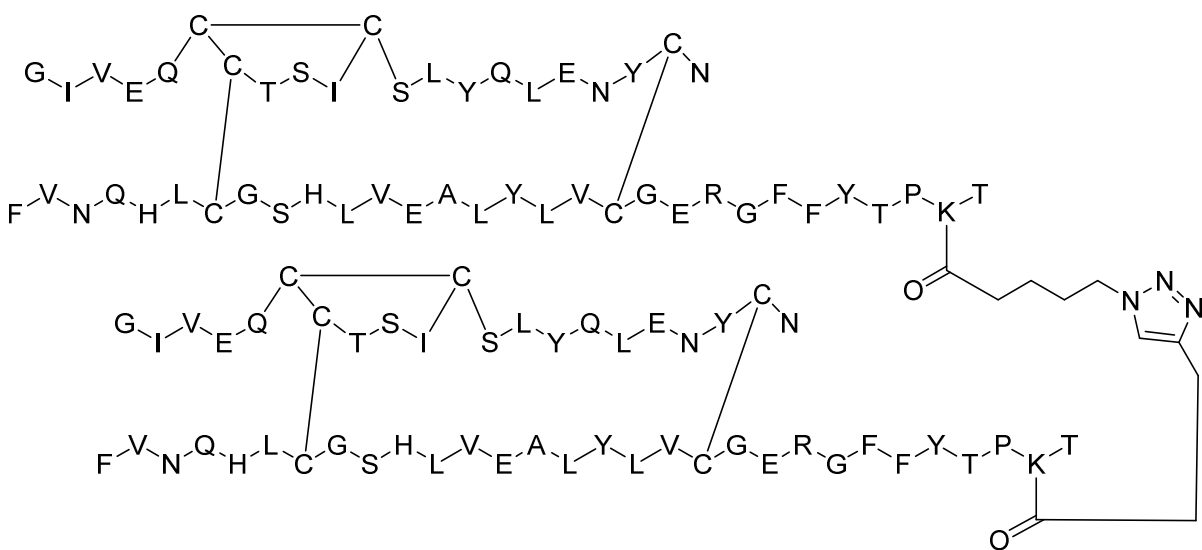
**Dímero 23;**5 **Dímero 24;****Dímero 25;**

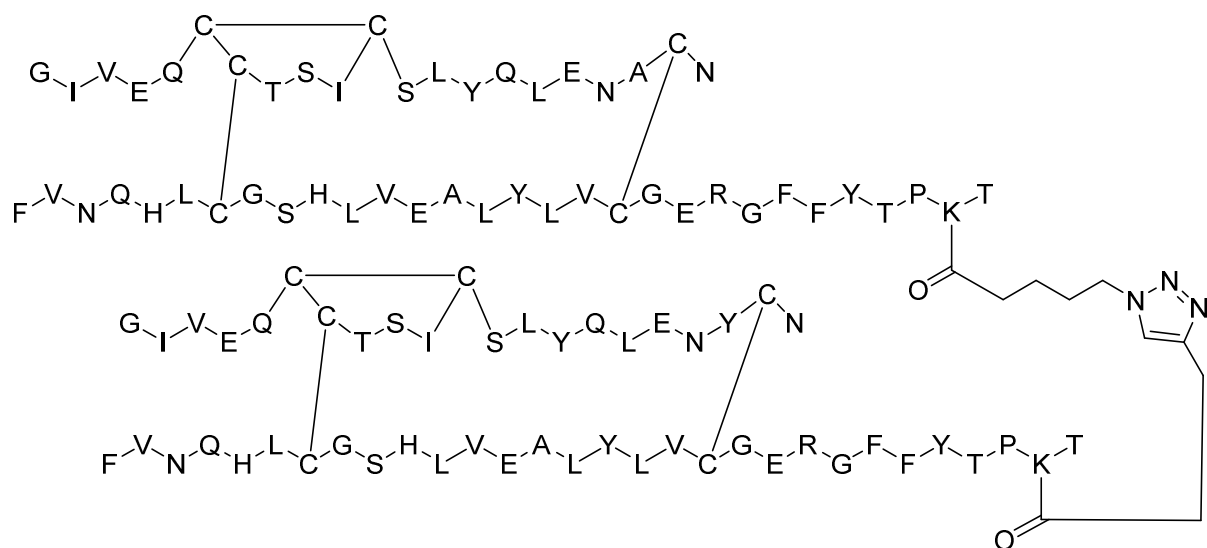
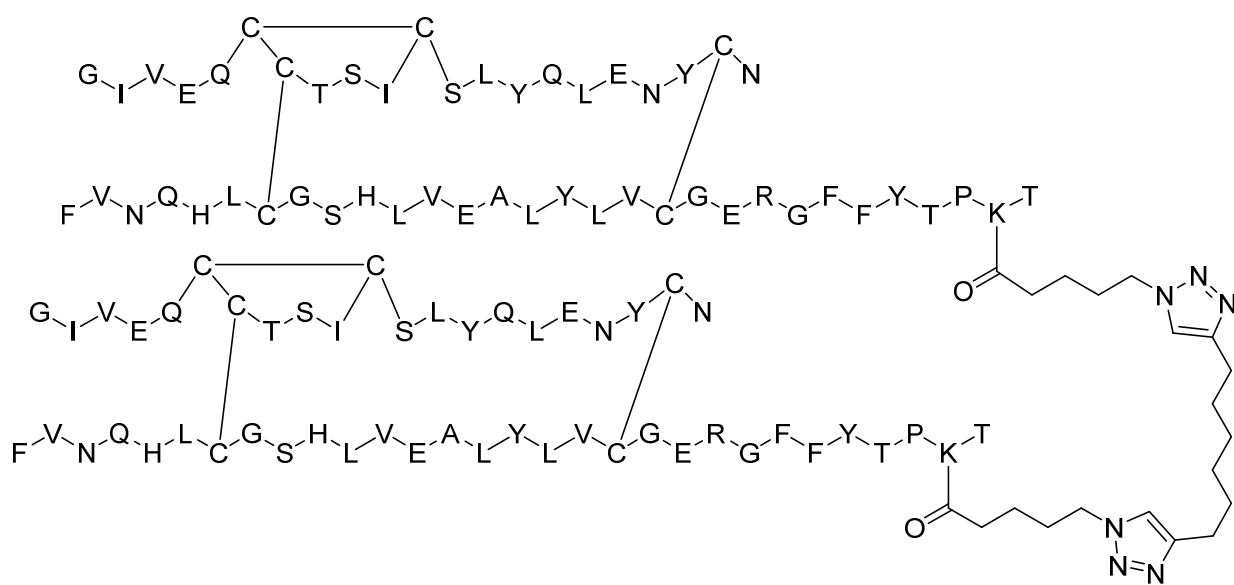
**Dímero 26;**5 **Dímero 27;****Dímero 28;**

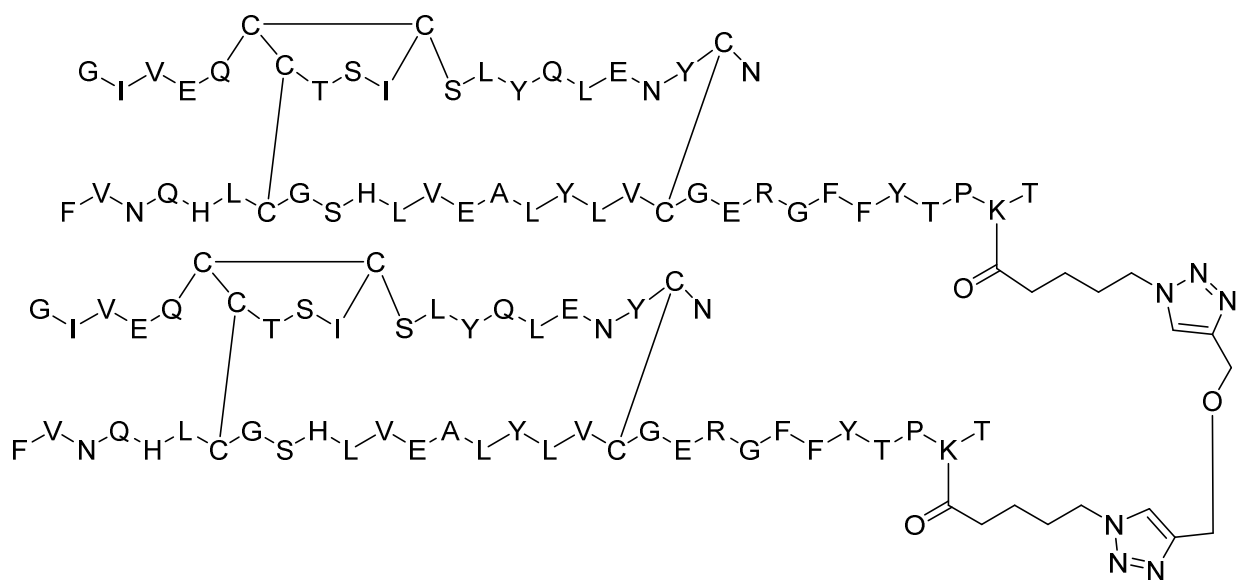
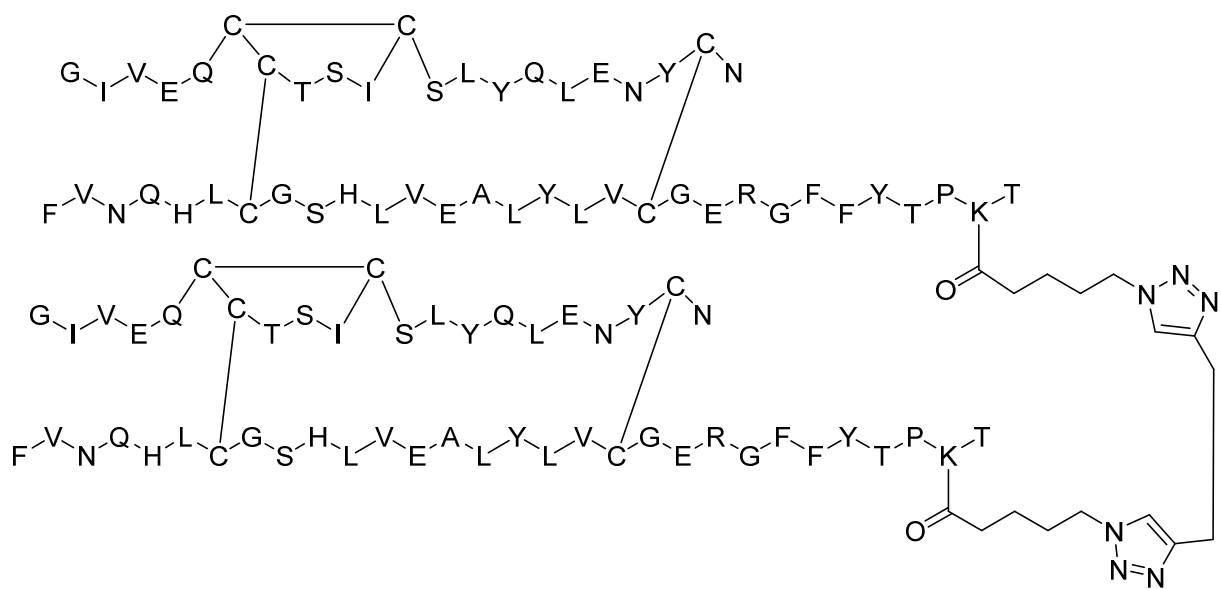
**Dímero 29;**5 **Dímero 30;****Dímero 31;**

**Dímero 32;****5 Dímero 33;****Dímero 34;**

**Dímero 35;**5 **Dímero 36;****Dímero 37;**

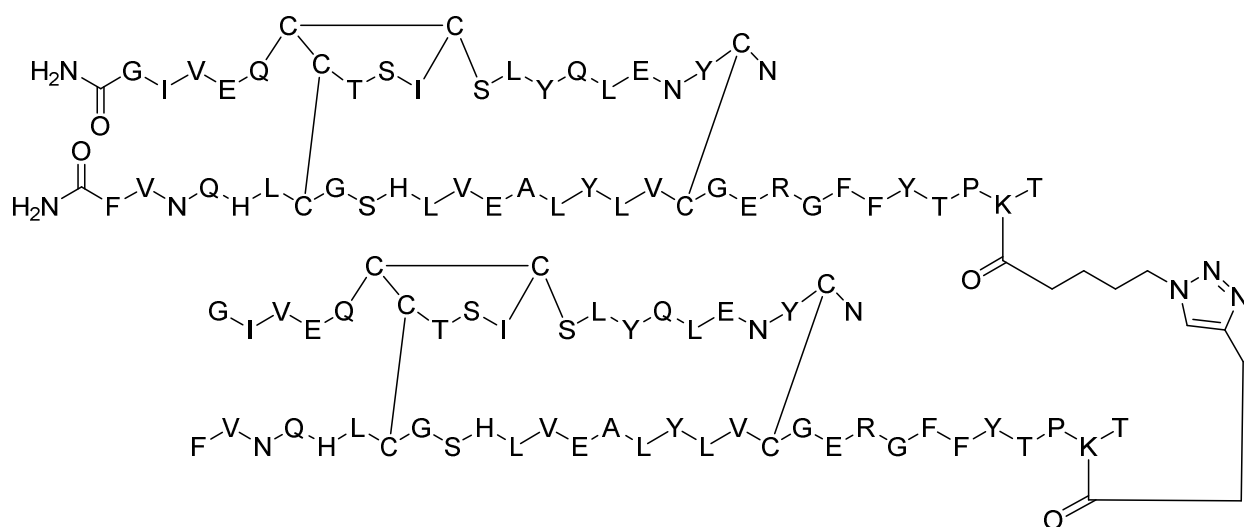
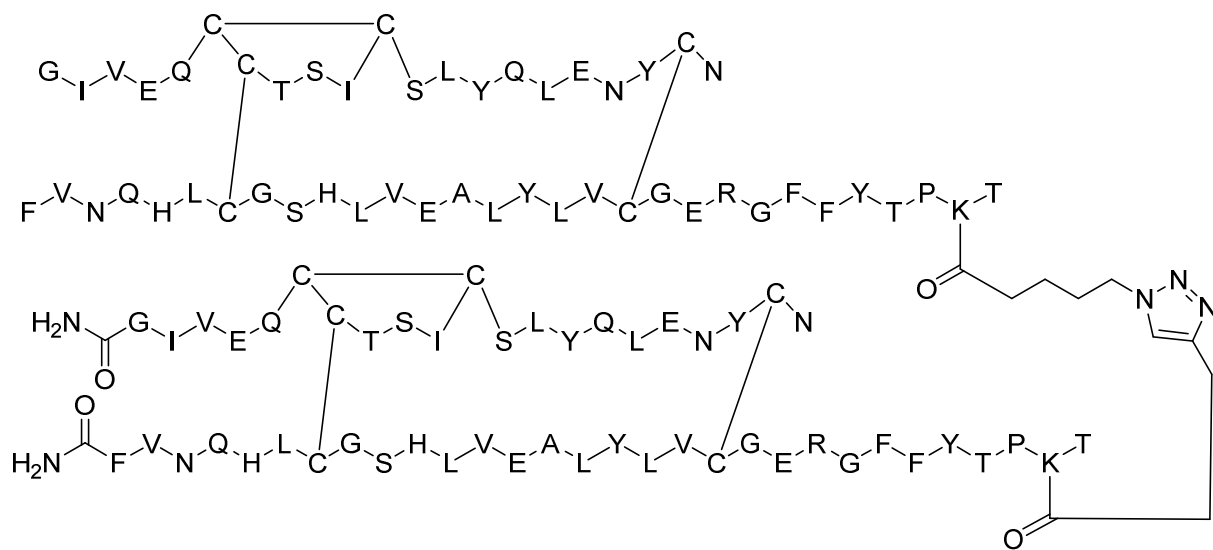
**Dímero 38;**5 **Dímero 39;****Dímero 40;**

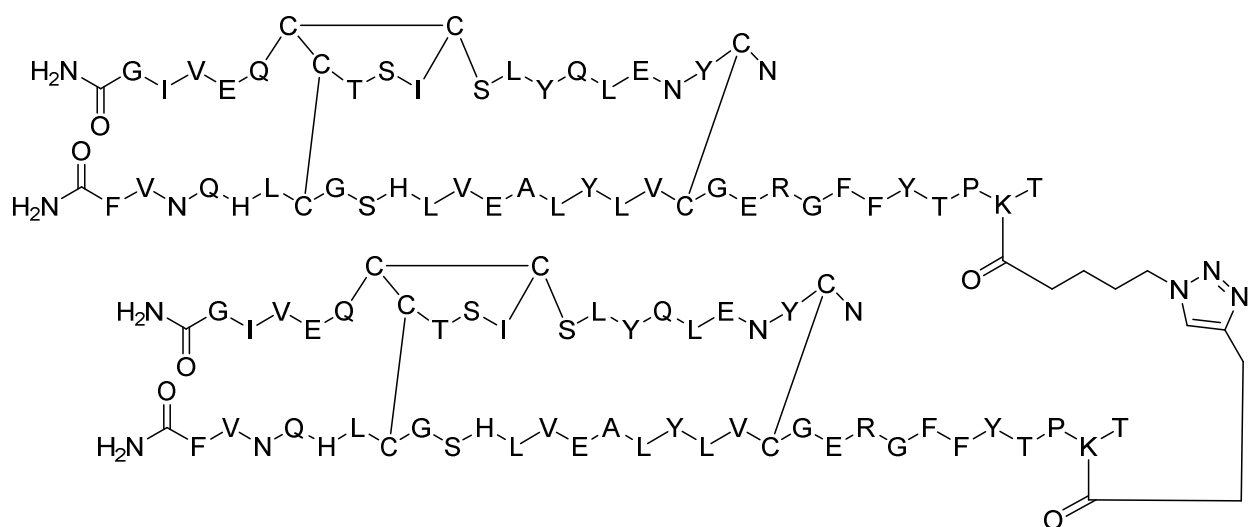
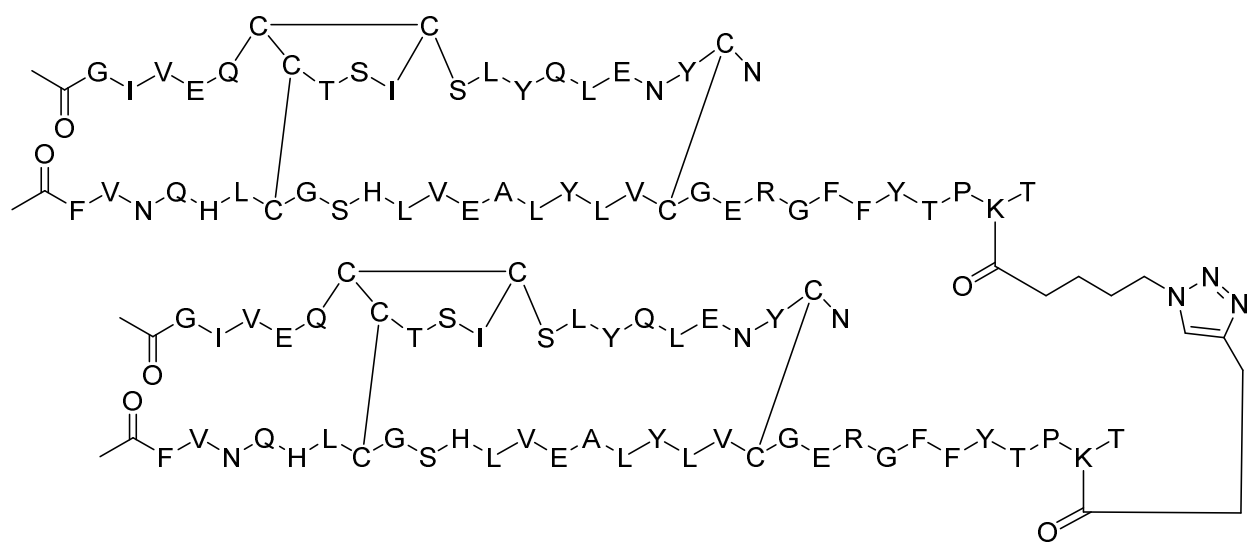
**Dímero 41;****Dímero 42;**

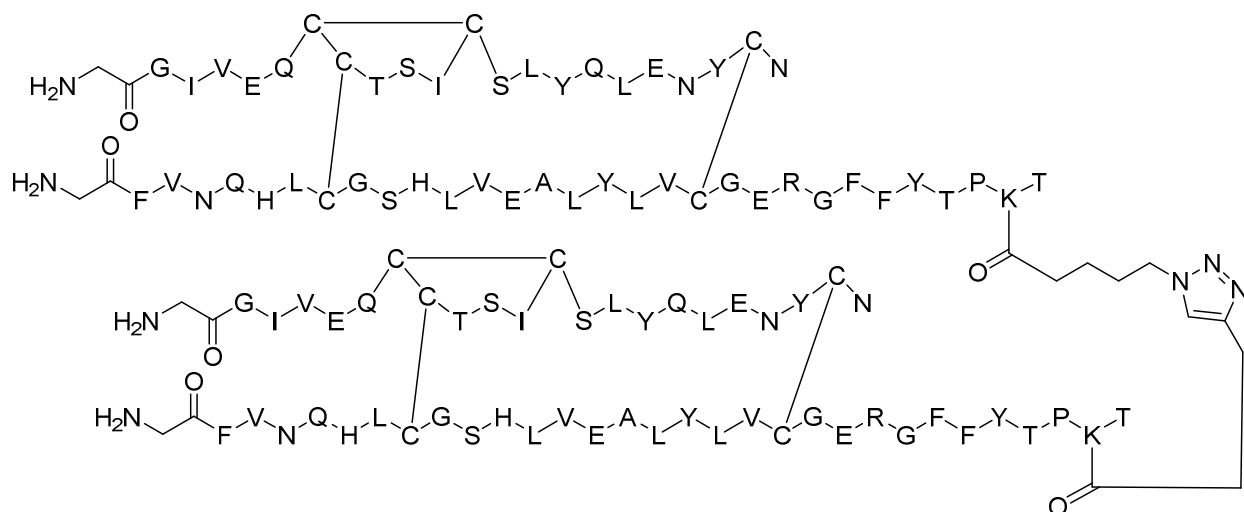
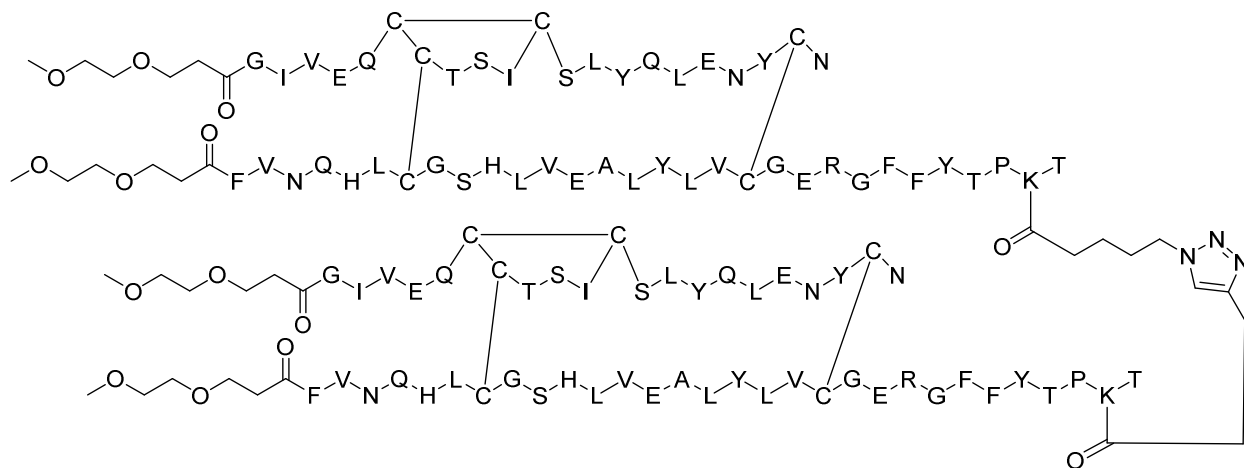
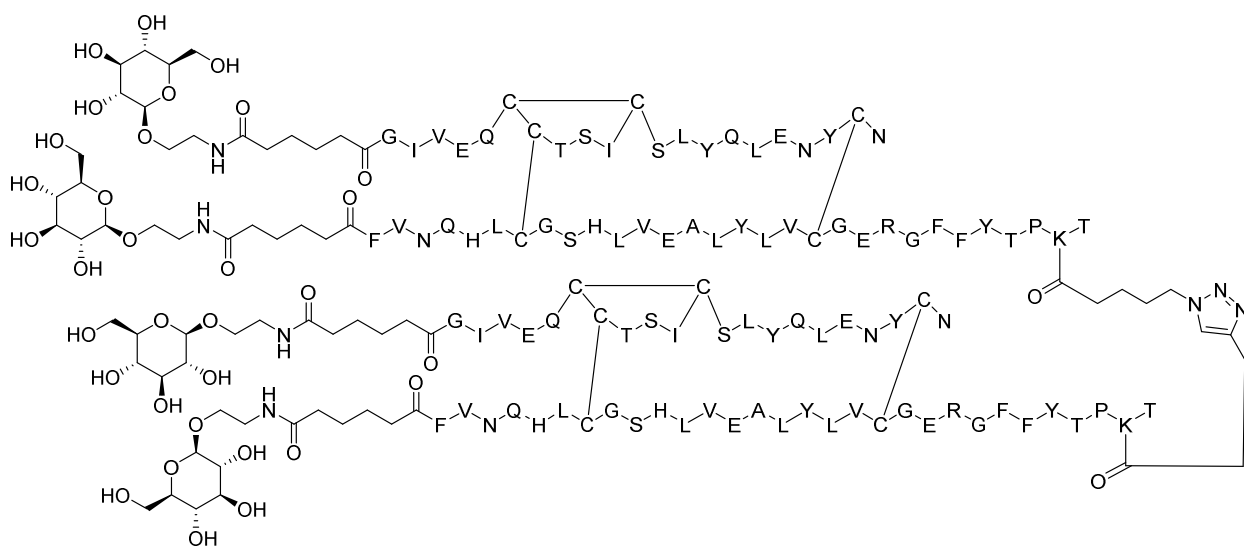
**Dímero 43;**

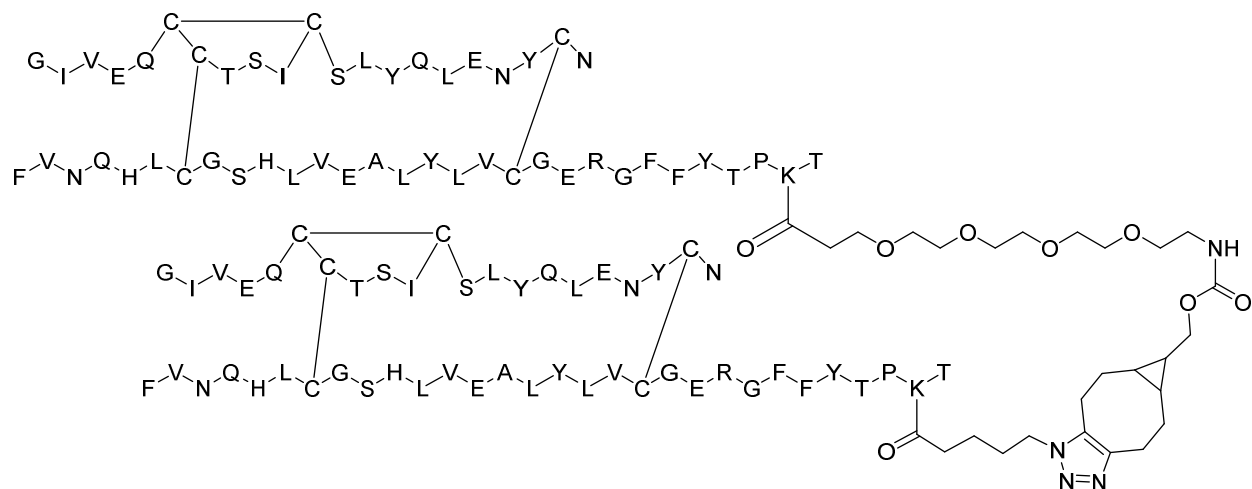
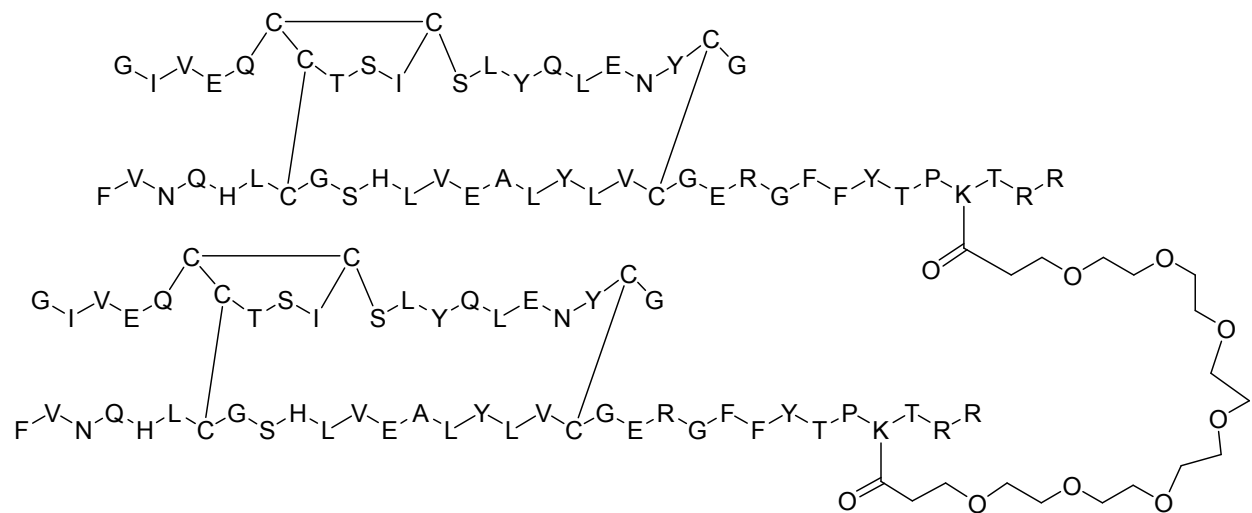
5

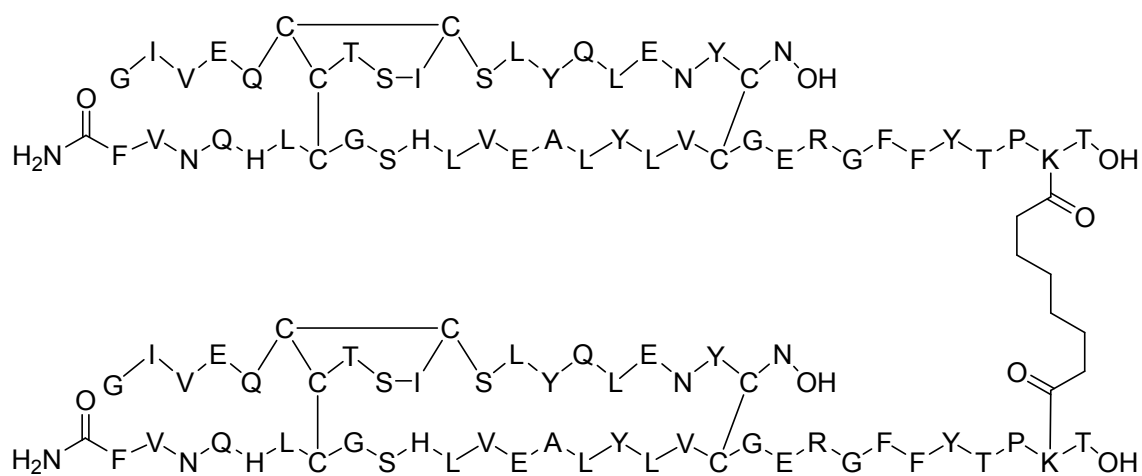
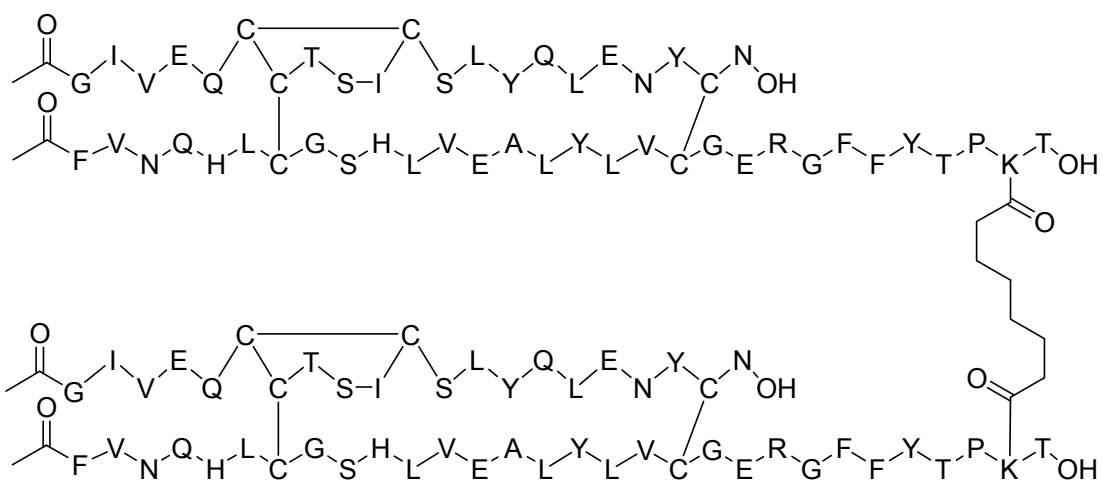
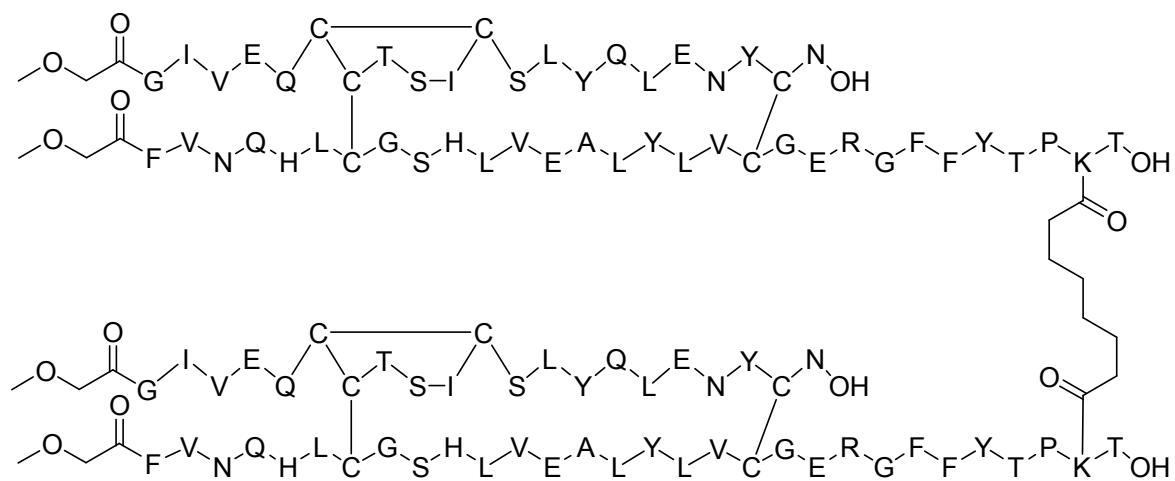
Dímero 44;

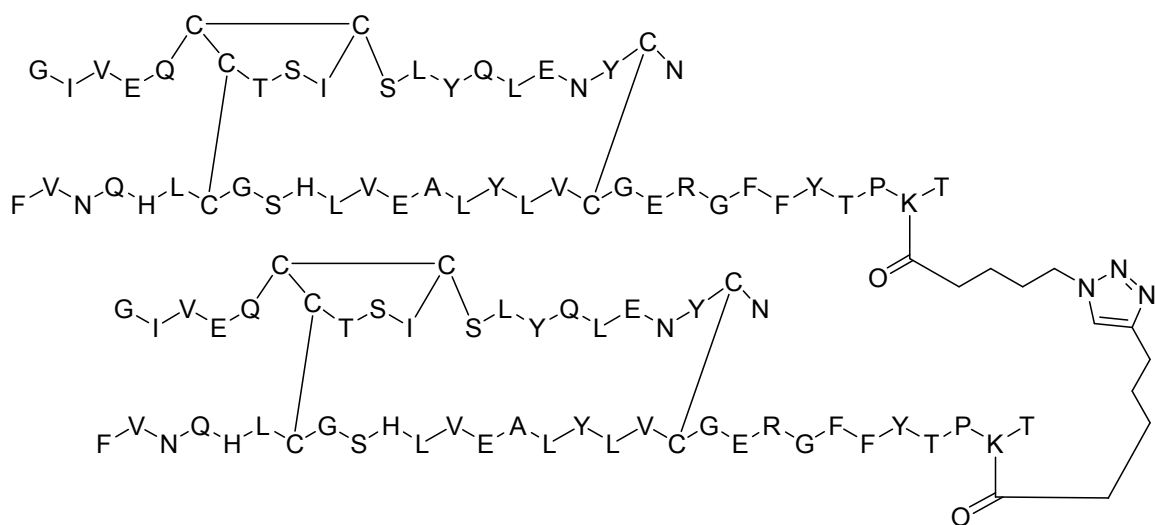
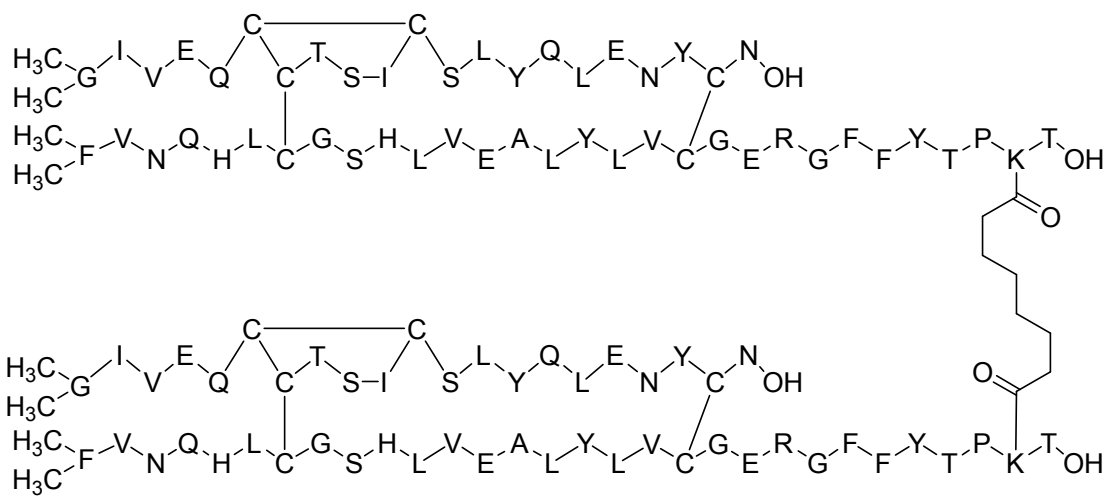
**Dímero 45;****5 Dímero 46;**

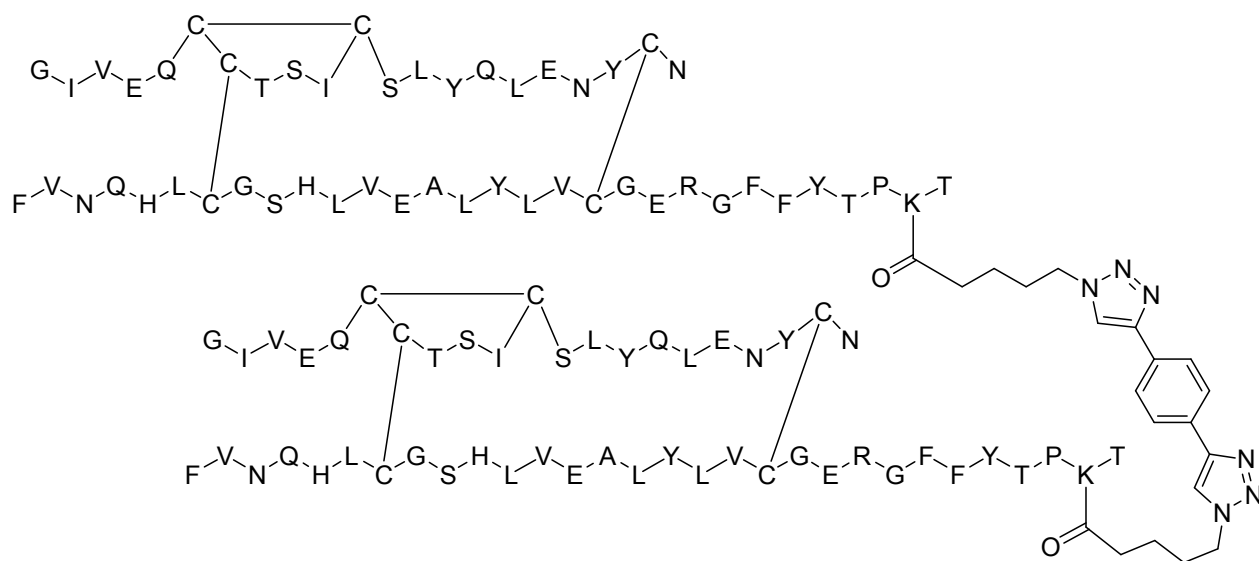
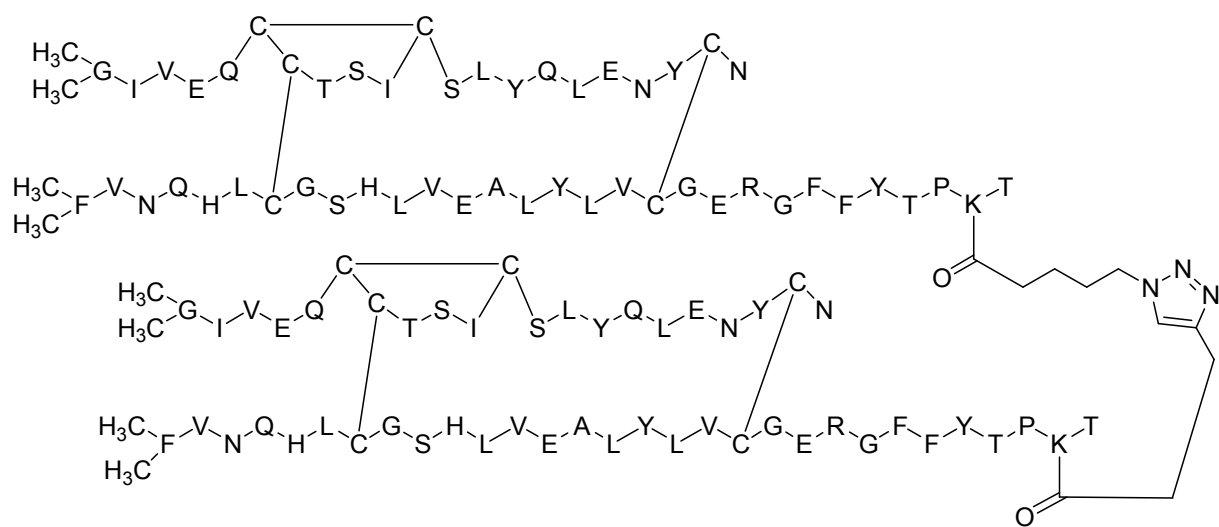
**Dímero 47;****Dímero 48;**

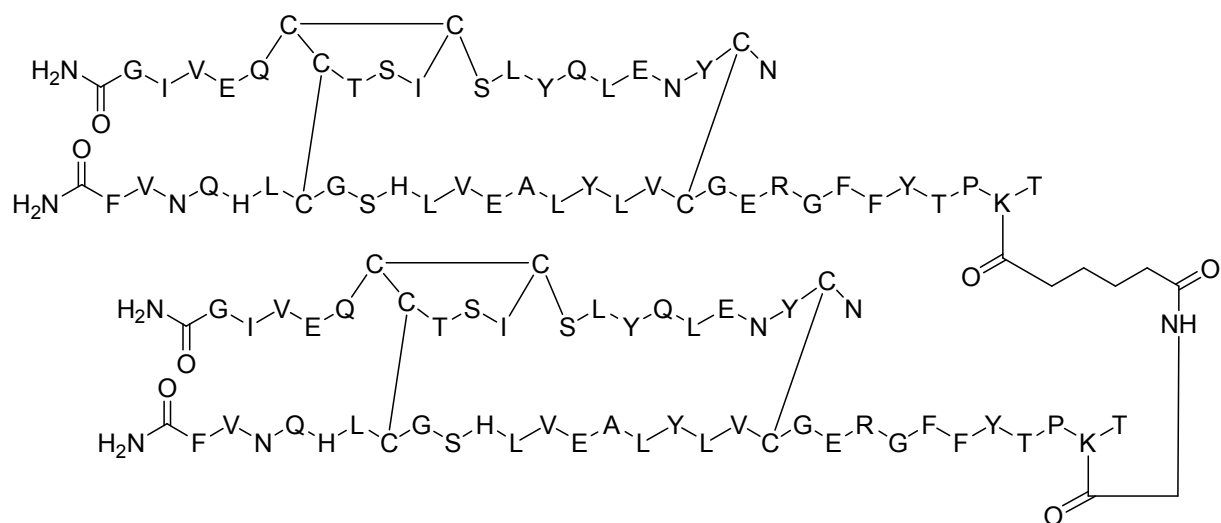
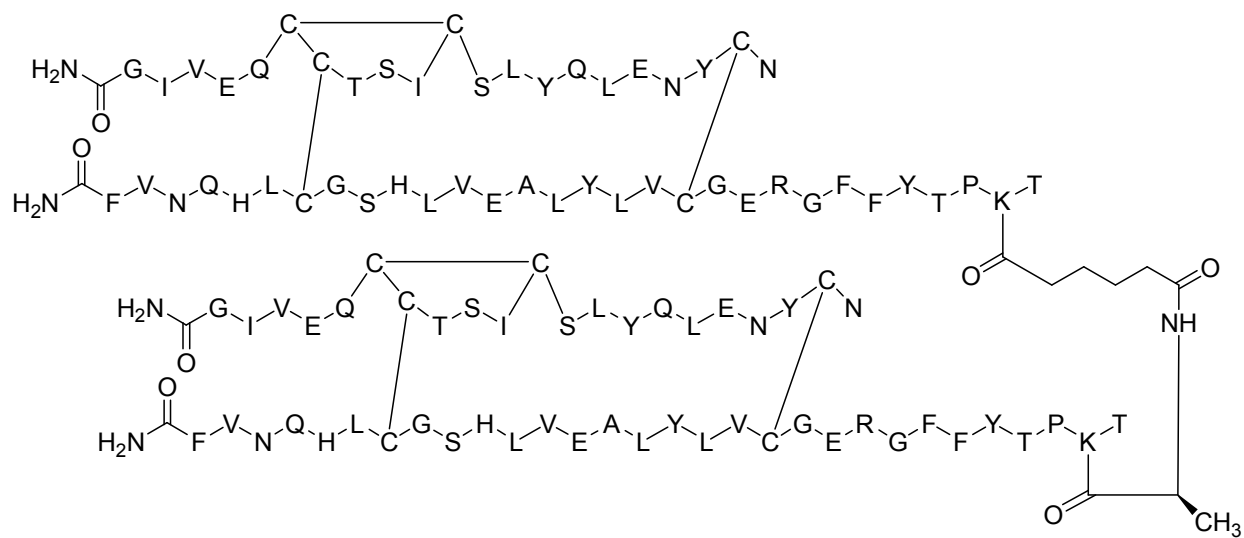
**Dímero 49;****5 Dímero 50;**

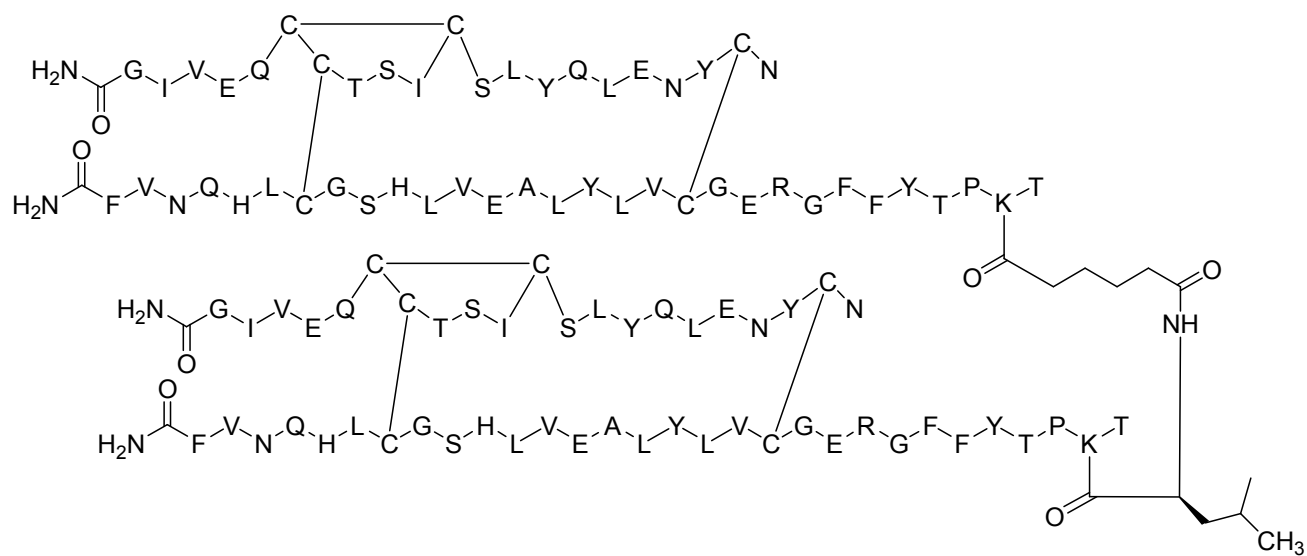
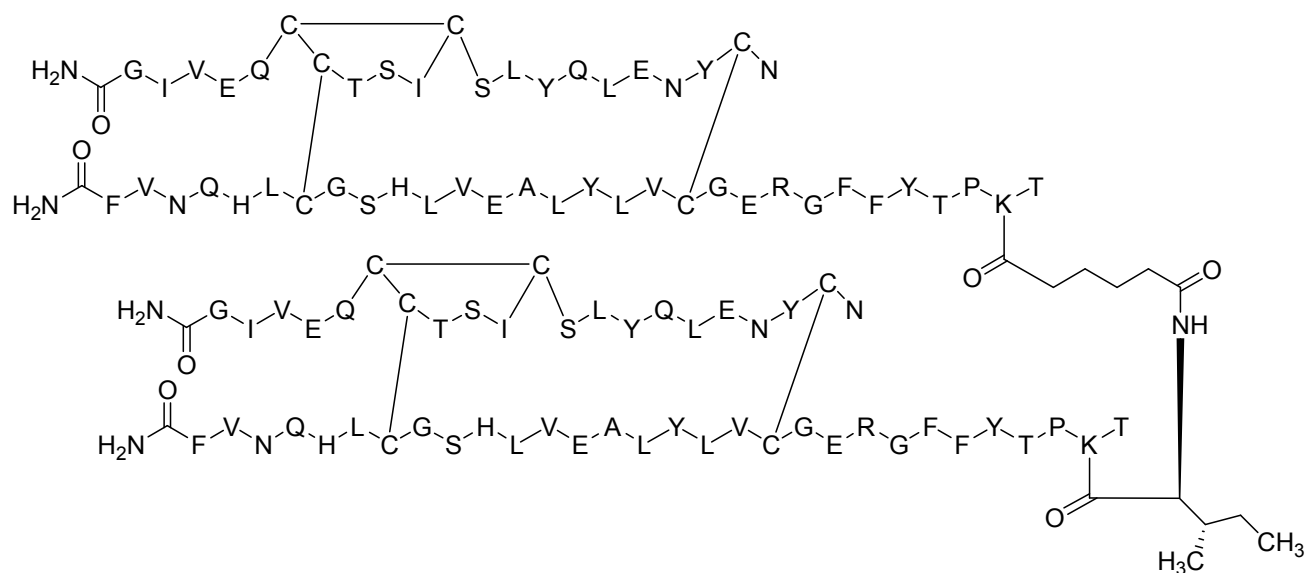
Dímero 51;5 **Dímero 52;****Dímero 53;**

**Dímero 54;****5 Dímero 55;****Dímero 56;**

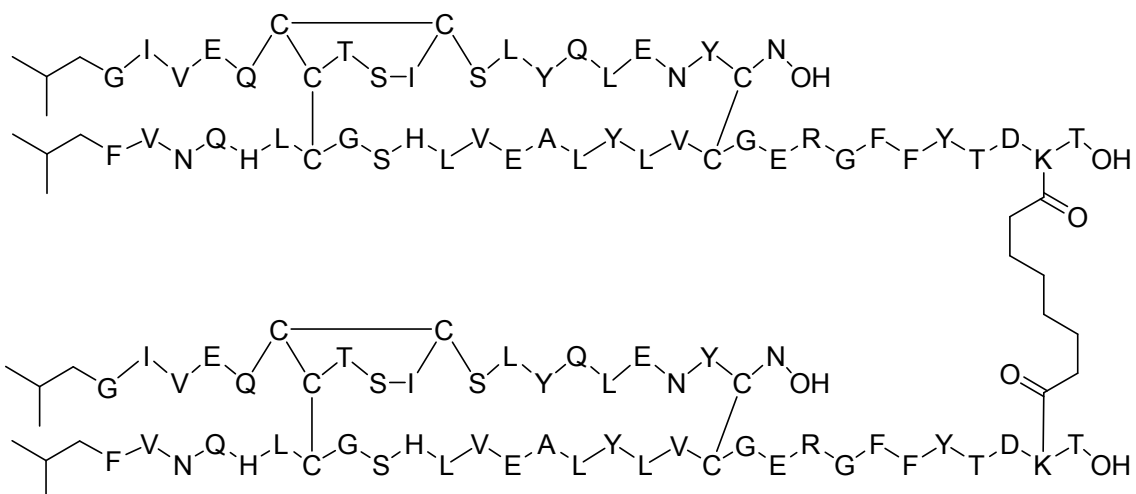
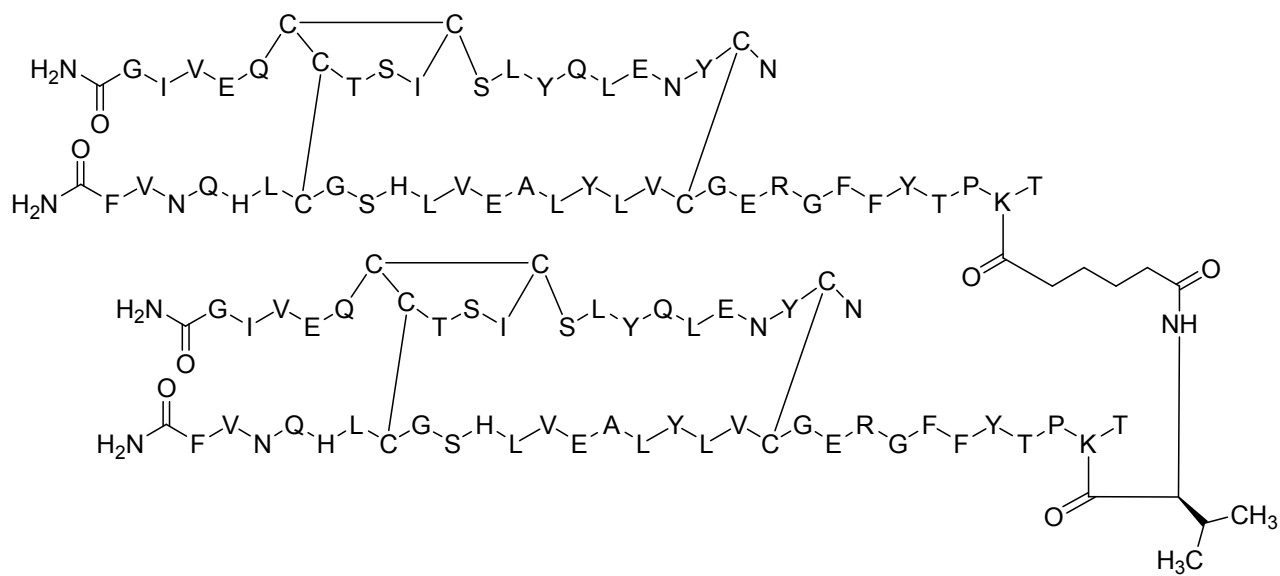
**Dímero 57;****5 Dímero 58;**

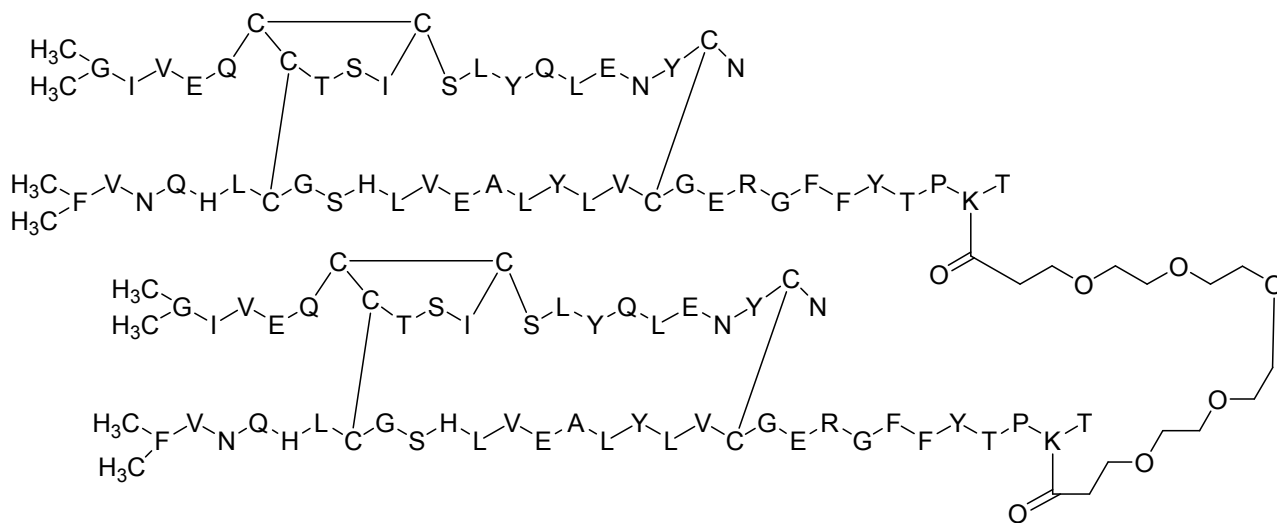
**Dímero 59;****5 Dímero 60;**

**Dímero 61;**5 **Dímero 62;**

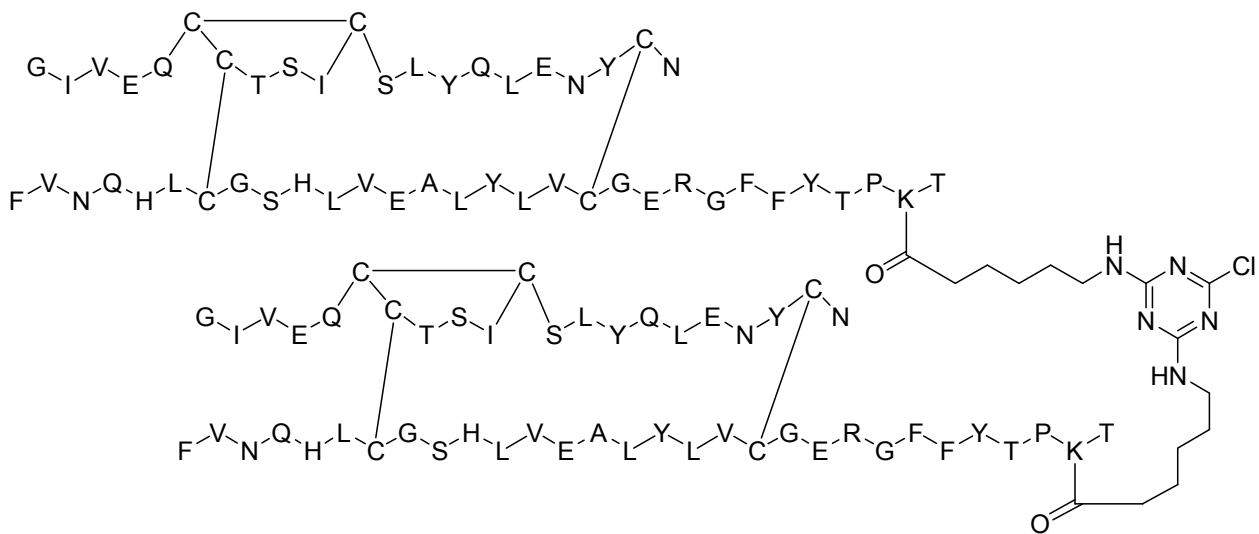


5

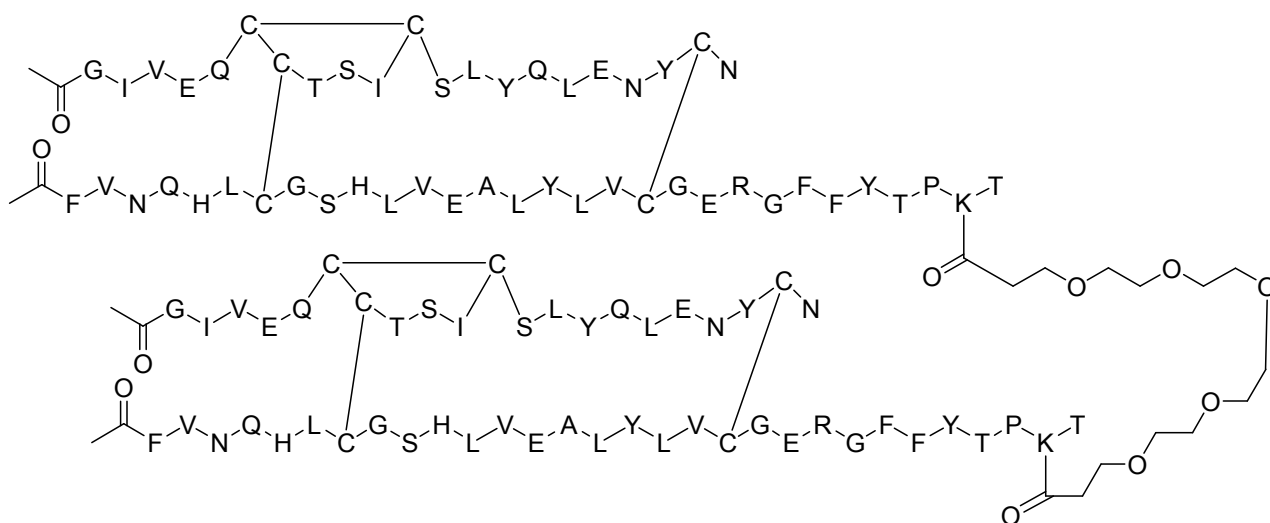
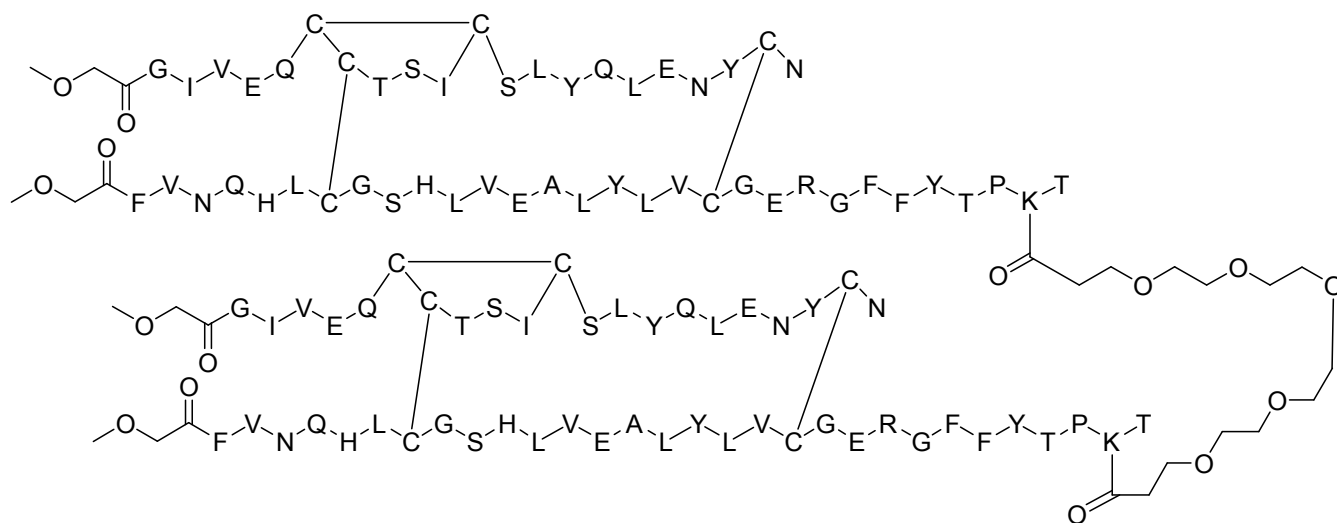
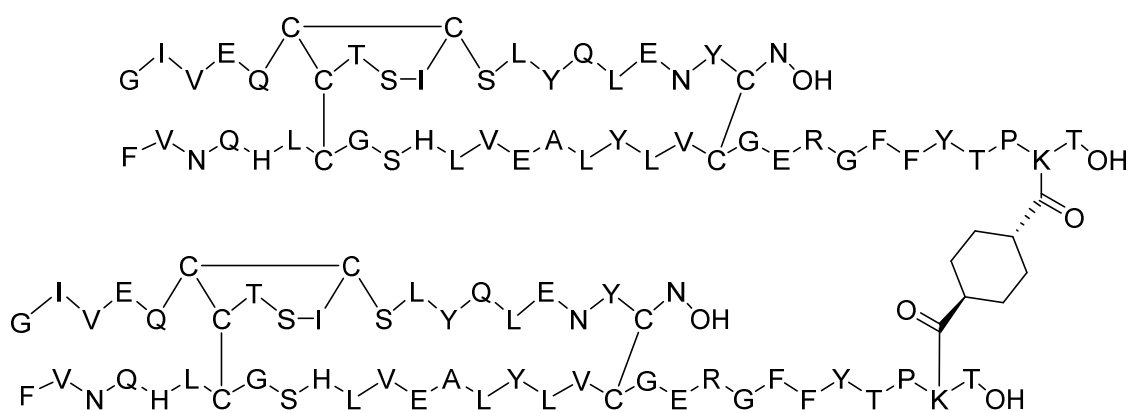
**Dímero 65;****5 Dímero 66;**

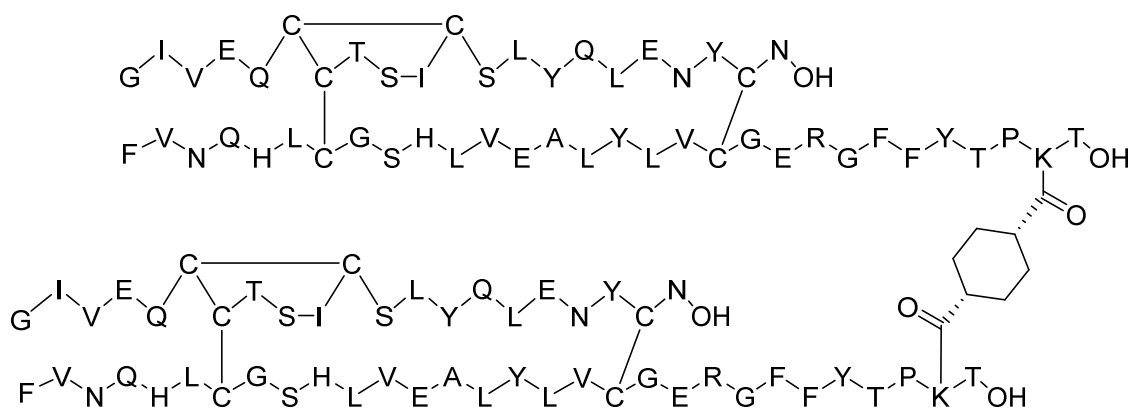
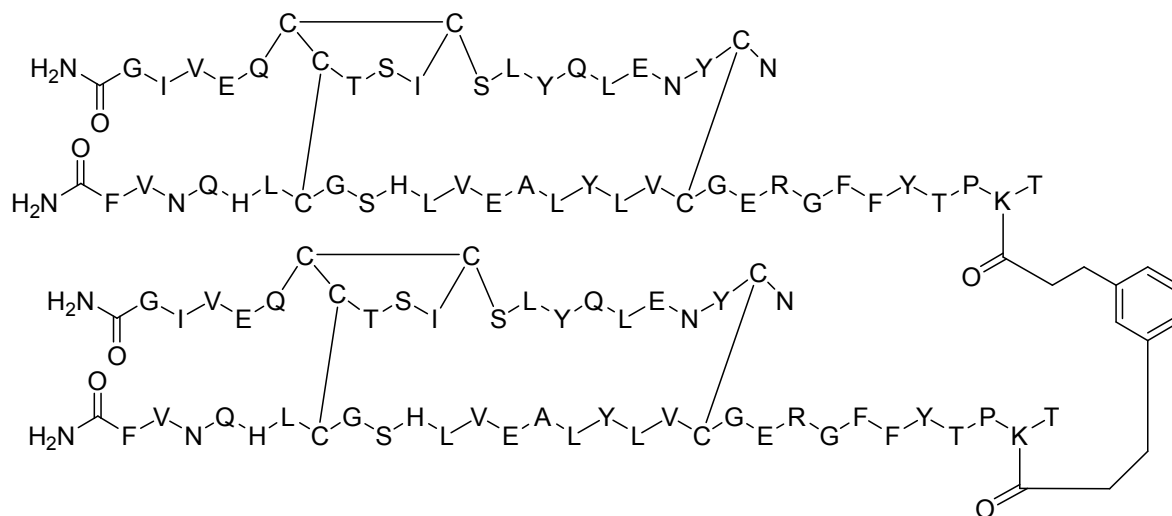
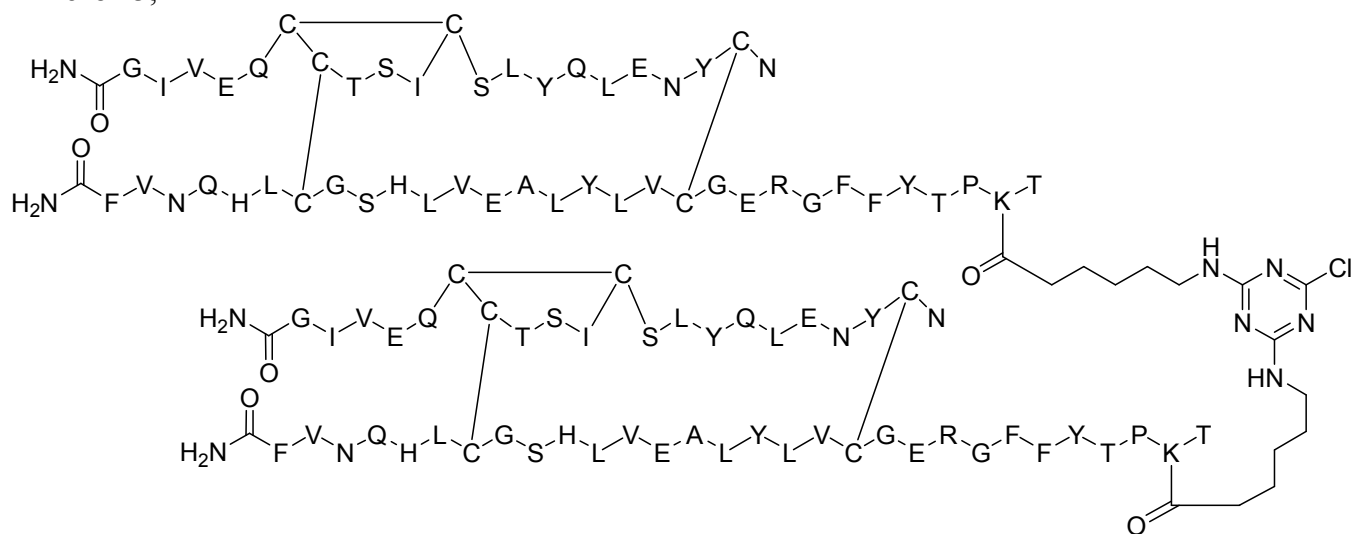


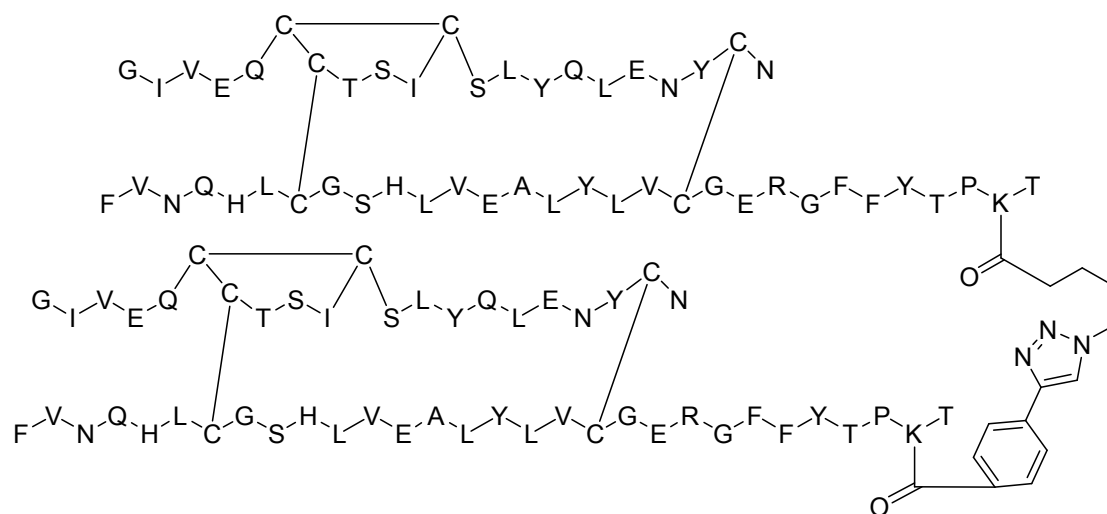
Dímero 67;



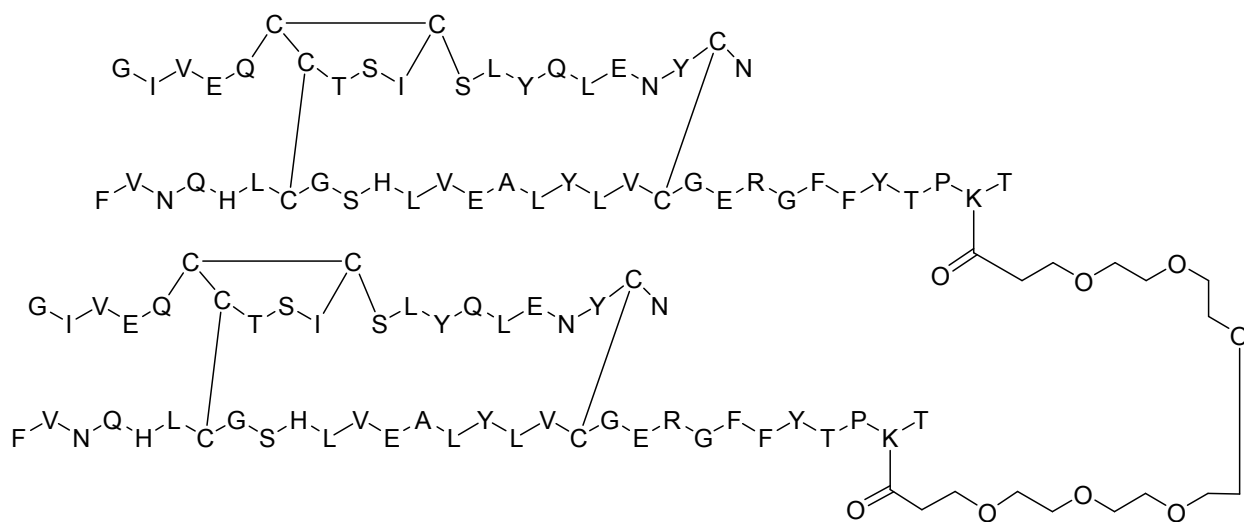
5 Dímero 68;

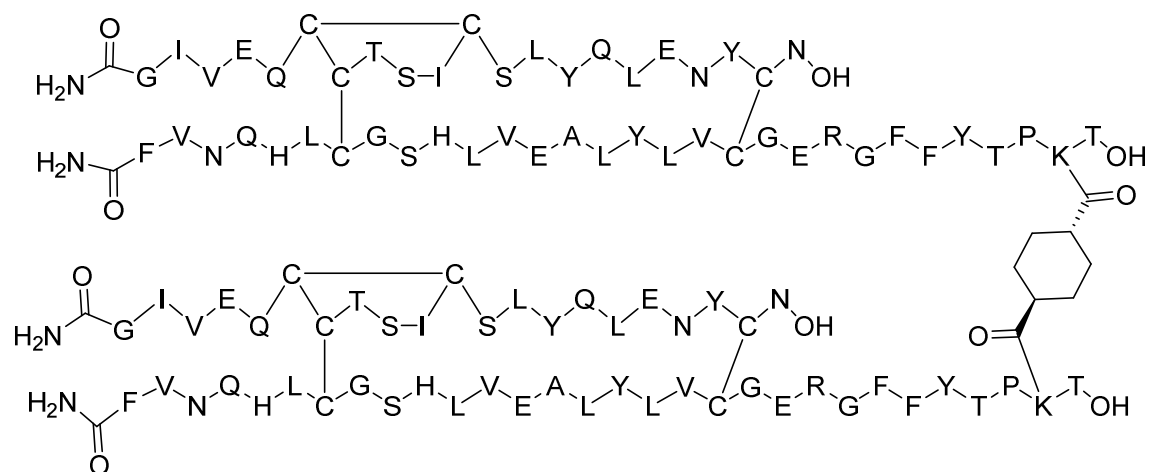
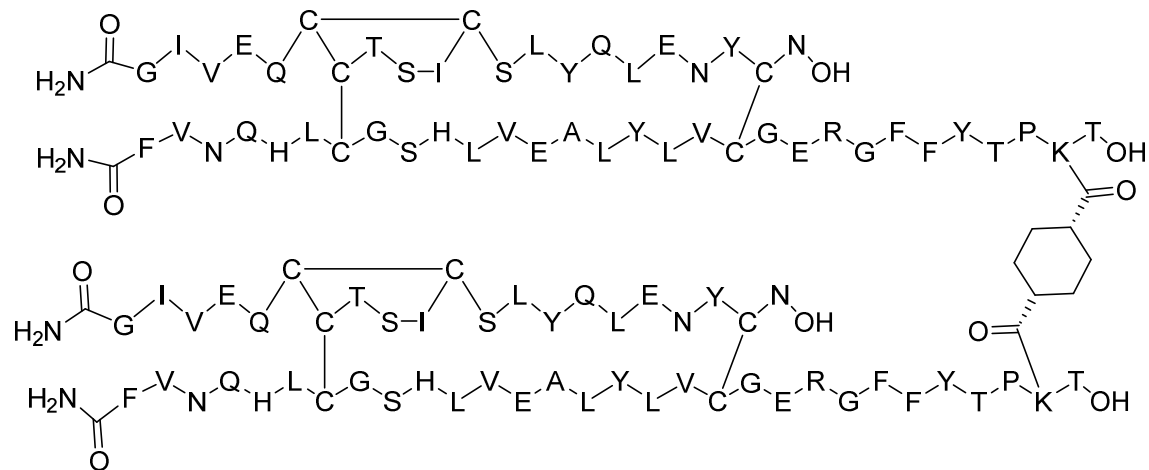
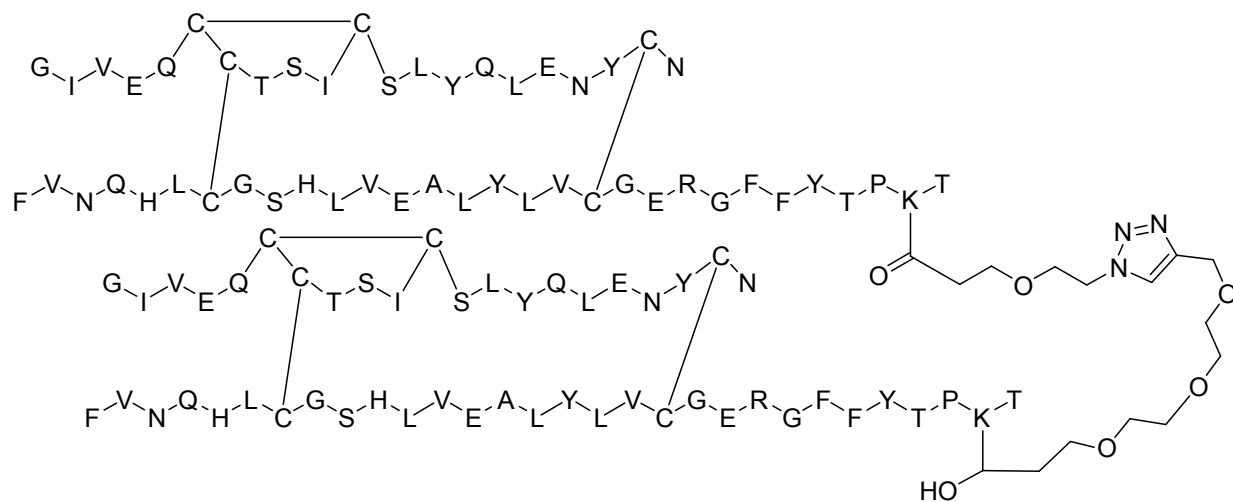
**Dímero 69;****5 Dímero 70;****Dímero 71;**

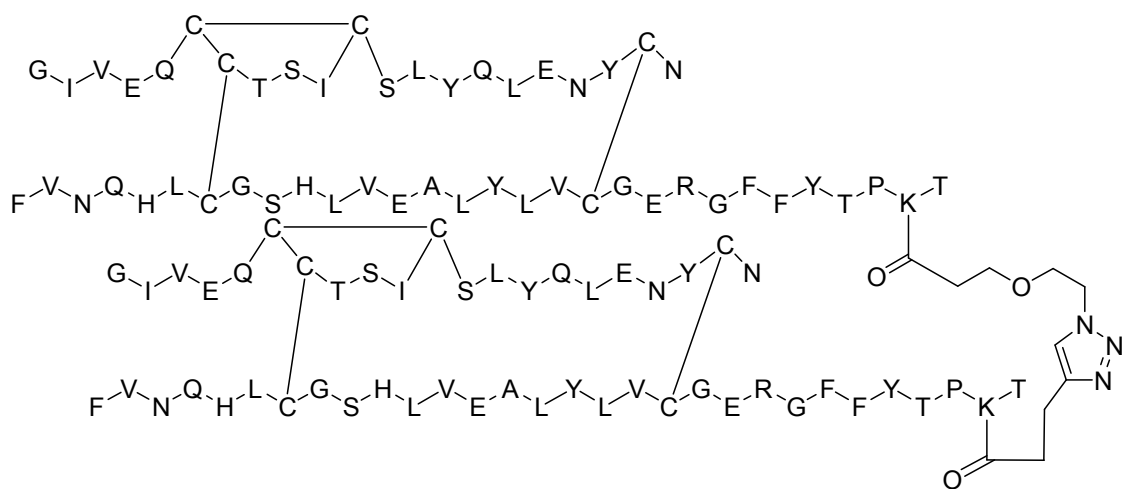
**Dímero 72;****5 Dímero 73;****Dímero 74;**

**Dímero 75;**

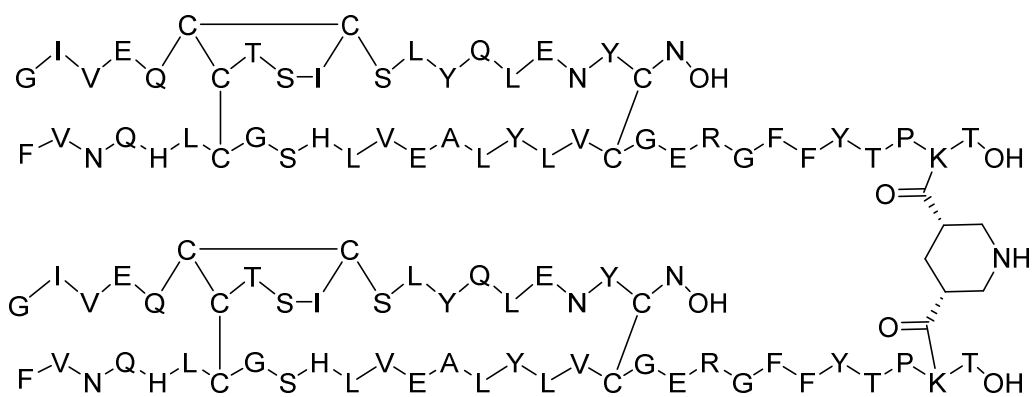
5

**Dímero 76;**

**Dímero 77;**5 **Dímero78;****Dímero 79;**

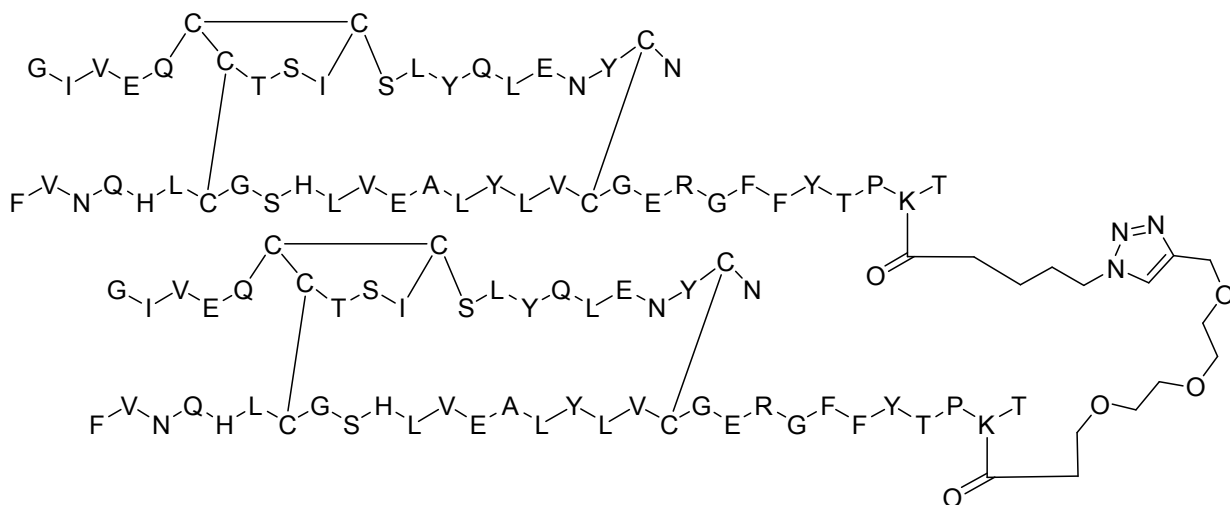
**Dímero 80;**

5

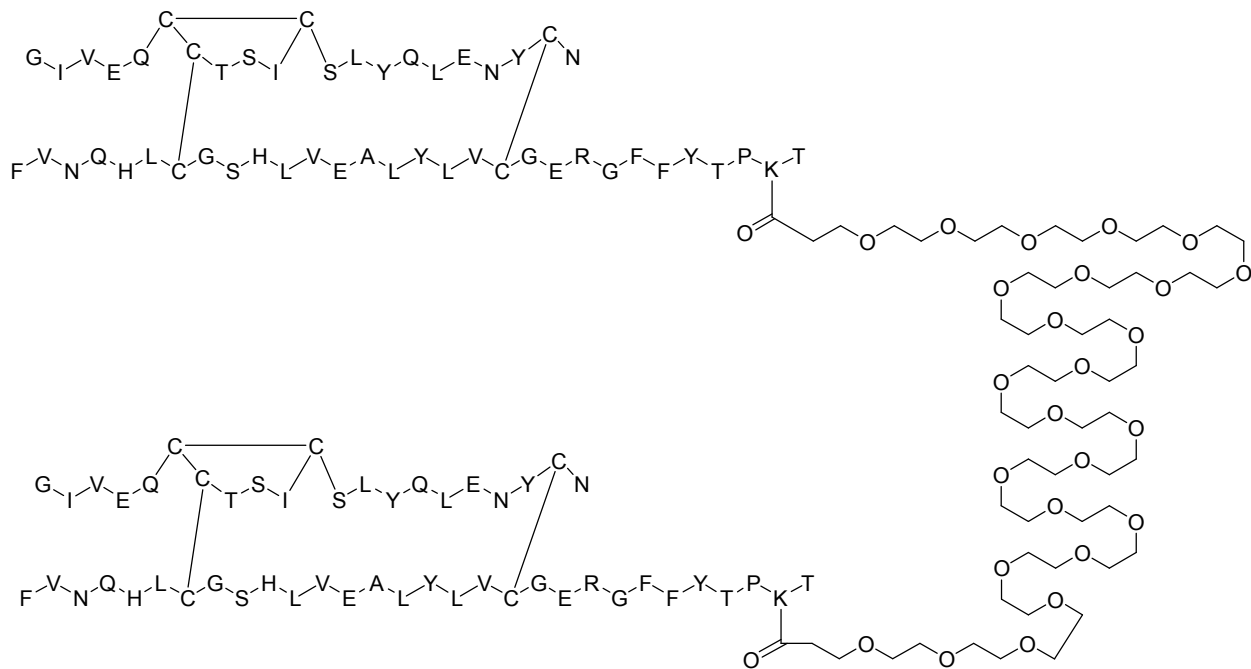
**Dímero 81;**

Chemical structure of a complex molecule, likely a peptide or protein derivative, showing a long chain of amino acids and a side chain with a carboxylic acid group.

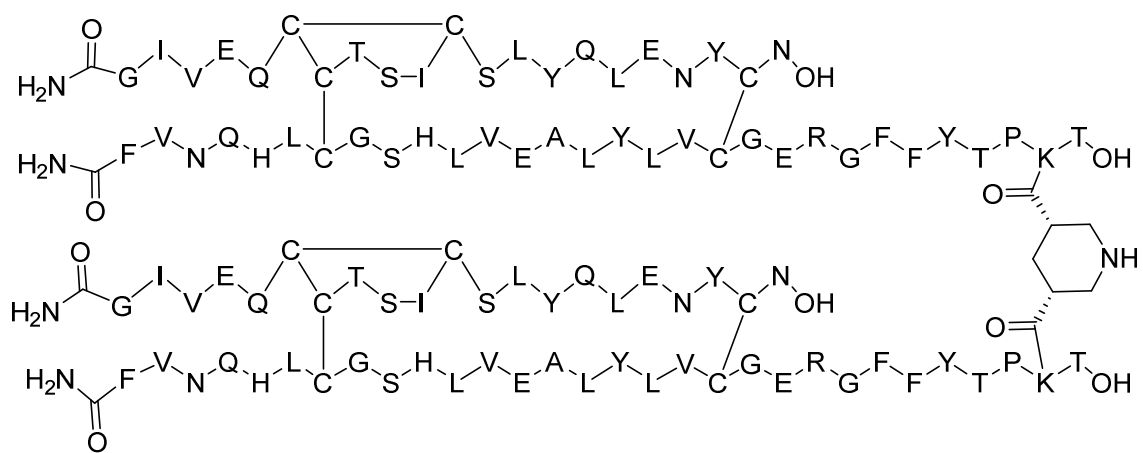
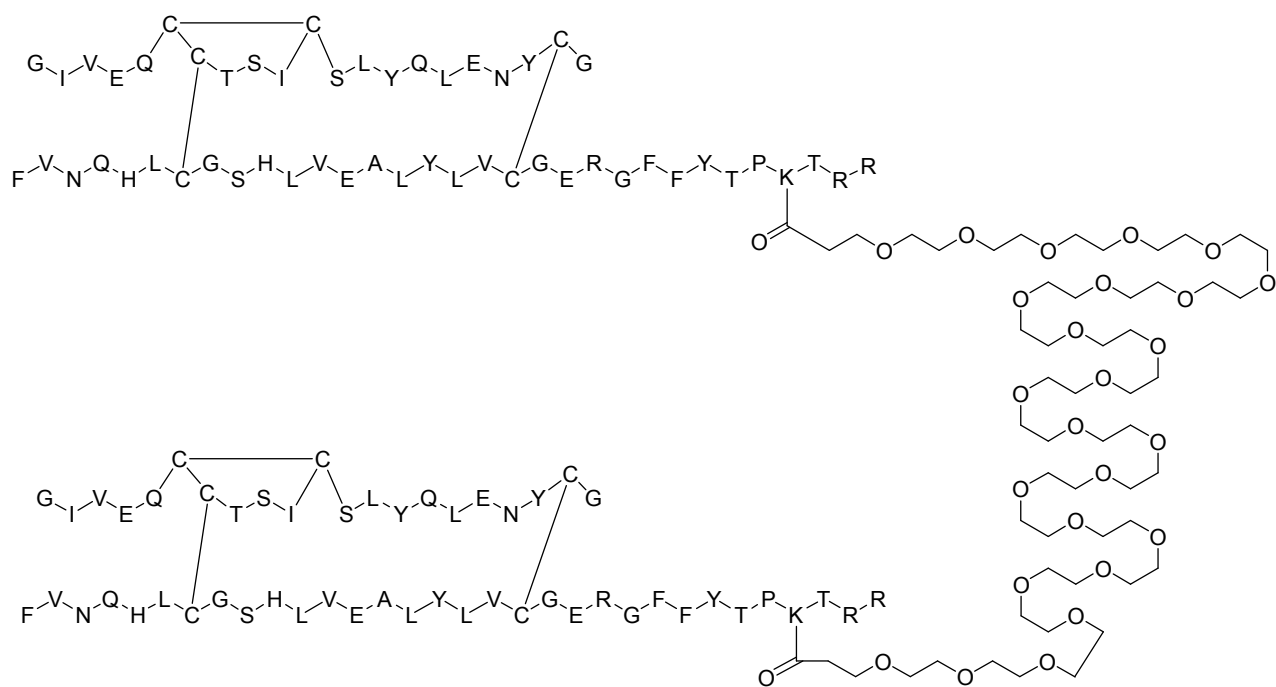
5

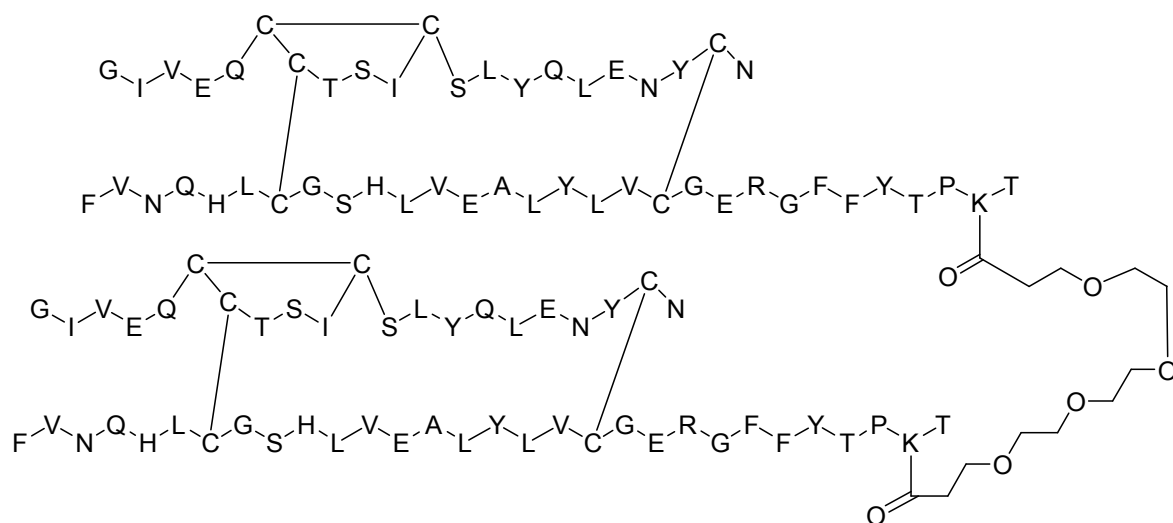


Dímero 84;

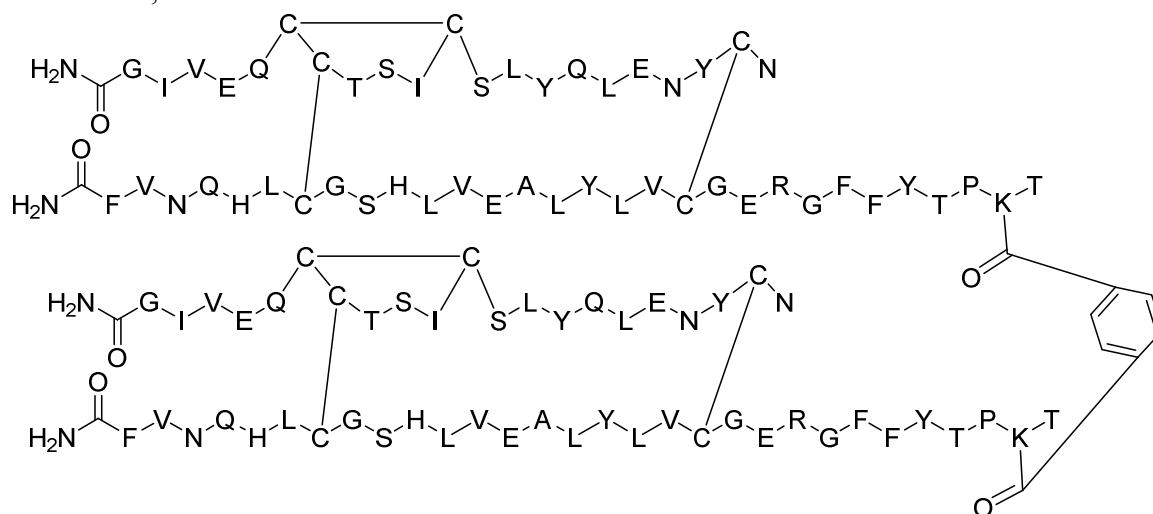


5 Dímero 85;

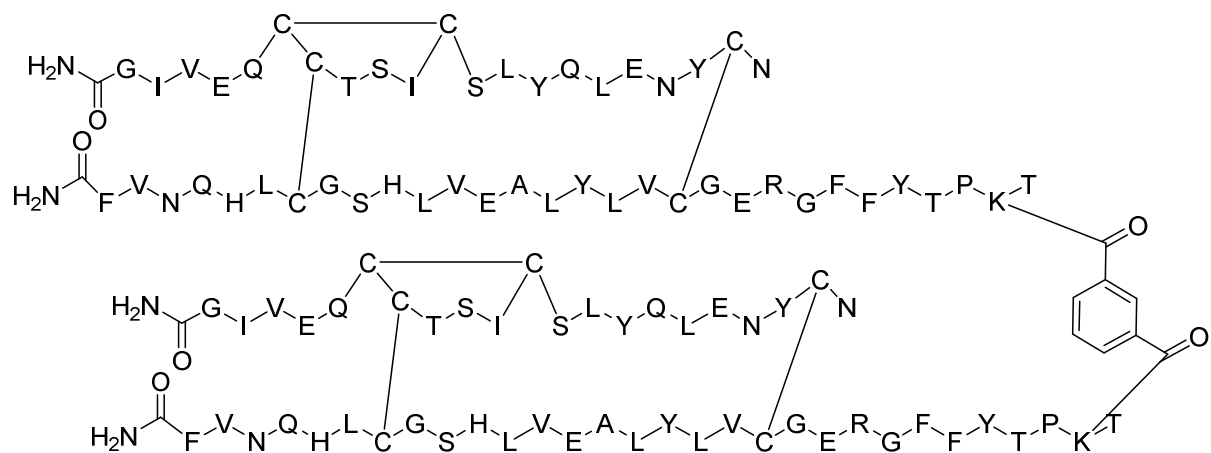
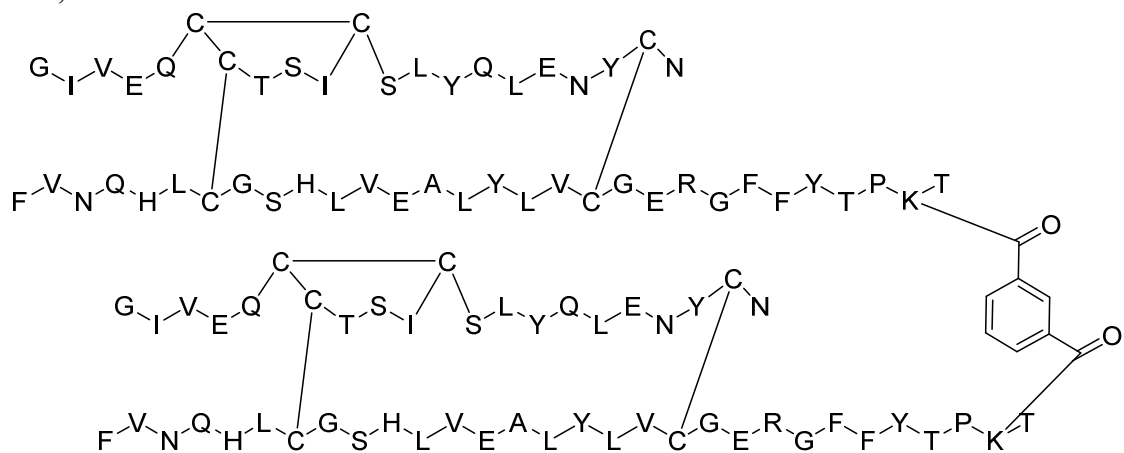
**Dímero 86;****5 Dímero 87;**

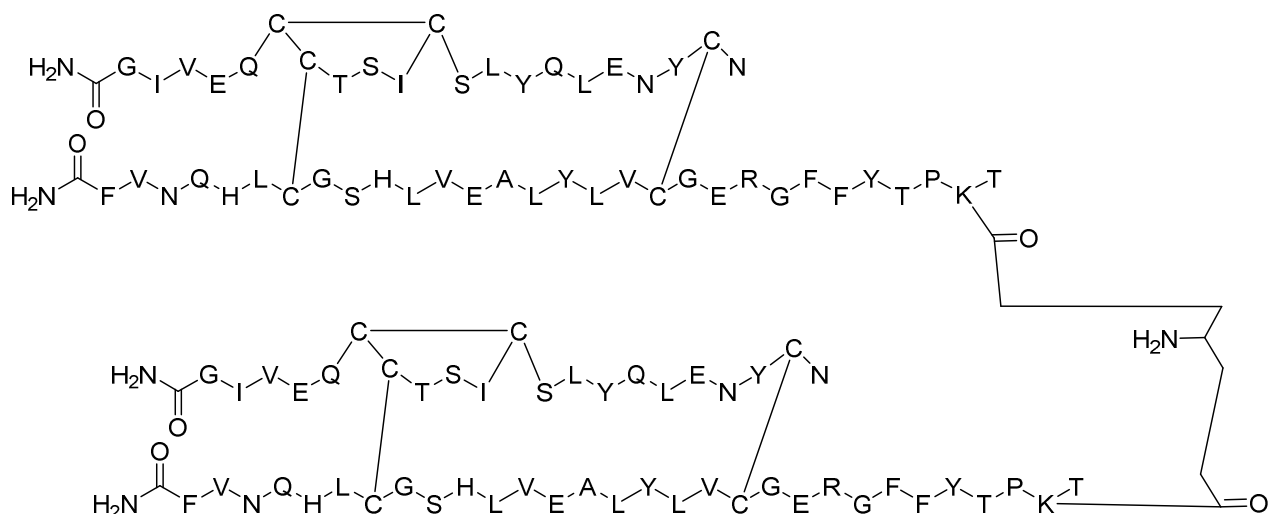
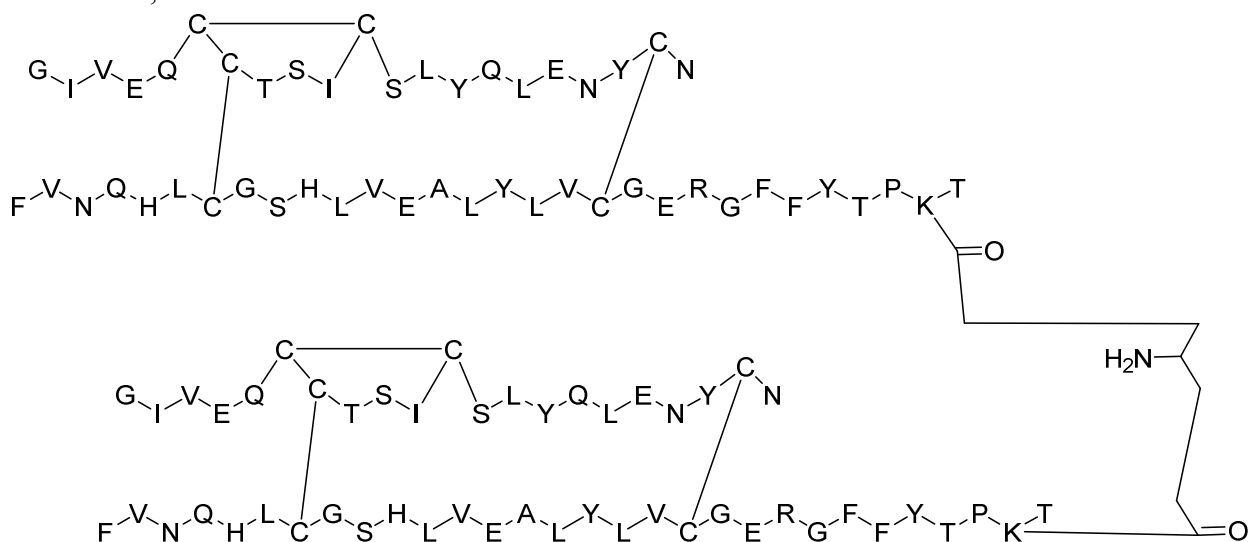


Dímero 88;



Dímero 89;

**Dímero 90;****Dímero 91;**

**Dímero 93;** o**Dímero 94**

- 5 en el que los enlaces disulfuro entre los residuos Cys₆ y Cys₁₁ del polipéptido de cadena A y los enlaces disulfuro entre la Cys₇ y Cys₂₀ de la cadena A con la Cys₇ y Cys₁₉ del polipéptido de cadena B, respectivamente, están representados por la línea sólida entre los mismos; los restos de unión están unidos covalentemente al aminoácido épsilon del residuo de lisina mostrado; el polipéptido de cadena A para los **Dímeros 1-40, 42-52, 54-86 y 88-94** tiene la
- 10 secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 1; el polipéptido de cadena A para el Dímero 41 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada para la SEC ID N.º: 11; el polipéptido de cadena B para los **Dímeros 1-17, 21-27, 36, 37, 39-40 y 42-52, 54-82, 84-86, y 88-94** tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 2; el polipéptido de cadena B para los **Dímeros 18 y 32-35** tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 6; el

polipéptido de cadena B para el **Dímero 19 y 83** tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 9; y el polipéptido de cadena B para los **Dímeros 20, 28-31 y 38** tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 10; y el polipéptido de cadena A y el polipéptido de cadena B para los **Dímeros 53 y 87** son SEC ID N.º: 7 y SEC ID N.º: 8, respectivamente.

75. Una composición que comprende uno o más compuestos de la reivindicación 74 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

76. Un procedimiento para tratar la diabetes que comprende administrar a un individuo con diabetes una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende el agonista parcial del receptor de insulina de la reivindicación 75.

77. El procedimiento de la reivindicación 76, en el que la diabetes es diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, o diabetes gestacional.

78. Una composición para el tratamiento de la diabetes que comprende el compuesto de la reivindicación 74.

79. La composición de la reivindicación 78, en la que la diabetes es diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, o diabetes gestacional.

80. Uso de un compuesto de la reivindicación 74 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes.

81. El uso de la reivindicación 80, en el que la diabetes es diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, o diabetes gestacional.

82. Un dímero de insulina que comprende:
una primera Lys B28 o B29 de una molécula de primer heterodímero de insulina que tiene un primer polipéptido de cadena A y primer polipéptido de cadena B y una segunda

Lys B28 o B29 de un segundo heterodímero de insulina que tiene un segundo polipéptido de cadena A y segundo polipéptido de cadena B conjugadas conjuntamente por un enlazador bifuncional seleccionado del grupo que consiste en **Enlazador 1, Enlazador 2, Enlazador 3, Enlazador 10, Enlazador 11, Enlazador 12, Enlazador 13, Enlazador 14, Enlazador 15, Enlazador 16, Enlazador 17, Enlazador 18, Enlazador 19, Enlazador 20, Enlazador 21, Enlazador 22, Enlazador 23, Enlazador 24, Enlazador 25, Enlazador 26, Enlazador 27, Enlazador 28, Enlazador 29, Enlazador 30, Enlazador 31, Enlazador 32, Enlazador 33, Enlazador 34, Enlazador 35, Enlazador 36, Enlazador 37, Enlazador 38, Enlazador 39, Enlazador 40, Enlazador 41, Enlazador 42, Enlazador 43, Enlazador 44, Enlazador 45, Enlazador 46, Enlazador 47, Enlazador 48, Enlazador 49, y Enlazador 50** con la condición de que cuando el enlazador bifuncional sea **Enlazador 10, Enlazador 11, Enlazador 12, Enlazador 13, o Enlazador 14**, al menos uno de los primer o segundo polipéptidos de cadena A o de cadena B esté conjugado en su aminoácido *N*-terminal con un sustituyente o al menos los aminoácidos *N*-terminales de la molécula de primer heterodímero de insulina estén conjugados con un sustituyente o los aminoácidos *N*-terminales de tanto el primer heterodímero de insulina como el segundo heterodímero de insulina estén conjugados con un sustituyente.

83. El dímero de insulina de la reivindicación 82, en el que el sustituyente comprende un éster de *N*-hidroxisuccinimida unido a un grupo que tiene la fórmula general $RC(O)-$, donde R puede ser $R'CH_2$, $R'NH$, $R'O$, y R' puede ser H, cadena alquilo lineal, aminoácido, péptido, poli(etilenglicol) (PEG), sacáridos.

84. El dímero de insulina de la reivindicación 82, en el que el sustituyente es un grupo carbamoilo, grupo acetilo, glicina, grupo metilo, grupo metoxi, grupo dimetilo, grupo isobutilo, grupo PEG1, grupo AEG, grupo alquilo C6-AEG o grupo PEG2.

85. Un dímero de insulina que comprende:
una primera Lys B28 o B29 de una molécula de primer heterodímero de insulina que tiene un primer polipéptido de cadena A y primer polipéptido de cadena B está conjugada con un primer enlazador seleccionado del grupo que consiste en **Enlazador 5 y Enlazador 7** y una segunda Lys B28 o B29 de un segundo heterodímero de insulina que tiene un segundo

polipéptido de cadena A y segundo polipéptido de cadena B conjugada con un segundo enlazador seleccionado del grupo que consiste en **Enlazador 4**, **Enlazador 6**, **Enlazador 8**, y **Enlazador 9** conjugados conjuntamente a través del primer enlazador y el segundo enlazador.

5 86. El dímero de insulina de la reivindicación 82, en el que el sustituyente comprende un éster de *N*-hidroxisuccinimida unido a un grupo que tiene la fórmula general $RC(O)-$, donde R puede ser $R'CH_2$, $R'NH$, $R'O$, y R' puede ser H, cadena alquilo lineal, aminoácido, péptido, poli(etilenglicol) (PEG), sacáridos.

10 87. El dímero de insulina de la reivindicación 82, en el que el sustituyente es un grupo carbamoilo, grupo acetilo, glicina, grupo metilo, grupo metoxi, grupo dimetilo, grupo isobutilo, grupo PEG1, grupo AEG, grupo alquilo C6-AEG o grupo PEG2.

15 88. Un dímero de análogo de insulina, que comprende:
una primera Lys B28 o B29 de una molécula de primer heterodímero de insulina que tiene un primer polipéptido de cadena A y primer polipéptido de cadena B conjugada con un primer enlazador seleccionado del grupo que consiste en **Enlazador 5** y **Enlazador 7** y una segunda Lys B28 o B29 de un segundo heterodímero de insulina que tiene un segundo polipéptido de cadena A y segundo polipéptido de cadena B conjugada con un segundo
20 enlazador seleccionado del grupo que consiste en **Enlazador 5** y **Enlazador 7**, en el que los primer y segundo enlazadores están conjugados conjuntamente a través de un enlazador en puente que tiene una estructura



25 en el que R es un enlace covalente, un átomo de carbono, un fenilo, un heteroátomo, o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado del grupo que consiste en acilo, alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo, y heterociclilo. En aspectos particulares R es un grupo acilo C2, C3, C4, C6, C7, C8, C9 o C10 o un PEG2, PEG3, PEG4, PEG5, PEG6, PEG7, PEG8, PEG9, PEG10, PEG11, PEG12, PEG13, o PEG25.

30 89. El dímero de insulina de la reivindicación 82, en el que el sustituyente comprende un éster de *N*-hidroxisuccinimida unido a un grupo que tiene la fórmula general

RC(O)-, donde R puede ser R'CH₂, R'NH, R'O, y R' puede ser H, cadena alquilo lineal, aminoácido, péptido, poli(etilenglicol) (PEG), sacáridos.

90. El dímero de insulina de la reivindicación 82, en el que el sustituyente es un grupo carbamoilo, grupo acetilo, glicina, grupo metilo, grupo metoxi, grupo dimetilo, grupo isobutilo, grupo PEG1, grupo AEG, grupo alquilo C6-AEG o grupo PEG2.

91. Un dímero de análogo de insulina, que comprende:
una primera Lys B28 o B29 de una molécula de primer heterodímero de insulina que tiene un primer polipéptido de cadena A y primer polipéptido de cadena B conjugada con un primer enlazador seleccionado del grupo que consiste en **Enlazador 4**, **Enlazador 6**, **Enlazador 8**, y **Enlazador 9** y una segunda Lys B28 o B29 de un segundo heterodímero de insulina que tiene un segundo polipéptido de cadena A y segundo polipéptido de cadena B conjugada con un segundo enlazador seleccionado del grupo que consiste en **Enlazador 4**, **Enlazador 6**, **Enlazador 8**, y **Enlazador 9**, en el que los primer y segundo enlazadores están conjugados conjuntamente a través de un enlazador en puente que tiene una estructura



en el que R es un enlace covalente, un átomo de carbono, un fenilo, un heteroátomo, o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado del grupo que consiste en acilo, alifático, heteroalifático, arilo, heteroarilo, y heterociclilo. En aspectos particulares R es un grupo acilo C2, C3, C4, C6, C7, C8, C9 o C10 o un PEG2, PEG3, PEG4, PEG5, PEG6, PEG7, PEG8, PEG9, PEG10, PEG11, PEG12, PEG13, o PEG25.

92. El dímero de insulina de la reivindicación 82, en el que el sustituyente comprende un éster de *N*-hidroxisuccinimida unido a un grupo que tiene la fórmula general RC(O)-, donde R puede ser R'CH₂, R'NH, R'O, y R' puede ser H, cadena alquilo lineal, aminoácido, péptido, poli(etilenglicol) (PEG), sacáridos.

93. El dímero de insulina de la reivindicación 82, en el que el sustituyente es un grupo carbamoilo, grupo acetilo, glicina, grupo metilo, grupo metoxi, grupo dimetilo, grupo isobutilo, grupo PEG1, grupo AEG, grupo alquilo C6-AEG o grupo PEG2.

RESUMEN DE LA DIVULGACIÓN

Se divulgan dímeros de insulina y dímeros de análogo de insulina que actúan como agonistas parciales en el receptor de insulina.