

ANÁLOGOS DE INSULINA ACILADOS NOVEDOSOS Y USOS DE ESTOS

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a análogos de insulina novedosos y derivados de estos, tales como análogos de insulina acilados, y su uso farmacéutico, en particular en el tratamiento o prevención de afecciones médicas relacionadas con la diabetes, la obesidad y enfermedades cardiovasculares.

INCORPORACIÓN COMO REFERENCIA DEL LISTADO DE SECUENCIAS

El listado de secuencias, titulado "LISTADO DE SECUENCIAS", es de 8.00 KB, se creó el 13 de julio de 2018 y se incorpora en la presente descripción como referencia.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico, en el que se pierde parcial o completamente la capacidad de usar la glucosa. Más del 5 % de la población mundial vive con diabetes, con millones más en riesgo de desarrollar la enfermedad.

Con las terapias actuales, aún aproximadamente el 50 % de las personas con diabetes mueren de enfermedades cardiovasculares y porque las personas con diabetes también tienen riesgo de desarrollar complicaciones microvasculares (como nefropatía, retinopatía y neuropatía), existe una necesidad continua de desarrollar nuevos fármacos para mejorar el tratamiento. Especialmente en el caso de la diabetes mellitus Tipo 2, dado que estos pacientes, además de la hiperglicemia, sufren frecuentemente de diversas disfunciones metabólicas, tales como por ejemplo dislipidemia, obesidad y complicaciones cardiovasculares para las cuales la terapia con insulina actual solo tiene un efecto beneficioso limitado.

En el hígado, la insulina inhibe la gluconeogénesis y glicogenólisis, y aumenta la síntesis de glucógeno, lo que produce una disminución de la producción de glucosa del hígado. Estos procesos se afectan notablemente por la resistencia a la insulina de los hepatocitos, y esta es la causa principal de hiperglicemia en ayunas en el síndrome metabólico. Además de los efectos sobre el metabolismo de la glucosa, la insulina también aumenta la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos en el hígado a través de la activación del factor de transcripción SREBP-1c, que a su vez aumenta la transcripción génica para enzimas lipogénicas, que incluyen acetil-coenzima A carboxilasa y ácidos grasos sintasa (FAS). Sin embargo, a diferencia de los efectos sobre la síntesis de glucógeno y la producción de glucosa, el aumento que induce la insulina en la síntesis de lípidos no se afecta en absoluto, o al menos se afecta en modelos de diabetes tipo II en roedores resistentes a la insulina así como en humanos que padecen de diabetes provocada por lipodistrofia o mutaciones que afectan a nodos específicos en las vías de señalización intracelular de la insulina. Por consiguiente, la hiperinsulinemia asociada con el síndrome metabólico puede provocar directamente aumentos en la síntesis de lípidos hepáticos y de ese modo exacerbar los

aumentos en los niveles de triglicéridos circulantes. Esta es una razón muy probable por la que varios estudios indican que la resistencia a la insulina hepática contribuye a la dislipidemia humana, la esteatosis hepática, la disfunción vascular cardiovascular, e incluso la reducción de la función renal que se observa en personas con diabetes Tipo 2. En
5 consonancia con esto, el tratamiento de sujetos resistentes a la insulina con una alta concentración de insulina con el fin de reducir los niveles de glucosa en sangre puede resultar en la sobreestimulación de las vías no resistentes involucradas en por ejemplo la lipogénesis de novo. Con el fin de reducir los niveles de glucosa en sangre sin vías de sobreestimulación no resistentes (por ejemplo, las vías lipogénicas), sería conveniente tener
10 acceso a análogos de insulina, que activen selectivamente las vías de disminución de la glucosa. Tales análogos de insulina funcionalmente selectivos, más allá de disminuir los niveles de glucosa en sangre, demostrarían efectos mejorados sobre la dislipidemia, la esteatosis hepática, la aterosclerosis y las enfermedades cardiovasculares (ECV).
El documento WO 2005 054291 describe supuestamente las insulinas de una única cadena
15 con acilación B28K. El documento WO 2009 112583 describe supuestamente análogos de insulina estabilizados por proteasa que comprenden B28K. Los documentos WO90/07511, WO96/15804, WO200043034, US2012241356, WO2012015692 y WO9731022 describen supuestamente análogos de insulina que comprenden B28K, algunos de los cuales también describen supuestamente la acilación en la misma posición.
20 Se ha informado una gran variedad de análogos de insulina y derivados. Sin embargo todos activan el receptor de insulina de la misma manera, es decir los efectos de regulación negativa de la activación del receptor de insulina son similares, independientemente de si la activación resulta de la unión de un análogo de alta afinidad o un análogo de baja afinidad – solo la potencia difiere.
25 Por lo tanto, aún existe la necesidad de análogos de insulina y derivados que tengan propiedades funcionalmente selectivas sobre las vías resistentes y no resistentes, por ejemplo, la gluconeogénesis y las vías del metabolismo de lípidos.

30 SUMARIO

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un derivado de la insulina, en donde dicho derivado de insulina comprende B5Y y un sustituyente que comprende un grupo acilo.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un derivado de la insulina, en
35 donde dicho derivado de la insulina comprende B5F y un sustituyente que comprende un grupo acilo.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un derivado de la insulina, en donde dicho derivado de insulina comprende B5Y y B26G o B26A y un sustituyente que comprende un grupo acilo unido a B28K, B26K o B29K.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un derivado de la insulina, en donde dicho derivado de insulina comprende B5F y B26G o B26A y un sustituyente que comprende un grupo acilo unido a B28K, B26K o B29K.

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden el derivado insulina de la invención y uno o más vehículos o disolventes farmacéuticamente aceptables.

En aspectos adicionales, la invención se refiere al uso de derivados de la insulina de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de diabetes, diabetes Tipo 1, diabetes Tipo 2, alteración de la tolerancia a la glucosa, hiperglicemia, dislipidemia, obesidad, síndrome metabólico (síndrome metabólico X, síndrome de resistencia a la insulina), hipertensión, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto del miocardio, accidente cerebrovascular, trastornos cardiovasculares, enfermedad cardíaca coronaria, síndrome intestinal inflamatorio, dispepsia, hipotensión o úlceras gástricas.

Además, o alternativamente en un segundo aspecto, la invención proporciona derivados de la insulina con efectos mejorados sobre los procesos que se relacionan con la obesidad, la dislipidemia o complicaciones cardiovasculares, tal como una ganancia de peso menor, menor aumento en la masa de grasa corporal, menor aumento de los triglicéridos hepáticos o función endotelial mejorada.

En un aspecto, los derivados de la insulina de la presente invención son capaces de disminuir la glucosa en sangre sin afectar negativamente el metabolismo de lípidos.

En otro aspecto, los derivados de la insulina de la presente invención inducen una fosforilación del receptor de insulina submáxima, e inducen señalización selectiva, y por lo tanto una respuesta celular selectiva, es decir, ofrecen menor respuesta máxima en las vías del metabolismo de lípidos que en la vía de disminución de la glucosa, cuando se comparan con la insulina humana.

Aún en otro aspecto, los derivados de la insulina de la presente invención, además de la disminución de la glucosa, también provocan una ganancia de peso menor, en particular por un aumento menor de la masa de grasa.

En un aspecto la invención proporciona derivados de la insulina con efectos mejorados en los procesos relacionados con la dislipidemia hepática, esteatosis hepática o enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFLD), en particular por aumentar la disminución de los triglicéridos hepáticos en comparación con la insulina humana.

En otro aspecto, la invención proporciona derivados de la insulina con efectos mejorados sobre los procesos relacionados con trastornos cardiovasculares tales como función endotelial mejorada en comparación con la insulina humana.

Aún en otro aspecto, los derivados de la insulina de la presente invención proporcionan una menor incidencia de eventos cardiovasculares adversos en pacientes con diabetes.

En un aspecto la invención proporciona derivados de la insulina con estabilidad mejorada en la formulación.

La invención puede resolver además otros problemas que resultarán evidentes a partir de la descripción de las modalidades ilustrativas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 5 La Figura 1 muestra curvas representativas de unión al receptor para la insulina humana (●) y el compuesto del ejemplo 15 (▲) a partir de un ensayo de unión competitiva con IR-A solubilizado (CPM = conteos por minuto);
- La Figura 2 muestra curvas representativas de dosis-respuesta para la insulina humana (●) y el compuesto del ejemplo 15 (▲) a partir de un ensayo de fosforilación de IRpY1158 en
- 10 células CHO-hIR que sobreexpresan el IR-A;
- La Figura 3 muestra curvas representativas de dosis-respuesta para la insulina humana (●) y el compuesto del ejemplo 15 (▲) a partir de un ensayo de fosforilación de AKT (fosforilación del residuo de serina número 473) en células CHO-hIR que sobreexpresan el IR-A;
- 15 La Figura 4 muestra curvas representativas de dosis-respuesta para la insulina humana (●) y el compuesto del ejemplo 15 (▲) a partir de un ensayo de fosforilación de ERK en células CHO-hIR que sobreexpresan el IR-A;
- La Figura 5 muestra curvas representativas de dosis-respuesta para la insulina humana (●) y el compuesto del ejemplo 15 (▲) a partir de un ensayo de lipogénesis en adipocitos
- 20 primarios de rata (DPM = desintegraciones por minuto);
- La Figura 6 muestra curvas representativas de dosis-respuesta para la insulina humana (●) y el compuesto del ejemplo 15 (▲) a partir de un ensayo de síntesis de glucógeno en hepatocitos primarios de rata;
- La Figura 7 muestra curvas representativas de dosis-respuesta para la insulina humana (●) y el compuesto del ejemplo 15 (▲) a partir de un ensayo cuantitativo de reacción en cadena
- 25 de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) para *fasn* realizado en ADNc aislado de hepatocitos primarios de rata;
- La Figura 8 muestra curvas representativas de dosis-respuesta para la insulina humana (●) y el compuesto del ejemplo 15 (▲) a partir de un ensayo cuantitativo de reacción en cadena
- 30 de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) para *g6pc* que se realizó en ADNc aislado de hepatocitos primarios de rata;
- La Figura 9 muestra curvas representativas de dosis-respuesta para la insulina humana (●) y el compuesto del ejemplo 15 (▲) a partir de un ensayo de lipogénesis *de novo* en hepatocitos de rata primarios (CPM = conteos por minuto);
- 35 La Figura 10 muestra curvas representativas para niveles de Hba1c de un subcrónico *in vivo* estudio en ratones diabéticos STZ-DIO dosificados por vía subcutánea dos veces al día durante seis semanas con vehículo, el Comparador PK (comparación núm. 5) y compuesto del ejemplo 15.
- La Figura 11 muestra curvas representativas para el peso corporal a partir de un estudio *in*
- 40 *vivo* en ratones diabéticos STZ-DIO dosificados por vía subcutánea dos veces al día durante

seis semanas con vehículo, el Comparador PK (comparador núm. 5) y el compuesto del ejemplo 15.

La Figura 12 muestra curvas representativas para la masa de grasa corporal a partir de un estudio *in vivo* en ratones diabéticos STZ-DIO dosificados por vía subcutánea dos veces al día durante seis semanas con vehículo, el Comparador PK (comparador núm. 5) y el compuesto del ejemplo 15.

La Figura 13 muestra curvas representativas para la TG hepática a partir de un estudio *in vivo* en ratones diabéticos STZ-DIO dosificados por vía subcutánea dos veces al día durante seis semanas con vehículo, el Comparador PK (comparador núm. 5) y el compuesto del ejemplo 15.

La Figura 14 muestra curvas representativas para la vasorelajación estimulada por ACh de arterias mesentéricas de un estudio subcrónico *in vivo* en ratones diabéticos STZ-DIO dosificados por vía subcutánea dos veces al día durante seis semanas con vehículo, el Comparador PK (comparador núm. 5) y el compuesto del ejemplo 15.

La Figura 15 muestra datos representativos de SEC para una formulación de 0.6 mM de un compuesto comparador, es decir, el comparador 9 (línea negra) que incluye 3 Zn/6 ins, fenol 30 mM, glicerol 1.6 % y tris(hidroximetil)aminometano 7 mM a pH 7.6. Se incluye una mezcla de referencia SEC de albúmina humana, Co(III)hexámero de insulina y un análogo de monómero de insulina (B9Asp, B27Glu) (línea gris).

La Figura 16 muestra los datos representativos de SEC de una formulación similar del compuesto del ejemplo 3 (línea negra).

La Figura 17 muestra los datos representativos de SEC de una formulación similar del compuesto del ejemplo 11 (línea negra).

La Figura 18 muestra los datos representativos de SEC de una formulación similar del compuesto del ejemplo 12 (línea negra)

La Figura 19 muestra los datos representativos de SEC de una formulación similar del compuesto del ejemplo 15 (línea negra).

DESCRIPCIÓN

La presente invención proporciona análogos novedosos de insulina humana, que se acilan y muestran propiedades funcionalmente selectivas sobre las vías implicadas en la gluconeogénesis y el metabolismo de los lípidos.

La presente invención se refiere ampliamente a derivados de la insulina que comprenden B5Y o B5F y un sustituyente que comprende un grupo acilo.

En una modalidad, los derivados de la insulina de la presente invención inducen una fosforilación submáxima del receptor de insulina de aproximadamente o menos de 65 %, en comparación con la insulina humana.

En una modalidad, el derivado de la insulina comprende un sustituyente que comprende un grupo acilo.

En una modalidad, el sustituyente se une a B28K, B26K o B29K.

- En una modalidad, el sustituyente se une a B28K.
- En una modalidad, el sustituyente se une a B26K.
- En una modalidad, el sustituyente se une a B29K.
- En otra modalidad, el derivado de la insulina comprende B26G o B26A.
- 5 En otra modalidad, el derivado de la insulina comprende A14E.
- En otra modalidad, el derivado de la insulina comprende desB30, desB29-30 o desB27-30.
- En otra modalidad, el derivado de la insulina comprende desB30.
- En otra modalidad, el derivado de la insulina comprende desB29-30.
- En otra modalidad, el derivado de la insulina comprende desB27-30.
- 10 En otra modalidad el derivado de insulina de la invención se selecciona del grupo que consiste en los compuestos de los ejemplos 1-46:

Ej.	Nombre	Mutaciones	Enlazado r	Grupo acilo	Sitio de acilación
1	N{Epsilon-B28}-15-carboxipentadecanoil-[TyrB5,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina	B5Y, B28K, desB29-B30	ninguna	C16 diácido	B28K
2	N{Epsilon-B28}-[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoilamino)butanoil]-[TyrB5,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina	B5Y, B28K, desB29-B30	gGlu	C16 diácido	B28K
3	N{Epsilon-B28}-17-carboxiheptadecanoil-[TyrB5,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina	B5Y, B28K, desB29-B30	ninguna	C18 diácido	B28K
4	N{Epsilon-B28}-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]-[TyrB5,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina	B5Y, B28K, desB29-B30	gGlu	C18 diácido	B28K
5	N{Epsilon-B28}-[2-[2-[2-(17-carboxiheptadecanoilamino)etoxi]etoxi]acetil]-[TyrB5,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina	B5Y, B28K, desB29-B30	OEG	C18 diácido	B28K
6	N{Epsilon-B28}-[(4S)-4-carboxi-4-[[4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]-	B5Y, B28K, desB29-B30	2xgGlu	C18 diácido	B28K

	[TyrB5,LysB28],des-(B29-B30)- Insulina				
7	N{Epsilon-B28}-[2-[2-[2-[[(4S)- 4-carboxi-4-(17- carboxiheptadecanoilamino)butan oil]amino]etoxi]etoxi]acetil]- [TyrB5,LysB28],des-(B29-B30)- Insulina	B5Y, B28K, desB29-B30	gGlu- OEG	C18 diácido	B28K
8	N{Epsilon-B28}-[(4S)-4-carboxi- 4-[[[(4R)-4-[(3R,10S,13R,17R)-3- hidroxi-10,13-dimetil- 2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17- tetradecahidro-1H- ciclopenta[a]fenantren-17- il]pentanoil]amino]butanoil]- [TyrB5,LysB28],des-(B29-B30)- Insulina	B5Y, B28K, desB29-B30	gGlu	Ácido litocólic o	B28K
9	N{Epsilon-B28}-[(4R)-4- [(3R,10S,13R,17R)-3-hidroxi- 10,13-dimetil- 2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17- tetradecahidro-1H- ciclopenta[a]fenanthren-17- il]pentanoil]-[TyrB5,LysB28],des- (B29-B30)-Insulina	B5Y, B28K, desB29-B30	ninguna	Ácido litocólic o	B28K
10	N{Epsilon-B28}-15- carboxipentadecanoil- [TyrB5,GlyB26,LysB28],des- (B29-B30)-Insulina	B5Y, B26G, B28K, desB29-B30	ninguna	C16 diácido	B28K
11	N{Epsilon-B28}-17- carboxiheptadecanoil- [TyrB5,GlyB26,LysB28],des- (B29-B30)-Insulina	B5Y, B26G, B28K, desB29-B30	ninguna	C18 diácido	B28K
12	N{Epsilon-B28}-17- carboxiheptadecanoil- [GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28], des-(B29-B30)-Insulina	A14E, B5Y, B26G, B28K, desB29-B30	ninguna	C18 diácido	B28K
13	N{Epsilon-B28}-[(4S)-4-carboxi- 4-(17-	A14E, B5Y, B26G,	gGlu	C18 diácido	B28K

	carboxiheptadecanoilamino)butanoil]- [GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28], des-(B29-B30)-Insulina	B28K, desB29-B30			
14	N{Epsilon-B28}-[(4S)-4-carboxi-4-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]- [GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28], des-(B29-B30)-Insulina	A14E, B5Y, B26G, B28K, desB29-B30	2xgGlu	C18 diácido	B28K
15	N{Epsilon-B28}-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]- [GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28], des-(B29-B30)-Insulina	A14E, B5Y, B26G, B28K, desB29-B30	gGlu- OEG	C18 diácido	B28K
16	N{Epsilon-B28}-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]- [GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28], des-(B29-B30)-Insulina	A14E, B5Y, B26G, B28K, desB29-B30	gGlu- OEG	C20 diácido	B28K
17	N{Epsilon-B28}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]- [GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28], des-(B29-B30)-Insulina	A14E, B5Y, B26G, B28K, desB29-B30	gGlu- 2xOEG	C20 diácido	B28K
18	N{Epsilon-B28}-[(4S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butanoil]- [GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28], des-(B29-B30)-Insulina	A14E, B5Y, B26G, B28K, desB29-B30	gGlu	C20 diácido	B28K
19	N{Epsilon-B28}-19-carboxinonadecanoil- [GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28], des-(B29-B30)-Insulina	A14E, B5Y, B26G, B28K, desB29-B30	ninguna	C20 diácido	B28K

20	N{Epsilon-B28}-15-(1H-tetrazol-5-il)pentadecanoil-[GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28], des-(B29-B30)-Insulina	A14E, B5Y, B26G, B28K, desB29-B30	ninguna	Tetrazol-C16	B28K
21	N{Epsilon-B28}-17-(1H-tetrazol-5-il)heptadecanoil-[GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28], des-(B29-B30)-Insulina	A14E, B5Y, B26G, B28K, desB29-B30	ninguna	Tetrazol-C18	B28K
22	N{Epsilon-B28}-16-(1H-tetrazol-5-il)hexadecanoil-[GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28], des-(B29-B30)-Insulina	A14E, B5Y, B26G, B28K, desB29-B30	ninguna	Tetrazol-C17	B28K
23	N{Epsilon-B28}-4-[16-(1H-tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil]butanoil-[GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28], des-(B29-B30)-Insulina	A14E, B5Y, B26G, B28K, desB29-B30	sulfonimida-C4	Tetrazol-C17	B28K
24	N{Epsilon-B28}-4-[4-[15-(1H-tetrazol-5-il)pentadecanoilsulfamoil]butanoil sulfamoil]butanoil-[GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28], des-(B29-B30)-Insulina	A14E, B5Y, B26G, B28K, desB29-B30	2xsulfonimida-C4	Tetrazol-C16	B28K
25	N{Epsilon-B28}-4-[17-(1H-tetrazol-5-il)heptadecanoilsulfamoil]butanoil -[GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28], des-(B29-B30)-Insulina	A14E, B5Y, B26G, B28K, desB29-B30	sulfonimida-C4	Tetrazol-C18	B28K
26	N{Epsilon-B28}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[15-(1H-tetrazol-5-il)pentadecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28], des-(B29-B30)-Insulina	A14E, B5Y, B26G, B28K, desB29-B30	gGlu-2xOEG	Tetrazol-C16	B28K
27	N{Epsilon-B28}-4-[4-[17-(1H-tetrazol-5-il)heptadecanoilsulfamoil]butanoil sulfamoil]butanoil-[GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28], des-(B29-B30)-Insulina	A14E, B5Y, B26G, B28K, desB29-B30	2xsulfonimida-C4	Tetrazol-C18	B28K

	il)heptadecanoilsulfamoil]butanoil sulfamoil]butanoil- [GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28], des-(B29-B30)-Insulina	B28K, desB29-B30			
28	N{Epsilon-B28}-4-(17-carboxiheptadecanoilsulfamoil)butanoil- [GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28], des-(B29-B30)-Insulina	A14E, B5Y, B26G, B28K, desB29-B30	sulfonimida-C4	C18 diácido	B28K
29	N{Epsilon-B28}-[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-[15-(1H-tetrazol-5-il)pentadecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]- [GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28], des-(B29-B30)-Insulina	A14E, B5Y, B26G, B28K, desB29-B30	gGlu-OEG	Tetrazol-C16	B28K
30	N{Epsilon-B28}-[(4R)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]- [GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28], des-(B29-B30)-Insulina	A14E, B5Y, B26G, B28K, desB29-B30	DgGlu	C18 diácido	B28K
31	N{Epsilon-B28}-[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]- [TyrB5,GlyB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina	B5Y, B26G, B28K, desB29-B30	gGlu-OEG	C18 diácido	B28K
32	N{Epsilon-B28}-[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]- [GluA14,TyrB5,AlaB26,LysB28], des-(B29-B30)-Insulina	A14E, B5Y, B26A, B28K, desB29-B30	gGlu-OEG	C18 diácido	B28K
33	N{Epsilon-B28}-[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]- [TyrB5,AlaB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina	B5Y, B26A, B28K, desB29-B30	gGlu-OEG	C18 diácido	B28K

34	N{Epsilon-B28}-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanol]-[GluA14,TyrB5,AlaB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina	A14E, B5Y, B26A, B28K, desB29-B30	gGlu	C18 diácido	B28K
35	N{Epsilon-B28}-17-carboxiheptadecanoil-[PheB5,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina	B5F, B28K, desB29-B30	ninguna	C18 diácido	B28K
36	N{Epsilon-B28}-17-carboxiheptadecanoil-[GluA14,PheB5,GlyB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina	A14E, B5F, B26G, B28K, desB29-B30	ninguna	C18 diácido	B28K
37	N{Epsilon-B26}-17-carboxiheptadecanoil-[TyrB5,LysB26],des-(B27-B30)-Insulina	B5Y, B26K, desB27-B30	ninguna	C18 diácido	B26K
38	N{Epsilon-B26}-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanol]-[TyrB5,LysB26],des-(B27-B30)-Insulina	B5Y, B26K, desB27-B30	gGlu	C18 diácido	B26K
39	N{Epsilon-B26}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanol]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[TyrB5,LysB26],des-(B27-B30)-Insulina	B5Y, B26K, desB27-B30	gGlu-2xOEG	C18 diácido	B26K
40	N{Epsilon-B29}-[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoilamino)butanol]-[TyrB5],des-ThrB30-Insulina	B5Y, desB30	gGlu	C16 diácido	B29K
41	N{Epsilon-B29}-tetradecanoil-[TyrB5],des-ThrB30-Insulina	B5Y, desB30	ninguna	C14	B29K
42	N{Epsilon-B29}-[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoilamino)butanol]	B5Y, B26G, desB30	gGlu	C16 diácido	B29K

	oil]-[TyrB5,GlyB26],des-ThrB30-Insulina				
43	N{Epsilon-B29}-[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoilamino)butanol]-[TyrB5,AlaB26],des-ThrB30-Insulina	B5Y, B26A, desB30	gGlu	C16 diácido	B29K
44	N{Epsilon-B29}-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanol]-[TyrB5,GlyB26],des-ThrB30-Insulina	B5Y, B26G, desB30	gGlu	C18 diácido	B29K
45	N{Epsilon-B29}-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanol]-[TyrB5,AlaB26],des-ThrB30-Insulina	B5Y, B26A, desB30	gGlu	C18 diácido	B29K
46	N{Epsilon-B26}-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanol]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[TyrB5,LysB26],des-(B27-B30)-Insulina	B5Y, B26K, desB27-B30	gGlu-OEG	C18 diácido	B26K

Ej.: ejemplo nr.

La presente invención se refiere al uso de los derivados de la insulina de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de la diabetes.

En modelos animales se ha encontrado sorprendentemente, que los derivados de insulina de la presente invención son capaces de disminuir la glucosa en sangre con menos impacto negativo sobre el metabolismo de los lípidos o la disfunción del endotelio. Se cree que esto conduce a una menor incidencia de eventos cardiovasculares adversos, y estos experimentos en animales también muestran que la disminución de la glucosa se acompaña de una menor ganancia de peso, y en particular de un menor aumento en la masa de grasa, en comparación con el tratamiento de insulina convencional.

Es probable que esto provoque efectos beneficiosos sobre el desarrollo o progresión de la enfermedad hepática ya que los experimentos en animales también muestran que la

disminución de la glucosa se acompaña de una reducción en los triglicéridos hepáticos en comparación con el tratamiento con insulina convencional.

Además, al examinar la señalización aguas abajo *in vitro*, los derivados de insulina de la presente invención han demostrado que inducen una fosforilación submáxima del receptor de insulina, e inducen señalización selectiva, y por lo tanto respuesta celular selectiva, es decir, dan una respuesta máxima menor en las vías del metabolismo de lípidos que en la vía de disminución de la glucosa, cuando se compara con la insulina humana.

Finalmente, los derivados de insulina de la presente invención también tienen una señalización selectiva deseada y una estabilidad mejorada en la formulación.

10 **Insulina**

El término “**insulina humana**” como se usa en la presente descripción se refiere a la hormona de insulina humana cuya estructura y propiedades se conocen bien. La insulina humana tiene dos cadenas polipeptídicas, denominadas cadena A y cadena B. La cadena A es un péptido de 21 aminoácidos y la cadena B es un péptido de 30 aminoácidos, donde las dos cadenas se conectan mediante puentes disulfuro: un primer puente entre la cisteína en posición 7 de la cadena A y la cisteína en posición 7 de la cadena B, y un segundo puente entre la cisteína en posición 20 de la cadena A y la cisteína en posición 19 de la cadena B. Un tercer puente está presente entre las cisteínas en posición 6 y 11 de la cadena A.

La cadena A de insulina humana tiene la siguiente secuencia: GIVEQCCTSICSLYQLENYCN (SEQ ID NO: 1), mientras que la cadena B tiene la secuencia siguiente: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (SEQ ID NO: 2).

En el cuerpo humano, la hormona se sintetiza como una proinsulina precursora de cadena simple (preproinsulina) que consiste en un prepéptido de 24 aminoácidos seguido de la proinsulina que contiene 86 aminoácidos en la configuración: prepéptido-B-Arg Arg-C-Lys Arg-A, en el que C es un péptido de conexión de 31 aminoácidos. Arg-Arg y Lys-Arg son sitios de escisión para la escisión del péptido de conexión de las cadenas A y B.

“Una insulina” de acuerdo con la invención se entiende en la presente descripción como insulina humana o una insulina de otra especie, tal como la insulina porcina o bovina.

El término “péptido de insulina” como se usa en la presente descripción significa un péptido que es insulina humana o un análogo o un derivado de estos con actividad de insulina.

Análogo de insulina

El término “**análogo de insulina**” como se usa en la presente descripción se refiere a una molécula de insulina humana modificada única en donde uno o más residuos de aminoácidos de la insulina se han sustituido por otros residuos de aminoácidos y/o en donde uno o más residuos de aminoácidos se han eliminado de la insulina y/o en donde uno o más residuos de aminoácidos se han añadido y/o insertado a la insulina.

En una modalidad un análogo de insulina comprende menos de 10 modificaciones de aminoácidos (sustituciones, deleciones, adiciones (que incluyen inserciones) y cualquier

combinación de estas) con relación a la insulina humana, alternativamente menos de 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 modificaciones con relación a la insulina humana.

Las modificaciones en la molécula de insulina se denotan en la declaración de la cadena (A o B), la posición, y el código de una o tres letras para que el residuo de aminoácido que
5 sustituye el residuo de aminoácido nativo.

Por “**péptido de conexión**” o “**Péptido C**” se entiende una porción de conexión “C” de la secuencia de polipéptido B-C-A de una molécula de proinsulina de cadena simple. En la cadena de insulina humana, el Péptido C- conecta la posición 30 de la cadena B y la posición 1 de la cadena A y es un residuo de 35 aminoácidos. El péptido de conexión
10 incluye dos secuencias de aminoácidos dibásicos terminales, por ejemplo, Arg-Arg y Lys-Arg que sirven como sitios de escisión para la escisión fuera del péptido de conexión de las cadenas A y B para formar la molécula de insulina de dos cadenas.

Por “**desB30**” o “**B(1-29)**” se refiere a una cadena B de insulina natural o un análogo de esta que carece del aminoácido B30 y “**A(1-21)**” se refiere a la cadena de insulina natural
15 A. Por lo tanto, por ejemplo, B5Y, B28K, la insulina humana desB29-desB30 es un análogo de la insulina humana donde el aminoácido en posición 5 en la cadena B se sustituye con tirosina (Tyr o Y), el aminoácido en posición 28 en la cadena B se sustituye con lisina (Lys o K), y los aminoácidos en las posiciones 29 y 30 en la cadena B se eliminan.

20 Los términos en la presente “**A1**”, “**A2**” y “**A3**” etc. indican el aminoácido en posición 1, 2 y 3 etc., respectivamente, en la cadena A de la insulina (contadas desde el extremo N terminal). De manera similar, los términos como B1, B2 y B3 etc. indican el aminoácido en posición 1, 2 y 3 etc., respectivamente, en la cadena B de la insulina (contadas desde el extremo N terminal).

25 En la presente descripción, el término “**residuo de aminoácido**” es un aminoácido del cual, formalmente, se ha eliminado un grupo hidroxilo de un grupo carboxi y/o de los cuales, formalmente, se ha eliminado un átomo de hidrógeno de un grupo amino.

En una modalidad, el análogo de insulina de la presente invención es un análogo de la insulina humana que comprende 2-10 mutaciones.

30 En una modalidad, el análogo de insulina de la presente invención es un análogo de la insulina humana que comprende 2-6 mutaciones.

En una modalidad, el análogo de insulina de la presente invención es un análogo de la insulina humana que comprende 2-3 mutaciones.

35 En una modalidad, el análogo de insulina de la presente invención es un análogo de la insulina humana que comprende dos mutaciones.

En una modalidad, el análogo de insulina de la presente invención es un análogo de la insulina humana que comprende tres mutaciones.

En una modalidad, el análogo de insulina de la presente invención es un análogo de la insulina humana que comprende cuatro mutaciones.

- En una modalidad, el análogo de insulina de la presente invención es un análogo de la insulina humana que comprende cinco mutaciones.
- En una modalidad, el análogo de insulina de la presente invención es un análogo de la insulina humana que comprende seis mutaciones.
- 5 En una modalidad, el análogo de insulina de la presente invención es un análogo de la insulina humana que comprende siete mutaciones.
- En una modalidad, el análogo de insulina de la presente invención es un análogo de la insulina humana que comprende ocho mutaciones.
- En una modalidad, el análogo de insulina de la presente invención es un análogo de la insulina humana que comprende nueve mutaciones.
- 10 En una modalidad, el análogo de insulina de la presente invención es un análogo de la insulina humana que comprende 10 mutaciones.
- En una modalidad, el análogo de insulina de la presente invención es un análogo de la insulina humana que comprende menos de 10 mutaciones.
- 15 En una modalidad, el análogo de insulina de la presente invención es un análogo de la insulina humana que comprende menos de 7 mutaciones.
- En una modalidad, el análogo de insulina de la presente invención es un análogo de la insulina humana que comprende menos de 5 mutaciones.
- En una modalidad, el análogo de insulina de la presente invención es un análogo de la insulina humana que comprende menos de 4 mutaciones.
- 20 En una modalidad, el análogo de insulina de la presente invención es un análogo de la insulina humana que comprende menos de 3 mutaciones.
- En una modalidad el análogo de insulina comprende B5Y.
- En una modalidad el análogo de insulina comprende B5F.
- 25 En una modalidad el análogo de insulina comprende B26A o B26G.
- En una modalidad, el análogo de insulina comprende B26A.
- En una modalidad, el análogo de insulina comprende B26G.
- En otra modalidad, el análogo de insulina comprende A14E.
- En una modalidad, el análogo de insulina comprende B5Y y B26A.
- 30 En una modalidad, el análogo de insulina comprende B5Y y B26G.
- En una modalidad, el análogo de insulina comprende B5F y B26A.
- En una modalidad, el análogo de insulina comprende B5F y B26G.
- En una modalidad, el análogo de insulina comprende B28K, B26K o B29K.
- En una modalidad, el análogo de insulina comprende B28K.
- 35 En una modalidad, el análogo de insulina comprende B26K.
- En una modalidad, el análogo de insulina comprende B29K.
- En otra modalidad, el análogo de insulina comprende B26G o B26A.
- En otra modalidad, el análogo de insulina comprende desB30, desB29-30 o desB27-30.
- En otra modalidad, el análogo de insulina comprende desB30.
- 40 En otra modalidad, el análogo de insulina comprende desB29-30.

- En otra modalidad, el análogo de insulina comprende desB27-30.
- En una modalidad, el análogo de la insulina puede comprender, además, hasta 10 sustituciones además de B5Y.
- En una modalidad, el análogo de la insulina comprende, además, hasta 5 sustituciones además de B5Y.
- 5 En una modalidad, el análogo de la insulina comprende, además, dos sustituciones además de B5Y.
- En una modalidad, el análogo de la insulina comprende, además, tres sustituciones además de B5Y.
- 10 En una modalidad, el análogo de la insulina comprende, además, cuatro sustituciones además de B5Y.
- En una modalidad, el análogo de la insulina comprende, además, cinco sustituciones además de B5Y.
- En una modalidad, el análogo de la insulina comprende, además, seis sustituciones además de B5Y.
- 15 En una modalidad, el análogo de la insulina comprende, además, siete sustituciones además de B5Y.
- En una modalidad, el análogo de la insulina comprende, además, ocho sustituciones además de B5Y.
- 20 En una modalidad, el análogo de la insulina comprende, además, nueve sustituciones además de B5Y.
- En una modalidad, el análogo de la insulina puede comprender, además, hasta 10 sustituciones además de B5F.
- En una modalidad, el análogo de la insulina comprende, además, hasta 5 sustituciones además de B5F.
- 25 En una modalidad, el análogo de la insulina comprende, además, dos sustituciones además de B5F.
- En una modalidad, el análogo de la insulina comprende, además, tres sustituciones además de B5F.
- 30 En una modalidad, el análogo de la insulina comprende, además, cuatro sustituciones además de B5F.
- En una modalidad, el análogo de la insulina comprende, además, cinco sustituciones además de B5F.
- En una modalidad, el análogo de la insulina comprende, ade, seis sustituciones además de B5F.
- 35 En una modalidad, el análogo de la insulina comprende, además, siete sustituciones además de B5F.
- En una modalidad, el análogo de la insulina comprende, además, ocho sustituciones además de B5F.

En una modalidad, el análogo de la insulina comprende, además, nueve sustituciones además de B5F.

Los ejemplos no limitantes de análogos de la insulina de la presente invención incluyen:

A14E, B5Y, B26A, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 4)

5 A14E, B5Y, B26G, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 5)

B5Y, B26A, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 7)

B5Y, B26G, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 8)

B5Y, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 9)

A14E, B5F, B26G, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 10)

10 B5F, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 11)

B5Y, B26K, desB27-desB30 (SEQ ID NO: 1 y 12)

B5Y, desB30 (SEQ ID NO: 1 y 13)

B5Y, B26G, desB30 (SEQ ID NO: 1 y 14)

B5Y, B26A, desB30 (SEQ ID NO: 1 y 15)

15 En una modalidad, los análogos de insulina de la presente invención comprenden:

A14E, B5Y, B26A, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 4)

A14E, B5Y, B26G, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 5)

B5Y, B26A, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 7)

B5Y, B26G, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 8)

20 B5Y, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 9)

A14E, B5F, B26G, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 10)

B5F, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 11)

B5Y, B26K, desB27-desB30 (SEQ ID NO: 1 y 12)

B5Y, desB30 (SEQ ID NO: 1 y 13)

25 B5Y, B26G, desB30 (SEQ ID NO: 1 y 14)

B5Y, B26A, desB30 (SEQ ID NO: 1 y 15)

B5F, B26A, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 6)

B5Y, B26A, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 4)

B5Y, B26G, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 5)

30 B5F, B26G, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 10)

A14E, B5F, B26A, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 6)

A14E, B5Y, B26A, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 7)

A14E, B5Y, B26G, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 8)

A14E, B5Y, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 9)

35 A14E, B5F, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 11)

A14E, B5Y, B26K, desB27-desB30 (SEQ ID NO: 3 y 12)

A14E, B5Y, desB30 (SEQ ID NO: 3 y 13)

A14E, B5Y, B26G, desB30 (SEQ ID NO: 3 y 14) y

A14E, B5Y, B26A, desB30 (SEQ ID NO: 3 y 15).

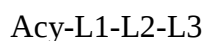
40 **Derivado de insulina**

El término “**derivado de insulina**” como se usa en la presente descripción se refiere a una insulina parental modificada químicamente o un análogo de esta, en la que una o más cadenas laterales se han unido covalentemente al péptido. El término “**cadena lateral**” como se usa en la presente descripción también puede denominarse como un “**sustituyente**” o “**porción de unión a albúmina**”. Los ejemplos no limitantes de cadenas laterales son amidas, carbohidratos, grupos alquilo, grupos acilo, ésteres, PEGilaciones, y similares, que pueden comprender, además, un enlazador.

El término “**porción de unión de albúmina**” como se usa en la presente descripción se refiere a cualquier grupo químico capaz de unirse no covalentemente a la albúmina, es decir tiene afinidad de unión a la albúmina. En algunas modalidades la porción de unión a albúmina comprende un grupo acilo.

En otra modalidad particular la cadena lateral comprende una porción que es particularmente relevante para la unión a albúmina y de esta manera la protuberancia, cuya porción puede referirse en consecuencia como una “**porción de prolongación**” o “**prolongador**” o “**grupo acilo**”. La porción de prolongación puede estar cerca, y preferentemente en el extremo terminal (o distal, o libre) de la porción de unión a albúmina, con relación a su punto de unión al péptido.

El “sustituyente”, “cadena lateral” o “porción de unión a albúmina” de acuerdo con la presente invención tiene la fórmula (I) siguiente:



en donde:

- Acy es un grupo acilo y se representa por ácido litocólico, por un grupo funcional de las fórmulas:

Químico 1: $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x-\text{COOH}$; o

Químico 2: $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x$ -tetrazolilo;

en donde x representa un número entero en el intervalo de 12 a 20; y el grupo tetrazolilo es 1H-tetrazol-5-ilo

o por un ácido graso de fórmula:

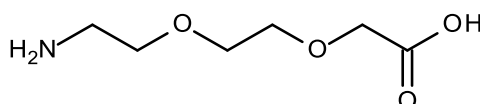
Químico 3: $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x-\text{CH}_3$

en donde x representa un número entero en el intervalo de 8 a 16

- L1 está ausente o representa OEG, gGlu, DgGlu o sulfonimida C-4
- L2 está ausente o representa OEG, gGlu, DgGlu o sulfonimida C-4
- L3 está ausente o representa OEG, gGlu, DgGlu o sulfonimida C-4

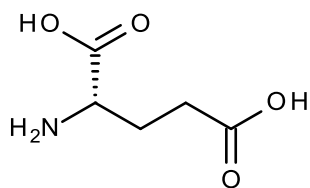
en donde:

- OEG representa [2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetil o residuo de aminoácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico $-\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_2\text{CO}-$ y se representa por la estructura siguiente:



- gGlu representa un residuo de ácido gamma glutámico representado por la estructura siguiente:

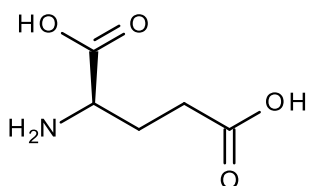
5



10 en donde el grupo carboxilo a la derecha de la estructura es el grupo gamma carboxi que forma el enlace con el grupo amino vecino

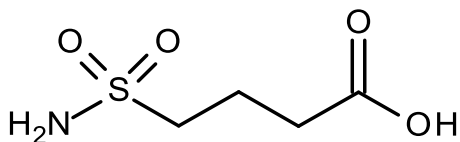
- DgGlu representa un residuo de ácido gamma glutámico representado por la estructura siguiente:

15



en donde el grupo carboxilo a la derecha de la estructura es el grupo gamma carboxi que forma el enlace con el grupo amino vecino

- 20 • y sulfonimida C-4 se representa por la estructura siguiente:



25

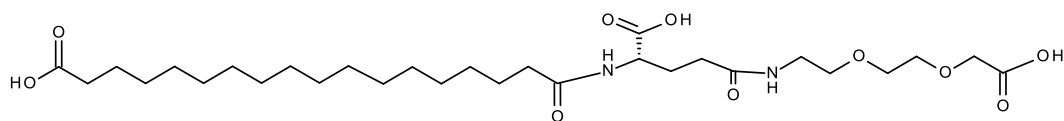
En una modalidad, L1-L2-L3 de la fórmula (I) se representa independientemente por:

- 30
- ninguna
 - gGlu
 - OEG
 - 2xgGlu
 - gGlu-OEG
 - gGlu-2xOEG
 - sulfonimida-C4
 - 2xsulfonimida-C4
- 35
- DgGlu

En una modalidad, el sustituyente tiene la fórmula (I) de Acy-L1-L2-L3 y se representa independientemente por:

- Ácido litocólico
- Ácido litocólico gGlu

- C14
- C16 diácido
- C16 diácido-gGlu
- C18 diácido
- 5 • C18 diácido-gGlu
- C18 diácido-2xgGlu
- C18 diácido-DgGlu
- C18 diácido-gGlu-OEG
- C18 diácido-gGlu-2xOEG
- 10 • C18 diácido-OEG
- C18 diácido-sulfonimida-C4
- C20 diácido
- C20 diácido-gGlu
- C20 diácido-gGlu-OEG
- 15 • C20 diácido-gGlu-2xOEG
- Tetrazol-C16
- Tetrazol-C16-gGlu-OEG
- Tetrazol-C16-gGlu-2xOEG
- Tetrazol-C16-2xsulfonimida-C4
- 20 • Tetrazol-C17
- Tetrazol-C17-sulfonimida-C4
- Tetrazol-C18;
- Tetrazol-C18-sulfonimida-C4
- Tetrazol-C18-2xsulfonimida-C4
- 25 En una modalidad, el sustituyente es el sustituyente del compuesto del ejemplo 15, en donde Acy-L1-L2-L3 se representa por C18 diácido-gGlu-OEG y por la estructura:



En una modalidad, los derivados de insulina de la invención se seleccionan del grupo que consiste en los compuestos de los Ejemplos 1-46.

- 30 Aún en otra modalidad, los derivados de insulina de la invención se seleccionan del grupo que consiste en los compuestos de los Ejemplos 1-36.

Aún en otra modalidad, el derivado de insulina de la invención se selecciona del grupo que consiste en los compuestos de los Ejemplos 10-34.

- 35 Aún en otra modalidad el derivado de insulina de la invención se selecciona del grupo que consiste en los compuestos de los Ejemplos 3, 4, 12- 16, 18- 20, 22, 23, 25, 26, 28- 30.

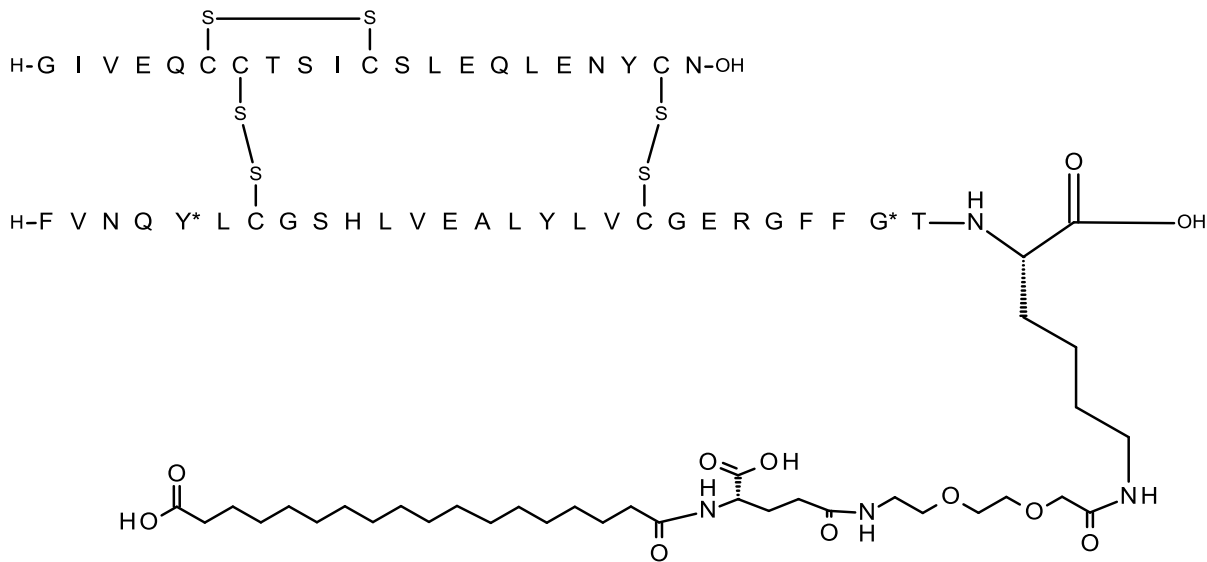
Aún en otra modalidad el derivado de insulina de la invención se selecciona del grupo que consiste en los compuestos de los Ejemplos 14-16, 18, 20 y 26.

Aún en otra modalidad, los derivados de insulina de la invención se seleccionan del grupo que consiste en los compuestos de los Ejemplos 37-39 o 46.

- 5 Aún en otra modalidad, los derivados de insulina de la invención se seleccionan del grupo que consiste en los compuestos de los Ejemplos 40-45.

En una modalidad el derivado de insulina de la invención es el compuesto del Ejemplo 15:
N{Epsilon-B28}-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-

10 [GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina



Grupo Acilo

En una modalidad, los derivados de insulina de la invención comprenden un grupo acilo.

- 15 Los derivados de insulina que comprenden un grupo acilo pueden, por lo tanto, denominarse “**análogos acilados de insulina**”.

En una modalidad preferida, los derivados de insulina de la invención comprenden un grupo acilo (Acy) en donde el grupo acilo representa ácido litocólico, o un grupo funcional de fórmulas:

- 20 • Químico 1:-CO-(CH₂)_x-COOH ; o
- Químico 2:--CO-(CH₂)_x-tetrazolilo-

en donde x representa un número entero en el intervalo de 12 a 20; y el grupo tetrazolilo es 1*H*-tetrazol-5-ilo

o un ácido graso de fórmula:

- 25 • Químico 3: -CO-(CH₂)_x-CH₃

en donde x representa un número entero en el intervalo de 8 a 16.

En una modalidad, la Acy se selecciona del grupo que consiste en: ácido litocólico, ácido 1,16-hexadecanodioico, ácido 1,18-octadecanodioico, ácido 1,20-eicosanodioico, tetrazol-C16, tetrazol-C17, tetrazol C18 y ácido tetradecanoico.

En una modalidad, el derivado de insulina comprende un grupo acilo, que comprende un ácido dicarboxílico.

En una modalidad, el derivado de insulina comprende un grupo acilo de la fórmula de Química 1, en donde x representa un número entero en el intervalo de 12 a 20.

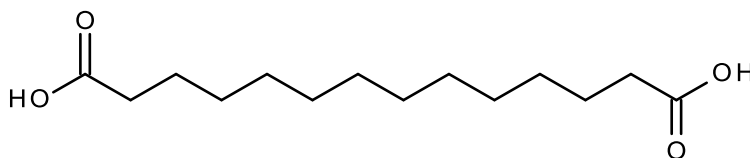
- 5 En una modalidad, el derivado de insulina comprende un grupo acilo de la fórmula Química 1, en donde x representa un número entero en el intervalo de 12 a 18.

En una modalidad, el derivado de insulina comprende un grupo acilo de la fórmula Química 1, en donde x representa un número entero en el intervalo de 12 a 16.

- 10 En una modalidad, el derivado de insulina comprende un grupo acilo de la fórmula Química 1, en donde x representa un número entero en el intervalo de 12 a 14.

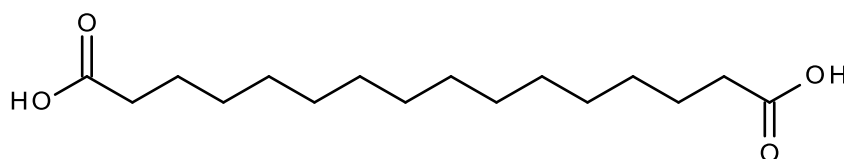
En una modalidad, el derivado de insulina comprende un grupo acilo de la fórmula de Química 1; en donde x representa el número entero 14, 16 o 18, es decir, el ácido 1,16-hexadecanodioico del grupo de diácido graso, ácido 1,18-octadecanodioico, y ácido 1,20-eicosanodioico, respectivamente.

- 15 En una modalidad, el derivado de insulina comprende un grupo acilo de la fórmula $\text{-CO-(CH}_2\text{)}_{12}\text{-COOH}$ y se representa por la estructura siguiente:



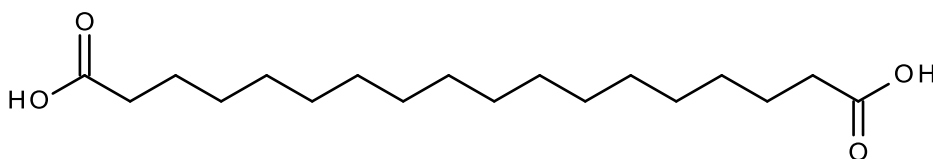
20

En una modalidad, el derivado de insulina comprende un grupo acilo de la fórmula $\text{-CO-(CH}_2\text{)}_{14}\text{-COOH}$ también nombrado ácido 1,16-hexadecanodioico y se representa por la estructura siguiente:



25

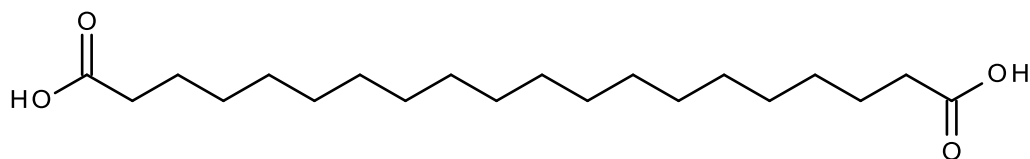
- 30 En una modalidad, el derivado de insulina comprende un grupo acilo de la fórmula $\text{-CO-(CH}_2\text{)}_{16}\text{-COOH}$, también denominado ácido 1,20-eicosanodioico y se representa por la estructura siguiente:



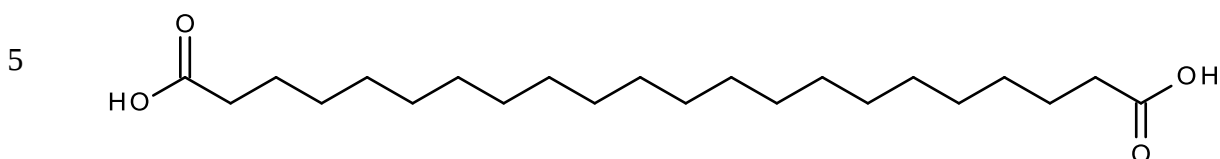
35

En una modalidad, el derivado de insulina comprende un grupo acilo de la fórmula $\text{-CO-(CH}_2\text{)}_{18}\text{-COOH}$ también denominado ácido 1,20-eicosanodioico y se representa por la estructura siguiente:

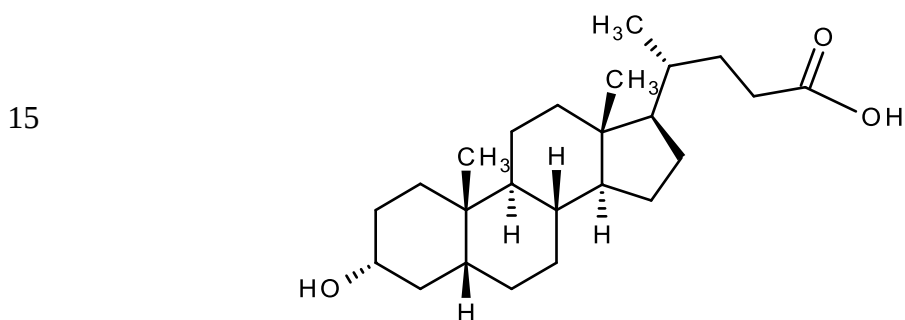
40



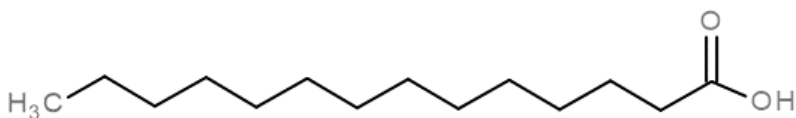
En una modalidad, el derivado de insulina comprende un grupo acilo de la fórmula $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{20}-\text{COOH}$ y se representa por la estructura siguiente:



10 En una modalidad, el derivado de insulina comprende un grupo acilo que comprende ácido litocólico y se representa por la estructura siguiente:



20 En una modalidad, el derivado de insulina comprende un grupo acilo que comprende un ácido graso de la fórmula $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_{12}-\text{CH}_3$ y se representa por la estructura siguiente:



25 En otra modalidad, el derivado de insulina comprende un grupo acilo que comprende al menos un grupo funcional.

En una modalidad, el derivado de insulina comprende un grupo acilo que comprende un grupo funcional que se selecciona del grupo que consiste en un ácido carboxílico y una porción tetrazol.

30 En una modalidad, el derivado de insulina comprende un grupo acilo que comprende un grupo funcional que se selecciona de las fórmulas:

Químico 1: $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x-\text{COOH}$; o

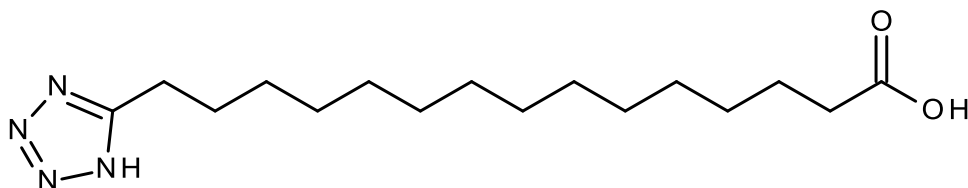
Químico 2: $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x-\text{tetrazolilo}-$

en donde x representa un número entero en el intervalo de 12 a 20; y el grupo tetrazolilo es

35 1H-tetrazol-5-ilo.

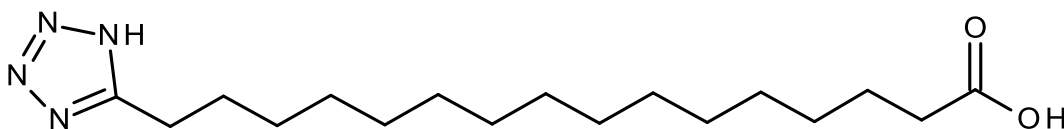
En una modalidad, el derivado de insulina comprende un grupo funcional que comprende una porción de tetrazol que se selecciona del grupo que consiste en tetrazol-C16, tetrazol-C17 y tetrazol C18.

- 5 En una modalidad, el derivado de insulina comprende un grupo funcional que es tetrazol-C16 que se representa por la estructura siguiente:



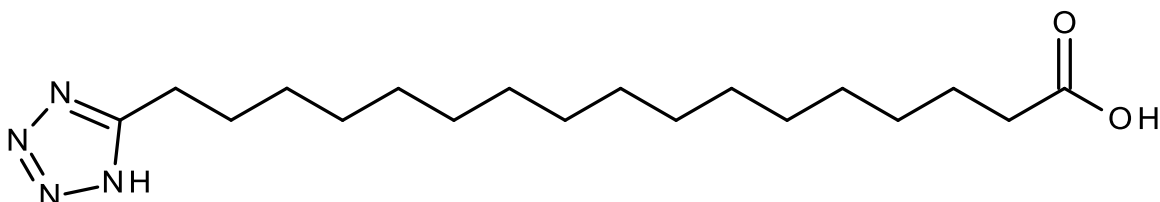
10

En una modalidad, el derivado de insulina comprende un grupo funcional que es tetrazol-C17 que se representa por la estructura siguiente:



15

En una modalidad, el derivado de insulina comprende un grupo funcional que es tetrazol-C18 que se representa por la estructura siguiente:



20

- 25 En una modalidad, el derivado de insulina comprende un ácido graso.

En una modalidad, el derivado de insulina comprende un ácido graso de fórmula:

Químico 3: $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x-\text{CH}_3$

en donde x representa un número entero en el intervalo de 8 a 16.

Enlazador

- 30 El término “**enlazador**” como se usa en la presente incluye cadenas laterales adecuadas que pueden unir una porción, tal como un grupo acilo, a la insulina o análogo de insulina. Por lo tanto, el enlazador y el grupo acilo se convierten en una cadena lateral juntos. La porción unida al enlazador puede ser cualquier porción adecuada. Los ejemplos incluyen una porción de unión a albúmina.

- 35 El enlazador puede contribuir y/o mejorar el efecto de unión de la porción (por ejemplo, la porción de unión a albúmina), por ejemplo, un enlazador que comprende gGlu pueden mejorar el efecto de unión a la albúmina de la insulina o del análogo de insulina.

En una modalidad la cadena lateral comprende una porción entre el grupo acilo y el punto de unión a la insulina o análogo de insulina, la porción puede referirse como una

- 40 “**enlazador**”, “**porción enlazadora**”, “**grupo enlazador**”, “**grupo de unión**”,

“espaciador”, o similares. El enlazador puede ser opcional, y por lo tanto, en ese caso la cadena lateral puede ser idéntica al grupo acilo.

El grupo acilo o el enlazador pueden unirse covalentemente a un residuo de lisina del péptido de insulina por acilación, es decir, mediante un enlace amida formado entre un grupo de ácido carboxílico de este (del grupo acilo, la porción de unión a albúmina, la porción de prolongación o el enlazador) y un grupo amino del residuo de lisina o residuo de aminoácido en el extremo N-terminal. Los compuestos químicos de conjugación adicionales o alternativos incluyen alquilación, formación de éster, formación de amida, o acoplamiento a un residuo de cisteína, tal como por acoplamiento a maleimida o haloacetamida (tal como bromo-/cloro-/yodo-).

En una modalidad preferida, un éster activo del grupo acilo, que comprende preferentemente una porción de prolongación y un enlazador, se une covalentemente a un grupo amino de un residuo de lisina, preferentemente el grupo de aminoácidos épsilon de este, bajo la formación de un enlace de amida, como se explicó anteriormente.

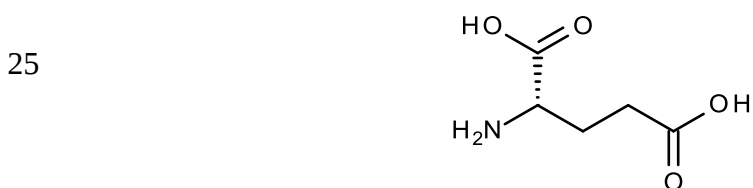
En otra modalidad, el grupo enlazador está ausente y representa un enlace covalente.

En una modalidad, los derivados de insulina de la invención comprenden un grupo enlazador de la fórmula -L1-L2-L3, en donde:

- L1 está ausente o representa OEG, gGlu, DgGlu o sulfonimida C-4
- L2 está ausente o representa OEG, gGlu, DgGlu o sulfonimida C-4
- L3 está ausente o representa OEG, gGlu, DgGlu o sulfonimida C-4

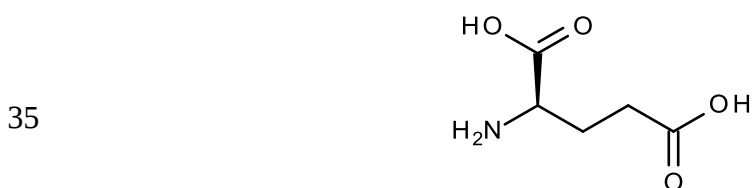
en donde

- gGlu representa un residuo de ácido gamma glutámico representado por la estructura siguiente:



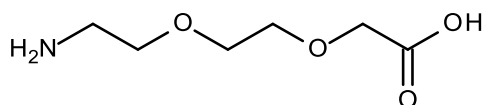
en donde el grupo carboxilo a la derecha de la estructura es el grupo gamma carboxi que forma el enlace con el grupo amino vecino

- DgGlu representa un residuo de ácido gamma glutámico representado por la estructura siguiente:



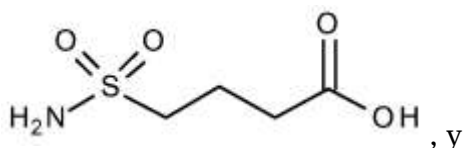
en donde el grupo carboxilo a la derecha del dibujo de la estructura es el grupo gamma carboxi que forma el enlace con el grupo amino vecino

- OEG representa [2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilo y se representa por la estructura siguiente:



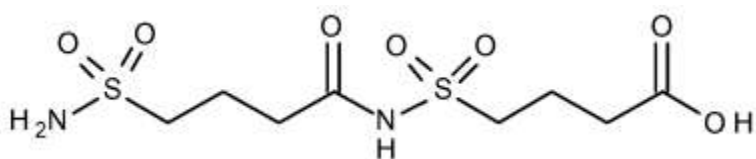
5

- sulfonimida C-4 se representa por la estructura siguiente:



10

- 2xsulfonimida-C4 o sulfonimiida-C4-sulfonimida-C4, se representa por la estructura siguiente:

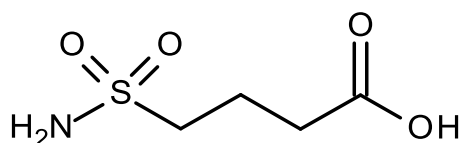


15

En una modalidad, los péptidos de insulina de la invención comprenden un grupo enlazador que representa un grupo de unión divalente que se selecciona de DgGlu, gGlu, gGlu-gGlu, gGlu-OEG, gGlu-OEG-OEG, OEG, sulfonimida-C4, y 2x sulfonimida-C4, en donde

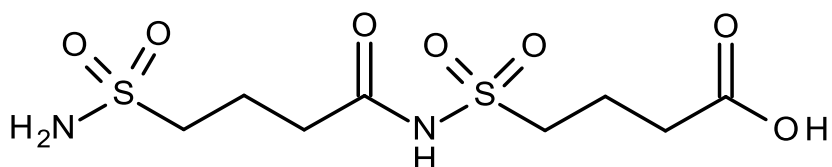
- gGlu representa un residuo de ácido gamma glutámico; y
- OEG representa el aminoácido con la fórmula $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COOH}$, correspondiente al grupo o residuo $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$, también designado [2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetil.
- sulfonimida-C4, que se representa por la estructura siguiente:

25



- 2xsulfonimida-C4 o sulfonimiida-C4-sulfonimida-C4, que se representa por la estructura siguiente:

30



35

Los ejemplos no limitantes de enlazadores se seleccionan de la lista que consiste en: DgGlu, gGlu, gGlu-gGlu, gGlu-OEG, gGlu-OEG-OEG, OEG, sulfonimida-C4, 2x sulfonimida-C4.

En una modalidad, el grupo de unión está ausente.

- 5 En una modalidad, el grupo de unión es DgGlu.

En una modalidad, el grupo de unión es gGlu.

En una modalidad, el grupo de unión es gGlu-gGlu.

En una modalidad, el grupo de unión es gGlu-OEG.

En una modalidad, el grupo de unión es gGlu-OEG-OEG.

- 10 En una modalidad, el grupo de unión es OEG.

En una modalidad, el grupo de unión es sulfonimida-C4.

En una modalidad, el grupo de unión es sulfonimida-C4-sulfonimida-C4 o 2xsulfonimida C-4.

Productos intermedios

- 15 La invención se refiere, además, a un producto intermedio en la forma de una cadena principal novedosa, que cuando se une a los sustituyentes de la invención, conduce a los péptidos derivados de la insulina de la invención.

La invención también se refiere a un producto intermedio en forma de la cadena principal novedosa de los péptidos de insulina de la invención, que se selecciona del grupo que

- 20 consiste en:

- i. A14E, B5Y, B26A, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 4)
- ii. A14E, B5Y, B26G, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 5)
- iii. B5Y, B26A, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 7)
- iv. B5Y, B26G, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 8)
- 25 v. B5Y, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 9)
- vi. A14E, B5F, B26G, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 10)
- vii. B5F, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 11)
- viii. B5Y, B26K, desB27-desB30 (SEQ ID NO: 1 y 12)
- ix. B5Y, desB30 (SEQ ID NO: 1 y 13)
- 30 x. B5Y, B26G, desB30 (SEQ ID NO: 1 y 14)
- xi. B5Y, B26A, desB30 (SEQ ID NO: 1 y 15)
- xii. B5F, B26A, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 6)
- xiii. B5Y, B26A, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 4)
- xiv. B5Y, B26G, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 5)
- 35 xv. B5F, B26G, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 10)
- xvi. A14E, B5F, B26A, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 6)
- xvii. A14E, B5Y, B26A, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 7)
- xviii. A14E, B5Y, B26G, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 8)
- xix. A14E, B5Y, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 9)
- 40 xx. A14E, B5F, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 11)

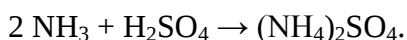
- xxi. A14E, B5Y, B26K, desB27-desB30 (SEQ ID NO: 3 y 12)
- xxii. A14E, B5Y, desB30 (SEQ ID NO: 3 y 13)
- xxiii. A14E, B5Y, B26G, desB30 (SEQ ID NO: 3 y 14)
- xxiv. A14E, B5Y, B26A, desB30 (SEQ ID NO: 3 y 15)

5 o una sal, amida o éster aceptable farmacéuticamente de este.

Sales, amida o éster aceptables farmacéuticamente

Los productos intermedios, análogos y derivados de la invención pueden estar en forma de una sal, amida o éster aceptable farmacéuticamente.

Las sales se forman, por ejemplo, mediante una reacción química entre una base y un ácido,
10 por ejemplo:



La sal puede ser una sal básica, una sal ácida, o puede no ser ninguna de estas (es decir una sal neutral). Las sales básicas producen iones de hidróxido y sales de ácido de iones de hidroincorporación en agua.

15 Las sales de los derivados de la invención pueden formarse con cationes o aniones añadidos que reaccionan con grupos aniónicos o catiónicos, respectivamente. Estos grupos pueden ubicarse en la porción peptídica, y/o en la cadena lateral de los derivados de la invención.

Los ejemplos no limitantes de grupos aniónicos de los derivados de la invención incluyen grupos carboxílicos libres en la cadena lateral, si los hay, así como también en la porción
20 peptídica. La porción peptídica a menudo incluye un grupo de ácido carboxílico libre en el extremo C terminal, y puede incluir, además, grupos carboxílicos libres en los residuos de aminoácidos ácidos interno tales como Asp y Glu.

Los ejemplos no limitantes de grupos catiónicos en la porción peptídica incluyen el grupo amino libre en el extremo N terminal, si está presente, así como también cualquier grupo
25 amino libre en los residuos de aminoácidos básicos internos tales como His, Arg y Lys.

El éster de los derivados de la invención puede, por ejemplo, formarse mediante la reacción de un grupo de ácido carboxílico libre con un alcohol o un fenol, que conduce al reemplazo de al menos un grupo hidroxilo por un grupo alcoxi o ariloxi.

La formación de éster puede involucrar al grupo carboxílico libre en el extremo C-terminal
30 del péptido, y/o cualquier grupo carboxílico libre en la cadena lateral.

La amida de los derivados de la invención puede, por ejemplo, formarse mediante la reacción de una forma activada de un grupo de ácido carboxílico libre con una amina o una amina sustituida, o mediante la reacción de un grupo amino libre o sustituido con una forma activada de un ácido carboxílico.

35 La formación de amida puede implicar el grupo carboxílico libre en el extremo C-terminal del péptido, cualquier grupo carboxílico libre en la cadena lateral, el grupo amino libre en el extremo N-terminal del péptido, y/o cualquier grupo amino libre o sustituido del péptido en el péptido y/o la cadena lateral.

En una modalidad particular, el péptido o derivado se encuentra en forma de una sal
40 aceptable farmacéuticamente. En otra modalidad particular, el derivado está en la forma de

una amida farmacéuticamente aceptable, preferentemente con un grupo amida en el extremo C terminal del péptido. Aún en otra modalidad particular, el péptido o derivado está en la forma de un éster aceptable farmacéuticamente.

Estabilidad

- 5 La estabilidad de un derivado de insulina se define como la capacidad de mantener una estructura tridimensional (estabilidad física) así como también la capacidad de resistir cambios covalentes en la estructura (estabilidad química). Una estabilidad favorable puede deberse a propiedades inherentes del derivado de insulina solo o a un resultado de interacciones favorables entre el derivado de insulina y uno o más ingredientes contenidos
10 en el vehículo.

La estabilidad satisfactoria de un derivado de insulina se define como estabilidad comparable a, o mejor que la de la insulina aspart.

En un aspecto la invención proporciona derivados de la insulina con estabilidad satisfactoria en la formulación.

- 15 En un aspecto la invención proporciona derivados de la insulina con estabilidad mejorada en la formulación.

Los inventores descubrieron que los derivados de insulina de acuerdo con la invención tienen una estabilidad satisfactoria en la formulación. Los inventores descubrieron, sorprendentemente, que los derivados de insulina humana de acuerdo con la invención
20 tienen estabilidad satisfactoria y retienen la activación parcial del receptor de insulina.

La estabilidad puede determinarse mediante métodos convencionales y varios métodos estándar conocidos por los expertos en la técnica.

- Los derivados de insulina pueden tamizarse, por ejemplo, en busca de estabilidad en formulaciones que incluyen zinc y fenol. En una modalidad, el objetivo es obtener una
25 formulación que incluya un único estado de autoasociación de insulina (por ejemplo, un estado hexamérico) que no cambia durante el almacenamiento o a una temperatura aumentada.

- Un ejemplo de un método para medir la estabilidad es la Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), que es un método común para evaluar la estabilidad de las proteínas,
30 típicamente, mediante la evaluación de la temperatura de aparición ($T_{\text{aparición}}$) de desplegamiento o, más frecuentemente, por el punto medio de desplegamiento térmico (T_m) en el derivado de insulina de autoasociación. Se ha descrito en la literatura (Huus y otros, Biochemistry (2005) 44, 11171-11177) cómo el desplegamiento térmico (por DSC) de insulina se correlaciona con la estabilidad del hexámero de zinc y con que, además, con la
35 estabilidad de la formulación de insulina (Huus y otros, Pharm Res (2006) 23(11), 2611-20). Una temperatura de aparición baja puede verse como disociación de insulina mientras que una temperatura de aparición más alta indica un complejo derivado de insulina estable hasta la temperatura de desplegamiento. Se obtiene una estabilidad satisfactoria en $T_{\text{aparición}}$ y T_m aproximadamente o por encima de $T_{\text{aparición}}$ y T_m para la insulina aspart (insulina
40 humana B28D) en condiciones que se asemejan a una formulación farmacéutica.

Otro ejemplo de tal método es la evaluación de la autoasociación de insulina mediante la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), mediante el uso de un eluyente que se asemeja a la condición de formulación que añade fenol y mantiene baja la fuerza iónica. Los picos amplios y prolongados son signos de numerosos estados de autoasociación que cambian durante la cromatografía mientras que un pico agudo único indica un estado de autoasociación estable.

En una modalidad, un derivado de insulina de acuerdo con la invención tiene una estabilidad química y/o física satisfactoria con relación a la insulina aspart.

En otra modalidad, un derivado de insulina de acuerdo con la invención tiene una estabilidad química y/o física satisfactoria con relación al derivado de insulina correspondiente sin la mutación B5Y o B5F.

A menos que se indique de cualquier otra manera en la descripción, los términos presentados en forma singular incluyen, además, la situación en plural.

Biología in vitro

15 Unión a insulina y activación/fosforilación del receptor

La activación del receptor de insulina por la insulina conduce a la activación del receptor, es decir, la fosforilación de varios residuos en el receptor, cuya activación resulta en una cascada de respuestas celulares, que incluye los procesos celulares que contribuyen a disminuir la concentración de glucosa en plasma, los procesos celulares que regulan el metabolismo de los lípidos, y los procesos celulares que promueven el crecimiento y la proliferación celular.

Aunque los derivados de la insulina de la invención son totalmente capaces de desplazar la insulina humana del receptor de insulina, de hecho inducen fosforilación submáxima del receptor de insulina. Los derivados de la insulina de la presente invención, por lo tanto, pueden considerarse agonistas parciales con respecto a la fosforilación del receptor de insulina, y pueden referirse como “derivadosparciales de insulina”.

En el contexto de esta invención, los “derivadosparciales de insulina” se definen como análogos de insulina, que inducen la fosforilación del receptor de insulina, pero la máxima respuesta obtenida, es decir el nivel máximo de fosforilación del receptor de insulina, es menor que la respuesta máxima que induce la insulina humana, y, es decir, menos del 65 % de la respuesta máxima que induce la insulina humana.

Una respuesta submáxima o efecto submáximo puede definirse como una respuesta máxima inducida por un derivado insulina parcial de la invención que es menor que la respuesta máxima que induce la insulina humana. Para determinar si un derivado de la insulina tiene un efecto submáximo, la respuesta máxima de dicho derivado tiene que determinarse en un ensayo y compararse con la respuesta máxima de la insulina humana. La respuesta máxima de un derivado de la insulina puede determinarse mediante la medición de la respuesta en presencia de cantidades crecientes del derivado de insulina, para obtener una curva de respuesta a la dosis. La respuesta máxima (Superior) puede calcularse

a partir de la curva de respuesta a la dosis y compararse con la máxima respuesta que induce la insulina humana.

La unión a la insulina y la fosforilación del receptor pueden determinarse mediante métodos convencionales, y se conocen varios ensayos estándar por los expertos en la técnica. Tales ensayos estándar para la determinación *in vitro* incluyen, por ejemplo, ensayos de radio-receptor de insulina, en los cuales la afinidad relativa de un derivado de insulina se define como la relación de la insulina con respecto al derivado de insulina que se requiere para desplazar el 50 % de la insulina marcada con I¹²⁵ que se une específicamente a los receptores de insulina, por ejemplo, en células completas, en fracciones de membrana celular, o en receptores purificados, así como también en ensayos de fosforilación del receptor de insulina, en los que la capacidad del derivado de insulina para activar el receptor de insulina se determina, por ejemplo, mediante la medición de la fosforilación de residuos de tirosina en el receptor de insulina, mediante el uso de, por ejemplo, técnicas de ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas (ELISA) o transferencia Western.

En una modalidad, los derivados de la insulina de la presente invención inducen una fosforilación submáxima del receptor de insulina de aproximadamente o menos de 65 %, en comparación con la insulina humana.

En una modalidad, el derivado de insulina de la presente invención induce una fosforilación submáxima del receptor de insulina de aproximadamente o menos de 60 %, en comparación con la insulina humana.

En una modalidad, el derivado de insulina de la presente invención induce una fosforilación submáxima del receptor de insulina de aproximadamente o menos de 50 %, en comparación con la insulina humana.

En una modalidad, el derivado de insulina de la presente invención induce una fosforilación submáxima del receptor de insulina de aproximadamente o menos de 40 %, en comparación con la insulina humana.

En una modalidad, el derivado de insulina de la presente invención induce una fosforilación submáxima del receptor de insulina de aproximadamente o menos de 30 %, en comparación con la insulina humana.

En una modalidad, el derivado de insulina de la presente invención induce una fosforilación submáxima del receptor de insulina de aproximadamente o menos de 20 %, en comparación con la insulina humana.

En una modalidad, el derivado de insulina de la presente invención induce una fosforilación submáxima del receptor de insulina de aproximadamente o menos de 15 %, en comparación con la insulina humana.

En una modalidad, el derivado de insulina de la presente invención induce una fosforilación submáxima del receptor de insulina de aproximadamente o menos de 12 %, en comparación con la insulina humana.

En una modalidad, los derivados de insulina de la presente invención inducen una fosforilación del receptor de insulina de aproximadamente o por encima de 1 %, en comparación con la insulina humana.

En una modalidad, los derivados de insulina de la presente invención son capaces de inducir la fosforilación del receptor de insulina.

Señalización del receptor de insulina

La activación del receptor de insulina inicia una cascada de respuestas intracelulares, tales como la fosforilación de residuos de, y la activación de, diversas proteínas intracelulares, que incluyen la Cinasa regulada extracelular (ERK), conocida además como MAP Cinzas (MAPK), y AKT, además conocida como Proteína Cinasa B (PKB). La activación de AKT es importante para inducir los procesos celulares que contribuye a disminuir la concentración de glucosa en sangre, mientras que la activación de ERK es importante para inducir los procesos celulares que contribuyen a promover el crecimiento celular y la proliferación en células de crecimiento.

La vía de señalización de AKT es un ejemplo de una vía de transducción de señales que es importante para las vías de disminución de la glucosa, en donde AKT es una proteína clave. En personas con diabetes Tipo 2, la activación de la vía de señalización AKT se afecta grandemente, lo que conduce a una disminución en la absorción de glucosa en el músculo esquelético y en el tejido adiposo. Sin embargo, la vía de señalización de ERK continúa respondiendo a la insulina y es un ejemplo de una vía no resistente que puede sobreestimarse durante el tratamiento. La activación de la vía de ERK mediante la insulina, además, estimula la migración y proliferación de los VSCS y la síntesis de colágeno, que son etapas críticas para la progresión de las lesiones ateroscleróticas. En una modalidad preferida, los derivados de insulina de la invención inducen un efecto submáximo en la vía de señalización de ERK.

Los ensayos para medir la señalización activada por insulina, por ejemplo, la capacidad de fosforilar las moléculas de señalización tales como ERK y AKT *in vitro*, son conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, técnicas de transferencia Western, técnicas Surefire y/o ELISA.

Los derivados de insulina de la presente invención tienen un efecto submáximo menor sobre la activación de ERK (fosforilación) que en la activación de AKT (fosforilación), en comparación con el efecto de la insulina humana.

Sorprendentemente, hemos descubierto que existe una correlación entre la máxima fosforilación del receptor de insulina (es decir, el grado de parcialidad del receptor de insulina) que un compuesto de prueba es capaz de inducir y su capacidad para activar las vías de disminución de glucosa sin sobreestimular las vías de no resistencia. Por ejemplo, los compuestos de la presente invención tienen un efecto submáximo más bajo sobre la activación de ERK (fosforilación) que en la activación de AKT (fosforilación), en comparación con la insulina humana y son capaces de disminuir los niveles de glucosa en sangre, pero tienen efectos mejorados sobre los procesos relacionados con, por ejemplo, el

metabolismo de los lípidos, tales como menos ganancia de peso, menos aumento en la masa de grasa corporal y mayor disminución de los TG hepáticos, y/o mejor función endotelial.

La parcialidad se define como que tiene la relación de fosforilación máxima del receptor de insulina del compuesto de prueba/la fosforilación máxima del receptor de insulina de la relación de insulina humana, menor que 1.

En una modalidad, la presente invención se refiere a un método para medir la parcialidad del receptor de insulina, que comprende las etapas siguientes:

a) medir la máxima fosforilación del receptor de insulina inducida por un compuesto de prueba

10 b) medir la máxima fosforilación del receptor de insulina inducida por la insulina humana en donde la relación de a)/b) es menor que 1.

En una modalidad dicha parcialidad del receptor de insulina es menor que 0.65.

En una modalidad dicha parcialidad del receptor de insulina es menor que 0.6.

En una modalidad dicha parcialidad del receptor de insulina es menor que 0.5.

15 En una modalidad dicha parcialidad del receptor de insulina es menor que 0.4.

En una modalidad dicha parcialidad del receptor de insulina es menor que 0.3.

En una modalidad dicha parcialidad del receptor de insulina es menor que 0.2.

En una modalidad dicha parcialidad del receptor de insulina es menor que 0.15.

En una modalidad dicha parcialidad del receptor de insulina es menor que 0.12.

20 La selectividad se define como la capacidad de un compuesto de prueba de activar las vías de disminución de glucosa sin sobreestimar las vías de no resistencia, en donde la relación es menor que 1.

En una modalidad, la presente invención se refiere a un método para medir la selectividad, que comprende medir independientemente la fosforilación máxima de las vías de disminución de glucosa y las vías de no resistentes en comparación con la insulina humana y determinar si la relación entre las vías de disminución de la glucosa/vías de no resistentes es menor que 1.

25 En una modalidad, la presente invención se refiere a un método para medir la selectividad, que comprende medir independientemente la fosforilación máxima de ERK y AKT en comparación con la insulina humana y determinar si la relación entre ERK/AKT es menor que 1.

En una modalidad dicha relación es menor que 0.8.

En una modalidad dicha relación es menor que 0.7.

En una modalidad dicha relación es menor que 0.6.

35 En una modalidad dicha relación es menor que 0.5.

En una modalidad dicha relación es menor que 0.4.

Vías del metabolismo de lípidos/no resistencia

Los derivados de insulina de la presente invención, en comparación con la insulina humana, son capaces de disminuir los niveles de glucosa en sangre sin sobreestimar las vías de no

resistencia, por ejemplo, presentan efectos submáximos sobre las vías del metabolismo de los lípidos.

Como se describió anteriormente, las cascadas de señalización iniciadas por la insulina a través del receptor de insulina conducen a una amplia gama de efectos celulares, que incluyen los efectos sobre las vías del metabolismo de lípidos. Como se define en la presente descripción, el término “vías del metabolismo de los lípidos” cubre las acciones biológicas inducidas o inhibidas por la insulina, cuyas acciones afectan, por ejemplo, la síntesis de triglicéridos en el hígado. Un ejemplo de una vía de no resistencia es la vía de señalización de ERK.

En una modalidad preferida los derivados de insulina de la invención inducen un efecto submáximo sobre las vías metabólicas relacionadas con la síntesis de lípidos de novo (DNL) en hepatocitos primarios en comparación con el efecto de la insulina humana. Los ensayos estándar para medir el efecto sobre la síntesis de ácidos grasos en el hígado son conocidos por los expertos e incluyen, por ejemplo, determinar el efecto en la lipogénesis *de novo* mediante la medición de la conversión de Acetato marcado con C¹⁴ en material extraíble orgánico (es decir, lípidos) en hepatocitos primarios.

Las cascadas de señalización iniciadas por la insulina a través del receptor de insulina conduce a la inducción de las enzimas necesarias para regular el metabolismo de los lípidos. Ejemplo de tal enzima es la ácido graso sintasa (FAS). FAS es una enzima clave en los procesos celulares que sirven para regular la síntesis de lípidos.

Los derivados de insulina de la invención tienen, además, un efecto submáximo sobre los factores que codifican el ARNm implicados en la síntesis de lípidos, por ejemplo FAS que solo se indujeron por debajo del máximo por los derivados de la insulina de la presente invención en hepatocitos primarios, en comparación con la insulina humana.

Los ensayos estándar para medir la capacidad de la insulina y sus análogos y derivados para inducir o inhibir la expresión del ARNm de los genes implicados en las vías del metabolismo de los lípidos, se conocen por los expertos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, la medición de la expresión de la expresión del ARNm mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (RT-PCR).

Vías de disminución de la glucosa

Mientras que los derivados de la insulina de la invención presentan un efecto submáximo inferior en las vías relacionadas con las vías de no resistencia tales como el metabolismo de los lípidos, son capaces de inducir la misma respuesta máxima en las vías de disminución de la glucosa como la insulina humana.

En el contexto de esta invención el término “vías de disminución de la glucosa” cubre las acciones biológicas inducidas por la insulina que provocan la disminución de la concentración de glucosa en plasma, tal como la promoción del almacenamiento de glucosa en el hígado, donde la insulina activa las enzimas que promueven la glicólisis y la glicogénesis, y suprime las implicadas en la gluconeogénesis, tales como promover la

incorporación de glucosa en lípidos en los adipocitos, y aumentar la absorción de glucosa, por ejemplo, en los músculos.

Como se describió anteriormente, las cascadas de señalización iniciadas por la insulina a través del receptor de insulina conduce a una amplia gama de efectos celulares, que incluyen los efectos en las vías de disminución de la glucosa. Los ejemplos de los procesos celulares estimulados con insulina que sirven para disminuir la concentración de glucosa en el plasma facilitan la entrada de glucosa en músculo, el tejido adiposo y en diversos otros tejidos, y estimulan el hígado para almacenar la glucosa en forma de glucógeno. La vía de señalización de AKT es un ejemplo de una vía de transducción de señales que es importante para las vías de disminución de la glucosa, en donde AKT es una proteína clave. Los ensayos *in vitro* para medir el efecto de la insulina humana, o análogos y derivados de esta, en las vías de disminución de la glucosa son conocidos por los expertos, e incluyen, por ejemplo, los ensayos con hepatocitos de rata aislados, donde la síntesis de glucógeno puede determinarse mediante la medición de la acumulación de glucógeno, y los ensayos de lipogénesis, realizados, por ejemplo, con adipocitos de rata en donde se mide la cantidad de glucosa [$3\text{-}^3\text{H}$] convertida en un material extraíble orgánico (es decir lípidos).

Las cascadas de señalización iniciadas por la insulina a través del receptor de insulina conducen, además, a la activación y/o inducción de enzimas y factores de transcripción necesarios para regular las vías de disminución de glucosa. Un ejemplo de tal enzima es la glucosa-6-fosfatasa (G6Pc). La G6Pc es una enzima limitante de la tasa de gluconeogénesis que resulta en la generación de glucosa a partir de sustratos de carbono no carbohidrato, tales como piruvato, lactato, glicerol, aminoácidos glucogénicos, y ácidos grasos de cadena impar.

Los derivados de la insulina de la invención tienen el mismo efecto máximo que la insulina humana sobre los factores que codifican los ARNm implicados en la gluconeogénesis en hepatocitos primarios de rata.

Los derivados de la insulina de la invención tienen el mismo efecto máximo que la insulina humana en los factores que codifican ARNm implicados en la gluconeogénesis en hepatocitos primarios de rata.

Los ensayos estándar para medir la capacidad de la insulina humana o sus análogos y derivados para inducir o inhibir la expresión del ARNm de genes implicados en ensayos de las vías de disminución de la glucosa se conocen, además, por los expertos en la técnica, e incluyen, es decir, medir la expresión del ARNm mediante el uso de RT-PCR cuantitativa.

Los derivados de la insulina de la invención presentan efecto completo (máximo) en las vías de disminución de glucosa, tales como la expresión de ARNm que codifica enzimas implicadas en gluconeogénesis, la estimulación de la síntesis de glucógeno, la incorporación de glucosa en lípidos, en células primarias, por ejemplo, músculo, hepatocitos y/o adipocitos, cuando se compara con los efectos de la insulina humana.

Los derivados de la insulina exhiben la misma respuesta máxima para estimular la incorporación de glucosa en lípidos en los adipocitos de rata primarios como la insulina humana.

Biología *in vivo*

- 5 En otra modalidad particular los derivados de la insulina de la invención son capaces de disminuir los niveles de glucosa en sangre *in vivo*, y tienen efectos mejorados sobre los procesos relacionados con el metabolismo de lípidos, tales como una menor ganancia de peso, menor aumento en la masa de grasa corporal, aumento de la disminución de triglicéridos hepáticos, o mejor función endotelial en comparación con la insulina humana,
10 que puede determinarse como se conoce en la técnica en cualquier modelo animal adecuado, así como en ensayos clínicos.

El ratón con obesidad inducida por la dieta C57BL/6J (DIO) es un ejemplo de un modelo animal adecuado, y los efectos de la glucosa en sangre y/o los efectos sobre los procesos relacionados con el metabolismo de lípidos, tales como menos ganancia de peso, menos
15 aumentos en la masa de grasa corporal o el aumento o disminución de los triglicéridos hepáticos, pueden determinarse en tales ratones, por ejemplo, como se describe en el Ensayo (II).

La integridad estructural y funcional del endotelio es crucial para mantener la homeostasis vascular y prevenir la aterosclerosis. La disfunción endotelial comprende una cantidad de
20 alteraciones funcionales en el endotelio vascular y el deterioro de la función endotelial arterial es un evento temprano en la aterosclerosis y se correlaciona con los principales factores de riesgo de la enfermedad cardiovascular. Por lo tanto, sería una ventaja importante tener derivados de insulina que impidan o reduzcan la disfunción endotelial ya que estos tendrían un efecto beneficioso sobre la aterosclerosis y/o la CVD.

- 25 En una modalidad, la presente invención proporciona derivados de la insulina, que son capaces de disminuir de los niveles de glucosa en sangre y tienen efectos mejorados sobre la función endotelial en comparación con la terapia de la insulina convencional, por ejemplo, prevenir o reducir la disfunción endotelial.

En otra modalidad, la presente invención proporciona derivados de la insulina que
30 previenen o reducen una enfermedad cardiovascular en un sujeto diabético y/o previenen o reducen el desarrollo de aterosclerosis.

La función endotelial arterial puede medirse mediante métodos conocidos por un experto en la técnica, tal como la medición del efecto sobre la relajación del vaso inducida por la acetil-colina en arterias mesentéricas, por ejemplo, como se describe en el Ensayo (II).

- 35 El metabolismo hepático se desregula gravemente en la diabetes. Normalmente, menos de 5 % del volumen hepático es grasa, pero en pacientes con esteatohepatitis no alcohólica (NASH) o enfermedades del hígado graso no alcohólicas (EHLN), hasta 50 %-80 % del peso del hígado puede estar formado por grasa, mayormente en forma de triglicéridos, ver, por ejemplo: Sanyal, A. J. en “AGA technical review on non-alcoholic fatty liver disease”,
40 Gastroenterology 2002; 123, 1705-1725.

En una modalidad preferida, la presente invención proporciona derivados, de la insulina, que son capaces de disminuir los niveles de glucosa en sangre, pero resulta en un contenido de triglicéridos hepáticos menor en comparación con la terapia con la insulina convencional.

- 5 El contenido de triglicéridos hepáticos puede medirse mediante métodos conocidos por un experto en la técnica, por ejemplo, como se describe en (Ensayo II).

Producción de péptidos de insulina

- La producción de polipéptidos, por ejemplo, insulinas, se conoce bien en la técnica. La insulina puede producirse, por ejemplo, mediante síntesis clásica de péptidos, por ejemplo, síntesis de péptidos en fase sólida mediante el uso de la química de t-Boc o Fmoc u otras técnicas bien establecidas, ver, por ejemplo, Greene y Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, 1999. La insulina puede producirse, además, mediante un método que comprende el cultivo de una célula huésped que contiene una secuencia de ADN que codifica el análogo y es capaz de expresar el análogo de insulina en un medio nutriente adecuado en condiciones que permiten la expresión del péptido insulina. Pueden usarse diversos métodos recombinantes en la producción de insulina humana y análogos de insulina humana. Los ejemplos de métodos que pueden usarse en la producción de insulina en microorganismos tales como, por ejemplo, *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* se describe, por ejemplo, en el documento WO2008034881.

- 20 Típicamente, el análogo de insulina se produce mediante la expresión de una secuencia de ADN que codifica el análogo de insulina en cuestión o un precursor de esta en una célula huésped adecuada mediante técnicas bien conocidas como se describe, por ejemplo, en los documentos EP1246845 o WO2008034881.

- El análogo de insulina puede expresarse con una extensión N-terminal como se describe en el documento EP 1,246,845. Después de la secreción al medio de cultivo y la recuperación, el precursor de insulina se someterá a diversos procedimientos in vitro para eliminar la posible secuencia de extensión del extremo N-terminal y el péptido de conexión para dar el análogo de insulina. Tales métodos incluyen la conversión enzimática por medio de tripsina o una proteasa de *Achromobacter lyticus* en presencia de un éster de L-treonina seguido de la conversión del éster de treonina del análogo de insulina en el análogo de insulina mediante hidrólisis básica o ácido como se describe en los documentos US4343898 o US4916212

Los ejemplos de extensiones N-terminal del tipo adecuado en la presente invención se describen en los documentos US5395922 y EP765395.

- 35 Para los análogos de insulina que comprenden residuos de aminoácidos no naturales, la célula recombinante debe modificarse de manera que los aminoácidos no naturales se incorporen en el análogo, por ejemplo, mediante el uso de mutantes de ARNt. Por lo tanto, brevemente, los péptidos de insulina de acuerdo con la invención se preparan de manera análoga a la preparación de análogos conocidos de insulina.

- 40 **Purificación de proteínas**

Los análogos de insulina usados para producir los derivados de insulina de la invención se recuperan del medio de cultivo celular. El análogo de insulina usado para producir derivados de insulina de la presente invención puede purificarse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, hidrofóbico, cromatografía de exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoque preparativo (IEF), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio) o extracción (ver, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson y Lars Ryden, editores, VCH Editor publicista, Nueva York, 1989). Preferentemente, pueden purificarse mediante cromatografía de afinidad en una columna de anticuerpo anti-“[una insulina/ análogo de insulina/derivado de insulina]”. La purificación adicional puede lograrse mediante medios de purificación química convencionales, tales como cromatografía líquida de alto rendimiento. Otros métodos de purificación, que incluyen precipitación de citrato de bario, se conocen en la técnica, y pueden aplicarse a la purificación de la novedosa “[una insulina/análogo de insulina/derivado de insulina]” descrita en la presente descripción (ver, por ejemplo, Scopes, R., Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y., 1982).

Formulaciones farmacéuticas

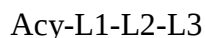
Las composiciones inyectables que contienen un derivado de insulina de esta invención pueden prepararse mediante el uso de las técnicas convencionales de la industria farmacéutica que implican disolver y mezclar los ingredientes según sea apropiado para dar el producto final deseado. Por lo tanto, de acuerdo con un procedimiento, un derivado de insulina de la invención se disuelve en una cantidad de agua que es un poco menor que el volumen final de la composición a preparar. Se añade un agente isotónico, un conservante y un tampón como se requiera y se ajusta el valor de pH de la solución, de ser necesario, mediante el uso de un ácido, por ejemplo, ácido clorhídrico, o una base, por ejemplo, hidróxido de sodio acuoso, según sea necesario. Finalmente, el volumen de la solución se ajusta con agua para dar la concentración deseada de los ingredientes.

Opcionalmente, una preparación de insulina de esta invención, por ejemplo una solución o suspensión, puede prepararse mediante la disolución de un derivado de insulina de la invención en un medio acuoso, por ejemplo, en una concentración en el intervalo de aproximadamente 240 a aproximadamente 6,000 nmol/ml. El medio acuoso se hace isotónico, por ejemplo, con cloruro de sodio, propilenglicol o glicerol. Además, el medio acuoso puede contener tampones tales como acetato o citrato, conservantes tales como m-cresol o fenol e iones de zinc, por ejemplo, en una concentración de hasta aproximadamente de 12 Zn/6 ins. El valor de pH de la solución se ajusta hacia la neutralidad sin llegar demasiado al punto isoeléctrico del compuesto de esta invención para evitar la precipitación potencial. El valor de pH de la preparación final de la insulina depende de qué compuesto de esta invención se usa, de la concentración de iones de zinc y de la concentración del compuesto de esta invención. La preparación de insulina se realiza estéril, por ejemplo, mediante filtración estéril.

MODALIDADES

La invención se describe adicionalmente mediante las siguientes modalidades no limitantes:

1. Un derivado de insulina, en donde dicho derivado de insulina comprende B5Y o B5F y un sustituyente que comprende un grupo acilo, o una sal, amida o éster aceptable farmacéuticamente de este.
2. El análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho derivado de insulina comprende, además, una o más sustituciones y/o deleciones de aminoácidos.
3. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho derivado de insulina comprende, además, hasta 5 sustituciones y/o deleciones adicionales.
4. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho derivado de insulina comprende, además, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos.
5. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-4, en donde dicho derivado de insulina comprende, además, B26G o B26A.
6. El derivado de insulina de acuerdo con la modalidad 5, en donde dicho derivado de insulina comprende, además, B26G.
7. El derivado de insulina de acuerdo con la modalidad 5, en donde dicho derivado de insulina comprende, además, B26A.
8. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-7, en donde dicho sustituyente tiene la fórmula (I) siguiente:



en donde:

Acy es un grupo acilo y se representa por ácido litocólico, o por un grupo funcional de las fórmulas:

Químico 1: $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x-\text{COOH}$; o

Químico 2: $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x$ -tetrazolilo;

en donde x representa un número entero en el intervalo de 12 a 20; y el grupo tetrazolilo es 1H-tetrazol-5-ilo

o un ácido graso de fórmula:

Químico 3: $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x-\text{CH}_3$

en donde x representa un número entero en el intervalo de 8 a 16

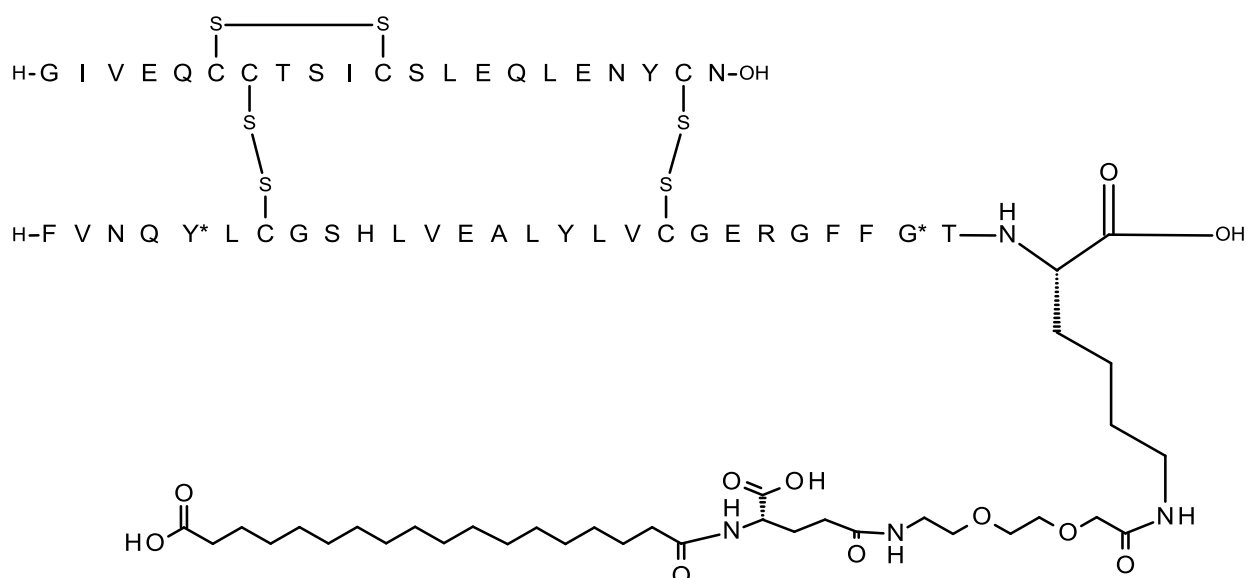
- L1 está ausente y representa un enlace covalente o representa OEG, gGlu, DgGlu o sulfonimida C-4
- L2 está ausente y representa un enlace covalente o representa OEG, gGlu, DgGlu o sulfonimida C-4
- L3 está ausente y representa un enlace covalente o representa OEG, gGlu, DgGlu o sulfonimida C-4

- en donde gGlu representa un residuo de ácido gamma glutámico y OEG representa [2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilo.
9. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho derivado de insulina comprende, además, A14E.
 - 5 10. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho derivado de insulina comprende, además, B28K, B26K o B29K.
 11. El derivado de insulina de acuerdo con la modalidad 10, en donde dicho derivado de insulina comprende, además, B28K.
 12. El derivado de insulina de acuerdo con la modalidad 10, en donde dicho derivado de insulina comprende, además, B26K.
 - 10 13. El derivado de insulina de acuerdo con la modalidad 10, en donde dicho derivado de insulina comprende, además, B29K.
 14. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-13, en donde dicho sustituyente se une al grupo epsilon de la lisina de B26K, B28K o B29K.
 - 15 15. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho derivado de insulina comprende, además, desB30, desB29-30 o desB27-30.
 16. El derivado de insulina de acuerdo con la modalidad 15, en donde dicho derivado de insulina comprende, además, desB30.
 17. El derivado de insulina de acuerdo con la modalidad 15, en donde en donde dicho derivado de insulina comprende, además, desB29-30.
 - 20 18. El derivado de insulina de acuerdo con la modalidad 15, en donde en donde dicho derivado de insulina comprende, además, desB27-30.
 19. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dichas sustituciones se seleccionan del grupo que consiste en:
 - 25 i. A14E, B5Y, B26A, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 4)
 - ii. A14E, B5Y, B26G, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 5)
 - iii. B5Y, B26A, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 7)
 - iv. B5Y, B26G, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 8)
 - v. B5Y, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 9)
 - 30 vi. A14E, B5F, B26G, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 10)
 - vii. B5F, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 11)
 - viii. B5Y, B26K, desB27-desB30 (SEQ ID NO: 1 y 12)
 - ix. B5Y, desB30 (SEQ ID NO: 1 y 13)
 - x. B5Y, B26G, desB30 (SEQ ID NO: 1 y 14)
 - 35 xi. B5Y, B26A, desB30 (SEQ ID NO: 1 y 15)
 - xii. B5F, B26A, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 6)
 - xiii. B5Y, B26A, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 4)
 - xiv. B5Y, B26G, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 5)
 - xv. B5F, B26G, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 10)
 - 40 xvi. A14E, B5F, B26A, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 6)

- xvii. A14E, B5Y, B26A, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 7)
 - xviii. A14E, B5Y, B26G, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 8)
 - xix. A14E, B5Y, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 9)
 - xx. A14E, B5F, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 11)
 - 5 xxi. A14E, B5Y, B26K, desB27-desB30 (SEQ ID NO: 3 y 12)
 - xxii. A14E, B5Y, desB30 (SEQ ID NO: 3 y 13)
 - xxiii. A14E, B5Y, B26G, desB30 (SEQ ID NO: 3 y 14)
 - A14E, B5Y, B26A, desB30 (SEQ ID NO: 3 y 15)
20. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en
10 donde dicho grupo acilo es ácido litocólico, o comprende un grupo funcional de las
fórmulas:
- Químico 1: $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x-\text{COOH}$;
- Químico 2: $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x\text{-tetrazolilo,;}$
- en donde x representa un número entero en el intervalo de 12 a 20; y el grupo tetrazolilo es
15 *1H*-tetrazol-5-ilo.
- o es un ácido graso de fórmula:
- Químico 3: $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x-\text{CH}_3$
- en donde x representa un número entero en el intervalo de 8 a 16.
21. El derivado de insulina de acuerdo con la modalidad 20, donde Acy se selecciona del
20 grupo que consiste en: ácido litocólico, ácido 1,16-hexadecanodioico, ácido 1,18-
octadecanodioico, ácido 1,20-eicosanodioico, tetrazol-C16, tetrazol-C17, tetrazol C18 y
ácido tetradecanoico.
22. El derivado de insulina de acuerdo con la modalidad 21, en donde dicho sustituyente
comprende ácido litocólico.
- 25 23. El derivado de insulina de acuerdo con la modalidad 21, en donde dicho grupo acilo
comprende un grupo de diácido graso que se selecciona de ácido 1,16-hexadecanodioico,
ácido 1,18-octadecanodioico, y ácido 1,20-eicosanodioico.
24. El derivado de insulina de acuerdo con la modalidad 23, en donde el al menos un
sustituyente comprende un grupo diácido graso ácido 1,16-hexadecanodioico.
- 30 25. El derivado de insulina de acuerdo con la modalidad 23, en donde el al menos un
sustituyente comprende un grupo diácido graso ácido 1,18-octadecanodioico.
26. El derivado de insulina de acuerdo con la modalidad 23, en donde el al menos un
sustituyente comprende un grupo diácido graso ácido 1,20-eicosanodioico.
27. El derivado de insulina de acuerdo con la modalidad 21, en donde dicha porción de
35 tetrazol se selecciona del grupo que consiste en tetrazol-C16, tetrazol-C17 y tetrazol C18.
28. El derivado de insulina de acuerdo con la modalidad 27, en donde dicha porción de
tetrazol es tetrazol-C16.
29. El derivado de insulina de acuerdo con la modalidad 27, en donde dicha porción de
tetrazol es tetrazol-C17.

30. El derivado de insulina de acuerdo con la modalidad 27, en donde dicha porción de tetrazol es tetrazol C18.
31. El derivado de insulina de acuerdo con la modalidad 20, en donde dicho ácido graso es ácido tetradecanoico o C14.
- 5 32. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho sustituyente comprende un grupo enlazador.
33. El derivado de insulina de acuerdo con las modalidades 1-31, en donde el grupo enlazador se representa por un enlace covalente.
34. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-32, en donde
10 -L1-L2-L3 representa un grupo enlazador divalente seleccionado de DgGlu, gGlu, gGlu-gGlu, gGlu-OEG, gGlu-OEG-OEG, OEG, sulfonimida-C4 y sulfonimida-C4-sulfonimida-C4, en donde, gGlu representa un residuo de ácido gamma glutámico; y OEG representa [2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilo.
35. El derivado de insulina de acuerdo con la modalidad 34, en donde dicho grupo
15 enlazador divalente es DgGlu.
36. El derivado de insulina de acuerdo con la modalidad 34, en donde dicho grupo enlazador divalente es gGlu.
37. El derivado de insulina de acuerdo con la modalidad 34, en donde dicho grupo enlazador divalente es gGlu- gGlu.
- 20 38. El derivado de insulina de acuerdo con la modalidad 34, en donde dicho grupo enlazador divalente es gGlu-OEG.
39. El derivado de insulina de acuerdo con la modalidad 34, en donde dicho grupo enlazador divalente es gGlu-OEG-OEG.
40. El derivado de insulina de acuerdo con la modalidad 34, en donde dicho grupo
25 enlazador divalente es OEG.
41. El derivado de insulina de acuerdo con la modalidad 34, en donde dicho grupo enlazador divalente es sulfonimida-C4.
42. El derivado de insulina de acuerdo con la modalidad 34, en donde dicho grupo enlazador divalente es sulfonimida-C4- sulfonimida-C4.
- 30 43. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho sustituyente es el sustituyente de los compuestos de los ejemplos 1-46, representados independientemente por:
- Ácido litocólico
 - Ácido litocólico gGlu
 - 35 • C14
 - C16 diácido
 - C16 diácido-gGlu
 - C18 diácido
 - C18 diácido-gGlu

- C18 diácido-2xgGlu
- C18 diácido-DgGlu
- C18 diácido-gGlu-OEG
- C18 diácido-gGlu-2xOEG
- 5 • C18 diácido-OEG
- C18 diácido-sulfonimida-C4
- C20 diácido
- C20 diácido-gGlu
- C20 diácido-gGlu-OEG
- 10 • C20 diácido-gGlu-2xOEG
- Tetrazol-C16
- Tetrazol-C16-gGlu-OEG
- Tetrazol-C16-gGlu-2xOEG
- Tetrazol-C16-2xsulfonimida-C4
- 15 • Tetrazol-C17
- Tetrazol-C17-sulfonimida-C4
- Tetrazol-C18
- Tetrazol-C18-sulfonimida-C4
- Tetrazol-C18-2xsulfonimida-C4
- 20 44. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, que se selecciona del grupo que consiste en los compuestos de los Ejemplos 1-46.
- 45. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, que se selecciona del grupo que consiste en los compuestos de los Ejemplos 1-36.
- 46. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, que se selecciona del grupo que consiste en los compuestos de los Ejemplos 10-34.
- 25 47. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, que se selecciona del grupo que consiste en los compuestos de los Ejemplos 3, 4, 12- 16, 18-20, 22, 23, 25, 26, 28- 30.
- 48. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, que se selecciona del grupo que consiste en los compuestos de Ejemplos 14-16, 18, 20 y 26.
- 30 49. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, que se selecciona del grupo que consiste en los compuestos de los Ejemplos 37-39 y 46.
- 50. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, que se selecciona del grupo que consiste en los compuestos de los Ejemplos 40-45.
- 35 51. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, se representa por el compuesto del Ejemplo 15: N{Epsilon-B28}-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina



52. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho derivado de insulina induce una fosforilación submáxima del receptor de insulina de aproximadamente o menos de 65 %, en comparación con la insulina humana.
53. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho derivado de insulina induce una fosforilación submáxima del receptor de insulina de aproximadamente o menos de 60 %, en comparación con la insulina humana.
54. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho derivado de insulina induce una fosforilación submáxima del receptor de insulina de aproximadamente o menos de 50 %, en comparación con la insulina humana.
55. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho derivado de insulina induce una fosforilación submáxima del receptor de insulina de aproximadamente o menos de 40 %, en comparación con la insulina humana.
56. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho derivado de insulina induce una fosforilación submáxima del receptor de insulina de aproximadamente o menos de 30 %, en comparación con la insulina humana.
57. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho derivado de insulina induce una fosforilación submáxima del receptor de insulina de aproximadamente o menos de 20 %, en comparación con la insulina humana.
58. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde dicho derivado de insulina induce una fosforilación submáxima del receptor de insulina de aproximadamente o menos de 12 %, en comparación con la insulina humana.
59. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, para su uso como medicamento.
60. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-58, para su uso en un método de tratamiento.
61. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores 1-58, para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad cardiovascular.

62. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores 1-58, para su uso en la prevención o tratamiento de la aterosclerosis.
63. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores 1-58, para su uso en la prevención o reducción de la disfunción endotelial.
- 5 64. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores 1-58, para su uso en la mejora de los parámetros lipídicos.
65. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores 1-58, para su uso en la prevención o reducción del contenido de triglicéridos hepáticos.
66. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores 1-58,
10 para su uso para prevenir o reducir la ganancia de peso corporal.
67. El derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores 1-58, para su uso en el tratamiento de:
- mejorar los parámetros de los lípidos, tal como la prevención y/o el tratamiento de la dislipidemia, disminuir los lípidos totales del suero, aumentar el HDL-C, disminuir el LDL-C, disminuir el LDL-C denso, pequeño, disminuir el VLDL-C, disminuir los triglicéridos,
15 C, disminuir el LDL-C denso, pequeño, disminuir el VLDL-C, disminuir los triglicéridos, disminuir el colesterol, disminuir los niveles plasmáticos de lipoproteína a (Lp(a)) o inhibir la generación de apolipoproteína A (apo(A));
 - la prevención y/o el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, como el síndrome cardíaco X, aterosclerosis, infarto de miocardio, enfermedad coronaria, daño por
20 reperfusión, accidente cerebrovascular, isquemia cerebral, una enfermedad cardíaca temprana o cardiovascular temprana, hipertrofia ventricular izquierda, enfermedad de las arterias coronarias, hipertensión, hipertensión esencial, emergencia hipertensiva aguda, cardiomiopatía, insuficiencia cardíaca, intolerancia al ejercicio, fallo cardíaco agudo y/o crónico, arritmia, disritmia cardíaca, síncope, angina de pecho, derivación cardíaca y/o re
25 oclusión del stent, claudicación intermitente (ateroesclerosis obliterans), disfunción diastólica, y/o disfunción sistólica; y/o reducción de la presión sanguínea, tal como reducción de la presión sanguínea sistólica; el tratamiento de enfermedad cardiovascular.
68. Una composición farmacéutica que comprende un derivado de la insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores 1-58, y un excipiente aceptable
30 farmacéuticamente.
69. La composición farmacéutica de acuerdo con la modalidad 68 para la administración subcutánea.
70. Una composición farmacéutica para el tratamiento de la diabetes en un paciente que necesita tratamiento, que comprende una cantidad con eficacia terapéutica de un derivado
35 de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-58, junto con un vehículo aceptable farmacéuticamente.
71. Las composiciones farmacéuticas de las modalidades **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**-70, para su uso como medicamento.

72. Las composiciones farmacéuticas de las modalidades **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**-70, para el uso en el tratamiento de pacientes con diabetes y alto riesgo de enfermedad cardiovascular.
73. Las composiciones farmacéuticas de las modalidades **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**-70y/o prevenir o reducir el desarrollo de la aterosclerosis.
74. El uso de un derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-58, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de diabetes, diabetes de Tipo 1, diabetes del Tipo 2, alteración de la tolerancia a la glucosa, hiperglicemia, dislipidemia, obesidad, síndrome metabólico (síndrome metabólico X, síndrome de resistencia a la insulina), hipertensión, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, trastornos cardiovasculares, enfermedad cardíaca coronaria, síndrome intestinal inflamatorio, dispepsia, hipotensión o úlceras gástricas.
75. Un método para mejorar los parámetros de los lípidos que comprende una etapa de administrar una cantidad farmacéuticamente activa de un derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores 1-58.
76. Un método para mejorar los parámetros de los lípidos que comprende una etapa de administrar una cantidad farmacéuticamente activa de un derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores 1-58 en donde mejorar los parámetros de los lípidos, es tal como prevenir y/o tratar la dislipidemia, disminuir los lípidos totales del suero; aumentar las HDL; disminuir el LDL-C; disminuir el LDL-C denso, pequeño; disminuir el VLDL-C; no_HDL-C; disminuir los triglicéridos; disminuir el colesterol; disminuir los niveles plasmáticos de lipoproteína a (Lp(a)); inhibir la generación de apolipoproteína A (apo(A)).
77. Un método para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad cardiovascular que comprende una etapa de administrar una cantidad farmacéuticamente activa de un derivado de insulina de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores 1-58.
78. Un método para el tratamiento o la prevención de diabetes, diabetes de tipo 1, diabetes del tipo 2, alteración de la tolerancia a la glucosa, hiperglicemia, dislipidemia, obesidad, síndrome metabólico (síndrome metabólico X, síndrome de resistencia a la insulina), hipertensión, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, trastornos cardiovasculares, enfermedad de las arterias coronarias, síndrome inflamatorio intestinal, dispepsia, o úlceras gástricas, cuyo método comprende la administración a un sujeto que lo necesite una cantidad con eficacia terapéutica de un derivado de insulina humana de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-58.
79. Un producto intermedio que comprende una estructura principal seleccionada del grupo que consiste en:
- i. A14E, B5Y, B26A, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 4)
 - ii. A14E, B5Y, B26G, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 5)
 - iii. B5Y, B26A, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 7)

- iv. B5Y, B26G, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 8)
- v. B5Y, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 9)
- vi. A14E, B5F, B26G, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 10)
- vii. B5F, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 11)
- 5 viii. B5Y, B26K, desB27-desB30 (SEQ ID NO: 1 y 12)
- ix. B5Y, desB30 (SEQ ID NO: 1 y 13)
- x. B5Y, B26G, desB30 (SEQ ID NO: 1 y 14)
- xi. B5Y, B26A, desB30 (SEQ ID NO: 1 y 15)
- xii. B5F, B26A, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 6)
- 10 xiii. B5Y, B26A, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 4)
- xiv. B5Y, B26G, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 5)
- xv. B5F, B26G, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 1 y 10)
- xvi. A14E, B5F, B26A, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 6)
- xvii. A14E, B5Y, B26A, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 7)
- 15 xviii. A14E, B5Y, B26G, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 8)
- xix. A14E, B5Y, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 9)
- xx. A14E, B5F, B28K, desB29-30 (SEQ ID NO: 3 y 11)
- xxi. A14E, B5Y, B26K, desB27-desB30 (SEQ ID NO: 3 y 12)
- xxii. A14E, B5Y, desB30 (SEQ ID NO: 3 y 13)
- 20 xxiii. A14E, B5Y, B26G, desB30 (SEQ ID NO: 3 y 14)
- xxiv. A14E, B5Y, B26A, desB30 (SEQ ID NO: 3 y 15) o una sal, amida o éster aceptable farmacéuticamente de este.

80. Un método para determinar la selectividad de un compuesto que comprende las siguientes etapas:

- 25 • medir la fosforilación de AKT máxima inducida por dicho compuesto con relación a la insulina humana
- medir la activación máxima de ERK inducida por el compuesto A con relación a la insulina humana,
- en donde la relación ERK/AKT es menor que 1.

30 81. El método de la modalidad 80, en donde dicho compuesto es un compuesto de insulina.

82. El método de la modalidad 81, en donde dicho compuesto de insulina es un compuesto de las modalidades 1-58.

EJEMPLOS

35 MÉTODOS FARMACOLÓGICOS

Ensayo (I) biología in vitro

Unión del receptor de insulina

La afinidad de unión relativa de los derivados de insulina de la invención para el receptor de insulina humana (IR) se determinó mediante unión por competencia en un ensayo de

proximidad de centelleo (SPA) (de acuerdo con Glendorf T y otros; *Biochemistry* 2008 47 4743-4751).

En breve, se realizaron diluciones seriadas de un estándar de insulina humana y de un derivado de insulina en placas de 96 pocillos seguido de la adición de perlas de SPA (anti-ratón poliviniltolueno SPA Beads, GE Healthcare), anticuerpo de ratón anti-IR 83–7 (puede comprarse de, por ejemplo Thermo Fisher Scientific), IR-A humano solubilizado (purificada a partir de células de riñón hámster recién nacido (BHK) que sobreexpresan IR-A), e insulina humana marcada [¹²⁵I-TyRa14] en tampón de unión. Después de la incubación, las placas se centrifugaron y se contaron en un TopCount NXT (Perkin-Elmer Life Sciences).

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

Las afinidades de unión relativas del derivado de insulina representativo de la invención se enumeran en la Tabla 1, más abajo. La Figura 1 muestra las curvas representativas de unión al receptor para la insulina humana y el Compuesto del Ejemplo 15 de un ensayo de unión por competencia con IR-A solubilizado.

Fosforilación del receptor de insulina (IRpY1158)

El efecto de los derivados de insulina de esta invención sobre la activación del receptor de insulina (IR) se evaluó mediante la capacidad de los derivados de insulina para fosforilar el residuo de tirosina en la posición 1158 del receptor de insulina, como se describe en Hansen BF y otros; PLOS One May 2012 7 e34274.

En breve, las células CHO-hIR (células de ovario hámster chino que sobreexpresan el receptor de insulina A) se estimularon con concentraciones crecientes de análogos de insulina durante 30 min, se lavaron en solución salina tamponada con fosfato frío (PBS), se congelaron a presión y se lisaron en tampón de lisis. Cantidades iguales de proteína se cargaron en pocillos de Fosfo-IR-ELISA (IRpY1158), y la fosforilación se midió de acuerdo con el protocolo del fabricante (Invitrogen).

La respuesta máxima de un derivado de insulina de la invención en el nivel de fosforilación del receptor de insulina se determinó mediante la medición del nivel de fosforilación del receptor de insulina en presencia de cantidades crecientes de dicho derivado de insulina para obtener una curva de respuesta a la dosis. Una curva de respuesta a la dosis estándar se definió por cuatro parámetros: la respuesta inicial (parte inferior), la respuesta máxima (superior), la pendiente, y la concentración del fármaco que provocaron la mitad de la respuesta entre el valor de referencia y el máximo (EC50).

Las curvas de respuesta a dosis de la fosforilación de receptores de insulina se ajustaron mediante la regresión no lineal (modelo de cuatro parámetros (Y=Fondo + (superior-inferior)/(1+10[^]((LogEC50-X)*HillSlope))) mediante el uso de GraphPad Prism 7 del programa informático GraphPad Inc. Los parámetros estimados se usaron para calcular el

valor de % max para cada ligando como (superior(análogo)- Inferior(análogo))*100/(superior(insulina)- inferior(insulina)).

Los % de los valores máximos calculados del derivado de insulina representativo de la invención se enumeran en la Tabla 1, a continuación. La Figura 2 muestra los ejemplos de

5 curvas de respuesta a dosis para la insulina humana y el compuesto del Ejemplo 15 de un ensayo de fosforilación de IRpY1158 en células CHO-hIR que sobreexpresan el IR-A.

Por lo tanto, de las Figuras 1 y 2 puede observarse cómo un compuesto representativo de la invención, es decir, el compuesto del Ejemplo 15, fue totalmente capaz de desplazar la insulina humana del receptor de insulina (Figura 1), pero solo induce la fosforilación

10 submáxima del receptor de insulina (Figura 2.).

Señalización del receptor de insulina

La señalización del receptor de insulina (IR) de los análogos de esta invención mediante las vías de AKT y ERK se evaluó ya sea por técnica tradicional de transferencia Western o mediante el uso de Surefire, la técnica alphascreen.

15 *Transferencia Western*

En breve, las células CHO-hIR se estimularon durante 10 min con concentraciones crecientes del análogo de insulina, se lavaron en PBS frío, se congelaron a presión y se lisaron en tampón de lisis (Biosource). Cantidades iguales de proteínas se cargaron en geles y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Se visualizaron AKT y ERK fosforilados

20 con anticuerpos fosfo-AKT (Ser473) (Cell Signalling #9271) y pMAPK 44/42 ERK1/2 generados en conejos (Cell Signalling # 4376), respectivamente. Las intensidades de banda se evaluaron mediante el uso de un LAS3000 (Fuji).

Surefire

Las células se sembraron en placa de cultivo de tejido de 96 pocillos y el día después se

25 estimularon con insulina o con el derivado de insulina durante 10 min a 37 °C y se analizaron de acuerdo con el protocolo de fabricación (AKT1/2/3 (p-Ser473) cat # TGRA4S10K y ERK1/2 p-T202/Y204 Cat # TGRESB10K)

El valor de respuesta (Span) para cada análogo se calculó mediante el uso de la regresión no lineal en GraphPad Prism 7 del programa informático GraphPad Inc y se expresó como

30 porcentaje de la respuesta de insulina (% máx de AKT o % max de ERK)

Las Figuras 3 y 4 muestran curvas de respuesta a dosis representativas para la insulina humana y el Compuesto del Ejemplo 15 a partir de un ensayo de fosforilación de AKT y un ensayo de fosforilación ERK en células CHO-hIR que sobreexpresan el IR-A y muestran cómo un compuesto representativo de la invención, es decir, el Compuesto del Ejemplo 15,

35 induce una activación submáxima más baja de ERK que de AKT en comparación con la insulina humana. Los valores calculados (% máx ERK/% máx de AKT) de los análogos de insulina representativos de la invención y los derivados de insulina de referencia se enumeran en la Tabla 1.

Los resultados dados en la Tabla 1 muestran que solo los derivados de insulina que inducen

40 una fosforilación del receptor de insulina menos del 65 % de la respuesta máxima inducida

por la insulina humana tienen un efecto submáximo menor sobre la activación de ERK (fosforilación) que en la activación de AKT (fosforilación), en comparación con el efecto de la insulina humana.

Potencia en ensayo de células grasas libres de rata (lipogénesis)

5 La potencia metabólica de los derivados de insulina de la invención se determinó por la lipogénesis mediante el uso de adipocitos aislados de rata. Los ensayos se llevaron a cabo en gran parte como se describe en Moody AJ y otros; *Horm Metab Res* 1974 6 12-16 (una versión modificada del ensayo descrito en Rodbell M; *J Biol Chem* 1964 239 375-380).

Brevemente, las almohadillas de grasa epididimal se retiraron de ratas Sprague-Dawley
10 muertas y se colocaron en tampón de degradación con collagenasa (Worthington) para degradar las almohadillas de grasa en una suspensión de células individuales. La suspensión celular se lavó con PBS y las células se suspendieron en tampón Krebs complementado con HSA 0.1 o 1 % (A-1887, Sigma) y HEPES. Las alícuotas de suspensión celular se incubaron con solución de glucosa que contiene D-[3-³H]glucosa
15 (PerkinElmer) y concentraciones crecientes de insulina humana estándar o derivados de insulina. La incubación se detuvo por adición de MicroScint-E (PerkinElmer), y las placas se contaron en un TopCount NXT (PerkinElmer).

Los datos se analizaron de acuerdo con el modelo logístico de cuatro parámetros (Vølund A; *Biometrics* 1978 34 357-365) y se calcularon las potencias metabólicas de los análogos
20 con respecto a la del estándar de insulina humana medida dentro de la misma placa.

Las potencias metabólicas de los derivados de insulina representativos de la invención se enumeran en la Tabla 1, más abajo. La Figura 5 muestra un compuesto representativo de la invención, es decir, el compuesto del Ejemplo 15, tienen el mismo efecto máximo que la insulina humana en la estimulación de la lipogénesis en los adipocitos de rata primarios.

Aislamiento de hepatocitos de rata

Los hepatocitos de rata se aislaron a partir de ratas Sprague-Dawley masculinas mediante perfusión retrógrada del hígado con collagenasa (Sigma) mediante el uso de una versión modificada de Berry M N y Friend D S; *J Cell Biol* 1969 43 506-520.

Los hepatocitos se lavaron en medio 199 (Gibco) suplementado con insulina humana,
30 dexametasona y suero fetal bovino (Gibco), se sembraron en placas recubiertas de colágeno (BD BioCoat, BD Biosciences) y se dejaron adherirse a la placa durante 1-4 horas.

Estimulación de síntesis de glucógeno en hepatocitos primarios de rata

El efecto de los análogos de insulina de esta invención sobre la estimulación de la acumulación de glucógeno se determinó en hepatocitos primarios (ver el procedimiento de
35 aislamiento anterior) mediante el uso de un método enzimático específico y simple denominado ensayo PAS (ácido periódico-Schiff) adaptado de M. Kilcoyne y otros, *Analytical Biochemistry* 416 (2011) 18-26. Este método es una adaptación de la tinción con el reactivo de PAS para un ensayo colorimétrico de placa de microtitulación. Los hepatocitos primarios de rata se cultivaron en placas de 96 pocillos con diversas
40 concentraciones de insulina humana o derivado de insulina durante 18-24 horas. Para

determinar el contenido de glucógeno celular, los hepatocitos se lisaron en Tritón al 1 % durante 30 minutos en un agitador a temperatura ambiente. Se añadió solución de ácido periódico (0.1 % ácido periódico + 7 % ácido acético en agua MQ) (Ácido periódico 3951, Sigma) a cada pocillo y se mezcló con agitador durante un min. Las placas se incubaron después durante 90 min a 37 °C permitiendo la oxidación de los grupos hidroxilo de glucosa a aldehídos. Después se agregó solución de Schiff y la placa se protegió de la luz, se agitó durante 5 min antes de dejar que se parara durante 25 min a temperatura ambiente. Después se midió la absorbancia a 550 nm mediante el uso de un espectrofotómetro SpectrAmax. Los datos se analizaron en el GraphPad Prism 7 y se calculó la potencia metabólica relativa del análogo de insulina como la relación entre los valores estimados de EC50 para la insulina humana y el análogo de la insulina.

Las potencias de los derivados de insulina representativos para la invención en la acumulación de glucógeno en hepatocitos se enumeran en la Tabla 1, más abajo. La Figura 6, un compuesto representativo de la invención, es decir, el compuesto del Ejemplo 15, tiene el mismo efecto máximo que la insulina humana en la estimulación de la acumulación de glucógeno en hepatocitos primarios de rata.

Expresión génica

El efecto de los derivados de insulina de esta invención en la expresión génica se determinó por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (RT-PCR) en ADNc aislado de hepatocitos primarios de rata (ver el procedimiento de aislamiento anterior).

Un día después del aislamiento, los hepatocitos se trataron con glucagón durante dos horas en medio de ensayo 199 (Gibco) suplementado con dexametasona 1 μ M y HSA 0.1 % (A-1887, Sigma). Después de la incubación previa, las células se trataron con insulina humana o derivado de insulina en medio de ensayo durante 16 horas, y se cambió a medio fresco después de 2, 4 y 6 horas.

Se extrajo el ARN y se purificó a partir de hepatocitos mediante el uso del kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). Se produjo ADNc a partir de ARN mediante el uso del kit de síntesis de cDNA iScript (Bio-Rad). La expresión génica se determinó mediante el uso de la mezcla maestra TagMan Fast Advanced Master y el cebador/sonda a demanda (Applied Biosystems; Ppib #Rn03302274_m1 rFAS #Rn00565347_m1; rG6Pc #Rn00565347_m1). La expresión génica se normalizó con respecto a la expresión de Ppip (cycb, ciclofilina b) y se ajustó a una curva de respuesta a dosis sigmoidal mediante el uso de GraphPad Prism 7 del programa informático GraphPad Inc.

Las Figuras 7 y 8 muestran curvas de respuesta a dosis representativas para la insulina humana y el Compuesto del Ejemplo 15, a partir de ensayos cuantitativos de RT-PCR para *fasn* y *g6pc* realizado en el ADNc aislado de hepatocitos de rata primarios. Los resultados dados en las Figuras 7 muestran cómo un compuesto representativo de la invención, es decir, compuesto del Ejemplo 15, induce una inducción submáxima de ARNm de FAS, en comparación con la insulina humana.

La Figura 8 muestra un compuesto representativo de la invención, es decir, compuesto del Ejemplo 15, que inhibe la expresión de ARN G6Pc al mismo nivel que la insulina humana en hepatocitos primarios de rata.

Lipogénesis *de novo*

5 El efecto de los derivados de insulina de la presente invención en la síntesis *de novo* de lípidos (DNL) se determinó en hepatocitos primarios (ver el procedimiento de aislamiento anterior) mediante el uso de acetato marcado.

Un día después del aislamiento, los hepatocitos se incubaron en medio de ensayo (Medio 199 (Gibco), HSA (Sigma)) suplementado con glucosa (Sigma) e insulina humana o

10 derivado de insulina durante 24 horas. Después de la incubación previa, los hepatocitos se trataron en medios de ensayo con insulina humana o derivado de insulina y acetato marcado con C¹⁴ (PerkinElmer) durante 24 horas. Después de la incubación, las células se lavaron en PBS y se lisaron con MicroScint-E (PerkinElmer).

La incorporación de acetato radioactivo en lípidos (DNL) se determinó mediante el uso de

15 un TopCount NXT (PerkinElmer Life Sciences) y los resultados se ajustaron a una curva de respuesta a dosis sigmoidal mediante el uso de GraphPad Prism 7 del programa informático GraphPad Inc.

La Figura 9 muestra curvas representativas de respuesta a dosis para la insulina humana y el compuesto del Ejemplo 15 de una lipogénesis *de novo* en hepatocitos primarios de rata y

20 muestra cómo un compuesto representativo de la invención, es decir, el compuesto del Ejemplo 15, exhibe una respuesta submáxima en la lipogénesis *de novo* en los hepatocitos primarios de rata.

Tabla 1A: Actividad biológica *in vitro*

Compuesto del Ejemplo núm.	Unión a hIR IC50 (% de insulina humana)	Lipogénesis HSA al 0.1 % EC50 (% de insulina humana)	Lipogénesis HSA al 1 % EC50 (% de insulina humana)	ELISA de hIR pY1158 máx (% de insulina humana)	% máx ERK/% máx AKT
1	8	0.82	0.15	32	0.38
2	10	0.86	0.21	43	0.47
3	8	0.04	0.01	17	0.35
4	4	0.14	0.07	19	0.37
5	8	0.14	0.07	31	0.48
6	5	0.14	0.06	36	0.45
7	9	0.20	0.09	39	0.61
8	10	1.76	0.72	25	0.32
9	12	0.40	0.49	14	0.29
10	14	0.68	0.11	10	0.27

11	10	0.05	0.02	3	0.07
12	12	0.10	0.02	10	0.25
13	10	0.26	0.05	11	0.15
14	10	0.26	0.05	16	0.25
15	10	0.29	0.09	16	0.25
16	7	0.08	0.05	20	0.38
17	7	0.18	0.16	37	0.53
18	6	0.32	0.26	14	0.35
19	7	0.04	0.02	15	0.21
20	20	0.34	0.14	23	0.23
21	12	0.39	0.43	37	0.54
22	17	0.21	0.15	26	0.36
23	23	0.29	0.17	28	0.36
24	34	0.39	0.21	30	0.42
25	15	0.14	0.12	26	0.50
26	14	0.50	0.24	21	0.37
27	19	0.11	0.09	35	0.47
28	15	0.24	0.16	12	0.30
29	16	0.37	0.17	17	0.32
30	12	0.17	0.11	14	0.25
31	12	0.26	0.20	7	0.34
32	4	0.12	0.05	32	0.40
33	7	0.08	0.05	6	0.20
34	3	0.09	0.03	27	0.27
35	4	0.02	0.01	10	0.31
36	9	0.03	0.01	10	0.26
37	6	0.01	0.01	2	ND
38	4	0.03	0.01	6	0.33
39	4	0.05	0.01	24	0.41
40	11	1.42	0.16	58	0.84
41	3	0.22	0.16	40	0.66
42	12	2.21	0.41	8	0.19
43	7	1.08	0.32	13	0.30
44	8	0.09	0.02	7	0.36
45	4	0.13	0.08	6	0.29
46	3	ND	0.03	20	0.27

ND: No determinado

Tabla 1B: Actividad biológica *in vitro* para los comparadores

Compuesto comparador	Unión a hIR IC50 (% de insulina humana)	Lipogénesis HSA al 0.1 % EC50 (% de insulina humana)	Lipogénesis HSA al 1 % EC50 (% de insulina humana)	ELISA de hIR pY1158 máx (% de insulina humana)	% máx ERK/% máx AKT
Insulina humana	100	100	100	100	1
Comparador núm. 1	47	71	56	93	0.84
Comparador núm. 2	27	44	43	93	0.82
Comparador núm. 3	54	37	35	132	0.85
Comparador núm. 4	45	58	39	95	0.84
Comparador núm. 5 Comparador de PK que se usa en el ensayo (II)	13	ND	0.7	69	0.81
Insulina lispro	119	ND	ND	104	0.85
Insulina aspart	83	ND	ND	95	0.79
Insulina degludec	20	3.8	0.8	87	0.97
Insulina glargina	79	ND	68.9	104	0.85

Ensayo (II) Estudio subcrónico *in vivo* con ratones diabéticos

Animales y compuestos

Los ratones machos C57BL/6J de Jackson Laboratory de 12 semanas de edad con obesidad inducida por la dieta (DIO) bajo la dieta de investigación D12492 alta en grasa, se mantuvieron durante dos semanas en las instalaciones, y después, bajo una anestesia breve con gas anflurano, se volvieron diabéticos mediante una inyección subcutánea (s.c.) de 150 mg/kg de estreptozotocina (STZ) (Sigma). Se permitió que los animales desarrollaran una diabetes estable durante dos semanas, antes de asignarse a grupos de tratamiento basados en las mediciones del peso corporal, los niveles de glucosa en sangre y los niveles de hemoglobina glicosilada (Hba1c) en sangre. Los animales se alojaron bajo condiciones

estándar de iluminación y temperatura, y tuvieron acceso a la dieta D12492 *ad lib* y agua en todo momento.

Los animales se asignaron a tratamiento con vehículo (n=16), o a diferentes dosis ya sea del Comparador PK (comparador núm. 5) o el compuesto del ejemplo 15 (n=26 por grupo de dosis).

Los compuestos de prueba, es decir, el comparador PK (comparador núm. 5) y el compuesto del ejemplo 15, se formularon en fosfato 5 mM, cloruro de sodio 140 mM y 70 ppm de polisorbato 20.

El Comparador PK (comparador núm. 5) es un derivado de insulina acilado, pero no parcial.

Protocolo de tratamiento

Los animales se trataron durante seis semanas, con inyecciones s.c. dos veces al día con el tratamiento que se asigna. Las inyecciones se aplicaron con 12 horas de diferencia, en los horarios de 07:30-08:30 y de 19:30-20:30 todos los días. El volumen de dosis fue de 2 ml/kg, y las inyecciones se administraron con un dispositivo de inyección NovoPen®.

Los animales se midieron regularmente para determinar los niveles de peso corporal y glucosa en sangre, a lo largo del estudio, y los niveles de HbA1c en sangre y la composición corporal se midieron al inicio y al finalizar el estudio. Además, se evaluó el nivel de exposición plasmática del Comparador PK (comparador núm. 5) y el compuesto del ejemplo 15.

Métodos analíticos

Se determinaron las concentraciones de glucosa en sangre mediante la dilución de la sangre total en solución tampón EBIO, seguido de medición en un autoanalizador EKF Diagnostic Biosen.

Se determinaron los niveles de HbA1c en sangre mediante la dilución de la sangre total en tampón de hemólisis, seguido de medición en un autoanalizador Hitachi Cobas 6000, y mediante el uso de un kit de HbA1c de Roche Diagnostics.

Se determinó la composición corporal de ratones sin anestésicos para determinar la masa de grasa y la masa magra mediante la exploración por resonancia magnética cuantitativa (EchoMRI-100TM, Echo Medical Systems).

Se determinó el contenido de TG hepático en muestras de tejido hepático, que se colectó inmediatamente después de la eutanasia. Después de la homogeneización, la saponificación y la centrifugación de la muestra de hígado, se midió la concentración de TG en el sobrenadante en un analizador Hitachi Cobas 6000 (Roche). Después se dividió el contenido de TG con la masa de la muestra de hígado homogeneizado original y se expresó como μmol de TG por mg de tejido hepático.

La función endotelial se evaluó *ex vivo* en grupos con coincidencia de HbA1c (vehículo n=12, comparador PK (comparador núm. 5) n=15 y compuesto del ejemplo 15 (n=15) mediante el uso de vasorelajación inducida por ACh en arterias mesentéricas que se montaron en un miógrafo de alambre. Las arterias se constriñeron previamente al 70 % del

tono máximo con fenilefrina seguida de estimulación con ACh en dosis crecientes de manera acumulativa.

Se determinaron los niveles de exposición plasmática del Comparador PK (comparador núm. 5) y del compuesto del ejemplo 15, a través del análisis de muestras de plasma mediante el uso de inmunoensayos luminiscentes de canalización de oxígeno (LOCI) propios.

Las Figuras 10-14 muestran curvas representativas para los niveles de HbA1c, peso corporal, masa corporal, TG hepáticos y vasorelajación de arterias mesentéricas estimulada con ACh a partir de un estudio subcrónico *in vivo* en ratones diabéticos STZ-DIO dosificados por vía subcutánea dos veces al día durante seis semanas con el vehículo, el Comparador PK (comparador núm. 5), y un análogo representativo de insulina de la invención, es decir, el compuesto del ejemplo 15.

Los experimentos en animales mostraron que el tratamiento de ratones diabéticos alimentados con una dieta rica en grasa con los derivados de insulina de la invención puede disminuir los niveles de glucosa en sangre de manera similar a la farmacocinética del comparador (PK) (comparador núm. 5). El Comparador PK (comparador núm. 5) es un análogo de insulina acilada que no es un agonista parcial de la fosforilación del receptor de insulina, sino que tiene un perfil PK en ratones similar al del compuesto del ejemplo 15 de la presente invención.

El tratamiento subcrónico (6 semanas) de ratones diabéticos, alimentados con una dieta rica en grasa con un derivado de insulina representativo de la invención, es decir, el compuesto del ejemplo 15, frente a un comparador PK (comparador núm. 5) que se dosificó para alcanzar el mismo nivel del control glicémico (medido por niveles de HbA1c), dió como resultado un aumento de peso en la masa de grasa corporal menor, una reducción de los triglicéridos hepáticos (TG) aumentada y una vasorelajación estimulada con acetilcolina (ACh) *ex vivo* mejorada.

Por lo tanto, la presente invención proporciona derivados de insulina, que son capaces de reducir los niveles de glucosa en sangre, pero tienen efectos mejorados sobre los procesos que se relacionan con el metabolismo de los lípidos, tales como menor ganancia de peso, menor aumento en la masa de grasa corporal y disminución de los TG hepáticos aumentada, así como función endotelial mejorada con respecto a un comparador equivalente a PK.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh – Acetilcolina

AKT - Proteína cinasa B (PKB)

BHK – Riñón de hámster recién nacido

CHO – Ovario de hámster chino

CPM – Conteos por minuto

CVD – Enfermedades cardiovasculares

DIO - Obesidad inducida por la dieta

- DNL – lipogénesis *de novo*
DPM – Desintegraciones por minuto
ELISA – Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
ERK – Cinasa regulada extracelularmente (también se conoce como MAPK)
- 5 FAS – ácido graso sintasa
G6Pc – Glucosa-6-fosfatasa
HbA1c: hemoglobina glicosilada
HEPES – Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico
HI – Insulina humana
- 10 HSA – Albúmina sérica humana
IR – Receptor de insulina
IR-A – Isoforma A del receptor de insulina
LOCI - inmunoensayos luminiscentes de canalización de oxígeno
MAPK - Proteína cinasa activada por mitógeno (también se conoce como ERK)
- 15 NAFLD – Enfermedades de hígado graso no alcohólico
PAS – Solución de ácido periódico
PBS – Solución salina tamponada con fosfato
PK – farmacocinética
PKB – Proteína cinasa B (también se conoce como AKT)
- 20 Ppip – Ciclofilina b (cycB)
RT-PCR – reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
SPA – ensayo de proximidad de centelleo
SREPB1c - Factor de transcripción de unión al elemento regulador de esteroides 1c
STZ – estreptozotocina
- 25 STZ-DIO – obesidad inducida por la dieta y tratamiento con estreptozotocina
TG - Triglicéridos

ESTABILIDAD

- La estabilidad de los derivados de insulina de esta invención se evaluó mediante el uso de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y Cromatografía de Exclusión por Tamaño
- 30 (SEC)

Evaluación de la autoasociación y la estabilidad de derivados de insulina mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Formulación

- Los derivados de insulina se disolvieron a alrededor de 0.2 mM y el pH se ajustó a
- 35 alrededor de 7.6 con hidróxido de sodio y ácido clorhídrico. La concentración se determinó por SEC Waters PROTEIN PAK 125 (250*8 mm) con un eluyente que contiene ácido acético 2.5 M, L-arginina 4 mM y acetonitrilo 20 % (V/V) a una tasa de flujo de 1 ml/min y temperatura ambiente. Detección a 280 nm contra una insulina humana de referencia mediante el uso de la corrección del coeficiente de absorción de acuerdo con Pace.

La recolección de datos se realizó mediante el uso de un MicroCal VP-Capillary DSC (Malvern Instruments Ltd). Todas las exploraciones se realizaron con un vehículo (la misma composición que las muestras de insulina pero sin insulina ni acetato de zinc) en la célula de referencia de 20 °C a 110 °C a una velocidad de exploración de 4 °C/min. El modo de retroalimentación del instrumento se establece en “bajo” y el período de filtración de datos se configura en 2 segundos. De cada exploración de la muestra se sustrajo una exploración de referencia tampón-tampón (se realizó con el vehículo que se mencionó anteriormente) antes de la normalización de la concentración y la creación de la línea base. Debe señalarse que el complejo de insulina zinc podría estar en estados de asociación diferentes del hexamérico con respecto a la insulina, pero con respecto a la simplificación del complejo de insulina estabilizada con zinc se denomina como hexamérico.

Se compararon la ($T_{\text{aparición}}$) y el punto medio del pico desplegado del hexámero ($T_{\text{m,hexamer}}$) con los diferentes derivados de insulina y los valores de $T_{\text{aparición}}$ y $T_{\text{m,hexámero}}$ se muestran en la **Tabla 2**. Los resultados muestran como las mutaciones B5Tyr y B5Phe tienen un efecto altamente estabilizante en el hexámero de zinc-insulina.

20

Compuesto	T _m , aparición (°C)	T _m , hexámero (°C)	SEC, % ≥ hexámero 3Zn/6 ins	SEC, % ≥ hexámero 6Zn/6 ins
Compuesto del Ejemplo 1	71.3	83.8	100	100
Compuesto del Ejemplo 2	77.3	92.1	ND	ND
Compuesto del Ejemplo 3	73.7	88.6	100	100
Compuesto del Ejemplo 4	77.2	91.7	96.7	97.1
Compuesto del Ejemplo 5	67.9	82.2	98.3	97.5
Compuesto del Ejemplo 6	75.4	90.3	86.7	92.4
Compuesto del Ejemplo 7	74.1	89	ND	ND
Compuesto del Ejemplo 8	59.1	85	96.1	93
Compuesto del Ejemplo 9	56.5	89.4	85.5	74.1
Compuesto del Ejemplo 10	71.7	82.1	91.5	88.5
Compuesto del Ejemplo 11	67	79.4	95.4	93.2
Compuesto del Ejemplo 12	66	77.3	89.4	76.3
Compuesto del Ejemplo 13	68.5	79.4	92.8	96.5
Compuesto del Ejemplo 14	71.5	82.3	78.5	87.3
Compuesto del Ejemplo 15	69.9	81	97.1	ND
Compuesto del Ejemplo 16	señal baja	señal baja	78.7	51.4

Compuesto del Ejemplo 17	señal baja	señal baja	21.7	71.1
Compuesto del Ejemplo 18	64.3	76.9	90.4	90.1
Compuesto del Ejemplo 19	60	73.6	80.7	74.2
Compuesto del Ejemplo 20	señal baja	señal baja	88.1	76.3
Compuesto del Ejemplo 21	ND	ND	ND	ND
Compuesto del Ejemplo 22	señal baja	señal baja	93	68.6
Compuesto del Ejemplo 23	señal baja	señal baja	42.5	44.1
Compuesto del Ejemplo 24	señal baja	señal baja	26.8	26.9
Compuesto del Ejemplo 25	señal baja	señal baja	52	67.1
Compuesto del Ejemplo 26	señal baja	señal baja	ND	ND
Compuesto del Ejemplo 27	señal baja	señal baja	18	42.5
Compuesto del Ejemplo 28	67	78.5	ND	ND
Compuesto del Ejemplo 29	señal baja	señal baja	ND	ND
Compuesto del Ejemplo 30	68.9	79.7	95.4	98.9
Compuesto del Ejemplo 31	67.9	97.7	91.7	86.5
Compuesto del Ejemplo 32	67.2	78.4	76.9	89.7
Compuesto del Ejemplo 33	67.4	98.2	ND	ND
Compuesto del Ejemplo 34	67.7	78.9	84.4	89.6
Compuesto del Ejemplo 35	67.6	91.4	91.4	91.4
Compuesto del Ejemplo 36	68.5	80.6	95.9	92
Compuesto del Ejemplo 37	60.8	74.1	74.2	64.7
Compuesto del Ejemplo 38	70.1	101.8	ND	ND
Compuesto del Ejemplo 39	76.3	97.3	ND	ND
Compuesto del Ejemplo 40	90.7	103.1	ND	ND
Compuesto del Ejemplo 41	67.8	82.6	ND	ND
Compuesto del Ejemplo 42	71.1	84	90.2	97.4
Compuesto del Ejemplo 43	71.8	82.7	89	97
Compuesto del Ejemplo 44	71.2	82.9	89	81
Compuesto del Ejemplo 45	73.6	84.3	86.2	80.5
Compuesto del Ejemplo 46	72	102	82.7	79.9
Insulina aspart	52	72	ND	ND
Comparador 1	ND	ND	ND	ND
Comparador 2	ND	ND	ND	ND
Comparador 3	ND	ND	ND	ND
Comparador 4	ND	ND	ND	ND
Comparador 5	ND	ND	ND	ND
Comparador 6	56.6	75	100	78
Comparador 7	44.5	68.8	100	90

Comparador 8	59.5	79	100	96
Comparador 9	señal baja	señal baja	45.1	77.6

ND: no determinado

Evaluación de la autoasociación del derivado de insulina mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

- 5
- La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) es un método común para evaluar la autoasociación del derivado de insulina.
- Formulación
- Los análogos de insulina se disolvieron a alrededor de 2 mM y el pH se ajustó a 7.6 con hidróxido de sodio y ácido clorhídrico. Se determinó la concentración por SEC Waters
- 10
- PROTEIN PAK 125 (250*8 mm) con un eluyente que contiene ácido acético 2.5 M, L-arginina al 0.065 % y acetonitrilo al 20 %(V/V) a una tasa de flujo de 1 ml/min y temperatura ambiente. Detección a 280 nm contra una insulina humana de referencia mediante el uso de la corrección del coeficiente de absorción de acuerdo con Pace CN, [Pace CN, Protein Science (1995) 4, 2411-2433].
- 15
- Para una concentración final del derivado de insulina de 0.6 mM se añadió 1.6 % de glicerol, fenol 30 mM, tris(hidroximetil)aminometano 7 mM y acetato de zinc 0.3 mM. El pH se ajustó con ácido clorhídrico e hidróxido de sodio a pH 7.6.
- Para simular la condición de formulación del derivado de insulina el eluyente incluyó fenol 16 mM, cloruro de sodio 20 mM, y tris(hidroximetil)aminometano 10 mM ajustado a pH
- 20
- 7.3 con ácido clorhídrico. Se usó la columna ACQUITY UPLC® BEH200 (150*4.6 mm, d = 1.7 µm) de Waters Corporation, Milford, MA, Estados Unidos. El flujo fue de 0.3 ml/min, volumen de inyección de 20 µl y detección ultravioleta a 286 nm. La temperatura de la columna se mantuvo a 23 °C.
- Las Figuras 15-19 muestran cromatogramas representativos de los experimentos de SEC.
- 25
- La Figura 15 muestra como un compuesto comparador es decir, el Comparador 9, fue inestable en la formulación ya que varios picos son amplios y prolongados y muestran varios estados de autoasociación solapados. En contraste los resultados que se ofrecen en las Figuras 16-19 muestran como los compuestos representativos de la invención, es decir, los compuestos de los ejemplos núm. 3, 11, 12 y 15 son estables en la formulación ya que
- 30
- los cromatogramas mostraron un único pico agudo predominante.
- Aunque determinadas características de la invención se han ilustrado y descrito en la presente descripción, muchas modificaciones, sustituciones, cambios y equivalentes serán evidentes para un experto en la técnica. Por lo tanto, debe entenderse que las modalidades adjuntas se destinan a cubrir todas estas modificaciones y cambios ya que caen dentro del
- 35
- verdadero espíritu de la invención.

MÉTODOS GENERALES DE PREPARACIÓN

Los siguientes ejemplos y procedimientos generales se refieren a compuestos intermedios y productos finales que se identificaron en la especificación y en los esquemas de síntesis. Se

describe en detalle la preparación de los compuestos de la presente invención mediante el uso de los siguientes ejemplos, pero las reacciones químicas descritas se describen en términos de su aplicabilidad general a la preparación de los compuestos de la invención.

Ocasionalmente, la reacción puede no ser aplicable como se describe para cada compuesto que se incluye dentro del alcance descrito de la invención. Los compuestos para los cuales esto ocurre se reconocerán fácilmente por los expertos en la técnica. En estos casos las reacciones pueden realizarse exitosamente mediante modificaciones convencionales que conocen los expertos en la técnica, es decir, mediante la protección adecuada de los grupos interferentes, tras cambiar a otros reactivos convencionales, o mediante la modificación rutinaria de las condiciones de reacción.

Alternativamente, se aplicarán otras reacciones descritas en la presente descripción o cualquier otra manera convencional a la preparación de los compuestos correspondientes de la invención. En todos los métodos de preparación, se conocen todos los materiales de partida o pueden prepararse fácilmente a partir de materiales de partida conocidos. Todas las temperaturas se exponen en grados Celsius y, a menos que se indique lo contrario, todas las partes y porcentajes son en peso cuando se hacen referencia a sólidos, y todas las partes son en volumen cuando se hacen referencia a solventes y eluyentes.

Los compuestos de la invención pueden purificarse mediante el empleo de uno o más de los siguientes procedimientos que son típicos dentro de la técnica. Estos procedimientos pueden modificarse, si es necesario, con respecto a gradientes, pH, sales, concentraciones, flujo, columnas, etc de acuerdo con las preferencias personales. En dependencia de factores tales como perfil de impurezas, solubilidad de las insulinas en cuestión etcétera, estas modificaciones pueden reconocerse fácilmente y elaborarse por un experto en la técnica.

(Método 1) Ejemplo preparativo – Expresión y purificación principal

Expresión principal

Las cadenas principales de los péptidos de insulina, es decir los análogos de insulina no acilados de dos cadenas, para su uso de acuerdo con la invención se producen de manera recombinante mediante la expresión de una secuencia de ADN que codifica la cadena principal de insulina en cuestión en una célula huésped adecuada mediante técnicas que se conocen bien, por ejemplo, como se describe en el documento US 6500645. La cadena principal del péptido de insulina se expresa directamente o como una molécula precursora que puede tener una extensión N-terminal en la cadena B y/o un péptido de conexión (péptido C) entre la cadena B y la cadena A. Esta extensión N-terminal y el péptido C se escinden *in vitro* por una proteasa adecuada, por ejemplo, la proteasa *Achromobactor lyticus* (ALP) o tripsina, y por lo tanto tendrá un sitio de escisión ubicado junto a las posiciones B1 y A1, respectivamente. Las extensiones de N-terminal y los péptidos C del tipo adecuado para su uso de acuerdo con esta invención se describen en los documentos US 5395922, EP 765395 y WO 9828429 A1.

La secuencia de polinucleótidos que codifica el precursor principal del péptido análogo de insulina para su uso de acuerdo con la invención puede prepararse sintéticamente mediante

métodos establecidos, por ejemplo el método de fosfoamidita descrito por Beaucage y otros; *Tetrahedron Letters* 1981 22 1859-1869; o el método descrito por Matthes et al. *EMBO Journal* 1984 3 801-805. De acuerdo con el método de fosfoamidita, los oligonucleótidos se sintetizan, por ejemplo, en un sintetizador de ADN automático, purificado, dúplex, y ligado para formar la construcción de ADN sintético. Una manera que se prefiere actualmente para preparar la construcción de ADN es mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El método recombinante usa típicamente un vector que es capaz de replicarse en el microorganismo o célula huésped seleccionados y que porta una secuencia de polinucleótidos que codifica el precursor principal del péptido de insulina para su uso de acuerdo con la presente invención. El vector recombinante puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial.. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autoreplicación. Alternativamente, el vector puede ser del tipo que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica junto con el(los) cromosoma(s) en el(los) que se integra. Además, puede usarse un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total para introducirse en el genoma de la célula huésped, o un transposón. El vector puede ser plásmidos circulares lineales o cerrados y preferentemente contendrán un(os) elemento(s) que permiten la integración estable del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

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

El vector puede contener uno o más marcadores seleccionables, que permiten la selección fácil de las células transformadas. Un marcador seleccionable es un gen el producto, que proporciona resistencia biocida o viral, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofas, y similares. Los ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son los genes *dal* de *Bacillus subtilis* o *Bacillus liqueniformis*, o marcadores que confieren resistencia a antibióticos tales como resistencia a ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Los marcadores seleccionables para su uso en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina carbamoiltransferasa), *pirG* (ornitina-5'-fosfato descarboxilasa) y *trpC* (antranilato sintasa. Los marcadores adecuados para las células huésped de levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1, y URA3. Un marcador seleccionable adecuado para levadura es el gen TPI de *Schizosaccharomyces pombe* (Russell; *Gene* 1985 40 125-130).

En el vector, la secuencia de polinucleótidos se conecta operativamente a una secuencia promotora adecuada. El promotor puede ser cualquier secuencia de ácido nucleico que

muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección que incluye promotores mutantes, truncados, e híbridos y puede obtenerse de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares ya sea homólogos o heterólogos a la célula huésped.

Los ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción en una célula huésped bacteriana son los promotores que se obtienen del operón lac de *E. coli*, el gen de agasa (dagA) de *Streptomyces coelicolor*, el gen levansacarasa (sacB) de *Bacillus subtilis*, el gen alfa-amilasa (amyl) de *Bacillus licheniformis*, el gen de amilasa maltogénica (amyM) de *Bacillus stearothermophilus*, el gen alfa-amilasa (amyQ) de *Bacillus amyloliquefaciens*, y el gen de penicilinas (penP) de *Bacillus licheniformis*. Los ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción en una célula huésped fúngica filamentosa son promotores que se obtienen de los genes para amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, y alfa-amilasa estable ácida de *Aspergillus niger*. En un huésped de levadura, los promotores útiles son los promotores Ma1, TPI, ADH, TDH3 o PGK de *Saccharomyces cerevisiae*.

La secuencia de polinucleótidos que codifica la cadena principal del péptido de insulina para su uso de acuerdo con la invención se conectará de manera operable a un terminador adecuado. En levadura, un terminador adecuado es el terminador TPI (Alber et al; *J. Mol. Appl. Genet.* 1982 1 419-434).

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

El vector que comprende la secuencia de polinucleótidos que codifica la cadena principal de insulina para su uso de acuerdo con la invención se introduce en una célula huésped, de manera que el vector se mantiene como un integrante cromosómico, o como un vector extracromosómico de autoreplicación. El término "célula huésped" abarca cualquier progenie de una célula parental que no es idéntica a la célula parental debido a mutaciones que ocurren durante la replicación. La célula huésped puede ser un microorganismo unicelular, por ejemplo, un procariota, o un microorganismo no unicelular, por ejemplo un eucariota. Las células unicelulares útiles son células bacterianas tales como bacterias gram positivas que incluyen, pero no se limitan a, una célula de *Bacillus*, una célula de *Streptomyces* o una bacteria gram negativa como *E. coli* y *Pseudomonas sp.* Las células eucariotas pueden ser células de mamíferos, insectos, plantas u hongos.

La célula huésped puede ser en particular una célula de levadura. El organismo de levadura puede ser cualquier organismo de levadura adecuado que secrete, en el cultivo, la cadena principal del péptido de insulina o el precursor de este en el medio de cultivo. Los ejemplos de organismos de levadura adecuados incluyen cepas seleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces uvarum*,
5 *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia kluyveri*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida sp.*, *Candida utilis*, *Candida cacaoi*, *Geotrichum sp.*, y *Geotrichum fermentans*.

La transformación de las células de levadura puede efectuarse por ejemplo mediante la formación de protoplasto seguida de transformación mediante métodos conocidos. El
10 medio que se usa para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para cultivar organismos de levadura.

Purificación principal

La estructura principal o precursor del péptido de insulina secretado de la presente puede recuperarse del medio mediante procedimientos convencionales que incluyen la separación de las células de levadura del medio por centrifugación, por filtración o mediante la captura de la cadena principal o precursor del péptido de insulina en una matriz de intercambio iónico o en una matriz de absorción de fase inversa, la precipitación de los componentes
15 proteínicos del sobrenadante, o mediante la filtración por medio de una sal, por ejemplo, sulfato de amonio, seguida de la purificación por una variedad de procedimientos cromatográficos, por ejemplo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía por afinidad, etc.

La purificación y digestión de las estructuras principales de los péptidos de insulina de esta invención se lleva a cabo como sigue:

25 El precursor de la cadena principal de un péptido de insulina de cadena simple, que puede contener una extensión N-terminal de la cadena B y un péptido-C modificado entre la cadena B y la cadena A se purifica y se concentra a partir del sobrenadante del cultivo de levadura por intercambio catiónico (Kjeldsen y otros; *Prot. Expr. Pur.* 1998 14 309-316). El precursor de la cadena simple de insulina del péptido se madura en la estructura principal del péptido de insulina de dos cadenas mediante digestión con ALP inmovilizada específica de lisina (Kristensen y otros; *J. Biol. Chem.* 1997 20 12978-12983) o mediante el
30 uso de tripsina para escindir la extensión N-terminal de la cadena B, si está presente, y el péptido C.

Digestión con ALP

35 El eluato de la etapa de cromatografía de intercambio catiónico que contiene el precursor de la cadena principal del péptido de insulina se diluye con agua a una concentración de etanol de 15-20 %. El glutamato de sodio se añade a una concentración de 15 mM y el pH se ajusta a 9.7 por NaOH. La ALP inmovilizada (4 gramos/L) se añade en una proporción de 1:100 (volumen:volumen) y se permite que la digestión continúe con agitación leve a
40 temperatura ambiente durante la noche.

- La reacción de digestión se analiza mediante LC analítica en un sistema de cromatografía líquida de ultra-rendimiento Waters Acquity con el uso de una columna C18 y el peso molecular se confirma por espectrometría de masa (MS) de ionización desorción con laser asistida por matriz (MALDI-TOF) (Bruker Daltonics Autoflex II TOF/TOF).
- 5 La ALP inmovilizada se elimina por filtración mediante el uso de un filtro de 0.2 µm. La cadena principal del péptido de insulina de dos cadenas se purifica mediante HPLC de fase inversa (sistema Waters 600) en una columna C18 mediante el uso de un gradiente de acetonitrilo. La cadena principal de los péptidos de insulina que se desean, es decir la insulina humana B28K desB29-B30, se recupera mediante liofilización.
- 10 Digestión con tripsina
- El eluato de la etapa de cromatografía de intercambio catiónico que contiene el precursor de la cadena principal del péptido de insulina se diluye con agua a una concentración de etanol de 15-20 %. La glicina se añade a una concentración de 50 mM y el pH se ajusta a 9.0-9.5 con NaOH. La tripsina se añade en una proporción de 1:300 (p:p) y se permite que ocurra la
- 15 digestión a 4 grados. La digestión se monitorea mediante análisis cada 20 minutos hasta que se completa la digestión. La digestión termina con la adición de ácido cítrico 1 M en una proporción de 3:100 (volumen:volumen).
- La reacción de digestión se analiza mediante LC analítica en un sistema de cromatografía líquida de ultra-rendimiento Waters Acquity mediante el uso de una columna C18 y el peso
- 20 molecular se confirma por MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics Autoflex II TOF/TOF).
- La cadena principal del péptido de insulina de dos cadenas se purifica mediante HPLC de fase inversa (sistema Waters 600) en una columna C18 mediante el uso de un gradiente de acetonitrilo. La cadena principal del péptido de insulina que se desea, se recupera mediante liofilización.
- 25 La pureza se determina mediante LC analítica en un sistema de cromatografía líquida de ultra-rendimiento Waters Acquity mediante el uso de una columna C18, y se confirma el peso molecular por MALDI-TOF MS.

(Método 2) Ejemplo preparativo - Procedimientos de acilación y purificación

Procedimientos de purificación

- 30 *Método de purificación 1*
- Columna: Waters x Bridge PrePc18, 30 x 250 mm
- Flujo: 20 ml/min
- Tampón A: TFA al 0.1 % en agua
- Tampón B: TFA al 0.1 % en acetonitrilo
- 35 Gradiente: 20-45 % B o 30-40 % B o 20-60 % B o 20-40 % B o 25-50 % B o 20-55 % B o 30-45 % B durante 40 min
- Método de Purificación 2*
- Columna: Fenomenex, 5µ, C18, 110 Å, 30 x 250 mm
- Flujo: 20 ml/min
- 40 Tampón A: TFA al 0.1 % en agua

Tampón B: TFA al 0.1 % en acetonitrilo

Gradiente: 10-60 % B durante 80 min o 0-60 % B durante 95 min o 25-55 % B durante 60 min

Procedimiento general para la preparación de reactivos de acilación

- 5 Diácidos simples: Los monoácidos activados con NHS se prepararon mediante la activación de un éster de diácido-mono-t-butil con TSTU y DIPEA en NMP y se usó directamente o se preparó y aisló el éster diácido-mono-NHS. Cuando se usó un reactivo de acilación protegido con terc-butilo el derivado de insulina resultante se desprotegió mediante el tratamiento con TFA.
- 10 Diácidos con enlazadores OEG: El reactivo se fabricó mediante síntesis de fase sólida escalonada en resina de clorotritilo mediante el uso de química Fmoc y se escindió de la resina con HFIP, TFA, una mezcla de HFIP/DCM, o una mezcla de TFA/DCM.
- Algunos agentes de acilación se prepararon, se aislaron y se usaron como NHS-ésteres sin ningún grupo protector.

15 *Procedimiento de acilación general 1*

- Se disolvieron 100 mg del análogo de insulina adecuado en 1.2 ml de Na₂CO₃ 0.1 M y 0.6 ml de NMP y se ajustó el pH a 10.7 ± 0.3 . Se añadió 0.03 mmol del reactivo de acilación en 0.3 ml de NMP y el pH se mantuvo a 10.7 ± 0.3 mediante la adición de NaOH 4 M cuando fue necesario. Después de 30 a 60 minutos, se completó la reacción, y el producto se
- 20 precipitó mediante adición de 40 ml de isopropanol, se centrifugó, se lavó con éter y se secó. Alternativamente el producto podría aislarse mediante dilución con 30 ml de agua y ajuste del pH a 4.5-5.0 lo que conduce a precipitación isoeléctrica. De manera alternativa, la mezcla de reacción se acidificó con ácido acético o TFA y se purificó inmediatamente.
- Posteriormente, el producto se purificó por cromatografía líquida de alto rendimiento de
- 25 fase inversa (RP-HPLC) en TFA-acetonitrilo como se describió anteriormente y se liofilizaron las fracciones puras. La identidad del producto se confirmó por espectrometría de masa de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-MS o cromatografía líquida de alto rendimiento (UPLC)/electrospray-MS.

- En algunos casos, la síntesis se escaló para producir cantidades más grandes o más
- 30 pequeñas. En ese caso, todas las cantidades de materiales de partida, reactivos y solventes se escalaron por el mismo factor

Modificación 1

- Cuando el reactivo de acilación contenía un grupo protector terc-butilo, el producto después del isopropanol o la precipitación isoeléctrica se disolvió en 5 ml de TFA o TFA:agua
- 35 (95:5) durante 5 minutos, se precipitó con 35 ml de éter, se lavó dos veces con éter y se secó.

Modificación 2

- Cuando el reactivo de acilación contenía un grupo protector terc-butilo, el producto crudo isoprecipitado se disolvió en 5 ml de TFA o TFA:agua 95:5 o TFA:triisopropilsilano 99:1.
- 40 La solución se agitó durante 20-30 min, luego se diluyó con agua, en algunos casos

adicionalmente con DMSO o NMF, e inmediatamente se purificó mediante HPLC preparativa.

Modificación 3

En algunos casos donde el reactivo de acilación parece ser poco soluble en la mezcla de
5 reacción, se añade más NMP (hasta 1 ml) y la mezcla de reacción se calienta brevemente a 37 °C.

Procedimiento de acilación general 2

Se disolvieron 100 mg de insulina apropiada en 2 ml de DMSO y se agregó 40 ul de
Bartons Base (2-t-butil-1,1,3,3-tetrametilguanidina). Se agregó 20 umol del agente acilante
10 y después de un minuto se completó la reacción. La mezcla de reacción se acidificó y se diluyó en agua y se purificó inmediatamente.

(Método 3) Síntesis química de derivados de insulina

La cadena A de la insulina se sintetizó mediante la síntesis estándar de péptidos Fmoc, por
ejemplo, en un sintetizador Prelude o Liberty. La desprotección se realizó con 10 % o 20 %
15 de piperidina en DMF. Todos los grupos protectores fueron estándar, excepto que los Cys
6, 11 y 20 tenían grupos protectores Trt y los Cis 7 tenían Acm. Si el residuo C-terminal
fue Asn, el péptido se sintetizó en una resina PAL o Rink con Fmoc-Asp-OBu como el
primer aminoácido.

Después de la síntesis, la resina se lavó con DCM, se trató con yoduro al 1 % en
20 DCM/HFIP (4:1) durante 1 minuto, y se incubó en DCM/HFIP (4:1) durante 15 minutos lo
que conducen a la formación del disulfuro A6-A11. Después del lavado con DCM y
secado, el péptido se escinde con TFA/agua/DPDS (93:5:2) lo que proporciona la cadena de
insulina A con piridilsulfuro en Cys20. La precipitación con éter, el lavado y el secado
conducen a la cadena cruda A la cual se usa en la combinación de cadenas subsiguiente.

25 La cadena B de insulina se sintetizó mediante síntesis estándar de péptidos Fmoc, por
ejemplo, en un sintetizador Liberty o Prelude. La resina fue por ejemplo, una resina de
Wang precargada. Todos los grupos protectores fueron estándar, excepto que Cys7 tenía
Acm y Cys19 tenía Trt.

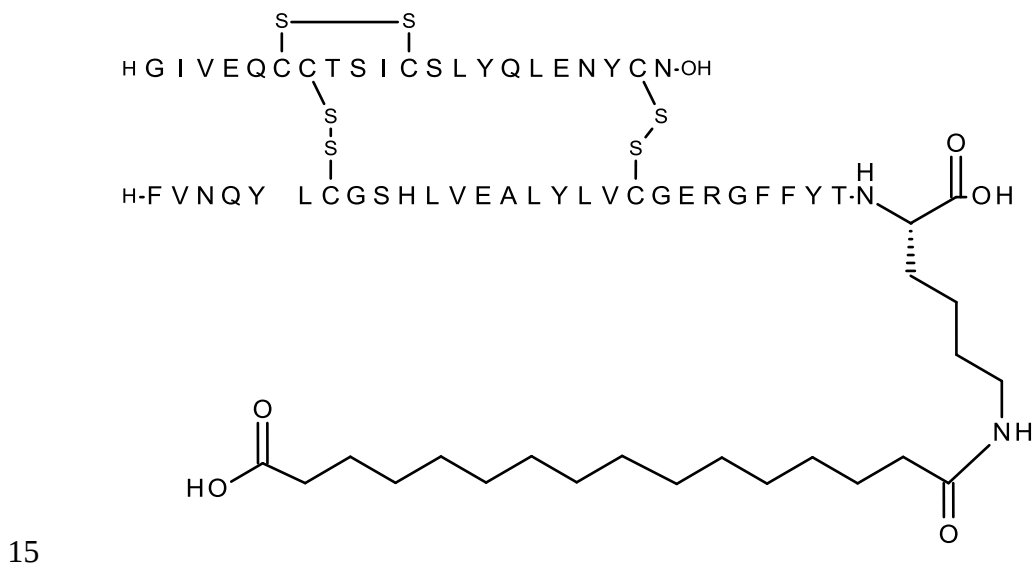
La escisión se realizó con TFA/agua/TIPS (93:4:3). La precipitación con éter, el lavado y el
30 secado conducen a la cadena B cruda la cual se usó en la combinación de cadenas
subsecuente.

Cuando se deseó un derivado de insulina con una cadena lateral modificada con lisina, la
modificación se introdujo durante la síntesis del péptido. La lisina para la modificación se
introdujo como Fmoc-Lisina(Mtt)-OH y el extremo N del péptido se protege con Boc (ya
35 sea mediante el acoplamiento de un aminoácido protegido por Boc en la última etapa de
acoplamiento o mediante la reacción del péptido unido a resina con 5 equivalentes de Boc-
anhídrido en DMF). El grupo Mtt se eliminó mediante el tratamiento de la resina con
DMF/HFIP (1:4) durante 30 minutos y la cadena lateral se sintetizó por química Fmoc
estándar como se describe para la cadena principal peptídica.

La cadena A y la cadena B crudas (0.14 mmol de cada una) se disolvieron en 40 ml de DMSO. Se añadió 2 ml de tampón Tris 2 M a pH 8.5 y se completó la combinación de cadenas en aproximadamente 10 minutos. La solución se diluyó con 40 ml de DMSO y 200 ml de acetonitrilo al 40 %, TFA al 1 %. Se añadió N-clorosuccinimida a una concentración final de 5 mM. Esto formó el tercer puente disulfuro en menos de 10 minutos. La solución se diluyó y neutralizó con 600 ml de Tris 0.2 M a pH 7.8 y se purificó mediante RP-HPLC en una columna C18 en un gradiente de acetonitrilo en 20 mM de fosfato a pH 7.2. Las fracciones que contienen el compuesto deseado se combinaron y se repurificaron en la misma columna con un gradiente de acetonitrilo en TFA al 0.1 %. Las fracciones puras se combinaron y liofilizaron. El rendimiento fue usualmente de 20-50 mg del derivado de insulina deseado que se caracterizó posteriormente por UPLC y LC-MS.

EJEMPLOS DE DERIVADOS DE INSULINA DE LA INVENCION

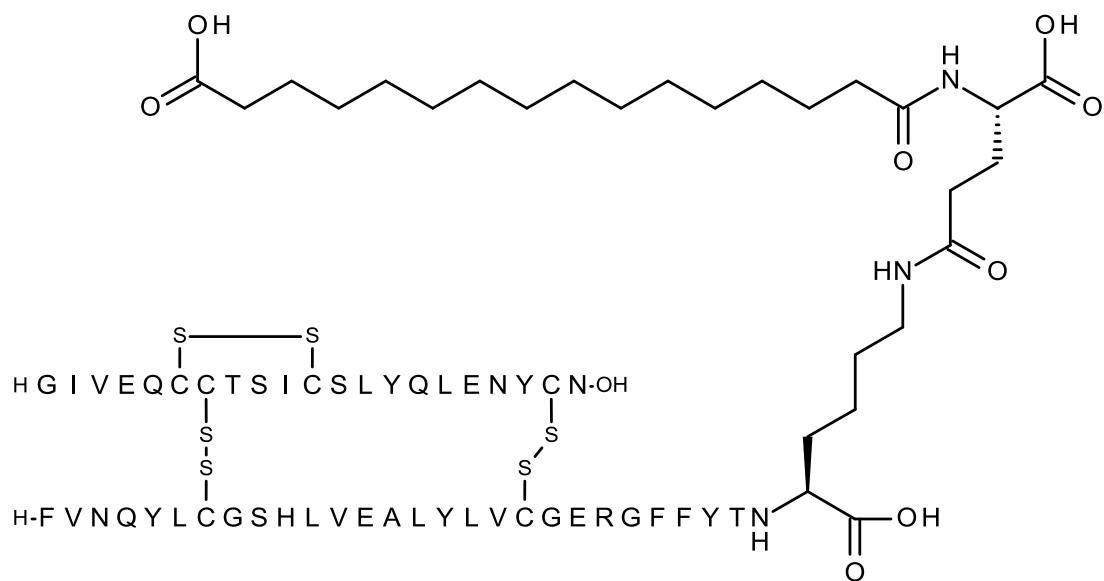
Ejemplo 1: N{Epsilon-B28}-15-carboxipentadecanoil-[TyrB5,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina]



Sintetizado por el Método de Síntesis 3.

Masa Calculada = 5,903.8; LC-MS m/4 Encontrado = 1,476.66

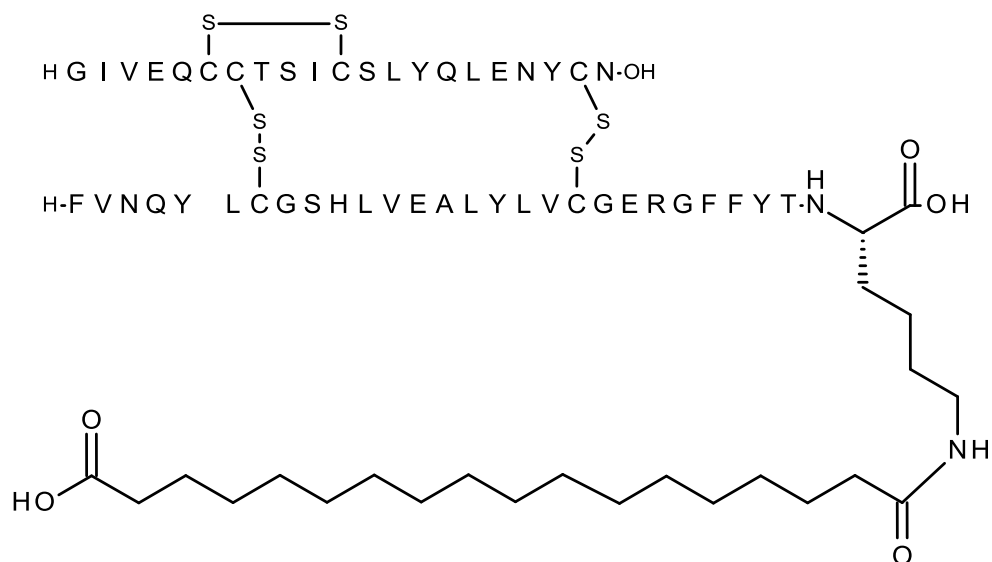
Ejemplo 2: N{Epsilon-B28}-[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoilamino)butanoil]-[TyrB5,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina



Sintetizado por el Método de Síntesis 3.

Masa Calculada = 6,032.9; LC-MS m/4 Encontrado = 1,509.07

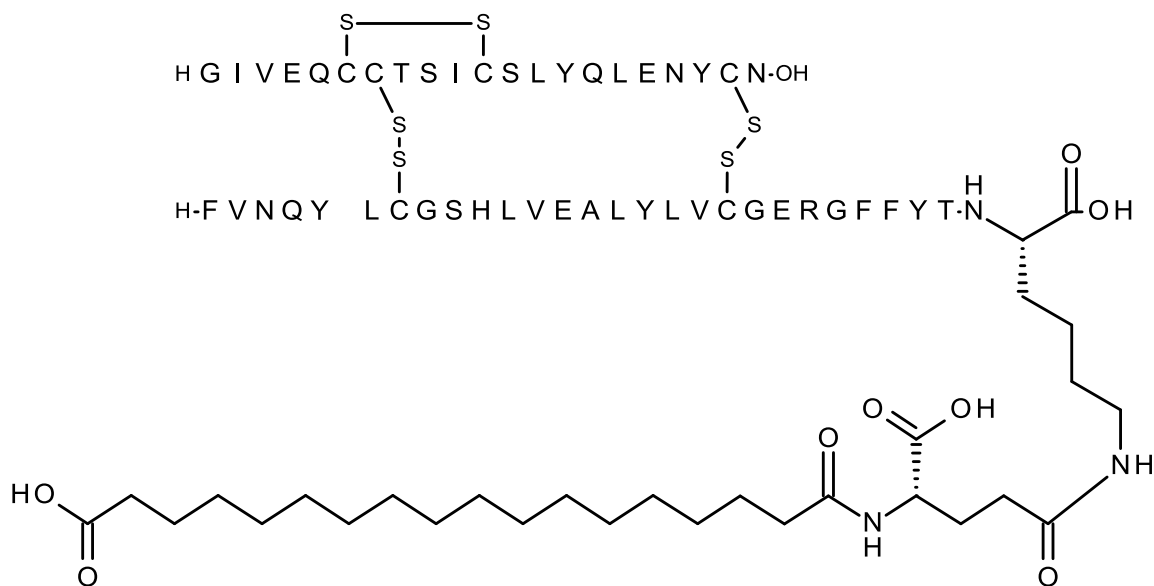
5 **Ejemplo 3: N{Epsilon-B28}-17-carboxiheptadecanoil-[TyrB5,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina**



Sintetizado por el Método de Síntesis 3.

10 Masa Calculada = 5,931.8; LC-MS m/4 Encontrado = 1,484

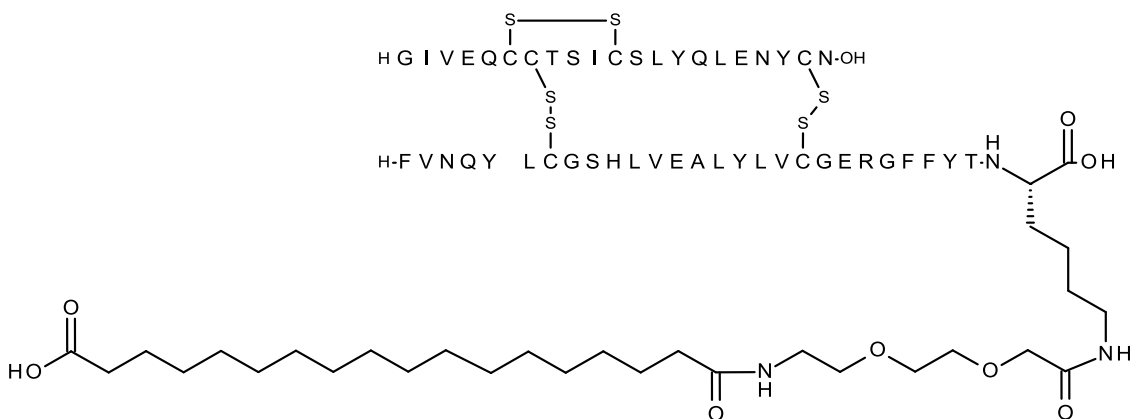
Ejemplo 4: N{Epsilon-B28}-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]-[TyrB5,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina



Sintetizado por el Método de Síntesis 3

Masa Calculada = 6,060.9; LC-MS m/4 Encontrado = 1,516.73

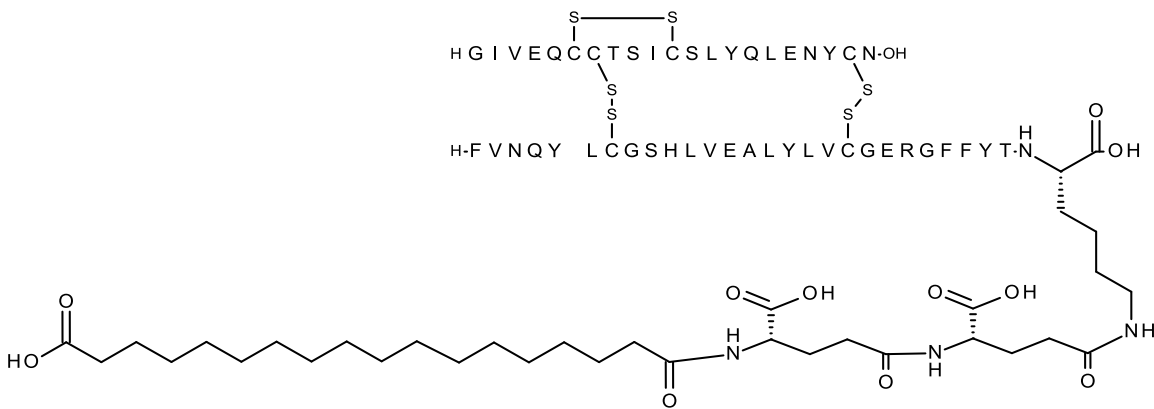
5 **Ejemplo 5:** **N{Epsilon-B28}-[2-[2-[2-(17-carboxiheptadecanoilamino)etoxi]etoxi]acetil]-[TyrB5,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina**



10 Sintetizado por el Método de Síntesis 3

Masa Calculada = 6,077.0; LC-MS m/5 Encontrado = 1,216.34

Ejemplo 6: **N{Epsilon-B28}-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]-[TyrB5,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina**

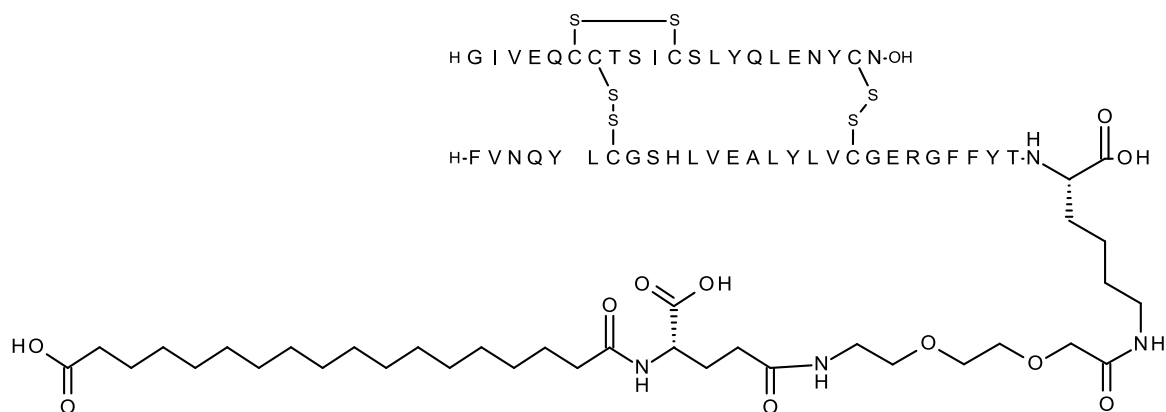


Sintetizado por el Método de Síntesis 3

Masa Calculada = 6,190.0; LC-MS m/4 Encontrado = 1,548.37

Ejemplo 7: N{Epsilon-B28}-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-

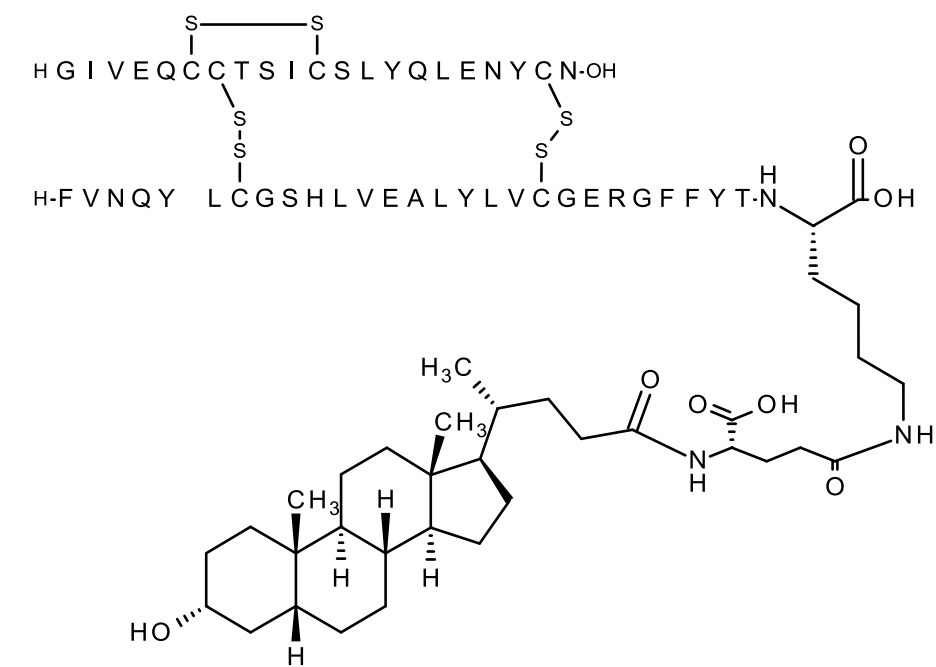
5 **carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[TyrB5,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina**



Sintetizado por el Método de Síntesis 3

10 Masa Calculada = 6,206.1; LC-MS m/4 Encontrado = 1,552.37

Ejemplo 8: N{Epsilon-B28}-[(4S)-4-carboxi-4-[(4R)-4-[(3R,10S,13R,17R)-3-hidroxi-10,13-dimetil-2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il]pentanoil]amino]butanoil]-[TyrB5,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina



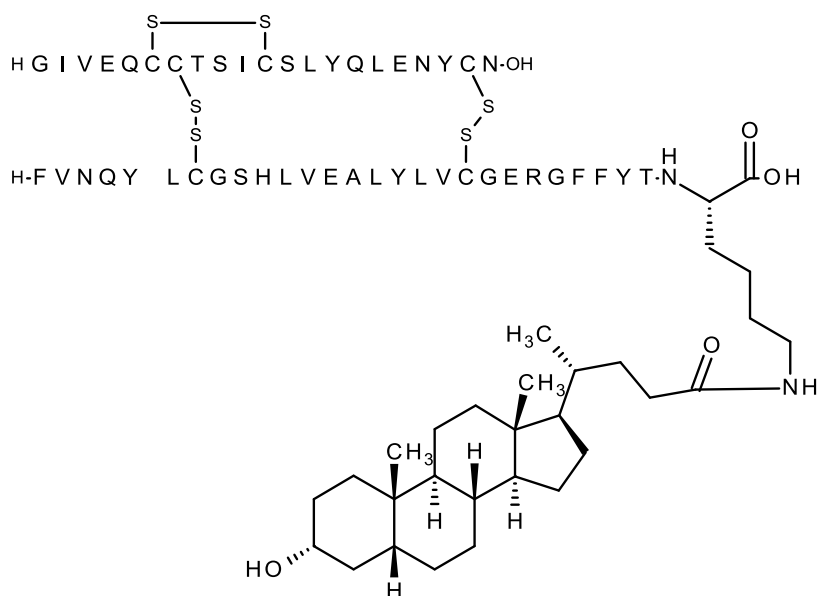
15

Sintetizado por el Método de Síntesis 3

Masa Calculada = 6,123.1; LC-MS m/4 Encontrado = 1,531.7

Ejemplo 9: N{Epsilon-B28}-[(4R)-4-[(3R,10S,13R,17R)-3-hidroxi-10,13-dimetil-

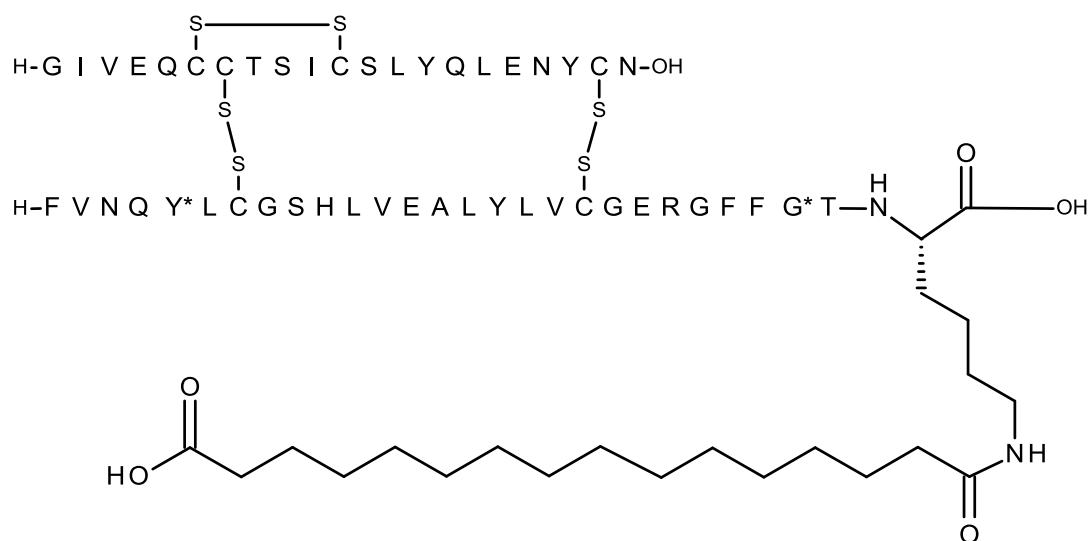
20 **2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il]pentanoil]-[TyrB5,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina**



Sintetizado por el Método de Síntesis 3

Masa Calculada = 5,993.9; LC-MS m/4 Encontrado = 1,499.16

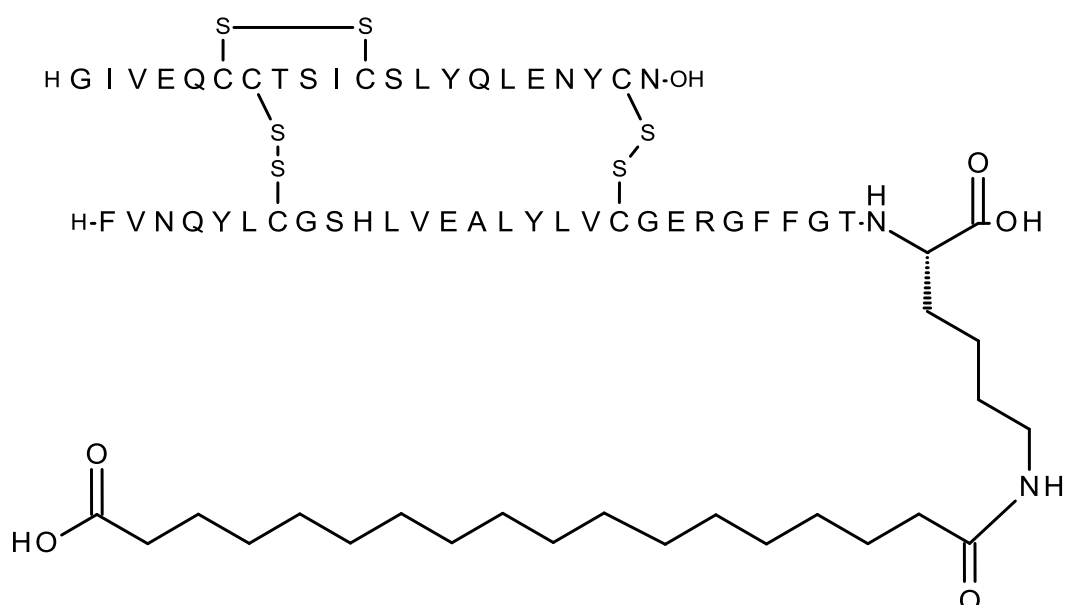
5 **Ejemplo 10: N{Epsilon-B28}-15-carboxipentadecanoil-[TyrB5,GlyB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina**



Sintetizado por el Método de Síntesis 3

10 Masa Calculada = 5,797.7; LC-MS m/4 Encontrado = 1,449.93

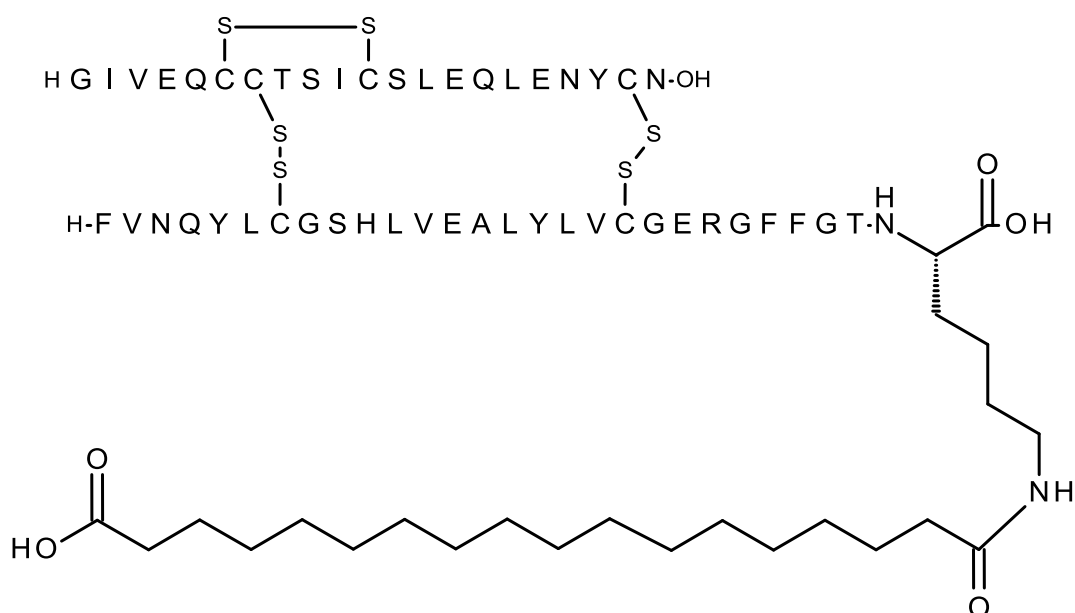
Ejemplo 11: N{Epsilon-B28}-17-carboxiheptadecanoil-[TyrB5,GlyB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina



Sintetizado por el Método de Síntesis 3

Masa Calculada = 5,825.7; MALDI-MS Encontrada = 5,825.7

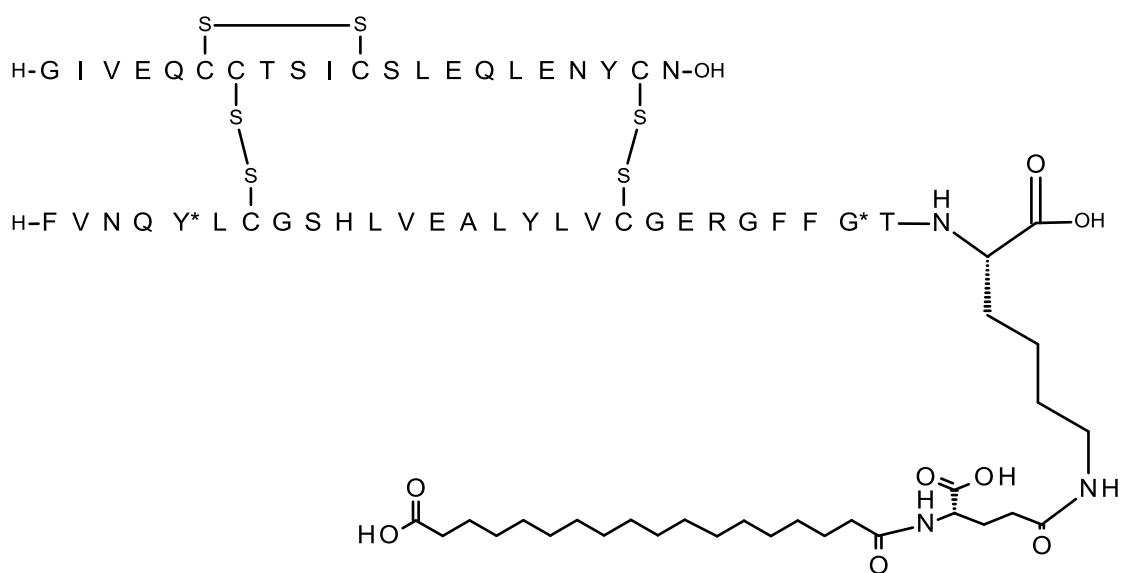
5 **Ejemplo 12: N{Epsilon-B28}-17-carboxiheptadecanoil-[GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina**



Sintetizado por el Método de Síntesis 3

10 Masa Calculada = 5,791.6; LC-MS m/3 Encontrado = 1,931.44

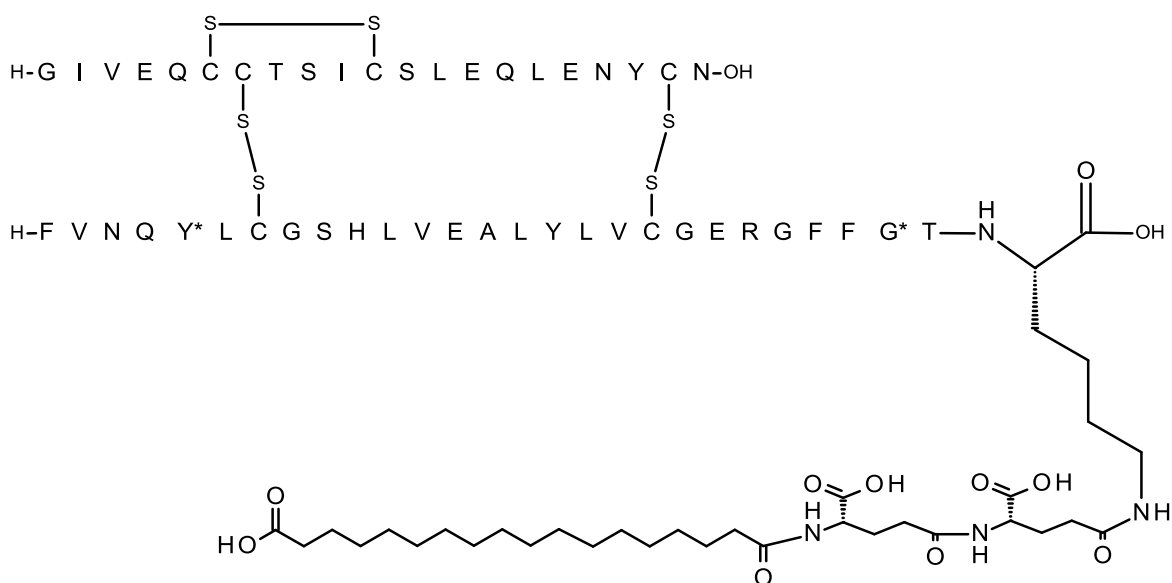
Ejemplo 13: N{Epsilon-B28}-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]-[GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina



Sintetizado por el Método de Síntesis 3

Masa Calculada = 5,920.8; LC-MS m/5 Encontrado = 1,185.04

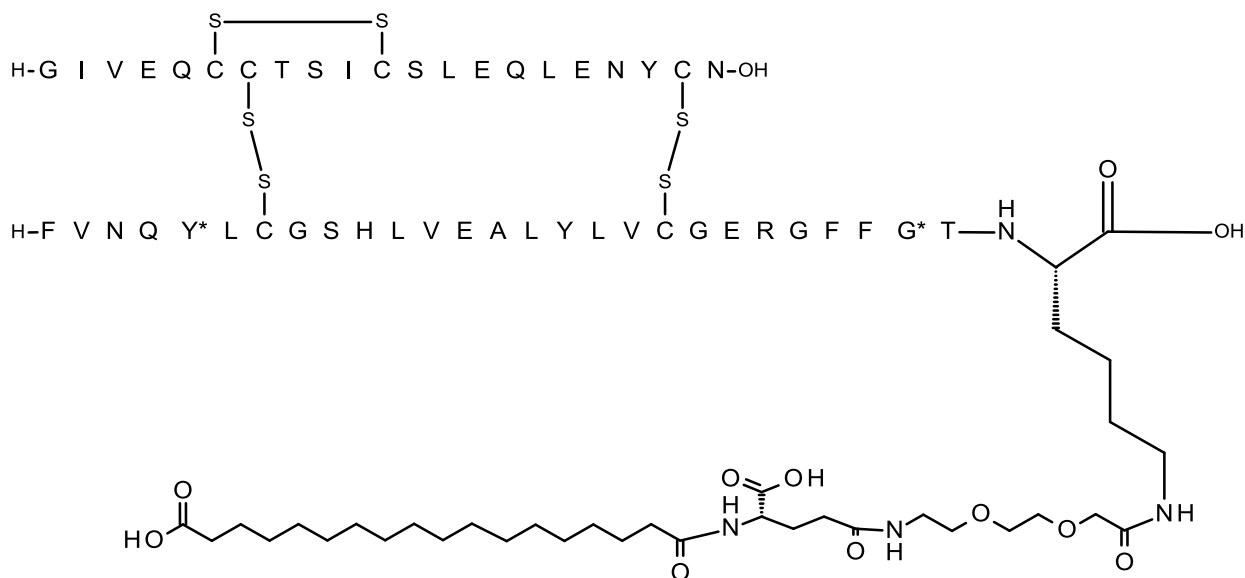
- 5 **Ejemplo 14: N{Epsilon-B28}-[(4S)-4-carboxi-4-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]-[GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina**



- 10 Sintetizado por el Método de Síntesis 3

Masa Calculada = 6,049.9; LC-MS m/4 Encontrado = 1,513.32

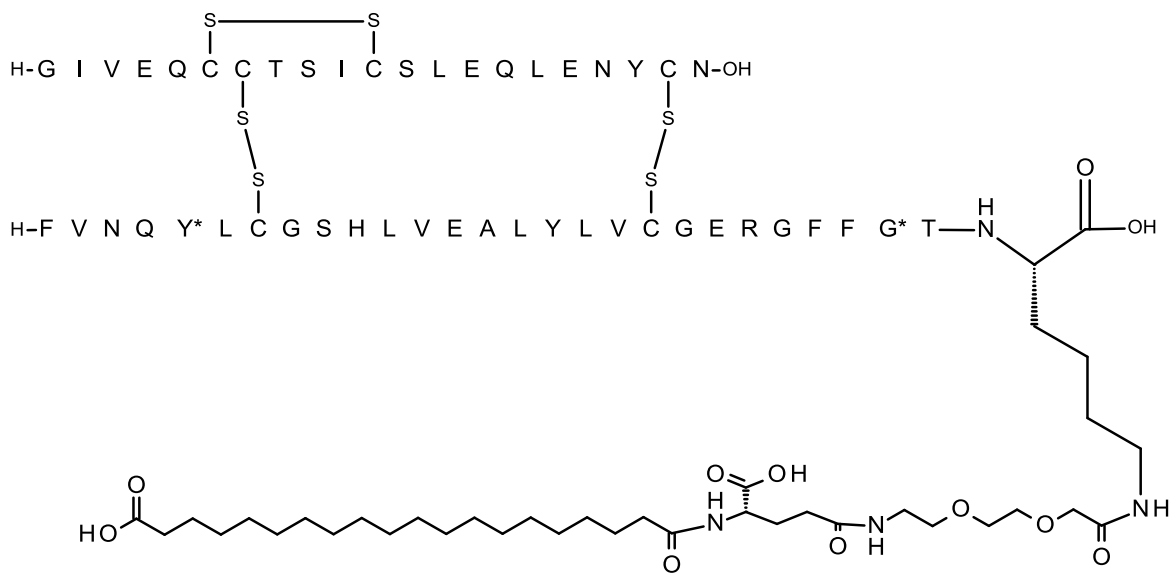
- Ejemplo 15: N{Epsilon-B28}-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina**



Sintetizado por el Método de Síntesis 3

Masa Calculada = 6,065.9; LC-MS m/4 Encontrado = 1,517.34

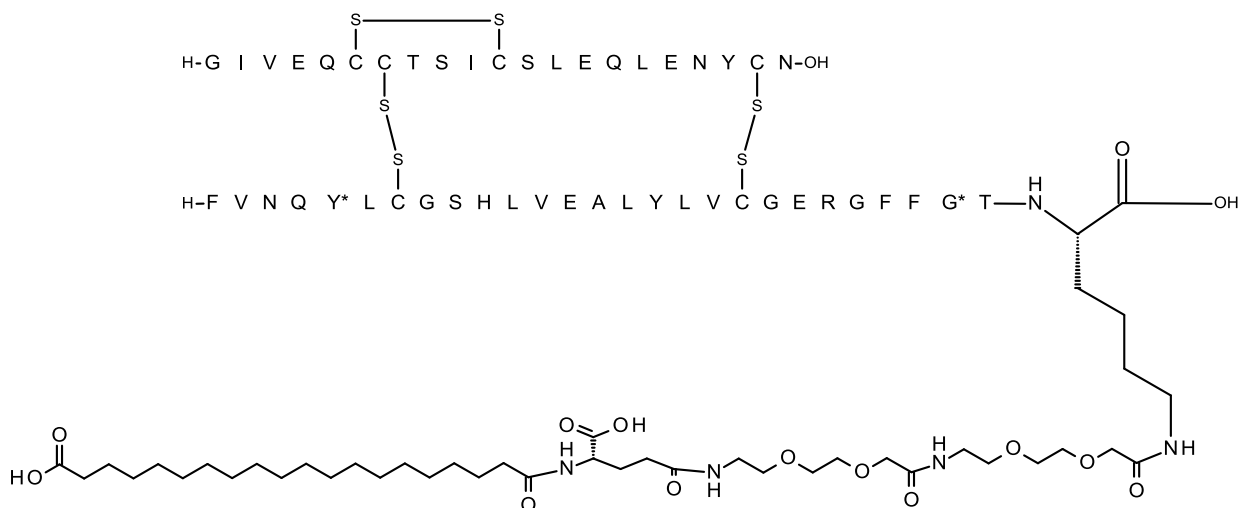
5 **Ejemplo 16: N{Epsilon-B28}-[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina**



10 Sintetizado por el Método de Síntesis 3

Masa Calculada = 6,094.0; LC-MS m/4 Encontrado = 1,524.36

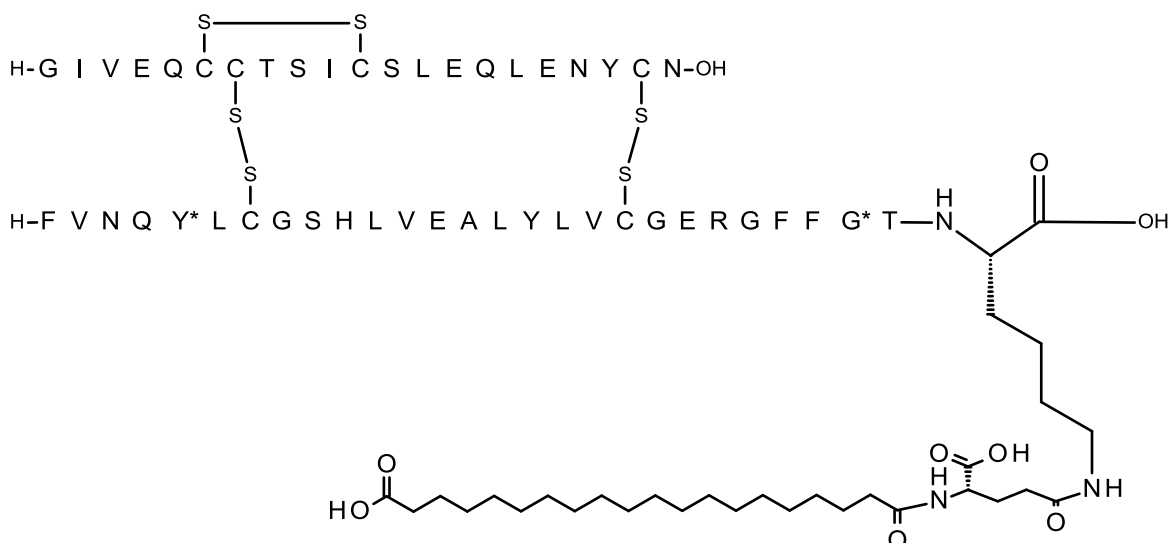
Ejemplo 17: N{Epsilon-B28}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulin



Sintetizado por el Método de Síntesis 3

Masa Calculada = 6,239.1; LC-MS m/4 Encontrado = 1,560.4

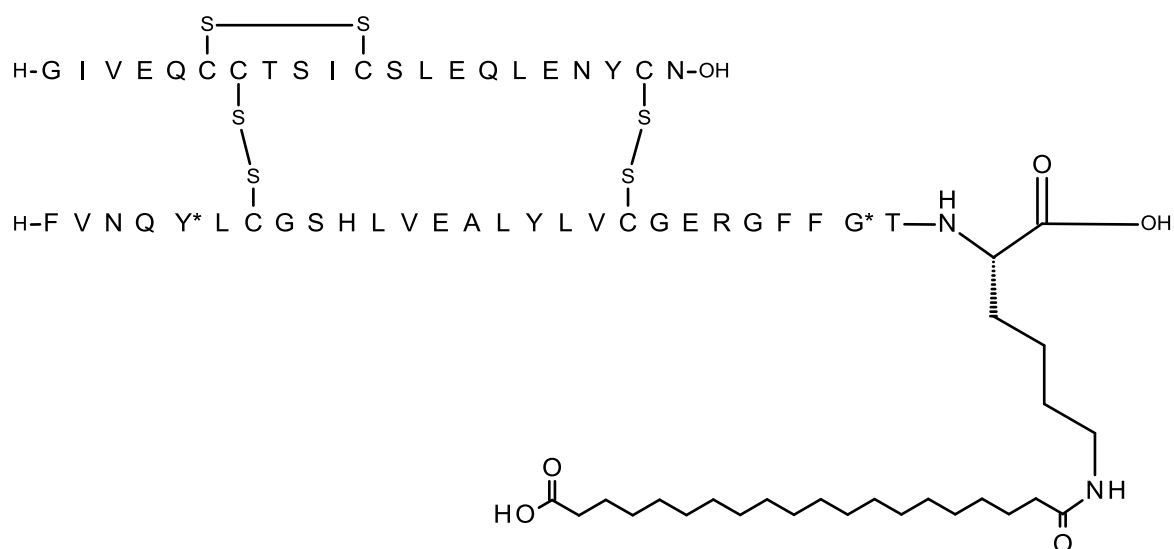
- 5 **Ejemplo 18: N{Epsilon-B28}-[(4S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butanoil]-[GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina**



- 10 Sintetizado por el Método de Síntesis 3

Masa Calculada = 5,948.8; LC-MS m/5 Encontrado = 1,190.69

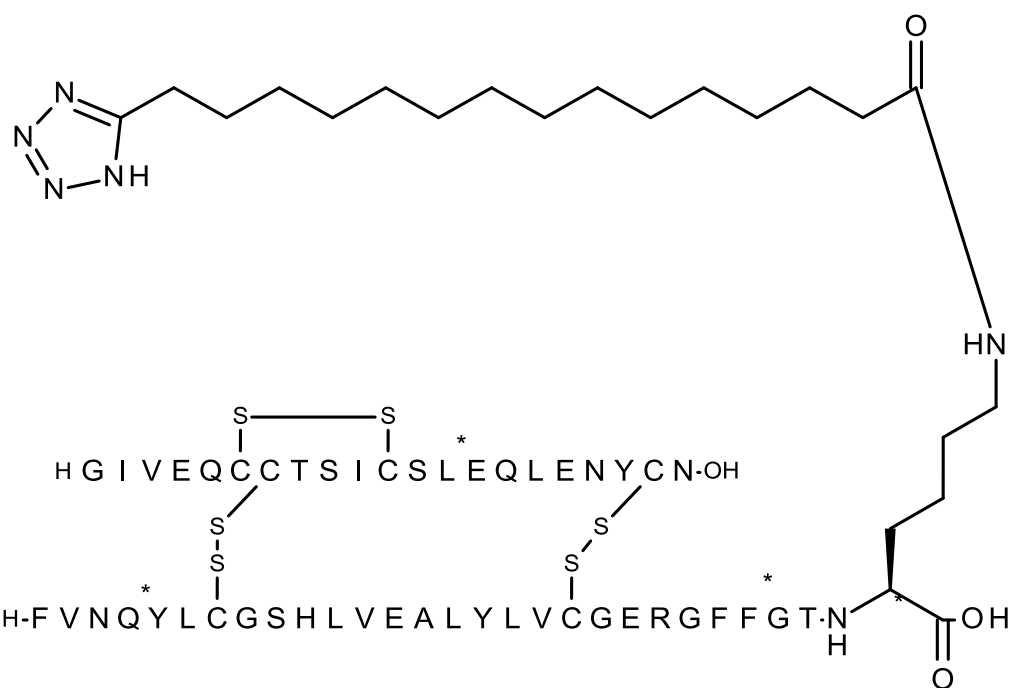
- Ejemplo 19: N{Epsilon-B28}-19-carboxinonadecanoil-[GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina**



Sintetizado por el Método de Síntesis 3

Masa Calculada = 5,819.7; LC-MS m/4 Encontrado = 1,455.67

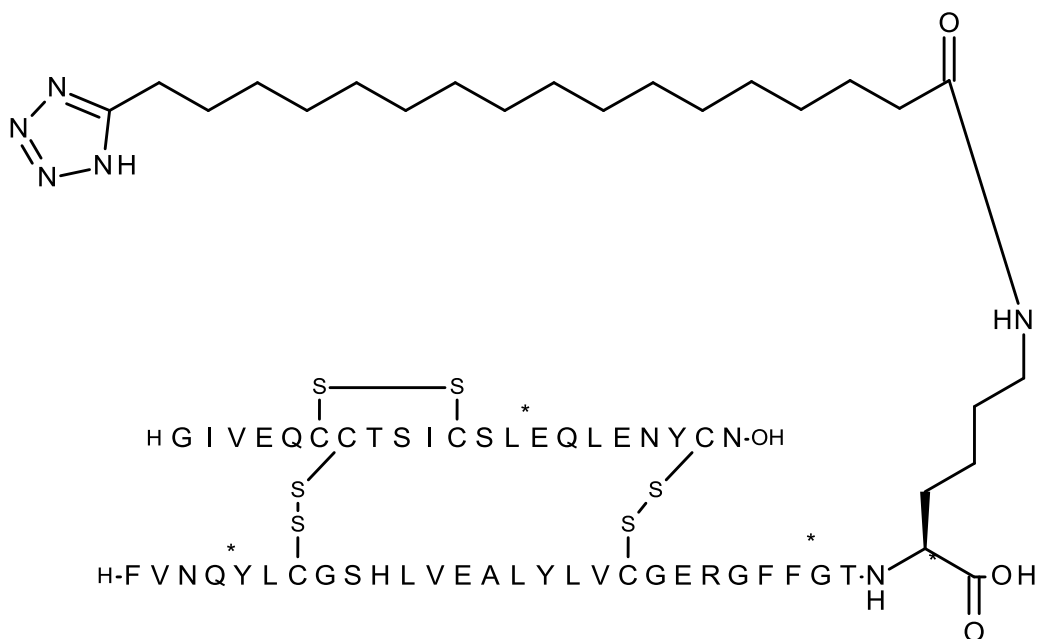
- 5 **Ejemplo 20: N{Epsilon-B28}-15-(1H-tetrazol-5-il)pentadecanoil-[GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina**



- 10 Sintetizado por el Método de Síntesis 2

Masa Calculada = 5,787.6; LC-MS m/4 Encontrado = 1,448.14

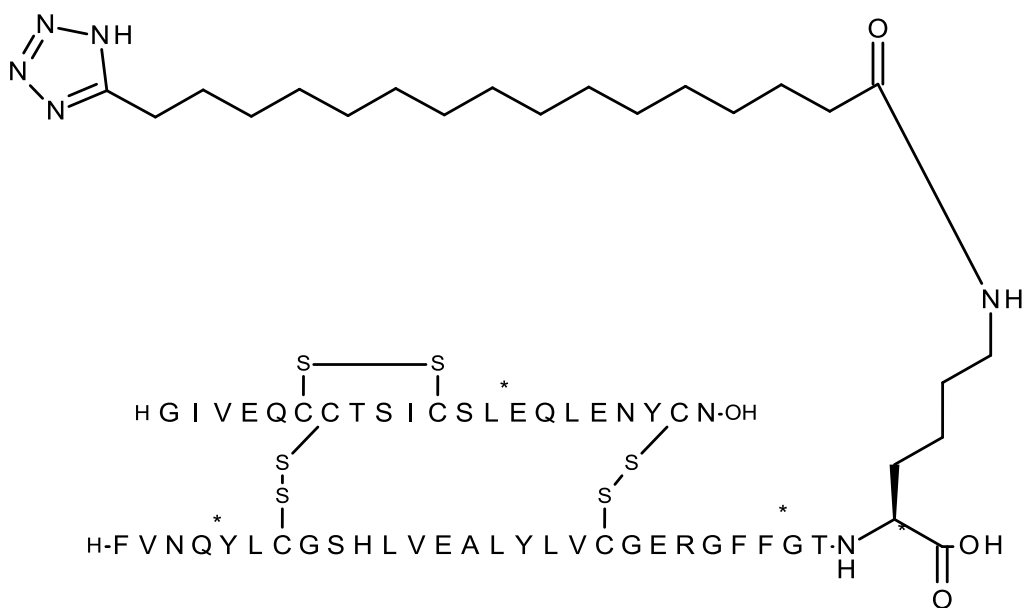
- Ejemplo 21: N{Epsilon-B28}-17-(1H-tetrazol-5-il)heptadecanoil-[GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina**



Sintetizado por el Método de Síntesis 2

Masa Calculada = 5,815,7; LC-MS m/4 Encontrado = 1,455.19

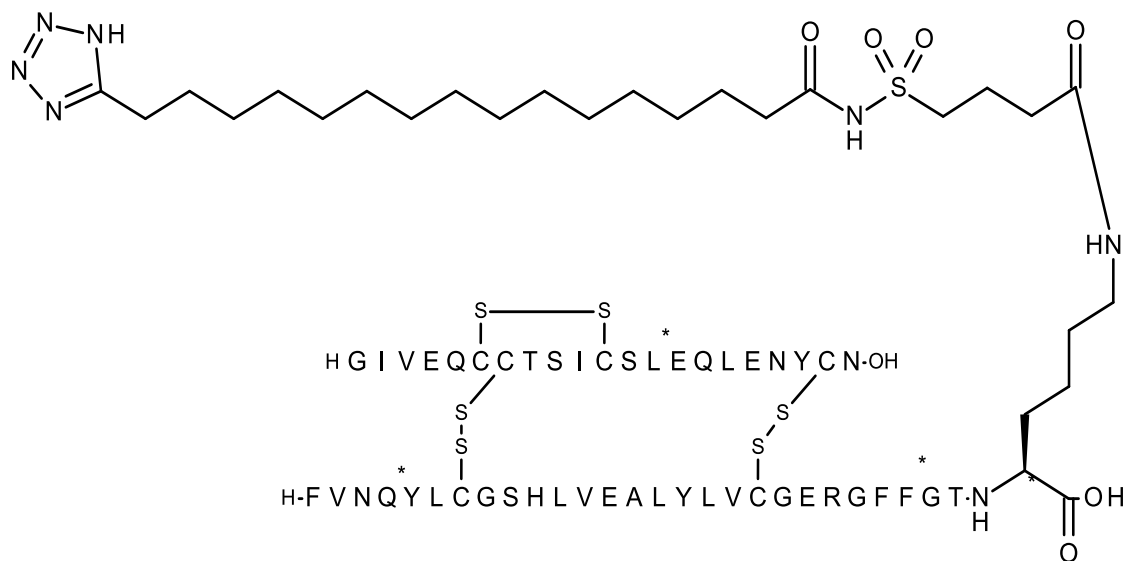
5 **Ejemplo 22: N{Epsilon-B28}-16-(1H-tetrazol-5-il)hexadecanoil-[GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina**



10 Sintetizado por el Método de Síntesis 2

Masa Calculada = 5,801.7; LC-MS m/4 Encontrado = 1,451.6

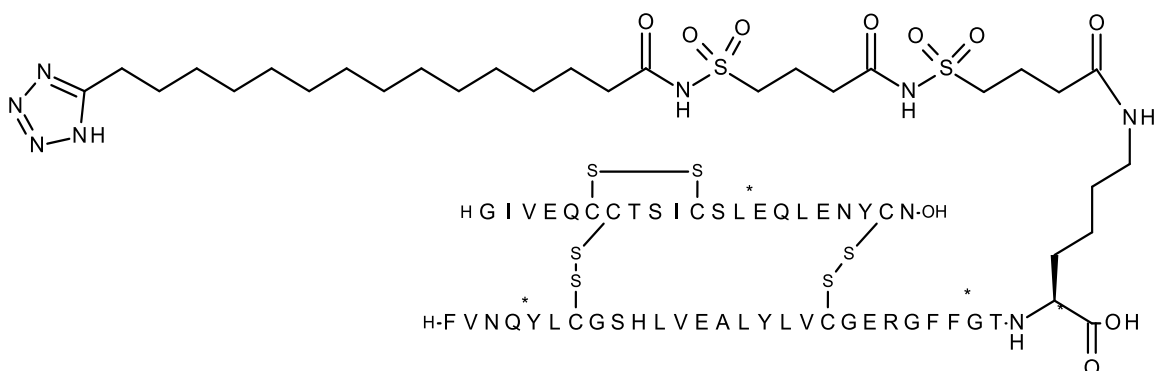
Ejemplo 23: N{Epsilon-B28}-4-[16-(1H-tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil]butanoil-[GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina



Sintetizado por el Método de Síntesis 2

Masa Calculada = 5,950.8; LC-MS m/4 Encontrado = 1,488.81

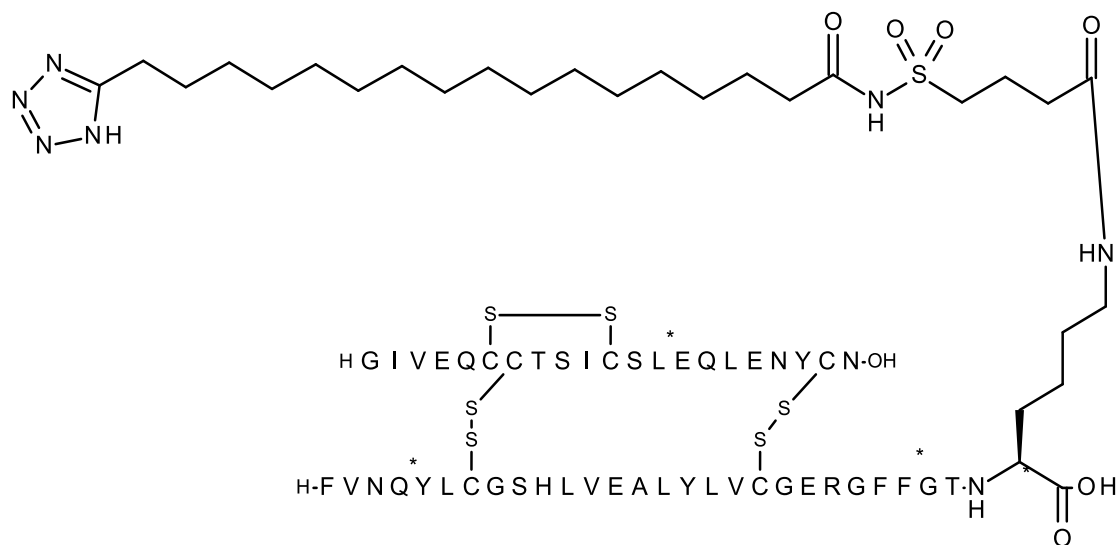
- 5 **Ejemplo 24: N{Epsilon-B28}-4-[4-[15-(1H-tetrazol-5-il)pentadecanoilsulfamoil]butanoilsulfamoil]butanoil-[GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina**



- 10 Sintetizado por el Método de Síntesis 2

Masa Calculada = 6,086.0; LC-MS m/4 Encontrado = 1,522.65

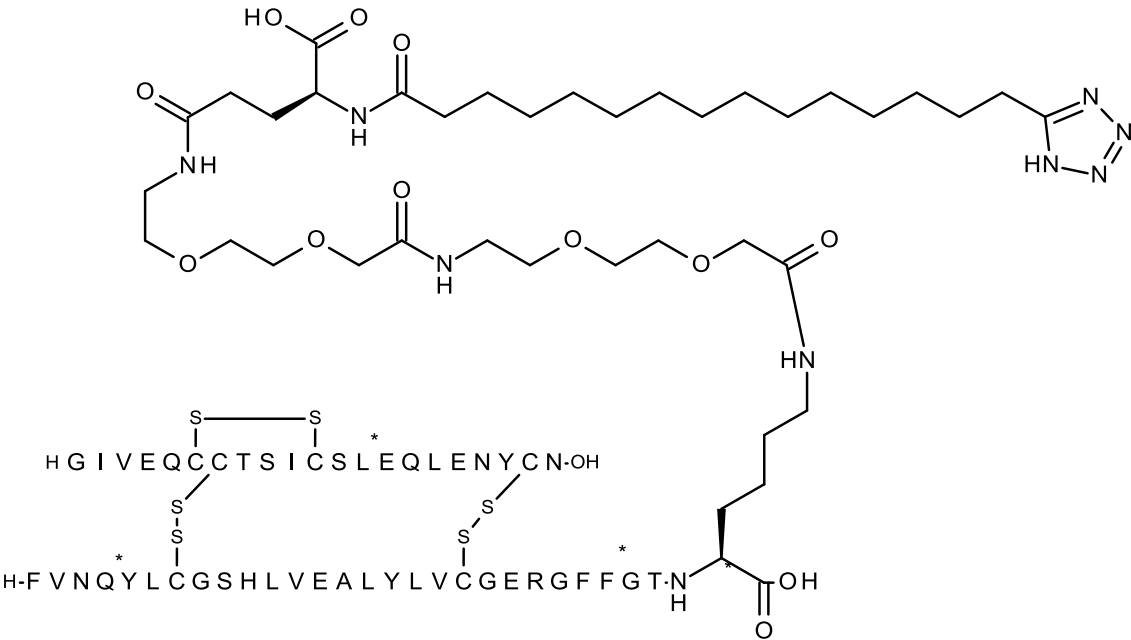
- Ejemplo 25: N{Epsilon-B28}-4-[17-(1H-tetrazol-5-il)heptadecanoilsulfamoil]butanoil-[GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina**



Sintetizado por el Método de Síntesis 2

Masa Calculada = 5,964.8; LC-MS m/4 Encontrado = 1,492.41

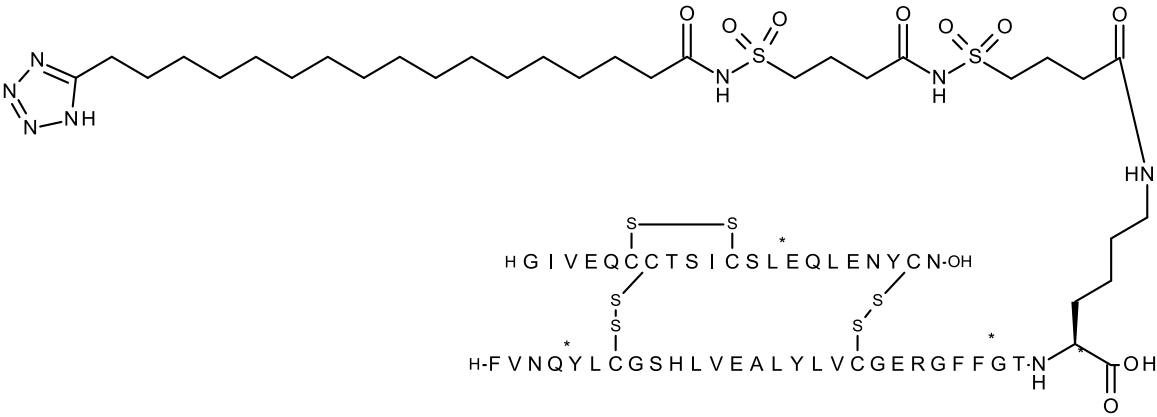
Ejemplo 26: N{Epsilon-B28}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-[15-(1H-tetrazol-5-il)pentadecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina



Sintetizado por el Método de Síntesis 2

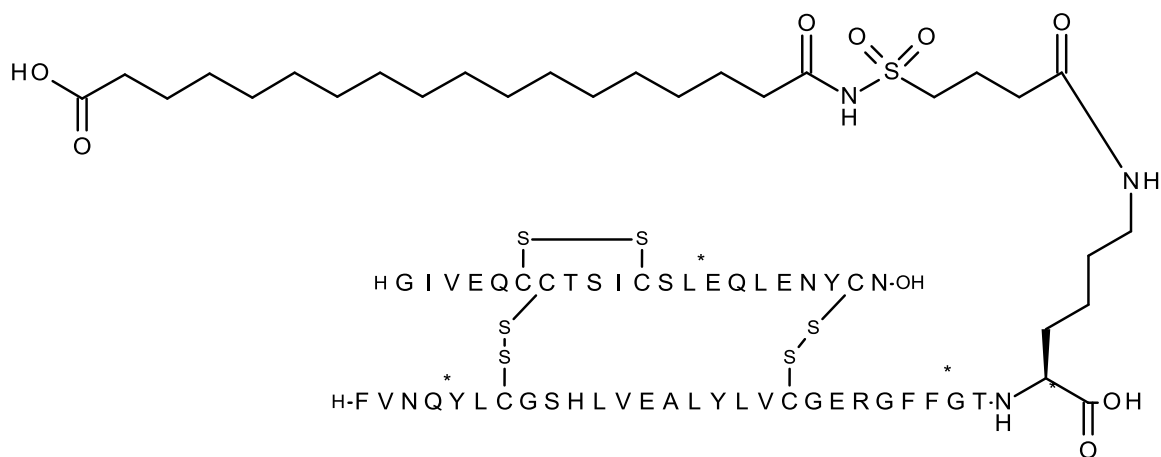
Masa Calculada = 6,207.0; LC-MS m/4 Encontrado = 1,552.95

Ejemplo 27: N{Epsilon-B28}-4-[4-[17-(1H-tetrazol-5-il)heptadecanoilsulfamoil]butanoilsulfamoil]butanoil-[GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina



Sintetizado por el Método de Síntesis 2

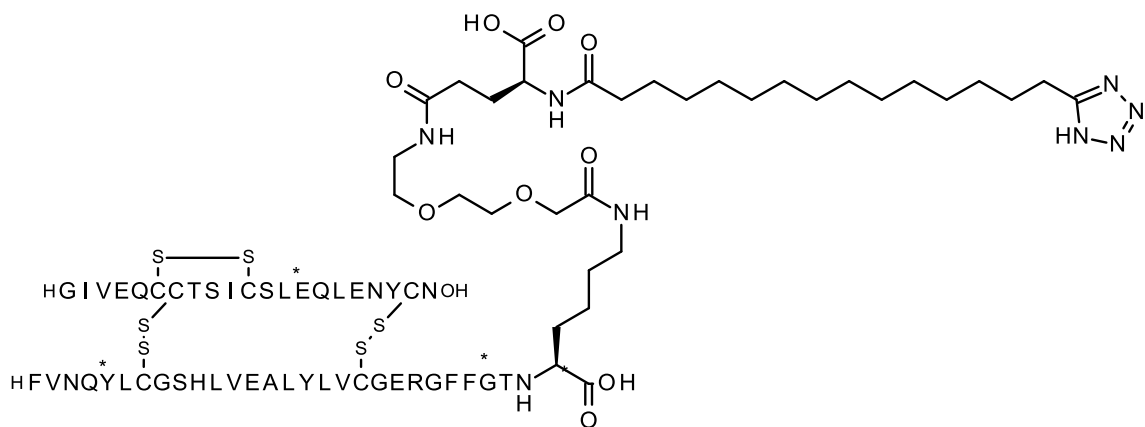
Ejemplo 28: N{Epsilon-B28}-4-(17-carboxiheptadecanoilsulfamoil)butanoil-[GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina



Sintetizado por el Método de Síntesis 2

Masa Calculada = 5,940.8; LC-MS m/4 Encontrado = 1,486.34

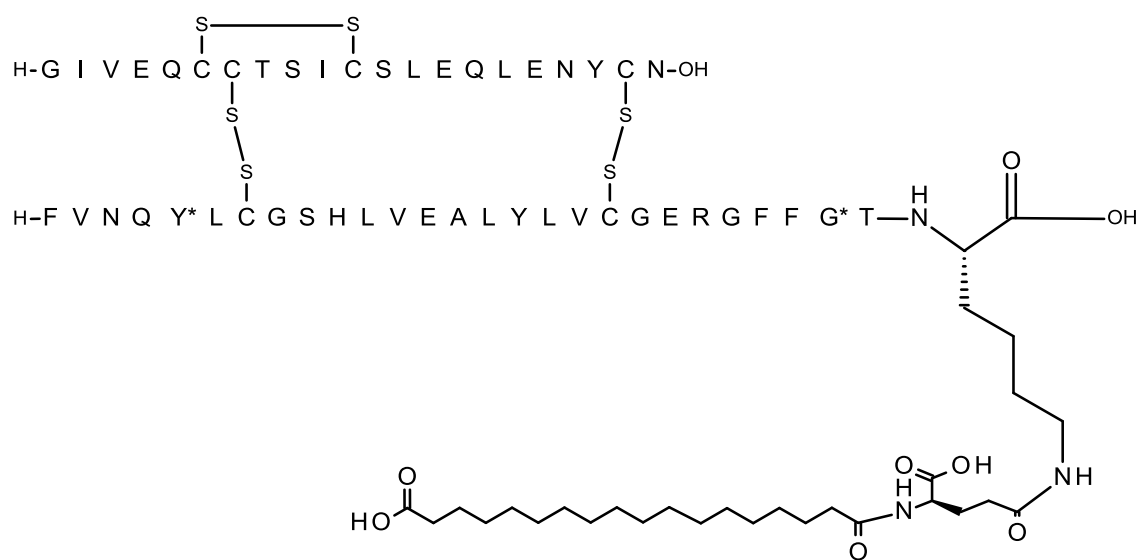
- 5 **Ejemplo 29: N{Epsilon-B28}-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-[15-(1H-tetrazol-5-il)pentadecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina**



Sintetizado por el Método de Síntesis 2

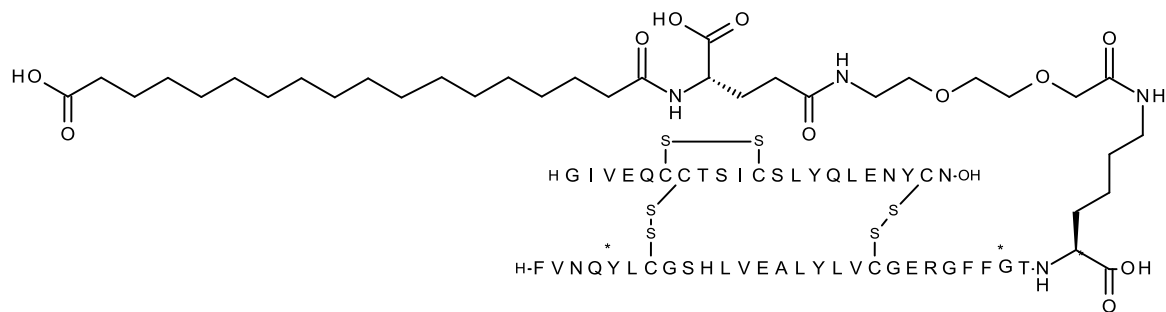
- 10 Masa Calculada = 6,061.9; LC-MS m/4 Encontrado = 1,516.63

- Ejemplo 30: N{Epsilon-B28}-[(4R)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]-[GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina**



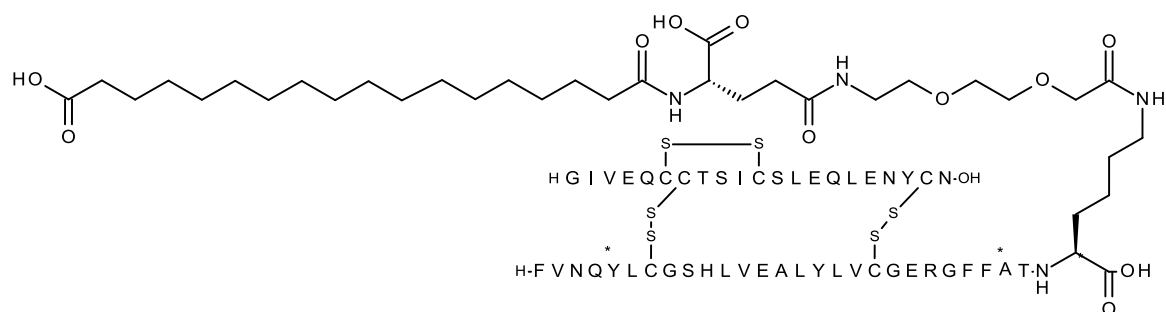
Sintetizado por el Método de Síntesis 2
Masa Calculada = 5,920.8; LC-MS m/4 Encontrado = 1,481.13

5 **Ejemplo 31: N{Epsilon-B28}-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[TyrB5,GlyB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina**



10 Sintetizado por el Método de Síntesis 2
Masa Calculada = 6,100.0; LC-MS m/4 Encontrado = 1,525.8

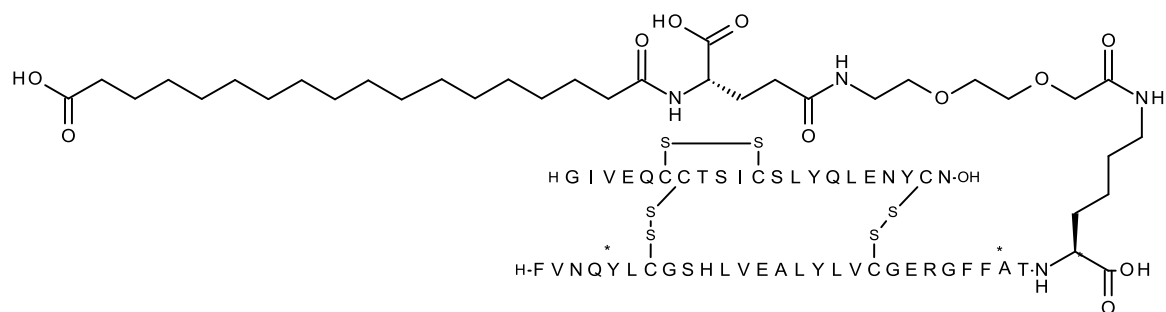
Ejemplo 32: N{Epsilon-B28}-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[GluA14,TyrB5,AlaB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina



15

Sintetizado por el Método de Síntesis 2
Masa Calculada = 6,079.9; LC-MS m/4 Encontrado = 1,520.77

20 **Ejemplo 33: N{Epsilon-B28}-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[TyrB5,AlaB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina**

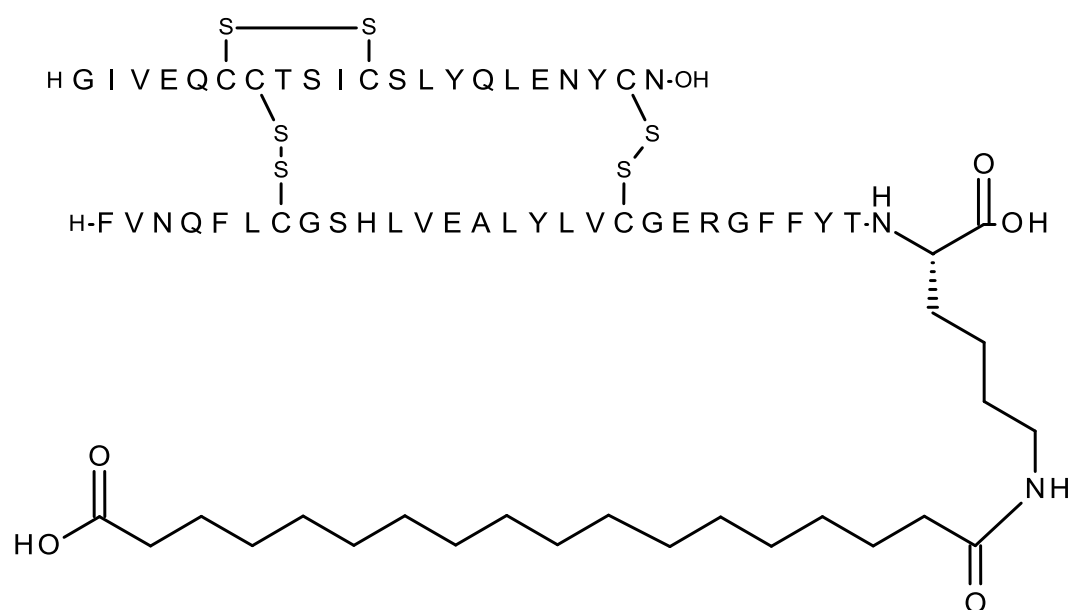


Sintetizado por el Método de Síntesis 2

Ejemplo 34: N{Epsilon-B28}-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]-[GluA14,TyrB5,AlaB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina

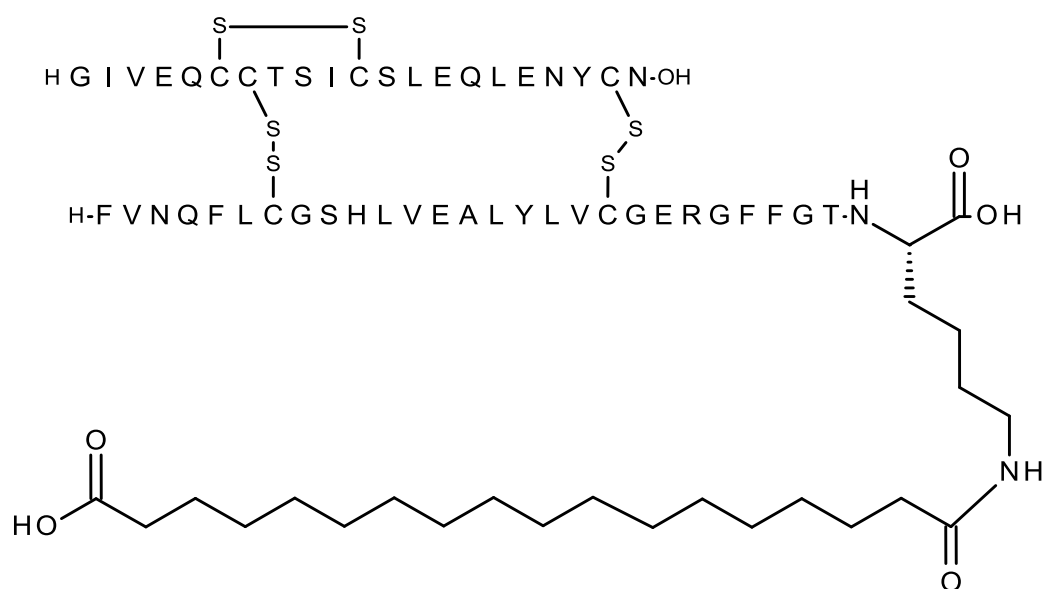
Masa Calculada = 5,934.8; LC-MS m/4 Encontrado = 1,484.5

Ejemplo 35: N{Epsilon-B28}-17-carboxiheptadecanoil-[PheB5,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina



Masa Calculada = 5,915.8; MALDI-MS Encontrada = 5,916

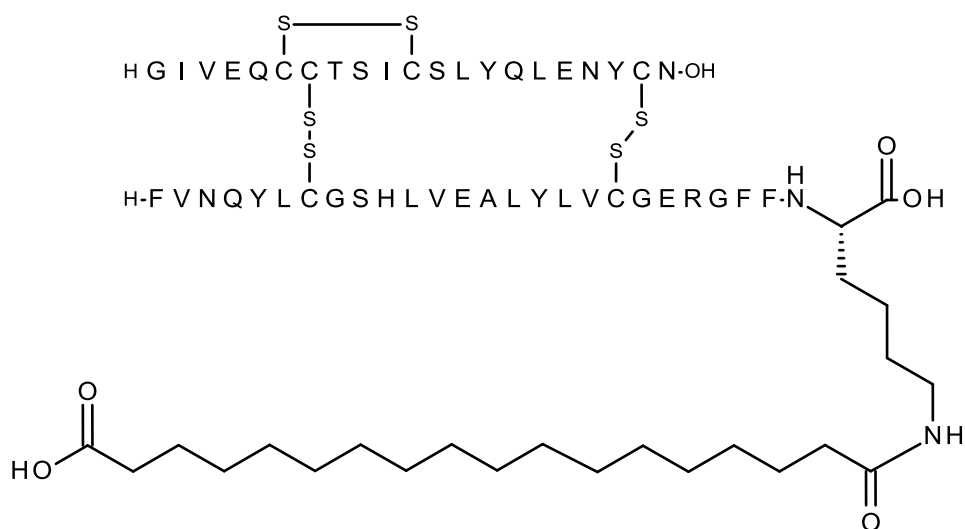
Ejemplo 36: N{Epsilon-B28}-17-carboxiheptadecanoil-[GluA14,PheB5,GlyB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina



Sintetizado por el método de Síntesis 3

Masa Calculada = 5,775.6; LC-MS m/4 Encontrado = 1,444.8

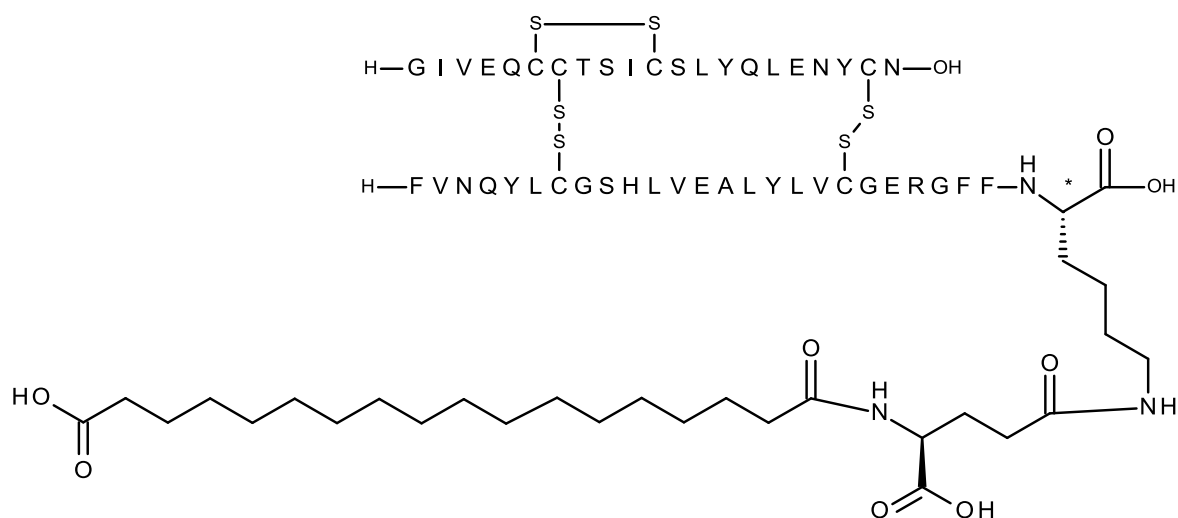
5 **Ejemplo 37: N{Epsilon-B26}-17-carboxiheptadecanoil-[TyrB5,LysB26],des-(B27-B30)-Insulina**



Sintetizado por el Método de Síntesis 3

10 Masa Calculada = 5,667.6; LC-MS m/3 Encontrado = 1,889.9

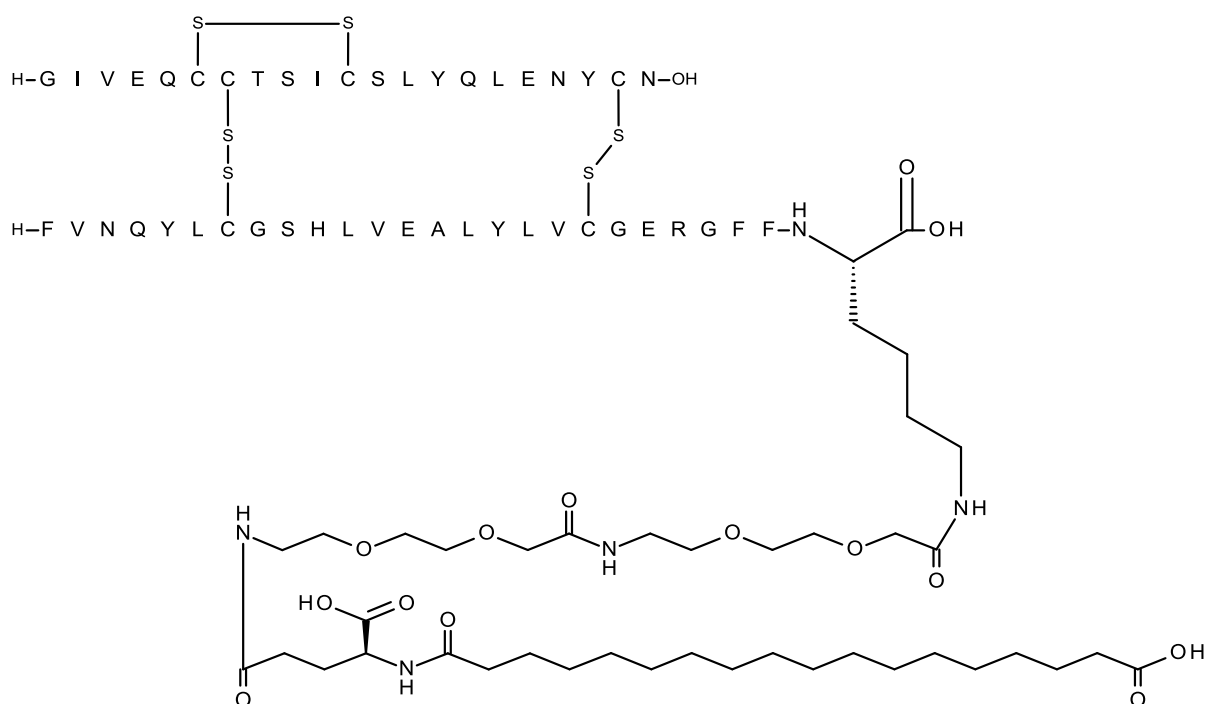
Ejemplo 38: N{Epsilon-B26}-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]-[TyrB5,LysB26],des-(B27-B30)-Insulina



Sintetizado por el Método de Síntesis 3

Masa Calculada = 5,796.7; LC-MS m/3 Encontrado = 1,933.1

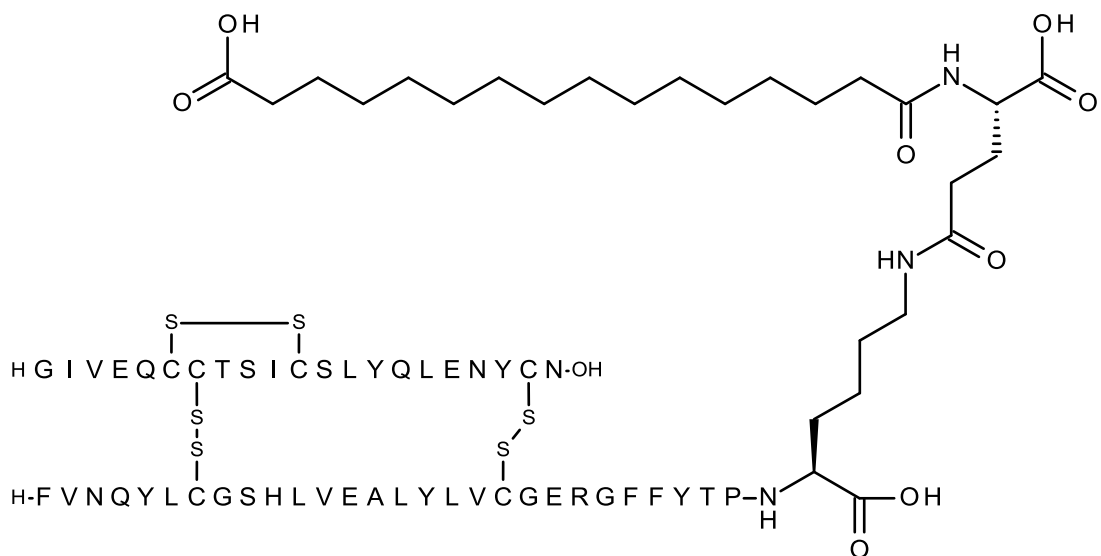
- 5 **Ejemplo 39: N{Epsilon-B26}-[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]eto]eto]acetil]amino]eto]eto]acetil]-[TyrB5,LysB26],des-(B27-B30)-Insulina**



- 10 Sintetizado por el Método de Síntesis 3

Masa Calculada = 6,087.0; LC-MS m/4 Encontrado = 1,522.5

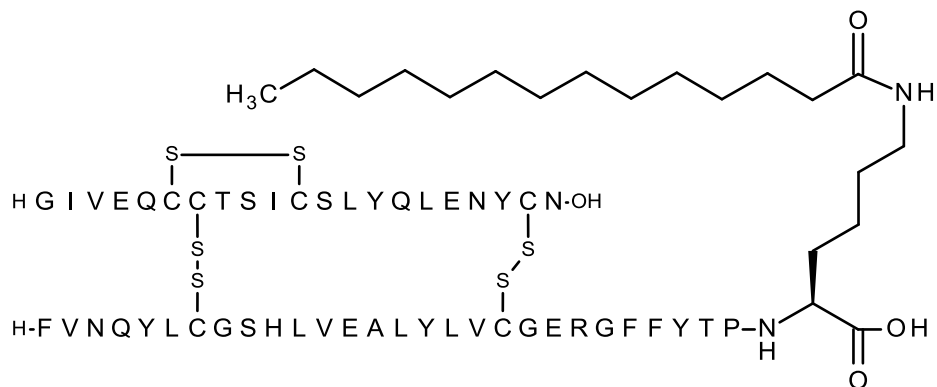
- Ejemplo 40: N{Epsilon-B29}-[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoilamino)butanoil]-[TyrB5],des-ThrB30-Insulina**



Sintetizado por el Método de Síntesis 3

Masa Calculada = 6,130.0; LC-MS m/3 Encontrado = 2044.3

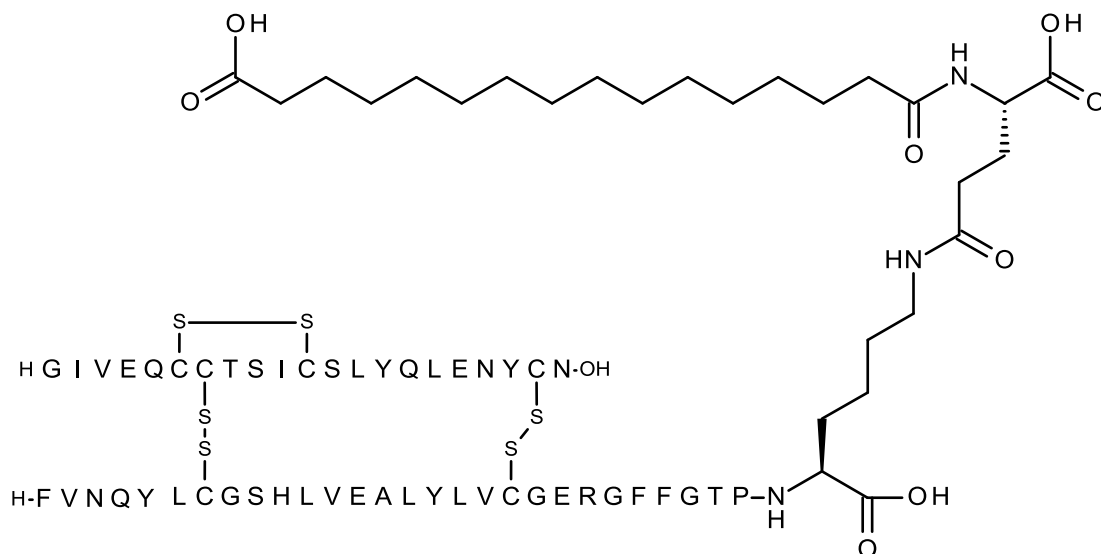
5 **Ejemplo 41: N{Epsilon-B29}-tetradecanoil-[TyrB5],des-ThrB30-Insulina**



Intetizada por el Método de Síntesis 3

Masa Calculada = 5,942.9; LC-MS m/3 Encontrado = 1,982

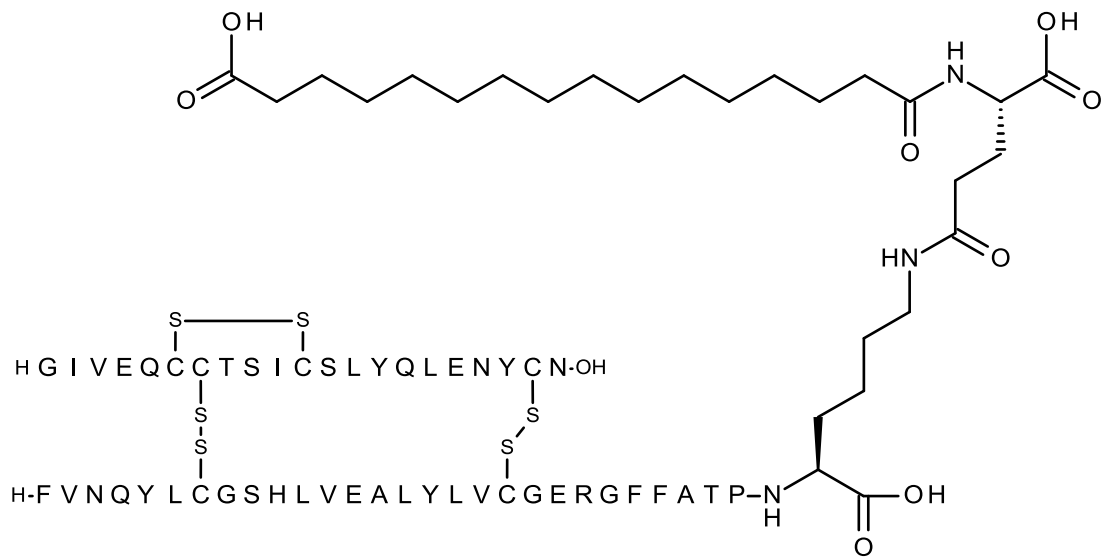
10 **Ejemplo 42: N{Epsilon-B29}-[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoilamino)butanoil]-[TyrB5,GlyB26],des-ThrB30-Insulina**



Sintetizado por el Método de Síntesis 3

Masa Calculada = 6,023.9; MALDI-MS Encontrada = 6,026

Ejemplo 43: N{Epsilon-B29}-[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoilamino)butanoil]-[TyrB5,AlaB26],des-ThrB30-Insulina

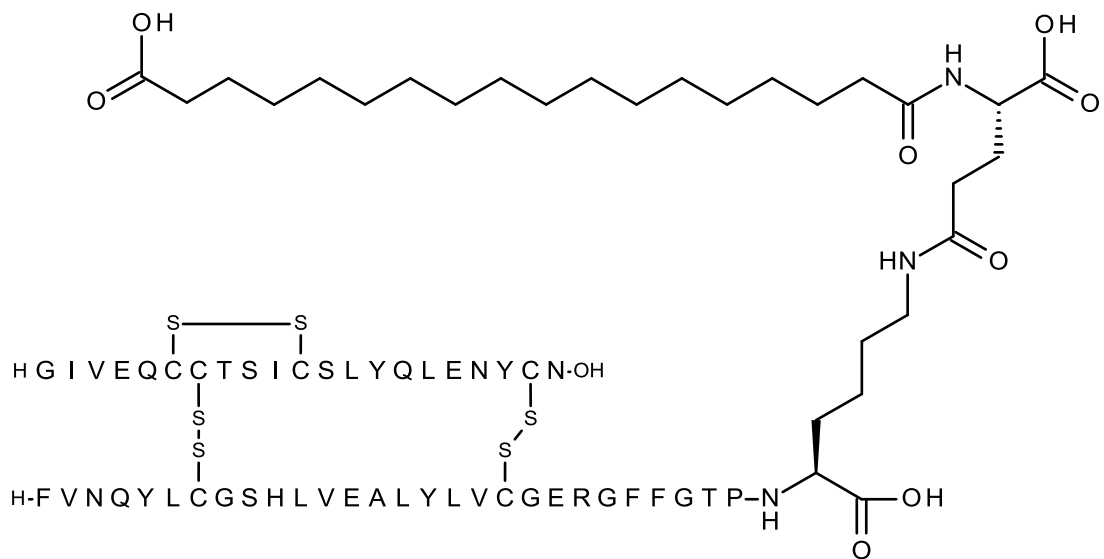


5

Sintetizado por el Método de Síntesis 3

Masa Calculada= 6,037.9; LC-MS m/4 Encontrado = 1,510.5

Ejemplo 44: N{Epsilon-B29}-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]-[TyrB5,GlyB26],des-ThrB30-Insulina



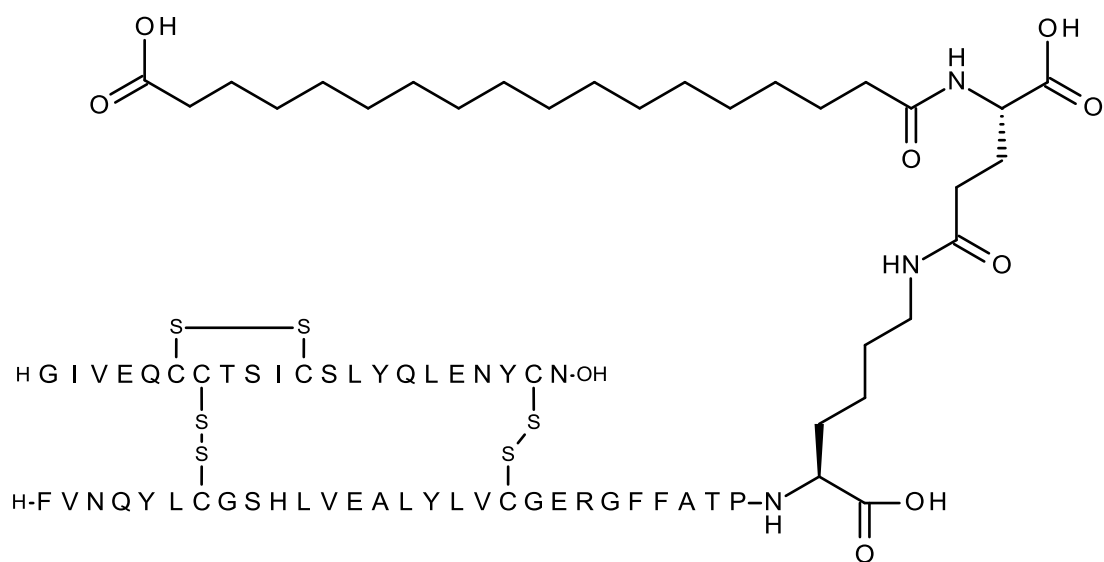
10

Sintetizado por el Método de Síntesis 3

Masa Calculada = 6,051.9; MALDI-MS Encontrada = 6,052

Ejemplo 45: N{Epsilon-B29}-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]-[TyrB5,AlaB26],des-ThrB30-Insulina

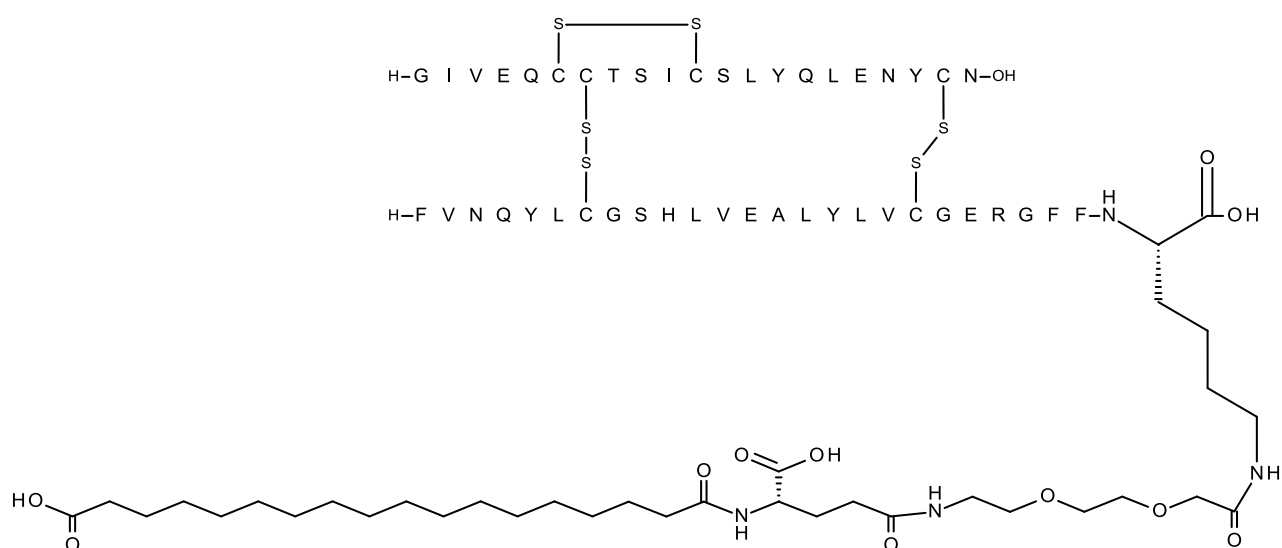
15



Sintetizado por el Método de Síntesis 3

Masa Calculada = 6,066.0; MALDI-MS Encontrada = 6,065

- 5 **Ejemplo 46: N{Epsilon-B26}-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-[TyrB5,LysB26],des-(B27-B30)-Insulina**



- 10 Sintetizado por el método de Síntesis 3

Masa Calculada = 5,941.8; LC-MS m/4 Encontrado = 1,486

COMPARADORES

Comparador 1: [TyrB5,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina



- 15

Sintetizado por el método de Síntesis 1

Masa Calculada = 5,635.4; MALDI-MS Encontrada 5,635

Comparador 2: [TyrB5,GlyB26],des-ThrB30-Insulina



5 Sintetizado por el método de Síntesis 1

Masa Calculada = 5,626.4; MALDI-MS Encontrada = 5626

Comparador 3: [TyrB5,AlaB26],des-ThrB30-Insulina

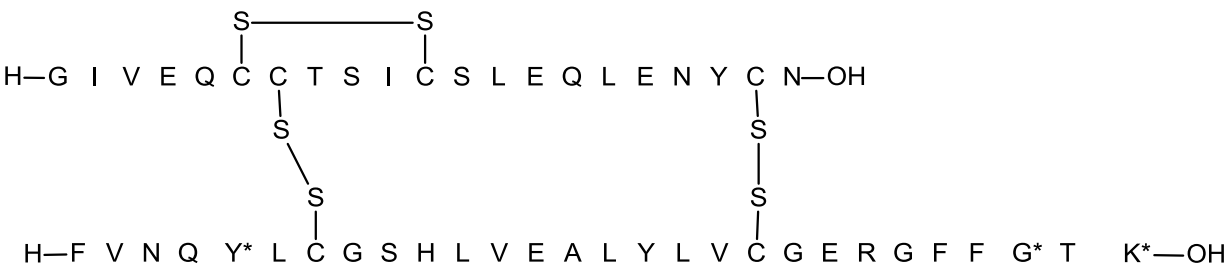


10

Sintetizado por el método de Síntesis 1

Masa Calculada = 5,640.4; MALDI-MS Encontrada = 5,641

Comparador 4: [GluA14,TyrB5,GlyB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina

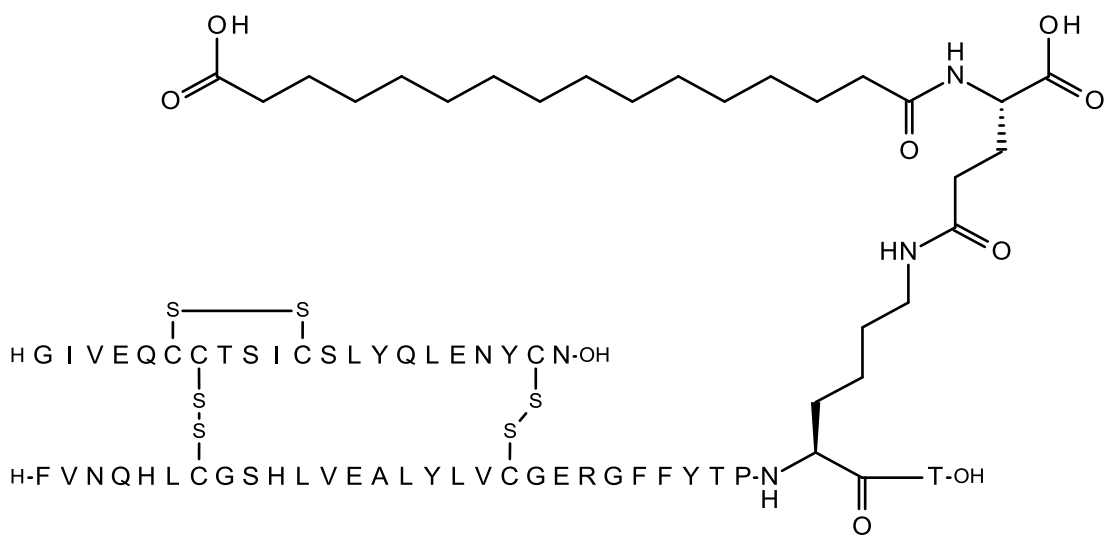


15

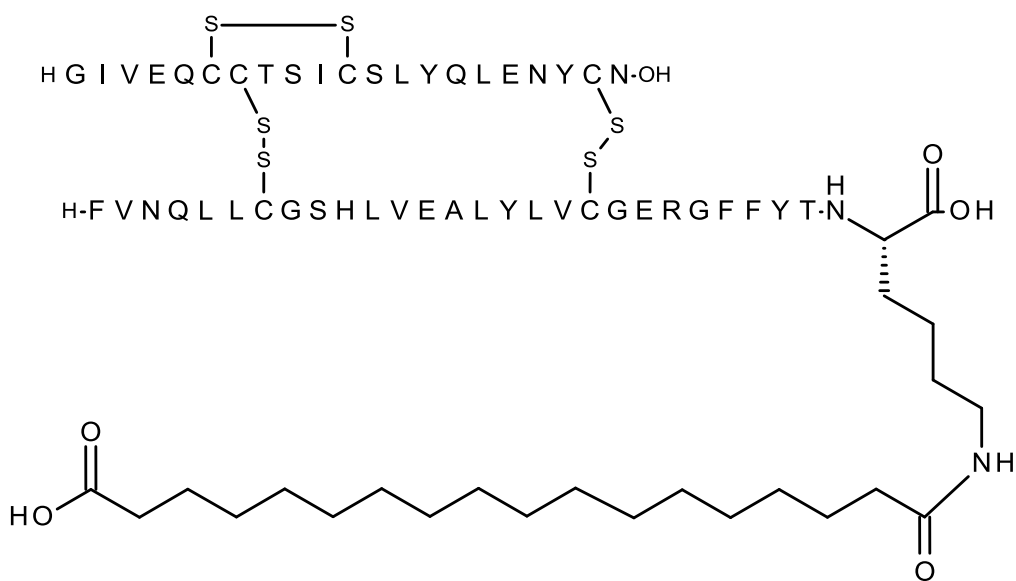
Sintetizado por el método de Síntesis 1

Masa Calculada = 5,495.2; LC-MS m/4 Encontrado = 1,374.83

Comparador 5: N{Epsilon-B29}-[(4S)-4-carboxi-4-(15-carboxipentadecanoilamino)butanoil]-Insulina



Comparador 6: N{Epsilon-B28}-17-carboxiheptadecanoil-[LeuB5,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina



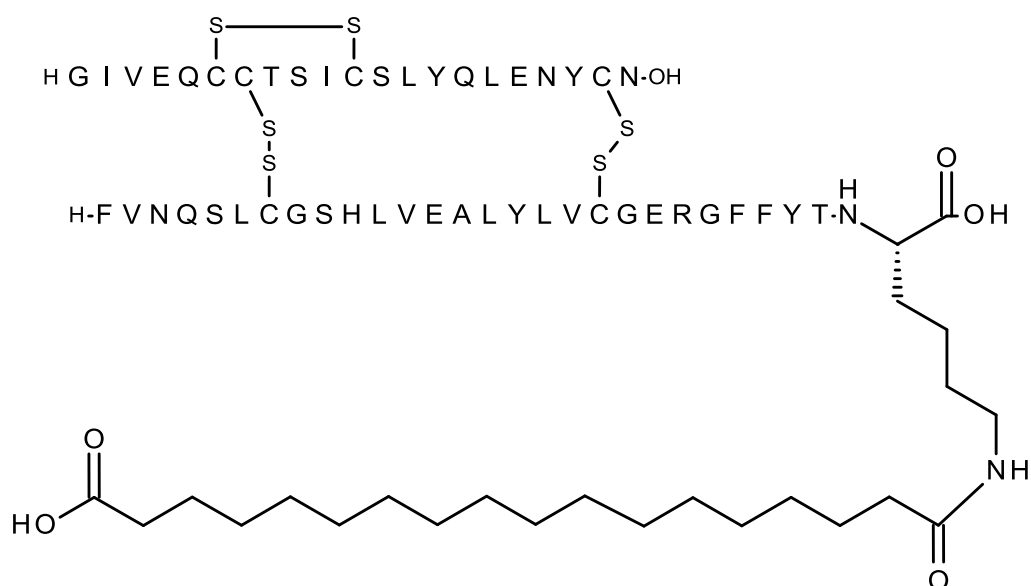
5

Sintetizado por el método de Síntesis 3

Masa Calculada = 5,881.8; MALDI-MS Encontrada = 5,882

Comparador 7: N{Epsilon-B28}-17-carboxiheptadecanoil-[SerB5,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina

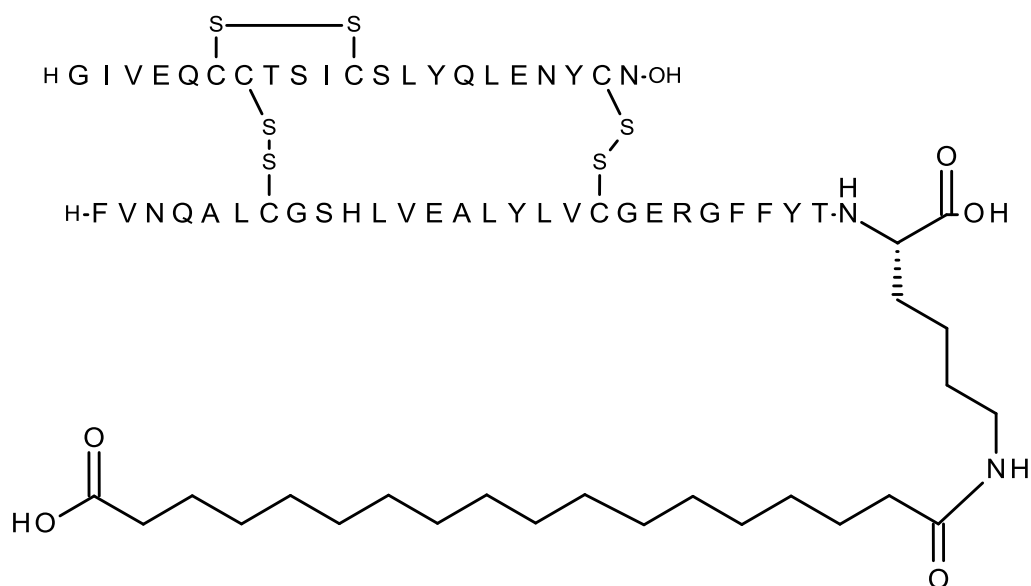
10



Sintetizado por el método de Síntesis 3

Masa Calculada = 5,875.7; MALDI-MS Encontrada = 5,876

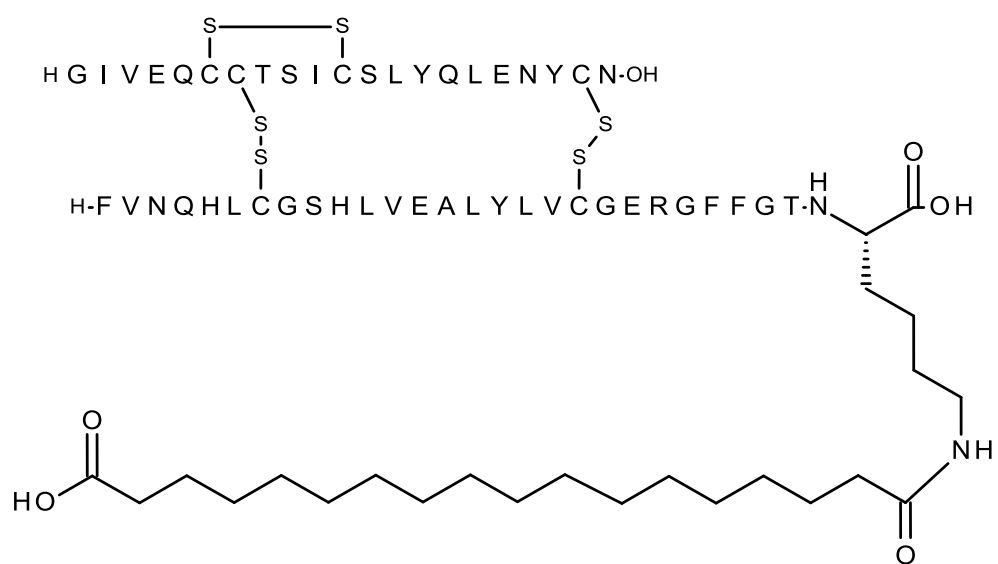
5 **Comparador 8: N{Epsilon-B28}-17-carboxiheptadecanoil-[AlaB5,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina**



Sintetizado por el método de Síntesis 3

10 Masa Calculada = 5,839.7; MALDI-MS Encontrada = 5,840

Comparador 9: N{Epsilon-B28}-17-carboxiheptadecanoil-[GlyB26,LysB28],des-(B29-B30)-Insulina



Sintetizado por el Método de Síntesis 3

Masa Calculada = 5,799.7; MALDI-MS Encontrada = 5,800