

CONJUGADOS DE INSULINA

DESCRIPCIÓN

Se dan a conocer en este documento conjugados que comprenden una sulfonamida de fórmula (I) y un ingrediente farmacéutico activo tal como un análogo de insulina que comprende por lo menos una mutación relativa a la insulina original, en donde el análogo de insulina comprende una mutación en la posición B16 que está sustituida con un aminoácido hidrófobo y/o una mutación en la posición B25 que está sustituida con un aminoácido hidrófobo. Se dan a conocer también sulfonamidas de fórmula (A) y análogos de insulina que comprenden por lo menos una mutación relativa a la insulina original, en donde los análogos de insulina comprenden una mutación en la posición B16 que está sustituida con un aminoácido hidrófobo y/o una mutación en la posición B25 que está sustituida con un aminoácido hidrófobo.

ANTECEDENTES

En todo el mundo, más de 400 millones de personas padecen diabetes mellitus de tipo 1 o de tipo 2. La diabetes de tipo 1 se trata con sustitución de insulina. En contraste con la diabetes de tipo 1, prácticamente no existe deficiencia de insulina en la diabetes de tipo 2, pero en una gran cantidad de casos, especialmente en la etapa avanzada, los pacientes con diabetes de tipo 2 son tratados con insulina.

En una persona sana, la liberación de insulina por el páncreas se asocia estrictamente con la concentración de glucosa en la sangre. Los niveles elevados de glucosa en la sangre, como ocurre después de las comidas, son rápidamente compensados por un incremento correspondiente en la segregación de insulina. En ayunas, el nivel de insulina en el plasma cae a un nivel basal que es adecuado para garantizar un suministro continuo de glucosa a los órganos sensibles a la insulina y a los tejidos de glucosa, y para mantener la producción de glucosa hepática en un nivel bajo durante la noche. A menudo,

el reemplazo de la segregación de insulina endógena por exógena, principalmente la administración subcutánea de insulina, no logra la calidad de regulación fisiológica de la glucosa en sangre descrita anteriormente. Pueden ocurrir desviaciones de la glucosa en sangre hacia arriba o hacia abajo, que en las formas más severas pueden ser potencialmente mortales. De aquí deriva que una terapia mejorada de la diabetes es un objetivo principal para mantener la glucosa en la sangre lo más próxima posible al intervalo fisiológico.

La insulina humana es un polipéptido de 51 aminoácidos, que se dividen en 2 cadenas de aminoácidos: la cadena A que tiene 21 aminoácidos y la cadena B que tiene 30 aminoácidos. Las cadenas se conectan entre sí mediante 2 puentes disulfuro. Existe un tercer puente disulfuro entre las cisteínas en las posiciones 6 y 11 de la cadena A. Algunos productos de uso corriente para el tratamiento de la diabetes mellitus contienen análogos de insulina, es decir, variantes de insulina cuya secuencia difiere de aquella de la insulina humana por una o dos sustituciones de aminoácidos en la cadena A y/o en la cadena B.

Al igual que muchas otras hormonas de péptidos, la insulina humana tiene una corta semivida *in vivo*. Por lo tanto, se administra frecuentemente, lo cual se asocia con incomodidad para el paciente. Por consiguiente, se desean análogos de insulina que tengan una mayor semivida *in vivo* y por lo tanto una duración prolongada de la acción.

Existen en la actualidad diferentes planteamientos para extender la semivida de las insulinas.

Un planteamiento se basa en el desarrollo de una formulación soluble a bajo pH, pero de solubilidad reducida en relación a la insulina natural a pH fisiológico. El punto isoelectrico del análogo de insulina se aumenta a través de la adición de dos argininas al término C de la cadena B. La adición de dos argininas en combinación con una sustitución de glicina en A21 (insulina glargina) proporciona una insulina con duración extendida de la

acción. El análogo de insulina precipita en presencia de zinc tras la inyección en sitios subcutáneos y se solubiliza lentamente, dando como resultado la presencia sostenida de la insulina glargina.

El documento WO 2016/006963 describe análogos de insulina que tienen una menor tasa de aclaramiento mediada por el receptor de insulina, en comparación con la insulina humana.

El documento WO 2018/056764 describe análogos de insulina que tienen una menor tasa de aclaramiento mediada por el receptor de insulina, en comparación con la insulina humana.

El documento WO 2008/034881 describe análogos de insulina estabilizada con proteasa.

En otro planteamiento, un grupo de ácido graso de cadena larga se conjuga al grupo amino épsilon de LysB29 de insulina. La presencia de este grupo permite la unión de la insulina a albúmina del suero por enlace no covalente, reversible. En consecuencia, este análogo de insulina exhibe un perfil de acción significativamente prolongada en relación con la insulina humana (véanse, p. ej., Mayer et al., Inc. Biopolymers (Pept Sci) 88: 687–713, 2007; o el documento WO 2009/115469).

COMPENDIO

Se dan a conocer en este documento análogos de insulina de acción prolongada. Los análogos de insulina de acción prolongada que se dan a conocer tienen muy poca afinidad de unión (en consecuencia, una tasa de aclaramiento inferior) a la vez que mantienen una alta transducción de señales. Los análogos de insulina se describen en la sección A que sigue.

Se dan a conocer en este documento restos de unión a albúmina del suero (en este documento se denominan “aglutinantes de albúmina” o “aglutinantes”), que cuando se

10



20

25

Sección A: Análogos de insulina

Por consiguiente, existe la necesidad de análogos de insulina que tengan una actividad reducida de unión al receptor de insulina, y por lo tanto una tasa reducida de aclaramiento mediada por el receptor, pero que tengan una actividad de transducción de señales que permita reducir en forma suficiente el nivel de glucosa en sangre *in vivo*.

Sorprendentemente, se demostró en el contexto de los estudios que subyacen a la presente invención que una sustitución en la posición B16 y/o B25 de insulina humana con un aminoácido hidrófobo (como leucina, isoleucina, valina, alanina y triptófano) resultó en una reducción de la actividad de unión al receptor de insulina (en comparación con la actividad de unión al receptor de insulina de la insulina original, véanse Ejemplos). Los efectos más fuertes sobre la actividad de unión al receptor de insulina se observaron en sustituciones con aminoácidos ramificados (leucina, isoleucina y valina). Cabe destacar que los análogos de insulina con dichas sustituciones en estas posiciones (como en la posición B25) exhibieron una mejora de hasta 6 veces en la transducción de señales en relación a lo esperado en función de las afinidades de unión a la isoforma del receptor de insulina B (IR-B) (véanse Ejemplos). Además, algunos análogos de insulina ensayados demostraron mejor estabilidad proteolítica frente a quimotripsina, catepsina D y enzima degradadora de insulina (véanse Ejemplos).

Por consiguiente, se dan a conocer en este documento análogos de insulina que comprenden por lo menos una mutación relativa a la insulina original, en donde los análogos de insulina comprenden una mutación en la posición B16 que está sustituida con un aminoácido hidrófobo, y/o una mutación en la posición B25 que está sustituida con un aminoácido hidrófobo.

La expresión “análogo de insulina”, tal como se emplea en este documento, se refiere a un péptido que tiene una estructura molecular que formalmente puede derivar de la estructura de una insulina natural (en este documento también denominada “insulina original”, p. ej., insulina humana) eliminando y/o sustituyendo por lo menos un residuo de aminoácido que ocurre en la insulina natural y/o añadiendo por lo menos un residuo de aminoácido. El residuo de aminoácido añadido y/o intercambiado puede o bien consistir en residuos de aminoácidos codificables o residuos de aminoácidos puramente sintéticos. El

análogo, tal como se hace referencia en este documento, es capaz de reducir los niveles de glucosa en la sangre *in vivo*, por ejemplo en un sujeto humano.

En algunas realizaciones, el análogo de insulina que se da a conocer en este documento comprende dos cadenas de péptidos, una cadena A y una cadena B. Típicamente, las dos cadenas se conectan mediante puentes disulfuro entre residuos cisteína. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los análogos de insulina provistos en este documento comprenden tres puentes disulfuro: un puente disulfuro entre las cisteínas en las posiciones A6 y A11, un puente disulfuro entre la cisteína en la posición A7 de la cadena A y la cisteína en la posición B7 de la cadena B, y uno entre la cisteína en la posición A20 de la cadena A y la cisteína en la posición B19 de la cadena B. Por consiguiente, los análogos de insulina que se describen en este documento pueden comprender residuos cisteína en las posiciones A6, A7, A11, A20, B7 y B19.

En algunas realizaciones de este documento, el análogo de insulina es una insulina de cadena sencilla. Una insulina de cadena sencilla es una sola cadena de polipéptidos en donde la cadena B de insulina se enlaza en forma contigua con la cadena A de insulina mediante un péptido conector no escindido.

Las mutaciones de insulina, es decir, mutaciones de una insulina original, se indican en este documento haciendo referencia a la cadena, es decir o bien la cadena A o la cadena B del análogo, la posición del residuo de aminoácidos mutado en la cadena A o B (como A14, B16 y B25), y el código de tres letras para el aminoácido que sustituye el aminoácido natural en la insulina original. El término “desB30” se refiere a un análogo que carece del aminoácido B30 de la insulina original (es decir, el aminoácido en la posición B30 está ausente). Por ejemplo, insulina humana Glu(A14)Ile(B16)desB30 es un análogo de insulina humana en donde el residuo de aminoácido en la posición 14 de la cadena A (A14) de insulina humana se sustituye con ácido glutámico, el residuo de aminoácido en la posición

16 de la cadena B (B16) se sustituye con isoleucina y el aminoácido en la posición 30 de la cadena B se elimina (es decir, está ausente).

Los análogos de insulina de este documento comprenden por lo menos una mutación (sustitución, eliminación o adición de un aminoácido) en relación con la insulina original. La expresión “por lo menos uno”, tal como se emplea en este documento, significa uno o más de uno, como “por lo menos dos”, “por lo menos tres”, “por lo menos cuatro”, “por lo menos cinco”, etc. En algunas realizaciones, los análogos de insulina que se dan a conocer en la presente invención comprenden por lo menos una mutación en la cadena B y por lo menos una mutación en la cadena A. En otra realización, los análogos de insulina de esta invención comprenden por lo menos dos mutaciones en la cadena B y por lo menos una mutación en la cadena A. Por ejemplo, el análogo de insulina puede comprender una sustitución en la posición B16, una eliminación en la posición B30 y una sustitución en la posición A14. Alternativamente, el análogo de insulina puede comprender una sustitución en la posición B25, una eliminación en la posición B30 y una sustitución en la posición A14. Además, el análogo de insulina puede comprender una sustitución en la posición B16, una sustitución en la posición B25, una eliminación en la posición B30 y una sustitución en la posición A14.

Los análogos de insulina que se dan a conocer en este documento pueden comprender mutaciones además de las mutaciones anteriormente mencionadas. En algunas realizaciones, el número de mutaciones no excede un número determinado. En algunas realizaciones, los análogos de insulina comprenden menos de doce mutaciones (es decir, eliminaciones, sustitución, adiciones) en relación con la insulina original. En otra realización, el análogo comprende menos de diez mutaciones en relación a la insulina original. En otra realización, el análogo comprende menos de ocho mutaciones en relación a la insulina original. En otra realización, el análogo comprende menos de siete mutaciones

en relación a la insulina original. En otra realización, el análogo comprende menos de seis mutaciones en relación a la insulina original. En otra realización, el análogo comprende menos de cinco mutaciones en relación a la insulina original. En otra realización, el análogo comprende menos de cuatro mutaciones en relación a la insulina original. En otra realización, el análogo comprende menos de tres mutaciones en relación a la insulina original.

La expresión “insulina original”, tal como se emplea en este documento, se refiere a insulina que ocurre naturalmente, es decir, a una insulina de tipo salvaje no mutada. En algunas realizaciones, la insulina original es insulina animal, como insulina mamífera. Por ejemplo, la insulina original puede ser insulina humana, insulina porcina o insulina bovina.

En algunas realizaciones, la insulina original es insulina humana. La secuencia de insulina humana se conoce en la técnica y se muestra en la Tabla 4 en la sección de Ejemplos. La insulina humana comprende una cadena A que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 1 (GIVEQCCTSICSLYQLENYCN) y una cadena B que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2 (FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT).

En otra realización, la insulina original es insulina bovina. La secuencia de insulina bovina se conoce en la técnica. La insulina bovina comprende una cadena A que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 81 (GIVEQCCASVCSLYQLENYCN) y una cadena B que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 82 (FVNQHLCGSHLVEALYLVC-GERGFFYTPKA).

En otra realización, la insulina original es insulina porcina. La secuencia de insulina porcina se conoce en la técnica. La insulina porcina comprende una cadena A que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 83

(GIVEQCCTSI CSLYQLENYCN) y una cadena B que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 84 (FVNQHLCGSHLVEALYLVC GERGFFYTPKA).

La insulina humana, bovina y porcina comprende tres puentes disulfuro: un puente disulfuro entre las cisteínas en las posiciones A6 y A11, un puente disulfuro entre la cisteína en la posición A7 de la cadena A y la cisteína en la posición B7 de la cadena B, y uno entre la cisteína en la posición A20 de la cadena A y la cisteína en la posición B19 de la cadena B.

Los análogos de insulina que se dan a conocer en este documento tienen una afinidad de unión hacia el receptor de insulina que es reducida en comparación con la afinidad de unión hacia el receptor de insulina de la insulina original correspondiente, p. ej., insulina humana.

El receptor de insulina puede ser cualquier receptor de insulina mamífera, como un receptor de insulina bovina, porcina o humana. En algunas realizaciones, el receptor de insulina es un receptor de insulina humana, p. ej., la isoforma A del receptor de insulina humana o la isoforma B del receptor de insulina humana (que se usó en la sección de Ejemplos).

Ventajosamente, los análogos de insulina humana provistos en este documento tienen una afinidad de unión significativamente reducida al receptor de insulina humana, en comparación con la afinidad de unión de insulina humana al receptor de insulina humana (ver Ejemplos). Por ende, los análogos de insulina tienen una tasa de aclaramiento muy baja, es decir una tasa de aclaramiento mediada por el receptor de insulina muy baja.

En algunas realizaciones, los análogos de insulina, tienen, es decir, exhiben, menos de 20 % de la afinidad de unión al correspondiente receptor de insulina en comparación con la insulina original. En otra realización, los análogos de insulina que se dan a conocer en este documento tienen menos de 10 % de la afinidad de unión al correspondiente receptor

de insulina comparados con su insulina original. En otra realización, los análogos de insulina de la presente invención tienen menos de 5 % de la afinidad de unión al correspondiente receptor de insulina en comparación con su insulina original, tal como menos de 3 % de la afinidad de unión comparados con su insulina original. Por ejemplo, los análogos de insulina provistos en este documento pueden tener entre 0,1% y 10 %, tal como entre 0,3 % y 5 % de la afinidad de unión al correspondiente receptor de insulina en comparación con su insulina original. Además, los análogos de insulina provistos en la presente invención pueden tener entre 0,5% y 3 %, tal como entre 0,5 % y 2 % de la afinidad de unión al correspondiente receptor de insulina en comparación con su insulina original.

Los métodos para determinar la afinidad de unión de un análogo de insulina a un receptor de insulina se conocen en la técnica. Por ejemplo, la afinidad de unión al receptor de insulina se puede determinar con un ensayo de proximidad de centelleos que se basa en la evaluación de la unión competitiva entre insulina original etiquetada con [125I], como insulina humana etiquetada con [125I], y el análogo de insulina (no etiquetado) al receptor de insulina. El receptor de insulina puede estar presente en una membrana de una célula, p. ej., célula CHO (ovario de hámster chino), que sobreexpresa un receptor de insulina recombinante. En una realización, la afinidad de unión al receptor de insulina se determina como se describe en la sección de Ejemplos.

La unión de una insulina natural o un análogo de insulina al receptor de insulina activa la vía de señalización de insulina. El receptor de insulina exhibe actividad de tirosina cinasa. La unión de insulina a su receptor induce un cambio conformacional que estimula la autofosforilación del receptor en residuos tirosina. La autofosforilación del receptor de insulina estimula la actividad de tirosina cinasa del receptor hacia sustratos intracelulares implicados en la transducción de la señal. La autofosforilación del receptor de insulina por

un análogo de insulina se considera entonces un parámetro para la transducción de señal causada por dicho análogo.

Los análogos de insulina de la Tabla 4 en la sección de Ejemplos se sometieron a ensayos de autofosforilación. Cabe destacar que los análogos de insulina con sustituciones alifáticas en las posiciones B16 y B25 causaron autofosforilación del receptor de insulina superior a la esperada en base a sus afinidades de unión al receptor de insulina. Por lo tanto, los análogos de insulina de la presente invención tienen baja actividad de unión, y en consecuencia baja tasa de aclaramiento mediada por el receptor, pero sin embargo son capaces de causar una transducción de señales relativamente alta. Por lo tanto, los análogos de insulina que se dan a conocer en este documento podrían utilizarse como insulinas de acción prolongada. En algunas realizaciones, los análogos de insulina de la presente invención son capaces de inducir 1 a 10 %, tal como 2 a 8 %, de autofosforilación del receptor de insulina en relación con la insulina original (tal como insulina humana). Además, en algunas realizaciones, los análogos de insulina de la presente invención son capaces de inducir 3 a 7 %, tal como 5 a 7% de autofosforilación del receptor de insulina en relación con la insulina original (como insulina humana). La autofosforilación del receptor de insulina en relación a una insulina original se puede determinar como se describe en la sección de Ejemplos.

Los análogos de insulina que se dan a conocer en este documento se sometieron a ensayos de estabilidad de proteasa. Como se muestra en la Tabla 6, los análogos de insulina de la presente invención exhibieron estabilidad superior hacia por lo menos algunas de las proteasas ensayadas en comparación con la insulina humana. Se observó mejor estabilidad proteolítica contra α -quimotripsina, catepsina D y enzima degradadora de insulina (IDE). Por consiguiente, los análogos de insulina provistos en este documento son, típicamente, análogos de insulina proteolíticamente estables. Por lo tanto, son degradados

más lentamente por las proteasas en comparación con la insulina original. En algunas realizaciones, los análogos de insulina de la presente invención se estabilizan contra degradación por α -quimotripsina, catepsina D y enzima degradadora de insulina (IDE) en comparación con la insulina original.

5 Como se expuso anteriormente, el análogo de insulina comprende por lo menos una mutación comparado con la insulina original.

10 En algunas realizaciones los análogos de insulina de este documento comprenden una mutación en la posición B16 que está sustituida con un aminoácido hidrófobo. Por lo tanto, el aminoácido en la posición B16 (tirosina en insulina humana, bovina y porcina) se reemplaza con un aminoácido hidrófobo.

 En otra realización, los análogos de insulina que se dan a conocer en este documento comprenden una mutación en la posición B25 que está sustituida con un aminoácido hidrófobo. Por lo tanto, el aminoácido en la posición B25 (fenilalanina en insulina humana, bovina y porcina) se reemplaza con un aminoácido hidrófobo.

15 En otra realización, los análogos de insulina provistos en la presente invención comprenden una mutación en la posición B16 que se sustituye con un aminoácido hidrófobo y una mutación en la posición B25 que se sustituye con un aminoácido hidrófobo.

20 El aminoácido hidrófobo puede ser cualquier aminoácido hidrófobo. Por ejemplo, el aminoácido hidrófobo puede ser un aminoácido alifático tal como un aminoácido alifático de cadena ramificada.

 En algunas realizaciones de los análogos de insulina que se dan a conocer en este documento, el aminoácido hidrófobo utilizado para la sustitución en la posición B16 y/o B25 es isoleucina, valina, leucina, alanina, triptófano, metionina, prolina, glicina, fenilalanina o tirosina (o un derivado de los aminoácidos precedentemente mencionados).

Varias insulinas originales tales como insulina humana, bovina y porcina comprenden tirosina en la posición B16 y fenilalanina en la posición B25. Por consiguiente, el aminoácido en la posición B16 de la insulina original se puede sustituir con isoleucina, valina, leucina, alanina, triptófano, metionina, prolina, glicina o fenilalanina (o con un derivado de los aminoácidos anteriormente mencionados). Además, el aminoácido en la posición B25 de la insulina original se puede sustituir con isoleucina, valina, leucina, alanina, triptófano, metionina, prolina, glicina o tirosina (o con un derivado de los aminoácidos anteriormente mencionados).

Los derivados de los aminoácidos anteriormente mencionados se conocen en la técnica.

Los derivados de leucina incluyen, aunque sin limitarse a ello, homo-leucina y *terc*-leucina. Por lo tanto, el aminoácido en la posición B16 y/o B25 se puede sustituir con homo-leucina o *terc*-leucina.

Un derivado de valina es, p. ej., 3-etil norvalina. Por lo tanto, el aminoácido en la posición B16 y/o B25 se puede sustituir con 3-etil norvalina.

Los derivados de glicina incluyen, aunque sin limitarse a ello, ciclohexil-glicina, ciclopropilglicina y trifluoretilglicina.

Los derivados de alanina incluyen, aunque sin limitarse a ello, beta-t-butilalanina, ciclobutil-alanina, ciclopropil-alanina y homo-ciclohexilalanina.

En algunas realizaciones, el aminoácido hidrófobo utilizado para la sustitución en la posición B16 y/o B25 es isoleucina, valina, leucina, alanina o triptófano.

En algunas realizaciones, el aminoácido alifático no es alanina. Por consiguiente, el aminoácido hidrófobo utilizado para la sustitución en la posición B16 y/o B25 puede ser isoleucina, valina, leucina o triptófano.

En algunas realizaciones, el aminoácido hidrófobo utilizado para la sustitución en la posición B16 y/o B25 es isoleucina, valina o leucina.

En algunas realizaciones, los aminoácidos a los que se hace referencia en este documento son L-aminoácidos (tales como L-isoleucina, L-valina o L-leucina). Por ende, los aminoácidos (o sus derivados) utilizados, p. ej., para la sustitución en la posición B16, B25 y/o A14 son típicamente L-aminoácidos.

En algunas realizaciones, el aminoácido hidrófobo es un aminoácido alifático. Por consiguiente, los análogos de insulina que se dan a conocer en este documento comprenden una mutación en la posición B16 que se sustituye con un aminoácido alifático y una mutación en la posición B25 que se sustituye con un aminoácido alifático (y opcionalmente otras mutaciones que incluyen, aunque sin limitarse a ello, Des(B30) y Glu(A14)).

Los aminoácidos alifáticos son aminoácidos no polares e hidrófobos que comprenden un grupo funcional de cadena lateral alifática. La hidrofobicidad aumenta a medida que aumenta el número de átomos de carbono en la cadena hidrocarbonada. Una medida de la hidrofobicidad de un alifático es el índice hidropático de acuerdo con la escala de Kyte y Doolittle que se puede determinar, p. ej., como lo describen Kyte J. *et al.* Journal of Molecular Biology. 1982 157 (1): 105–32. En algunas realizaciones, el aminoácido alifático es un aminoácido alifático que tiene un índice hidropático (según la escala de Kyte y Doolittle) de más de 2,0, como más de 3,0 o más de 3,5.

Los aminoácidos alifáticos incluyen, aunque sin limitarse a ello, isoleucina, valina, leucina, alanina y glicina. Por ejemplo, el aminoácido alifático puede ser un aminoácido seleccionado entre isoleucina, valina, leucina y glicina, como un aminoácido seleccionado entre isoleucina, valina y leucina.

Isoleucina, valina y leucina son aminoácidos de cadena ramificada (abreviados BCAA). Por lo tanto, el aminoácido alifático puede ser un aminoácido de cadena ramificada. En algunas realizaciones, los análogos de insulina de la presente invención comprenden una mutación en la posición B16 que se sustituye con un aminoácido de cadena ramificada y una mutación en la posición B25 que se sustituye con un aminoácido de cadena ramificada (y opcionalmente otras mutaciones que incluyen, aunque sin limitarse a ello, Des(B30) y Glu(A14)).

Los BCAA, tales como los aminoácidos isoleucina, valina y leucina, son aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas que no son lineales, es decir, los aminoácidos de cadena ramificada son aminoácidos que tienen una cadena lateral alifática con una ramificación (un átomo de carbono central unido a tres átomos de carbono o más).

El aminoácido de cadena ramificada puede ser un BCAA proteinogénico, es decir, un aminoácido que se incorpora en forma biosintética a las proteínas durante la traducción, o un BCAA no proteinogénico, es decir, un aminoácido que no está codificado naturalmente ni se halla en el código genético de ningún organismo. Por ejemplo, los BCAA proteinogénicos son leucina, isoleucina y valina. Por lo tanto, el aminoácido de cadena ramificada aminoácido hidrófobo/alifático puede ser leucina, isoleucina o valina (o un derivado de leucina, isoleucina o valina, tal como un derivado de leucina o valina anteriormente mencionado).

En algunas realizaciones, el aminoácido de cadena ramificada es isoleucina. En algunas realizaciones, el aminoácido de cadena ramificada es valina. En algunas realizaciones, el aminoácido de cadena ramificada es leucina.

Además de la mutación en la posición B16 y/o la mutación en la posición B25 como se describió previamente, los análogos de insulina de este documento pueden comprender también otras mutaciones relativas a la insulina original.

Por ejemplo, el análogo de insulina puede además comprender una mutación en la posición A14. Se sabe que dichas mutaciones aumentan la estabilidad de la proteasa (véase, p. ej., el documento WO 2008/034881). En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición A14 se sustituye con ácido glutámico (Glu). En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición A14 se sustituye con ácido aspártico (Asp). En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición A14 se sustituye con histidina (His).

A su vez, los análogos de insulina que se dan a conocer en la presente invención pueden comprender una mutación en la posición B30. En alguna realización, la mutación en la posición B30 es la eliminación de treonina en la posición B30 de la insulina original (también denominada mutación Des(B30)).

Asimismo, el análogo de insulina de la presente invención puede comprender también una mutación en la posición B3 que se sustituye con un ácido glutámico (Glu), y/o una mutación en la posición A21 que se sustituye con glicina (Gly).

En una realización, la cadena B del análogo de insulina de la presente invención comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 22 (FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFLYTPK).

En otra realización, la cadena B del análogo de insulina de la presente invención comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 24 (FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPK).

En otra realización, la cadena B del análogo de insulina de la presente invención comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 44 (FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFIYTPK).

En otra realización, la cadena B del análogo de insulina de la presente invención comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 48 (FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPK).

En otra realización, la cadena B del análogo de insulina de la presente invención comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 50 (FVEQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPK).

5 En otra realización, la cadena B del análogo de insulina de la presente invención comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 58 (FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFIYTPK).

En otra realización, la cadena B del análogo de insulina de la presente invención comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 60 (FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFIYTPK).

10 En otra realización, la cadena B del análogo de insulina de la presente invención comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 64 (FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFVYTPK).

15 En otra realización, la cadena B del análogo de insulina de la presente invención comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 66 (FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFVYTPK).

En otra realización, la cadena B del análogo de insulina de la presente invención comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 70 (FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFIYTPK).

20 En otra realización, la cadena B del análogo de insulina de la presente invención comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 78 (FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPK).

En otra realización, la cadena B del análogo de insulina de la presente invención comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 80 (FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPK).

Las cadenas B resumidas anteriormente comprenden la mutación Des(B30). Por ende, el aminoácido que está presente en la posición B30 de la insulina original (treonina en insulina humana y alanina en insulina porcina y bovina) se elimina, es decir, no está presente. No obstante, también se contempla que las cadenas B de los análogos de la presente invención no comprenden esta mutación, es decir, comprenden una treonina en la posición 30. Por consiguiente, la cadena B del análogo de insulina de la presente invención puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFLYTPKT (SEQ ID NO: 85)
- FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPKT (SEQ ID NO: 86)
- FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFIYTPKT (SEQ ID NO: 87)
- FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPKT (SEQ ID NO: 88)
- FVEQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPKT (SEQ ID NO: 89)
- FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFIYTPKT (SEQ ID NO: 90)
- FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFIYTPKT (SEQ ID NO: 91)
- FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFVYTPKT (SEQ ID NO: 92)
- FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFVYTPKT (SEQ ID NO: 93)
- FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFIYTPKT (SEQ ID NO: 94)
- FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPKT (SEQ ID NO: 95)
- FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPKT (SEQ ID NO: 96)
- FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPKT (SEQ ID NO: 97)

En una realización, la cadena A del análogo de insulina de la presente invención comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1 (GIVEQCCTSICSLYQLENYCN).

En otra realización, la cadena A del análogo de insulina de la presente invención comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 43 (GIVEQCCTSICSLEQLENYCN).

En otra realización, la cadena A del análogo de insulina de la presente invención comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 45 (GIVEQCCTSICSLEQLENYCG).

Típicamente, el análogo de insulina de la presente invención comprende la cadena A y la cadena B como se mencionó anteriormente.

Por ejemplo, el análogo de insulina de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en:

Leu(B16)-insulina (p. ej., insulina humana, es decir Leu(B16)- insulina humana),

Val(B16)-insulina (p. ej., insulina humana, es decir Val(B16)-insulina humana),

Ile(B16)-insulina (p. ej., insulina humana),

Leu(B16)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),

Val(B16)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),

Ile(B16)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),

Leu(B25)-insulina (p. ej., insulina humana),

Val(B25)-insulina (p. ej., insulina humana),

Ile(B25)-insulina (p. ej., insulina humana),

Leu(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),

Val(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),

Ile(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),

Glu(A14)Leu(B16)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),

Glu(A14)Ile(B16)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),

Glu(A14)Val(B16)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),

Glu(A14)Leu(B16)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Glu(A14)Ile(B16)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Glu(A14)Val(B16)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Glu(A14)Leu(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
 5 Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Glu(A14)Leu(B25)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Glu(A14)Ile(B25)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Glu(A14)Val(B25)-insulina (p. ej., insulina humana),
 10 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina
 15 humana),
 Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Glu(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina
 20 humana),
 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)-insulina (p. ej., insulina humana),
 25 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)-insulina (p. ej., insulina humana),

Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Glu(A14)Val(B16)Val(B25)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-insulina (p. ej., insulina humana), y
 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-insulina (p. ej., insulina humana).

5 En otra realización, los análogos de insulina que se dan a conocer en la presente invención se seleccionan del grupo que consiste en:

Asp(A14)Leu(B16)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana, es decir
 Asp(A14)Leu(B16)Des(B30)-insulina humana),

10

Asp(A14)Ile(B16)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Asp(A14)Val(B16)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Asp(A14)Leu(B16)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Asp(A14)Ile(B16)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Asp(A14)Val(B16)-insulina (p. ej., insulina humana),

15

Asp(A14)Leu(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Asp(A14)Ile(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Asp(A14)Val(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Asp(A14)Leu(B25)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Asp(A14)Ile(B25)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Asp(A14)Val(B25)-insulina (p. ej., insulina humana),

20

Asp(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Asp(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Asp(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Asp(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),

25

Asp(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),

Asp(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Asp(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Asp(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Asp(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),

5

Asp(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Asp(A14)Ile(B16)Ile(B25)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Asp(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Asp(A14)Ile(B16)Val(B25)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Asp(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Asp(A14)Val(B16)Ile(B25)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Asp(A14)Val(B16)Val(B25)-insulina (p. ej., insulina humana),
 Asp(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-insulina (p. ej., insulina humana), y
 Asp(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-insulina (p. ej., insulina humana).

10

15

En otra realización, los análogos de insulina que se dan a conocer en la presente invención se seleccionan del grupo que consiste en:

His(A14)Leu(B16)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
 His(A14)Ile(B16)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
 His(A14)Val(B16)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
 His(A14)Leu(B16)-insulina (p. ej., insulina humana),
 His(A14)Ile(B16)-insulina (p. ej., insulina humana),
 His(A14)Val(B16)-insulina (p. ej., insulina humana),
 His(A14)Leu(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
 His(A14)Ile(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
 His(A14)Val(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),

20

25

- His(A14)Leu(B25)-insulina (p. ej., insulina humana),
- His(A14)Ile(B25)-insulina (p. ej., insulina humana),
- His(A14)Val(B25)-insulina (p. ej., insulina humana),
- His(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
- 5 His(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
- His(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
- His(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
- His(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
- 10 His(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
- His(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
- His(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
- His(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina (p. ej., insulina humana),
- 15 His(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)-insulina (p. ej., insulina humana),
- His(A14)Ile(B16)Ile(B25)-insulina (p. ej., insulina humana),
- His(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)-insulina (p. ej., insulina humana),
- His(A14)Ile(B16)Val(B25)-insulina (p. ej., insulina humana),
- His(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)-insulina (p. ej., insulina humana),
- 20 His(A14)Val(B16)Ile(B25)-insulina (p. ej., insulina humana),
- His(A14)Val(B16)Val(B25)-insulina (p. ej., insulina humana),
- His(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-insulina (p. ej., insulina humana), y
- His(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-insulina (p. ej., insulina humana).
- En otra realización, el análogo de insulina es Leu(B25)Des(B30)-Insulina (tal como
- 25 Leu(B25)Des(B30)-insulina humana). La secuencia de este análogo se muestra, p. ej., en

la Tabla 4 de la sección de Ejemplos (véase el Análogo 11). Por ejemplo, Leu(B25)Des(B30)-Insulina comprende una cadena A que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 21 (GIVEQCCTSICSLYQLENYCN) y una cadena B que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 22 (FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFLYTPK).

En otra realización, el análogo de insulina es Val(B25)Des(B30)-Insulina (tal como Val(B25)Des(B30)-insulina humana). La secuencia de este análogo se muestra, p. ej., en la Tabla 4 de la sección de Ejemplos (véase el Análogo 12). Por ejemplo, Val(B25)Des(B30)-Insulina comprende una cadena A que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 23 (GIVEQCCTSICSLYQLENYCN) y una cadena B que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 24 (FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPK).

En otra realización, el análogo de insulina es Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-Insulina (tal como Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-insulina humana). La secuencia de este análogo se muestra, p. ej., en la Tabla 4 de la sección de Ejemplos (véase el Análogo 22). Por ejemplo, Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-Insulina comprende una cadena A que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 43 (GIVEQCCTSICSLEQLENYCN) y una cadena B que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 44 (FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFIYTPK).

En otra realización, el análogo de insulina es Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-Insulina (tal como Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-insulina humana). La secuencia de este análogo se muestra, p. ej., en la Tabla 4 de la sección de Ejemplos (véase el Análogo 24). Por ejemplo, Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-Insulina comprende una cadena A que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 47 (GIVEQCCTSICSLEQLENYCN) y una

cadena B que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 48 (FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFVYTPK).

En otra realización, el análogo de insulina es Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)Des(B30)-Insulina (tal como Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)Des(B30)-insulina humana). La secuencia de este análogo se muestra, p. ej., en la Tabla 4 de la sección de Ejemplos (véase el Análogo 25). Por ejemplo, Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)Des(B30)-Insulina comprende una cadena A que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 49 (GIVEQCCTSICSLEQLENYCG) y una cadena B que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 50 (FVEQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFVYTPK).

En otra realización, el análogo de insulina es Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-Insulina (tal como Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-insulina humana). La secuencia de este análogo se muestra, p. ej., en la Tabla 4 de la sección de Ejemplos (véase el Análogo 29). Por ejemplo, Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-Insulina comprende una cadena A que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 57 (GIVEQCCTSICSLEQLENYCN) y una cadena B que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 58 (FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFIYTPK).

En otra realización, el análogo de insulina es Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-Insulina (tal como Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-insulina humana). La secuencia de este análogo se muestra, p. ej., en la Tabla 4 de la sección de Ejemplos (véase el Análogo 30). Por ejemplo, Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-Insulina comprende una cadena A que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 56 (GIVEQCCTSICSLEQLENYCN) y una cadena B que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 60 (FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFIYTPK).

En otra realización, el análogo de insulina es Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-Insulina (tal como Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina humana). La secuencia de este análogo se muestra, p. ej., en la Tabla 4 de la sección de Ejemplos (véase el Análogo 32). Por ejemplo, Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-Insulina comprende una cadena A que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 63 (GIVEQCCTSICSLEQLNYCN) y una cadena B que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 64 (FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFVYTPK).

En otra realización, el análogo de insulina es Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-Insulina (tal como Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina humana). La secuencia de este análogo se muestra, p. ej., en la Tabla 4 de la sección de Ejemplos (véase el Análogo 33). Por ejemplo, Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-Insulina comprende una cadena A que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 65 (GIVEQCCTSICSLEQLNYCG) y una cadena B que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 66 (FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFVYTPK).

En otra realización, el análogo de insulina es Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)-Insulina (tal como Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)-insulina humana). La secuencia de este análogo se muestra, p. ej., en la Tabla 4 de la sección de Ejemplos (véase el Análogo 35). Por ejemplo, Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)-Insulina comprende una cadena A que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 69 (GIVEQCCTSICSLEQLNYCN) y una cadena B que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 70 (FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPK).

En otra realización, el análogo de insulina es Glu(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-Insulina (tal como Glu(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina humana). La secuencia de este análogo se muestra, p. ej., en la Tabla 4 de la sección de Ejemplos (véase el Análogo

38). Por ejemplo, Glu(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-Insulina comprende una cadena A que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 75 (GIVEQCCTSICSLEQLNYCN) y una cadena B que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 76 (FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPK).

5 En otra realización, el análogo de insulina es Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-Insulina (tal como Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina humana). La secuencia de este análogo se muestra, p. ej., en la Tabla 4 de la sección de Ejemplos (véase el Análogo 39). Por ejemplo, Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-Insulina comprende una cadena A que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 77 (GIVEQCCTSICSLEQLNYCN) y una cadena B que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 78 (FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPK).

10

 En otra realización, el análogo de insulina es Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-Insulina (tal como Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina humana). La secuencia de este análogo se muestra, p. ej., en la Tabla 4 de la sección de Ejemplos (véase el Análogo 40). Por ejemplo, Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-Insulina comprende una cadena A que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 79 (GIVEQCCTSICSLEQLNYCG) y una cadena B que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 80 (FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPK).

15

20

El análogo de insulina se puede preparar por cualquier método que se considere apropiado. Por ejemplo, el análogo de insulina se puede preparar por métodos recombinantes o síntesis de fase sólida.

Las definiciones y explicaciones expuestas anteriormente en este documento rigen *mutatis mutandis* para lo siguiente.

25

Se dan a conocer en este documento cadenas B de insulina, es decir, péptidos de cadena B de insulina, como se definió previamente en este documento en relación con la cadena B del análogo de insulina provisto en la presente invención. Por consiguiente, se dan a conocer en este documento cadenas B de insulina que comprenden por lo menos una mutación relativa a la cadena B de insulina de la insulina original, en donde las cadenas B comprenden una mutación en la posición B16 que se sustituye con un aminoácido hidrófobo, y/o una mutación en la posición B25 que se sustituye con un aminoácido hidrófobo. La cadena B de insulina puede comprender otras mutaciones, como se describió precedentemente, tal como la eliminación des(B30).

Se dan a conocer también en este documento proinsulinas que comprenden una cadena A de insulina y/o una cadena B de insulina de los análogos de insulina provistos en esta invención. La cadena B puede ser cualquier cadena B definida anteriormente en este documento para los análogos de insulina provistos en esta invención. Por ejemplo, se dan a conocer proinsulinas que comprenden una cadena A de insulina y una cadena B de insulina, en donde dicha cadena B comprende por lo menos una mutación relativa a la cadena B de una insulina original, en donde la mutación es en la posición B16 que se sustituye con un aminoácido hidrófobo y/o en donde la mutación es en la posición B25 que se sustituye con un aminoácido hidrófobo. La cadena B de insulina puede además comprender otras mutaciones descritas anteriormente para la cadena B.

La cadena A comprendida por la proinsulina que se da a conocer en este documento puede ser cualquier cadena A definida anteriormente en la presente invención para los análogos de insulina de la presente invención. En algunas realizaciones, la cadena A de dicha proinsulina comprende una mutación en la posición A14 que se sustituye con un aminoácido seleccionado entre ácido glutámico (Glu), ácido aspártico (Asp) e histidina (His).

Además de la cadena A de insulina A y/o la cadena B de insulina, las proinsulinas de la presente invención pueden comprender también otros elementos tales como secuencias líderes o un péptido C. En algunas realizaciones, la proinsulina puede además comprender un péptido C que está ubicado entre la cadena B de insulina y la cadena A de insulina. El péptido C puede tener una longitud de 4-10 aminoácidos, tal como una longitud de 4 a 9 aminoácidos. La orientación puede ser la siguiente (del término N al término C): cadena B, péptido C, cadena A.

Se dan a conocer en este documento polinucleótidos que codifican los análogos de insulina, las cadenas B de insulina y las proinsulinas de la presente invención. Dicho polinucleótido puede estar operativamente enlazado Dicho polinucleótido puede estar operativamente enlazado a un promotor que permite la expresión de dicho polinucleótido. En algunas realizaciones, el promotor es heterólogo con respecto a dicho polinucleótido. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor constitutivo. En otra realización, el promotor es un promotor inducible.

Asimismo, se dan a conocer vectores que comprenden el polinucleótido que codifica los análogos de insulina de la presente invención. En algunas realizaciones, dicho vector es un vector de expresión.

Se dan a conocer en esta invención células hospedantes que comprenden ácidos nucleicos que codifican los análogos de insulina, las cadenas B de insulina y las proinsulinas, los polinucleótidos y/o los vectores de la presente invención. En algunas realizaciones, la célula hospedante es una célula bacteriana tal como una célula que pertenece al género *Escherichia*, p. ej., una célula de *E. coli*. En otra realización, la célula hospedante es una célula de levadura, tal como una célula *Pichia pastoris* o una célula *Klyveromyces lactis*.

Se dan a conocer en este documento composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad farmacéuticamente eficaz de un análogo de insulina de la presente invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Se dan a conocer en este documento métodos para tratar una enfermedad que comprenden administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de uno o más análogos de insulina de la presente invención o su composición farmacéutica a un sujeto.

En algunas realizaciones, la enfermedad es diabetes mellitus, tal como diabetes mellitus de tipo II.

Se dan a conocer en este documento análogos de insulina o su composición farmacéutica para uso en medicina.

Se dan a conocer en este documento análogos de insulina o su composición farmacéutica para uso en el tratamiento de diabetes mellitus, como diabetes mellitus de tipo II.

Finalmente, se dan a conocer en este documento usos de los análogos de insulina de la presente invención o sus composiciones farmacéuticas para la preparación de un medicamento o fármaco para el tratamiento de diabetes mellitus, como diabetes mellitus de tipo II.

Los análogos de insulina, cadenas B de insulina, proinsulinas y los usos descritos en la sección A se ilustran en más detalle con las siguientes realizaciones y combinaciones de realizaciones como se indica con las respectivas dependencias y documentos originales. Las definiciones y explicaciones del presente documento rigen *mutatis mutandis* para las siguientes realizaciones.

1. Un análogo de insulina que comprende por lo menos una mutación relativa a la insulina original, en donde el análogo de insulina comprende una mutación en la

posición B16 que se sustituye con un aminoácido hidrófobo y/o una mutación en la posición B25 que se sustituye con un aminoácido hidrófobo.

2. El análogo de insulina según la realización 1, en donde la insulina original es insulina humana, insulina porcina o insulina bovina.

5 3. El análogo de insulina según las realizaciones 1 y 2, en donde el aminoácido hidrófobo en la posición B16 y/o la posición B25 es un aminoácido alifático.

10 4. El análogo de insulina según una cualquiera de las realizaciones 1 a 3, en donde dicho aminoácido alifático en la posición B16 y/o en la posición B25 es un aminoácido de cadena ramificada, tal como un aminoácido de cadena ramificada seleccionado del grupo que consiste en valina (Val), isoleucina (Ile) y leucina (Leu).

5. El análogo de insulina según una cualquiera de las realizaciones 1 a 3, en donde dicho análogo de insulina comprende además una mutación en la posición A14 que se sustituye con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico (Glu), ácido aspártico (Asp) e histidina (His).

15 6. El análogo de insulina según una cualquiera de las realizaciones 1 a 5, en donde dicho análogo de insulina comprende además una mutación en la posición B30, p. ej., en donde la mutación en la posición B30 es la eliminación del aminoácido en la posición B30 de la insulina original (mutación Des(B30)).

20 7. El análogo de insulina según una cualquiera de las realizaciones 1 a 6, en donde dicho análogo de insulina comprende además una mutación en la posición B3 que se sustituye con un ácido glutámico (Glu).

8. El análogo de insulina según una cualquiera de las realizaciones 1 a 7, en donde dicha insulina comprende además una mutación en la posición A21 que se sustituye con glicina (Gly).

9. El análogo de insulina según una cualquiera de las realizaciones 1 a 8, en donde la cadena B del análogo de insulina comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFLYTPK	(SEQ ID NO: 22)
5	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFIYTPK	(SEQ ID NO: 44)
	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPK	(SEQ ID NO: 48)
	FVEQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPK	(SEQ ID NO: 50)
	FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFIYTPK	(SEQ ID NO: 58)
	FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFIYTPK	(SEQ ID NO: 60)
10	FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFVYTPK	(SEQ ID NO: 64)
	FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFVYTPK	(SEQ ID NO: 66)
	FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFIYTPK	(SEQ ID NO: 70)
	FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPK	(SEQ ID NO: 76)
	FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPK	(SEQ ID NO: 78)
15	FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPK	(SEQ ID NO: 80)
	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFLYTPKT	(SEQ ID NO: 85)
	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPKT	(SEQ ID NO: 86)
	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFIYTPKT	(SEQ ID NO: 87)
	FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPKT	(SEQ ID NO: 88)
20	FVEQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPKT	(SEQ ID NO: 89)
	FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFIYTPKT	(SEQ ID NO: 90)
	FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFIYTPKT	(SEQ ID NO: 91)
	FVNQHLCGSHLVEALILVCGERGFVYTPKT	(SEQ ID NO: 92)
	FVEQHLCGSHLVEALILVCGERGFVYTPKT	(SEQ ID NO: 93)
25	FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFIYTPKT	(SEQ ID NO: 94)

FVNQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPKT (SEQ ID NO: 95)

FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPKT (SEQ ID NO: 96), y

FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPKT (SEQ ID NO: 97).

10. El análogo de insulina según una cualquiera de las realizaciones 1 a 9, que
5 comprende

(a) una cadena A que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en
SEQ ID NO: 43 (GIVEQCCTSICSLEQLENYCN) y una cadena B que tiene una secuencia
de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 44
(FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFIYTPK),

10 (b) una cadena A que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en
SEQ ID NO: 47 (GIVEQCCTSICSLEQLENYCN) y una cadena B que tiene una secuencia
de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 48
(FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPK), o

15 (c) una cadena A que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en
SEQ ID NO: 77 (GIVEQCCTSICSLEQLENYCN) y una cadena B que tiene una secuencia
de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 78
(FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPK).

11. Un análogo de insulina seleccionado del grupo que consiste en

Leu(B16)-insulina humana,

20 Val(B16)-insulina humana,

Ile(B16)-insulina humana,

Leu(B16)Des(B30)-insulina humana,

Val(B16)Des(B30)-insulina humana,

Ile(B16)Des(B30)-insulina humana,

25 Leu(B25)-insulina humana,

Val(B25)-insulina humana,
 Ile(B25)-insulina humana,
 Leu(B25)Des(B30)-insulina humana,
 Val(B25)Des(B30)-insulina humana,
 5 Ile(B25)Des(B30)-insulina humana,
 Glu(A14)Leu(B16)Des(B30)-insulina humana,
 Glu(A14)Ile(B16)Des(B30)-insulina humana,
 Glu(A14)Val(B16)Des(B30)-insulina humana,
 Glu(A14)Leu(B16)-insulina humana,
 10 Glu(A14)Ile(B16)-insulina humana,
 Glu(A14)Val(B16)-insulina humana,
 Glu(A14)Leu(B25)Des(B30)-insulina humana,
 Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-insulina humana,
 Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-insulina humana,
 15 Glu(A14)Leu(B25)-insulina humana,
 Glu(A14)Ile(B25)-insulina humana,
 Glu(A14)Val(B25)-insulina humana,
 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)Des(B30)-insulina humana,
 Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-insulina humana,
 20 Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-insulina humana,
 Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina humana,
 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina humana,
 Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)-insulina humana,
 Glu(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina humana,
 25 Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina humana,

Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina humana,

Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)-insulina humana,

Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)-insulina humana,

Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)-insulina humana,

5 Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)-insulina humana,

Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)-insulina humana,

Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)-insulina humana,

Glu(A14)Val(B16)Val(B25)-insulina humana,

Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-insulina humana, y

10 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-insulina humana.

12. Una cadena B de insulina que comprende por lo menos una mutación relativa a la cadena B de la insulina original, en donde la cadena B comprende una mutación en la posición B16 que se sustituye con un aminoácido hidrófobo, y/o una mutación en la posición B25 que se sustituye con un aminoácido hidrófobo.

15 13. La cadena B de insulina según la realización 12, en donde la insulina original es insulina humana, insulina porcina o insulina bovina.

14. La cadena B de insulina según las realizaciones 12 y 13, en donde el aminoácido hidrófobo en la posición B16 y/o en la posición B25 es un aminoácido alifático.

20 15. La cadena B de insulina según una cualquiera de las realizaciones 12 a 14, en donde dicho aminoácido alifático es un aminoácido de cadena ramificada, tal como un aminoácido de cadena ramificada seleccionado del grupo que consiste en valina (Val), isoleucina (Ile) y leucina (Leu).

25 16. La cadena B de insulina según una cualquiera de las realizaciones 12 a 15, en donde dicha cadena B de insulina comprende además una mutación en la posición B3 que se sustituye con un ácido glutámico (Glu).

17. La cadena B de insulina según una cualquiera de las realizaciones 12 a 16, en donde dicha cadena B de insulina comprende además una mutación en la posición B30, en donde la mutación en la posición B30 es la eliminación del aminoácido en la posición B30 de la insulina original (mutación Des(B30)).

5 18. Una proinsulina que comprende una cadena A de insulina y una cadena B de insulina, en donde la cadena B de insulina comprende por lo menos una mutación relativa a la cadena B de una insulina original, en donde la cadena B comprende una mutación en la posición B16 que se sustituye con un aminoácido hidrófobo y/o una mutación en la posición B25 que se sustituye con un aminoácido hidrófobo.

10 19. La proinsulina según la realización 18, en donde la cadena A de insulina de dicha proinsulina comprende una mutación en la posición A14 que se sustituye con un aminoácido seleccionado entre ácido glutámico (Glu), ácido aspártico (Asp) e histidina (His).

20. La proinsulina según las realizaciones 18 y 19, en donde la insulina original es insulina humana, insulina porcina o insulina bovina.

15 21. La proinsulina según una cualquiera de las realizaciones 18 a 20, en donde el aminoácido hidrófobo en la posición B16 y/o la posición B25 es un aminoácido alifático.

20 22. La proinsulina según una cualquiera de las realizaciones 18 a 21, en donde dicho aminoácido alifático es un aminoácido de cadena ramificada, tal como un aminoácido de cadena ramificada seleccionado del grupo que consiste en valina (Val), isoleucina (Ile) y leucina (Leu).

23. La proinsulina según una cualquiera de las realizaciones 18 a 22, en donde dicha proinsulina comprende además una mutación en la posición B3 que se sustituye con un ácido glutámico (Glu).

25 24. La proinsulina según una cualquiera de las realizaciones 18 a 23, en donde dicha proinsulina comprende además una mutación en la posición B30, en donde la

mutación en la posición B30 es la eliminación del aminoácido en la posición B30 de la insulina original (mutación Des(B30)).

25. Un polinucleótido que codifica el análogo de insulina según una cualquiera de las realizaciones 1 a 11, la cadena B de insulina según una cualquiera de las realizaciones 12 a 17 y/o la proinsulina según una cualquiera de las realizaciones 18 a 24.

26. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido según la realización 25.

27. Una célula hospedante que comprende un análogo de insulina según una cualquiera de las realizaciones 1 a 11, la cadena B de insulina según una cualquiera de las realizaciones 12 a 17, la proinsulina según una cualquiera de las realizaciones 18 a 24, el polinucleótido según la realización 25 y/o el vector de expresión según la realización 26.

28. Un método para tratar a un paciente que padece diabetes mellitus, que comprende administrar al paciente uno o más análogos de insulina según se define en una cualquiera de las realizaciones 1 a 11.

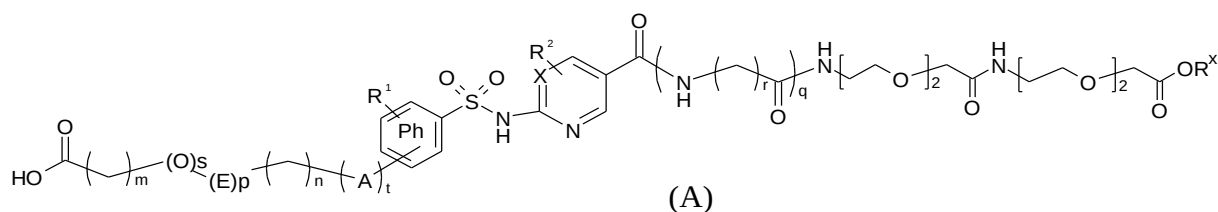
29. El análogo de insulina según se define en una cualquiera de las realizaciones 1 a 11 para uso en el tratamiento de la diabetes mellitus.

Sección B: Restos de unión a albúmina del suero

Se dan a conocer en este documento restos de unión a la albúmina del suero (en lo sucesivo denominados “aglutinantes de albúmina” o “aglutinantes”), que cuando se acoplan a un péptido tal como un análogo de insulina mencionado anteriormente producen mejores propiedades de farmacodinamia y/o farmacocinética del péptido, por ejemplo, una semivida extendida de la farmacocinética en la sangre y/o el plasma sanguíneo y/o un perfil prolongado de la acción, es decir una reducción prolongada del nivel de glucosa en sangre. Los restos de unión a albúmina del suero provistos son las sulfonamidas que se describen a continuación.

Sorprendentemente, se descubrió que dichos conjugados de péptido se pueden proveer usando sulfonamidas específicas, que se pueden usar para conjugados de péptido. Los conjugados de péptido resultantes exhiben semivida favorable en la sangre y/o el plasma sanguíneo, y un perfil prolongado de acción. Se pudo demostrar que los conjugados de péptido resultantes exhiben un aumento de la semivida de la farmacocinética ($t_{1/2}$) y también un Tiempo Medio de Residencia (MRT) aumentado comparado con los péptidos no conjugados. Asimismo, los conjugados de péptido tienen una prolongación significativa de la duración de la acción *in vivo* en comparación con los péptidos no conjugados.

Por lo tanto, se dan a conocer en este documento sulfonamidas de fórmula (A)



en donde:

A se selecciona del grupo que consiste en átomo de oxígeno, grupo $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, grupo OCH_2- y grupo $-\text{CH}_2\text{O}-$;

E representa un grupo $-\text{C}_6\text{H}_3\text{R}-$ en donde R es un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno, en donde el átomo de halógeno se selecciona del grupo que consiste en un átomo de flúor, cloro, bromo y yodo;

X representa un átomo de nitrógeno o un grupo $-\text{CH}-$;

m es un número entero en el intervalo de 5 a 17;

n es cero o un número entero en el intervalo de 1 a 3;

p es cero o 1;

q es cero o 1;

r es un número entero en el intervalo de 1 a 6;

s es cero o 1;

t es cero o 1;

R^1 representa por lo menos un residuo seleccionado del grupo de átomo de hidrógeno, átomo de halógeno, grupo alquilo C1 a C3 y grupo alquilo C1 a C3 halogenado;

5 R^2 representa por lo menos un residuo seleccionado del grupo de átomo de hidrógeno, átomo de halógeno, grupo alquilo C1 a C3 y grupo alquilo C1 a C3 halogenado;

R^x representa un átomo de hidrógeno o un grupo de activación, opcionalmente un grupo de activación seleccionado del grupo que consiste en 7-azabenzotriazol (opcionalmente derivado de HATU [hexafluorofosfato de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio 3-óxido hexafluorofosfato] o HBTU [hexafluorofosfato de 3-[bis-(dimetilamino)metilio-il]-3H-benzotriazol-1-óxido]), 4-nitrobenceno y grupo N-succinimidilo, en donde R^x es opcionalmente un grupo N-succinimidilo.

10

En algunas realizaciones, se excluye la combinación en donde s es 1, p es cero, n es cero, A es un átomo de oxígeno y t es 1. En algunas realizaciones, s es cero, en donde los residuos e índices restantes tienen el significado que se indicó anteriormente para la fórmula (A).

15

Por ejemplo, el grupo alquilo C1 a C3 halogenado de R^1 y/o el grupo alquilo C1 a C3 halogenado de R^2 está/están parcialmente halogenado(s) o per halogenado(s). En algunas realizaciones, el grupo alquilo C1 a C3 halogenado de R^1 y/o el grupo alquilo C1 a C3 halogenado de R^2 está/están per halogenado(s).

20

Como se emplea en esta memoria, la expresión “sulfonamidas de fórmula (A)” comprende las sulfonamidas de fórmula (A), sus sales farmacéuticamente aceptables y todas las sulfonamidas isotópicamente etiquetadas farmacéuticamente aceptables de fórmula (A), en donde uno o más átomos se reemplazan con átomos que tienen el mismo número atómico, pero un número másico o masa atómica diferente de la masa atómica o

25

el número másico que predomina en la naturaleza. Lo mismo rige para todos los subtipos de las sulfonamidas de fórmula (A), es decir, para las sulfonamidas de fórmula (A-1) a (A-5) como se detalla a continuación y también para sus subestructuras respectivamente, por ejemplo, las sulfonamidas de fórmula (A-1-1). Es decir, la expresión “sulfonamidas de fórmula (A-...)”, en donde (A-...) representa el número de las sulfonamidas de fórmula (A-1) a (A-5) como se detalla a continuación y también sus subestructuras, comprende los compuestos propiamente dichos, sus sales farmacéuticamente aceptables y todos sus compuestos isotópicamente etiquetados farmacéuticamente aceptables.

Las sales farmacéuticamente aceptables de las sulfonamidas de fórmula (A) incluyen sales de bases. Las sales de bases adecuadas se forman a partir de bases que forman sales no tóxicas. Los ejemplos incluyen sales de aluminio, arginina, benzatina, calcio, colina, dietilamina, bis(2-hidroxietil)amina (diolamina), glicina, lisina, magnesio, meglumina, 2-aminoetanol (olamina), potasio, sodio, 2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol (tris o trometamina) y zinc. Para una revisión de sales adecuadas, véase Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use de Stahl y Wermuth (Wiley-VCH, 2002).

Las sulfonamidas de fórmula (A), y sus sales farmacéuticamente aceptables, pueden existir en formas solvatadas y no solvatadas. El término `solvato` se usa en este documento para describir un complejo molecular que comprende las sulfonamidas de fórmula (A), o una sal farmacéuticamente aceptable de éstas, y una o más moléculas de disolvente farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, etanol. El término `hidrato` se emplea cuando dicho disolvente es agua.

Los ejemplos de isótopos adecuados para inclusión en las sulfonamidas de fórmula (A) incluyen isótopos de hidrógeno, tales como ^2H y ^3H , carbono, tales como ^{11}C , ^{13}C y ^{14}C ,

cloro, tales como ^{36}Cl , flúor, tales como ^{18}F , yodo, tales como ^{123}I y ^{125}I , nitrógeno, tales como ^{13}N y ^{15}N , oxígeno, como ^{15}O , ^{17}O y ^{18}O , y azufre, tales como ^{35}S .

Ciertas sulfonamidas isotópicamente etiquetadas de fórmula (A), por ejemplo aquellas que incorporan un isótopo radiactivo, son útiles en estudios de distribución de fármacos y/o sustrato. Los isótopos radiactivos tritio, es decir ^3H , y carbono -14, es decir ^{14}C , son particularmente útiles para este propósito en vista de su facilidad de incorporación y métodos de detección sencillos.

La sustitución con isótopos más pesados tales como deuterio, es decir ^2H , puede producir ciertas ventajas terapéuticas que resultan de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, mayor semivida *in vivo* o menores requerimientos de dosis.

La sustitución con isótopos de emisión de positrones, como ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O y ^{13}N , puede ser útil en estudios de Topografía por Emisión de Positrones (PET) para examinar la ocupación de los receptores de sustrato.

Las sulfonamidas isotópicamente etiquetadas de fórmula (A) en general se pueden preparar por técnicas convencionales conocidas para los expertos.

Los solvatos farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la invención incluyen aquellos en los que el disolvente de cristalización puede ser isotópicamente sustituido, p. ej., D_2O , d_6 -acetona, d_6 -DMSO.

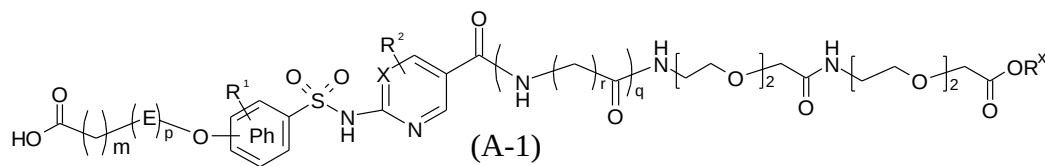
Con el propósito de identificar moléculas aglutinantes adecuadas, que cuando se unen a un péptido, como una insulina, son capaces de mejorar la semivida en plasma y prolongar el perfil de acción, se estableció un sistema basado en cromatografía de afinidad con columnas de albúmina del suero, es decir, columnas con albúmina del suero inmovilizada.

El tiempo de retención neto de los aglutinantes (muestras) se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Tiempo de retención neto} = \text{TiempoRet}_{\text{Muestra}} - \text{TiempoRet}_{\text{marcador t0}}$$

Las sulfonamidas de fórmula (A) tienen una retención neta en el intervalo de 9 a 19, por ejemplo en el intervalo de 9,5 a 18, y en consecuencia se consideraron aglutinantes útiles para conjugados de péptidos, como los conjugados de insulina.

5 De acuerdo con una realización, la sulfonamida tiene la fórmula (A-1)



10 en donde:

E representa un grupo $-\text{C}_6\text{H}_3\text{R}-$ en donde R es un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno, en donde el átomo de halógeno se selecciona del grupo que consiste en átomos de flúor, cloro, bromo y yodo, y es por ejemplo un átomo de flúor;

X representa un átomo de nitrógeno o un grupo $-\text{CH}-$;

15 p es cero o 1;

q es cero o 1;

r es un número entero en el intervalo de 1 a 6;

20 R^1 representa por lo menos un residuo seleccionado del grupo de átomo de hidrógeno y átomo de halógeno, en donde el átomo de halógeno es por ejemplo un átomo de flúor o cloro;

R^2 representa por lo menos un residuo seleccionado del grupo de átomo de hidrógeno, grupo alquilo C1 a C3 y grupo alquilo C1 a C3 halogenado, en donde el grupo alquilo C1 a C3 es por ejemplo un grupo metilo y el grupo alquilo C1 a C3 halogenado es por ejemplo perhalogenado, tal como un grupo trifluorometilo;

25

R^x representa un átomo de hidrógeno o un grupo de activación, opcionalmente un grupo de activación seleccionado del grupo que consiste en 7-azabenzotriazol (opcionalmente derivado de HATU o HBTU), 4-nitro benceno y grupo N-succinimidilo, en donde R^x es opcionalmente un grupo N-succinimidilo, en donde m es un número entero en el intervalo de 5 a 15 si p es cero, o m es un número entero en el intervalo de 7 a 15 si p es 1.

En una realización de la sulfonamida, R^1 y R^2 son átomos de hidrógeno.

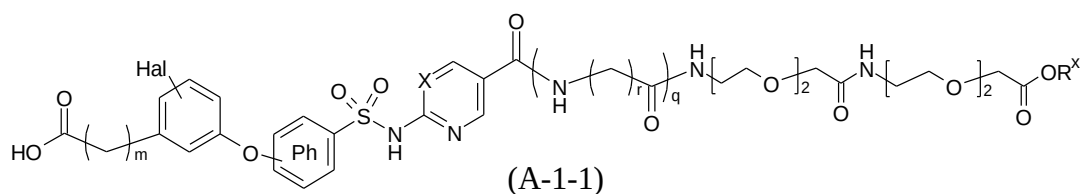
En una realización de la sulfonamida, X representa un átomo de nitrógeno.

De acuerdo con otra realización de la sulfonamida, el grupo $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-(\text{O})_s-(\text{E})_p-(\text{CH}_2)_n-(\text{A})_t$ de fórmula (A) o el grupo $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-(\text{E})_p-\text{O}-$ de fórmula (A-1) se sitúa en la posición meta o para en el anillo fenilo Ph con respecto al grupo $-\text{S}(\text{O})_2-$.

De acuerdo con otra realización de la sulfonamida, si p es 1, el grupo $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-(\text{O})_s-$ y el grupo $-(\text{CH}_2)_n-(\text{A})_t$ se sitúan en la posición meta o para en $(\text{E})_p$ de fórmula (A) o el grupo $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-$ y $-\text{O}-$ se sitúan en la posición meta o para en $(\text{E})_p$ de fórmula (A-1).

De acuerdo con otra realización de la sulfonamida, q es cero.

De acuerdo con otra realización, la sulfonamida tiene la fórmula (A-1-1)

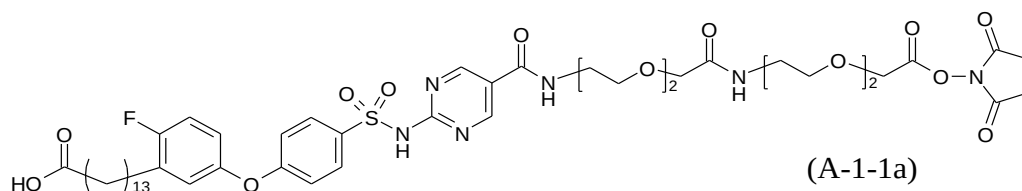


en donde X es un átomo de nitrógeno o un grupo-CH-, por ejemplo un átomo de nitrógeno; m es un número entero en el intervalo de 7 a 15; r es un número entero en el intervalo de 1 a 6; q es cero o 1, por ejemplo cero; Hal es un átomo de halógeno seleccionado del grupo que consiste en átomo de flúor, cloro, bromo y yodo, por ejemplo un átomo de flúor; R^x es un átomo de hidrógeno o un grupo de activación, opcionalmente un grupo de activación seleccionado del grupo que consiste en 7-azabenzotriazol

(opcionalmente derivado de HATU o HBTU), 4-nitro benceno y grupo N-succinimidilo, en donde R^x es un grupo N-succinimidilo; y el grupo $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-\text{C}_6\text{H}_3\text{Hal}-\text{O}-$ está situado en la posición meta o para en el anillo fenilo Ph con respecto al grupo $-\text{S}(\text{O})_2-$.

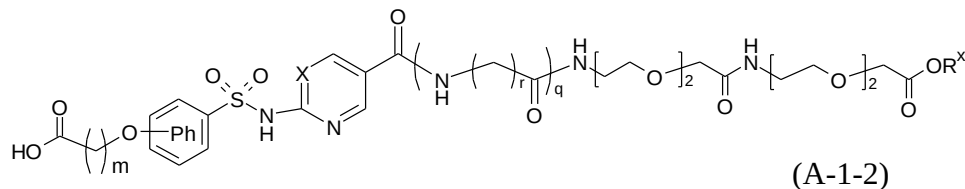
De acuerdo con una realización, la sulfonamida tiene la fórmula (A-1-1a)

5



De acuerdo con otra realización, la sulfonamida tiene la fórmula (A-1-2)

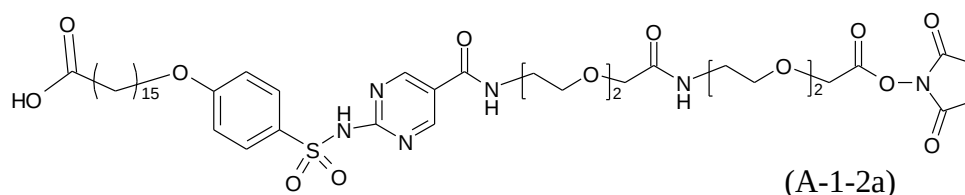
10



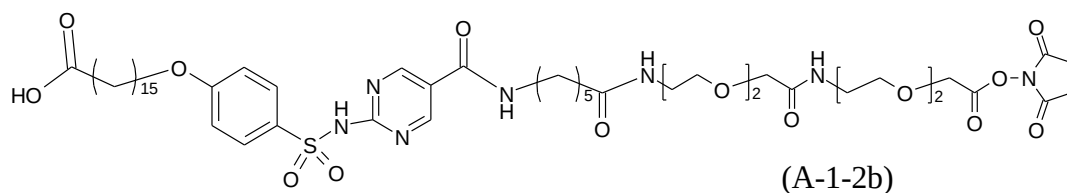
en donde X es un átomo de nitrógeno o un grupo $-\text{CH}-$, por ejemplo un átomo de nitrógeno; m es un número entero en el intervalo de 5 a 15; r es un número entero en el intervalo de 1 a 6; q es cero o 1, por ejemplo cero; R^x es un átomo de hidrógeno o un grupo de activación, opcionalmente un grupo de activación seleccionado del grupo que consiste en 7-azabenzotriazol (opcionalmente derivado de HATU o HBTU), 4-nitro benceno y grupo N-succinimidilo, en donde R^x es opcionalmente un grupo N-succinimidilo; y el grupo $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-\text{O}-$ está situado en la posición meta o para en el anillo fenilo Ph con respecto al grupo $-\text{S}(\text{O})_2-$.

De acuerdo con una realización, la sulfonamida tiene la fórmula (A-1-2a)

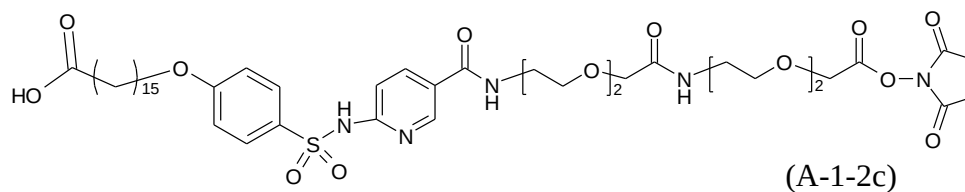
25



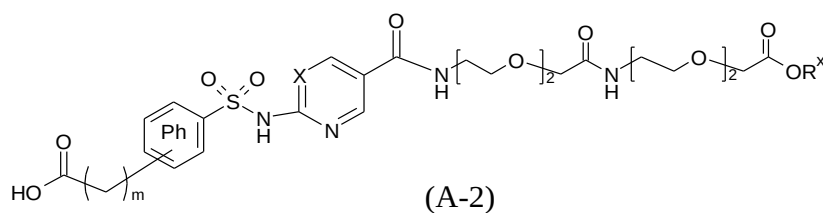
o la fórmula (A-1-2b)



o la fórmula (A-1-2c)



De acuerdo con otra realización, la sulfonamida tiene la fórmula (A-2)



en donde

X representa un átomo de nitrógeno o un grupo -CH-;

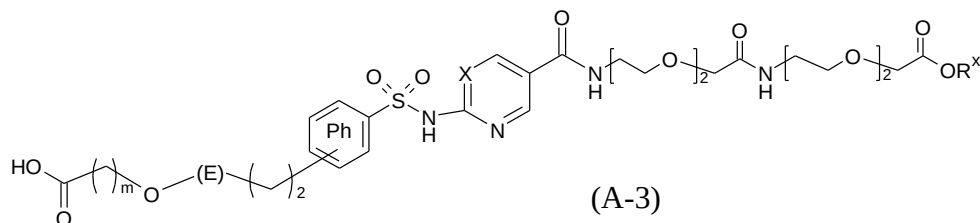
R^x representa un átomo de hidrógeno o un grupo de activación, opcionalmente un grupo de activación seleccionado del grupo que consiste en 7-azabenzotriazol (opcionalmente derivado de HATU o HBTU), 4-nitro benceno y grupo N-succinimido, en donde R^x es opcionalmente un grupo N-succinimido; y

m es un número entero en el intervalo de 5 a 17, por ejemplo en el intervalo de 11 a 17.

De acuerdo con una realización de la sulfonamida de fórmula (A-2), el grupo $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-$ está situado en la posición meta o para en el anillo fenilo Ph con respecto al grupo $-\text{S}(\text{O})_2-$.

De acuerdo con otra realización, la sulfonamida tiene la fórmula (A-3)

5



10

en donde

E representa un grupo $-\text{C}_6\text{H}_3\text{R}-$ en donde R es un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno, en donde el átomo de halógeno se selecciona del grupo que consiste en un átomo de flúor, cloro, bromo y yodo;

X representa un átomo de nitrógeno o un grupo $-\text{CH}-$;

15

R^x representa un átomo de hidrógeno o un grupo de activación, opcionalmente un grupo de activación seleccionado del grupo que consiste en 7-azabenzotriazol (opcionalmente derivado de HATU o HBTU), 4-nitro benceno y grupo N-succinimidilo, en donde R^x es opcionalmente un grupo N-succinimidilo; y

m es un número entero en el intervalo de 5 a 17, por ejemplo 11.

20

De acuerdo con una realización de la sulfonamida de fórmula (A-3), el grupo $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m\text{-O}-$ y el grupo $-(\text{CH}_2)_2-$ están situados en la posición para en (E) de fórmula (A-3) y el grupo $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m\text{-O}-(\text{E})-(\text{CH}_2)_2-$ está situado en la posición para en el anillo fenilo Ph con respecto al grupo $-\text{S}(\text{O})_2-$.

De acuerdo con otra realización, la sulfonamida tiene la fórmula (A-4)

25

(A-4)

(A-5)

en donde

E representa un grupo $-C_6H_3R-$ en donde R es un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno, en donde el átomo de halógeno se selecciona del grupo que consiste en un átomo de flúor, cloro, bromo y yodo;

X representa un átomo de nitrógeno o un grupo $-CH-$;

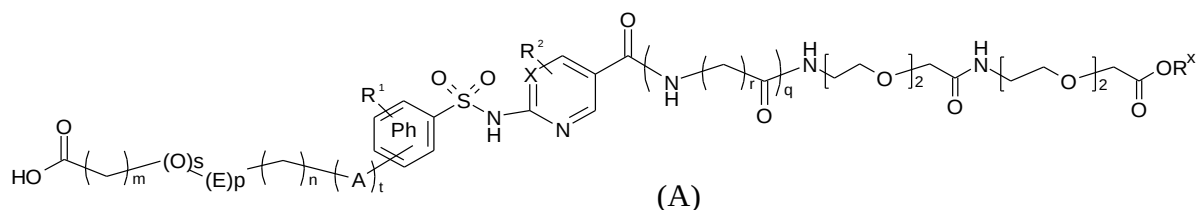
5 R^x representa un átomo de hidrógeno o un grupo de activación, opcionalmente un grupo de activación seleccionado del grupo que consiste en 7-azabenzotriazol (opcionalmente derivado de HATU o HBTU), 4-nitro benceno y grupo N-succinimidilo, en donde R^x es opcionalmente un grupo N-succinimidilo; y

10 m es un número entero en el intervalo de 5 a 17, por ejemplo en el intervalo de 7 a 9.

De acuerdo con una realización de la sulfonamida de fórmula (A-5), el grupo $HOOC-(CH_2)_m-$ y el grupo $-(CH_2)_2-$ están situados en la posición para en (E) de fórmula (A-5) y el grupo $HOOC-(CH_2)_mE-(CH_2)_2-O-$ está situado en la posición para en el anillo fenilo Ph con respecto al grupo $-S(O)_2-$.

15 Los aglutinantes de albúmina descritos en la sección B se ilustran en más detalle mediante las siguientes realizaciones y combinaciones de realizaciones como lo indican las respectivas dependencias y documentos originales. En particular, se observa que en cada caso en el que se menciona un intervalo de realizaciones, por ejemplo en el contexto de una expresión tal como "El/La ... según cualquiera de las realizaciones 1 a 4", cada
20 realización en este intervalo tiene como fin ser descrita en forma explícita para el experto en la técnica, es decir el experto en la técnica entenderá que la terminología en esta expresión es sinónimo de "El/La ... según cualquiera de las realizaciones 1, 2, 3 y 4".

1. Una sulfonamida de fórmula (A)



en donde:

5

A se selecciona del grupo que consiste en átomo de oxígeno, grupo $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, grupo $-\text{OCH}_2-$ y grupo $-\text{CH}_2\text{O}-$;

E representa un grupo $-\text{C}_6\text{H}_3\text{R}-$ en donde R es un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno, en donde el átomo de halógeno se selecciona del grupo que consiste en un átomo de flúor, cloro, bromo y yodo;

10

X representa un átomo de nitrógeno o un grupo $-\text{CH}-$;

m es un número entero en el intervalo de 5 a 17;

n es cero o un número entero en el intervalo de 1 a 3;

p es cero o 1;

q es cero o 1;

15

r es un número entero en el intervalo de 1 a 6;

s es cero o 1;

t es cero o 1;

R^1 representa por lo menos un residuo seleccionado del grupo de átomo de hidrógeno, átomo de halógeno, grupo alquilo C1 a C3 y grupo alquilo C1 a C3 halogenado;

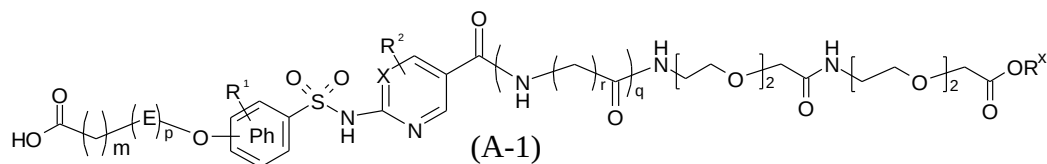
20

R^2 representa por lo menos un residuo seleccionado del grupo de átomo de hidrógeno, átomo de halógeno, grupo alquilo C1 a C3 y grupo alquilo C1 a C3 halogenado;

R^x representa un átomo de hidrógeno o un grupo de activación, opcionalmente un grupo de activación seleccionado del grupo que consiste en 7-azabenzotriazol (opcionalmente derivado de HATU o HBTU), 4-nitro benceno y grupo N-succinimidilo, en donde R^x es opcionalmente un grupo N-succinimidilo.

25

2. La sulfonamida de acuerdo con la realización 1 que tiene la fórmula (A-1)



5

en donde:

E representa un grupo $-C_6H_3R-$ en donde R es un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno, en donde el átomo de halógeno se selecciona del grupo que consiste en un átomo de flúor, cloro, bromo y yodo;

X representa un átomo de nitrógeno o un grupo $-CH-$;

10

p es cero o 1;

q es cero o 1;

r es un número entero en el intervalo de 1 a 6;

R^1 representa por lo menos un residuo seleccionado del grupo de átomo de hidrógeno y átomo de halógeno;

15

R^2 representa por lo menos un residuo seleccionado del grupo de átomo de hidrógeno, grupo alquilo C1 a C3 y grupo alquilo C1 a C3 halogenado;

R^x representa un átomo de hidrógeno o un grupo de activación, opcionalmente un grupo de activación seleccionado del grupo que consiste en 7-azabenzotriazol (opcionalmente derivado de HATU o HBTU), 4-nitro benceno y grupo N-succinimidilo, en donde R^x es opcionalmente un grupo N-succinimidilo; y

20

en donde m es un número entero en el intervalo de 5 a 15 si p es cero, o m es un número entero en el intervalo de 7 a 15 si p es 1.

3. La sulfonamida de acuerdo con la realización 1 o 2, en donde R^1 y R^2 son átomos de hidrógeno.

25

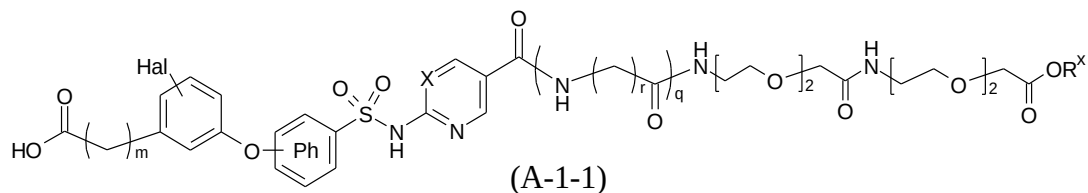
4. La sulfonamida de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 3, en donde X representa un átomo de nitrógeno.

5. La sulfonamida de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 4, en donde el grupo $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-(\text{O})_s-(\text{E})_p-(\text{CH}_2)_n-(\text{A})_t-$ de fórmula (A) o el grupo $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-(\text{E})_p-\text{O}-$ de fórmula (A-1) está situado en la posición meta o para en el anillo fenilo Ph con respecto al grupo $-\text{S}(\text{O})_2-$.

6. La sulfonamida de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 5, en donde, si p es 1, el grupo $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-(\text{O})_s-$ y el grupo $-(\text{CH}_2)_n-(\text{A})_t-$ están situados en la posición meta o para en $(\text{E})_p$ de fórmula (A) o el grupo $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-$ y $-\text{O}-$ están situados en la posición meta o para en $(\text{E})_p$ de fórmula (A-1).

7. La sulfonamida de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 6, en donde q es cero.

8. La sulfonamida de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 7, en donde la sulfonamida tiene la fórmula (A-1-1)

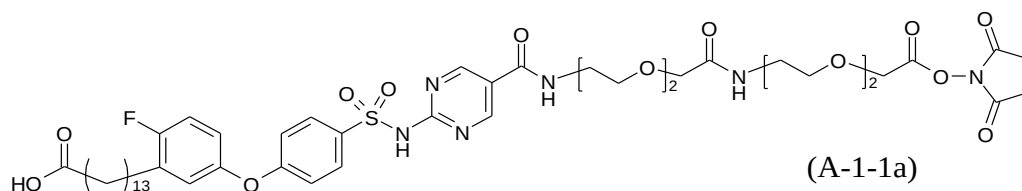


en donde X es un átomo de nitrógeno o un grupo $-\text{CH}-$; m es un número entero en el intervalo de 7 a 15; r es un número entero en el intervalo de 1 a 6; q es cero o 1; Hal es un átomo de halógeno seleccionado del grupo que consiste en un átomo de flúor, cloro, bromo y yodo; R^x representa un átomo de hidrógeno o un grupo de activación, opcionalmente un grupo de activación seleccionado del grupo que consiste en 7-azabenzotriazol (opcionalmente derivado de HATU o HBTU), 4-nitro benceno y grupo N-succinimidilo, en donde R^x es opcionalmente un grupo N-succinimidilo;

y el grupo $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-\text{C}_6\text{H}_3\text{Hal}-\text{O}-$ está situado en la posición meta o para en el anillo fenilo Ph con respecto al grupo $-\text{S}(\text{O})_2-$.

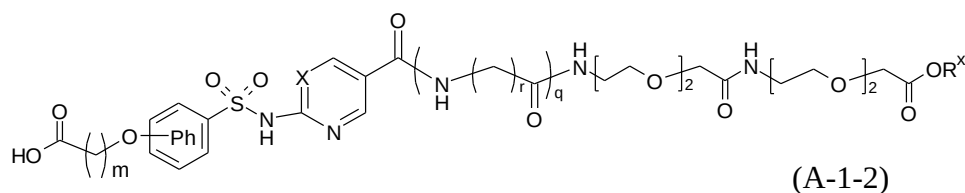
9. La sulfonamida de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 8, en donde la sulfonamida tiene la fórmula (A-1-1a)

5



10. La sulfonamida de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 7, en donde la sulfonamida tiene la fórmula (A-1-2)

10

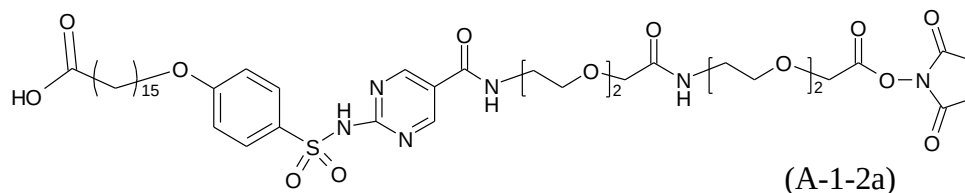


en donde X es un átomo de nitrógeno o un grupo $-\text{CH}-$; m es un número entero en el intervalo de 5 a 15; r es un número entero en el intervalo de 1 a 6; q es cero o 1; y el grupo $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-\text{O}-$ está situado en la posición meta o para en el anillo fenilo Ph con respecto al grupo $-\text{S}(\text{O})_2-$.

15

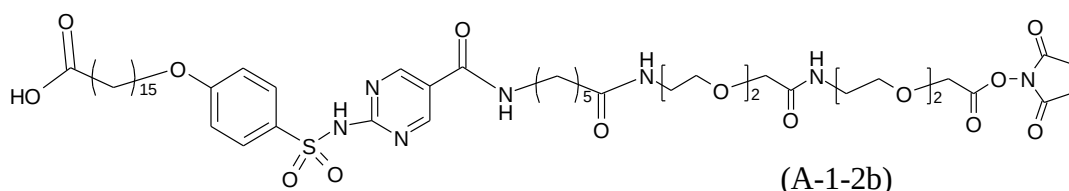
11. La sulfonamida de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 7 o 10, en donde la sulfonamida tiene la fórmula (A-1-2a)

20

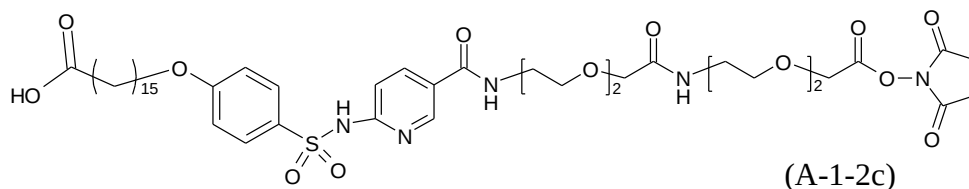


o la fórmula (A-1-2b)

25



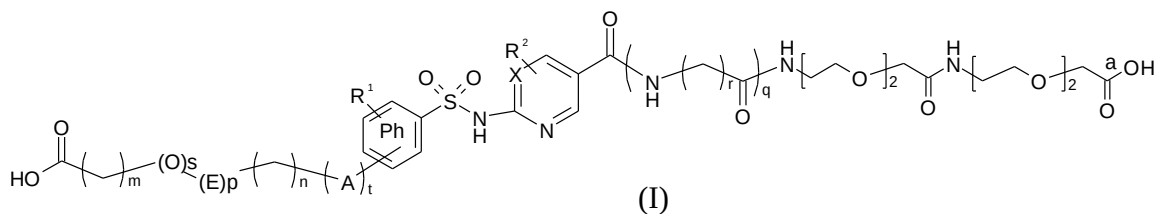
o la fórmula (A-1-2c)



Sección C: Conjugado

Se dan a conocer en la presente invención conjugados que comprenden un aglutinante de albúmina y un ingrediente farmacéutico activo o un compuesto diagnóstico. En una realización, el aglutinante de albúmina se definió en la sección B anterior y el ingrediente farmacéutico activo es un análogo de insulina definido en la sección A anterior.

Se dan a conocer conjugados que comprenden una sulfonamida de fórmula (I) y un ingrediente farmacéutico activo o un compuesto diagnóstico



en donde la sulfonamida de fórmula (I):

A se selecciona del grupo que consiste en átomo de oxígeno, grupo-CH₂CH₂-, grupo -OCH₂- y grupo -CH₂O-;

E representa un grupo -C₆H₃R- en donde R es un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno, en donde el átomo de halógeno se selecciona del grupo que consiste en un átomo de flúor, cloro, bromo y yodo;

X representa un átomo de nitrógeno o un grupo -CH-;

m es un número entero en el intervalo de 5 a 17;

n es cero o un número entero en el intervalo de 1 a 3;

p es cero o 1;

q es cero o 1;

5 r es un número entero en el intervalo de 1 a 6;

s es cero o 1;

t es cero o 1;

R¹ representa por lo menos un residuo seleccionado del grupo de átomo de hidrógeno, átomo de halógeno, grupo alquilo C1 a C3 y grupo alquilo C1 a C3 halogenado;

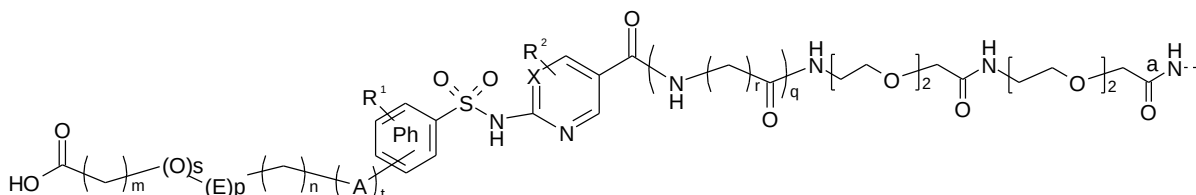
10 R² representa por lo menos un residuo seleccionado del grupo de átomo de hidrógeno, átomo de halógeno, grupo alquilo C1 a C3 y grupo alquilo C1 a C3 halogenado;

en donde la sulfonamida de fórmula (I) está covalentemente unida al ingrediente farmacéutico o al compuesto diagnóstico.

15 En algunas realizaciones, la combinación en donde s es 1, p es cero, n es cero, A es un átomo de oxígeno y t es 1, se excluye para la sulfonamida de fórmula (I). En algunas realizaciones, s es cero, en donde los residuos e índices restantes tienen el significado que se indicó anteriormente para la fórmula (I).

20 En algunas realizaciones, la sulfonamida de fórmula (I) está covalentemente unida al ingrediente farmacéutico o al compuesto diagnóstico en el sentido que el grupo carboxi terminal "a" de la sulfonamida de fórmula (I) está covalentemente unido a un grupo funcional adecuado del ingrediente farmacéutico activo o del compuesto diagnóstico, por ejemplo a un grupo amino o un grupo hidroxilo del ingrediente farmacéutico activo o del grupo diagnóstico. Por ejemplo, el ingrediente farmacéutico activo es un péptido, en donde el péptido y la sulfonamida de fórmula (I) están por ejemplo conectados por un enlace amida, 25 por ejemplo formado entre el grupo carboxi terminal "a" de la sulfonamida de fórmula (I) y

un grupo amino del péptido. De más está decir que en caso de un enlace amida, el grupo carboxilo “a” está presente en el conjugado como grupo carbonilo—C(=O)—, como se muestra a continuación, en donde todos los residuos E, A, R¹, R², X, además de los índices m, s, p, n, t, r y q tienen el significado indicado anteriormente para la fórmula (I) y el grupo NH---- ya es la parte remanente del grupo amino del péptido:



En algunas realizaciones, el grupo alquilo C1 a C3 halogenado de R¹ y/o el grupo alquilo C1 a C3 halogenado de R² de la sulfonamida de fórmula (I) está parcialmente halogenado o perhalogenado. En algunas realizaciones, el grupo alquilo C1 a C3 halogenado de R¹ y/o el grupo alquilo C1 a C3 halogenado de R² de la sulfonamida de fórmula (I) está perhalogenado.

Como se analizó precedentemente, se descubrió sorprendentemente que dichos conjugados exhiben semivida favorable en la sangre y/o el plasma sanguíneo, y un perfil prolongado de la acción, que se ha comprobado, por ejemplo, en modelos animales pre-clínicos.

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión “ingrediente farmacéutico activo” (API) incluye cualquier compuesto químico o biológico farmacéuticamente activo y cualquier sal farmacéuticamente aceptable de éste y cualquier mezcla de éste, que ofrezca algún efecto farmacológico y se use para tratar o prevenir una afección. Tal como se emplean en esta memoria, las expresiones “ingrediente farmacéutico activo”, “agente activo”, “ingrediente activo”, “sustancia activa” y “fármaco” son sinónimos, es decir, tienen significado idéntico.

Tal como se emplea en esta memoria, la expresión “conjugados que comprenden una sulfonamida de fórmula (I) y un ingrediente farmacéutico activo o un compuesto diagnóstico” comprende los conjugados propiamente dichos, sus sales farmacéuticamente aceptables y conjugados isotópicamente etiquetados, en donde uno o más átomos se reemplazan con átomos que tienen el mismo número atómico pero una masa atómica o número másico diferente de la masa atómica o número másico que predomina en la naturaleza. Lo mismo rige para todos los subtipos de conjugados, es decir, los conjugados que comprenden sulfonamidas de fórmula (I-1) a (I-5) como se detalla a continuación y también para sus subestructuras, por ejemplo, conjugados que comprenden las sulfonamidas de fórmula (I-1-1). Lo mismo rige para todos los subtipos de las sulfonamidas de fórmula (I), es decir, para las sulfonamidas de fórmula (I-1) a (I-5) como se detalla a continuación y también para sus subestructuras respectivamente, por ejemplo, las sulfonamidas de fórmula (I-1-1). Es decir, la expresión “conjugado que comprende una sulfonamida de fórmula (I-...)”, en donde (I-...) representa el número de las sulfonamidas de fórmula (I-1) a (I-5) como se detalla a continuación y también sus subestructuras, comprende los conjugados propiamente dichos, sus sales farmacéuticamente aceptables y todos sus compuestos isotópicamente etiquetados farmacéuticamente aceptables.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los conjugados incluyen sales de adición de ácidos y sales de bases. Las sales de adición de ácidos adecuadas se forman a partir de ácidos que forman sales no tóxicas. Los ejemplos incluyen las sales de acetato, adipato, aspartato, benzoato, besilato, bicarbonato/carbonato, bisulfato/sulfato, borato, camsilato, citrato, ciclamato, edisilato, esilato, formiato, fumarato, gluceptato, gluconato, glucuronato, hexafluorofosfato, hibenzato, hidrocloreuro/cloruro, hidrobromuro/bromuro, hidroyoduro/yoduro, isetionato, lactato, malato, maleato, malonato, mesilato, metilsulfato, naftilato, 2-napsilato, nicotinato, nitrato, orotato, oxalato, palmitato, pamoato,

fosfato/hidrógeno fosfato/dihidrógeno fosfato, piroglutamato, sacarato, estearato, succinato, tannato, tartrato, tosilato, trifluoroacetato, ácido 1,5-naftalenodisulfónico y xinafoato. Las sales de bases adecuadas se forman a partir de bases que forman sales no tóxicas. Los ejemplos incluyen las sales de aluminio, arginina, benzatina, calcio, colina, dietilamina, bis(2-hidroxietil)amina (diolamina), glicina, lisina, magnesio, meglumina, 2-aminoetanol (olamina), potasio, sodio, 2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol (tris o trometamina) y zinc. También se pueden formar hemisales de ácidos y bases, por ejemplo, sales de hemisulfato y hemicalcio. Para una revisión de las sales adecuadas, véase Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use de Stahl y Wermuth (Wiley-VCH, 2002).

Los conjugados, y sus sales farmacéuticamente aceptables, pueden existir en las formas no solvatada y solvatada. El término `solvato` se emplea en esta memoria para describir un complejo molecular que comprende el compuesto de Fórmula I, o su sal farmacéuticamente aceptable, y una o más moléculas de disolvente farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, etanol. El término `hidrato` se emplea cuando dicho disolvente es agua.

Los ejemplos de isótopos para inclusión en los conjugados incluyen isótopos de hidrógeno, tales como ^2H y ^3H , carbono, tales como ^{11}C , ^{13}C y ^{14}C , cloro, tales como ^{36}Cl , flúor, tales como ^{18}F , yodo, tales como ^{123}I y ^{125}I , nitrógeno, tales como ^{13}N y ^{15}N , oxígeno, tales como ^{15}O , ^{17}O y ^{18}O , y azufre, tales como ^{35}S .

Ciertos conjugados isotópicamente etiquetados, por ejemplo aquellos que incorporan un isótopo radiactivo, son útiles en estudios de distribución en el tejido de fármacos y/o sustrato. Los isótopos radiactivos tritio, es decir, ^3H , y carbono -14, es decir, ^{14}C , son particularmente útiles para este propósito en vista de su facilidad de incorporación y medios de detección simples.

La sustitución con isótopos más pesados tales como deuterio, es decir ^2H , puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas resultantes de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, aumento de semivida *in vivo* o reducción de requerimientos de dosis.

La sustitución con isótopos de emisión de positrones, tales como ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O y ^{13}N , puede ser útil en estudios de Topografía por Emisión de Positrones (PET) para examinar la ocupación del receptor en el sustrato.

Los conjugados isotópicamente etiquetados en general se pueden preparar con técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia.

Los solvatos farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la invención incluyen aquellos en los que el disolvente de cristalización puede ser isotópicamente sustituido, p. ej., D_2O , d_6 -acetona, d_6 -DMSO.

En una realización, el ingrediente farmacéutico activo se selecciona del grupo que comprende agente antidiabético, agente antiobesidad, agente regulador del apetito, agente antihipertensivo, agente para el tratamiento y/o la prevención de complicaciones que provienen o se asocian con diabetes y agentes para el tratamiento y/o la prevención de complicaciones y trastornos resultantes o asociados con obesidad. Los ejemplos de estos ingredientes farmacéuticos activos son: insulina, sulfonilureas, biguanidas, meglitinidas, inhibidores de glucosidasa, antagonistas de glucagón, inhibidores de DPP-IV (dipeptidil peptidasa-IV), inhibidores de enzimas hepáticas implicadas en estimulación de gluconeogénesis y/o glicogenólisis, moduladores de absorción de glucosa, compuestos que modifican el metabolismo de lípidos tales como agentes antihiperlipidémicos como inhibidores de HMG CoA (estatinas), polipéptidos de inhibición gástrica (análogos de GIP), compuestos que reducen la ingesta de alimentos, agonistas de RXR y agentes que actúan sobre el canal de potasio dependiente de ATP de las células; colestiramina, colestipol, clofibrato, gemfibrozil, lovastatina, pravastatina, simvastatina, probucol, dextrotiroxina,

neteglinida, repaglinida; -bloqueantes tales como alprenolol, atenolol, timolol, pindolol, propranolol y metoprolol, inhibidores de ACE (enzima convertidora de angiotensina) tales como benazepril, captopril, enalapril, fosinopril, lisinopril, alatriopril, quinapril y ramipril, bloqueantes de los canales de calcio tales como nifedipina, felodipina, nicardipina, isradipina, nimodipina, diltiazem y verapamil, y α -bloqueantes tales como doxazosin, urapidil, prazosin y terazosin; agonistas de CART (transcrito regulado por cocaína y anfetamina), antagonistas de NPY (neuropéptido Y), agonista de PYY, agonistas de PYY2, agonistas de PYY4, agonistas de PPY2/PYY4 mixtos, agonistas de MC4 (melanocortina 4), antagonistas de orexina, agonistas de TNF (factor de necrosis tumoral), agonistas de CRF (factor de liberación de corticotropina), antagonistas de CRF BP (proteína de unión al factor liberador de corticotropina), agonistas de urocortina, agonistas de 3, agonistas de MSH (hormona estimulante de melanocitos), antagonistas de MCH (hormona concentradora de melanocitos), agonistas de CCK (colecistoquinina), inhibidores de reabsorción de serotonina, inhibidores de reabsorción de serotonina y noradrenalina, compuestos mixtos de serotonina y noradrenérgicos, agonistas de 5HT (serotonina), agonistas de bombesina, antagonistas de galanina, hormona del crecimiento, compuestos liberadores de la hormona del crecimiento, agonistas de TRH (hormona liberadora de tireotropina), moduladores de UCP 2 o 3 (proteína de desacoplamiento 2 o 3), agonistas de leptina, agonistas de DA (bromocriptin, dorexina), inhibidores de lipasa/amilasa, moduladores de RXR (receptor de retinoide X), agonistas de TR; antagonistas de histamina H3, polipéptido inhibidor gástrico hasta agonistas y antagonistas (análogos de GIP), gastrina y análogos de gastrina. En una realización, el ingrediente farmacéutico activo se selecciona del grupo que consiste en agente antidiabético, agente antiobesidad, agente regulador del apetito, agente antihipertensivo, agente para el tratamiento y/o la prevención de complicaciones que provienen o se asocian con diabetes y agentes para el tratamiento y/o la prevención de

complicaciones y trastornos resultantes de o asociados con obesidad. Los ejemplos de estos ingredientes farmacéuticos activos son: Insulina, sulfonilureas, biguanidas, meglitinidas, inhibidores de glucosidasa, antagonistas de glucagón, inhibidores de DPP-IV (dipeptidil peptidasa-IV), inhibidores de enzimas hepáticas implicadas en la estimulación de gluconeogénesis y/o glicogenólisis, moduladores de absorción de glucosa, compuestos que modifican el metabolismo de lípidos tales como agentes antihiperlipidémicos como inhibidores de HMG CoA (estatinas), polipéptidos inhibidores gástricos (análogos de GIP), compuestos que reducen la ingesta de alimentos, agonistas de RXR y agentes que actúan sobre el canal de potasio dependiente de ATP de las células; colestiramina, colestipol, clofibrato, gemfibrozil, lovastatina, pravastatina, simvastatina, probucol, dextrotiroxina, neteglinide, repaglinide; bloqueantes tales como alprenolol, atenolol, timolol, pindolol, propranolol y metoprolol, inhibidores de ACE (enzima convertidora de angiotensina) tales como benazepril, captopril, enalapril, fosinopril, lisinopril, alatriopril, quinapril y ramipril, bloqueantes de los canales de calcio tales como nifedipina, felodipina, nicardipina, isradipina, nimodipina, diltiazem y verapamil, y α -bloqueantes tales como doxazosin, urapidil, prazosin y terazosin; agonistas de CART (transcrito regulado por cocaína y anfetamina), antagonistas de NPY (neuropéptido Y), agonista de PYY, agonistas de PYY2, agonistas de PYY4, agonistas de PPY2/PYY4 mixtos, agonistas de MC4 (melanocortina 4), antagonistas de orexina, agonistas de TNF (factor de necrosis tumoral), agonistas de CRF (factor liberador de corticotropina), antagonistas de CRF BP (proteína de unión al factor liberador de corticotropina), agonistas de urocortina, agonistas de 3, agonistas de MSH (hormona estimulante de melanocitos), antagonistas de MCH (hormona concentradora de melanocitos), agonistas de CCK (colecistoquinina), inhibidores de absorción de serotonina, inhibidores de absorción de serotonina y noradrenalina, compuestos mixtos de serotonina y noradrenérgicos, agonistas de 5HT (serotonina), agonistas de bombesina, antagonistas

de galanina, hormona del crecimiento, compuestos liberadores de la hormona del crecimiento, agonistas de TRH (hormona liberadora de tireotropina), moduladores de UCP 2 o 3 (proteína de desacoplamiento 2 o 3), agonistas de leptina, agonistas de DA (bromocriptina, doprexina), inhibidores de lipasa/amilasa, moduladores de RXR (receptor del retinoide X), agonistas de TR; antagonistas de histamina H3, polipéptido inhibidor gástrico a agonistas o antagonistas (análogos de GIP), gastrina y análogos de gastrina.

En una realización, el ingrediente farmacéutico activo es un péptido terapéuticamente activo, en donde el péptido comprende por lo menos 2 aminoácidos. En algunas realizaciones, el péptido comprende por lo menos 10 aminoácidos, o por lo menos 20 aminoácidos. En algunas realizaciones, el péptido comprende no más de 1000 aminoácidos, como no más de 500 aminoácidos, por ejemplo no más de 100 aminoácidos.

En una realización del conjugado, el ingrediente farmacéutico activo es un agente antidiabético, tal como un péptido. En algunas realizaciones, el péptido es GLP-1, análogo de GLP-1, agonista de GLP-1; agonista dual del receptor de GLP-1/glucagón; análogo de FGF21, FGF21 humano, derivado de FGF21; insulina (por ejemplo, insulina humana), análogo de insulina o derivado de insulina.

De acuerdo con una realización del conjugado, el ingrediente farmacéutico activo se selecciona del grupo que comprende insulina, análogo de insulina, GLP-1 y análogo de GLP-1 (por ejemplo, agonista de GLP(-1)). En una realización del conjugado, el ingrediente farmacéutico activo se selecciona del grupo que consiste en insulina, análogo de insulina, GLP-1 y análogo de GLP-1 (por ejemplo, agonista de GLP(-1)).

Tal como se emplea en este documento, la expresión "análogo de GLP-1" se refiere a un polipéptido que tiene una estructura molecular que formalmente puede derivar de la estructura de un péptido de tipo glucagón 1 que ocurre naturalmente 1 (GLP-1), por ejemplo aquel de GLP-1 humano, eliminando y/o intercambiando por lo menos un residuo de

aminoácido que ocurre en el GLP-1 natural y/o añadiendo por lo menos un residuo de aminoácido. El residuo de aminoácido añadido y/o intercambiado puede o bien consistir en residuos de aminoácidos codificables u otros residuos naturales o residuos de aminoácidos puramente sintéticos.

5 Tal como se emplea en este documento, la expresión “agonista de GLP(-1)” hace referencia a análogos de GLP(-1), que activan el receptor del péptido de tipo glucagón 1 (receptor de GLP-1). Los ejemplos de agonistas de GLP(-1) incluyen, aunque sin limitarse a ello, los siguientes: lixisenatida, exenatida / exendin-4, semaglutida, taspoglutida, albiglutida, dulaglutida.

10 La lixisenatida tiene la siguiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 98): His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-NH₂

La exenatida tiene la siguiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 99):

15 His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser- NH₂

Semaglutida – El aglutinante de albúmina acoplado a Lys(20) tiene la siguiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 100):

20 His-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys(AEEAc-AEEAc-γ-Glu-17-carboxiheptadecanoil)-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly

Dulaglutida (GLP1 (7-37) acoplada mediante un enlazador peptídico a un fragmento de fc) tiene la siguiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 101):

25 His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly

Tal como se emplea en este documento, el término “FGF-21” significa “factor de crecimiento de fibroblastos 21”. Los compuestos FGF-21 pueden ser FGF-21 humano, un análogo de FGF-21 (denominado “análogo de FGF-21”) o un derivado de FGF-21 (denominado “derivado de FGF-21”).

5 En algunas realizaciones, el ingrediente farmacéutico activo es un análogo de insulina. Los ejemplos de análogos de insulina incluyen, aunque sin limitarse a ello, los siguientes:

(i). ‘Insulina aspártica’ es insulina humana en la que el aminoácido B28 (es decir, el aminoácido núm. 28 en la cadena B de insulina humana), que es prolina, se reemplaza por ácido aspártico.

10 (ii). ‘Insulina lispro’ es insulina humana en la que los penúltimos residuos lisina y prolina en el extremo C-terminal de la cadena B se revierten (insulina humana: ProB28LysB29; insulina lispro: LysB28ProB29).

15 (iii). ‘Insulina glulisina’ difiere de la insulina humana en el sentido que el aminoácido asparagina en la posición B3 se reemplaza por lisina, y la lisina en la posición B29 se reemplaza por ácido glutámico.

(iv). “Insulina glargina” difiere de la insulina humana en el sentido que la asparagina en la posición A21 se reemplaza por glicina, y la cadena B es extendida en el extremo carboxi terminal por dos argininas.

20 Además, el análogo de insulina puede ser “Insulina detemir” que difiere de la insulina humana en el sentido que el aminoácido treonina en la posición B30 se elimina, y se acopla un residuo de ácido graso (ácido mirístico) a la función amino épsilon de la lisina en la posición B29. Alternativamente, el análogo de insulina puede ser ‘Insulina degludec’ que difiere de la insulina humana porque el aminoácido treonina en la posición B30 se elimina y se conjuga un ácido hexadecanodioico al aminoácido lisina B29 mediante un enlazador

25 gama-L-glutamilo. La insulina degludec es una insulina de acción prolongada.

En algunas realizaciones, el análogo de insulina es un análogo de insulina descrito en la sección A precedente. Las definiciones y explicaciones provistas anteriormente rigen en este sentido. En algunas realizaciones, el análogo de insulina comprendido por el conjugado es un análogo de insulina que comprende por lo menos una mutación relativa a la insulina original, en donde el análogo de insulina comprende una mutación en la posición B16 que se sustituye con un aminoácido hidrófobo, y/o una mutación en la posición B25 que se sustituye con un aminoácido hidrófobo. Como se describió anteriormente en la sección A, el análogo de insulina puede opcionalmente comprender otras mutaciones. Por ejemplo, el residuo de aminoácido en la posición 14 de la cadena A (A14) de la insulina original (tal como insulina humana) se puede sustituir con ácido glutámico, y el aminoácido en la posición 30 de la cadena B se puede eliminar, es decir, puede estar ausente (mutación desB30).

En algunas realizaciones, el análogo de insulina comprendido por el conjugado es Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-Insulina (tal como Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-insulina humana). La secuencia de este análogo se muestra, p. ej., en la Tabla 4 de la sección de Ejemplos (véase el Análogo 24). Por ejemplo, Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-Insulina comprende una cadena A que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 47 (GIVEQCCTSICSLEQLNYCN) y una cadena B que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 48 (FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFVYTPK).

En algunas realizaciones, el análogo de insulina comprendido por el conjugado es Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-Insulina (tal como Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-insulina humana). La secuencia de este análogo se muestra, p. ej., en la Tabla 4 de la sección de Ejemplos (véase el Análogo 22). Por ejemplo, Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-Insulina comprende una cadena A que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 43

(GIVEQCCTSICSLEQLNYCN) y una cadena B que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 44 (FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFIYTPK).

En algunas realizaciones, el análogo de insulina comprendido por el conjugado es Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-Insulina (tal como Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina humana). La secuencia de este análogo se muestra, p. ej., en la Tabla 1 de la sección de Ejemplos (véase el Análogo 39).

De acuerdo con una realización del conjugado, el ingrediente farmacéutico activo es insulina o un análogo de insulina, por ejemplo un análogo de insulina expuesto anteriormente (tal como Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-insulina humana, Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-insulina humana) o Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina humana), en donde el grupo amino del péptido, al que está covalentemente unida la sulfonamida de fórmula (I), es un grupo amino épsilon de una lisina presente en la insulina o el análogo de insulina, o es el grupo amino N-terminal de la cadena B de la insulina o el análogo de insulina. Por ejemplo, la insulina o el análogo de insulina tienen una lisina en la cadena A y/o en la cadena B. En algunas realizaciones, la insulina o el análogo de insulina tienen una lisina en la cadena A y en la cadena B.

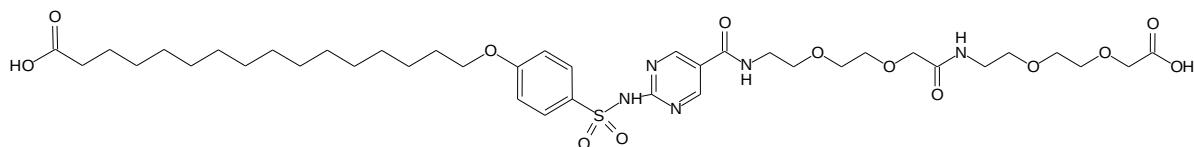
De acuerdo con una realización del conjugado, el grupo amino del péptido, al que está covalentemente unida la sulfonamida de fórmula (I), es un grupo amino épsilon de una lisina presente en la posición B26 a B29, por ejemplo B29, de la cadena B de la insulina humana o el análogo de insulina humana, por ejemplo del análogo de insulina humana.

En algunas realizaciones, en los análogos de insulina humana que se describen en la sección A anterior, está presente un solo residuo lisina. Por ejemplo, Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-insulina humana, Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-insulina humana y Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina humana tienen un residuo lisina en la posición B29. Dicho residuo lisina es el aminoácido terminal en el término C de la cadena

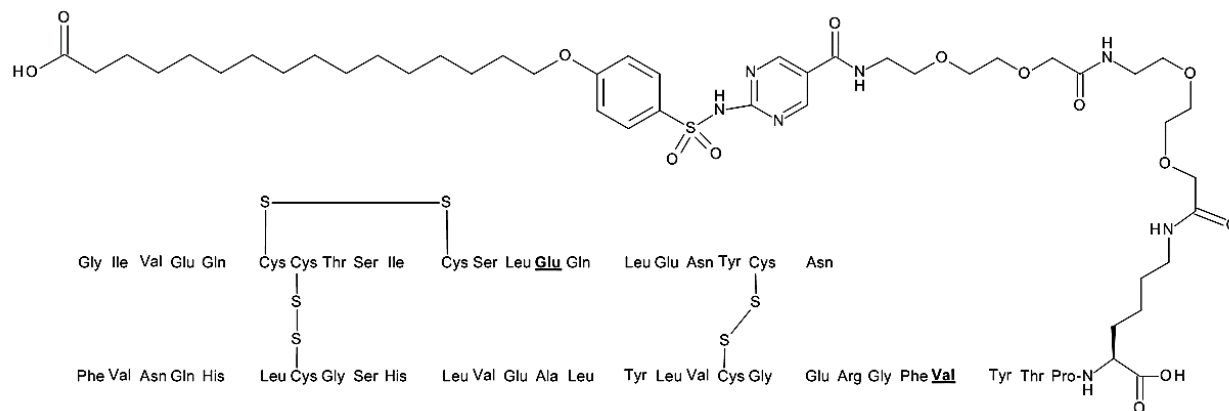
B, ya que el aminoácido en la posición B30 está ausente. En algunas realizaciones de los conjugados de la presente invención, la sulfonamida de fórmula (I) está covalentemente unida al grupo amino épsilon de dicho residuo lisina, típicamente a través de un enlace amida.

Los conjugados ilustrativos se muestran en las Fig. 5 a Fig. 8 y se describen en la sección de Ejemplos, p. ej., en el Ejemplo 10.

En algunas realizaciones del conjugado de la presente invención, el conjugado comprende Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-insulina humana (como análogo de insulina) y una sulfonamida de la siguiente fórmula (como aglutinante de albúmina):



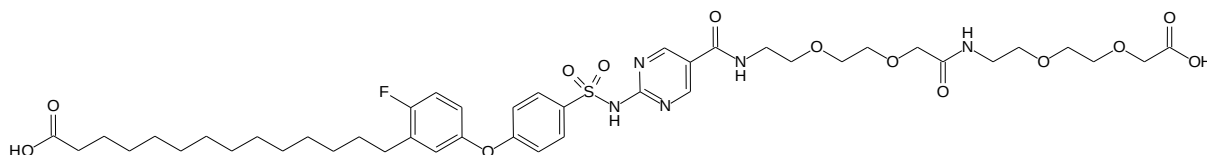
El conjugado expuesto arriba puede tener la siguiente estructura (véase también la Fig. 5, conjugado 1):



Las secuencias de la cadena A (SEQ ID NO: 47) y de la cadena B (SEQ ID NO: 48) se indican con un código de tres letras, excepto por el último aminoácido en la cadena B (lisina en la posición B29). Se muestra la estructura del residuo lisina. El residuo lisina está covalentemente unido al aglutinante (mediante el aminoácido épsilon del residuo lisina).

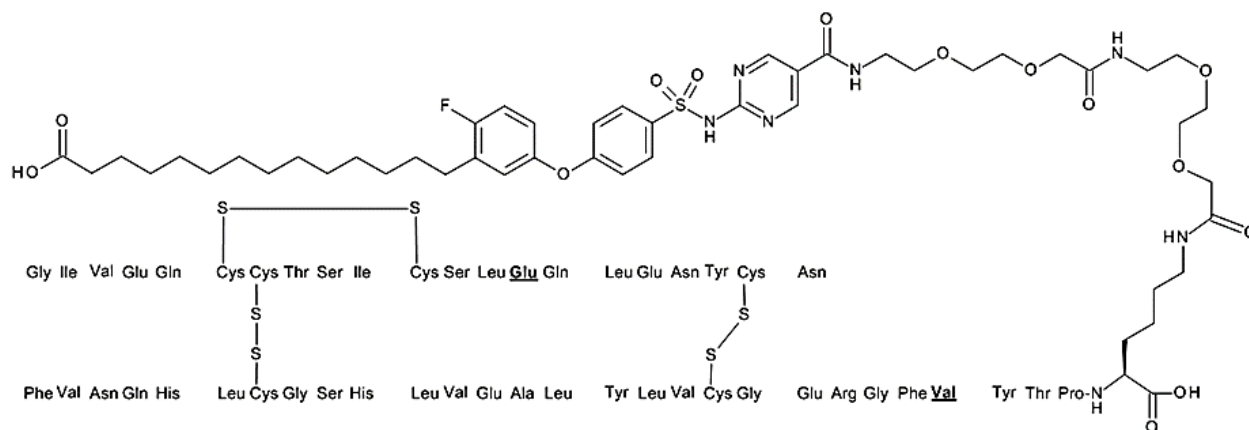
En algunas realizaciones del conjugado descrito en la presente invención, el conjugado comprende Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-insulina humana (como análogo de insulina) y una sulfonamida de la siguiente fórmula (como aglutinante de albúmina):

5



El conjugado expuesto arriba puede tener la siguiente estructura (véase también la Fig. 6, conjugado 2):

10



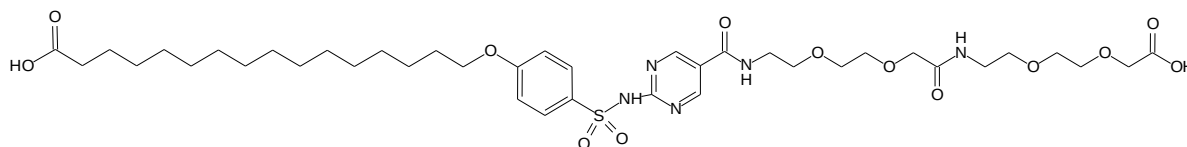
15

Las secuencias de la cadena A (SEQ ID NO: 47) y de la cadena B (SEQ ID NO: 48) se indican con el código de tres letras, excepto por el último aminoácido en la cadena B (Lisina en la posición B29). Se muestra la estructura del residuo lisina. El residuo lisina está covalentemente unido al aglutinante (vía el aminoácido épsilon del residuo lisina).

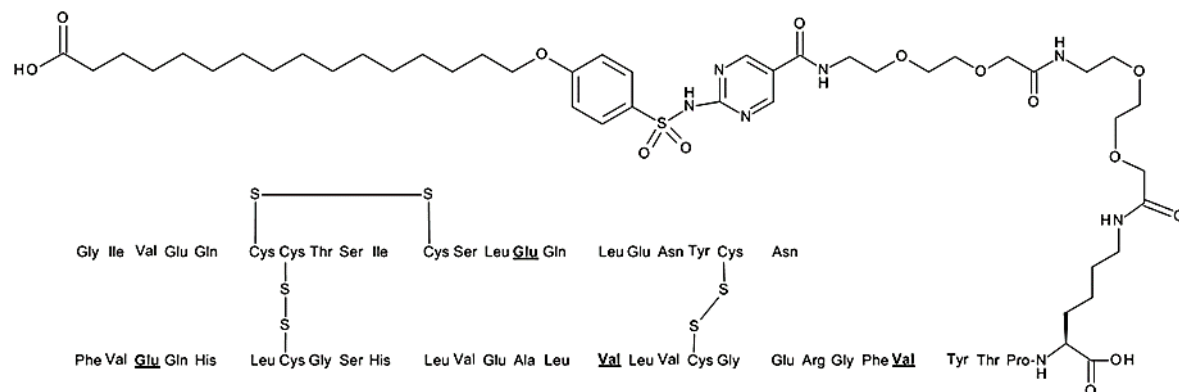
20

En algunas realizaciones del conjugado de la presente invención, el conjugado comprende Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina humana (como análogo de insulina) y una sulfonamida de la siguiente fórmula (como aglutinante de albúmina):

25

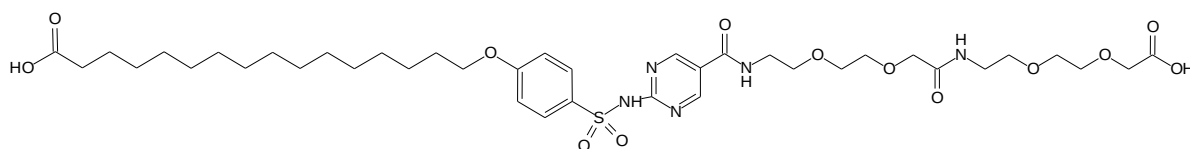


El conjugado expuesto arriba puede tener la siguiente estructura (véase también la Fig. 7, conjugado 3):

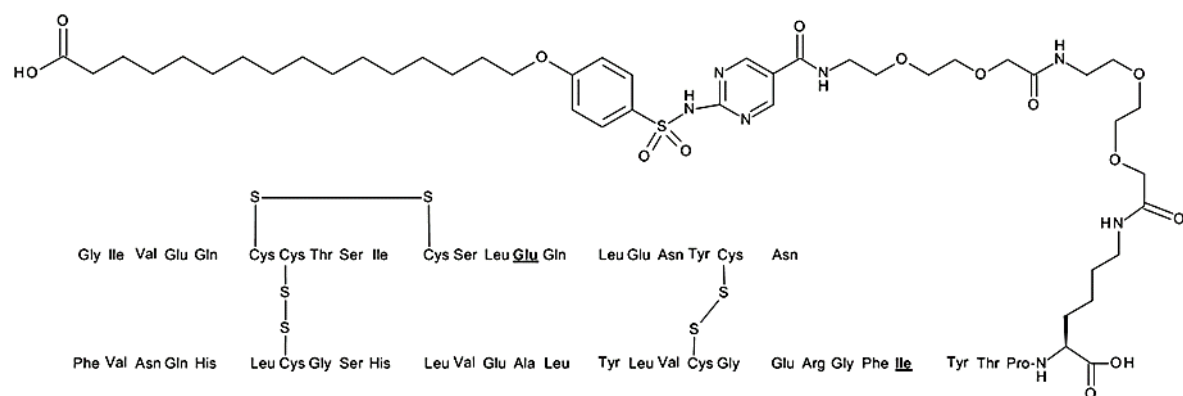


Las secuencias de la cadena A (SEQ ID NO: 77) y de la cadena B (SEQ ID NO: 78) se indican con el código de tres letras, excepto por el último aminoácido en la cadena B (lisina en la posición B29). Se muestra la estructura del residuo lisina. El residuo lisina está covalentemente unido al aglutinante (mediante el aminoácido épsilon del residuo lisina).

En algunas realizaciones de los conjugados de la presente invención, el conjugado comprende Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-insulina humana (como análogo de insulina) y una sulfonamida de la siguiente fórmula (como aglutinante de albúmina):



El conjugado expuesto arriba puede tener la siguiente estructura (véase también la Fig. 8, conjugado 4):



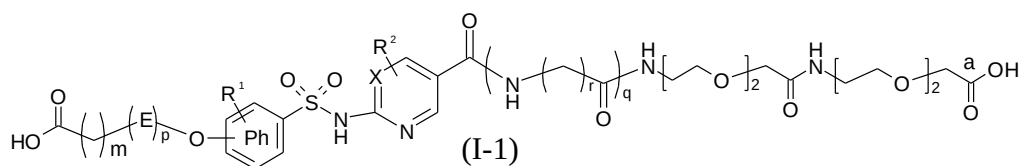
Las secuencias de la cadena A (SEQ ID NO: 43) y de la cadena B (SEQ ID NO: 44) se indican con el código de tres letras, excepto por el último aminoácido en la cadena B (lisina en la posición B29). Se muestra la estructura del residuo lisina. El residuo lisina está covalentemente unido al aglutinante (vía el grupo amino épsilon del residuo lisina).

Se describen también en este documento conjugados que comprenden un compuesto diagnóstico. En algunas realizaciones del conjugado, el compuesto diagnóstico es un agente de contraste, tal como un agente de contraste radiológico. En algunas realizaciones, el agente de contraste es agente de contraste para imágenes de resonancia magnética (RMN) basado en gadolinio o yodo. En algunas realizaciones, el agente de contraste es gadopentetato dimeglumina, gadoterato meglumina, gadobenato dimeglumina, gadoteridol, gadodiamida, gadoversetamida, gadoxetato disódico, amidotrizoato o una sal de amidotrizoato, por ejemplo una meglumina, sal de sodio y/o lisina de amidotrizoato, iohexol (5-[acetil(2,3-dihidroxiopropil)amino]-1-N,3-N-bis(2,3-dihidroxiopropil)-2,4,6-triyodo-benceno-1,3-dicarboxamida), iopamidol (1-N,3-N-bis(1,3-dihidroxiopropan-2-il)-5-[(2S)-2-hidroxiopropanoil]amino]-2,4,6-triidobenceno-1,3-dicarboxamida), iopromida (1-N,3-N-bis(2,3-dihidroxiopropil)-2,4,6-triyodo-5-[(2-metoxiacetil)amino]-3-N-metil-benceno-1,3-dicarboxamida) o ioxidanol (5-[acetil-[3-[acetil-[3,5-bis(2,3-dihidroxiopropilcarbamoil)-2,4,6-triyodo-fenil]amino]-2-hidroxi-propil]amino]-N,N'-bis(2,3-dihidroxiopropil)-2,4,6-triyodo-

benceno-1,3-dicarboxamida). En algunas realizaciones, el agente de contraste se selecciona del grupo que consiste en gadopentetato dimeglumina, gadoterato meglumina, gadobenato dimeglumina, gadoteridol, gadodiamida, gadoversetamida, gadoxetato disódico, amidotrizoato una sal de amidotrizoato, por ejemplo una meglumina, sal de sodio y/o lisina de amidotrizoato, iohexol (5-[acetil(2,3-dihidroxi-propil)amino]-1-N,3-N-bis(2,3-dihidroxi-propil)-2,4,6-tri-yodo-benceno-1,3-dicarboxamida), iopamidol (1-N,3-N-bis(1,3-dihidroxi-propan-2-il)-5-[(2S)-2-hidroxi-propanoil]amino]-2,4,6-triyodobenceno-1,3-dicarboxamida), iopromida (1-N,3-N-bis(2,3-dihidroxi-propil)-2,4,6-triyodo-5-[(2-metoxiacetil)amino]-3-N-metil-benceno-1,3-dicarboxamida) o ioxidanol (5-[acetil-[3-[acetil-[3,5-bis(2,3-dihidroxi-propilcarbamoil)-2,4,6-triyodo-fenil]amino]-2-hidroxi-propil]amino]-N,N'-bis(2,3-dihidroxi-propil)-2,4,6-triyodo-benceno-1,3-dicarboxamida).

Como se analizó anteriormente, la sulfonamida de fórmula (I) está covalentemente unida al compuesto diagnóstico en el sentido que el grupo carboxi terminal “a” de la sulfonamida de fórmula (I) está covalentemente unido a un grupo funcional adecuado del compuesto diagnóstico. El grupo funcional adecuado puede ser, por ejemplo, un grupo amino (primario o secundario) o un grupo hidroxilo del compuesto diagnóstico.

De acuerdo con una realización del conjugado, la sulfonamida tiene la fórmula (I-1)



en donde:

E representa un grupo $-C_6H_3R-$ en donde R es un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno, en donde el átomo de halógeno se selecciona del grupo que consiste en un átomo de flúor, cloro, bromo y yodo y es por ejemplo un átomo de flúor;

X representa un átomo de nitrógeno o un grupo $-CH-$;

p es cero o 1;

q es cero o 1;

r es un número entero en el intervalo de 1 a 6;

R^1 representa por lo menos un residuo seleccionado del grupo de átomo de hidrógeno y átomo de halógeno, en donde el átomo de halógeno es por ejemplo un átomo de flúor o cloro;

R^2 representa por lo menos un residuo seleccionado del grupo de átomo de hidrógeno, grupo alquilo C1 a C3 y grupo alquilo C1 a C3 halogenado, en donde el grupo alquilo C1 a C3 es por ejemplo un grupo metilo y el grupo alquilo C1 a C3 halogenado es por ejemplo perhalogenado, tal como un grupo trifluorometilo;

en donde m es un número entero en el intervalo de 5 a 15 si p es cero, o m es un número entero en el intervalo de 7 a 15 si p es 1.

En una realización del conjugado, los residuos R^1 y R^2 de la sulfonamida son átomos de hidrógeno.

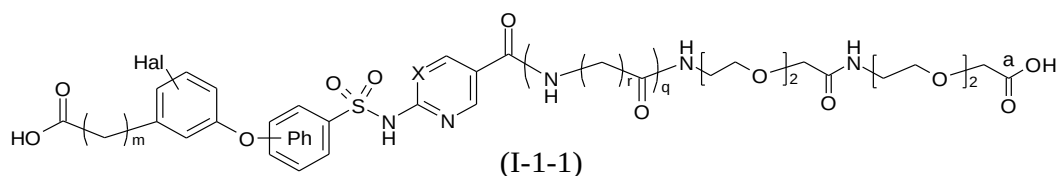
En una realización del conjugado, el residuo X de la sulfonamida representa un átomo de nitrógeno.

De acuerdo con otra realización del conjugado, el grupo $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-(\text{O})_s-(\text{E})_p-(\text{CH}_2)_n-(\text{A})_t-$ de fórmula (I) o el grupo $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-(\text{E})_p-\text{O}-$ de fórmula (I-1) de la sulfonamida está situado en la posición meta o para en el anillo fenilo Ph con respecto al grupo $-\text{S}(\text{O})_2-$.

De acuerdo con otra realización del conjugado, si p es 1, el grupo $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-(\text{O})_s-$ y el grupo $-(\text{CH}_2)_n-(\text{A})_t-$ están situados en la posición meta o para en $(\text{E})_p$ de fórmula (I) de la sulfonamida o el grupo $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-$ y $-\text{O}-$ están situados en la posición meta o para en $(\text{E})_p$ de fórmula (I-1).

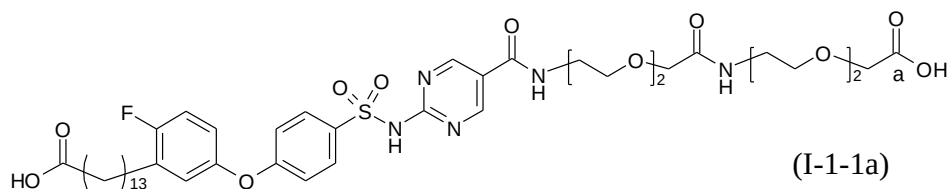
De acuerdo con otra realización del conjugado, el índice q de la sulfonamida es cero.

De acuerdo con otra realización del conjugado, la sulfonamida tiene la fórmula (I-1-1)

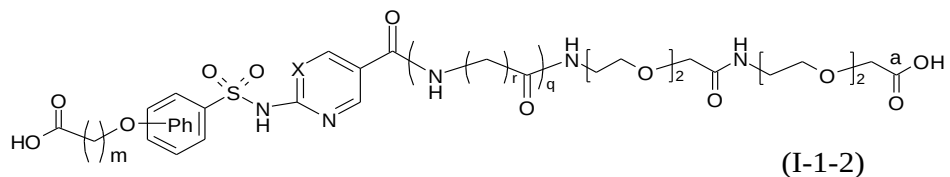


en donde X es un átomo de nitrógeno o un grupo-CH-, por ejemplo un átomo de nitrógeno;
 m es un número entero en el intervalo de 7 a 15; r es un número entero en el intervalo de 1
 a 6; q es cero o 1, por ejemplo cero; Hal es un átomo de halógeno seleccionado del grupo
 que consiste en un átomo de flúor, cloro, bromo y yodo, por ejemplo un átomo de flúor; y el
 grupo $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-\text{C}_6\text{H}_3\text{Hal}-\text{O}-$ está situado en la posición meta o para en el anillo fenilo
 Ph con respecto al grupo $-\text{S}(\text{O})_2-$.

De acuerdo con una realización del conjugado, la sulfonamida tiene la fórmula (I-1-1a)

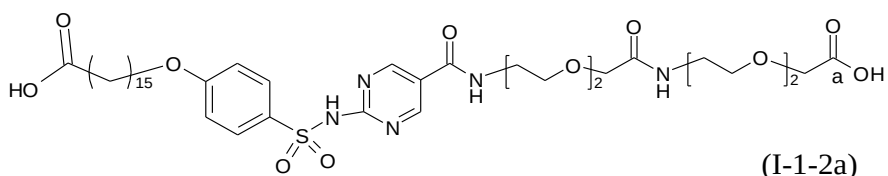


De acuerdo con otra realización del conjugado, la sulfonamida tiene la fórmula (I-1-2)



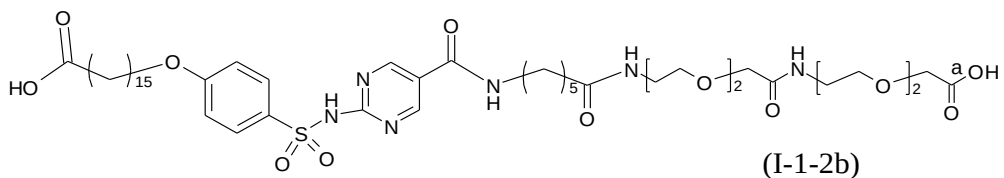
en donde X es un átomo de nitrógeno o un grupo-CH-, por ejemplo un átomo de nitrógeno;
 m es un número entero en el intervalo de 5 a 15; r es un número entero en el intervalo de 1
 a 6; q es cero o 1, por ejemplo cero; y el grupo $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-\text{O}-$ está situado en la posición
 meta o para en el anillo fenilo Ph con respecto al grupo $-\text{S}(\text{O})_2-$.

De acuerdo con una realización del conjugado, la sulfonamida tiene la fórmula (I-1-2a)



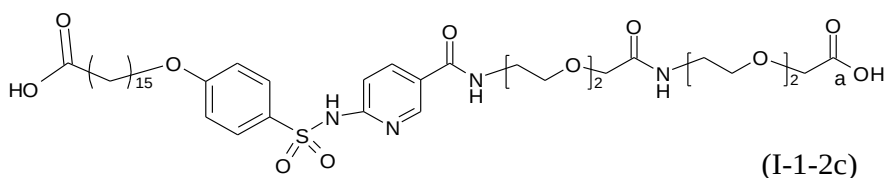
o la fórmula (I-1-2b)

5



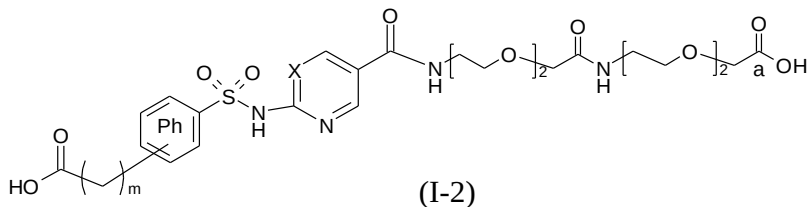
o la fórmula (I-1-2c)

10



De acuerdo con otra realización del conjugado, la sulfonamida tiene la fórmula (I-2)

15



en donde

X representa un átomo de nitrógeno o un grupo -CH-; y

m es un número entero en el intervalo de 5 a 17, por ejemplo en el intervalo de 11 a

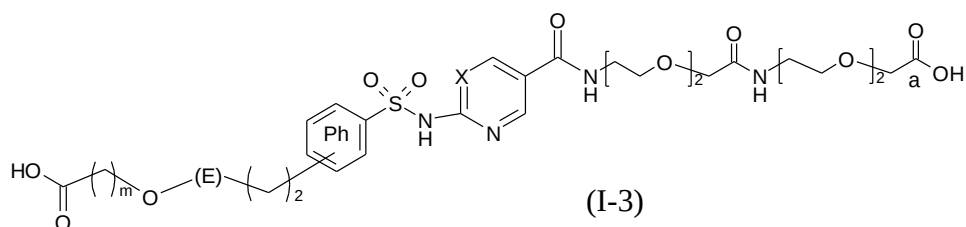
20

17.

De acuerdo con una realización del conjugado, el grupo $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m$ - de la sulfonamida de fórmula (I-2) está situado en la posición meta o para en el anillo fenilo Ph con respecto al grupo $-\text{S}(\text{O})_2-$.

De acuerdo con otra realización del conjugado, la sulfonamida tiene la fórmula (I-3)

25



en donde

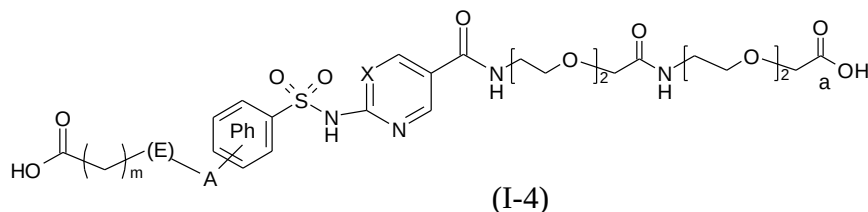
E representa un grupo $-C_6H_3R-$ en donde R es un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno, en donde el átomo de halógeno se selecciona del grupo que consiste en un átomo de flúor, cloro, bromo y yodo;

X representa un átomo de nitrógeno o un grupo $-CH-$;

m es un número entero en el intervalo de 5 a 17, por ejemplo 11.

De acuerdo con una realización del conjugado, el grupo $HOOC-(CH_2)_m-O-$ y el grupo $-(CH_2)_2-$ de la sulfonamida de fórmula (I-3) están situados en la posición para en (E) de fórmula (I-3) y el grupo $HOOC-(CH_2)_m-O-(E)-(CH_2)_2-$ está situado en la posición para en el anillo fenilo Ph con respecto al grupo $-S(O)_2-$.

De acuerdo con otra realización del conjugado, la sulfonamida tiene la fórmula (I-4)



en donde

A es un grupo OCH_2- o un grupo $-CH_2O-$;

E representa un grupo $-C_6H_3R-$ en donde R es un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno, en donde el átomo de halógeno se selecciona del grupo que consiste en un átomo de flúor, cloro, bromo y yodo;

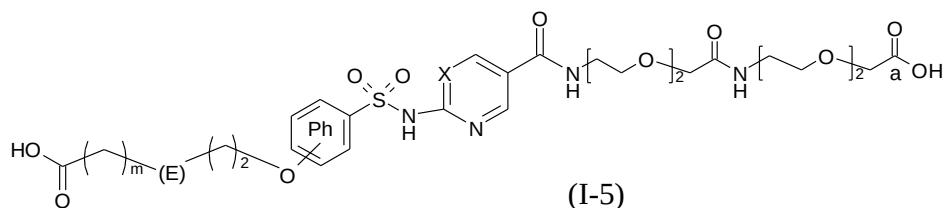
X representa un átomo de nitrógeno o un grupo $-CH-$;

m es un número entero en el intervalo de 5 a 17, por ejemplo en el intervalo de 9 a 13.

De acuerdo con una realización del conjugado, el grupo $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m$ - y el grupo -A- de la sulfonamida de fórmula (I-4) están situados en la posición para en (E) de fórmula (I-4) y el grupo-A- está situado en la posición para en el anillo fenilo Ph con respecto al grupo $-\text{S}(\text{O})_2-$.

De acuerdo con otra realización del conjugado, la sulfonamida tiene la fórmula (I-5)

5



en donde

10

E representa un grupo $-\text{C}_6\text{H}_3\text{R}-$ en donde R es un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno, en donde el átomo de halógeno se selecciona del grupo que consiste en un átomo de flúor, cloro, bromo y yodo;

X representa un átomo de nitrógeno o un grupo $-\text{CH}-$;

m es un número entero en el intervalo de 5 a 17, por ejemplo en el intervalo de 7 a 9.

15

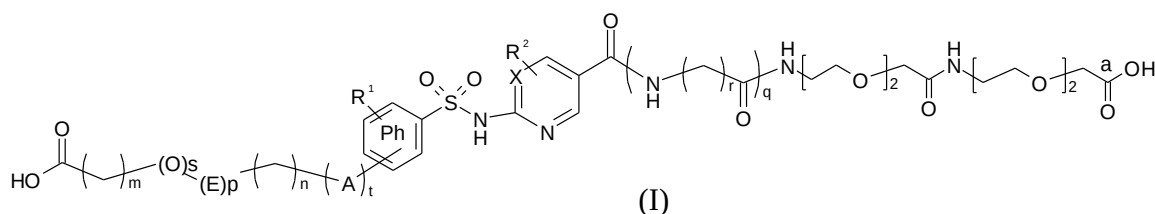
De acuerdo con una realización del conjugado, el grupo $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m$ y el grupo $-(\text{CH}_2)_2$ - de la sulfonamida de fórmula (I-5) están situados en la posición para en (E) de fórmula (I-5) y el grupo $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m$ (E)- $(\text{CH}_2)_2$ -O- está situado en la posición para en el anillo fenilo Ph con respecto al grupo $-\text{S}(\text{O})_2-$.

Procedimiento para preparar un conjugado

20

Se describen en la presente invención procedimientos para preparar un conjugado como se describió en la sección C anterior. Por consiguiente, se proveen en este documento procedimientos para preparar un conjugado que comprende una sulfonamida de fórmula (I) y un ingrediente farmacéutico activo

25



en donde la sulfonamida de fórmula (I):

A se selecciona del grupo que consiste en átomo de oxígeno, grupo $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, -grupo OCH_2- y grupo $-\text{CH}_2\text{O}-$;

E representa un grupo $-\text{C}_6\text{H}_3\text{R}-$ en donde el grupo R es un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno, en donde el átomo de halógeno se selecciona del grupo que consiste en un átomo de flúor, cloro, bromo y yodo;

X representa un átomo de nitrógeno o un grupo $-\text{CH}-$;

m es un número entero en el intervalo de 5 a 17;

n es cero o un número entero en el intervalo de 1 a 3;

p es cero o 1;

q es cero o 1;

r es un número entero en el intervalo de 1 a 6;

s es cero o 1;

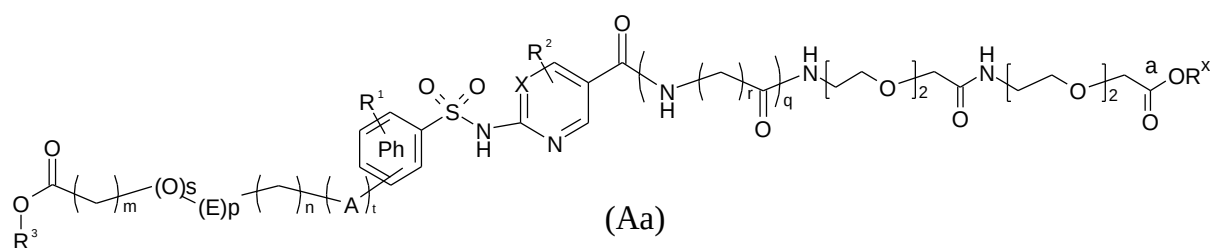
t es cero o 1;

R^1 representa por lo menos un residuo seleccionado del grupo de átomo de hidrógeno, átomo de halógeno, grupo alquilo C1 a C3 y un grupo alquilo C1 a C3 halogenado;

R^2 representa por lo menos un residuo seleccionado del grupo de átomo de hidrógeno, átomo de halógeno, grupo alquilo C1 a C3 y un grupo alquilo C1 a C3 halogenado;

en donde la sulfonamida de fórmula (I) está covalentemente unida al ingrediente farmacéutico activo en el sentido de que el grupo carboxi terminal "a" de la sulfonamida de fórmula (I) está covalentemente unido a un grupo amino del ingrediente farmacéutico activo;

(a) proporcionar una sulfonamida de fórmula (Aa)



5 en donde X, Y, A, E, R¹, R² y los índices m, n, p, q, r, s, t tienen el significado definido anteriormente con respecto a la fórmula (I), R^x es un átomo de hidrógeno o un grupo de activación, opcionalmente un grupo de activación seleccionado del grupo que consiste en 7-azabenzotriazol (opcionalmente derivado de HATU o HBTU), 4-nitro benceno y grupo N-succinimidilo, en donde R^x es opcionalmente un grupo N-succinimidilo,

10

y R³ es un grupo protector o un átomo de hidrógeno, opcionalmente un átomo de hidrógeno; y un ingrediente farmacéutico activo que tiene un término C protegido o desprotegido;

(b) someter a reacción la sulfonamida de fórmula (Aa) y el ingrediente farmacéutico activo que tiene un término C protegido o desprotegido bajo condiciones adecuadas para formar un enlace amida entre el grupo carboxi libre o activado, opcionalmente activado "a" de la sulfonamida de fórmula (Aa) y un grupo amino del ingrediente farmacéutico activo que tiene un término C protegido o desprotegido;

15

(c) opcionalmente quitar uno o ambos grupos de protección, por ejemplo quitar ambos grupos protectores.

20

En algunas realizaciones del procedimiento, la combinación en donde s es 1, p es cero, n es cero, A es un átomo de oxígeno y t es 1, se excluye para la sulfonamida de fórmula (I) así como también para la sulfonamida de fórmula (Aa). En algunas realizaciones, s es cero para la sulfonamida de fórmula (I) así como también para la sulfonamida de fórmula (Aa),

en donde los residuos e índices restantes tienen el significado expuesto anteriormente para las fórmulas (I) y (Aa) respectivamente.

Es también posible preparar un conjugado como se describió en la sección C anterior, mediante un procedimiento que comprende:

- 5 a) Proporcionar una sulfonamida de fórmula (Aa) en donde R^x representa un grupo de activación (R^x = grupo de activación);
- b) Proporcionar una disolución acuosa de un ingrediente farmacéutico activo, en donde la disolución acuosa opcionalmente comprende un alcohol;
- 10 c) Poner en contacto la disolución acuosa de b) con la sulfonamida de fórmula (Aa) (R^x = grupo de activación) de a); y
- d) Someter a reacción la sulfonamida de fórmula (Aa) con el ingrediente farmacéutico activo, obteniendo una disolución que comprende el conjugado de la sulfonamida y el ingrediente farmacéutico activo, en donde la sulfonamida está covalentemente unida al ingrediente farmacéutico activo.

15 En este procedimiento, el ingrediente farmacéutico activo es opcionalmente un polipéptido de insulina que tiene un grupo amino libre, opcionalmente un análogo de insulina como en la Sección A anterior o su precursor, en donde cada uno tiene un grupo amino libre, en donde el precursor del análogo de insulina comprende un péptido enlazador adicional que tiene una longitud de por lo menos dos aminoácidos, o una longitud en el intervalo de 2 a

20 30 aminoácidos, o una longitud en el intervalo de 4 a 9 aminoácidos. En este procedimiento, la disolución acuosa provista en a) tiene un valor de pH en el intervalo de 9 a 12, o en el intervalo de 9,5 a 11,5, o en el intervalo de 10 a 11, en donde el valor de pH se determina con un electrodo de vidrio sensible al pH de acuerdo con la norma ASTM E 70:2007; en donde el valor de pH se ajusta opcionalmente en el intervalo respectivo por adición de una

25 base, o una base seleccionada del grupo que consiste en hidróxidos alcalinos (hidróxido de

litio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio), alquilaminas y mezclas de dos o más de estos; o se selecciona del grupo de alquilaminas terciarias $N(\text{alquilo C1-C5})_3$, alquilaminas primarias $H_2N-C(\text{alquilo C1-C5})_3$ y de dos o más de éstas, en donde los grupos alquilo C1-C5 de las aminas terciarias y de las aminas primarias se seleccionan cada uno en forma independiente entre grupos alquilo C1-C5 ramificados o lineales y en donde cada grupo alquilo C1-C5 tiene por lo menos un sustituyente seleccionado del grupo de átomo de hidrógeno, grupo hidroxilo y grupo carboxilo; o del grupo de alquilaminas terciarias $N(\text{alquilo C1-C3})_3$, alquilaminas primarias $H_2N-C(\text{alquilo C1-C3})_3$ y mezclas de dos o más de éstas, en donde los grupos alquilo C1-C3 de las aminas terciarias y de las aminas primarias se seleccionan cada uno en forma independiente entre grupos alquilo C1-C3 lineales o ramificados y en donde cada grupo alquilo C1-C3 tiene por lo menos un sustituyente seleccionado del grupo de átomo de hidrógeno, grupo hidroxilo y grupo carboxilo; o seleccionado del grupo de bicina, trimetilamina, tris(hidroximetil)-amino-metano y mezclas de dos o más de estos; en donde la base opcionalmente comprende por lo menos trietilamina.

En una variante de este procedimiento, el contacto de la disolución acuosa de b) con la sulfonamida de fórmula (Aa) (R^x = grupo de activación) de a) de acuerdo con la etapa c) se realiza añadiendo la sulfonamida de fórmula (Aa) (R^x = grupo de activación) de a) como una disolución de la sulfonamida de fórmula (Aa) (R^x = grupo de activación) a la disolución acuosa de b), en donde la disolución de la sulfonamida de fórmula (Aa) (R^x = grupo de activación) es opcionalmente una disolución orgánica, opcionalmente una disolución que comprende la sulfonamida de fórmula (Aa) (R^x = grupo de activación) y un disolvente orgánico aprótico polar, opcionalmente un disolvente orgánico aprótico polar que tiene un coeficiente de reparto octanol-agua (K_{ow}) en el intervalo de 1 a 5, o en el intervalo de 2 a 4 en condiciones estándar (T: 20-25 °C, p: 1013 mbar); o se selecciona del grupo que consiste

en tetrahidrofurano, acetonitrilo, dimetilformamida, y mezclas de dos o más de éstos; o se selecciona del grupo de tetrahidrofurano, acetonitrilo y mezclas de tetrahidrofurano y acetonitrilo.

En una variante de este procedimiento, poner en contacto la disolución acuosa de b) con la sulfonamida de fórmula (Aa) (R^x = grupo de activación) de a) de acuerdo con la etapa c) se realiza añadiendo la sulfonamida de fórmula (Aa) (R^x = grupo de activación) de a) en forma sólida a la disolución acuosa de b), o por lo menos parcialmente en forma cristalina, o por lo menos 90 % en peso en forma cristalina.

En este procedimiento, la etapa d) opcionalmente comprende: d.1) Someter a reacción la sulfonamida de fórmula (Aa) (R^x = grupo de activación) con un precursor del análogo de insulina a pH en el intervalo de 9 a 12, o en el intervalo de 9,5 a 11,5, o en el intervalo de 10 a 11, obteniendo un pre-conjugado que comprende la sulfonamida de fórmula (I) y el precursor del análogo de insulina, en donde la sulfonamida de fórmula (I) está covalentemente unida al precursor del análogo de insulina por un enlace amida $C(=O)-NH$ - formado entre el $-C(=O)-O(R)$ de la sulfonamida de Fórmula (I) y el grupo amino del precursor del análogo de insulina; d.2) Digestión enzimática, opcionalmente a un pH en el intervalo inferior a 9, o a un pH en el intervalo de 7 a 9, del precursor del análogo de insulina del pre-conjugado obtenido de acuerdo con d.1), obteniendo una disolución que comprende el conjugado de la sulfonamida de fórmula (I) y el análogo de insulina. El procedimiento opcionalmente también comprende: e) Aislar el conjugado de la sulfonamida de fórmula (I) y el análogo de insulina de la disolución obtenida en d) o d.2).

En este procedimiento, el grupo de activación R^x de la sulfonamida de fórmula (Aa) se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en 7-azabenzotriazol (opcionalmente derivado de HATU o HBTU), 4-nitro benceno y grupo N-succinimidilo, en donde R^x es más opcionalmente un grupo N-succinimidilo.

En una variante de este procedimiento, la disolución acuosa del precursor del análogo de insulina de acuerdo con b) comprende un alcohol que se selecciona del grupo que consiste en monoalcoholes C1-C4 y mezclas de dos o más de éstos, o del grupo que consiste en metanol, etanol, propan-2-ol, propan-1-ol, butan-1-ol y mezclas de dos o más de estos, o del grupo que consiste en etanol, propan-2-ol, propan-1-ol, y mezclas de dos o más de éstos. Opcionalmente, el alcohol está presente en la disolución acuosa en una cantidad en el intervalo de 0,0001 a 35 % en volumen, o en el intervalo de 0,001 a 30% en volumen, o en el intervalo de 0,01 a 25% en volumen, o en el intervalo de 0,1 a 20% en volumen, cada uno en base al volumen total de agua y alcohol. En este procedimiento, la digestión enzimática de acuerdo con d.2) comprende el uso de por lo menos una enzima seleccionada del grupo que consiste en tripsina, una TEV proteasa (proteasa del virus del grabado del tabaco) y mezclas de dos o más éstas. En este procedimiento, el análogo de insulina es un análogo de insulina descrito en la sección A anterior y/o aquí en la Sección C anterior. En este procedimiento, la sulfonamida de fórmula (I) se une covalentemente al análogo de insulina y a su precursor respectivamente mediante un enlace amida C(=O)-NH- formado entre C(=O)-O(R³) de la sulfonamida de fórmula (I) y el grupo amino libre del análogo de insulina y su precursor respectivamente, en donde el grupo amino libre del análogo de insulina y su precursor respectivamente es opcionalmente el grupo amino de una lisina comprendida en el análogo de insulina y su precursor respectivamente, opcionalmente una lisina terminal, opcionalmente una lisina presente en el término C del análogo de insulina y su precursor respectivamente, opcionalmente una lisina presente en el término C de la cadena B.

Se dan a conocer en este documento procedimientos para preparar un conjugado que comprende una sulfonamida de fórmula (I) y un compuesto diagnóstico, en donde el compuesto diagnóstico está covalentemente unido con un grupo funcional adecuado a un

grupo carboxi activado, opcionalmente activado “a” de la sulfonamida de fórmula (Aa) de acuerdo con el método anteriormente descrito para el enlace con el ingrediente farmacéutico activo.

Se dan a conocer en este documento conjugados que comprenden una sulfonamida de fórmula (I) y un ingrediente farmacéutico activo o un compuesto diagnóstico obtenido u obtenible de los procedimientos anteriormente descritos.

Se dan a conocer en este documento composiciones farmacéuticas que comprenden, en una cantidad eficaz desde el punto de vista farmacéutico o diagnóstico, el conjugado que comprende una sulfonamida de fórmula (I) y un ingrediente farmacéutico activo o un compuesto diagnóstico como se describió anteriormente.

Se dan a conocer en este documento conjugados que comprenden una sulfonamida de fórmula (I) y un ingrediente farmacéutico activo como se describió anteriormente para uso como medicamento.

Una realización se refiere al conjugado que comprende una sulfonamida de fórmula (I) y un ingrediente farmacéutico activo como se describió anteriormente para uso como medicamento para el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en diabetes gestacional, diabetes mellitus de tipo 1, diabetes mellitus de tipo 2 e hiperglucemia y/o para reducir los niveles de glucosa en la sangre. En algunas realizaciones, la enfermedad es diabetes mellitus de tipo 2.

Se dan a conocer en este documento métodos para tratar a un paciente que padece una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en diabetes gestacional, diabetes mellitus de tipo 1, diabetes mellitus de tipo 2 e hiperglucemia y/o que necesita reducir los niveles de glucosa en la sangre; que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado que comprende una sulfonamida de fórmula (I) y un ingrediente farmacéutico activo como el anteriormente descrito.

Se dan a conocer en este documento usos del conjugado que comprende una sulfonamida de fórmula (I) y un ingrediente farmacéutico activo como se describió anteriormente para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en diabetes gestacional, diabetes mellitus de tipo 1, diabetes mellitus de tipo 2 e hiperglucemia y/o para reducir los niveles de glucosa sanguínea.

Se dan a conocer en este documento conjugados que comprenden una sulfonamida de fórmula (I) y un compuesto diagnóstico descrito anteriormente para uso como agente diagnóstico.

Se dan a conocer en este documento métodos para diagnosticar una enfermedad, por ejemplo una enfermedad seleccionada del grupo de enfermedades cardiovasculares y cáncer, en un paciente o para determinar el riesgo de un paciente de desarrollar una enfermedad, por ejemplo una enfermedad seleccionada del grupo de enfermedades cardiovasculares y cáncer, que comprenden administrar una cantidad eficaz desde el punto de vista diagnóstico del conjugado que comprende una sulfonamida de fórmula (I) y un compuesto diagnóstico anteriormente descrito.

Se dan a conocer en este documento usos del conjugado que comprende una sulfonamida de fórmula (I) y un compuesto diagnóstico anteriormente descrito para la elaboración de un agente diagnóstico para diagnosticar una enfermedad, por ejemplo, una enfermedad seleccionada del grupo de enfermedades cardiovasculares y cáncer.

Las composiciones, composiciones farmacéuticas y usos descritos en la sección C se ilustran en más detalle mediante las siguientes realizaciones y combinaciones de realizaciones como se indica con las respectivas dependencias y referencias originales. Las definiciones y explicaciones anteriormente expuestas en las secciones A, B y C rigen *mutatis mutandis* para las siguientes realizaciones.

5



A se selecciona del grupo que consiste en un átomo de oxígeno, grupo -CH₂CH₂-, grupo -OCH₂- y grupo -CH₂O-;

E representa un grupo -C₆H₃R- en donde R es un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno, en donde el átomo de halógeno se selecciona del grupo que consiste en un átomo de flúor, cloro, bromo y yodo;

X representa un átomo de nitrógeno o un grupo -CH-;

m es un número entero en el intervalo de 5 a 17;

n es cero o un número entero en el intervalo de 1 a 3;

p es cero o 1;

q es cero o 1;

r es un número entero en el intervalo de 1 a 6;

s es cero o 1;

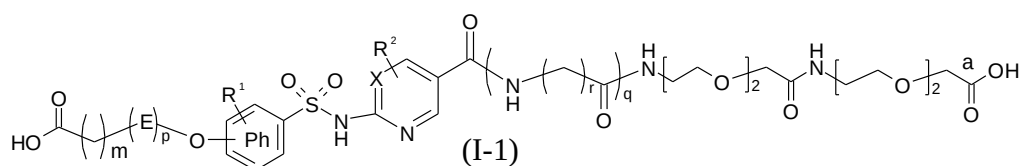
t es cero o 1;

R¹ representa por lo menos un residuo seleccionado del grupo de átomo de hidrógeno, átomo de halógeno, grupo alquilo C1 a C3 y grupo alquilo C1 a C3 halogenado;

R^2 representa por lo menos un residuo seleccionado del grupo de átomo de hidrógeno, átomo de halógeno, grupo alquilo C1 a C3 y grupo alquilo C1 a C3 halogenado

en donde la sulfonamida de fórmula (I) está covalentemente unida al análogo de insulina dado que el grupo carboxi terminal "a" de la sulfonamida de fórmula (I) está covalentemente unido a un grupo amino del análogo de insulina.

2. El conjugado de acuerdo con la realización 1, en donde la sulfonamida tiene la fórmula (I-1)



en donde:

E representa un grupo $-C_6H_3R-$ en donde R es un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno, en donde el átomo de halógeno se selecciona del grupo que consiste en un átomo de flúor, cloro, bromo y yodo;

X representa un átomo de nitrógeno o un grupo $-CH-$;

p es cero o 1;

q es cero o 1;

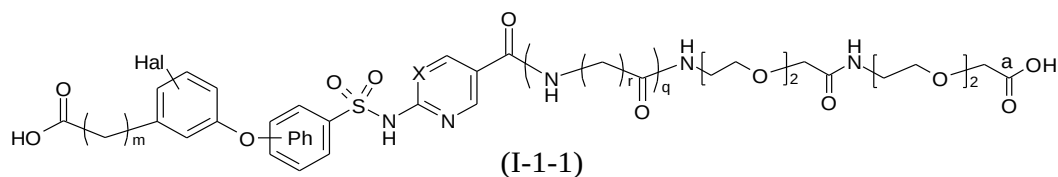
r es un número entero en el intervalo de 1 a 6;

R^1 representa por lo menos un residuo seleccionado del grupo de átomo de hidrógeno y átomo de halógeno;

R^2 representa por lo menos un residuo seleccionado del grupo de átomo de hidrógeno, grupo alquilo C1 a C3 y grupo alquilo C1 a C3 halogenado;

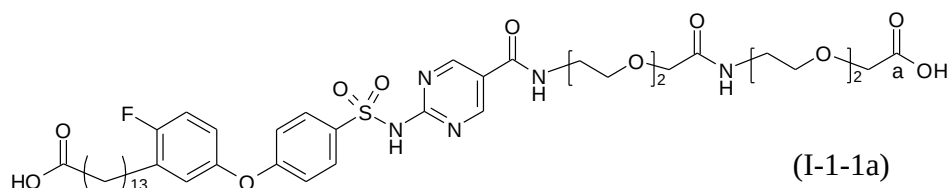
en donde m es un número entero en el intervalo de 5 a 15 si p es cero, o m es un número entero en el intervalo de 7 a 15 si p es 1.

3. El conjugado de acuerdo con la realización 1 o 2, en donde la sulfonamida tiene la fórmula (I-1-1)

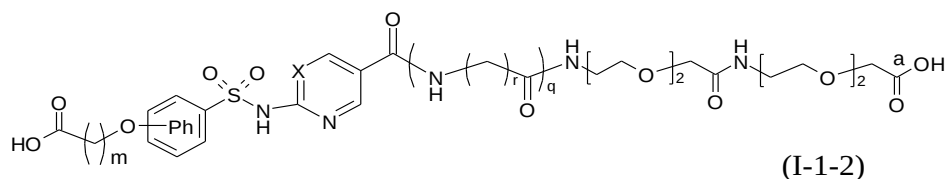


en donde X es un átomo de nitrógeno o un grupo-CH-; m es un número entero en el intervalo de 7 a 15; r es un número entero en el intervalo de 1 a 6; q es cero o 1; Hal es un átomo de halógeno seleccionado del grupo que consiste en un átomo de flúor, cloro, bromo y yodo; y el grupo HOOC-(CH₂)_m-C₆H₃Hal-O- está situado en la posición meta o para en el anillo fenilo Ph con respecto al grupo -S(O)₂-.

4. El conjugado de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 3, en donde la sulfonamida tiene la fórmula (I-1-1a)



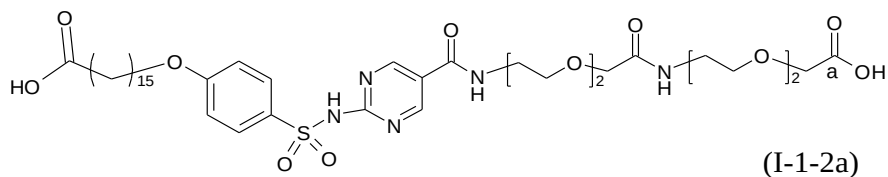
5. El conjugado de acuerdo con la realización 1 o 2, en donde la sulfonamida tiene la fórmula (I-1-2)



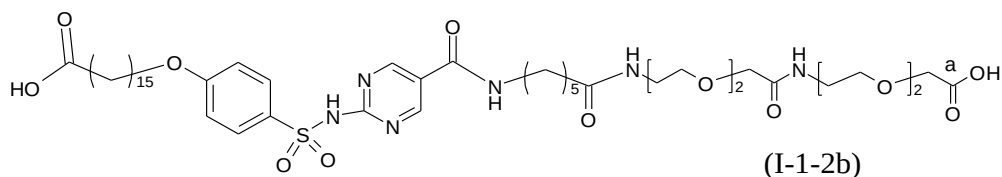
en donde X es un átomo de nitrógeno o un grupo -CH-; m es un número entero en el intervalo de 5 a 15; r es un número entero en el intervalo de 1 a 6; q es cero o 1; y el grupo HOOC-(CH₂)_m-O- está situado en la posición meta o para en el anillo fenilo Ph con respecto al grupo -S(O)₂-.

25

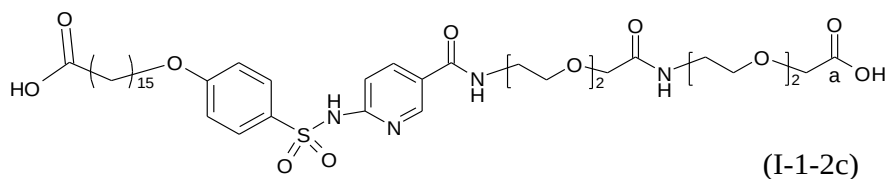
6. El conjugado de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 2 o 5, en donde la sulfonamida tiene la fórmula (I-1-2a)



o la fórmula (I-1-2b)



o la fórmula (I-1-2c)



7. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 6, en donde el análogo de insulina comprende por lo menos una mutación relativa a la insulina original, en donde el análogo de insulina comprende una mutación en la posición B16 que se sustituye con un aminoácido hidrófobo y/o una mutación en la posición B25 que se sustituye con un aminoácido hidrófobo, y opcionalmente, en donde dicho análogo de insulina comprende además una mutación en la posición A14 que se sustituye con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico (Glu), ácido aspártico (Asp) e histidina (His) y/o una mutación en la posición B30.
8. El conjugado de acuerdo con la realización 7, en donde la insulina original es insulina humana, insulina porcina o insulina bovina.

9. El conjugado de acuerdo con las realizaciones 7 y 8, en donde el aminoácido hidrófobo es un aminoácido ramificado, tal como un aminoácido ramificado seleccionado del grupo que consiste en valina (Val), isoleucina (Ile) y leucina (Leu).

10. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 9, en donde el análogo de insulina se selecciona entre

Leu(B16)-insulina humana,

Val(B16)-insulina humana,

Ile(B16)-insulina humana,

Leu(B16)Des(B30)-insulina humana,

Val(B16)Des(B30)-insulina humana,

Ile(B16)Des(B30)-insulina humana,

Leu(B25)-insulina humana,

Val(B25)-insulina humana,

Ile(B25)-insulina humana,

Leu(B25)Des(B30)-insulina humana,

Val(B25)Des(B30)-insulina humana,

Ile(B25)Des(B30)-insulina humana,

Glu(A14)Leu(B16)Des(B30)-insulina humana,

Glu(A14)Ile(B16)Des(B30)-insulina humana,

Glu(A14)Val(B16)Des(B30)-insulina humana,

Glu(A14)Leu(B16)-insulina humana,

Glu(A14)Ile(B16)-insulina humana,

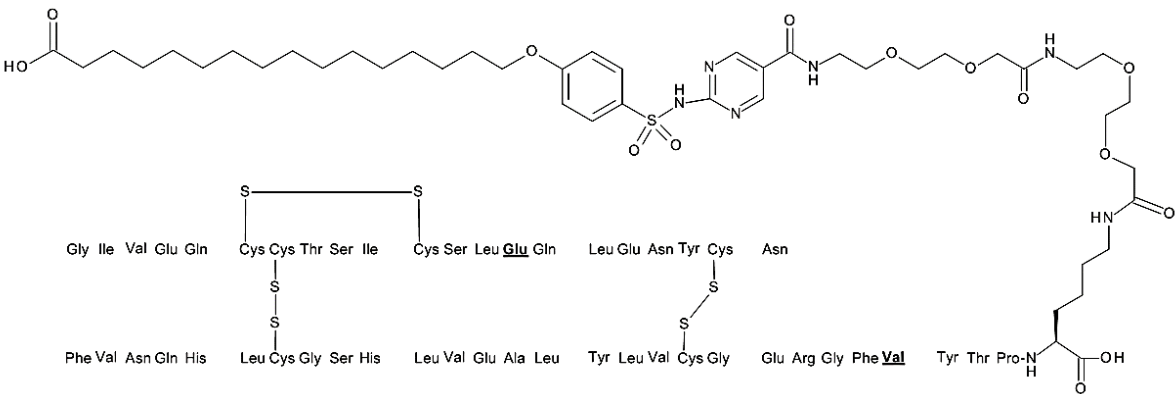
Glu(A14)Val(B16)-insulina humana,

Glu(A14)Leu(B25)Des(B30)-insulina humana,

Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-insulina humana,

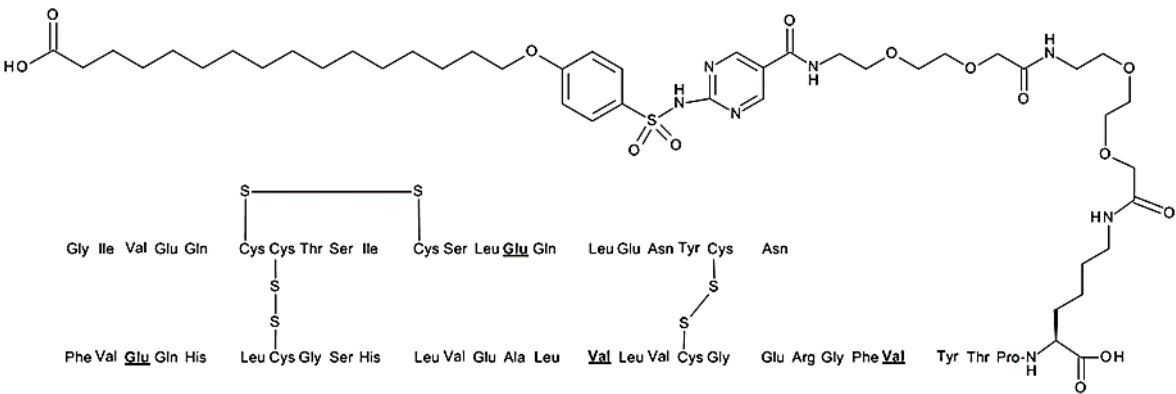
- Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-insulina humana,
- Glu(A14)Leu(B25)-insulina humana,
- Glu(A14)Ile(B25)-insulina humana,
- Glu(A14)Val(B25)-insulina humana,
- 5 Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)Des(B30)-insulina humana,
- Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-insulina humana,
- Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-insulina humana,
- Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina humana,
- Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina humana,
- 10 Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)-insulina humana,
- Glu(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina humana,
- Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina humana,
- Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-insulina humana,
- Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)-insulina humana,
- 15 Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)-insulina humana,
- Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)-insulina humana,
- Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)-insulina humana,
- Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)-insulina humana,
- Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)-insulina humana,
- 20 Glu(A14)Val(B16)Val(B25)-insulina humana,
- Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-insulina humana, y
- Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)-insulina humana.
11. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 10, en donde el análogo de insulina comprende

- (a) una cadena A que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 43 (GIVEQCCTSICSLEQLENYCN) y una cadena B que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 44 (FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFIYTPK),
- 5 (b) una cadena A que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 47 (GIVEQCCTSICSLEQLENYCN) y una cadena B que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 48 (FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFVYTPK), o
- 10 (c) una cadena A que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 77 (GIVEQCCTSICSLEQLENYCN) y una cadena B que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 78 (FVEQHLCGSHLVEALVLVCGERGFVYTPK).
12. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 11, en donde el grupo amino del análogo de insulina, al que está unida covalentemente la
- 15 sulfonamida de fórmula (I), es un grupo amino épsilon de una lisina presente en el análogo de insulina o es el grupo amino N-terminal de la cadena B de la insulina o el análogo de insulina.
13. El conjugado de acuerdo con la realización 12, en donde el grupo amino es el grupo amino épsilon de la lisina presente en la posición B29 de la cadena B.
- 20 14. El conjugado según una cualquiera de las realizaciones 1 a 13, en donde el conjugado es el conjugado 1 (secuencia de la cadena A: SEQ ID NO: 47; secuencia de la cadena B: SEQ ID NO: 48):



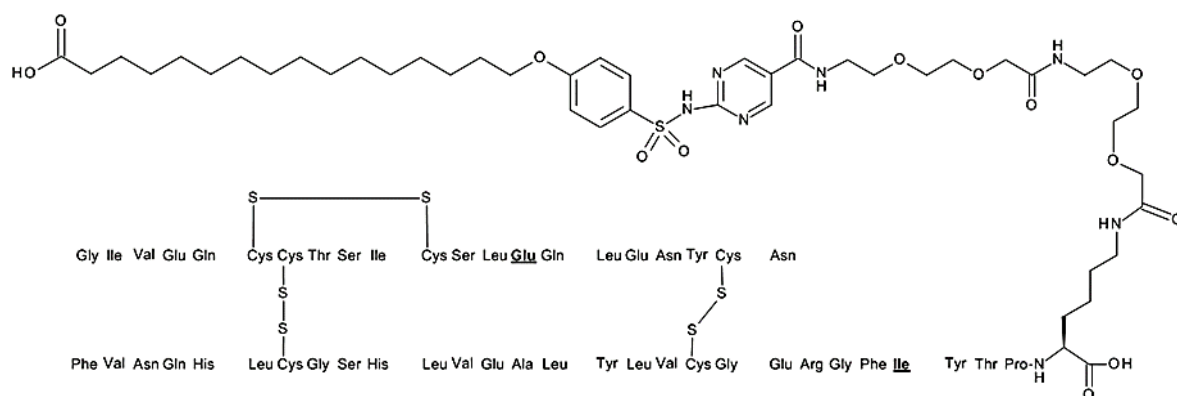
0

el conjugado 3 (secuencia de la cadena A: SEQ ID NO: 77; secuencia de la cadena B: SEQ ID NO: 78):

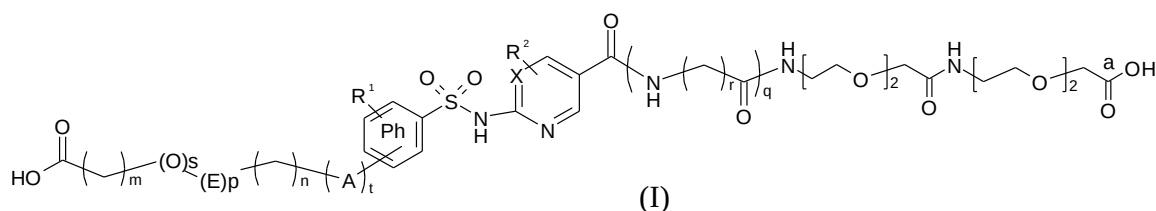


0

el conjugado 4 (secuencia de la cadena A: SEQ ID NO: 43; secuencia de la cadena B: SEQ ID NO: 44):



15. Un procedimiento para preparar un conjugado que comprende una sulfonamida de fórmula (I) y un análogo de insulina



en donde la sulfonamida de fórmula (I):

A se selecciona del grupo que consiste en átomo de oxígeno, grupo $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, grupo $-\text{OCH}_2-$ y grupo $-\text{CH}_2\text{O}-$;

E representa un grupo $-\text{C}_6\text{H}_3\text{R}-$ en donde R es un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno, en donde el átomo de halógeno se selecciona del grupo que consiste en un átomo de flúor, cloro, bromo y yodo, opcionalmente un átomo de flúor;

X representa un átomo de nitrógeno o un grupo $-\text{CH}-$;

m es un número entero en el intervalo de 5 a 17;

n es cero o un número entero en el intervalo de 1 a 3;

p es cero o 1;

q es cero o 1;

r es un número entero en el intervalo de 1 a 6;

s es cero o 1;

t es cero o 1;

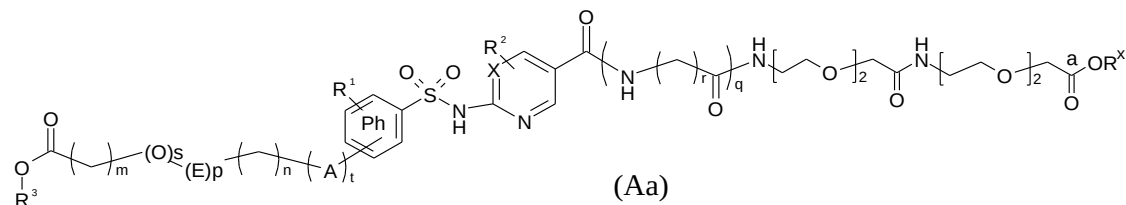
R¹ representa por lo menos un residuo seleccionado del grupo de átomo de hidrógeno, átomo de halógeno, grupo alquilo C1 a C3 y grupo alquilo C1 a C3 halogenado;

R² representa por lo menos un residuo seleccionado del grupo de átomo de hidrógeno, átomo de halógeno, grupo alquilo C1 a C3 y grupo alquilo C1 a C3 halogenado;

en donde la sulfonamida de fórmula (I) está covalentemente unida al ingrediente farmacéutico activo puesto que el grupo carboxi terminal "a" de la sulfonamida de fórmula (I) está covalentemente unido a un grupo amino del ingrediente farmacéutico activo;

que comprende:

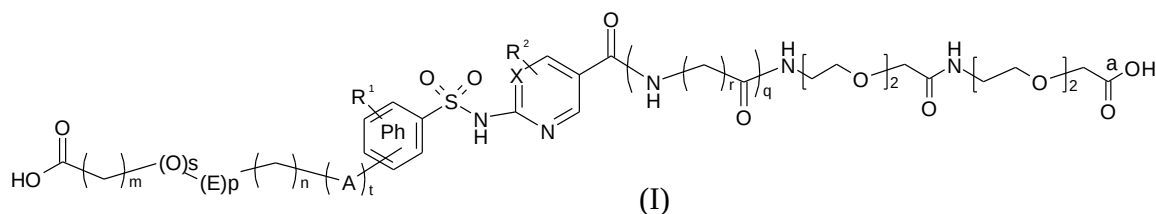
(a) proporcionar una sulfonamida de fórmula (Aa)



en donde X, Y, A, E, R¹, R² y los índices m, n, p, q, r, s, t tienen el significado definido en la realización 1, R^x es un átomo de hidrógeno o un grupo de activación, opcionalmente un grupo de activación seleccionado del grupo que consiste en 7-azabenzotriazol (opcionalmente derivado de HATU o HBTU), 4-nitro benceno y grupo N-succinimidilo, en donde R^x es opcionalmente un grupo N-succinimidilo; y R³ es un grupo protector o un átomo de hidrógeno, opcionalmente un átomo de hidrógeno; y un análogo de insulina que tiene un término C protegido o desprotegido;

- (b) someter a reacción la sulfonamida de fórmula (Aa) y el análogo de insulina que tiene un término C protegido o desprotegido bajo condiciones adecuadas para formar un enlace amida entre el grupo carboxi libre o activado, opcionalmente activado "a" de la sulfonamida de fórmula (A) y un grupo amino del análogo de insulina que tiene un término C protegido o desprotegido;
- (c) opcionalmente eliminar uno o ambos grupos de protección.
- 5 16. Un conjugado que comprende una sulfonamida de fórmula (I) y un análogo de insulina obtenido u obtenible del procedimiento según la realización 15.
- 10 17. La composición farmacéutica que comprende, en una cantidad farmacéuticamente eficaz, el conjugado que comprende una sulfonamida de fórmula (I) y un análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 15 o de acuerdo con la realización 16.
- 15 18. El conjugado que comprende una sulfonamida de fórmula (I) y un análogo de insulina de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 15 o de acuerdo con la realización 16 para uso como medicamento.
- 20 19. El conjugado que comprende una sulfonamida de fórmula (I) y un análogo de insulina de acuerdo con las realizaciones 1 a 15 o de acuerdo con la realización 16 para uso como medicamento para el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en diabetes gestacional, diabetes mellitus de tipo 1, diabetes mellitus de tipo 2 e hiperglucemia, y/o para reducir los niveles de glucosa en la sangre.
- 25 20. Un método para tratar una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en diabetes gestacional, diabetes mellitus de tipo 1, diabetes mellitus de tipo 2 e hiperglucemia y/o para reducir los niveles de glucosa en la sangre, que comprende

administrar a un paciente que lo necesita un conjugado que comprende un análogo de insulina y una sulfonamida de fórmula (I)



en donde:

- A se selecciona del grupo que consiste en un átomo de oxígeno, grupo -CH₂CH₂-, grupo -OCH₂- y grupo -CH₂O-;
- E representa un grupo -C₆H₃R- en donde R es un átomo de hidrógeno o un átomo de halógeno, en donde el átomo de halógeno se selecciona del grupo que consiste en un átomo de flúor, cloro, bromo y yodo;
- X representa un átomo de nitrógeno o un grupo -CH-;
- m es un número entero en el intervalo de 5 a 17;
- n es cero o un número entero en el intervalo de 1 a 3;
- p es cero o 1;
- q es cero o 1;
- r es un número entero en el intervalo de 1 a 6;
- s es cero o 1;
- t es cero o 1;
- R¹ representa por lo menos un residuo seleccionado del grupo de átomo de hidrógeno, átomo de halógeno, grupo alquilo C1 a C3 y grupo alquilo C1 a C3 halogenado;

R^2 representa por lo menos un residuo seleccionado del grupo de átomo de hidrógeno, átomo de halógeno, grupo alquilo C1 a C3 y grupo alquilo C1 a C3 halogenado,

en donde la sulfonamida de fórmula (I) está covalentemente unida al análogo de insulina puesto que el grupo carboxi terminal "a" de la sulfonamida de fórmula (I) está covalentemente unido a un grupo amino del análogo de insulina, tratando así la enfermedad.

La presente invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

1. Lista de abreviaturas utilizadas:

Ac	Acetilo
Boc	<i>tert</i> -Butiloxycarbonilo
DCM	Diclorometano
DIAD	Diisopropil azodicarboxilato
DIPEA	N,N-diisopropiletilamina
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
EA	Acetato de etilo
HMPA	Hexametilfosforamida
HPLC	Cromatografía de líquidos de alto rendimiento
LC	Cromatografía de líquidos
LCMS	Cromatografía de líquidos / espectrometría de masas

MeCN	MeCN
NMM	<i>N</i> -metilmorfolina
NMP	<i>N</i> -metil-2-pirrolidona
PE	Éter de petróleo
RP	Fase inversa
TA	Temperatura ambiente (25 °C)
TEA	Trietilamina
TEMPO	2,2,6,6-Tetrametilpiperidina- <i>N</i> -óxido
TFA	Ácido trifluoroacético
TFAA	Anhídrido trifluoroacético
TMS	Trimetil sililo
Ts	Tosilo
TSTU	Tetrafluoroborato de O-(<i>N</i> -succinimidil)- <i>N,N,N,N</i> -tetrametiluronio

Los procedimientos generales adecuados para preparar compuestos de la fórmula (I) se describen a continuación. Los compuestos de la fórmula I se prepararon por diferentes procedimientos químicos. Los grupos e índices mencionados en los siguientes métodos, especialmente en los esquemas, tienen el significado anteriormente mencionado para la fórmula (I), a menos que se defina explícitamente otra cosa.

2. Síntesis general de los compuestos de fórmula (I)

Los compuestos de la fórmula (I) se sintetizaron comenzando por el correspondiente intermedio I (esquema 1). Después de la activación con TSTU, el intermedio I se acopló o bien con el aminoácido (4) (etapa 3) o el compuesto (2) (etapa 2) para dar las especies (3) y (6), respectivamente. En caso de la etapa 3, se utilizó un alquil éster (R = alquilo), se logró la saponificación con LiOH. Ambos ácidos carboxílicos (6) y (7) se activaron con TSTU y se

acoplaron con (2) para dar la especie (3). Para finalizar la síntesis de los compuestos de la fórmula (I), se escindió éster *terc*-butílico (3) en la etapa final 7 por tratamiento con $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$. La síntesis del intermedio I se muestra en el esquema 2.

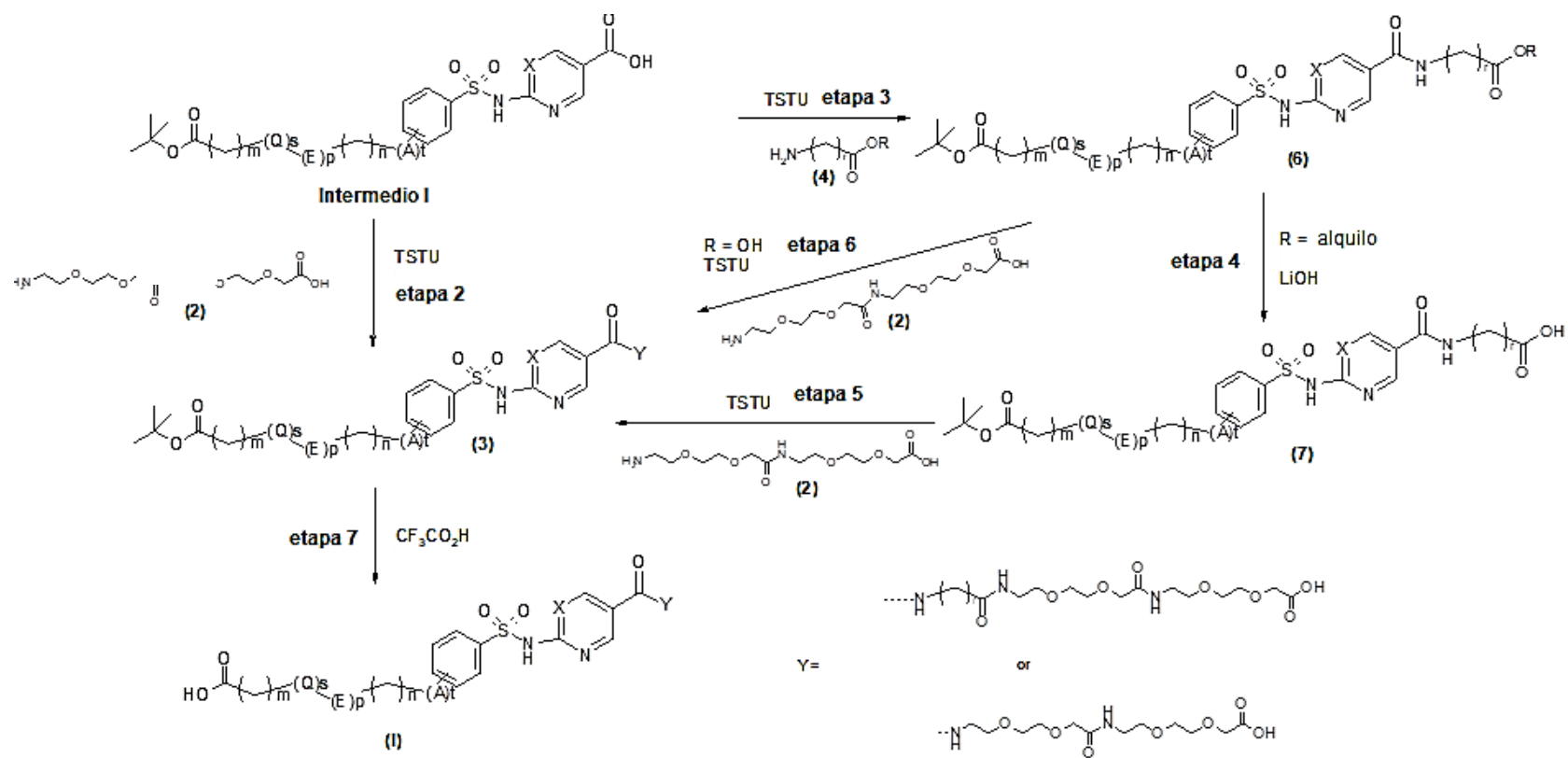
5

10

15

20

25



2.1 Síntesis general del intermedio I

El intermedio I se sintetizó como se muestra en el esquema 2. Comenzando por Bromuro I o Tosilato I se obtuvo la alquilación del intermedio III en presencia de K_2CO_3 (etapa 8). Alternativamente, se aisló la especie (8) después de una secuencia de reacción comenzando por una reacción de Sonogashira de alquino I y el intermedio II (etapa 11) seguida de hidrogenación de (11) resultante bajo una atmósfera de hidrógeno catalizada con paladio y platino, respectivamente (etapa 12). Las especies (8) se condensaron luego o bien con 2-cloro piridina (9) (etapa 9) en una reacción catalizada con paladio o se condensaron térmicamente con 2-cloro pirimidina (10) (etapa 10). En ambos casos, el éster alquílico se hidrolizó posteriormente con LiOH para obtener el intermedio I deseado.

5

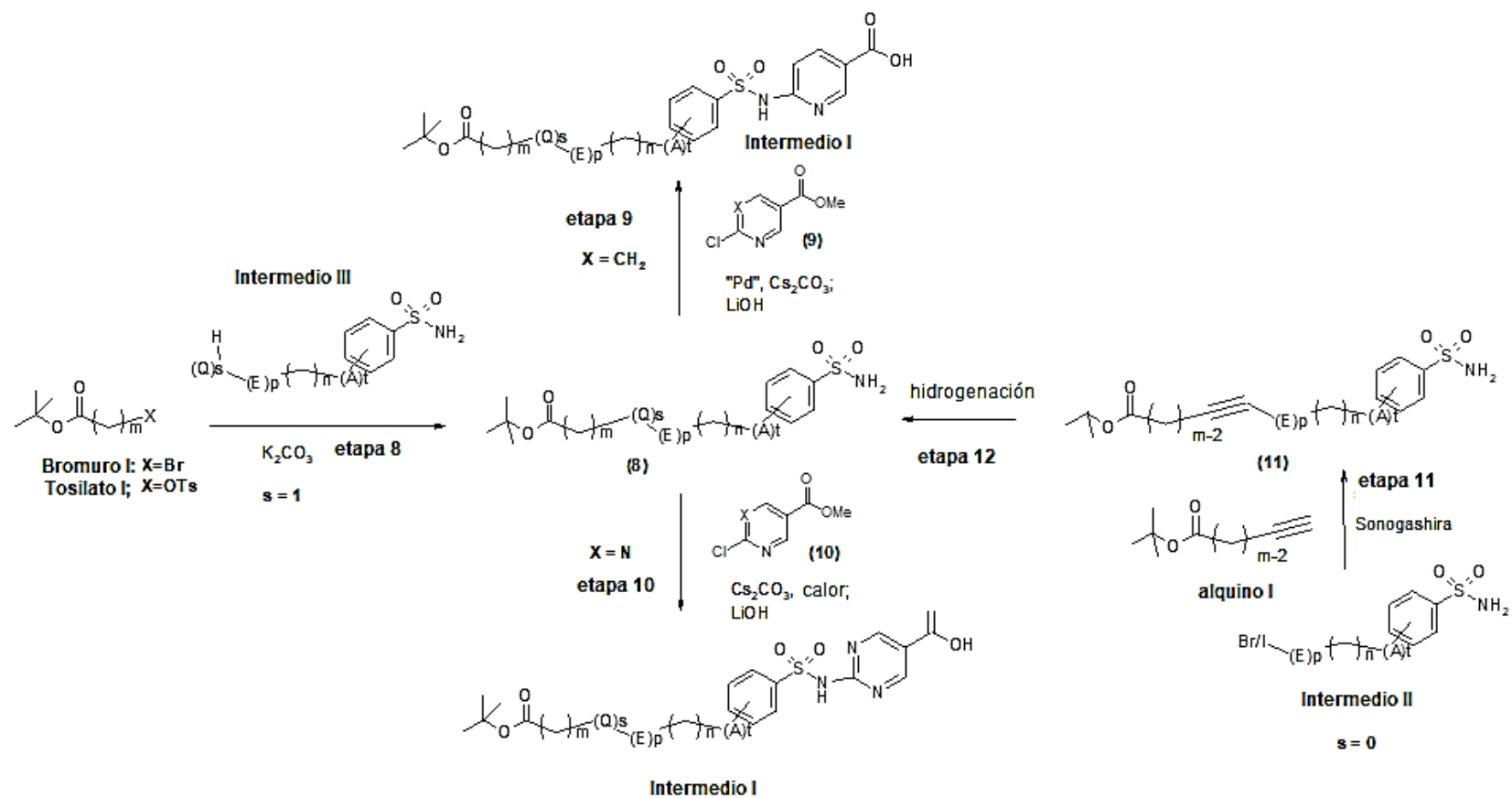
10

15

20

25

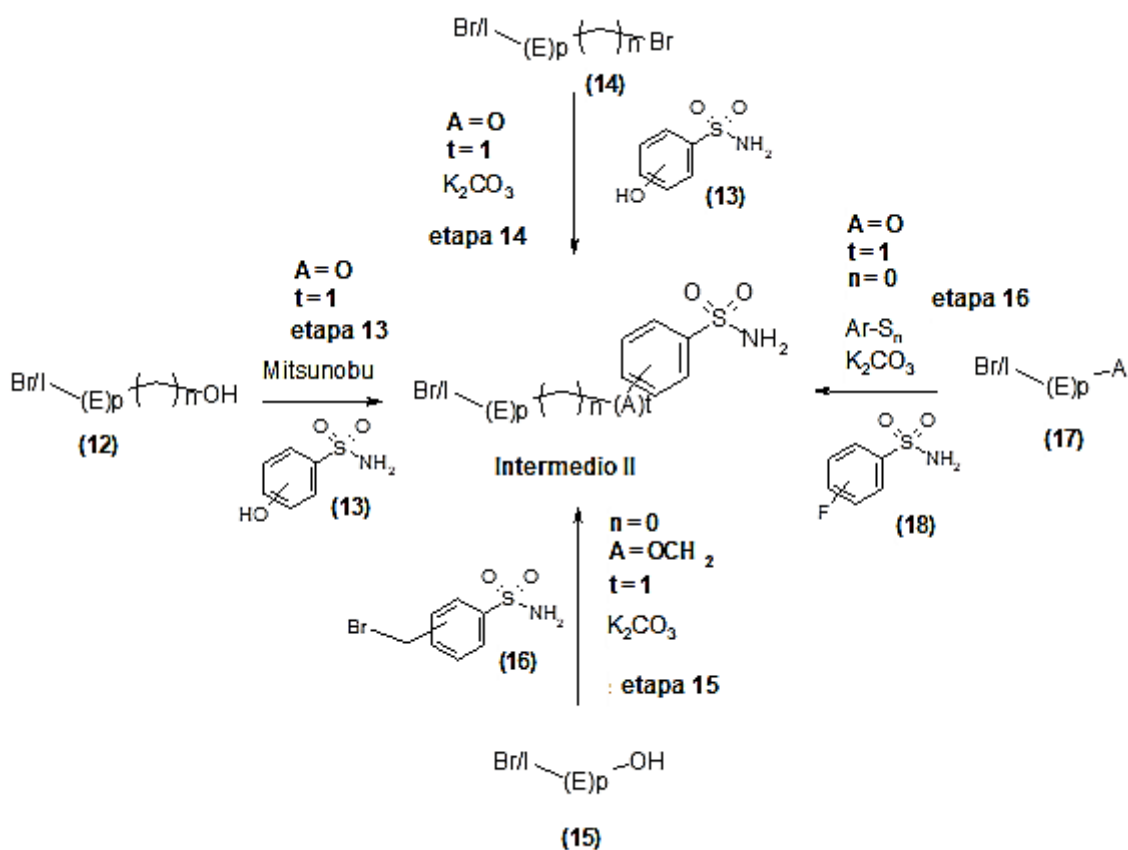
Esquema 2



2.2 Síntesis general del intermedio II

Como se muestra en el esquema 3, se aisló el intermedio II después de una reacción Mitsunobu de fenol (13) y alcohol (12) (etapa 13). Alternativamente, se sintetizó el intermedio II mediante alquilación o bien de fenol (13) (etapa 14) o fenol (15) (etapa 15) en presencia de K_2CO_3 . Los agentes alquilantes adecuados fueron (14) y (16), respectivamente. La sustitución aromática nucleófila de fluoruro (18) con fenol (17) también produjo el intermedio II (etapa 16).

Esquema 3



2.3 Síntesis general del intermedio III

Se obtuvo el intermedio III después de una secuencia de reacción lineal como se describe en el esquema 4. Comenzando por una alquilación de alquino (20) con bromuro (19), se aisló alquino protegido con TMS (21). Se desprotegió el alquino (21) bajo

condiciones básicas usando NaOH. La reacción de Sonogashira subsiguiente del alquino aislado (22) con un haluro aromático correspondiente (23) (etapa 19) proporcionó la especie (24). Un grupo protector adecuado para la especie (24) fue, por ejemplo, acetilo (PG = Ac), que se escindió tras el tratamiento con NaOH (etapa 20). La etapa de hidrogenación final 21 se catalizó con paladio o platino bajo una atmósfera de H₂ para proporcionar el intermedio III deseado

5

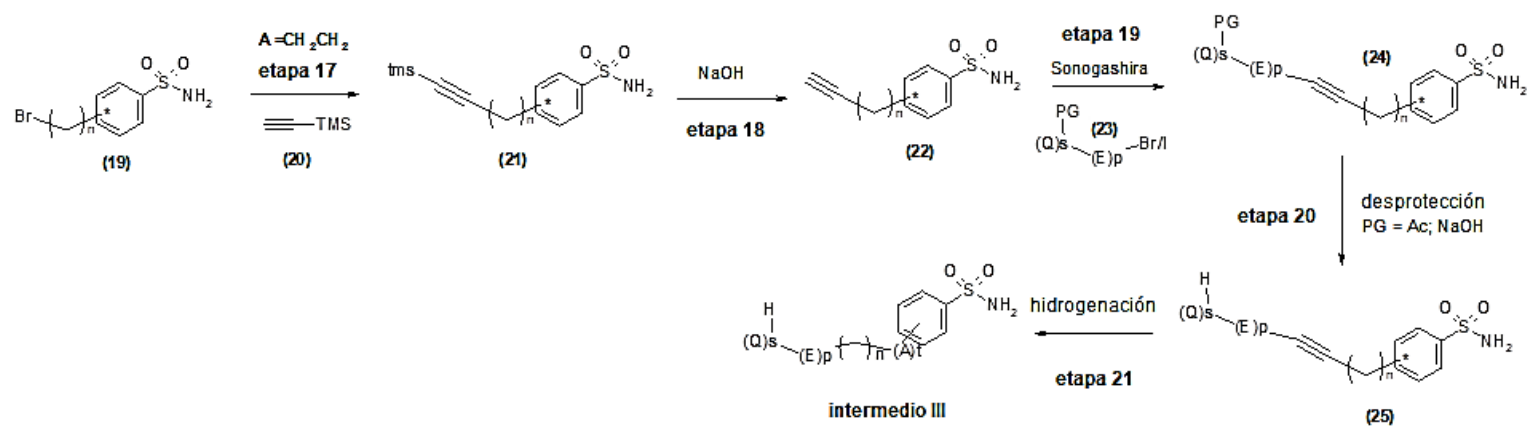
10

15

20

25

Esquema 4



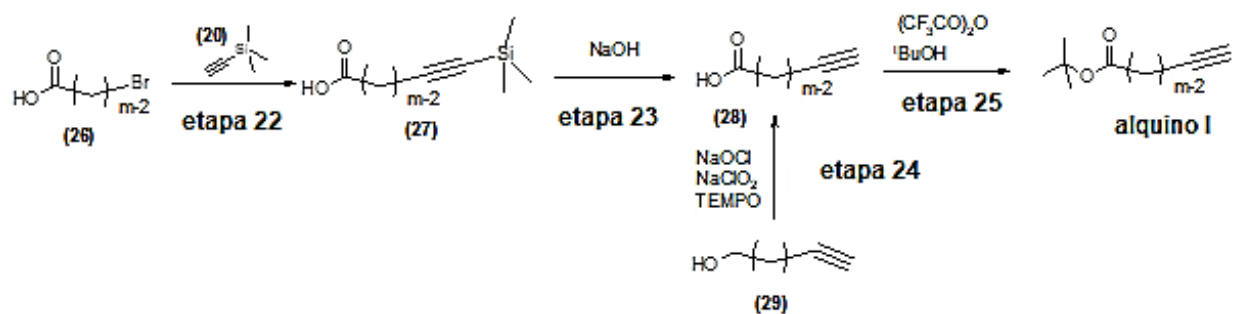
2.4 Síntesis general de alquino I y bromuro I

Se sintetizaron los materiales de partida bromuro I y alquino I como se muestra en el esquema 5. Para alquino I, se utilizaron dos rutas sintéticas distintas. Se aisló o bien ácido carboxílico (28) después de la oxidación del alcohol (29) – la oxidación mencionada se obtuvo con una mezcla de NaOCl y NaClO₂ en presencia de una cantidad catalítica de TEMPO (etapa 24) – o por una secuencia de alquilación / desprotección de bromuro (26). Para la alquilación se usó el reactivo (20). El producto aislado (27) se trató luego con NaOH para escindir el grupo protector de TMS. La protección necesaria del ácido carboxílico (28) como éster *terc*-butílico para obtener el alquino I deseado se obtuvo después de la activación con (CF₃CO)₂O y reacción con *terc*-butanol.

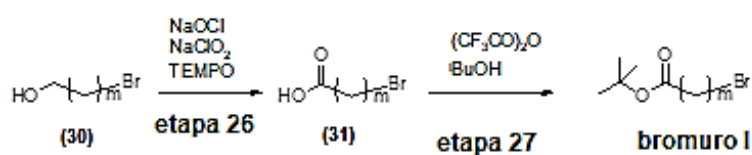
Para la síntesis de bromuro I se empleó una secuencia similar a aquella descrita para la conversión de (29) a alquino I (etapas 24 y 25). La oxidación del alcohol (30) y la posterior protección del ácido carboxílico resultante (31) proporcionaron el bromuro I deseado.

Se puede sintetizar tosilato I por una tosilación de alcohol (33) (etapa 29). (33) Se aisló después de una reducción del ácido carboxílico (32), que se transfirió *in situ* al anhídrido mixto y se redujo posteriormente con NaBH₄ (etapa 28).

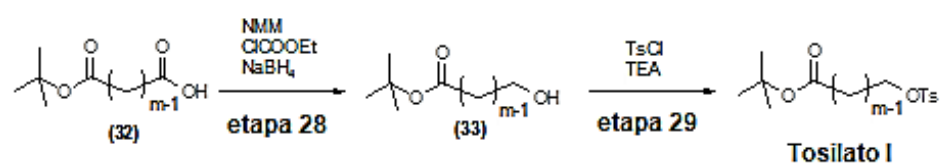
Esquema 5



5



10

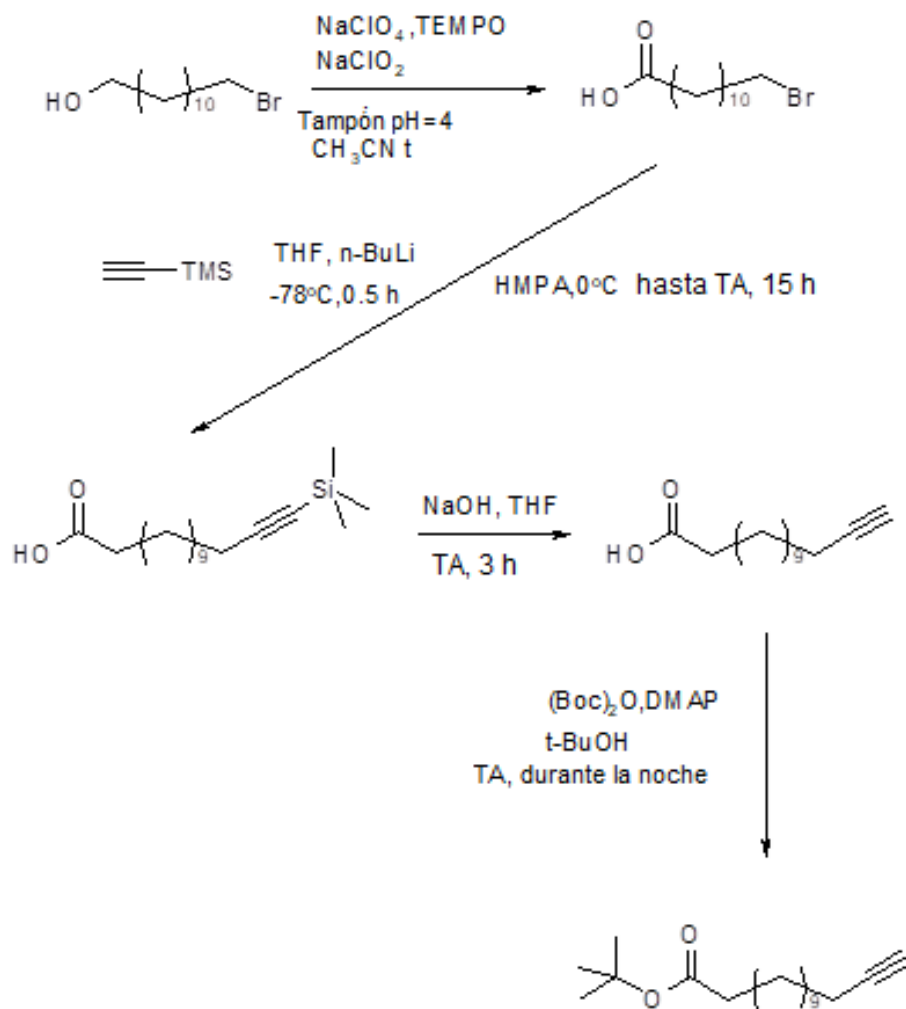


2.5 Ejemplos de síntesis de alquinos I y bromuros I de conformidad con el esquema 5

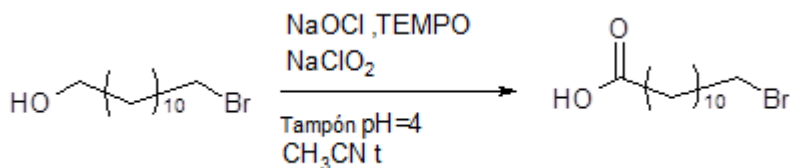
15

20

25



2.5.1 Síntesis de ácido 12-bromododecanoico

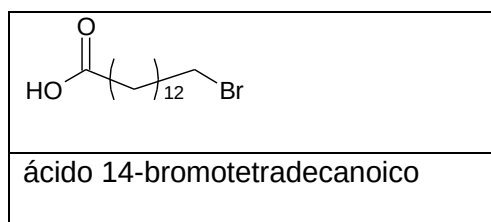


Se añadieron simultáneamente una disolución de NaClO_2 (37,5 g, 414,8 mmol) en H_2O (60 ml) y una disolución al 10% de NaOCl (28 g, 37,7 mmol) a una disolución de 12-bromododecan-1-ol (20 g, 75,4 mmol) y TEMPO (5,9 g, 37,7 mmol) en CH_3CN (400 ml) y disolución tampón a pH 4 (60 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante la noche.

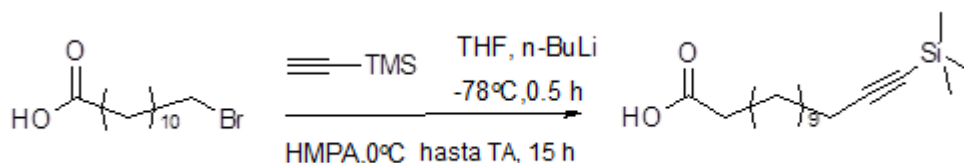
La mezcla se diluyó con EA (1200 ml), se lavó con agua (1000 ml) y salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró al vacío para dar el producto deseado ácido 12-bromododecanoico (20 g, 71,6 mmol, rendimiento, 95%) en la forma de un sólido amarillo.

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11,96 (s, 1H), 3,52 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 2,18 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 1,85 – 1,72 (m, 2H), 1,55 – 1,43 (m, 2H), 1,37 (s, 2H), 1,21 (d, J = 32,6 Hz, 12H).

Por consiguiente se sintetizaron los siguientes compuestos:

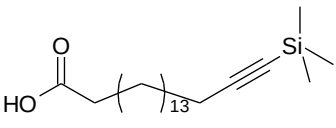
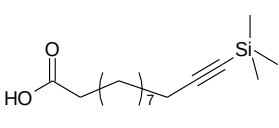
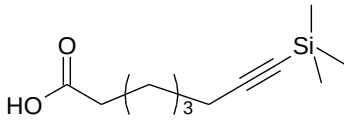


2.5.2 Síntesis de ácido 14-(trimetilsilil)tetradec-13-inoico

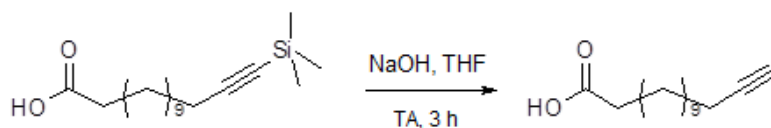


A una mezcla de etinil-trimetil-silano (63,3 g, 644,7 mmol) en THF (300 ml), se le añadió *n*-butil-litio (2,5 M en hexano) (258 ml, 644,7 mmol) a -78°C en N_2 . Después de 10 min, se añadió HMPA (115,5 g, 644,7 mmol) y la mezcla se calentó a 0°C durante 30 min. Luego se añadió ácido 12-bromododecanoico (30 g, 107,45 mmol) en THF (300 ml). Luego la mezcla se agitó a TA durante la noche. Se añadió agua (1200 ml) a la mezcla lentamente a 0°C , luego se ajustó el valor del pH hasta 3 con disolución de HCl acuosa, se extrajo con EA (800 ml). La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 , se concentró al vacío para dar el producto bruto ácido 14-(trimetilsilil)tetradec-13-inoico (35 g) en la forma de un aceite pardo que se usó en la etapa siguiente.

Por consiguiente se sintetizaron los siguientes compuestos:

		
ácido 18-trimetilsililoctadec-17-inoico	ácido 12-trimetilsilildodec-11-inoico	ácido 8-trimetilsililoct-7-inoico

2.5.3 Síntesis de ácido tetradec-13-inoico



Se añadió NaOH (8,6 g, 214,9 mmol) a una mezcla de ácido 14-(trimetilsilil)tetradec-13-inoico (35 g, 107,45 mmol) en H₂O (150 ml) y THF (150 ml). Luego la mezcla se agitó a TA durante 3 h. Después se ajustó el valor de pH hasta 4 con disolución de HCl acuosa, se extrajo con EA (2 x 300 ml). Las fases orgánicas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron al vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía en gel de sílice (PE:EA=4:1) para dar el producto deseado ácido tetradec-13-inoico (23 g, 102,5 mmol, rendimiento 2 etapas: 95%) en la forma de un sólido amarillo.

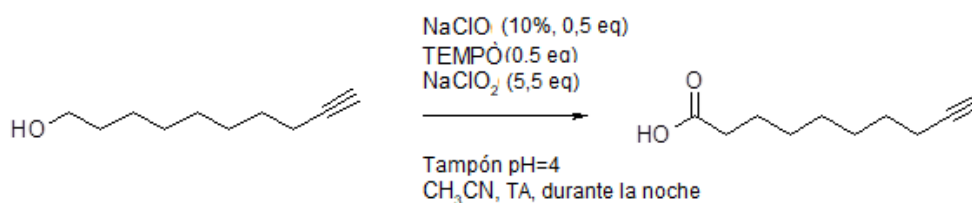
¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11,96 (s, 1H), 2,73 (s, 1H), 2,17 (dd, J = 16,3, 8,9 Hz, 4H), 1,51 – 1,21 (m, 18H).

Por consiguiente se sintetizaron los siguientes compuestos:

ácido octadec-17-inoico	ácido dodec-11-inoico	ácido oct-7-inoico

5

2.5.4 Síntesis de ácido dec-9-inoico



10

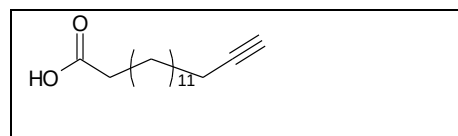
Una disolución de NaClO_2 (48,2 g, 536 mmol) y NaOCl (36,0 g, 48,7 mmol) se añadió simultáneamente a una disolución de dec-9-in-1-ol (15 g, 97,4 mmol) y TEMPO (7,6 g, 48,7 mmol) en CH_3CN (300 ml) y disolución tampón a pH 4 (75 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante la noche, se diluyó con EA (900 ml), se lavó con agua (900 ml) y salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 , se concentró al vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía en gel de sílice (PE/EA = 1/1) para dar el ácido dec-9-inoico deseado (20 g, bruto) en la forma de un aceite incoloro.

15

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 2,36 (t, J = 7,3 Hz, 2H), 2,18 (td, J = 6,9, 2,3 Hz, 2H), 1,93 (t, J = 2,3 Hz, 1H), 1,72 – 1,59 (m, 2H), 1,54 (td, J = 14,1, 7,2 Hz, 2H), 1,48 – 1,30 (m, 6H) ppm.

20

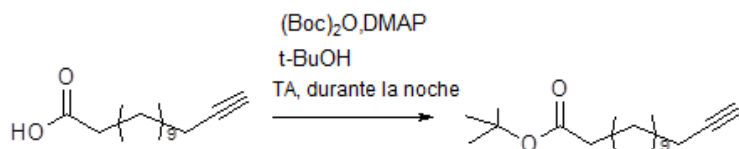
Por consiguiente se sintetizaron los siguientes compuestos:



25

ácido hexadec-15-inoico

5

2.5.5 Síntesis de tetradec-13-inoato de *terc*-butilo

10

Se añadieron $(\text{Boc})_2\text{O}$ (33,6 g, 153,8 mmol) y DMAP (3,7 g, 30,7 mmol) a una mezcla de ácido tetradec-13-inoico (23 g, 102,5 mmol) en t-BuOH (200 ml). Luego la mezcla se agitó a TA durante la noche. El disolvente se eliminó al vacío. Se añadió agua (400 ml) a la mezcla y se extrajo con EA (400 ml). La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (PE:EA=30:1) para dar el producto deseado tetradec-13-inoato de *terc*-butilo (23,5 g, 83,8 mmol, 82% de rendimiento) en la forma de un líquido amarillo.

15

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 2,72 (s, 1H), 2,15 (d, $J = 8,4$ Hz, 4H), 1,49 – 1,21 (m, 27H).

Por consiguiente se sintetizaron los siguientes compuestos:

20

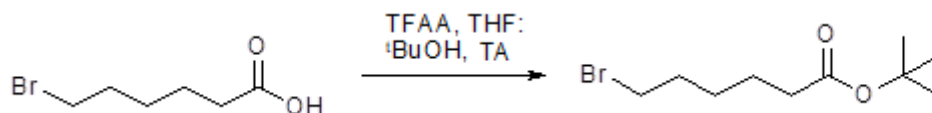
octadec-17-inoato de <i>terc</i> -butilo	dodec-11-inoato de <i>terc</i> -butilo	hexadec-15-inoato de <i>terc</i> -butilo

25

oct-7-inoato de <i>terc</i> -butilo	dec-9-inoato de <i>terc</i> -butilo	
-------------------------------------	-------------------------------------	--

2.5.6 Síntesis de 6-bromohexanoato de *terc*-butilo

5



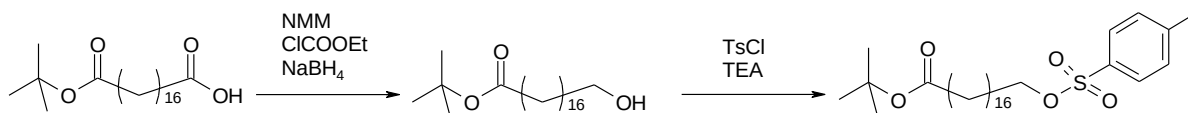
Se añadió ácido 6-bromohexanoico (6,0 g, 31 mmol), TFAA (26,0 g, 124 mmol) a THF (60 ml), la mezcla se sometió a reacción a TA durante 1 h. Luego se añadió *terc*-butanol (30 ml) a la mezcla y se agitó durante 16 h a TA. Después se adaptó el pH de la mezcla de reacción hasta pH=8 con disolución de NaHCO₃, la mezcla se extrajo con EA (3 x 150 ml), se secó sobre Na₂SO₄, se concentró para dar el compuesto diana 6-bromohexanoato de *terc*-butilo (7,6 g, 30,4 mmol, 98% de rendimiento).

10

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 3,52 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 2,20 (dd, *J* = 15,0, 7,8 Hz, 2H), 1,85 – 1,74 (m, 2H), 1,52 (ddd, *J* = 19,3, 10,9, 5,7 Hz, 2H), 1,44 – 1,32 (m, 9H).

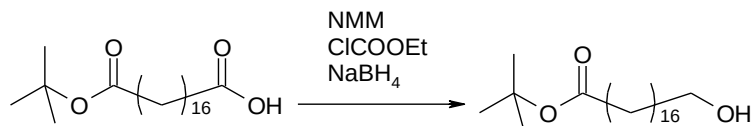
2.5.6 Síntesis de tosilatos I

15



2.5.7 Síntesis de 18-hidroxi-octadecanoato de *terc*-butilo

20



Se añadió N-metilmorfolina (1638 mg, 16,5 mmol) a una disolución de ácido 18-*terc*-butoxi-18-oxo-octadecanoico (5 g, 13,5 mmol) en THF (150 ml). La mezcla se enfrió hasta -25°C antes de añadir cloroformiato de etilo (1277 mg, 13,5 mmol) gota a gota. La mezcla se agitó a -25°C por 20 minutos y el sólido se eliminó por filtración. La disolución se añadió cuidadosamente a una disolución de NaBH₄ (770 mg, 20,25 mmol) en agua (15 ml) a 0°C.

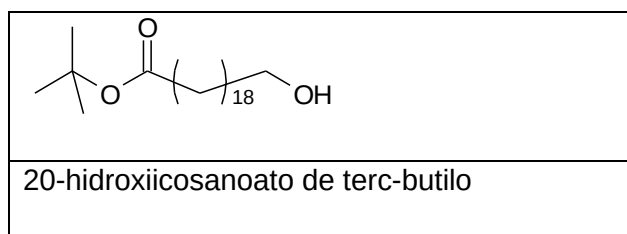
25

La mezcla se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se eliminó el THF al vacío, y la fase acuosa se extrajo con EA (3 x 50 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO_4 y se concentraron al vacío para dar 18-hidroxiocetadecanoato de terc-butilo en la forma de un sólido blanco (4,7 g, 99,8% de rendimiento).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 3,63 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 2,19 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 1,57 (dd, J = 13,0, 6,5 Hz, 4H), 1,43 (d, J = 3,9 Hz, 9H), 1,38 – 1,20 (m, 27H).

Por consiguiente, se sintetizaron los siguientes compuestos:

10



2.5.8 Síntesis de 18-(p-

tolilsulfoniloxi)octadecanoato de terc-butilo

15



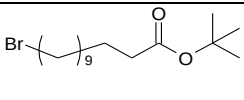
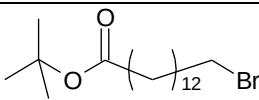
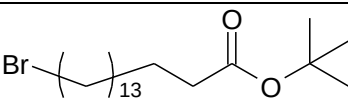
20

Se añadió TEA (400 mg, 39,6 mmol) a una disolución de 18-hidroxiocetadecanoato de terc-butilo (4700 mg, 13,2 mmol) y TsCl (2508 mg, 13,2 mmol) en DCM (100 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió agua (50 ml) y se extrajo con DCM (2 x 50 ml). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (100 ml), se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró. El producto bruto se purificó por columna de gel de sílice (EA/n-hexano = 1:20) para dar 18-(p-tolilsulfoniloxi)octadecanoato de terc-butilo (4,5 g, 67% rendimiento).

25

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7,79 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), 7,34 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 4,02 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,45 (s, 3H), 2,20 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 1,69 – 1,57 (m, 4H), 1,44 (s, 9H), 1,25 (t, $J = 12,1$ Hz, 24H).

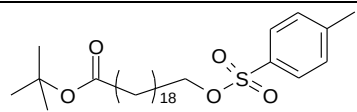
5

		
12-bromododecanoato de <i>terc</i> -butilo	14-bromotetradecanoato de <i>terc</i> -butilo	16-bromohexadecanoato de <i>terc</i> -butilo

10

Por consiguiente, se sintetizaron los siguientes compuestos:

15

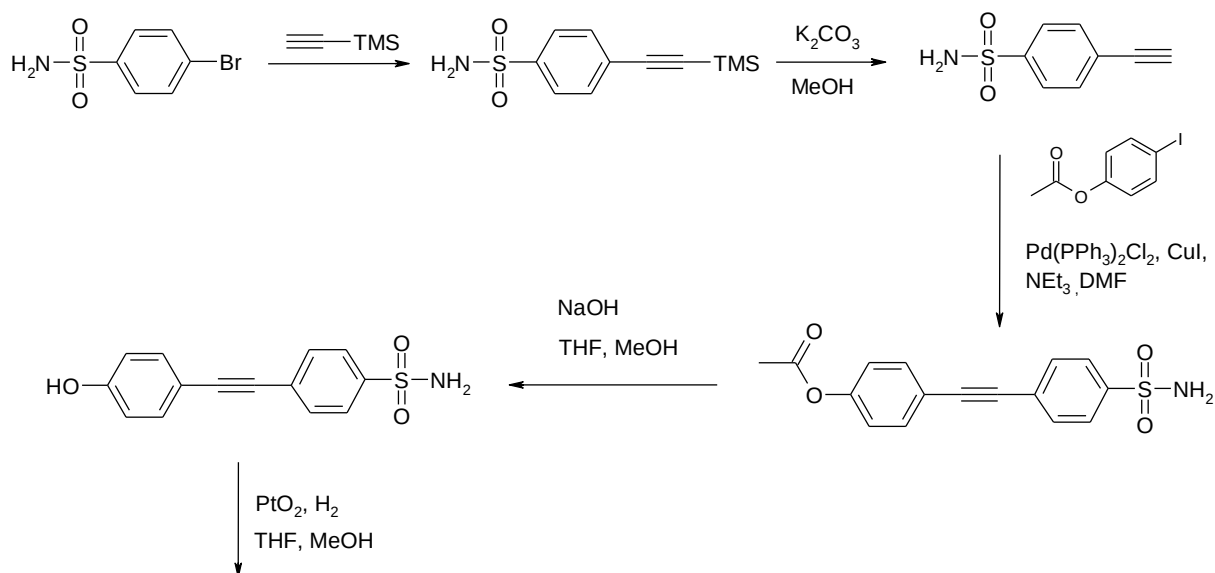

20-(p-tolilsulfonilo)icosanoato de <i>terc</i> -butilo

2.6 Ejemplos de la síntesis de los intermedios III de acuerdo con el esquema 4

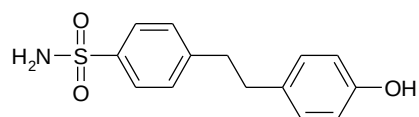
20

25

5

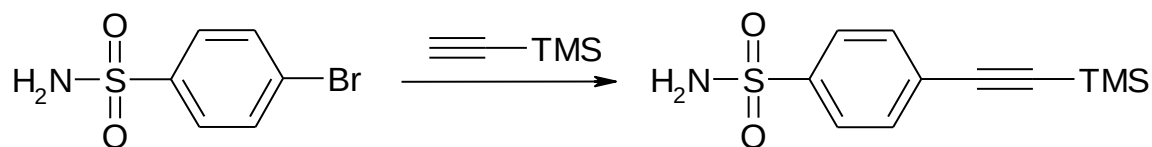


10



2.6.1 Síntesis de 4-((trimetilsilil)etnil)bencenosulfonamida

15



20

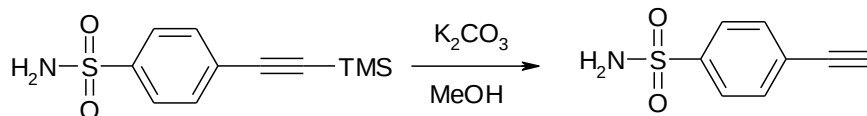
Una mezcla de 4-bromobencenosulfonamida (61 g, 260 mmol), trimetilsililacetileno (38,2 g, 0,09 mol), tetrakis(trifenilfosfina) paladio (7,5 g, 6,5 mmol) y yoduro de cobre (2,5 g, 13 mmol) en trietilamina (500 ml) se calentó hasta 80°C en atmósfera de nitrógeno durante 8 h. La mezcla se concentró al vacío y se extrajo con EA (300 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na_2SO_4) y concentraron a presión reducida. El producto bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (eluyendo con 70% DCM en PE) para dar 4-((trimetilsilil)etnil)bencenosulformamida (50 g, 75 %).

25

Método LC-Masas: Fase móvil: A = 10 mM TFA/ H_2O , B = MeCN; Gradiente: B = 5 % - 95 % en 1,5 min; Caudal: 2,0 ml/min; Columna: Xbridge- C_{18} , 50 × 4,6 mm, 3,5 μm . Pureza LC:

90 % (214 nm); Masa: pico encontrado 254,0 (M + H)⁺ a 1,98 min.

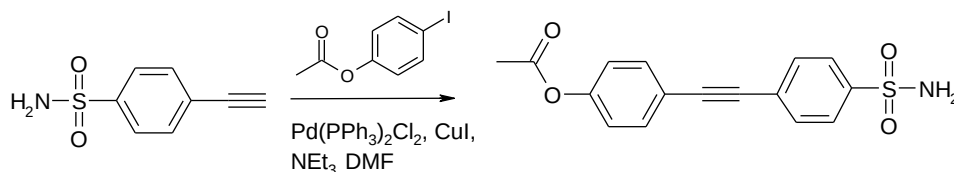
2.6.2 Síntesis de 4-etinilbencenosulfonamida



4-((trimetilsilil)etinil)bencenosulfonamida (40 g, 158 mmol), K₂CO₃ (2,2 g, 15,8 mmol) y metanol (400 ml) se agitaron a TA durante 12 h. Una vez completada la reacción (monitoreada por LCMS), se diluyó con agua (200 ml) y se extrajo con EA (2x200 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron a presión reducida. El producto bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (eluyendo con 100% DCM en PE) para dar 4-etinilbencenosulfonamida (22 g, 77 %).

Método LC-Masas: Fase móvil: A = 10 mM TFA/H₂O, B = MeCN; Gradiente: B = 5 % - 95 % en 1,5 min; Caudal: 2,0 ml/min; Columna: Xbridge-C₁₈, 50 × 4,6 mm, 3,5 um. Pureza LC: 90 % (214 nm); Masa: pico encontrado 182,1 (M + H)⁺ a 1,65 min.

2.6.3 Síntesis de acetato de 4-((4-sulfamoilfenil)etinil)fenilo

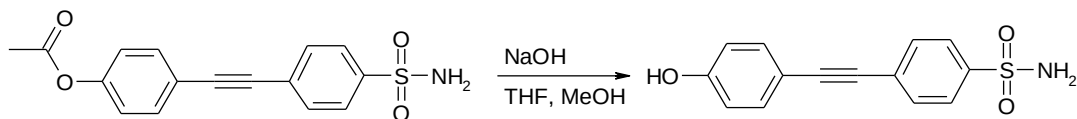


Pd(PPh₃)₂Cl₂ (5,8 g, 8,3 mmol), CuI (1,6 g, 8,3 mmol), Et₃N (25 g, 249 mmol) y (4-yodfenil) acetato (27 g, 103 mmol) se añadieron a una mezcla de 4-etinilbencenosulfonamida (15 g, 83 mmol) en DMF (150 ml). El matraz se vació y volvió a llenar con N₂. Luego la mezcla se agitó a TA durante la noche. Se añadió agua (200 ml) a la mezcla, se filtró por succión y se secó al aire para dar acetato de 4-((4-sulfamoilfenil)etinil)fenilo en la forma de un sólido pardo (18 g, 70 %).

Método LC-Masas: Fase móvil: A = 10 mM TFA/H₂O, B = MeCN; Gradiente: B = 5 % - 95 % en 1,5 min; Caudal: 2,0 ml/min; Columna: Xbridge-C₁₈, 50 × 4,6 mm, 3,5 um. Pureza LC:

90 % (214 nm); Masa: pico encontrado 338 (M + Na)⁺ a 1,88 min.

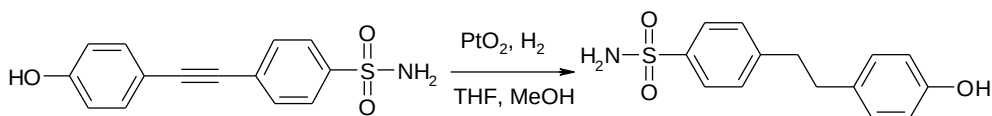
2.6.4 Síntesis de 4-((4-hidroxifenil)etnil)bencenosulfonamida



A 0°C, se añadió NaOH (4,5 g, 114 mmol) a una disolución de acetato de 4-((4-sulfamoilfenil)etnil)fenilo (18 g, 57 mmol) en THF (60 ml), MeOH (60 ml) y H₂O (30 ml). La mezcla se agitó a TA durante 2 h. Después de completar la reacción (monitoreada por LCMS), la disolución se diluyó con EA (50 ml) y se lavó con agua (20 ml) y NaCl saturado acuoso, se secó sobre MgSO₄. El filtrado se concentró al vacío para dar el producto bruto. El producto bruto se suspendió con DCM. Se filtró con succión y se secó al aire para dar 4-((4-hidroxifenil) etnil)bencenosulfonamida en la forma de un sólido pardo (10,9 g, 70 %).

Método LC-Masas: Fase móvil: A = 10 mM TFA/H₂O, B = MeCN; Gradiente: B = 5 % - 95 % en 1,5 min; Caudal: 2,0 ml/min; Columna: Xbridge-C₁₈, 50 × 4,6 mm, 3,5 um. Pureza LC: 95 % (214 nm); Masas: pico encontrado 296,1 (M + Na)⁺ a 1,75 min.

2.6.5 Síntesis de 4-(4-hidroxifenetil)bencenosulfonamida



Se añadió PtO₂ (1 g) a una disolución de 4-((4-hidroxifenil)etnil)bencenosulfonamida (10.9 g, 40 mmol) en 40 ml de THF y 40 ml de MeOH. La mezcla de reacción se agitó a TA en H₂ por 24 h. Después de completar la reacción (monitoreada por LCMS), la mezcla se filtró. El filtrado se concentró al vacío para dar 4-(4-hidroxifenetil)-benceno-sulfonamida (9.5 g, 86 %).

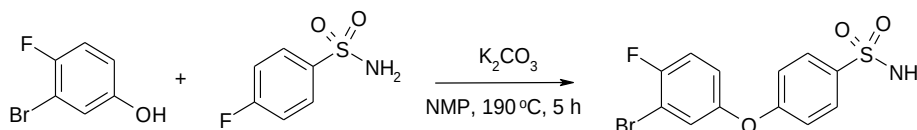
Método LC-Masas: Fase móvil: A = 10 mM TFA/H₂O, B = MeCN; Gradiente: B = 5 % - 95 % en 1,5 min; Caudal: 2,0 ml/min; Columna: Xbridge-C₁₈, 50 × 4,6 mm, 3,5 um. Pureza LC:

100 % (214 nm); Masa: pico encontrado 278,1 (M + H)⁺ a 1,67 min.

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9,14 (s, 1H), 7,71 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 7,38 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 7,26 (s, 2H), 7,00 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 6,72 – 6,60 (m, 2H), 2,96 – 2,84 (dd, *J* = 9,2, 6,2 Hz, 2H), 2,77 (dd, *J* = 9,2, 6,3 Hz, 2H).

5 2.7 Ejemplos de la síntesis de los intermedios II según el esquema 3

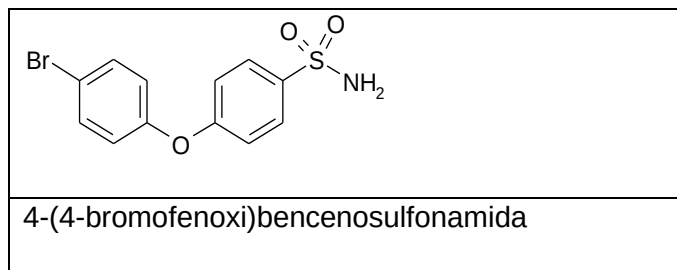
2.7.1 Síntesis de 4-(3-bromo-4-fluorofenoxi)bencenosulfonamida



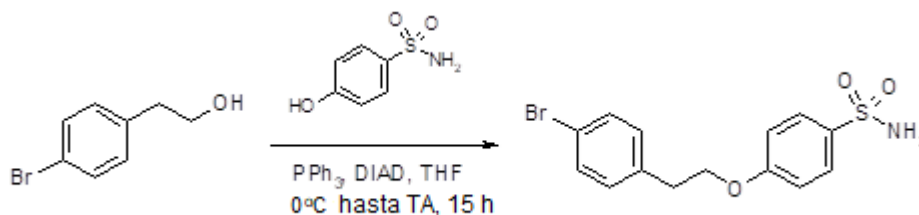
10 Una mezcla de 3-bromo-4-fluoro-fenol (12,8 g, 66,8 mmol), 4-fluorobenceno sulfonamida (9,00 g, 51,4 mmol) y K₂CO₃ (14,2 g, 103 mmol) en NMP (50 ml) se agitó a 190°C durante 5 h. La mezcla de reacción se diluyó con EA (500 ml), se lavó con agua (50 ml), salmuera (3 x 50 ml), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (eluyendo con PE/EA = 3/1) para dar 4-(3-bromo-4-fluorofenoxi)bencenosulfonamida en la forma de un sólido blanco (10,8 g, 31,3 mmol, 61% de rendimiento).

Método LC-Masas: Fase móvil: A = 2,5 mM TFA/H₂O, B = 2,5 mM TFA/MeCN; Gradiente: B = 10%-95% in 1,0 min; Caudal: 1,5 ml/min; Columna: Xbridge-C₁₈, 30 × 4,6 mm, 2,5 μm. Pureza LC (producto deseado): 88% (214 nm); Masa: pico encontrado 368,0 (M + Na)⁺ a 1,74 min.

20 Por consiguiente, se sintetizaron los siguientes compuestos:



2.7.2 Síntesis de 4-(4-bromofenetoxi)bencenosulfonamida



5

Se añadió DIAD (11,1 g, 54,7 mmol), a 0°C y gota a gota, a una disolución de 2-(4-bromofenil)etanol (10 g, 49,8 mmol), 4-hidroxibenceno sulfonamida (8,6 g, 49,8 mmol) y PPh_3 (14,3 g, 54,795 mmol) en THF seco (200 ml). La reacción se dejó calentar hasta TA con agitación durante 20 h. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se disolvió en EA (200 ml) y luego se lavó con agua (50 ml) y salmuera (50 ml). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 . Después de filtrar, el disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, eluyendo con EA en PE de 0 a 40%) para obtener 4-(4-bromofenetoxi)bencenosulfonamida (6,8 g en la forma de un sólido blanco) en 39% de rendimiento.

10

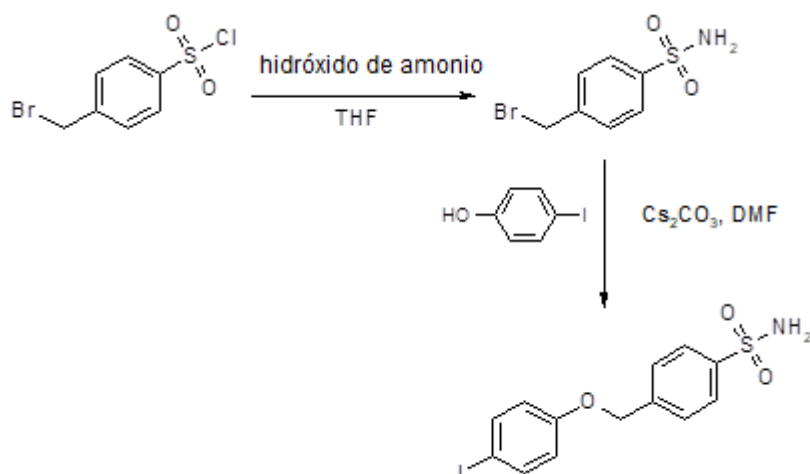
15

Método LC-Masas: Fase móvil: H_2O (0,01%TFA) (A) / MeCN (0,01%TFA), (B); Gradiente: 5 % B durante 0,2 min, incremento hasta 95%B dentro de 1,3 min; Caudal: 1,8 ml/min; Columna: SunFire, $50 \times 4,6$ mm, 3,5 μm . Pureza LC: 95% (214 nm); Masa: pico encontrado 356 ($\text{M} + \text{H}$)⁺ a 2,08 min

2.7.3 Esquema de síntesis 4-((4-yodofenoxi)metil)bencenosulfonamida

20

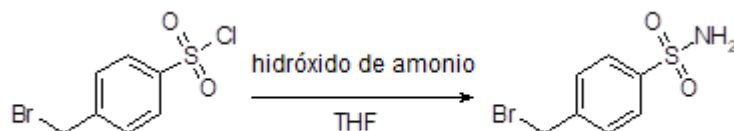
25



5

2.7.4 Síntesis de 4-(bromometil)bencenosulfonamida

10



15

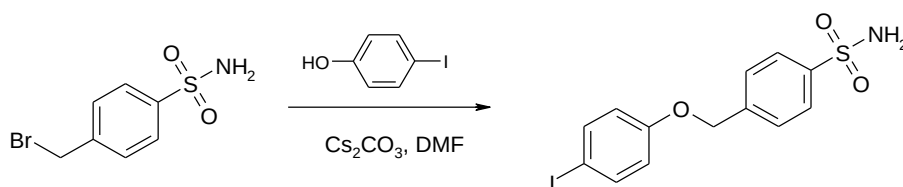
Una disolución de cloruro de 4-(bromometil)bencenosulfonilo (7 g, 26 mmol) en THF (80 ml) se enfrió hasta 0°C , se añadió amoníaco acuoso al 28% (6,5 ml) y la mezcla se agitó a TA durante 2 h. La disolución de reacción se concentró y se añadió acetato de etilo (200 ml). La capa orgánica se separó, se secó y se concentró. Se usó 4-(bromometil)bencenosulfonamida bruta directamente sin purificación adicional. (5,5 g, 86 %)

20

Método LC-Masas: Fase móvil: A = 10 mM TFA/ H_2O , B = MeCN; Gradiente: B = 5 % - 95 % en 1,5 min; Caudal: 2,0 ml/min; Columna: Xbridge- C_{18} , $50 \times 4,6$ mm, 3,5 μm , Pureza LC: 90 % (214 nm); Masa: pico encontrado 250,1 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$ a 1,64 min.

2.7.5 Síntesis de 4-((4-yodofenoxy)metil)bencenosulfonamida

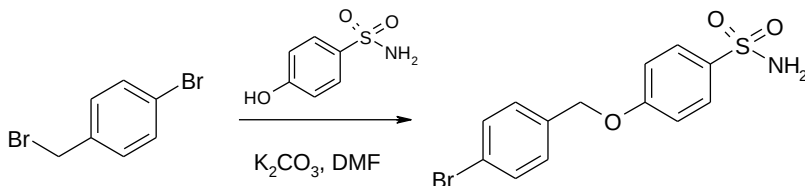
25



Se añadieron Cs_2CO_3 (10,7 g, 33 mmol) y 4-yodofenol (6 g, 27,5 mmol) a una mezcla de 4-(bromometil)bencenosulfonamida (5,5 g, 22 mmol) en DMF (50 ml). Luego la mezcla se agitó a TA durante 12 h. Se añadió agua (200 ml) a la mezcla, el sólido resultante se filtró y luego se suspendió con Et_2O (50 ml); se filtró con succión y se secó al aire para dar el producto deseado en la forma de un sólido blanco (5,5 g, 65 %).

Método LC-Masas: Fase móvil: A = 10 mM TFA/ H_2O , B = MeCN; Gradiente: B = 5 % - 95 % en 1,5 min; Caudal: 1,8 ml/min; Columna: Xbridge- C_{18} , 50 x 4,6 mm, 3,5 μm . Pureza LC: 80% (214 nm); Masa: pico encontrado 389,7 ($\text{M}+\text{H}$)⁺ a 1,98 min.

2.7.6 Síntesis de 4-(4-bromobenciloxy)bencenosulfonamida



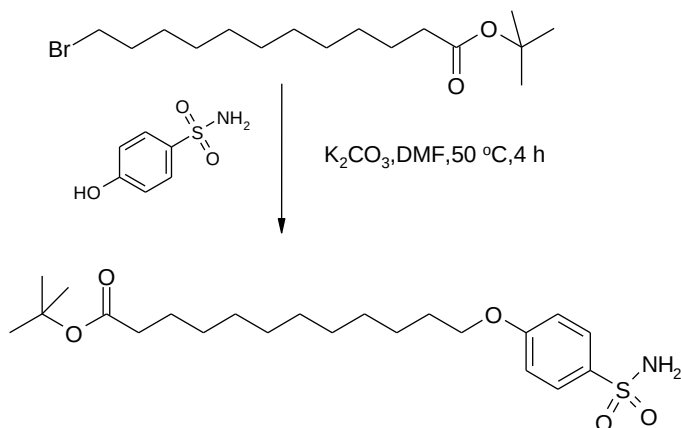
A una mezcla de 1-bromo-4-(bromometil)benceno (6,5 g, 26 mmol) en DMF (50 ml) se le añadieron K_2CO_3 (5,5 g, 40 mmol) y 4-hidroxibencenosulfonamida (4,5 g, 26 mmol). Luego la mezcla se agitó a 50°C durante 2 h. Se añadió agua (200 ml) a la mezcla, el sólido se filtró. Luego el sólido se suspendió con PE:EA=1:2 (50 ml), se filtró con succión y se secó al aire para dar el producto deseado en la forma de un sólido blanco. (5,3 g, 60 %).

Método LC-Masas: Método: Fase móvil: A = 10 mM TFA/ H_2O , B = MeCN; Gradiente: B = 5 % - 95 % en 1,5 min; Caudal: 1,8 ml/min; Columna: Xbridge- C_{18} , 50 x 4,6 mm, 3,5 μm . Pureza LC: 80% (214 nm); Masa: pico encontrado 364 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺ a 1,81 min.

2.8 Ejemplos para la síntesis de intermedios I de acuerdo con el esquema 2

2.8.1 Síntesis de 12-(4-sulfamoilfenoxi)dodecanoato de *terc*-butilo

5



10

Una mezcla de 12-bromododecanoato de *terc*-butilo (6 g, 18 mmol), 4-hidroxibenceno sulfonamida (3 g, 18 mmol) y K_2CO_3 (5 g, 36 mmol) en DMF (50 ml) se calentó hasta 50°C y se agitó durante 4 h. Después se añadió agua (300 ml). El precipitado resultante se recogió y secó para dar el 12-(4-sulfamoilfenoxi)dodecanoato bruto que se suspendió con EA/PE (1/5, 100 ml) para proporcionar 7 g (93%) de 12-(4-sulfamoilfenoxi) dodecanoato:

15

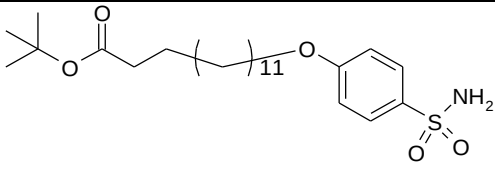
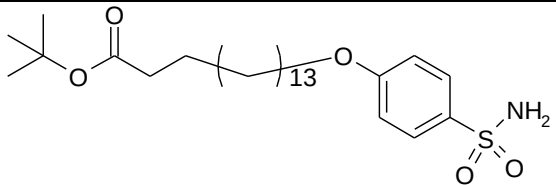
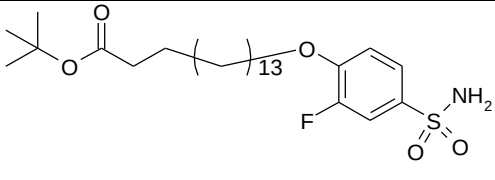
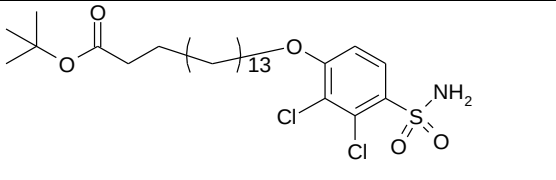
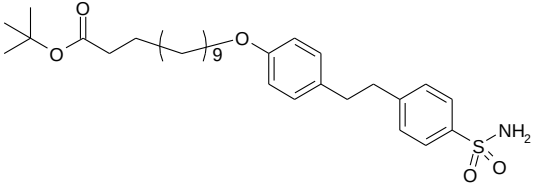
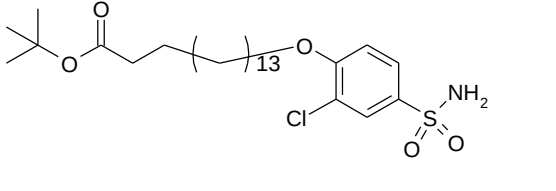
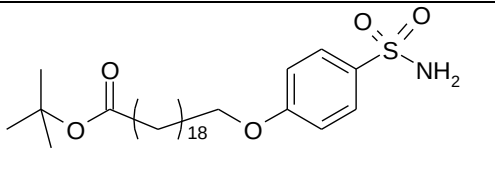
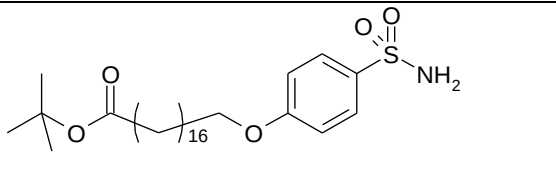
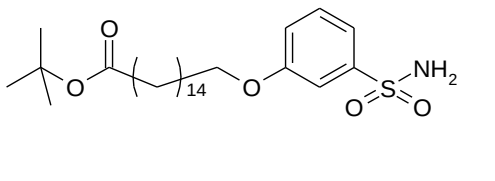
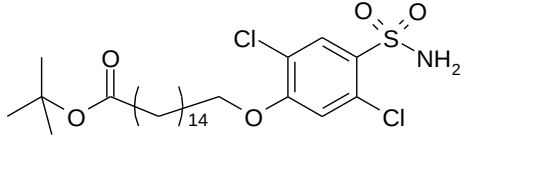
Método LC-Masas: Fase móvil: A: agua (0,01%TFA) B: MeCN (0,01%TFA). Gradiente: 5% B durante 0,2 min, incremento hasta 95% B dentro de 1,3 min, 95% B durante 1,5 min, nuevamente a 5% B dentro de 0,01 min; Caudal: 1,8 ml/min; Columna: Sunfire, 50*4,6 mm, 3,5 μ m Temperatura de la columna: 50°C. LC-MS pureza: 100% (214 nm); Masa: pico encontrado 450,2 ($M + Na$)⁺ a 2,23 min.

20

^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,83 (t, J = 14,8 Hz, 2H), 6,96 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 4,89 (s, 2H), 4,03 (dt, J = 13,0, 6,6 Hz, 2H), 2,20 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 1,73-1,80 (m, 2H), 1,50-1,57 (m, 2H), 1,40-1,48 (m, 11H), 1,37 – 1,19 (m, 12H).

Por consiguiente, se sintetizaron los siguientes compuestos:

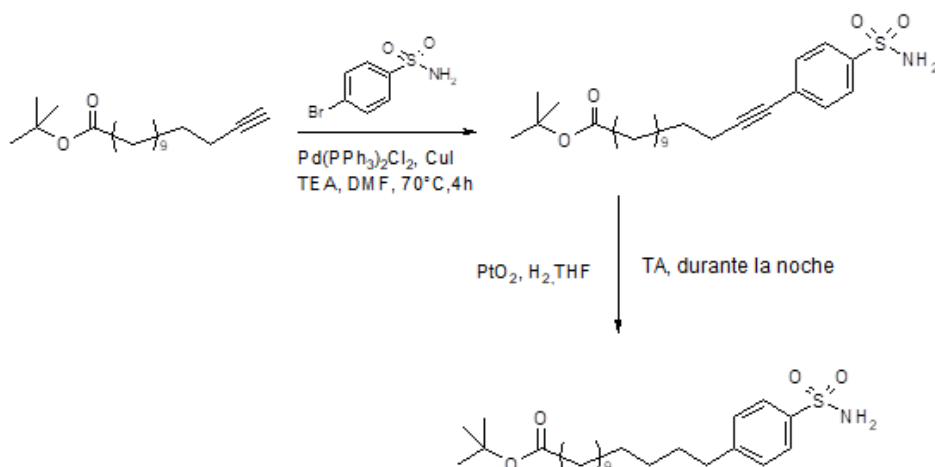
25

		
5	14-(4-sulfamoylphenoxy) tetradecanoate de <i>tert</i> -butilo	16-(4-sulfamoylphenoxy) hexadecanoate de <i>tert</i> -butilo
		
10	16-(2-fluoro-4-sulfamoylphenoxy) hexadecanoate de <i>tert</i> -butilo	16-(2,3-dichloro-4-sulfamoylphenoxy) hexadecanoate de <i>tert</i> -butilo
		
15	12-[4-[2-(4-sulfamoylphenyl)]ethoxy]dodecanoate de <i>tert</i> -butilo	16-(2-chloro-4-sulfamoylphenoxy) hexadecanoate de <i>tert</i> -butilo
		
20	20-(4-sulfamoylphenoxy) icosanoate de <i>tert</i> -butilo	18-(4-sulfamoylphenoxy) octadecanoate de <i>tert</i> -butilo
		
25		

16-(3-sulfamoilfenoxi)hexadecanoato de <i>terc</i> -butilo	de	16-(2,5-dicloro-4-sulfamoil-fenoxi)hexadecanoato de <i>terc</i> -butilo
--	----	---

Esquema sintético: Síntesis de 14-(4-sulfamoilfenil)tetradecanoato

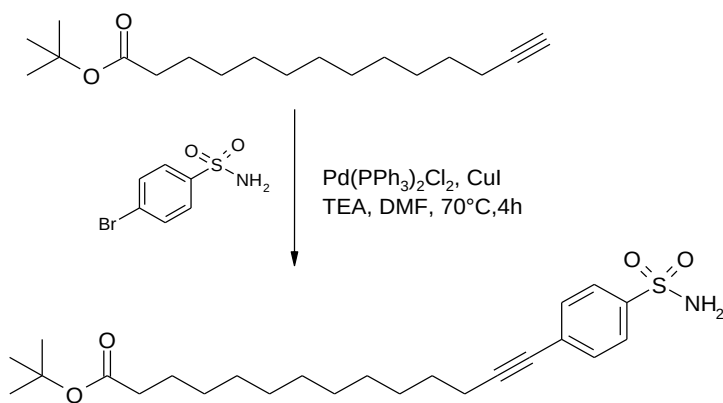
5



10

2.8.2 Síntesis de 14-(4-sulfamoilfenil)tetradec-13-inoato de *terc*-butilo

15



20

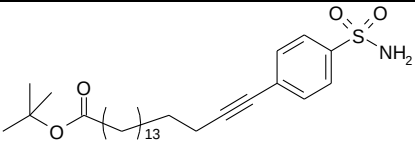
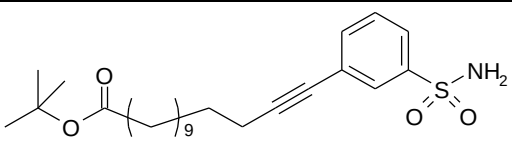
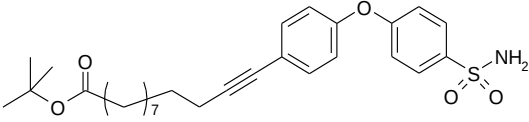
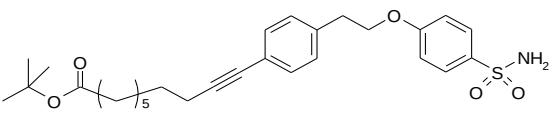
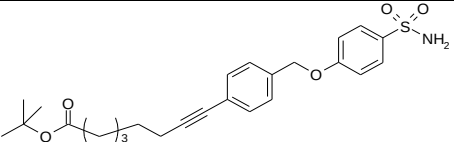
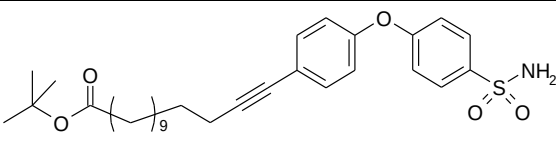
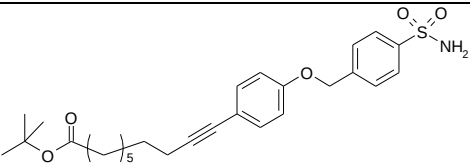
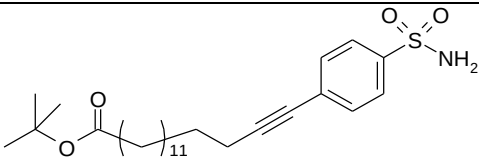
Se añadieron $\text{Pd(PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (0,47 g, 0,68 mmol), CuI (0,13 g, 0,68 mmol), Et_3N (2 g, 20,33 mmol) y tetradec-13-inoato de *terc*-butilo (2,2 g, 7,8 mmol) a una mezcla de 4-bromobencenosulfonamida (1,6 g, 6,8 mmol) en DMF (20 ml). El matraz se vació y se volvió a llenar con N_2 . Luego la mezcla se agitó a 70°C durante 4h. Se añadió agua (80 ml) a la mezcla, se extrajo con EA (2 x 80 ml). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera,

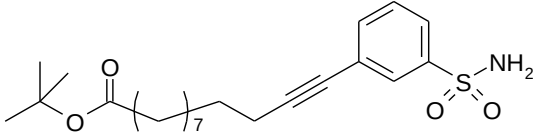
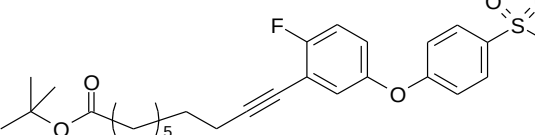
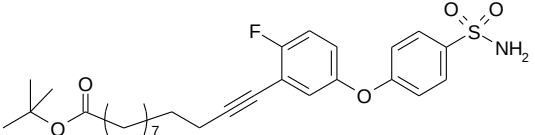
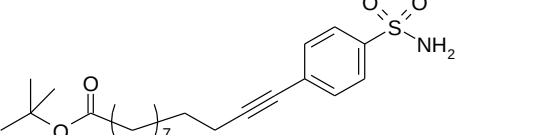
25

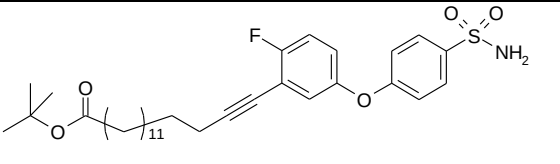
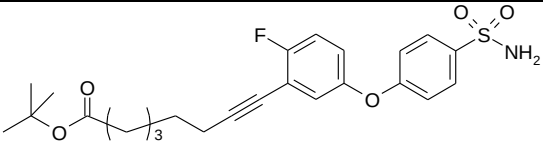
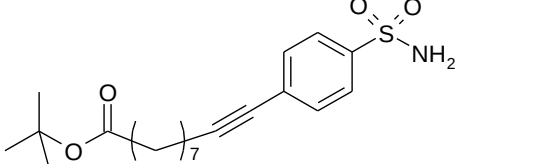
se secó sobre Na_2SO_4 , se concentró al vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (PE:EA=4:1) para dar 14-(4-sulfamoilfenil)tetradec-13-inoato de *terc*-butilo (2,2 g, 5,05 mmol, rendimiento: 76%) en la forma de un sólido amarillo.

Método LC-Masas: Método: Fase móvil: A = 10 mM TFA/ H_2O , B = MeCN; Gradiente: B = 5 % - 95 % en 1,5 min; Caudal: 1,8 ml/min; Columna: Xbridge- C_{18} , 50 x 4,6 mm, 3,5 μm . Pureza LC: 98% (214 nm); Masa: pico encontrado 458 (M+H)⁺ a 2,37min.

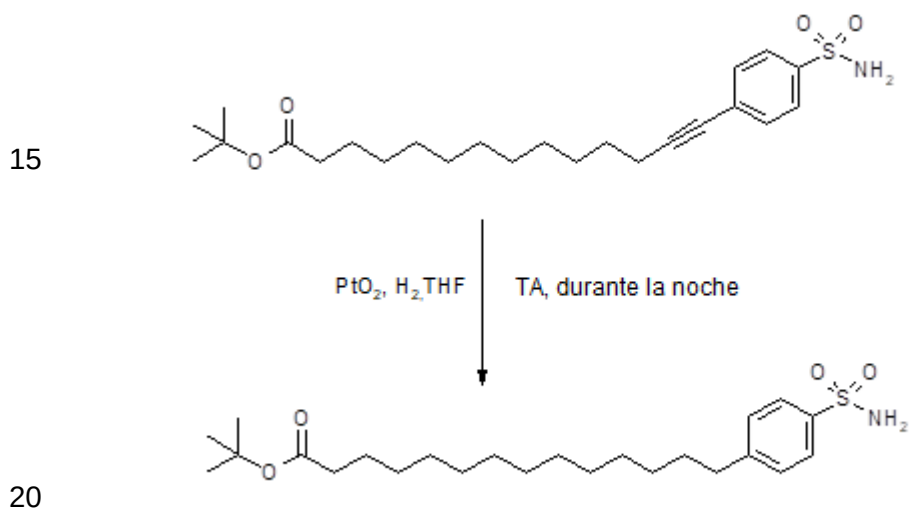
Por consiguiente, se sintetizaron los siguientes compuestos:

10		
	18-(4-sulfamoilfenil) octadec-17-inoato de <i>terc</i> -butilo	14-(3-sulfamoilfenil) tetradec-13-inoato de <i>terc</i> -butilo
15		
	12-[4-(4-sulfamoilfenoxi) fenil]dodec-11-inoato de <i>terc</i> -butilo	10-[4-[2-(4-sulfamoil-fenoxi) etil]fenil]dec-9-inoato de <i>terc</i> -butilo
20		
	8-[4-[(4-sulfamoil fenoxi) metil]fenil]oct-7-inoato de <i>terc</i> -butilo	14-[4-(4-sulfamoilfenoxi) fenil]tetradec-13-inoato de <i>terc</i> -butilo
25		

5	10-[4-[(4-sulfamoilfenil) metoxi]fenil]dec-9-inoato de <i>terc</i> -butilo	16-(4-sulfamoilfenil)hexadec-15-inoato de <i>terc</i> -butilo
10		
15	12-(3-sulfamoilfenil)dodec-11-inoato de <i>terc</i> -butilo	10-[2-fluoro-5-(4-sulfamoilfenoxi)fenil]dec-9-inoato de <i>terc</i> -butilo
20		
25	8-[4-[2-(4-sulfamoilfenoxi) etil]fenil]oct-7-inoato de <i>terc</i> -butilo	14-[4-[(4-sulfamoilfenil) metoxi]fenil]tetradec-13-inoato de <i>terc</i> -butilo
		

		
5	16-[2-fluoro-5-(4-sulfamoylphenyl)fenil]hexadec-15-inoato de <i>terc</i> -butilo	8-[2-fluoro-5-(4-sulfamoylphenyl)fenil]oct-7-inoato de <i>terc</i> -butilo
		
10	10-(4-sulfamoylphenyl)dec-9-inoato de <i>terc</i> -butilo	

2.8.3 Síntesis de 14-(4-sulfamoylphenyl)tetradecanoato de *terc*-butilo

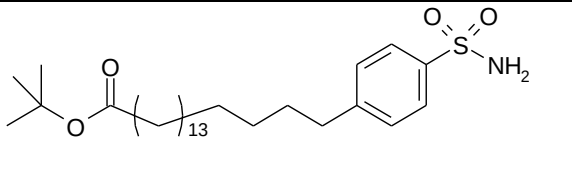
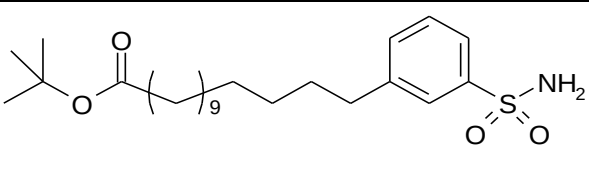
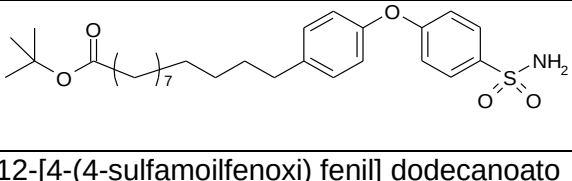
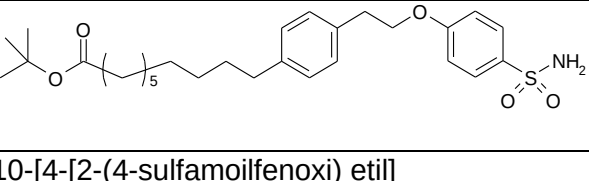
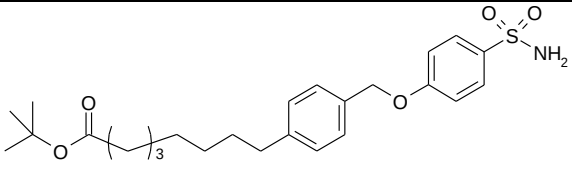
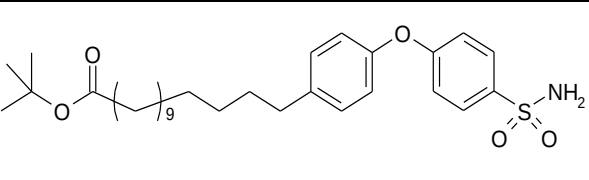
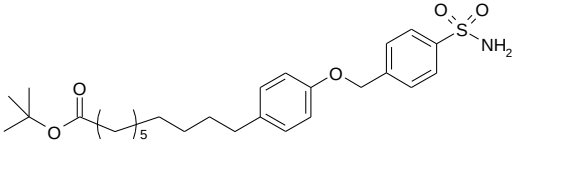
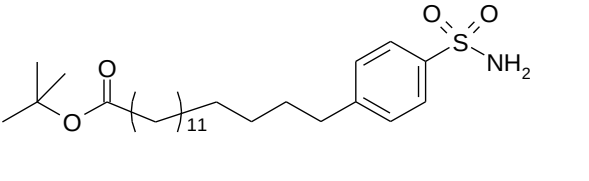


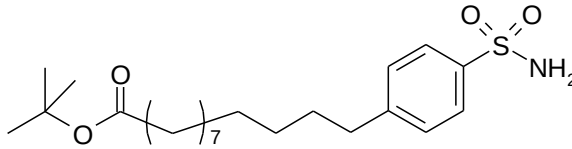
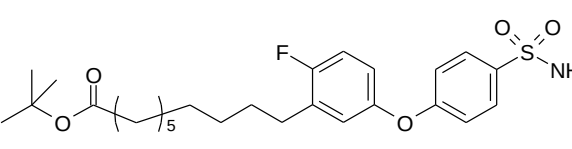
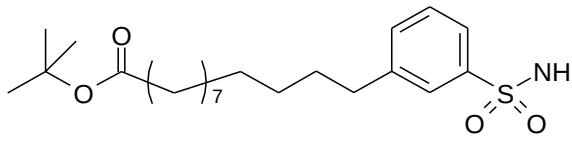
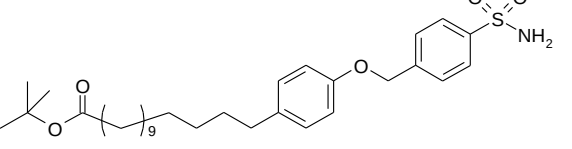
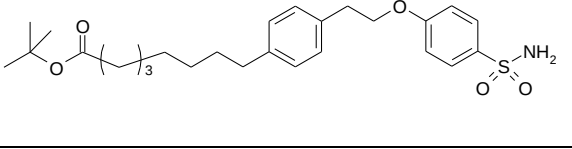
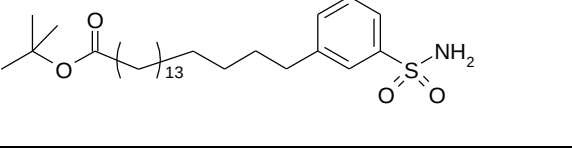
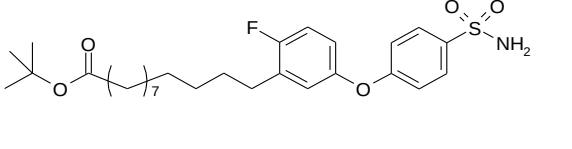
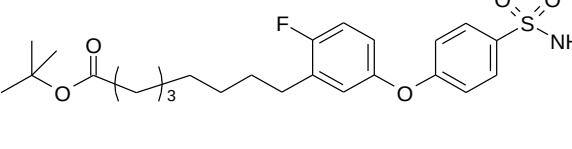
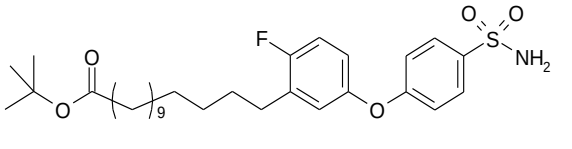
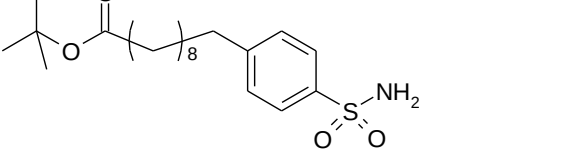
Se añadió PtO_2 (0,23 g, 1,01 mmol) a una mezcla de 14-(4-sulfamoylphenyl)tetradec-13-inoato de *terc*-butilo (2,2 g, 5,0 mmol) en THF (30 ml). El matraz se vació y se volvió a llenar con H_2 . Luego la mezcla se agitó a TA durante la noche. Se filtró, se concentró al vacío para dar 14-(4-sulfamoylphenyl)tetradecanoato (2 g, 4,55 mmol, rendimiento: 90%) en la forma de un sólido gris.

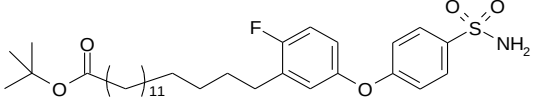
Método LC-Masas: Fase móvil: A = 10 mM TFA/H₂O, B = MeCN; Gradiente: B = 5 % - 95 % en 1,5 min; Caudal: 1,8 ml/min; Columna: Xbridge-C₁₈, 50 × 4,6 mm, 3,5 µm. Pureza LC: 93% (214 nm); Masa: pico encontrado 462 (M+H)⁺ a 2,44min.

¹HNMR (400 MHz, DMSO) δ 7,72 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 7,37 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 7,26 (s, 2H), 2,63 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 2,16 (t, J = 7,3 Hz, 2H), 1,57 (s, 2H), 1,51 – 1,43 (m, 2H), 1,38 (s, 9H), 1,25 (d, J = 14,5 Hz, 18H).

Por consiguiente, se sintetizaron los siguientes compuestos:

10		
	18-(4-sulfamoylphenyl) octadecanoato de <i>tert</i> -butilo	14-(3-sulfamoylphenyl) tetradecanoato de <i>tert</i> -butilo
15		
	12-[4-(4-sulfamoylphenoxy) fenil] dodecanoato de <i>tert</i> -butilo	10-[4-[2-(4-sulfamoylphenoxy) etil] fenil]decanoato de <i>tert</i> -butilo
20		
	8-[4-[(4-sulfamoylphenoxy) metil]fenil]octanoato de <i>tert</i> -butilo	14-[4-(4-sulfamoylphenoxy) fenil]tetradecanoato de <i>tert</i> -butilo
25		

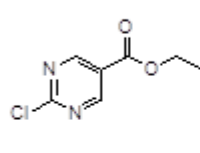
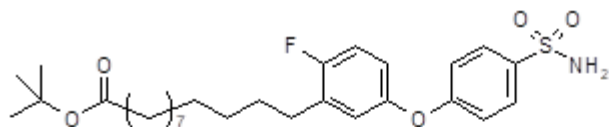
5	10-[4-[(4-sulfamoilfenil)metoxi]fenil]decanoato de <i>terc</i>-butilo 	16-(4-sulfamoilfenil)hexadecanoato de <i>terc</i>-butilo 
10	12-(4-sulfamoilfenil)dodecanoato de <i>terc</i>-butilo 	10-[2-fluoro-5-(4-sulfamoilfenoxi)fenil]decanoato de <i>terc</i>-butilo 
15	12-(3-sulfamoilfenil) dodecanoato de <i>terc</i>-butilo 	14-[4-[(4-sulfamoilfenil)metoxi]fenil]tetradecanoato de <i>terc</i>-butilo 
20	8-[4-[2-(4-sulfamoilfenoxi)etil]fenil]octanoato de <i>terc</i>-butilo 	18-(3-sulfamoilfenil) octadecanoato de <i>terc</i>-butilo 
25	12-[2-fluoro-5-(4-sulfamoilfenoxi)fenil]dodecanoato de <i>terc</i>-butilo 	8-[2-fluoro-5-(4-sulfamoilfenoxi)fenil]octanoato de <i>terc</i>-butilo 

14-[2-fluoro-5-(4-sulfamoilfenoxi)fenil]tetradecanoato de <i>terc</i> -butilo	10-(4-sulfamoilfenil)decanoato de <i>terc</i> -butilo
	
16-[2-fluoro-5-(4-sulfamoilfenoxi)fenil]hexadecanoato de <i>terc</i> -butilo	

5

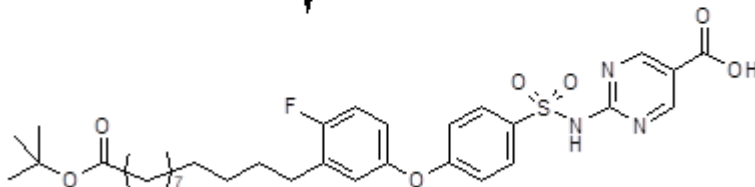
2.8.4 Síntesis de ácido 2-[[4-[3-(12-*terc*-butoxi-12-oxo-dodecil)-4-fluoro-fenoxi]fenil]sulfonil amino] pirimidina-5-carboxílico

10



Cs_2CO_3 , CH_3CN ;
 LiOH , dioxano, H_2O

15



Una mezcla de 12-[2-fluoro-5-(4-sulfamoilfenoxi)fenil]dodecanoato de *terc*-butilo (300 mg, 575 μmol), 2-cloropirimidina-5-carboxilato de etilo (112 mg, 603 μmol) y Cs_2CO_3 (656 mg, 2,01 mmol) en MeCN (6 ml) se calentó hasta 60°C y se agitó durante 3 h (TLC control). La mezcla de reacción se usó en la etapa de saponificación siguiente sin purificación adicional. La suspensión se diluyó con dioxano (6 ml) y se añadió una disolución de LiOH (37 mg, 1,56 mmol) en agua (6 ml). La mezcla se agitó a TA durante 16 h y se añadió más LiOH (37 mg, 1,56 mmol). Toda la mezcla se agitó a TA durante 36 h. La suspensión se vertió en

25

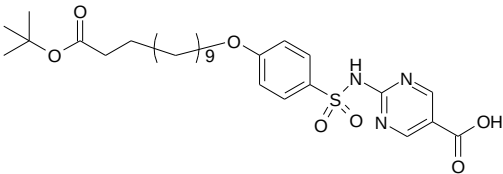
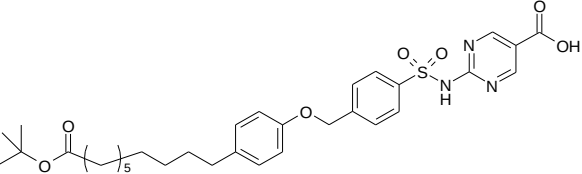
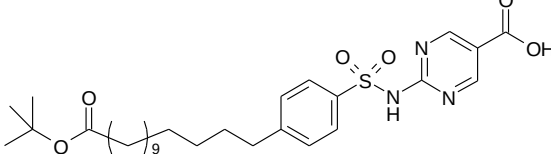
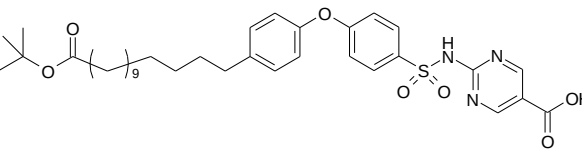
disolución acuosa de ácido cítrico (10 por ciento, 50 ml). La suspensión se filtró y la torta del filtro se lavó con agua y se secó al vacío. El compuesto del título ácido 2-[[4-[3-(12-*terc*-butoxi-12-oxo-dodecil)-4-fluoro-fenoxi]fenil]sulfonilamino] pirimidina-5-carboxílico se obtuvo en la forma de un sólido blanco (350 mg, cuan.).

¹H NMR (400,23 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 12,2 (bs, 2 H), 8,89 (s, 2 H), 7,99 (d, J=8,93 Hz, 2 H), 7,21 (t, J=9,17 Hz, 1 H), 7,05 (m, 4 H), 2,58 (br t, J= 7,46 Hz, 2 H), 2,15 (t, J= 7,27 Hz, 2 H), 1,53 (m, 2 H), 1,47 (m, 2 H), 1,38 (s, 9 H), 1,26-1,22 (m, 14 H).

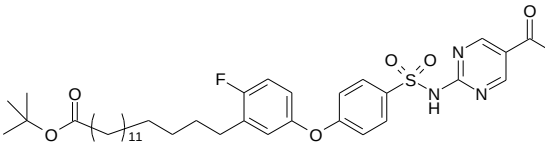
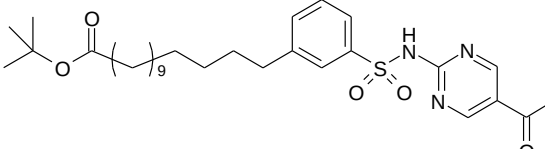
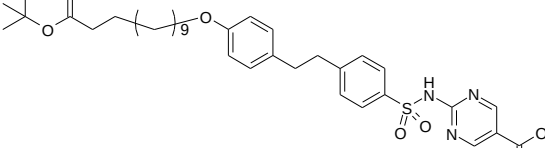
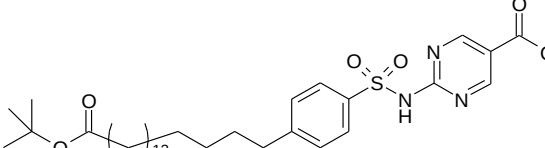
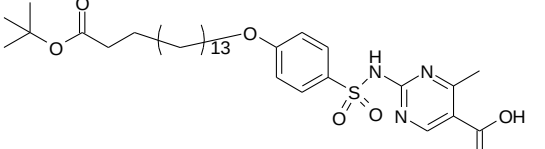
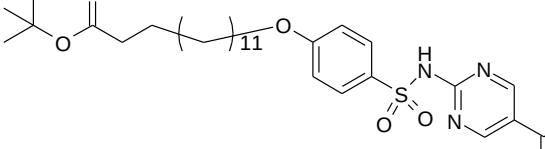
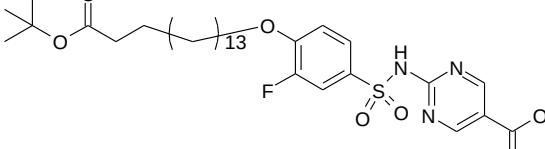
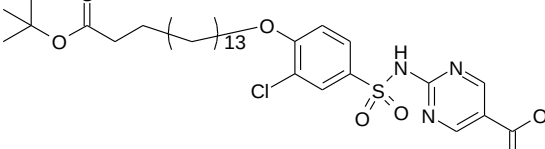
En caso de que el producto deseado no precipitara tras verter en ácido cítrico acuoso, la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo, las capas orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío. Los productos brutos se sometieron a cromatografía en columna usando MeOH / CH₂Cl₂ como eluyente.

Por consiguiente, se sintetizaron los siguientes compuestos:

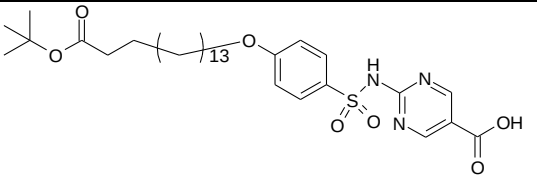
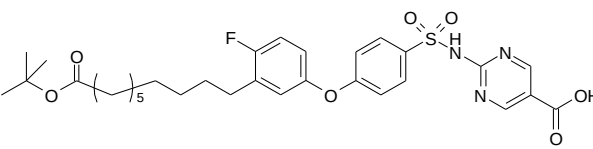
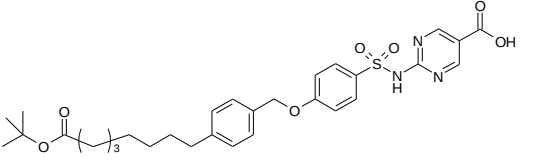
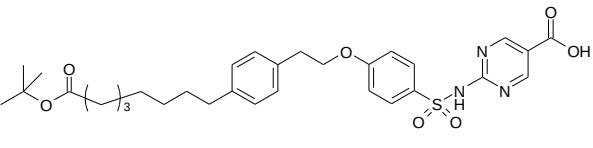
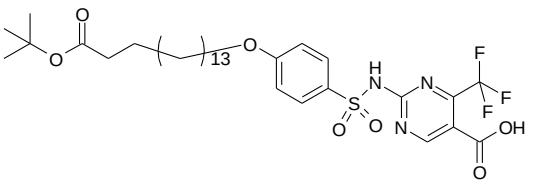
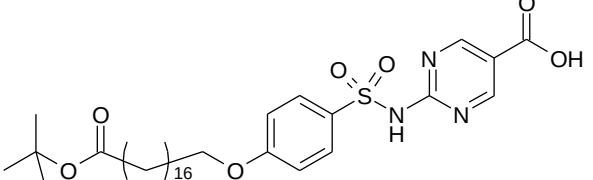
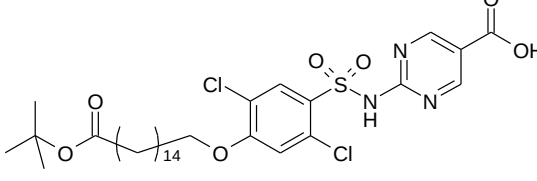
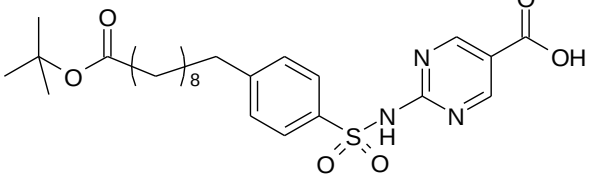
15

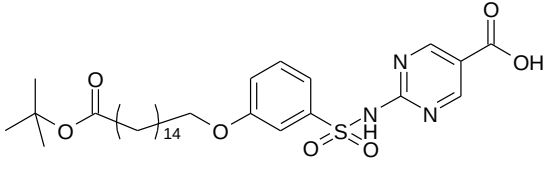
	
ácido 5-[[4-(12-<i>terc</i>-butoxi-12-oxo-dodecoxi)fenil]sulfonilamino]pirimidina-2-carboxílico	ácido 5-[[4-[[4-(10-<i>terc</i>-butoxi-10-oxo-decil)fenoxi]metil]fenil]sulfonilamino]pirimidina-2-carboxílico
	
ácido 5-[[4-(14-<i>terc</i>-butoxi-14-oxo-tetradecil)fenil]sulfonilamino]pirimidina-2-carboxílico	ácido 5-[[4-[4-(14-<i>terc</i>-butoxi-14-oxo-tetradecil)fenoxi]fenil]sulfonilamino]pirimidina-2-carboxílico

25

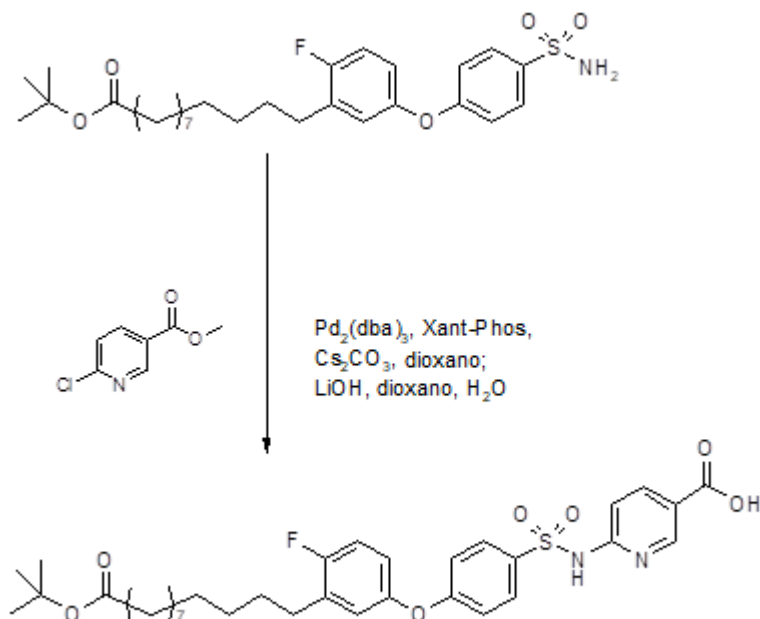
		
5	ácido 5-[[4-[3-(16-<i>tert</i>-butoxi-16-oxo-hexadecil)-4-fluoro-fenoxi]fenil]sulfonilamino]pirimidina-2-carboxílico	ácido 5-[[3-(14-<i>tert</i>-butoxi-14-oxo-tetradecil)fenil]sulfonilamino]pirimidina-2-carboxílico
10		
	ácido 5-[[4-[2-[4-(12-<i>tert</i>-butoxi-12-oxododecoxi)fenil]etil]fenil]sulfonilamino]pirimidina-2-carboxílico	ácido 5-[[4-(18-<i>tert</i>-butoxi-18-oxooctadecil)fenil]sulfonilamino]pirimidina-2-carboxílico
15		
20	ácido 2-[[4-(16-<i>tert</i>-butoxi-16-oxohexadecoxi)fenil]sulfonilamino]-4-metil-pirimidina-5-carboxílico	ácido 5-[[4-(14-<i>tert</i>-butoxi-14-oxotetradecoxi)fenil]sulfonilamino]pirimidina-2-carboxílico
		
25	ácido 2-[[4-(16-<i>tert</i>-butoxi-16-oxohexadecoxi)-3-fluoro-fenil]sulfonilamino]pirimidina-5-carboxílico	ácido 2-[[4-(16-<i>tert</i>-butoxi-16-oxohexadecoxi)-3-cloro-fenil]sulfonilamino]pirimidina-5-carboxílico

	sulfonilamino]pirimidina-5-carboxílico	fenil]sulfonilamino]pirimidina-5-carboxílico
5	ácido 2-[[4-(16- <i>tert</i> -butoxi-16-oxo-hexadecil)fenil]sulfonilamino]pirimidina-5-carboxílico	ácido 2-[[4-(12- <i>tert</i> -butoxi-12-oxo-dodecil)fenil]sulfonilamino]pirimidina-5-carboxílico a
10		
15		
20	ácido 5-[[4-[2-[4-(10- <i>tert</i> -butoxi-10-oxodecil)fenil]etoxi]fenil]sulfonilamino]pirimidina-2-carboxílico	ácido 2-[[4-[3-(8- <i>tert</i> -butoxi-8-oxooctil)-4-fluoro-fenoxi]fenil]sulfonilamino]pirimidina-5-carboxílico a
25	ácido 5-[[4-[3-(14- <i>tert</i> -butoxi-14-oxotetradecil)-4-fluoro-fenoxi]fenil]sulfonilamino]pirimidina-2-carboxílico	ácido 2-[[4-[[4-(14- <i>tert</i> -butoxi-14-oxotetradecil)fenoxi]metil]fenil]sulfonilamino]pirimidina-5-carboxílico

		
5	ácido 5-[[4-(16- <i>tert</i> -butoxi-16-oxohexadecoxi)fenil] sulfonilamino]pirimidina-2-carboxílico	ácido 2-[[4-[3-(10- <i>tert</i> -butoxi-10-oxodecil)-4-fluoro-fenoxi]fenil] sulfonilamino] pirimidina-5-carboxílico
		
10	ácido 5-[[4-[[4-(8- <i>tert</i> -butoxi-8-oxooctil)fenil]metoxi]fenil] sulfonilamino]pirimidina-2-carboxílico	ácido 2-[[4-[2-[4-(8- <i>tert</i> -butoxi-8-oxooctil)fenil]etoxi]fenil]sulfonilamino] pirimidina-5-carboxílico
15		
	ácido 2-[[4-(16- <i>tert</i> -butoxi-16-oxohexadecoxi) fenil]sulfonilamino]-4-(trifluorometil) pirimidina-5-carboxílico	ácido 2-[[4-(18- <i>tert</i> -butoxi-18-oxooctadecoxi)fenil]sulfonilamino]pirimidina-5-carboxílico
20		
25	ácido 2-[[4-(16- <i>tert</i> -butoxi-16-oxohexadecoxi)-2,5-dicloro-fenil] sulfonilamino]pirimidina-5-carboxílico	ácido 2-[[4-(10- <i>tert</i> -butoxi-10-oxodecil)fenil]sulfonilamino]pirimidina-5-carboxílico

	sulfonilamino]pirimidina-5-carboxílico	carboxílico
		
5	ácido 2-[[3-(16- <i>tert</i> -butoxi-16-oxohexadecoxi)fenil]sulfonilamino]pirimidina-5-carboxílico	

2.8.5 Síntesis de ácido 6-[[4-[3-(12-*tert*-butoxi-12-oxododecil)-4-fluorofenoxi]fenil]sulfonil-amino]piridina-3-carboxílico



Una mezcla de 12-[2-fluoro-5-(4-sulfamoylphenoxy)fenil]dodecanoato de *tert*-butilo (300 mg, 575 μmol), 6-cloronicotinoato de metilo (102 mg, 603 μmol), Cs_2CO_3 (468 mg, 1,44 mmol), tris(dibencilidenoacetona)dipaladio (26 mg, 29 μmol) y 4,5-bis(difenil-fosfino)-9,9-dimetilxanteno ("xantphos", 17 mg, 29 μmol) en dioxano (6 ml) se calentó a 80°C en una

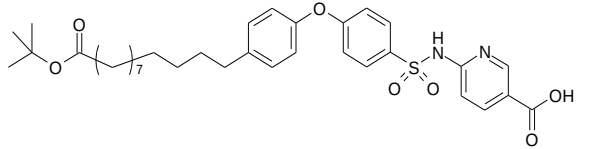
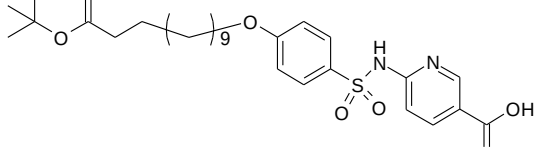
atmósfera de argón durante 3 h (TLC control). La mezcla de reacción se usó en la siguiente etapa de saponificación sin purificación adicional.

La suspensión se diluyó con dioxano (6 ml) y se añadió una disolución de LiOH (37 mg, 1,56 mmol) en agua (6 ml). La mezcla se agitó a TA durante 16 h y se añadió más LiOH (37 mg, 1,56 mmol). Toda la mezcla se agitó a TA durante 36 h. La suspensión se vertió en disolución acuosa de ácido cítrico (10 por ciento, 50 ml). La suspensión se filtró y la torta del filtro se lavó con agua y se secó al vacío. El compuesto del título ácido 6-[[4-[3-(12-*terc*-butoxi-12-oxo-dodecil)-4-fluoro-fenoxi]fenil]sulfonil-amino]piridina -3-carboxílico se obtuvo en la forma de un sólido blanco (350 mg, cuan.).

¹H NMR (400,23 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 12,5 (br s, 1H), 8,54 (br s, 1 H), 8,11 (dd, J=8,93, 2,20 Hz, 1 H), 7,91 (br d, J=8,68 Hz, 2 H), 7,80 (m, 1 H), 7,19 (m, 2 H), 7,04 (m, 4 H), 2,58 (br t, J= 7,46 Hz, 2 H), 2,15 (t, J=7,27 Hz, 2 H), 1,48 (m, 4 H), 1,38 (s, 9 H), 1,26-1,22 (m, 14 H).

En caso de que el producto deseado no precipitara tras verter en ácido cítrico acuoso, la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo, las capas orgánicas se secaron con Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío. Los productos brutos se sometieron a cromatografía en columna usando MeOH / CH₂Cl₂ como eluyente.

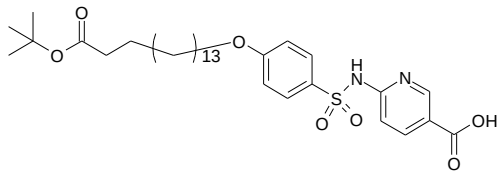
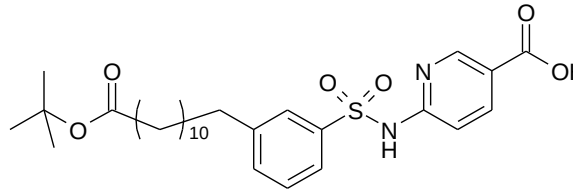
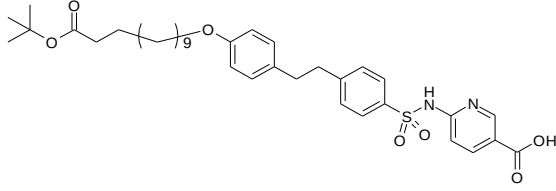
Por consiguiente, se sintetizaron los siguientes compuestos:

	
ácido 6-[[4-[4-(12-<i>terc</i>-butoxi-12-oxo-dodecil)fenoxi]fenil]sulfonil-amino]piridina-3-	ácido 6-[[4-(12-<i>terc</i>-butoxi-12-oxo-dodecoxi)fenil] sulfonil-amino]piridina-3-

	carboxílico	carboxílico
5		
10	ácido 6-[[4-[[4-(10- <i>tert</i> -butoxi-10-oxo-decil)fenoxi]metil]fenil]sulfonilamino] piridina-3-carboxílico	ácido 6-[[4-[2-[4-(10- <i>tert</i> -butoxi-10-oxo-decil)fenil] etoxi] fenil]sulfonilamino] piridina-3-carboxílico
15	ácido 6-[[4-(14- <i>tert</i> -butoxi-14-oxo-tetradecil)fenil]sulfonil amino]piridina-3-carboxílico	ácido 6-[[4-[3-(14- <i>tert</i> -butoxi-14-oxo-tetradecil)-4-fluoro-fenoxi] fenil]sulfonil amino]piridina-3-carboxílico
20	ácido 6-[[4-[3-(16- <i>tert</i> -butoxi-16-oxo-hexadecil)-4-fluoro-fenoxi] fenil]sulfonilamino] piridina-3-carboxílico	ácido 6-[[4-(18- <i>tert</i> -butoxi-18-oxo-octadecil)fenil] sulfonilamino]piridina-3-carboxílico
25	ácido 6-[[4-(14- <i>tert</i> -butoxi-14-oxo-tetradecoxi) fenil]sulfonilamino]piridina-3-	ácido 6-[[4-(16- <i>tert</i> -butoxi-16-oxo-hexadecoxi)-2,3-dicloro-fenil] sulfonilamino]

	carboxílico	piridina-3-carboxílico
5		
10		
15		
20		
25		

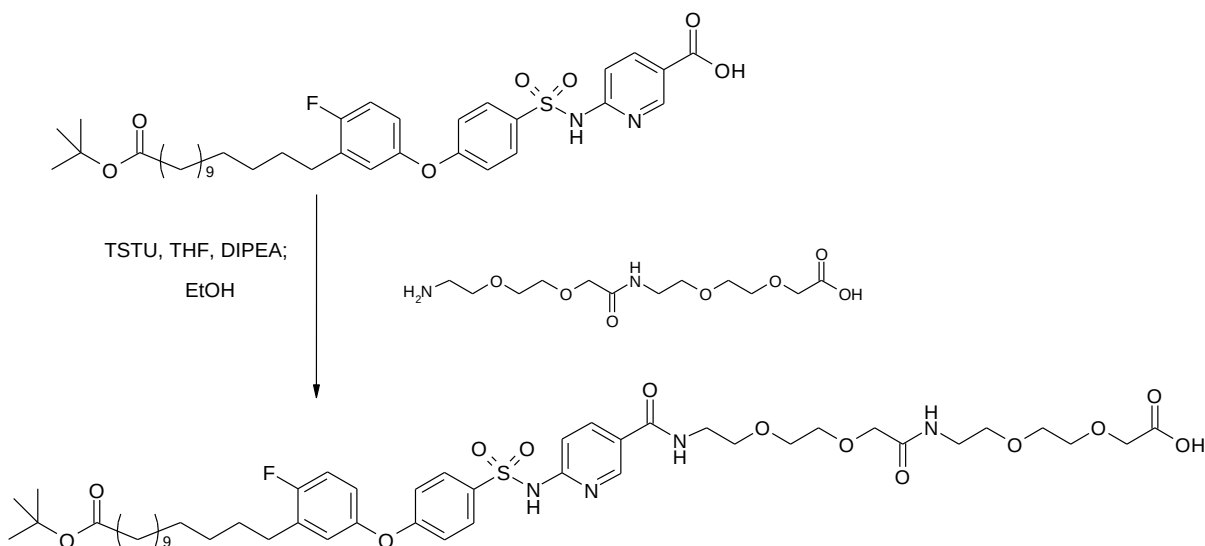
	tetradecil) fenoxi]fenil]sulfonilamino]piridina-3-carboxílico	hexadecoxi)fenil]sulfonilamino]piridina-3-carboxílico
5		
10		
15		
20	ácido 6-[[4-(10- <i>tert</i> -butoxi-10-oxo-decoxi)fenil]sulfonilamino]piridina-3-carboxílico	ácido 6-[[4-(10- <i>tert</i> -butoxi-10-oxo-decil)fenil]sulfonilamino]piridina-3-carboxílico
25		

	ácido 6-[[3-(14- <i>terc</i> -butoxi-14-oxo-tetradecil)fenil]sulfonilamino]piridina-3-carboxílico	ácido 6-[[4-(20- <i>terc</i> -butoxi-20-oxo-icosoxi)fenil]sulfonilamino]piridina-3-carboxílico
5		
10	ácido 6-[[4-(16- <i>terc</i> -butoxi-16-oxohexadecoxi)fenil]sulfonilamino]piridina-3-carboxílico	ácido 6-[[3-(12- <i>terc</i> -butoxi-12-oxododecil)fenil]sulfonilamino]piridina-3-carboxílico
		
15	ácido 6-[[4-[2-[4-(12- <i>terc</i> -butoxi-12-oxododecoxi)fenil] etil]fenil]sulfonilamino]piridina-3-carboxílico	

2.9 Ejemplos para la síntesis de los compuestos con la fórmula I de acuerdo con el esquema 1

2.9.1 Síntesis de ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[6-[[4-[3-(14-*terc*-butoxi-14-oxo-tetradecil)-4-fluoro-fenoxi]fenil]sulfonilamino]piridina-3-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]-etoxi]acético

5



10

Una mezcla de ácido 6-[[4-[3-(14-*tert*-butoxi-14-oxo-tetradecil)-4-fluoro-fenoxi]fenil]sulfonil amino]piridina-3-carboxílico (169 mg, 251 μ mol), TSTU (80 mg, 264 μ mol) y DIPEA (132 μ l, 97 mg, 1,25 mmol) en 6 ml de THF se agitó a TA durante 16 h. Después de 16 h, el disolvente se eliminó a presión reducida y se añadió una disolución de ácido [2-(2-{2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetilamino}-etoxi)-etoxi]-acético (85 mg, 277 μ mol) en 6 ml abs. Se añadió EtOH, y la mezcla se agitó a TA durante 16 h. Los componentes volátiles se eliminaron a presión reducida, el residuo resultante se disolvió en CH_2Cl_2 y se lavó con disolución acuosa de KHSO_4 al 10%. La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El producto bruto se purificó por RP HPLC para dar ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[6-[[4-[3-(14-*tert*-butoxi-14-oxo-tetradecil)-4-fluoro-fenoxi]fenil] sulfonil amino]piridina-3-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil] amino]etoxi] etoxi]acético (106 mg, 44 %).

15

20

^1H NMR (400,23 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 12,29 (br s, 1 H), 8,52 (m, 2 H), 8,09 (dd, $J=8,93$, 2,32 Hz, 1 H), 7,89 (d, $J=8,80$ Hz, 2 H), 7,61 (br t, $J=5,69$ Hz, 1 H), 7,18 (m, 2 H), 7,03 (m, 4 H), 4,01 (s, 2 H), 3,86 (s, 2 H), 3,20 – 3,68 (m, 16 H), 2,58 (br t, $J=7,52$ Hz, 2 H), 2,15 (t, $J=7,27$ Hz, 2 H), 1,49 (m, 4 H), 1,38 (s, 9 H), 1,25 (m, 18 H).

25

Por consiguiente, se sintetizaron los siguientes compuestos:

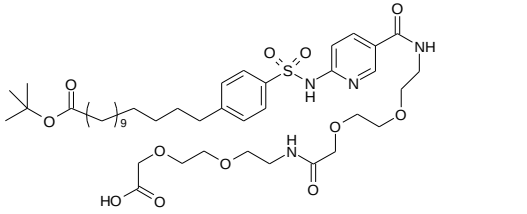
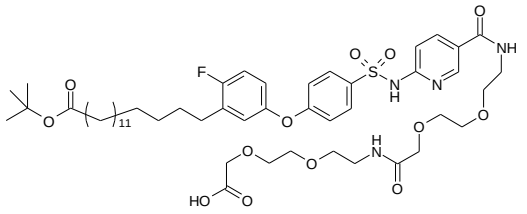
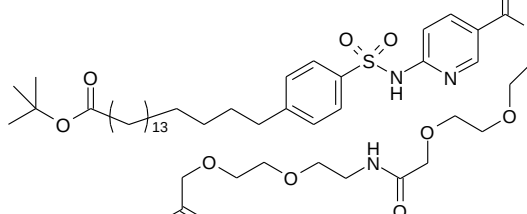
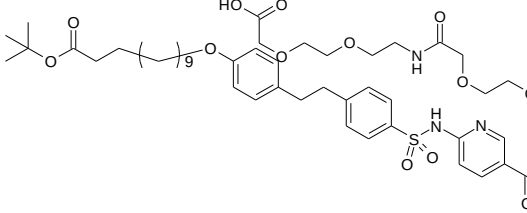
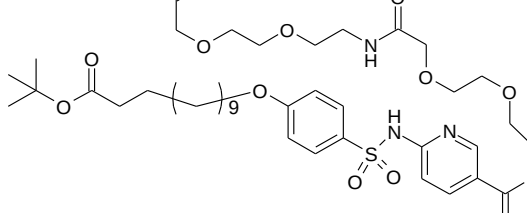
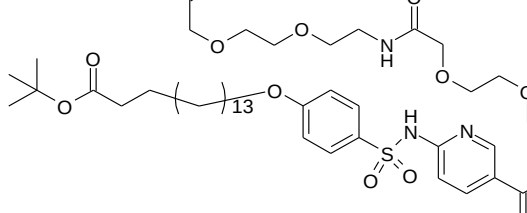
5

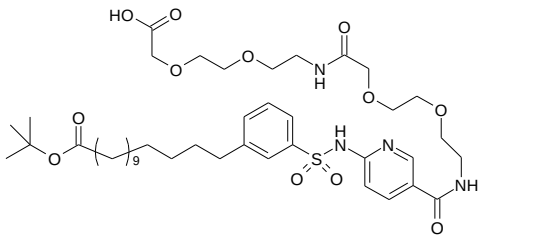
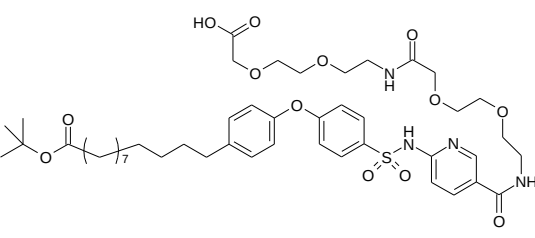
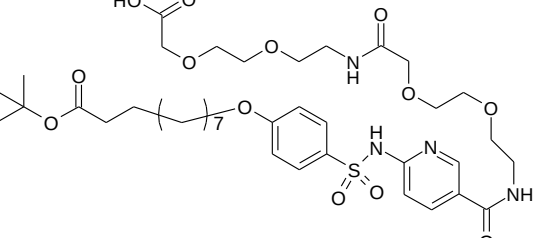
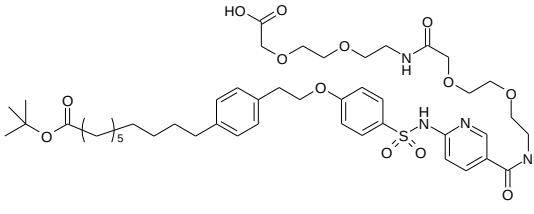
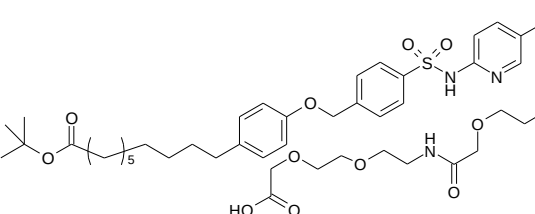
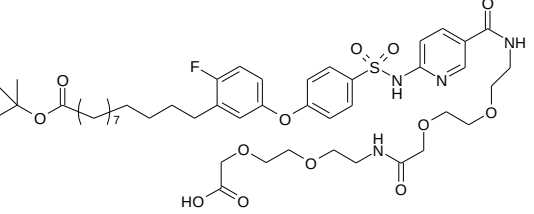
10

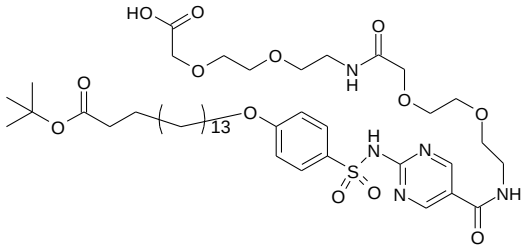
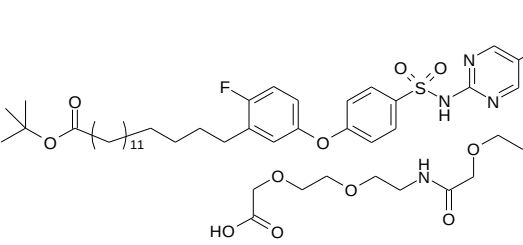
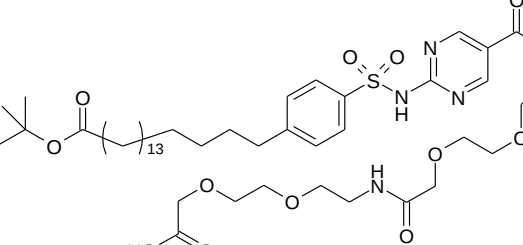
15

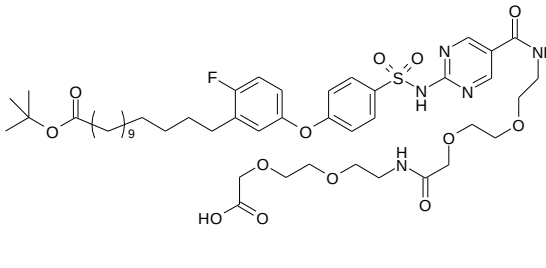
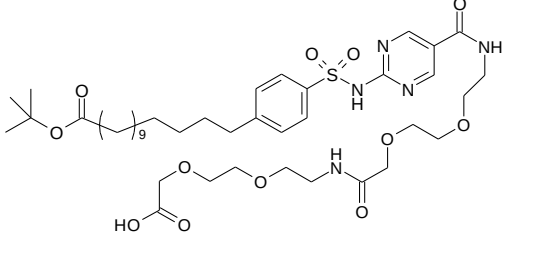
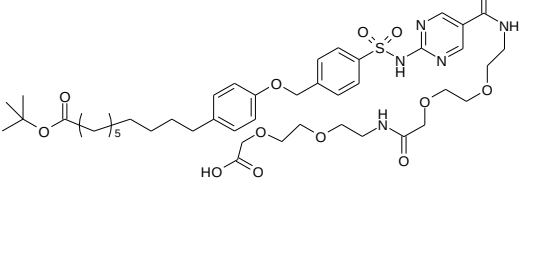
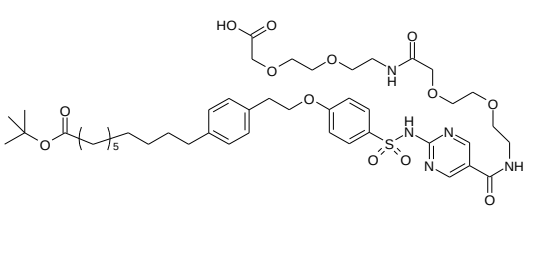
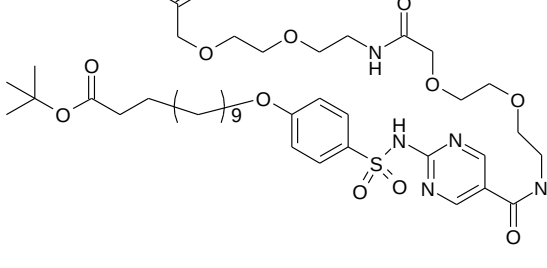
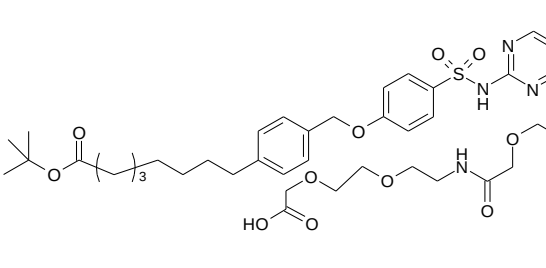
20

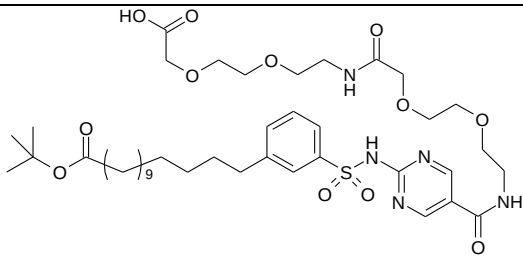
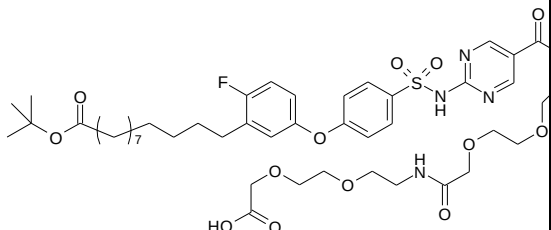
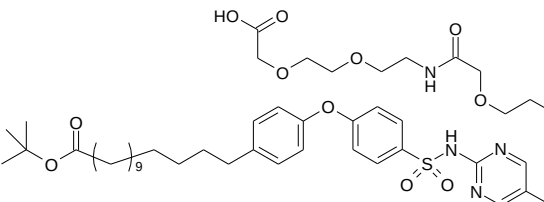
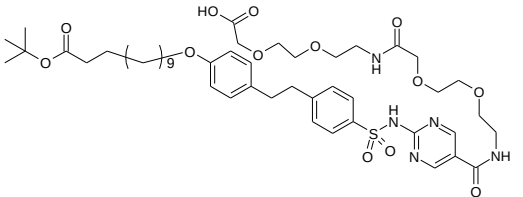
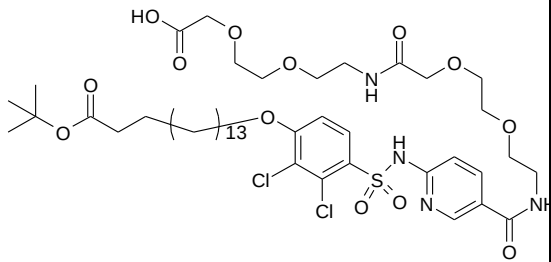
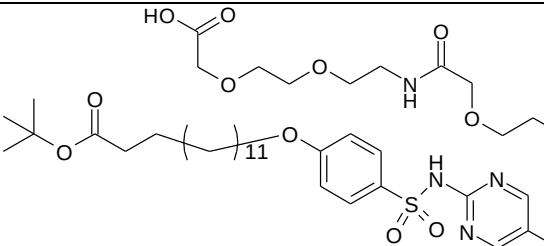
25

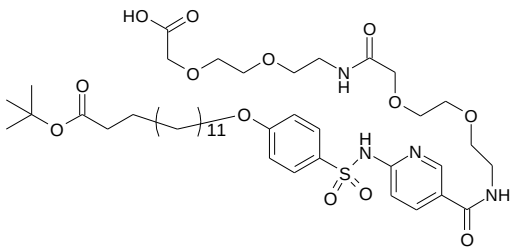
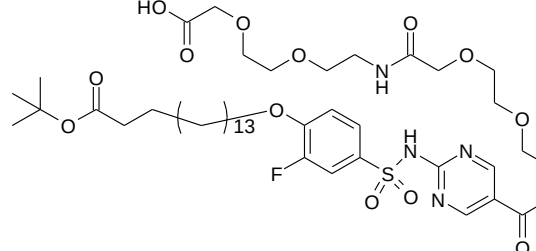
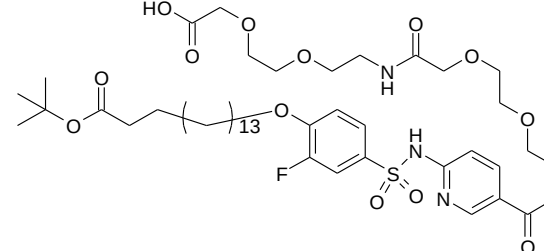
		
ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[6-[[4-(14-<i>terc</i>-butoxi-14-oxo-tetradecil)fenil]sulfonilamino] piridina-3-carbonil]amino] etoxi]etoxi]acetil] amino]etoxi] etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[6-[[4-[3-(16-<i>terc</i>-butoxi-16-oxo-hexadecil)-4-fluoro-fenoxi]fenil] sulfonil amino]piridina-3-carbonil] amino]etoxi] etoxi]acetil] amino]etoxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[6-[[4-(18-<i>terc</i>-butoxi-18-oxo-octadecil)fenil] sulfonilamino]piridina-3-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil] amino]etoxi]etoxi]acético
		
ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[6-[[4-[2-[4-(12-<i>terc</i>-butoxi-12-oxo-dodecoxi)fenil] sulfonilamino] piridina-3-carbonil]amino] etoxi]etoxi]acetil] amino]etoxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[6-[[4-(12-<i>terc</i>-butoxi-12-oxo-dodecoxi)fenil] sulfonilamino] piridina-3-carbonil]amino] etoxi]etoxi]acetil] amino]etoxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[6-[[4-(16-<i>terc</i>-butoxi-16-oxo-dodecoxi)fenil] sulfonilamino] piridina-3-carbonil]amino] etoxi]etoxi]acetil] amino]etoxi]etoxi]acético

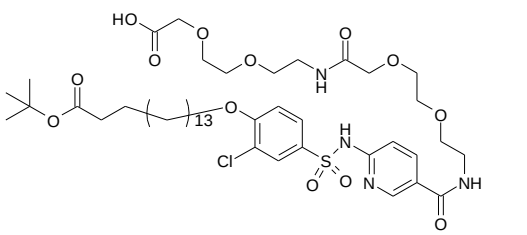
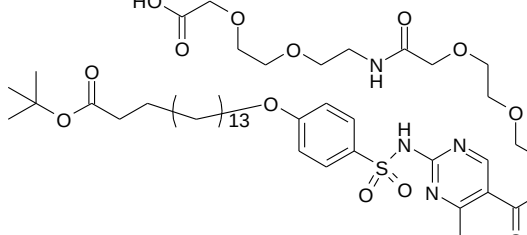
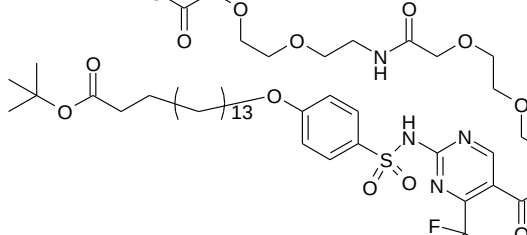
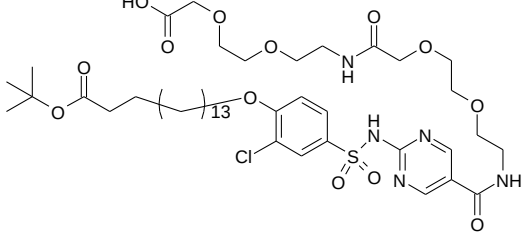
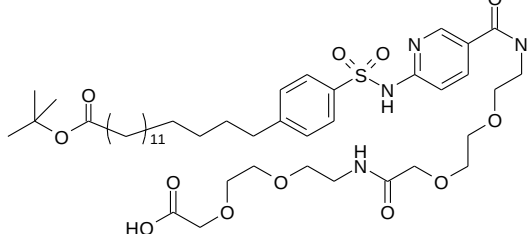
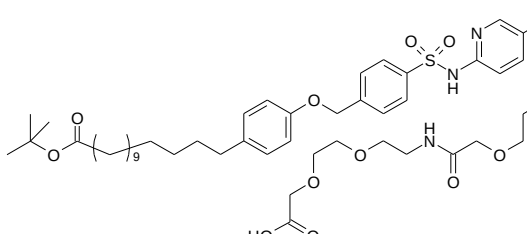
etil]fenil]sulfonilamino]piridina-3-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético	fenil]sulfonilamino]piridina-3-carbonil]amino] etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético	hexadecoxi)fenil]sulfonilamino]piridina-3-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético
		
ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[6-[[3-(14-terc-butoxi-14-oxo-tetradecil)fenil]sulfonilamino]piridina-3-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[6-[[4-(12-terc-butoxi-12-oxo-dodecil)fenoxi]fenil]sulfonilamino]piridina-3-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[6-[[4-(10-terc-butoxi-10-oxo-decoxi)fenil]sulfonilamino]piridina-3-carbonil]amino]etoxi] etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético
		

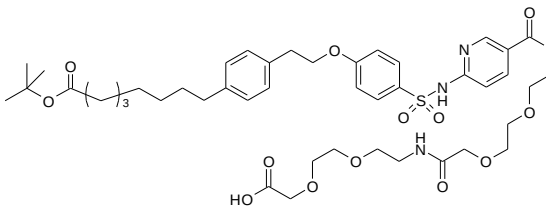
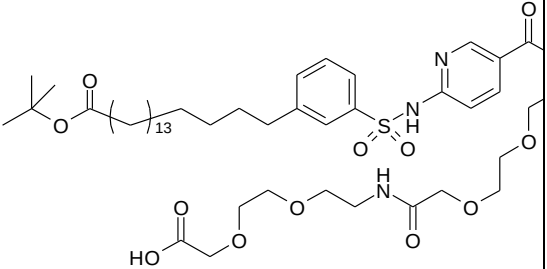
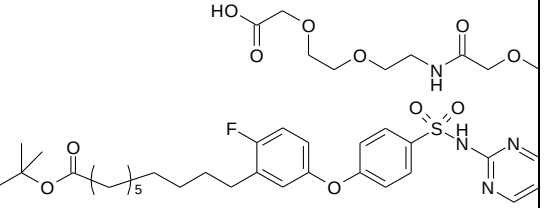
ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[6-[[4-[2-[4-(10-<i>terc</i>-butoxi-10-oxo-decil)fenil]etoxi]fenil]sulfonilamino]piridina-3-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[6-[[4-[[4-(10-<i>terc</i>-butoxi-10-oxo-decil)fenoxi]metil]fenil]sulfonilamino]piridina-3-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[6-[[4-[3-(12-<i>terc</i>-butoxi-12-oxo-dodecil)-4-fluoro-fenoxi]fenil] sulfonilamino]piridina-3-carbonil] amino]etoxi] etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético
		
ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[5-[[4-(16-<i>terc</i>-butoxi-16-oxo-hexadecoxi)fenil]sulfonilamino]pirimidina-2-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[5-[[4-[3-(16-<i>terc</i>-butoxi-16-oxo-hexadecil)-4-fluoro-fenoxi]fenil]sulfonil amino]pirimidina-2-carbonil] amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[5-[[4-(18-<i>terc</i>-butoxi-18-oxo-octadecil)fenil]sulfonilamino]pirimidina-2-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético

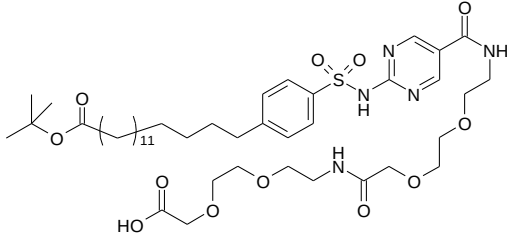
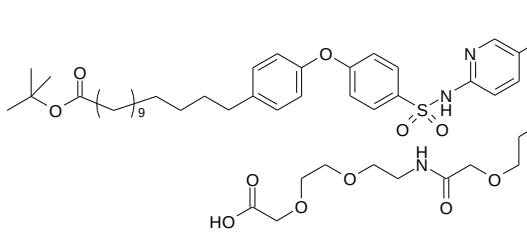
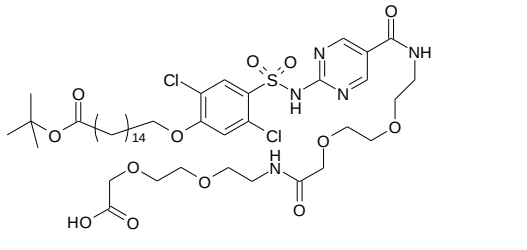
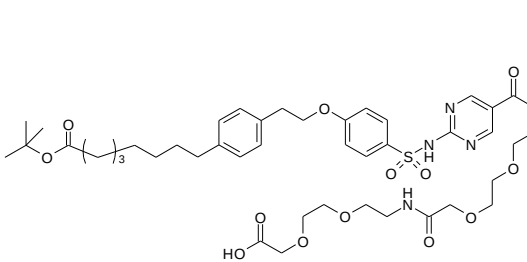
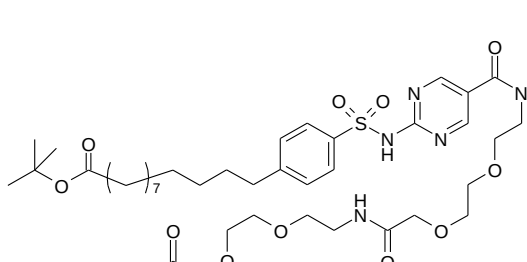
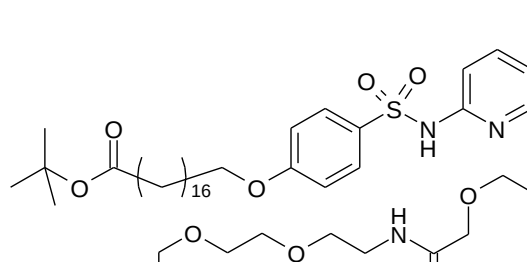
		
ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[5-[[4-[3-(14-<i>terc</i>-butoxi-14-oxo-tetradecil)-4-fluoro-fenoxi]fenil] sulfonilamino] pirimidina-2-carbonil]amino] etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[5-[[4-(14-<i>terc</i>-butoxi-14-oxo-tetradecil)fenil] sulfonilamino] pirimidina-2-carbonil]amino] etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[5-[[4-[(10-<i>terc</i>-butoxi-10-oxo-decil) fenoxi]metil] fenil]sulfonilamino] pirimidina-2-carbonil]amino] etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético
		
ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[5-[[4-[2-[4-(10-<i>terc</i>-butoxi-10-oxo-decil) sulfonilamino] pirimidina-2-carbonil]amino] etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[5-[[4-(12-<i>terc</i>-butoxi-12-oxo-dodecoxi) sulfonilamino] pirimidina-2-carbonil]amino] etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[5-[[4-[(8-<i>terc</i>-butoxi-8-oxo-octil)fenil] sulfonilamino] pirimidina-2-carbonil]amino] etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético

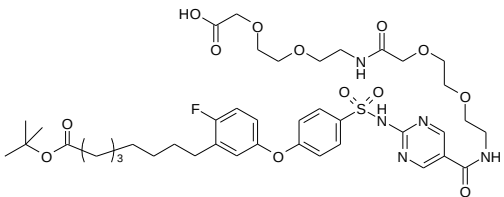
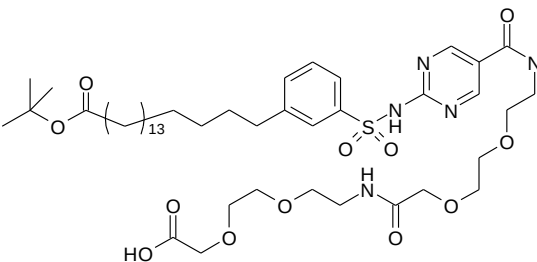
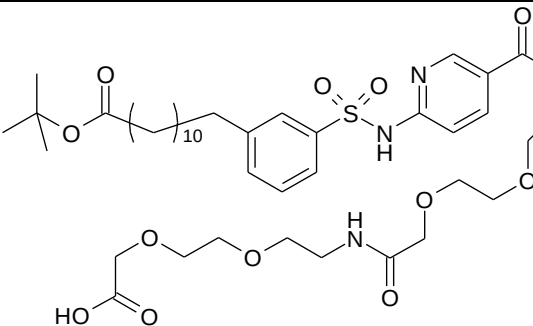
fenil]etoxi]fenil]sulfonilamino]pirimidina-2- carbonil] amino]etoxi]etoxi]acetil] amino]etoxi]etoxi]acético	fenil]sulfonilamino]pirimidina-2- carbonil]amino]etoxi] etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético	metoxi]fenil]sulfonilamino]pirimidina-2- carbonil]amino]etoxi] etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético
		
ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[5-[[3-(14- <i>terc</i> - butoxi-14-oxo-tetradecil)fenil] sulfonilamino]pirimidina-2- carbonil]amino] etoxi]etoxi] acetil]amino]etoxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[5-[[4-[3-(12- <i>terc</i> - butoxi-12-oxo-dodecil)-4-fluoro- fenoxi]fenil] sulfonil amino]pirimidina-2- carbonil]amino] etoxi]etoxi]acetil] amino]etoxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[5-[[4-[4-(14- <i>terc</i> - butoxi-14-oxo-tetradecil)fenoxi] fenil]sulfonilamino] pirimidina-2- carbonil]amino]etoxi] etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético
		

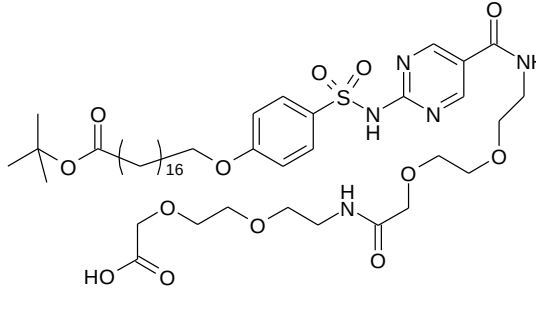
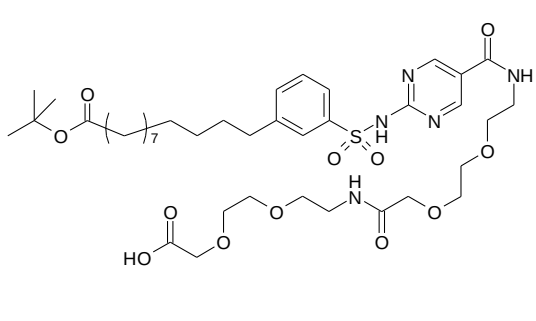
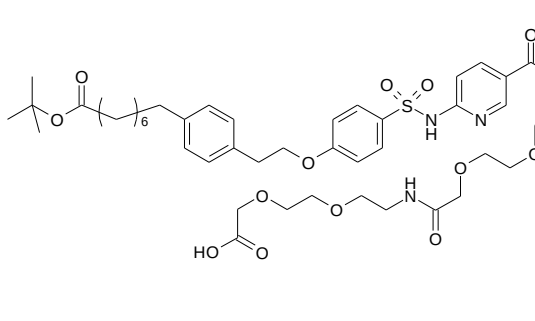
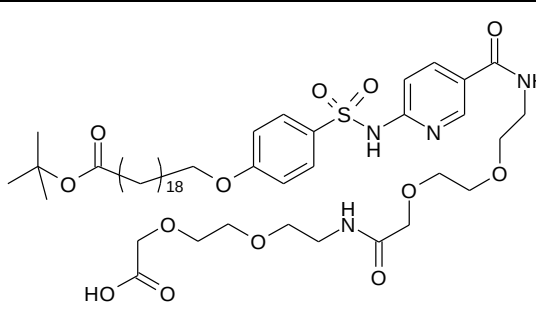
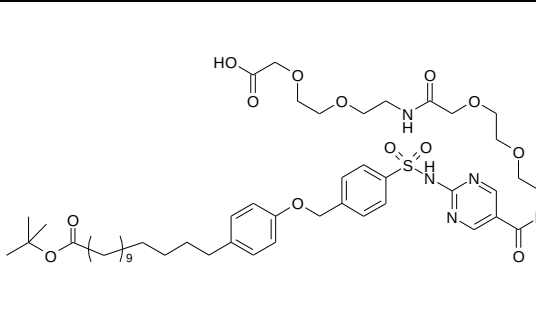
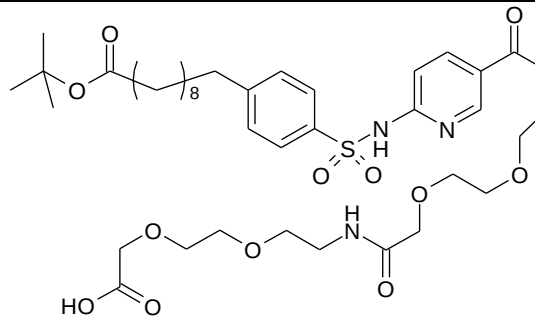
ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[5-[[4-[2-[4-(12-<i>terc</i>-butoxi-12-oxo-dodecoxi)fenil]etil]fenil]sulfonilamino]pirimidina-2-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[6-[[4-(16-<i>terc</i>-butoxi-16-oxo-hexadecoxi)-2,3-dicloro-fenil]sulfonilamino]piridina-3-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[5-[[4-(14-<i>terc</i>-butoxi-14-oxo-tetradecoxi)fenil]sulfonilamino]pirimidina-2-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético
		
ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[6-[[4-(14-<i>terc</i>-butoxi-14-oxo-tetradecoxi)fenil]sulfonilamino]piridina-3-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[[4-(16-<i>terc</i>-butoxi-16-oxo-hexadecoxi)-3-fluoro-fenil]sulfonilamino]pirimidina-5-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[6-[[4-(16-<i>terc</i>-butoxi-16-oxo-hexadecoxi)-3-fluoro-fenil]sulfonilamino]piridina-3-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético

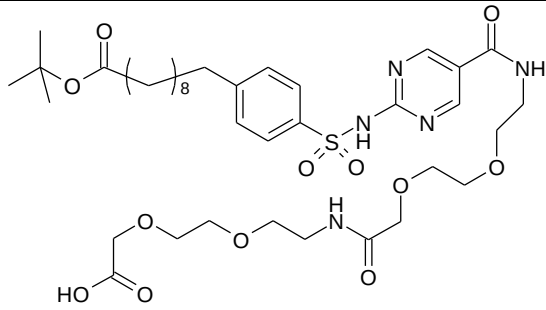
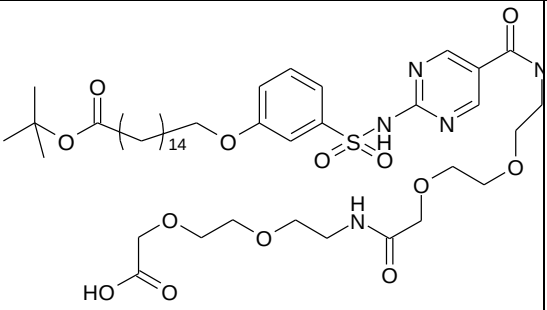
		
ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[6-[[4-(16-<i>terc</i>-butoxi-16-oxo-hexadecoxi)-3-cloro-fenil]sulfonilamino]piridina-3-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4-(16-<i>terc</i>-butoxi-16-oxo-hexadecoxi)fenil]sulfonilamino]-4-metil-pirimidina-5-carbonil]amino] etoxi]etoxi]acetil]amino] etoxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4-(16-<i>terc</i>-butoxi-16-oxo-hexadecoxi)fenil]sulfonilamino]-4-(trifluorometil)pirimidina-5-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético
		
ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4-(16-<i>terc</i>-butoxi-16-oxo-hexadecoxi)-3-cloro-fenil]sulfonilamino]piridina-3-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4-(16-<i>terc</i>-butoxi-16-oxo-hexadecoxi)fenil]sulfonilamino]-4-metil-pirimidina-5-carbonil]amino] etoxi]etoxi]acetil]amino] etoxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4-(16-<i>terc</i>-butoxi-16-oxo-hexadecoxi)fenil]sulfonilamino]-4-(trifluorometil)pirimidina-5-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético

butoxi-16-oxo-hexadecoxi)-3-cloro- fenil]sulfonilamino]pirimidina-5- carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil] amino]etoxi]etoxi]acético	butoxi-16-oxo-hexadecil]fenil] sulfonilamino]piridina-3-carbonil] amino]etoxi] etoxi]acetil]amino]etoxi] etoxi]acético	butoxi-14-oxo-tetradecil]fenoxi] metil]fenil]sulfonilamino]piridina-3- carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]et oxi]etoxi]acético
		
ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[6-[[4-[2-[4-(8- <i>terc</i> - butoxi-8-oxo-octil]fenil]etoxi] fenil]sulfonilamino]piridina-3- carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]et oxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[6-[[3-(18- <i>terc</i> - butoxi-18-oxo- octadecil]fenil]sulfonilamino] piridina-3- carbonil]amino]etoxi]etoxi] acetil]amino]etoxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[[4-[3-(10- <i>terc</i> - butoxi-10-oxo-decil)-4-fluoro-fenoxi]fenil] sulfonilamino]pirimidina-5- carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil] amino]etoxi]etoxi]acético

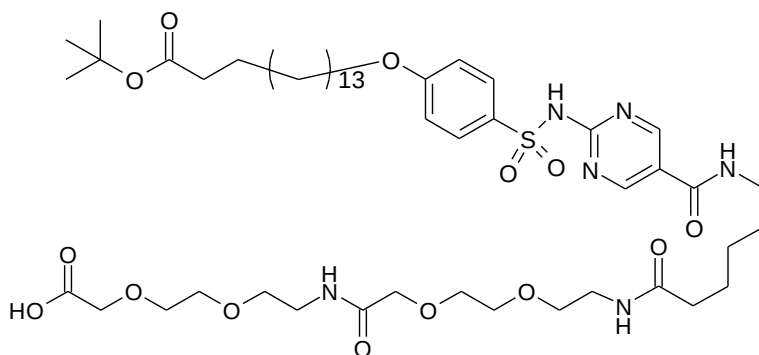
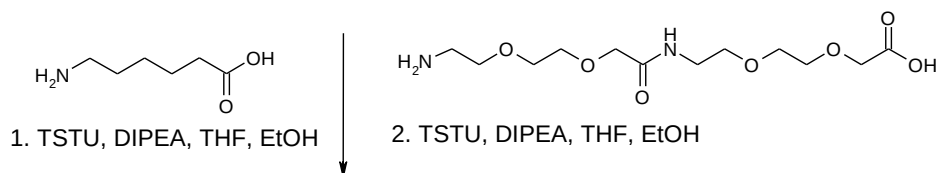
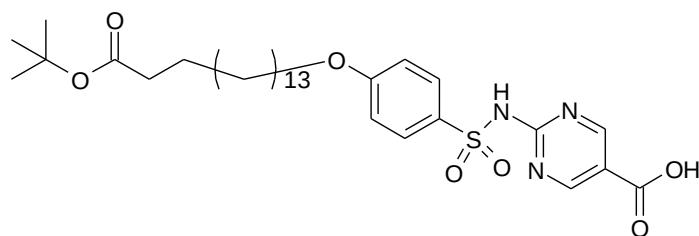
		
ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[4-(16-terc-butoxi-16-oxo-hexadecil)fenil]]sulfonilamino]pirimidina-5-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[6-[[4-[4-(14-terc-butoxi-14-oxo-tetradecil)fenoxi]]sulfonilamino]piridina-3-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[4-(16-terc-butoxi-16-oxo-hexadecoxi)-2,5-dicloro-fenil]]sulfonilamino]pirimidina-5-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético
		
ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[4-[2-[4-(8-terc-butoxi-8-oxo-octil)fenil]]sulfonilamino]pirimidina-5-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[4-[12-terc-butoxi-12-oxo-dodecil)fenil]]sulfonilamino]piridina-3-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[6-[[4-[18-terc-butoxi-18-oxo-octil)fenil]]sulfonilamino]piridina-3-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético

etoxi]fenil]sulfonilamino]pirimidina-5-carbonil]amino] etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi] etoxi]acético	sulfonilamino]pirimidina-5-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético	octadecoxi]fenil]sulfonilamino]piridina-3-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético
		
ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[4-[3-(8-<i>terc</i>-butoxi-8-oxo-octil)-4-fluoro-fenoxi]fenil]sulfonilamino]pirimidina-5-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[3-(18-<i>terc</i>-butoxi-18-oxo-octadecil)fenil]sulfonilamino]pirimidina-5-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[6-[3-(12-<i>terc</i>-butoxi-12-oxo-dodecil)fenil]sulfonilamino]piridina-3-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético

		
ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[4-(18-terc-butoxi-18-oxo-octadecoxi)fenil]sulfonilamino] pirimidina-5-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[3-(12-terc-butoxi-12-oxo-dodecil)fenil]sulfonilamino]pirimidina-5-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil] amino]etoxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[6-[[4-[2-[4-(8-terc-butoxi-8-oxo-octil)fenil]etoxi]fenil]sulfonilamino]piridina-3-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético
		
ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[6-[[4-(20-terc-butoxi-20-oxo-icosoxi)fenil]sulfonilamino]	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[4-[[4-(14-terc-butoxi-14-oxo-tetradecil)fenoxi]	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[6-[[4-(10-terc-butoxi-10-oxo-

piridina-3-carbonil]amino]etoxi] etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético	metil]fenil]sulfonilamino]pirimidina-5- carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]et oxi]etoxi]acético	decil]fenil]sulfonilamino]piridina-3- carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]et oxi]etoxi]acético
		
ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[4-(10-terc- butoxi-10-oxo- decil]fenil]sulfonilamino]pirimidina-5- carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]et oxi]etoxi]acético	ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[3-(16-terc- butoxi-16-oxo- hexadecoxi]fenil]sulfonilamino] pirimidina-5-carbonil]amino]etoxi] etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético	

2.9.2 Síntesis de ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[6-[[5-[[4-(16-*terc*-butoxi-16-oxo-hexadecoxi)fenil]sulfonilamino]pirimidina-2-carbonil]amino]-hexanoilamino]etoxi]etoxi]acetil]-amino]etoxi]etoxi] acético



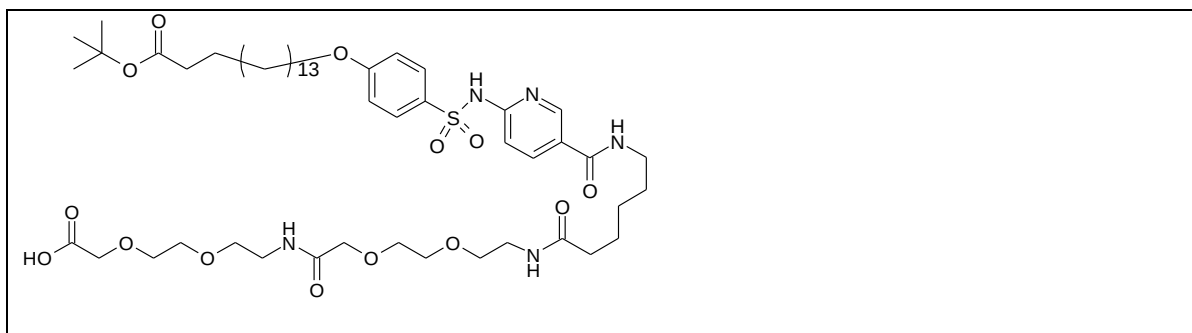
Una mezcla de ácido 5-[[4-(16-*terc*-butoxi-16-oxo-hexadecoxi)fenil]sulfonilamino]pirimidina-2-carboxílico (500 mg, 825 μmol), TSTU (310 mg, 1,0 mmol) y DIPEA (360 μl , 266 mg, 2,06 mmol) en 6 ml de THF se agitó a TA durante 16 h. Después de 16 h, el disolvente se eliminó a presión reducida y se añadió una disolución de ácido 6-aminohexanoico (130 mg, 990 μmol) y DIPEA (360 μl , 266 mg, 2,06 mmol) en 6 ml abs. Se añadió EtOH y la mezcla se agitó a TA durante 16 h. Los componentes volátiles se eliminaron a presión reducida, el residuo resultante se disolvió en CH_2Cl_2 y se lavó con disolución acuosa al 10% de KHSO_4 . La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. Se usaron 900 mg del ácido 6-[[5-[[4-(16-*terc*-butoxi-16-

oxo-hexadecoxi)fenil] sulfonilamino] pirimidina-2-carbonil]amino]hexanoico bruto obtenido en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Una mezcla de ácido 6-[[5-[[4-(16-*terc*-butoxi-16-oxo-hexadecoxi)fenil]sulfonilamino]pirimidina-2-carbonil]amino]hexanoico (900 mg bruto, 65% pureza, 814 μmol), TSTU (306 mg, 1,02 mmol) y DIPEA (355 μl , 262 mg, 2,03 mmol) en 6 ml de THF se agitó a TA durante 16 h. Después de 16 h, el disolvente se eliminó a presión reducida y se añadió una disolución de ácido 2-[2-[2-[[2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético (301 mg, 976 μmol) y DIPEA (355 μl , 262 mg, 2,03 mmol) en 6 ml abs. Se añadió EtOH y la mezcla se agitó a TA durante 16 h. Los componentes volátiles se eliminaron a presión reducida, el residuo resultante se disolvió en CH_2Cl_2 y se lavó con disolución acuosa al 10% de KHSO_4 . La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El producto bruto se purificó por RP HPLC para dar ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[6-[[5-[[4-(16-*terc*-butoxi-16-oxo-hexadecoxi)fenil]sulfonilamino]pirimidina-2-carbonil]amino]hexanoilamino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi] acético (78 mg, 10 %).

^1H NMR (400,23 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 12,29 (br s, 1 H), 8,82 (s, 2 H), 8,47 (br s, 1 H), 7,90 (d, $J=8,93$ Hz, 2 H), 7,79 (t, $J=5,50$ Hz, 1 H), 7,63 (t, $J=5,75$ Hz, 1 H), 7,07 (d, $J=8,93$ Hz, 2 H), 4,01 (m, 4 H), 3,87 (s, 2 H), 3,20 – 3,68 (m, 18 H), 2,15 (t, $J=7,27$ Hz, 2 H), 2,05 (t, $J=7,34$ Hz, 2 H), 1,70 (m, 2 H), 1,48 (m, 6 H), 1,38 (s, 9 H), 1,25 (m, 24 H).

Por consiguiente, se sintetizó el siguiente compuesto:



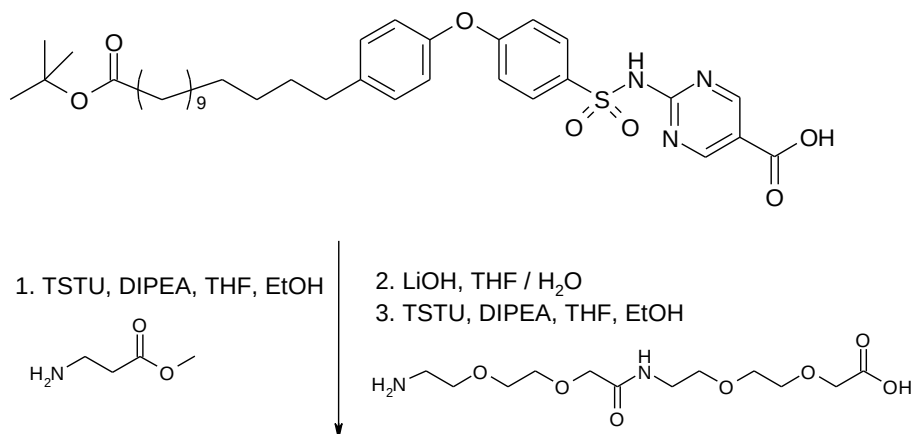
ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[6-[[4-(16-*terc*-butoxi-16-oxo-hexadecoxi)fenil]
sulfonilamino]piridina-3-carbonil]amino]hexanoilamino]etoxi]
etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético

2.10 Incorporación de especies (2)

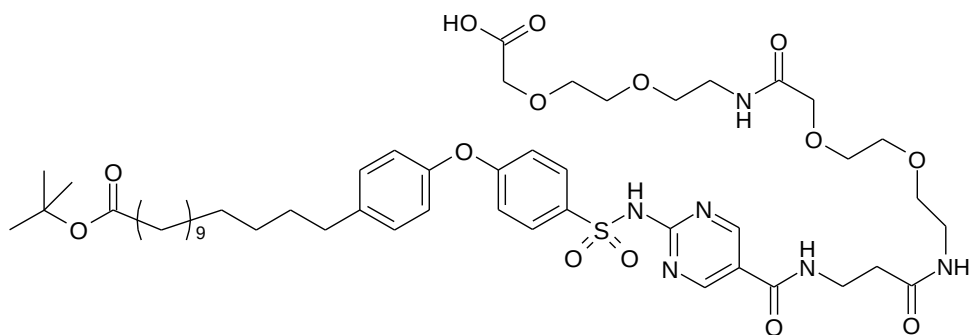
5

2.10.1 Síntesis de ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[3-[[5-[[4-[4-(14-*terc*-butoxi-14-oxo-tetradecil)fenoxi]fenil]sulfonil amino]pirimidina-2-carbonil]-amino]propanoilamino]etoxi]etoxi]acetil] amino]etoxi] etoxi]acético

10



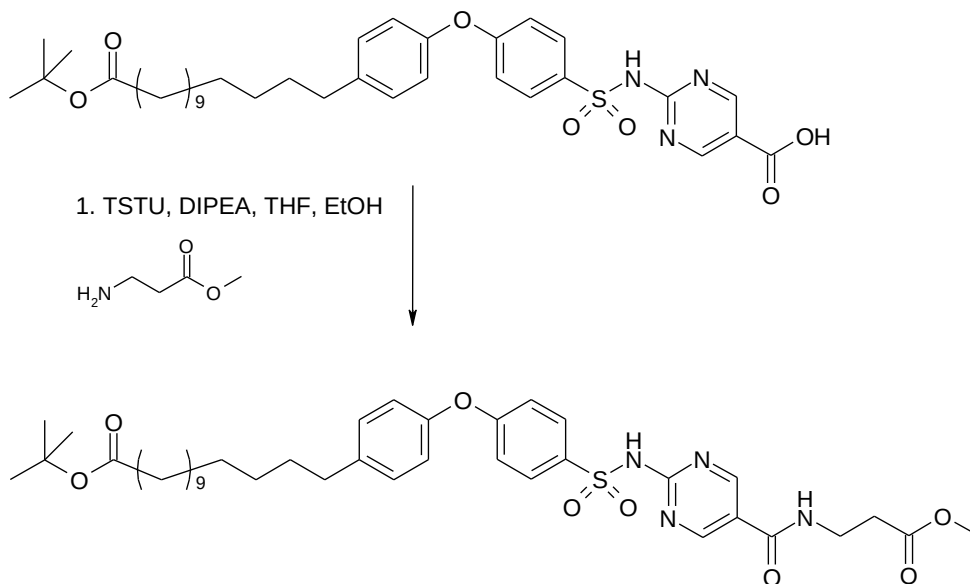
15



20

2.10.2 Síntesis de 14-[4-[4-[[5-[(3-metoxi-3-oxo-propil)carbamoil] pirimidin-2-il] sulfamoil]fenoxi]fenil]tetradecanoato de *terc*-butilo

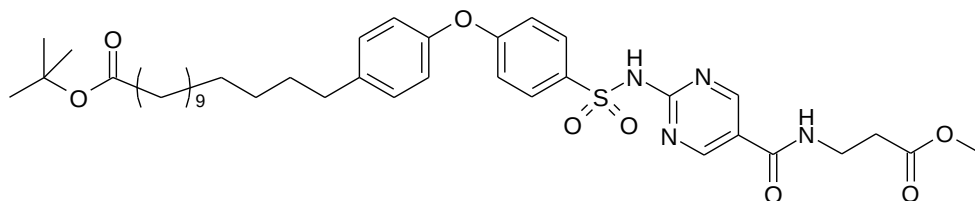
25



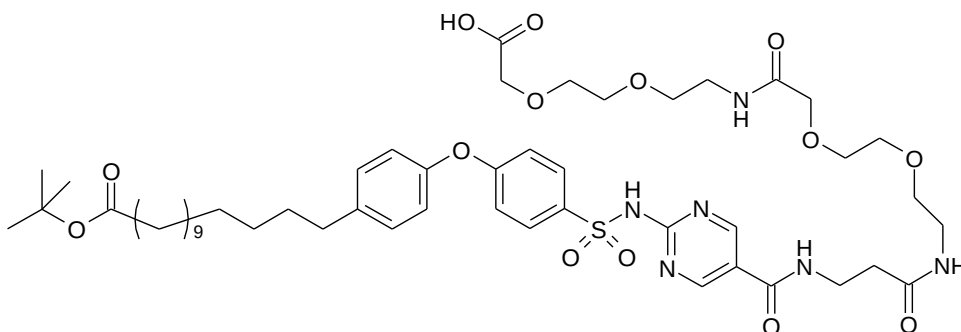
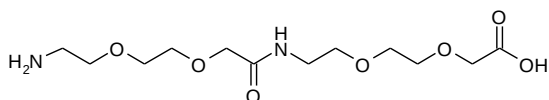
Una mezcla de ácido 5-[[4-[4-(14-*tert*-butoxi-14-oxo-tetradecil)fenoxi]fenil]sulfonil amino]pirimidina-2-carboxílico (1,0 g, 764 μmol), TSTU (241 mg, 803 μmol) y DIPEA (494 mg, 3,82 mmol) en 10 ml de THF se agitó a TA durante 16 h. Se añadió más TSTU (80 mg, 267 μmol) y se siguió agitando a TA durante 2 h. Se añadió hidrocloreto de 3-aminopropanoato de metilo (117 mg, 841 μmol) y se siguió agitando a TA durante 16 h. Los componentes volátiles se eliminaron a presión reducida, el residuo resultante se disolvió en CH_2Cl_2 y se lavó con disolución acuosa al 10% de KHSO_4 . La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El producto bruto se purificó por HPLC preparativa RP para dar 14-[4-[4-[[5-[(3-metoxi-3-oxo-propil) carbamoyl] pirimidin-2-il]sulfamoyl]fenoxi]fenil] tetradecanoato (235 mg, 42%).

^1H NMR (400,23 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 12,11 (br s, 1 H), 8,84 (s, 2 H), 8,66 (t, $J=5,44$ Hz, 1 H), 7,98 (d, $J=8,93$ Hz, 2 H), 7,26 (d, $J=8,44$ Hz, 2 H), 7,04 (m, 4 H), 3,60 (s, 3 H), 3,46 (m, 2H), 2,57 (m, 4 H), 2,15 (t, $J=7,27$ Hz, 2 H), 1,56 (m, 2 H), 1,46 (m, 2 H), 1,38 (s, 9 H), 1,29 (m, 18 H).

2.10.3 Síntesis de ácido 2-[2-[2-[2-[2-[3-[[5-[[4-[4-(14-*terc*-butoxi-14-oxo-tetradecil)fenoxi]fenil]sulfonil amino]pirimidina-2-carbonil]amino]propanoilamino]-etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético



1. LiOH, THF / H₂O
2. TSTU, DIPEA, THF, EtOH



Una mezcla de 14-[4-[4-[[5-[(3-metoxi-3-oxo-propil) carbamoil] pirimidin-2-il]sulfamoil]fenoxi]fenil] tetradecanoato (235 mg, 318 μmol), LiOH (38 mg, 1,59 mmol), THF (5 ml) y H₂O (5 ml) se agitó a TA durante 2 h. La mezcla de reacción se acidificó hasta aprox. pH = 1,0 con HCl (2,0 M) y se extrajo con CH₂-Cl₂. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró para dar ácido 3-[[5-[[4-[4-(14-*terc*-butoxi-14-oxo-tetradecil)fenoxi]fenil]sulfonilamino]pirimidina-2-carbonil]amino]propanoico (207 mg, 89% de rendimiento) en la forma de un sólido blanco, que se usó en la reacción siguiente sin purificación adicional.

Una mezcla de ácido 3-[[5-[[4-[4-(14-*terc*-butoxi-14-oxo-tetradecil)fenoxi]fenil]sulfonil amino]pirimidina-2-carbonil]amino]propanoico (207 mg, 285 μmol), TSTU (90 mg, 300 μmol)

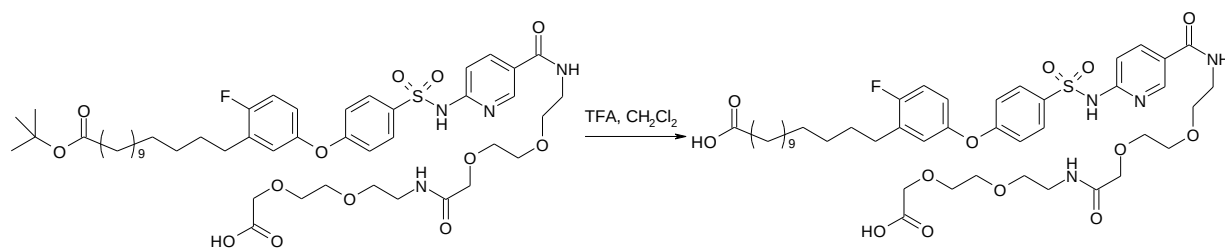
y DIPEA (150 μ l, 110 mg, 850 μ mol) en 6 ml de THF se agitó a TA durante 1h. Después de 1h, el disolvente se eliminó a presión reducida y se añadió una disolución de ácido 2-[2-[2-[[2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético (97 mg, 314 μ mol) y DIPEA (150 μ l, 110 mg, 850 μ mol) en 6 ml abs. Se añadió EtOH y la mezcla se agitó a TA durante 16 h. Los componentes volátiles se eliminaron a presión reducida, el residuo resultante se

disolvió en CH_2Cl_2 y se lavó con disolución acuosa al 10% de KHSO_4 . La capa orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El producto bruto se purificó por RP HPLC para dar ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[3-[[4-[4-(14-*terc*-butoxi-14-oxo-tetradecil)fenoxi]fenil]sulfonilamino]pirimidina-2-carbonil]amino]propanoilamino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético (163 mg, 56%).

^1H NMR (400,23 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 12,11 (br s, 2 H), 8,84 (s, 2 H), 8,61 (t, $J=5,62$ Hz, 1 H), 7,97 (m, 3 H), 7,62 (t, $J=5,56$ Hz, 1 H), 7,26 (d, $J=8,44$ Hz, 2 H), 7,04 (m, 4 H), 4,01 (s, 2 H), 3,86 (s, 2 H), 3,20 – 3,60 (m, 18 H), 2,58 (m, 2 H), 2,34 (t, $J=7,03$ Hz, 2 H), 2,15 (t, $J=7,27$ Hz, 2 H), 1,56 (m, 2 H), 1,46 (m, 2 H), 1,38 (s, 9 H), 1,29 (m, 18 H).

2.11 Desprotección

Síntesis de ácido 14-[5-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi] etilcarbamoil]-2-piridil]sulfamoil]fenoxi]-2-fluoro-fenil]tetradecanoico



Se disolvió ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[6-[[4-[3-(14-*terc*-butoxi-14-oxo-tetradecil)-4-fluoro-fenoxi] fenil] sulfonilamino]piridina-3-carbonil]amino] etoxi]etoxi] acetil]amino]etoxi] etoxi]acético (20 mg, 21 μ mol) en DCM (3,0 ml) y se añadió TFA (0,5 ml) a TA. Se siguió agitando a TA durante 16 h. Los componentes volátiles se eliminaron a presión reducida y

el residuo resultante se disolvió en DCM y se re-evaporó dos veces. El producto bruto se purificó por HPLC preparativa RP. El compuesto del título, ácido 14-[5-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoil]-2-piridil]sulfamoil]fenoxi]-2-fluoro-fenil]tetradecanoico, se obtuvo en la forma de un sólido incoloro (19 mg, 21 μ mol, cuan.).

5 ^1H NMR (400,23 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 12,19 (br s, 1 H), 8,51 (m, 2 H), 8,09 (dd, $J=8,93$, 2,32 Hz, 1 H), 7,89 (d, $J=8,93$ Hz, 2 H), 7,61 (br t, $J=5,56$ Hz, 1 H), 7,20 (t, $J=8,93$ Hz, 1 H), 7,15 (d, $J=8,19$ Hz, 1 H), 7,03 (m, 4 H), 4,01 (s, 2 H), 3,86 (s, 2 H), 3,20 – 3,68 (m, 16 H), 2,58 (br t, $J=7,52$ Hz, 2 H), 2,17 (t, $J=7,34$ Hz, 2 H), 1,49 (m, 4 H), 1,25 (m, 18 H).

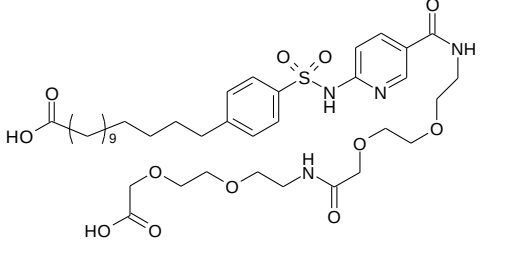
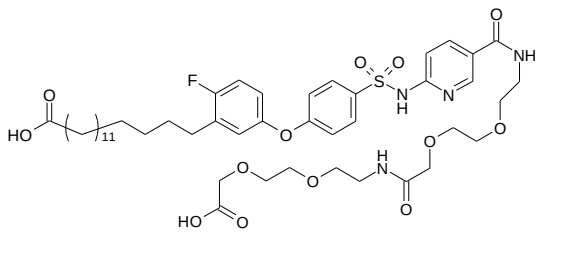
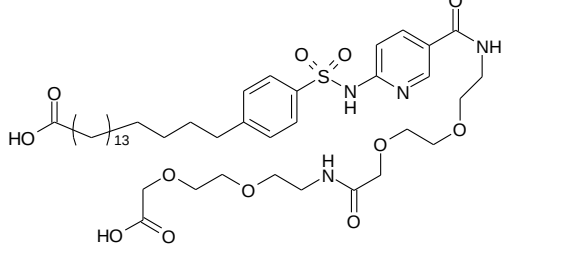
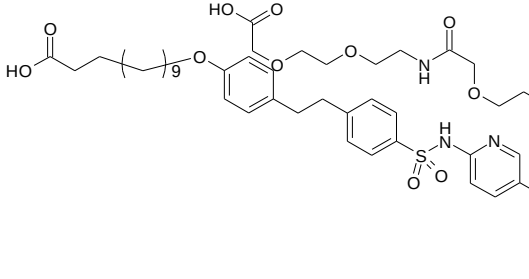
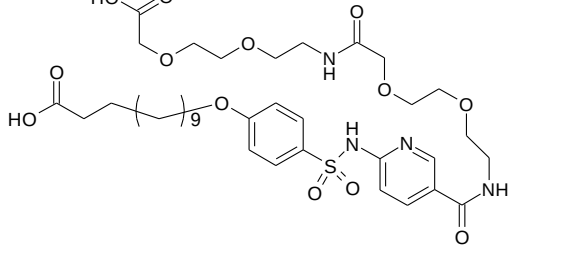
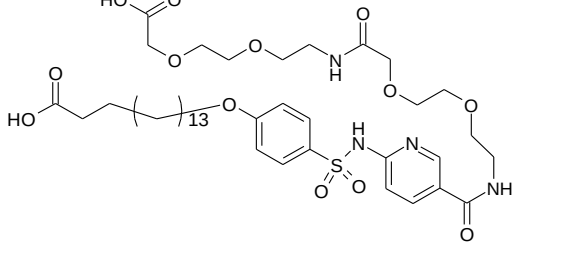
Por consiguiente, se sintetizaron los siguientes compuestos:

10

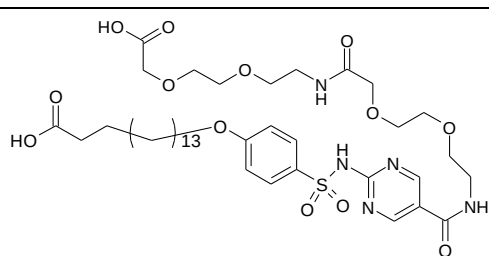
15

20

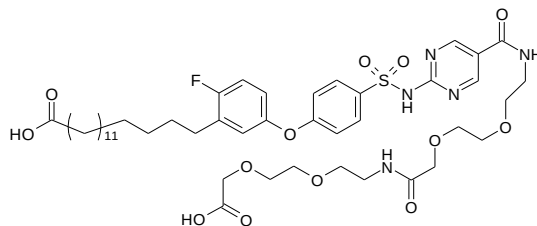
25

		
ácido 14-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etil carbamoil]-2-piridil]sulfamoil] fenil]tetradecanoico	ácido 16-[5-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi] etilcarbamoil]-2-piridil]sulfamoil]fenoxi]-2-fluoro-fenil]hexadecanoico	ácido 18-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi] etilcarbamoil]-2-piridil]sulfamoil]fenil]octadecanoico
		
ácido 12-[4-[2-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi] etilcarbamoil]-2-piridil]sulfamoil]fenil] etil]fenoxi]dodecanoico	ácido 12-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi] etilcarbamoil]-2-piridil]sulfamoil]fenoxi]dodecanoico	ácido 16-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi] etilcarbamoil]-2-piridil]sulfamoil]fenoxi]hexadecanoico

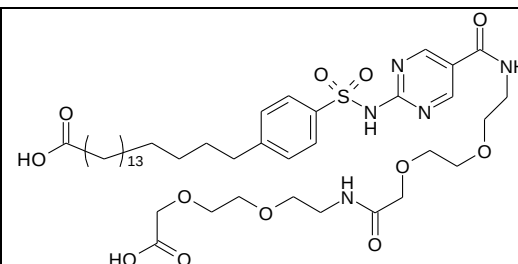
ácido 14-[3-[[5-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi] etilcarbamoil]-2-piridil] sulfamoil]fenil]tetradecanoico	ácido 12-[4-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi] etilcarbamoil]-2-piridil] sulfamoil]fenoxi]fenil]dodecanoico	ácido 10-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi] etilcarbamoil]-2-piridil] sulfamoil]fenoxi]decanoico
ácido 10-[4-[2-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi] etilcarbamoil]-2-piridil] sulfamoil]fenoxi] etil]fenil]decanoico	ácido 10-[4-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi] etilcarbamoil]-2-piridil] sulfamoil]fenil]metoxi]fenil]decanoico	ácido 12-[5-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi] etilcarbamoil]-2-piridil] sulfamoil]fenoxi]-2-fluoro-fenil]dodecanoico



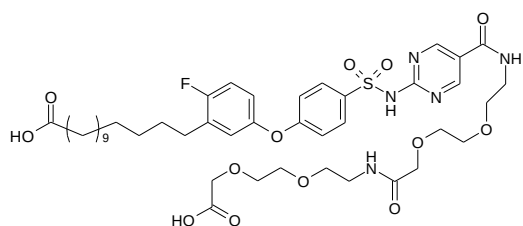
ácido 16-[4-[[[5-[2-[2-[2-[2-(
(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-
etoxi]etoxi] etilcarbamoil]pirimidin-2-il]
sulfamoil]fenoxi]hexadecanoico



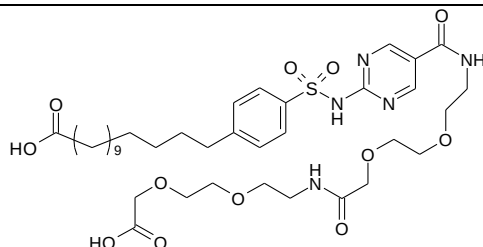
ácido 16-[5-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-
(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-
etoxi]etoxi] etilcarbamoil]]pirimidin-2-
il]]sulfamoil]]fenoxi]-2-fluoro-
fenil]]hexadecanoico



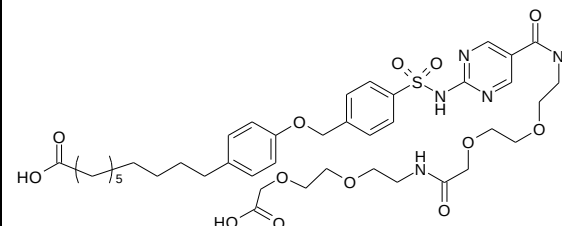
ácido 18-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-(
(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-
etoxi]etoxi] etilcarbamoil]pirimidin-2-
il]sulfamoil]fenil]octadecanoico



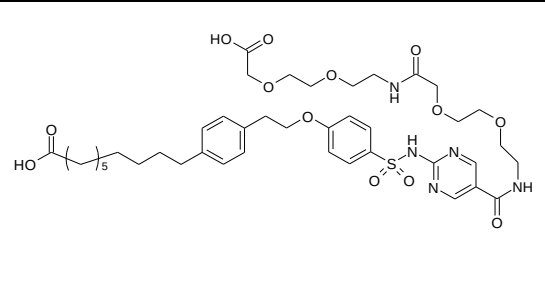
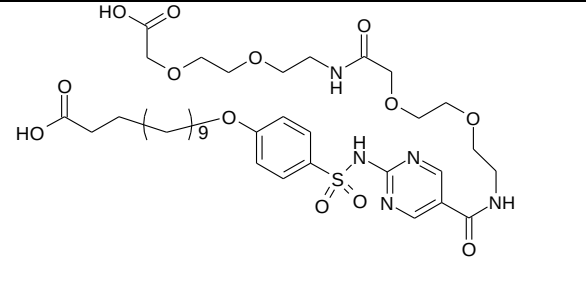
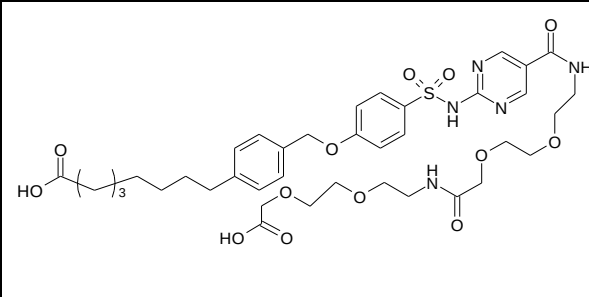
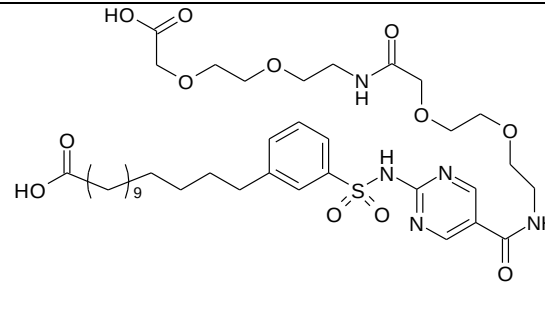
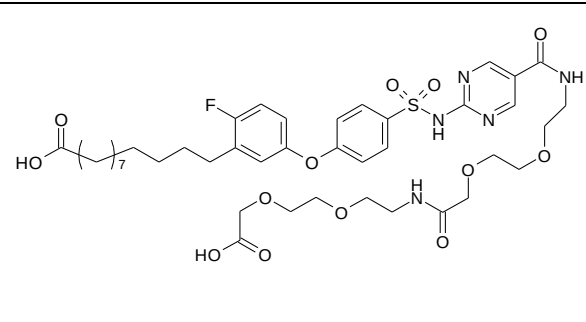
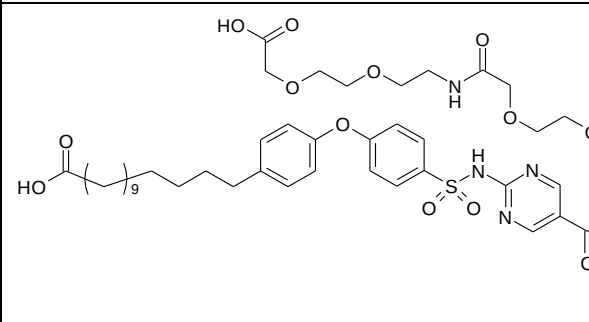
ácido 14-[5-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-
(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-
etoxi]etoxi] etilcarbamoil]pirimidin-2-
il]sulfamoil]fenoxi]-2-fluoro-
fenil]tetradecanoico

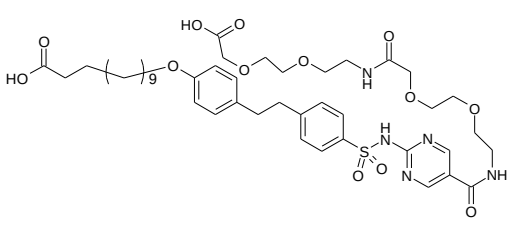
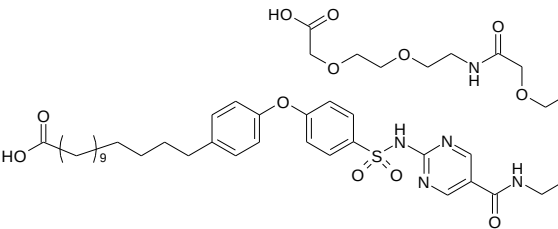
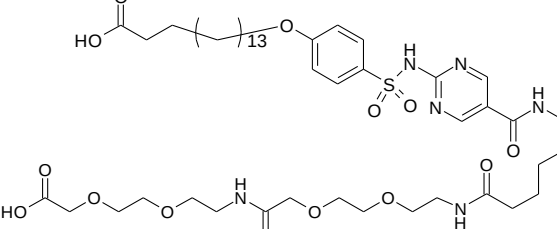
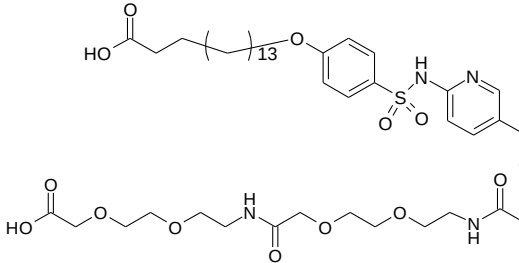
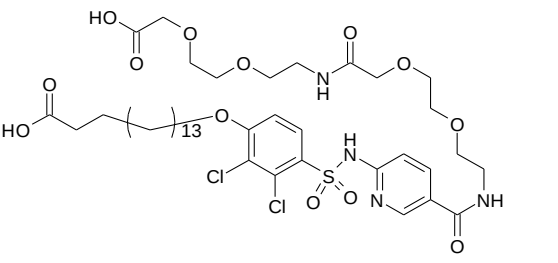
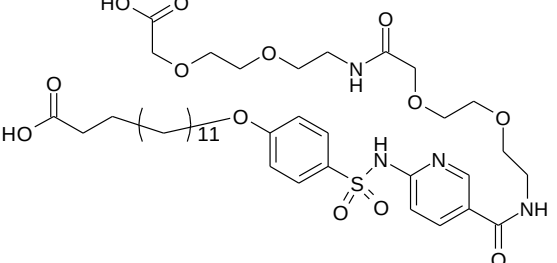


ácido 14-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi] etilcarbamoil]pirimidin-2-il]sulfamoil]fenil]tetradecanoico



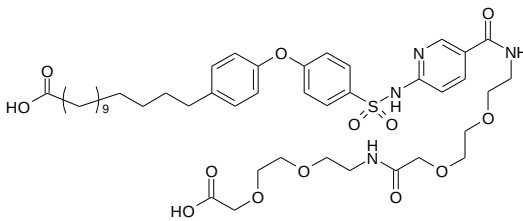
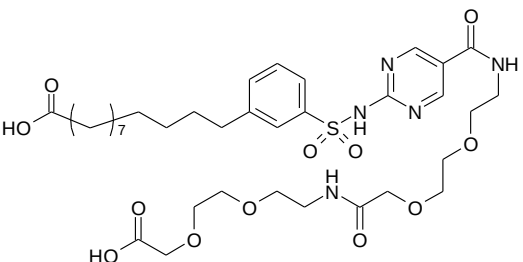
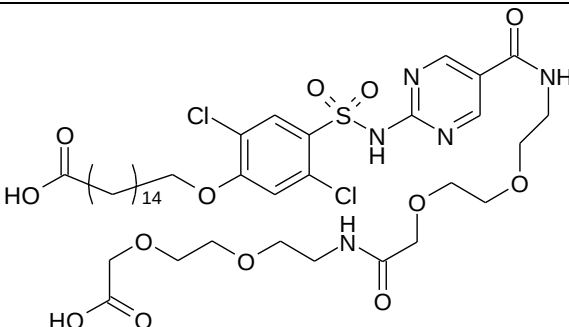
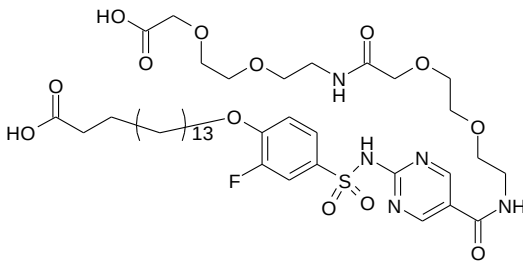
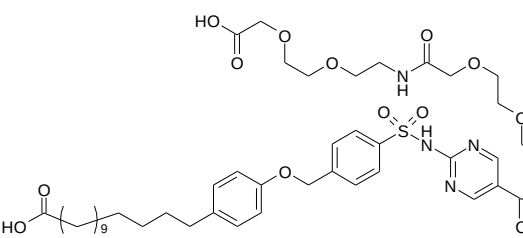
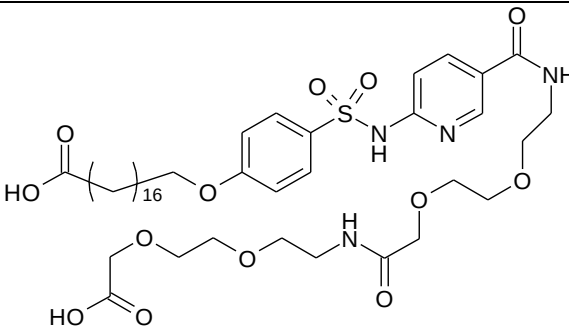
ácido 10-[4-[[4-[[5-[2-[2-[2-[2-(
(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-
etoxi]etoxi] etilcarbamoil]pirimidin-2-
il]sulfamoil]fenil]metoxi]fenil]decanoico

		
ácido 10-[4-[2-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi] etilcarbamoil]pirimidin-2-il]sulfamoil]fenoxi]etil]fenil]decanoico	ácido 12-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi] etilcarbamoil]pirimidin-2-il]sulfamoil]fenoxi]dodecanoico	ácido 8-[4-[[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi] etilcarbamoil]pirimidin-2-il]sulfamoil]fenoxi]metil]fenil]octanoico
		
ácido 14-[3-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi] etilcarbamoil]pirimidin-2-il]sulfamoil]fenil]tetradecanoico	ácido 12-[5-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi] etilcarbamoil]pirimidin-2-il]sulfamoil]fenoxi]-2-fluorofenil]dodecanoico	ácido 14-[4-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi] etilcarbamoil]pirimidin-2-il]sulfamoil]fenoxi]fenil]tetradecanoico

		
ácido 12-[4-[2-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi] etilcarbamoil]pirimidin-2-il]sulfamoil]fenil]etil]fenoxi] dodecanoico	ácido 14-[4-[4-[[5-[3-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-3-oxo-propil]carbamoil]pirimidin-2-il]sulfamoil]fenoxi]fenil]tetradecanoico	ácido 16-[4-[[5-[[6-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi] etilamino]-6-oxo-hexil]carbamoil]pirimidin-2-il]sulfamoil]fenoxi]hexadecanoico
		
ácido 16-[4-[[5-[[6-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-6-oxo-hexil]carbamoil]-2-	ácido 16-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoil]-2-piridil]sulfamoil]-2,3-dicloro-fenoxi]hexadecanoico	ácido 14-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoil]-2-piridil]sulfamoil]fenoxi]tetradecanoico

piridil]sulfamoil]fenoxi]hexadecanoico		
ácido 14-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etil carbamoil]pirimidin-2-il]sulfamoil]fenoxi]tetradecanoico	ácido 14-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoil]-2-piridil]sulfamoil]fenil]metoxi]fenil]tetradecanoico	ácido 16-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoil]-2-piridil]sulfamoil]-2-fluoro-fenoxi]hexadecanoico
ácido 16-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoil]-2-piridil]sulfamoil]-2-cloro-	ácido 16-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoil]-4-(trifluorometil)pirimidin-2-	ácido 8-[4-[2-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoil]-2-pyridil]sulfamoyl]fenoxi]etil]fenil]octanoico

fenoxi]hexadecanoico	il]sulfamoil]fenoxi]hexadecanoico	
ácido 16-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoil]-2-piridil]sulfamoil]fenil]hexadecanoico	ácido 12-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoil]pirimidin-2-il]sulfamoil]fenil]dodecanoico	ácido 16-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoil]pirimidin-2-il]sulfamoil]-2-cloro-fenoxi]hexadecanoico
ácido 18-[3-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoil]-2-piridil]sulfamoil]fenil]octadecanoico	ácido 18-[3-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoil]pirimidin-2-il]sulfamoil]fenil]octadecanoico	ácido 10-[5-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoil]pirimidin-2-il]sulfamoil]fenoxi]-2-fluoro-fenil]decanoico

		
ácido 14-[4-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoi]l]-2-piridil]sulfamoi]l]fenoxi]fenil]tetradecanoico	ácido 12-[3-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoi]l]pirimidin-2-il]sulfamoi]l]fenil]dodecanoico	ácido 16-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoi]l]pirimidin-2-il]sulfamoi]l]-2,5-dicloro-fenoxi]hexadecanoico
		
ácido 16-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoi]l]pirimidin-2-	ácido 14-[4-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoi]l]pirimidin-2-	ácido 18-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoi]l]-2-

il]sulfamoil]-2-fluoro-fenoxi]- hexadecanoico	il]sulfamoil]fenil]metoxi]fenil]tetradecanoico	piridil]sulfamoil]fenoxi]octadecanoico
ácido 16-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-(carboxi- metiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]- etoxi]etilcarbamoil]-4-metil-pirimidin-2- il]sulfamoil]fenoxi]hexadecanoico	ácido 16-[3-[[5-[2-[2-[2-[2-(carboxi- metiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo- etoxi]etoxi]etilcarbamoil]pirimidin-2- il]sulfamoil]fenoxi]hexadecanoico	ácido 12-[3-[[5-[2-[2-[2-[2-(carboxi- metiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo- etoxi]etoxi]etilcarbamoil]-2- piridil]sulfamoil]fenil]dodecanoico
ácido 16-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-(carboxi- metiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]- etoxi]etilcarbamoil]-4-metil-pirimidin-2- il]sulfamoil]fenoxi]hexadecanoico	ácido 8-[4-[2-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-(carboxi- metiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo- etoxi]etoxi]etilcarbamoil]pirimidin-2- il]sulfamoil]fenoxi]hexadecanoico	ácido 20-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-(carboxi- metiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo- etoxi]etoxi]etilcarbamoil]-2- piridil]sulfamoil]fenil]dodecanoico

etoxi]etilcarbamoil]pirimidin-2-il]- sulfamoil]fenil]hexadecanoico	etoxi]etoxi]etilcarbamoil]-2-piridil] sulfamoil]fenoxi]etil]fenil]octanoico	etoxi]etoxi]etilcarbamoil]-2- piridil]sulfamoil]fenoxi]icosanoico
ácido 8-[4-[2-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoil]pirimidin-2-il]-sulfamoil]fenoxi]etil]fenil]octanoico	ácido 10-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoil]-2-piridil]sulfamoil]fenil]decanoico	ácido 10-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoil]pirimidin-2-il]sulfamoil]fenil]decanoico
ácido 8-[5-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]-	ácido 18-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi) etoxi]etilamino]-2-oxo-	

etoxi]etilcarbamoil]pirimidin-2- il]sulfamoil]fenoxi]-2-fluoro- fenil]octanoico	etoxi]etoxi] etilcarbamoil]pirimidin-2- il]sulfamoil] fenoxi]octadecanoico
---	---

3. Insulinas y síntesis de conjugados

3.1 insulina humana

Las secuencias de aminoácidos de la cadena A y B de insulina humana son:

Cadena A: GIVEQCCTSICSLYQLENYCN (SEQ ID NO: 102)

Cadena B: FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (SEQ ID NO:103)

Un puente disulfuro entre cadenas está presente entre *Cys(A6)* y *Cys(A11)*, dos puentes disulfuro entre cadenas están presentes entre *Cys(A7)* y *Cys(B7)*, y entre *Cys(A20)* y (*Cys(B19)*).

3.2 Análogo de insulina 41

El análogo de insulina 41 se basa en la insulina humana con mutaciones en las posiciones A14, B16, B25, y una eliminación del aminoácido en la posición B30:

Glu(A14): El aminoácido en la posición 14 de la cadena A de insulina humana (Y, tirosina, Tyr) se sustituye con ácido glutámico (E, Glu),

His(B16): El aminoácido en la posición 16 de la cadena B de insulina humana (Y, tirosina, Tyr) se sustituye con histidina (H, His),

His(B25): El aminoácido en la posición 25 de la cadena B de insulina humana (F, fenilalanina, Phe) se sustituye con histidina (H, His),

Des(B30): El aminoácido en la posición 30 de la cadena B de insulina humana se elimina.

La secuencia de aminoácidos completa del análogo de insulina humana 41 en vista de las cadenas A y B es:

Cadena A: GIVEQCCTSICSLEQLENYCN (SEQ ID NO: 104)

Cadena B: FVNQHLCGSHLVEALHLVCGERGFHYTPK- (SEQ ID NO: 105)

El puente disulfuro entre cadenas y los dos puentes disulfuro entre cadenas concuerdan con la insulina humana.

3.3 Conjugado con insulina humana / Síntesis de ácido [16-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoil]pirimidin-2-il]sulfamoil]fenoxi]hexadecanoico]Lys(B29)-insulina

Se preparó un conjugado de insulina humana de acuerdo con 3.1 y ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[[4-(16-*terc*-butoxi-16-oxo-hexadecoxi) fenil]sulfonilamino]pirimidina-5-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético del Ejemplo 2.9:

Síntesis de 16-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) oxi-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoil]pirimidin-2-il]sulfamoil]fenoxi]hexadecanoato:

A una disolución de 296 mg de ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[[4-(16-*terc*-butoxi-16-oxo-hexadecoxi) fenil]sulfonilamino]pirimidina-5-carbonil]amino]etoxi]etoxi]-acetil]amino]-etoxi]etoxi]-acético en 9 ml de DMF, se le añadieron 92,7 µl de trietilamina, 106 mg TSTU y una cantidad mínima de DMAP. La disolución se agitó durante una hora. Se añadieron 100 ml de cloruro de metileno y la disolución resultante se lavó tres veces con 50 ml de salmuera. La capa orgánica se separó, se secó con sulfato de sodio, se filtró y se concentró al vacío. El producto bruto se recogió en 11 ml de cloruro de metileno y 5,5 ml de trifluoro acético, y se almacenó durante la noche a 5 °C.

La disolución se concentró. Luego el producto bruto se disolvió tres veces en 30 ml de cloruro de metileno y se evaporó. El material sólido se suspendió en 5 ml de éter metil *terc*-butílico, el éter decantó. El residuo se secó al vacío y se usó sin purificación adicional.

Se suspendió una disolución de 480 mg de insulina en 25 ml de agua y luego se añadieron 0,45 ml trietilamina. A la disolución clara se le añadieron 25 ml MeCN y luego 0,9 ml (45,89 mM en DMF) 16-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoil]pirimidin-2-

il]sulfamoil]fenoxi]hexadecanoato. La disolución se agitó durante 3 horas a temperatura

ambiente. La reacción se analizó con Waters UPLC clase H a 214 nm en un tampón de fosfato y cloruro de sodio. Waters BEH300 10 cm. Tiempo de retención insulina: 3,85 min. Tiempo de retención conjugado de insulina 6,46 min. El producto se purificó por HPLC con ÄKTA avant 25. Kinetex 5 µm C18 100 A 250 x 21,2 mm. Volumen de la columna (CV) 88 ml.

Volumen de la columna (CV) 88 ml.

Disolvente A: 0,5% ácido acético en agua

Disolvente B: 0,5 ácido acético en agua / MeCN 2: 8

Gradiente: 95 % A 5 % B a 40 % A 60 % B en 14 CV

La reacción se analizó con Waters UPLC clase H a 214 nm en un tampón de fosfato de cloruro de sodio. Waters BEH300 10 cm. Tiempo de retención del conjugado de insulina: 6,419 min. La disolución se liofilizó y proporcionó el producto deseado. 93 mg 34 % rendimiento. Espect. masas: 6629,6 g / mol.

3.4 Conjugados con el análogo de insulina 41

Los conjugados del análogo de insulina 41 de acuerdo con 3.2 se prepararon con las moléculas aglutinantes del Ejemplo 2.9 (para la estructura, véase también la Tabla 1):

Aglutinante 5: ácido 16-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi] etilcarbamoil]pirimidin-2-il] sulfamoil]fenoxi]hexadecanoico; éster terc-butílico:

ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4-(16-terc-butoxi-16-oxo-hexadecoxi)fenil]sulfonilamino]pirimidina-5-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético

Aglutinante 8: ácido 14-[5-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi] etilcarbamoil]pirimidin-2-il]sulfamoil]fenoxi]-2-fluorofenil]tetradecanoico; éster terc-butílico:

ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[5-[[4-[3-(14-*terc*-butoxi-14-oxo-tetradecil)-4-fluoro-fenoxi]fenil] sulfonilamino] pirimidina-2-carbonil]amino] etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético

Aglutinante 50: ácido 16-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoil]pirimidin-2-il]sulfamoil]-2-cloro-fenoxi]hexadecanoico; éster *terc*-butílico:

ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[[4-(16-*terc*-butoxi-16-oxo-hexadecoxi)-3-cloro-fenil]sulfonilamino]pirimidina-5-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil] amino]etoxi]etoxi]acético

Aglutinante 54: ácido 16-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoil]pirimidin-2-il]sulfamoil]fenil]hexadecanoico; y éster *terc*-butílico:

ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[[4-(16-*terc*-butoxi-16-oxo-hexadecil)fenil] sulfonilamino]pirimidina-5-carbonil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético

3.4.1 Síntesis de Glu(A14)His(B16)His(B25) [ácido 16-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-(carboximetiloxi)etoxi]etilamino]-2-oxoetoxi]etoxi]etilcarbamoil]pirimidin-2-il]sulfamoil]fenoxi]hexadecanoico]Lys(B29)Des(B30)-insulina

Se formó un enlace amida entre el grupo ϵ -amino de lisina B29 y el residuo de ácido acético activado del aglutinante en su forma de éster *terc*-butílico del ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4-(16-*terc*-butoxi-16-oxo-hexadecoxi) fenil]sulfonilamino]pirimidina-5-carbonil]amino]-etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético de la siguiente manera:

Una disolución de 400 mg del análogo de insulina 41 (Glu(A14)His(B16)His(B25)Des(B30)-insulina de acuerdo con el Ejemplo 3,2) se suspendió en 20 ml de agua y luego se añadieron 0,4 ml de trietilamina. A la disolución clara se le añadieron 20 ml de DMF y luego 5 ml (17,04

mM en DMF) de 16-[4-[[5-[2-[2-[2-[2-[2-(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoil]pirimidin-2-

il]sulfamoil]fenoxi]hexadecanoato) de terc-butilo. La disolución se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La reacción se analizó con Waters UPLC clase H a 214 nm en un tampón de fosfato y cloruro de sodio.

Waters BEH300 10 cm.

Tiempo de retención insulina: 2,643 min.

Tiempo de retención conjugado de insulina 6,224 min.

El producto se purificó por HPLC con ÄKTA avant 25.

Kinetex 5 µm C18 100 A 250 x 21,2 mm. Volumen de la columna (CV) 88 ml.

Disolvente A: 0,5% ácido acético en agua

Disolvente B: 0,5% ácido acético en agua / MeCN 4 : 6

Gradiente: 80 % A 20 % B a 20 % A 80 % B en 10 CV

Después de la liofilización del producto, el polvo se disolvió en 2 ml de ácido trifluoroacético.

Después de una hora, la disolución se neutralizó con bicarbonato sódico diluido. El producto se purificó por HPLC con ÄKTA avant 25. Kinetex 5 µm C18 100 A 250 x 21,2 mm. Volumen de la columna (CV) 88 ml.

Disolvente A: 0,5% ácido acético en agua

Disolvente B: 0,5% ácido acético en agua / MeCN 4 : 6

Gradiente: 70 % A 30 % B a 30 % A 70 % B en 8 CV

La reacción se analizó con Waters UPLC clase H a 214 nm en un tampón de fosfato y cloruro de sodio.

Waters BEH300 10 cm.

Tiempo de retención conjugado de insulina: 5,121 min.

La disolución se liofilizó y proporcionó el producto deseado.

63 mg 14 % rendimiento.

Espect. masas: 6453,9 g / mol.

Por consiguiente, se prepararon los conjugados de los aglutinantes 8, 50 y 54 y el análogo de insulina 4.

5

4. Datos analíticos

4.1 Análisis de cromatografía de líquidos, espectrometría de masas (LCMS)

10

Método Espectrometría de masas	Descripción del método	Tipo de espectrometría de masas
a	Waters SQD de un solo cuadrupolo, tiempo de barrido 0,13 s para masa 100-1400	UPLC esi
b	Waters SQD de un solo cuadrupolo, tiempo de barrido 0,5 s para masa 100-1400	UPLC esi

15

20

Método Cromatografía de líquidos	Descripción del método
A	Waters ACQUITY UPLC BEH C18 1,7um 2,1x50 mm MV Kit; H2O+0,05% TFA: MeCN+0,035% TFA 98:2 (0 min) a 98:2 (0,2 min) a 2:98 (3,8 min) a 2:98(4,3 min) a 98:2 (4,5 min), 1 ml/min 55°C

25

B	Waters ACQUITY UPLC BEH C18 1,7um 2,1x50 mm; H2O+0,05% TFA: MeCN+0,035% TFA 95:5 (0 min) a 5:95 (2 min) a 5:95 (2,6 min) a 95:5 (2,7 min) a 95:5 (3 min), 0,9 ml/min 55°C
C	Waters ACQUITY UPLC BEH C18 1,7um 2,1x50 mm; H2O+0,05% TFA: MeCN+0,035% TFA 98:2 (0 min) a 98:2 (0,2 min) a 2:98 (3,8 min) a 2:98 (4,3 min) a 98:2 (4,5 min), 1 ml/min 55°C

5

10

La Tabla 1 en la sección 4.2 muestra los resultados del análisis LCMS de los aglutinantes aislados.

4.2 Análisis de unión a albúmina

15

Instrumento: Waters Alliance 2795 / Waters PDA 2996 o Waters Clase H UPLC equipado con un detector de matriz de fotodiodos Waters Acquity

Software: Waters Empower 3

Columna: CHIRALPAK® HSA 50 x 4 mm; tamaño de partícula 5 µm

Números de orden Chiraltech: HSA: 34712

20

Eluyente A: Disolución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH=7,4
Gibco PBS pH 7,4 (10x) disolución salina tamponada con fosfato 500 ml; número de orden: 70011-036 (500 ml)

Eluyente B: Isopropanol

25

Número de orden Fisher: A461-1 (1L)

Gradiente:

Tiempo [min]	% A	% B
0	98	2
2	98	2
17	60	40
22	60	40
22,2	98	2
30	98	2
31	95	5

Temperatura de la columna: 25 °C

Caudal: 1,0 ml/min

Detección: $\lambda = 220 \text{ nm}$

Volumen inyección: 20 μl

- Conc. muestra:
- 1 mg/ml disolución insulina en PBS para muestras de insulina
 - 5 μl de disolución madre DMSO 10 mM (DMSO evaporado y re-disuelto en 200 μl i-propanol/agua 1:1 v/v) para muestras de aglutinantes aislados (250 μM , 0,2 mg/ml a 800Da peso mol)

marcador t0

Disolución de nitrato sódico (NaNO_3) en agua, 0,05 mg/ml

Se diluye a partir de 1 mg/ml disolución madre acuosa (número de orden Fluka: 74246-100ML)

Valor informado

Tiempo de retención neto de la muestra: TiempoRet

Muestra – TiempoRet marcador t0

La cromatografía de afinidad se llevó a cabo i) para conjugados de insulina de conformidad con los Ejemplos 3.3 y 3.4 en un Módulo de Separación Waters Alliance 2695 equipado con un detector de matriz de fotodiodos Waters 2996 o Waters Clase H UPLC equipado con un detector de matriz de fotodiodos Waters Acquity y ii) para aglutinantes aislados de conformidad con el Ejemplo 2.11 en un Módulo de Separación Waters Alliance 2795 equipado con un detector de matriz de fotodiodos Waters 2996 o Waters Clase H UPLC equipado con un detector de matriz de fotodiodos Waters Acquity.

Se usó Waters Empower 3 para todas las mediciones como software de procesamiento de datos.

Las columnas con albúmina de suero humana inmovilizada (50 x 4 mm; tamaño de partícula 5 µm) se adquirieron de Chiralpak y se emplearon para separaciones.

Se adquirió disolución salina tamponada con fosfato (PBS) de Gibco y se utilizó como el Eluyente A, se adquirió isopropanol de Fisher y se utilizó como el Eluyente B.

El gradiente aplicado con un flujo de 1,0 ml/min se muestra a continuación:

Tiempo [min]	% Eluyente A	% Eluyente B
0	98	2
2	98	2
17	60	40
22	60	40
22,2	98	2

30	98	2
31	95	5

Las columnas con albúmina de suero inmovilizadas se mantuvieron a 25°C durante la pasada de LC, se llevó a cabo detección UV a 220 nm y el volumen de inyección fue 20 µl.

El tiempo de retención neto de las muestras se informa de acuerdo con

Tiempo de retención neto = TiempoRet Muestra – TiempoRet marcador t₀

La Tabla 1 muestra los resultados de unión a la albúmina de los aglutinantes aislados, junto con los datos de LCMS de la sección 4.1.

Las abreviaturas utilizadas en la Tabla 1 se definen a continuación:

NRT: Tiempo de retención neto en las columnas con albúmina del suero humana inmovilizada

LCMS: Cromatografía de líquidos-espectrometría de masas

MSM: Método de espectrometría de masas

OIM: Masa iónica observada

OIT: Tipo de ion observado

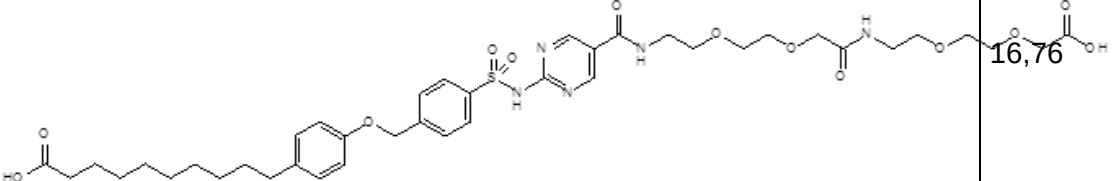
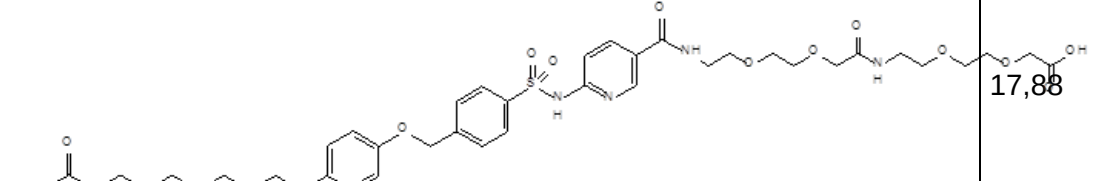
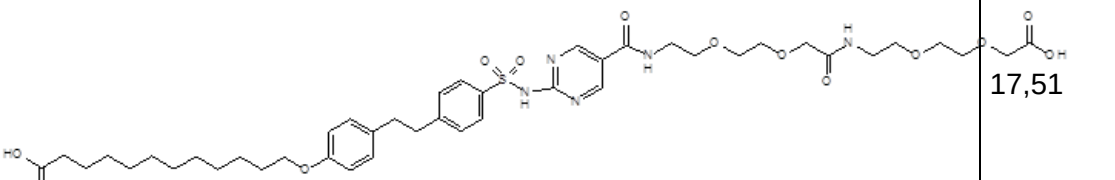
IM: Método de ionización

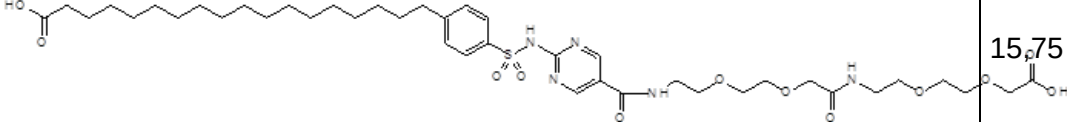
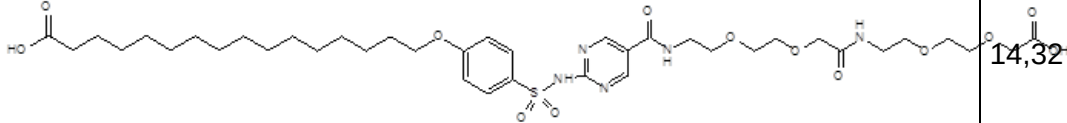
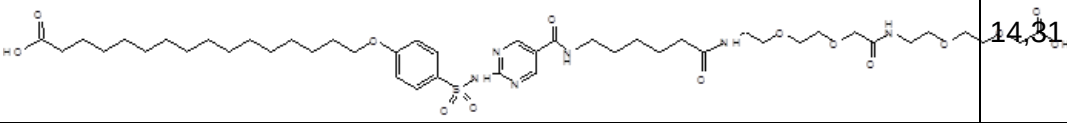
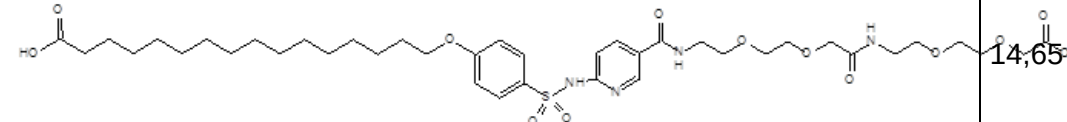
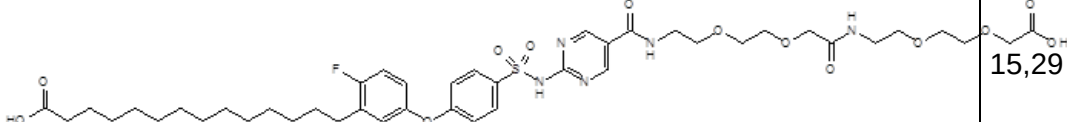
LCRT: Tiempo de retención de la cromatografía de líquidos

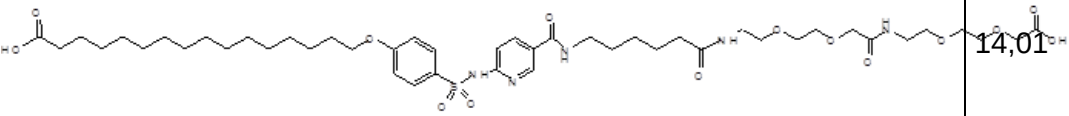
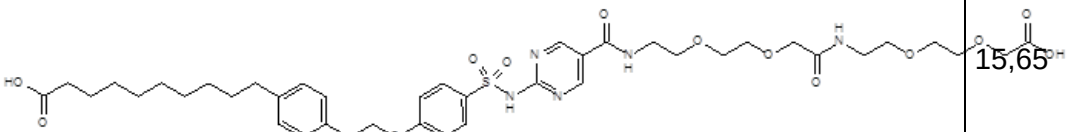
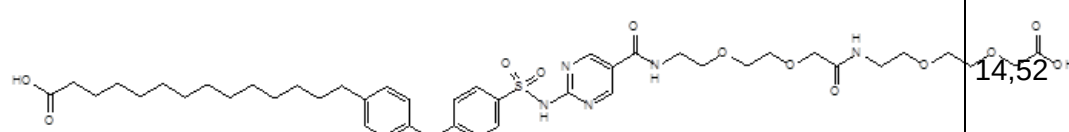
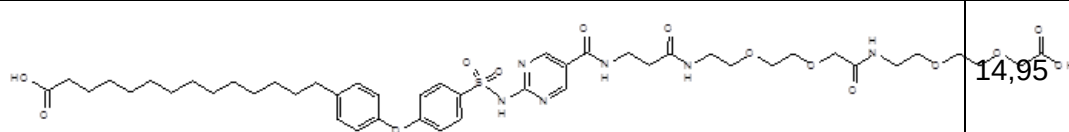
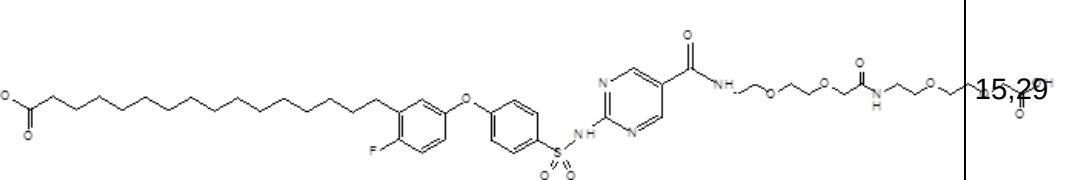
LCM: Método de cromatografía de líquidos

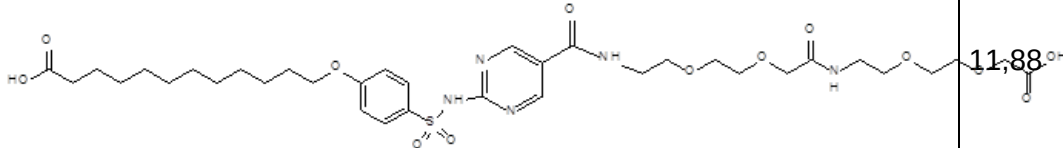
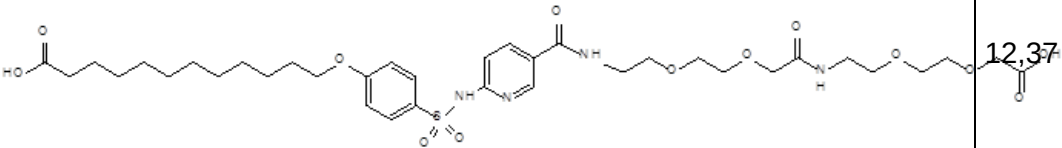
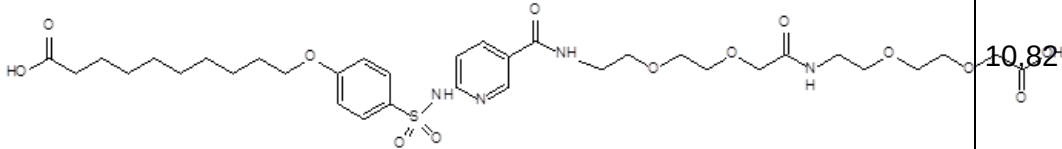
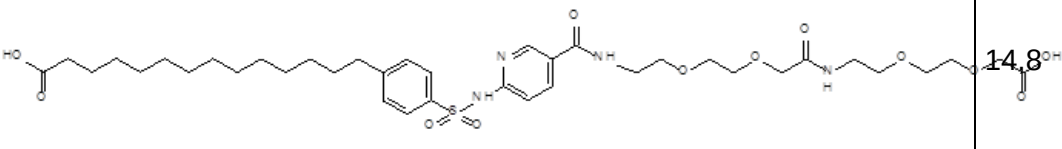
Tabla 1

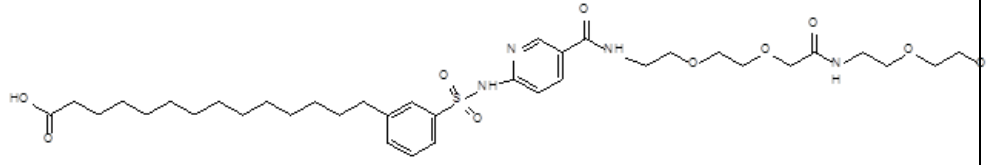
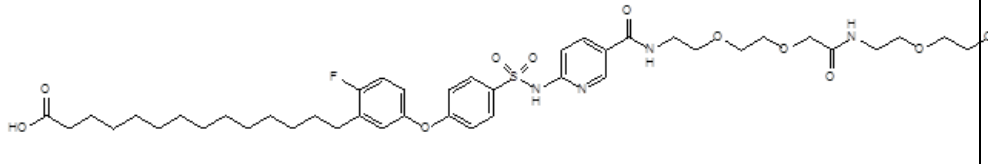
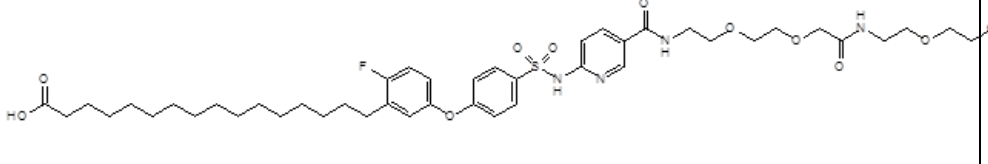
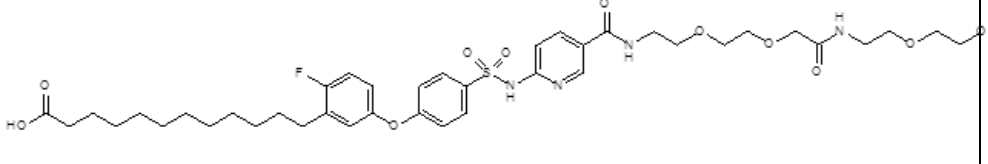
Resultados de las Columnas con albúmina del suero inmovilizada y datos de LCMS

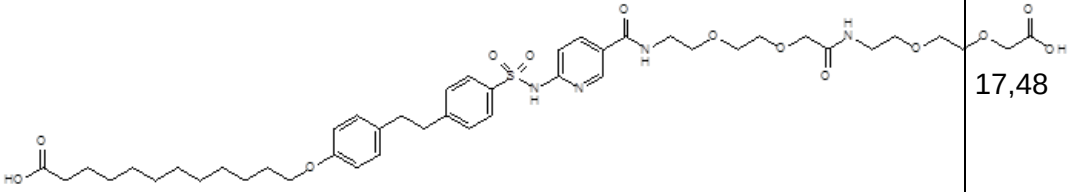
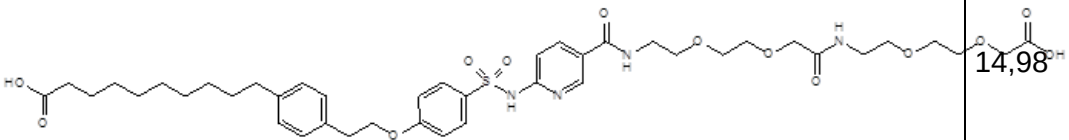
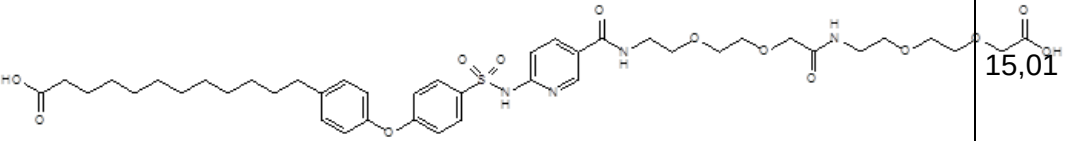
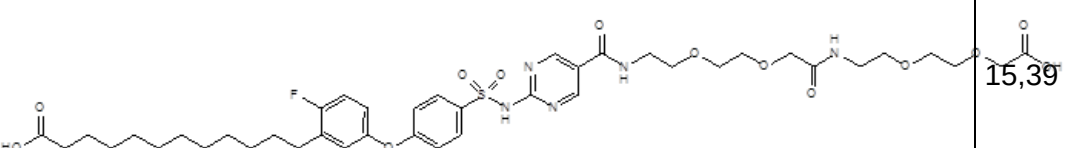
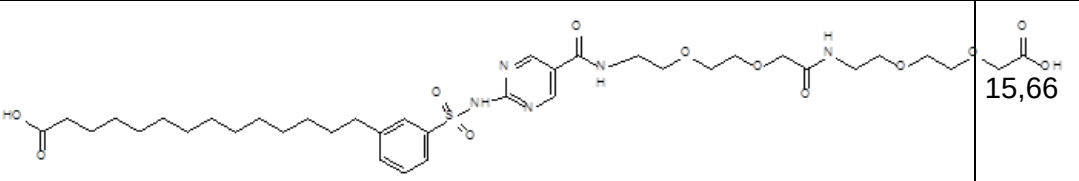
No	Estructura	NRT [min]	LCMS					
			MSM	OIM	OIT	IM	LCRT[min]	LCM
1		16,76	b	846,3 7	[M+H] +	ES+	1,78	B
2		17,88	b	845,3 7	[M+H] +	ES+	2,28	C
3		17,51	b	888,3 5	[M+H] +	ES+	2,52	C

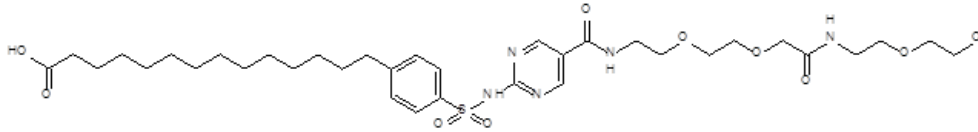
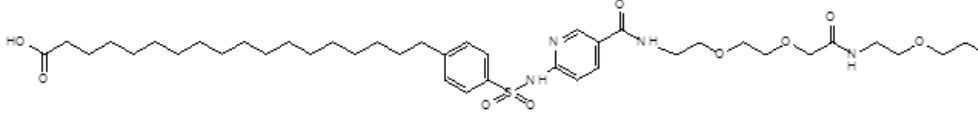
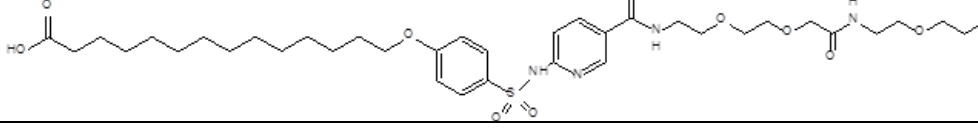
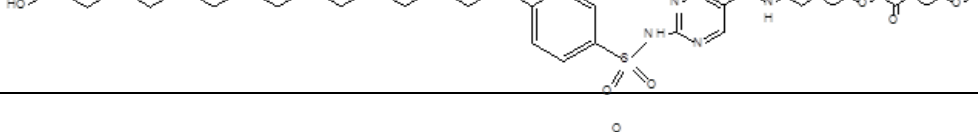
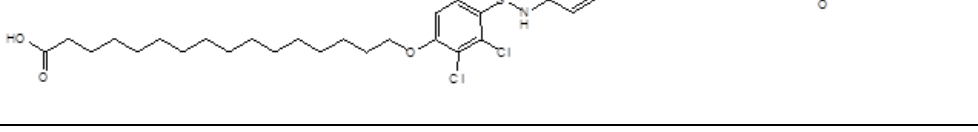
No	Estructura	NRT [min]	LCMS				
			MSM	OIM	OIT	IM	LCRT[min]
4		15,75	b	852,7	[M+H] +	ES+	2,88 A
5		14,32	b	840,3 5	[M+H] +	ES+	2,59 C
6		14,31	b	953,4 6	[M+H] +	ES+	2,58 C
7		14,65	b	839,4	[M+H] +	ES+	2,58 C
8		15,29	a	906,5 2	[M+H] +	ES+	2,77 C

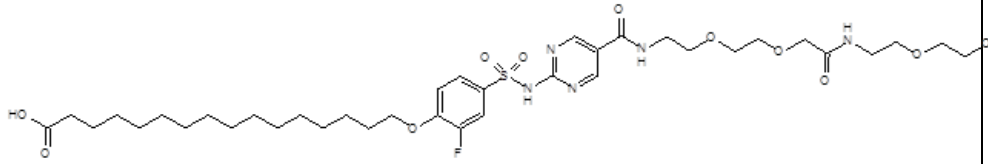
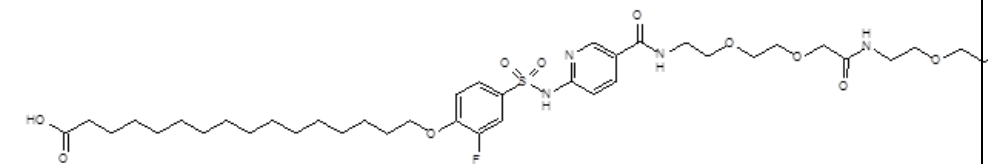
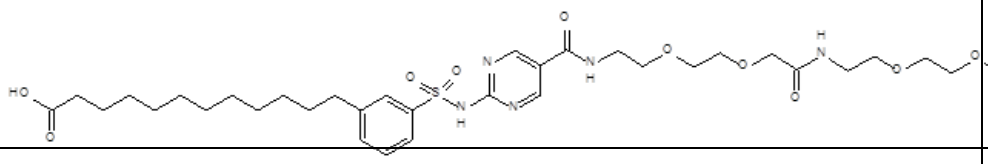
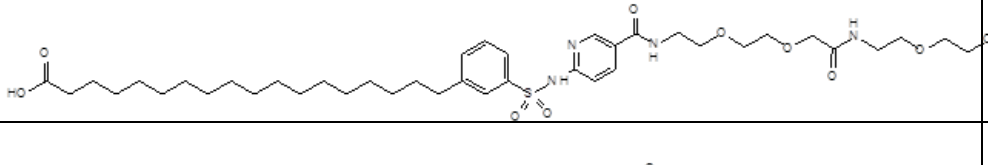
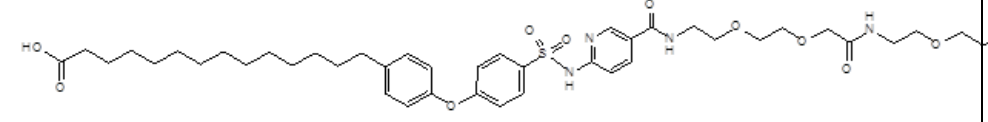
No	Estructura	NRT [min]	LCMS				
			MSM	OIM	OIT	IM	LCRT[min]
9		14,01	b	952,4	[M+H] +	ES+	2,57 C
10		15,65	b	860,3 2	[M+H] +	ES+	2,38 C
11		14,52	b	888,7	[M+H] +	ES+	2,78 A
12		14,95	b	957,7	[M-H]-	ES-	2,73 A
13		15,29	b	934,7 8	[M+H] +	ES+	2,99 A

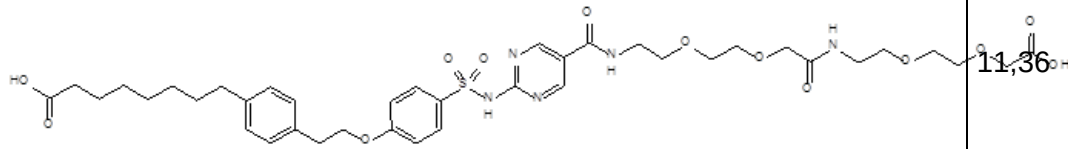
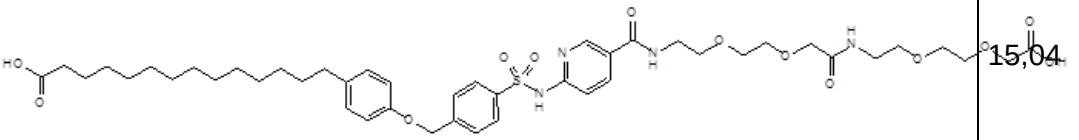
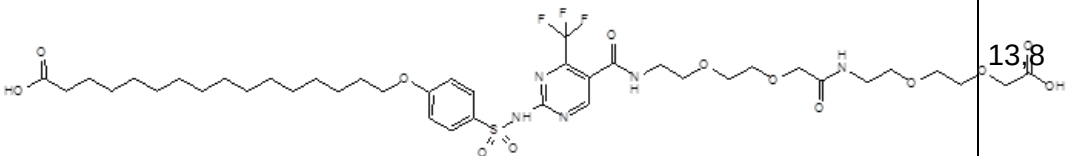
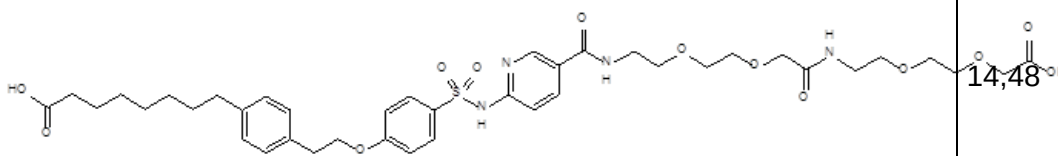
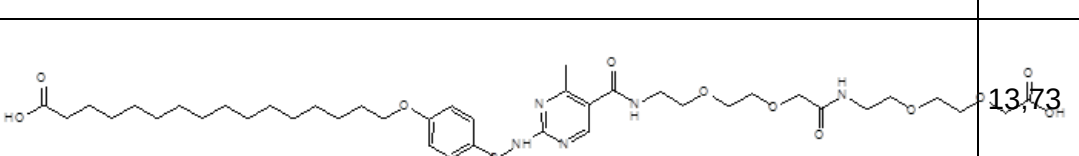
No	Estructura	NRT [min]	LCMS					
			MSM	OIM	OIT	IM	LCRT[min]	LCM
16		11,88 ^{OH}	a	784,28	[M+H] ⁺	ES+	2,14	C
18		12,37 ^H	a	783,34	[M+H] ⁺	ES+	2,13	C
19		10,82 ^H	a	755,28	[M+H] ⁺	ES+	1,87	C
20		14,8 ^{OH}	a	795,37	[M+H] ⁺	ES+	2,4	C

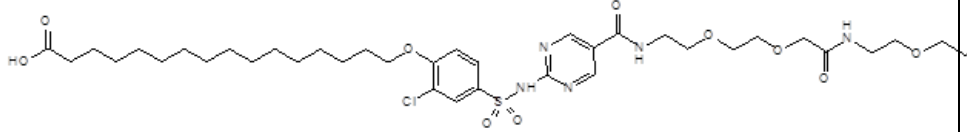
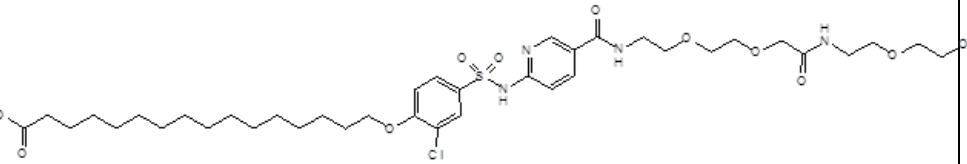
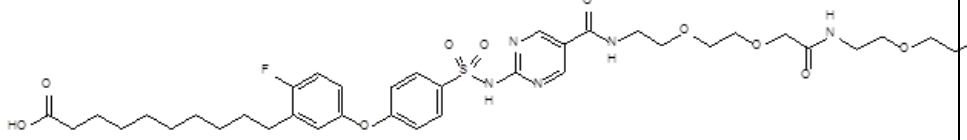
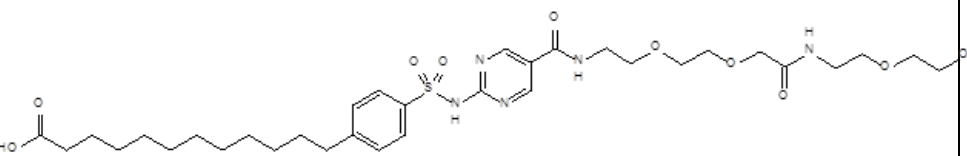
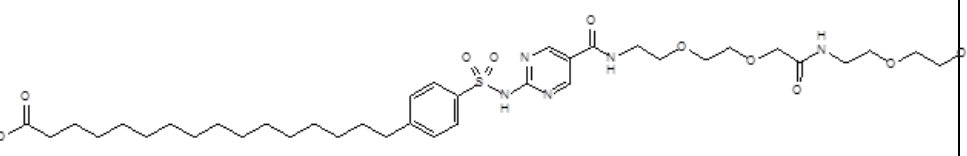
No	Estructura	NRT [min]	LCMS					
			MSM	OIM	OIT	IM	LCRT[min]	LCM
21		16,26	a	795,37	[M+H] +	ES+	2,38	C
22		15,55	a	905,47	[M+H] +	ES+	2,77	C
23		15,61	a	933,54	[M+H] +	ES+	2,99	C
24		15,76	a	877,44	[M+H] +	ES+	2,55	C

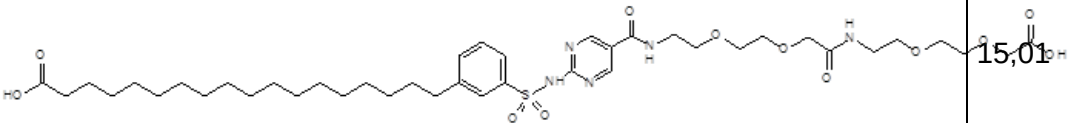
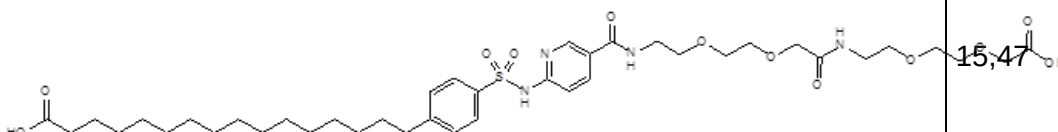
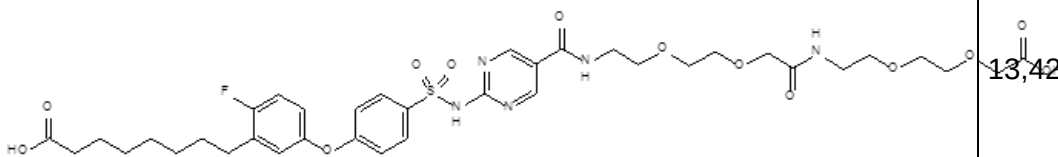
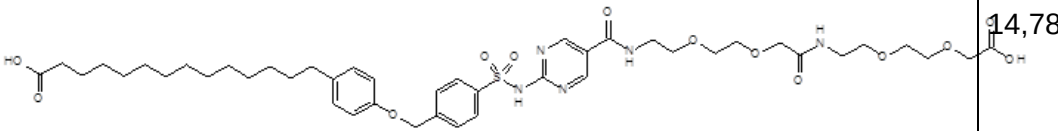
No	Estructura	NRT [min]	LCMS				
			MSM	OIM	OIT	IM	LCM
						LCRT[min]	
25		17,48	a	887,4 9	[M+H] +	ES+ 2,54	C
26		14,98	a	859,4 4	[M+H] +	ES+ 2,41	C
27		15,01	a	859,4 5	[M+H] +	ES+ 2,55	C
28		15,39	a	878,4	[M+H] +	ES+ 2,57	C
29		15,66	a	796,4	[M+H] +	ES+ 2,39	C

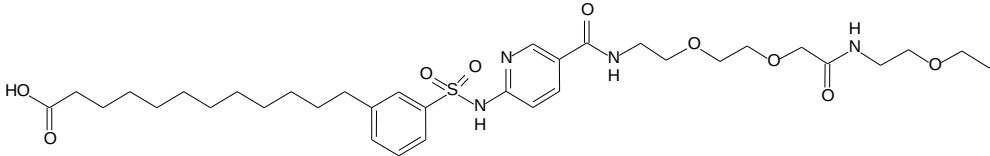
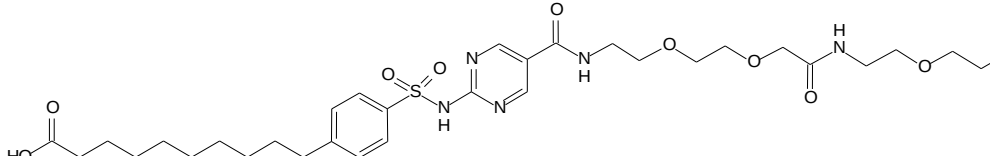
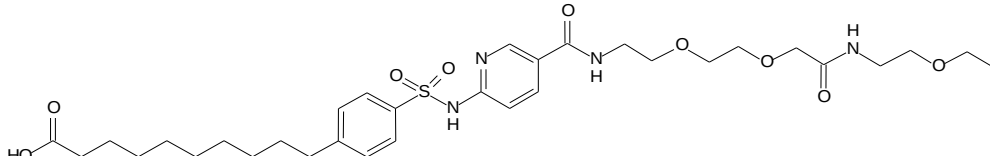
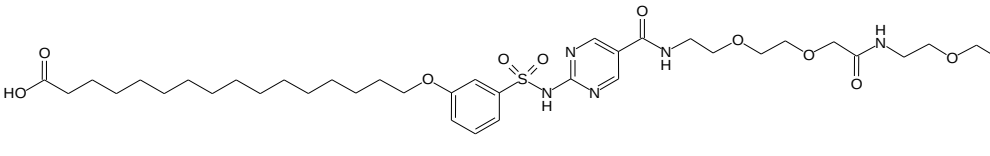
No	Estructura	NRT [min]	LCMS					
			MSM	OIM	OIT	IM	LCRT[min]	LCM
30		14,36	a	796,44	[M+H] ⁺	ES+	2,41	C
31		15,77	a	851,51	[M+H] ⁺	ES+	2,88	C
32		13,9	a	811,29	[M+H] ⁺	ES+	2,36	C
33		13,57	a	812,23	[M+H] ⁺	ES+	2,37	C
36		13,89	a	907,59	[M+H] ⁺	ES+	2,74	C

No	Estructura	NRT [min]	LCMS					
			MSM	OIM	OIT	IM	LCRT[min]	LCM
38		13,53	a	858,6	[M+H] +	ES+	2,62	C
39		13,68	a	857,6 2	[M+H] +	ES+	2,6	C
40		11,44	a	768,6	[M+H] +	ES+	2,14	C
41		14,08	a	851,7	[M+H] +	ES+	2,82	C
42		14,35	a	887,6 5	[M+H] +	ES+	2,76	C

No	Estructura	NRT [min]	LCMS					
			MSM	OIM	OIT	IM	LCRT[min]	LCM
43		11,36	a	832,6	[M+H] +	ES+	2,18	C
44		15,04	a	901,7 2	[M+H] +	ES+	2,76	C
45		13,8	a	908,6 6	[M+H] +	ES+	2,77	C
46		14,48	a	831,6	[M+H] +	ES+	2,16	C
47		13,73	a	854,7	[M+H] +	ES+	2,63	C

No	Estructura	NRT [min]	LCMS					
			MSM	OIM	OIT	IM	LCRT[min]	LCM
50		13,74	a	874,6	[M+H] +	ES+	2,7	C
51		13,59	a	871,6	[M-H]-	ES-	2,68	C
52		14,56	a	850,5 4	[M+H] +	ES+	2,33	C
53		12,29	a	768,5	[M+H] +	ES+	2,16	C
54		15,19	a	824,6 1	[M+H] +	ES+	2,64	C

No	Estructura	NRT [min]	LCMS					
			MSM	OIM	OIT	IM	LCRT[<i>min</i>]	LCM
55		15,01	a	852,58	[M+H] ⁺	ES+	2,84	C
59		15,47	a	821,62	[M-H] ⁻	ES-	2,62	C
63		13,42	a	822,52	[M+H] ⁺	ES+	2,11	C
64		14,78	a	902,65	[M+H] ⁺	ES+	2,78	C
65		12,21	a	767,61	[M+H] ⁺	ES+	2,13	C

No	Estructura	NRT [min]	LCMS				
			MSM	OIM	OIT	IM	LCRT[min]
							
66		9,87	a	740,5 7	[M+H] +	ES+	1,92 C
67		10,99	a	739,5 7	[M+H] +	ES+	1,91 C
68		14,74	a	840,5 7	[M+H] +	ES+	2,60 C

No	Estructura	NRT [min]	LCMS					
			MSM	OIM	OIT	IM	LCRT[min]	LCM
69		14,24	a	868,8 2	[M+H] +	ES+	2,84	C
70		14,26	a	867,8 3	[M+H] +	ES+	2,83	C
71		14,42	a	895,8 1	[M+H] +	ES+	3,06	C
72		13,96	a	908,7 9	[M+H] +	ES+	2,77	C

5 Afinidad de unión al receptor de insulina

La afinidad de unión al receptor de insulina para la insulina, el análogo de insulina 41 y los
 5 conjugados respectivos que se exponen en la Tabla 2 se determinó como se describe en
 Hartmann et al. (Effect of the long-acting insulin analogues glargine and degludec on
 cardiomyocyte cell signaling and function. *Cardiovasc Diabetol.* 2016;15:96). Se efectuaron
 aislamiento de membranas plasmáticas embebidas en receptor de insulina (M-IR) y
 experimentos de unión de competición como se describió precedentemente (Sommerfeld
 10 *et al.*, *PLoS One.* 2010; 5(3): e9540). En síntesis, se recogieron células CHO que
 sobreexpresan el IR y se re-suspendieron en tampón STM 2,25 enfriado con hielo (sacarosa
 2,25 M, Tris-HCl 5 mM pH 7,4, MgCl₂, inhibidor de proteasa completa) y se rompió usando
 un homogeneizador Dounce seguido de sonicación. El homogeneizado se recubrió con
 tampón 0,8 STM (sacarosa 0,8 M, Tris-HCl 5 mM pH 7,4, MgCl₂ 5 mM, inhibidor de proteasa
 15 completa) y se ultra-centrifugó durante 90 min a 100.000 g. Se recogieron las membranas
 plasmáticas en la interfaz y se lavaron dos veces con disolución salina tamponada con
 fosfato (PBS). El sedimento final se re-suspendió en tampón de dilución (Tris-HCl 50 mM
 pH 7,4, MgCl₂ 5 mM, inhibidor de proteasa completa) y se homogeneizó nuevamente con
 un homogeneizador Dounce. Se efectuaron experimentos de unión de competición en
 20 tampón de unión (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, 0,1 % BSA, inhibidor de proteasa
 completa, ajustado hasta pH 7,8) en microplacas de 96 pocillos. En cada pocillo, se
 incubaron 2 µg de membrana aislada con 0,25 mg de perlas de ensayo de proximidad de
 centelleos (SPA) con poliviniltolueno polietilenimina de aglutinina de germen de trigo (SPA).
 Se añadieron concentraciones constantes de Ins humana etiquetada con [125I]- Ins (100
 25 pM) y distintas concentraciones de Ins no etiquetadas respectivas (0,001–1000 nM) durante

12 h a temperatura ambiente (23 °C). Se midió la radiactividad en equilibrio en un contador de centelleos de microplacas (Wallac Microbeta, Freiburg, Alemania).”

La afinidad de unión al receptor de insulina en relación a la insulina humana para el análogo ilustrado en la Tabla 2 comprende los siguientes intervalos: A ($\geq 40\%$); B ($< 20\%$). El conjugado insulina humana + aglutinante no. 5 pertenece a la categoría A, mientras que todos los otros conjugados y el análogo de insulina 41 se clasificaron bajo la categoría B.

Tabla 2

Afinidad de unión al receptor de insulina B en relación a insulina humana

10	No. de aglutinante	Esqueleto	Activación del receptor B <i>in vitro</i>
	5	Insulina humana	A
	5	Análogo de insulina 41	B
15	8	Análogo de insulina 41	B
	50	Análogo de insulina 41	B
	54	Análogo de insulina 41	B
20	---	Análogo de insulina 41	B

6. Ensayo *in vivo* – Evaluación de los efectos de farmacocinética

Se utilizaron minicerdos Göttingen normoglucémicos sanos (8-11 meses de vida, peso corporal ~12-18 kg) para evaluar los efectos de farmacodinamia y farmacocinética de los

análogos de insulina de muy larga acción en animales. Los cerdos se mantuvieron bajo condiciones de alojamiento animal estándar y se alimentaron una vez al día con acceso a agua a voluntad. Después de ayunar durante toda la noche, los cerdos fueron tratados con una sola inyección subcutánea de una disolución que contenía o bien una formulación con placebo, insulina o análogo de insulina, o el conjugado respectivo. Se ensayaron insulina humana pura y análogo de insulina 41 puro, además del conjugado de aglutinante no. 5 con insulina humana y los conjugados de aglutinantes 5, 50 y 54 con el análogo de insulina 41. Se extrajo sangre mediante catéteres venosos centrales implantados para determinar la glucosa sanguínea, la farmacocinética y biomarcadores adicionales de plasma K-EDTA. La extracción de sangre comenzó antes de la administración del artículo de ensayo (situación inicial) y se repitió 1-4 veces por día hasta el final de estudio. Durante el estudio, los animales fueron alimentados después de la última extracción de sangre del día. Todos los animales fueron controlados regularmente y se registraron los signos clínicos por lo menos dos veces al día el día de tratamiento y una vez al día el resto de los días del estudio. Se controlaron cuidadosamente los signos clínicos de hipoglucemia, incluido comportamiento, piel, orina y heces, condición de los orificios corporales y cualquier signo de enfermedad. En caso de hipoglucemia severa, el investigador permitió que el animal accediera a alimento o se infundió disolución de glucosa por vía intravenosa (i.v.) en caso de que no fuera posible la ingesta de alimento. Después de la última extracción de sangre, los animales fueron transportados nuevamente a la instalación de cuidado animal no GLP.

Para determinación de los parámetros de farmacocinética, se emplearon las siguientes condiciones experimentales.

6.1 Materiales y sustancias químicas

Se adquirieron MeCN (hyperSolv chromanorm), sulfóxido de dimetilo (uvasol), 2-propanol, metanol (hyperSolv chromanorm), agua (hyperSolv chromanorm), ácido fórmico (98-100%)

de Merck (Darmstadt, Alemania). Se obtuvieron analitos y referencias internas adecuadas de Sanofi. Se obtuvo plasma testigo (K2-EDTA como anticoagulante) de Seralab (West Sussex, Reino Unido).

6.2 Disoluciones madre y de trabajo del compuesto de ensayo y estándar interno

5 Las disoluciones madre del compuesto de ensayo y su estándar interno se prepararon en MeCN /agua/ácido fórmico (50:50:1, v/v/v) en una concentración de 1 mg/ml. Las disoluciones de trabajo del compuesto de ensayo y el correspondiente estándar interno se prepararon en el mismo disolvente en una concentración de 100 µg/ml y 1250 ng/ml, respectivamente.

10 6.3 Preparación de muestras de plasma

A una porción de 25 µl de plasma se le añadieron 10 µl de disolución de trabajo estándar interna (1250 ng/ml) en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Después de sellar y mezclar, se añadieron 75 µl de MeCN/metanol (80:20, v/v) y las muestras se agitaron en vórtex durante 5 s y 10 min a aproximadamente 5°C y 3000 g. Luego se transfirieron 75 µl de sobrenadante
15 a un vial del automuestreador que contenía 75 µl de agua. Los viales se sellaron, mezclaron y analizaron.

6.4 Análisis LC-MS/MS

El análisis LC-MS/MS de la insulina intacta se realizó en Agilent 1290 Serie HPLC (Waldbronn, Alemania), acoplado a un espectrómetro de masas ABSciex QqQ API 4000
20 (Darmstadt, Alemania). La LC se equipó con una columna analítica Aeris PEPTIDE XB-C18 (100 x 2,1 mm, tamaño de partícula 3,6 µm, Phenomenex) operada a 40°C. La fase móvil A consistió en agua/ácido fórmico/DMSO (100:0,1:1, v/v/v) y la fase móvil B en MeCN/ácido fórmico/DMSO (100:0,1:1, v/v/v). El programa de HPLC comenzó manteniendo las condiciones iniciales de 2% B durante 0,5 min, luego se aplicó un gradiente de 2% B a 90%
25 B dentro de 7,5 minutos y la columna se re-equilibró durante 2 minutos. El caudal fue 600

μl/min y se inyectó un volumen de 40 μl en el sistema. El espectrómetro de masas se operó en modo positivo a un voltaje de pulverización de iones de 5500 V, y el potencial de desagrupación se optimizó para un aislamiento eficiente de las moléculas protonadas 5 veces. El espectrómetro de masas operaba en modo positivo y los parámetros específicos del compuesto MS se optimizaron para obtener la mejor sensibilidad. Se usó nitrógeno como gas de colisión.

El tiempo de semivida ($t_{1/2}$) de los parámetros de farmacocinética (PK) y tiempo medio de residencia (MRT) se muestran en la Tabla 3.

Para insulina humana, se expone el valor de MRT de la bibliografía obtenido en minicerdos Yucatán con diabetes crónica (Senshang Lin, Li-Lan H. Chen y Yie W. Chien, The journal of pharmacology and experimental therapeutics, 1998, 286, 959-966). El $t_{1/2}$ enumerado se calculó como una aproximación usando la fórmula $t_{1/2} * 1,44$ de acuerdo con el libro de texto Clinical Pharmacokinetics Concepts and applications de Tozer y Rowland, 3ª edición (Editor Lippincott Williams & Wilkins), 1995- Sección II-6).

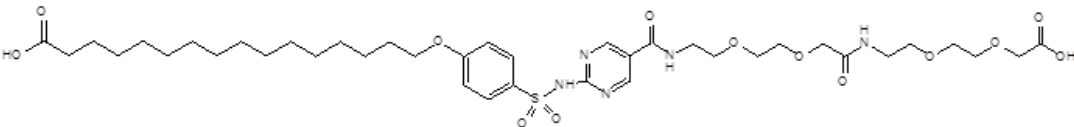
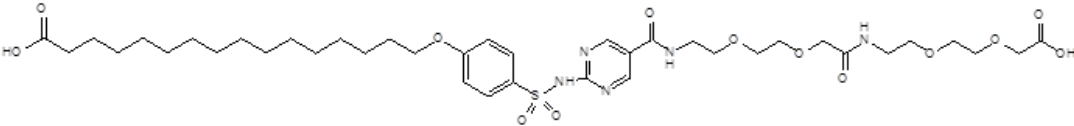
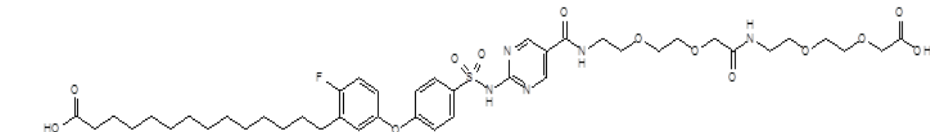
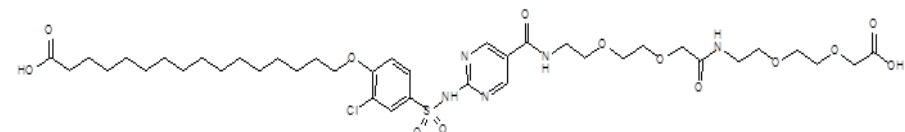
Como se puede observar, la conjugación de derivados de insulina, aquí insulina humana o el análogo de insulina 41, con los aglutinantes de la invención tuvo un impacto significativo en las propiedades de PK (farmacocinética) de los conjugados resultantes, conduciendo a un incremento en los valores de $t_{1/2}$ y MRT.

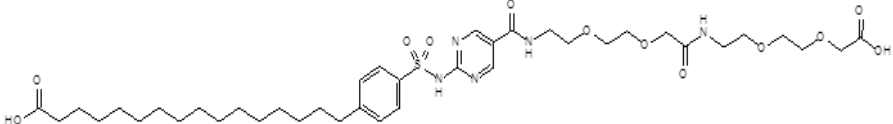
20

25

Tabla 3

Resultados de farmacocinética de insulinas puras frente a conjugados

No. de aglutinante	Estructura del aglutinante	Esqueleto	PK $t_{1/2}$	MRT
---	Sin aglutinante	Insulina humana	~2 h**	2,8 h*
5		Insulina humana	30 h	47,2 h
5		Análogo de insulina 41	37 h	57,7 h
8		Análogo de insulina 41	38 h	63,3 h
50		Análogo de insulina 41	52 h	83 h

No. de aglutina nte	Estructura del aglutinante	Esqueleto	PK $t_{1/2}$	MRT
54		Análogo de insulina 41	33 h	56,5 h

* De: Senshang Lin, Li-Lan H. Chen y Yie W. Chien, The journal of pharmacology and experimental therapeutics, 1998, 286, 959-966.

** Calculado a partir de $t_{1/2} = \text{MRT} / 1,44$ de acuerdo con Clinical Pharmacokinetics Concepts and applications de Tozer y Rowland, 3ª edición (Editor Lippincott Williams & Wilkins), 1995- Sección II-6).

Los efectos de farmacodinamia de varias insulinas y conjugados se muestran en las Figuras 1 y 2, es decir, se ilustra el efecto sobre la glucosa sanguínea después de la administración s.c. Los datos demostraron una prolongación significativa de la duración de la acción para todos los conjugados insulina-aglutinante ensayados (> 48 h), en relación con el análogo de insulina 41 y la insulina humana, respectivamente, para los cuales se observó una duración de la acción en las dosis ensayadas de menos de 24 horas. Para los conjugados de insulina de ensayo con una afinidad de unión reducida al receptor de insulina, la dosis *in vivo* seleccionada fue superior que para las insulinas originales correspondientes, que no se ensayaron en dosis mayores para evitar efectos hipoglucémicos.

Ejemplo 7: Producción de insulina humana y análogos de insulina

La insulina humana, así como también los análogos de insulina, se produjeron en forma recombinante. Se adquirieron polinucleótidos que codifican pre-pro-insulina de Geneart®. Los polinucleótidos diseñados se optimizaron para expresión en levadura. Se insertaron en un vector de expresión por clonación de restricción clásica que permite la expresión funcional y segregación en *Klyveromyces lactis* K. Como líder de segregación, el gen se condensó en el extremo C a una secuencia de ADN que codifica la señal del factor de apareamiento alfa de *Saccharomyces cerevisiae*. La expresión del gen recombinante se controló con un promotor inducible de lactosa *K. lactis*.

La insulina humana, así como los análogos de insulina, se fabricaron como pre-pro-insulina. Se usó una pre-secuencia N-terminal genéticamente condensada para mejorar la expresión y segregación y para estabilizar el péptido en el caldo de cultivo. Se puede usar una amplia variedad de secuencias para este propósito y se ensayaron para eficiencia. La proinsulina propiamente dicha consiste en una cadena B condensada a un péptido C seguida de una cadena A C-terminal. Como el péptido C, se describe una diversidad de combinaciones de

aminoácidos. Se demostró que los péptidos cortos de 1-10 aminoácidos funcionan bien como secuencias C. Para procesamiento posterior de la insulina son importantes los sitios de reconocimiento para proteasas específicas, que flanquean el péptido C para permitir su escisión.

5 Se convirtieron en competentes células *K. lactis* a través de medios químicos. Posteriormente, las células se transformaron con el plásmido de expresión que codifica la respectiva pre-pro-insulina. Después de la inserción del plásmido, las células se dispusieron en placas de agar selectivas que contenían geneticina. Se aislaron las colonias desarrolladas y se ensayaron para expresión de genes recombinantes. Las células se
10 desarrollaron hasta densidades celulares suficientemente altas en medio de levadura peptona dextrosa enriquecido con geneticina. Después de la fase de crecimiento inicial, se añadió a los cultivos un medio de extracto de levadura tamponado con sal con geneticina enriquecida con lactosa para inducir la expresión del gen recombinante. Se desarrollaron los cultivos durante varios días y los sobrenadantes se recogieron por centrifugación.

15 La purificación de la insulina funcional o los análogos de insulina comenzó con un procedimiento de filtración. El procedimiento de captación cromatográfica inicial se realizó con una resina de intercambio iónico. La escisión de pre-pro-insulina a insulina se realizó con una proteasa altamente específica. La reducción de proteína de células hospedantes, pre-secuencia y productos relacionados se efectuaron con una cascada de dos etapas
20 cromatográficas adicionales. Después de una cromatografía de interacción hidrófoba, se aplicó otro procedimiento de intercambio iónico para alcanzar este objetivo. El pulido final se realizó por cromatografía de fase inversa. Se usaron filtración, precipitación y liofilización para finalizar el proceso de producción de la molécula de insulina.

Después de las reacciones de acoplamiento con un derivado de ácido carboxílico activado,
25 se filtró la disolución con moléculas de insulina conjugadas. La purificación final se realizó

por cromatografía de fase inversa. Se usaron filtración, precipitación y liofilización para finalizar la síntesis de la molécula diana.

Se generaron varios análogos de insulina con mutaciones, p. ej., en las posiciones B16, B25 y/o A14. La Tabla 4 exhibe un panorama general de las insulinas generadas.

5

10

15

20

25

Tabla 4: Análogos generados de insulina humana

Aná logo	Esqueleto	A 1 4	B 1 6	B 2 5	Cadena A de la secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO (cadena A)	Cadena B de la secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO (cadena B)
WT	Insulina humana (de tipo salvaje)	T yr	T yr	P h e	GIVEQCCTSICSLYQ LENYCN	1	FVNQHLCGSHLVEAL YLVCGERGFFYTPKT	2
2	Glu(A14)Des(B30)-Insulina	G lu	T yr	P h e	GIVEQCCTSICSLEQ LENYCN	3	FVNQHLCGSHLVEAL YLVCGERGFFYTPK	4
3	Leu(B16)Des(B30)-Insulina	T yr	L e u	P h e	GIVEQCCTSICSLYQ LENYCN	5	FVNQHLCGSHLVEAL LLVCGERGFFYTPK	6
4	Gly(A21)Trp(B16)Des(B30)- Insulina	T yr	T rp	P h e	GIVEQCCTSICSLYQ LENYCG	7	FVNQHLCGSHLVEAL WLVCGERGFFYTPK	8
5	His(B16)Des(B30)-Insulina	T yr	H is	P h e	GIVEQCCTSICSLYQ LENYCN	9	FVNQHLCGSHLVEAL HLVCGERGFFYTPK	10

6	Val(B16)Des(B30)-Insulina	T yr	V al e	P h e	GIVEQCCTSICSLYQ LENYCN	11	FVNQHLCGSHLVEAL VLVCGERGGFFYTPK	12
7	Ala(B25)-Insulina	T yr	T yr	Al a	GIVEQCCTSICSLYQ LENYCN	13	FVNQHLCGSHLVEAL YLVCGERGFAYTPKT	14
8	Ala(B25)Des(B30)-Insulina	T yr	T yr	Al a	GIVEQCCTSICSLYQ LENYCN	15	FVNQHLCGSHLVEAL YLVCGERGFAYTPK	16
9	Glu(B25)Des(B30)-Insulina	T yr	T yr	G lu	GIVEQCCTSICSLYQ LENYCN	17	FVNQHLCGSHLVEAL YLVCGERGFYTPK	18
10	His(B25)Des(B30)-Insulina	T yr	T yr	H is	GIVEQCCTSICSLYQ LENYCN	19	FVNQHLCGSHLVEAL YLVCGERGFHYTPK	20
11	Leu(B25)Des(B30)-Insulina	T yr	T yr	L e u	GIVEQCCTSICSLYQ LENYCN	21	FVNQHLCGSHLVEAL YLVCGERGFLYTPK	22
12	Val(B25)Des(B30)-Insulina	T yr	T yr	V al	GIVEQCCTSICSLYQ LENYCN	23	FVNQHLCGSHLVEAL YLVCGERGFVYTPK	24
13	His(B16)His(B25)Des(B30)- Insulina	T yr	H is	H is	GIVEQCCTSICSLYQ LENYCN	25	FVNQHLCGSHLVEAL HLVCGERGFHYTPK	26

14	Gly(A21)Trp(B16)His(B25)Des(B30)-Insulina	T yr	T rp	H is	GIVEQCCTSICSLYQ LENYCG	27	FVNQHLCGSHLVEAL WLVCGERGFHYTPK	28
15	Gly(A21)Trp(B16)Trp(B25)Des(B30)-Insulina	T yr	T rp	T rp	GIVEQCCTSICSLYQ LENYCG	29	FVNQHLCGSHLVEAL WLVCGERGFWYTPK	30
16	Glu(A14)His(B16)Des(B30)-Insulina	G lu	H is	P h e	GIVEQCCTSICSLEQ LENYCN	31	FVNQHLCGSHLVEAL HLVCGERGFFYTPK	32
17	Glu(A14)Gly(A21)Trp(B16)Des(B30)-Insulina	G lu	T rp	P h e	GIVEQCCTSICSLEQ LENYCG	33	FVNQHLCGSHLVEAL WLVCGERGFFYTPK	34
18	Glu(A14)Ile(B16)Des(B30)-Insulina	G lu	I le	P h e	GIVEQCCTSICSLEQ LENYCN	35	FVNQHLCGSHLVEALI LVCGERGFFYTPK	36
19	Glu(A14)Val(B16)Des(B30)-Insulina	G lu	V al	P h e	GIVEQCCTSICSLEQ LENYCN	37	FVNQHLCGSHLVEAL VLVCGERGFFYTPK	38

20	Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Des(B30)-Insulina	Glu	Val	Pro	GIVEQCCTSICSLEQ LENYCN	39	FVEQHLCGSHLVEAL VLVCGERGGFFYTPK	40
21	Glu(A14)His(B25)Des(B30)-Insulina	Glu	Thr	His	GIVEQCCTSICSLEQ LENYCN	41	FVNQHLCGSHLVEAL YLVCGERGFFHYTPK	42
22	Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-Insulina	Glu	Thr	Ile	GIVEQCCTSICSLEQ LENYCN	43	FVNQHLCGSHLVEAL YLVCGERGFIYTPK	44
23	Glu(A14)Gly(A21)Trp(B25)Des(B30)-Insulina	Glu	Thr	Trp	GIVEQCCTSICSLEQ LENYCG	45	FVNQHLCGSHLVEAL YLVCGERGFYTPK	46
24	Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-Insulina	Glu	Thr	Val	GIVEQCCTSICSLEQ LENYCN	47	FVNQHLCGSHLVEAL YLVCGERGFVYTPK	48
25	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)Des(B30)-Insulina	Glu	Thr	Val	GIVEQCCTSICSLEQ LENYCG	49	FVEQHLCGSHLVEAL YLVCGERGFVYTPK	50
26	Glu(A14)Glu(B16)His(B25)Des(B30)-Insulina	Glu	Glu	His	GIVEQCCTSICSLEQ LENYCN	51	FVNQHLCGSHLVEAL ELVCGERGFFHYTPK	52
27	Glu(A14)His(B16)Ala(B25)Des(B30)-Insulina	Glu	His	Ala	GIVEQCCTSICSLEQ LENYCN	53	FVNQHLCGSHLVEAL HLVCGERGFAYTPK	54

28	Glu(A14)His(B16)His(B25)Des(B30)-Insulina	G lu	H is	H is	GIVEQCCTSICSLEQ LENYCN	55	FVNQHLCGSHLVEAL HLVCGERGFHYTPK	56
29	Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-Insulina	G lu	Il e	Il e	GIVEQCCTSICSLEQ LENYCN	57	FVNQHLCGSHLVEALI LVCGERGFIYTPK	58
30	Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-Insulina	G lu	Il e	Il e	GIVEQCCTSICSLEQ LENYCN	59	FVEQHLCGSHLVEALI LVCGERGFIYTPK	60
31	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Trp(B25)Des(B30)-Insulina	G lu	Il e	T rp	GIVEQCCTSICSLEQ LENYCG	61	FVEQHLCGSHLVEALI LVCGERGFWYTPK	62
32	Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-Insulina	G lu	Il e	V al	GIVEQCCTSICSLEQ LENYCN	63	FVNQHLCGSHLVEALI LVCGERGFVYTPK	64
33	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-Insulina	G lu	Il e	V al	GIVEQCCTSICSLEQ LENYCG	65	FVEQHLCGSHLVEALI LVCGERGFVYTPK	66
34	Glu(A14)Leu(B16)Ala(B25)Des(B30)-Insulina	G lu	L e u	Al a	GIVEQCCTSICSLEQ LENYCN	67	FVNQHLCGSHLVEAL LLVCGERGFAYTPK	68
35	Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)-Insulina	G lu	V al	Il e	GIVEQCCTSICSLEQ LENYCN	69	FVNQHLCGSHLVEAL VLVCGERGFIYTPK	70

36	Glu(A14)Gly(A21)Val(B16)Trp(B25)Des(B30)-Insulina	G lu	V al	T rp	GIVEQCCTSICSLEQ LENYCG	71	FVNQHLCGSHLVEAL VLVCGERGFWYTPK	72
37	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Trp(B25)Des(B30)-Insulina	G lu	V al	T rp	GIVEQCCTSICSLEQ LENYCG	73	FVEQHLCGSHLVEAL VLVCGERGFWYTPK	74
38	Glu(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-Insulina	G lu	V al	V al	GIVEQCCTSICSLEQ LENYCN	75	FVNQHLCGSHLVEAL VLVCGERGFVYTPK	76
39	Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-Insulina	G lu	V al	V al	GIVEQCCTSICSLEQ LENYCN	77	FVEQHLCGSHLVEAL VLVCGERGFVYTPK	78
40	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-Insulina	G lu	V al	V al	GIVEQCCTSICSLEQ LENYCG	79	FVEQHLCGSHLVEAL VLVCGERGFVYTPK	80

Ejemplo 8: Ensayos de afinidad de unión al receptor de insulina / ensayos de autofosforilación del receptor de insulina

La unión de insulina y la transducción de señales de diversos análogos de insulina generados se determinaron mediante un ensayo de unión y un ensayo de autofosforilación del receptor.

A) Ensayo de afinidad de unión al receptor de insulina

La afinidad de unión al receptor de insulina de los análogos enumerados en la Tabla 4 se determinó como se describe en Hartmann *et al.* (Effect of the long-acting insulin analogs glargine and degludec on cardiomyocyte cell signaling and function. Cardiovasc Diabetol. 2016;15:96). Se efectuaron aislamiento de membranas plasmáticas embebidas en receptor de insulina (M-IR) y experimentos de unión de competición como se describió previamente (Sommerfeld *et al.*, PLoS One. 2010; 5(3): e9540). En síntesis, se recogieron células CHO que expresan el IR y se re-suspendieron en tampón 2.25 STM enfriado con hielo (sacarosa 2,25 M, Tris-HCl 5 mM pH 7,4, MgCl₂ 5 mM, inhibidor de proteasa completa) y se rompieron usando un homogeneizador Dounce seguido de sonicación. El homogeneizado se recubrió con tampón 0.8 STM (sacarosa 0,8 M, Tris-HCl 5 mM pH 7,4, MgCl₂ 5 mM, inhibidor de proteasa completo) y se ultra-centrifugó durante 90 min a 100.000 g. Las membranas plasmáticas en la interfaz se recogieron y lavaron dos veces con disolución salina tamponada con fosfato (PBS). El sedimento final se re-suspendió en tampón de dilución (Tris 50 mM pH 7,4, MgCl₂ 5 mM, inhibidor de proteasa completa) y nuevamente se homogeneizó con un homogeneizador Dounce. Los experimentos de unión de competición se realizaron en un tampón de unión (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, 0,1 % BSA, inhibidor de proteasa completa, ajustado hasta pH 7,8) en microplacas de 96 pocillos. En cada pocillo, se incubaron 2 µg de membrana aislada con 0,25 mg de esferas de ensayo de proximidad de centelleos (SPA) aglutinina de germen de trigo poliviniltolueno polietilenimina (SPA). Las

concentraciones constantes de insulina humana etiquetada con [125I] (100 pM) y diversas concentraciones de la insulina no etiquetada respectiva (0,001–1000 nM) se añadieron durante 12 h a temperatura ambiente (23 °C). La radiactividad se midió en equilibrio en un contador de centelleos de microplacas (Wallac Microbeta, Freiburg, Alemania).”

5 Los resultados de los ensayos de afinidad de unión al receptor de insulina para los análogos ensayados en relación con la insulina humana se muestran en la Tabla 5.

B) Ensayos de autofosforilación del receptor de insulina (como medida de la transducción de señales)

10 Con el fin de determinar la transducción de señales de un análogo de insulina que se une al receptor de insulina B, se midió la autofosforilación *in vitro*.

Se usaron células CHO que expresan la isoforma B del receptor de insulina humana (IR-B) para ensayos de autofosforilación de IR usando tecnología In-Cell Western como se describió previamente (Sommerfeld *et al.*, PLoS One. 2010; 5(3): e9540). Para el análisis de autofosforilación de IGF1R, el receptor se sobreexpresó en una línea celular de fibroblastos de embrión de ratón 3T3 Tet (BD Bioscience, Heidelberg, Alemania) 15 establemente transfectada con el plásmido de expresión regulable de tetraciclina IGF1R. Para determinar el nivel de fosforilación de tirosinas del receptor, las células se sembraron en placas de 96 pocillos y se desarrollaron durante 44 h. Las células se privaron de suero con medio libre de suero Ham F12 (Life Technologies, Darmstadt, Alemania) durante 2 h. 20 Las células luego se trataron con concentraciones en aumento de insulina humana o del análogo de insulina durante 20 min a 37°C. Después de incubar, el medio se desechó y las células se fijaron en 3,75% paraformaldehído recién preparado durante 20 min. Las células se permeabilizaron con 0,1% Triton X-100 en PBS por 20 min. Se efectuó el bloqueo con tampón bloqueante Odyssey (LICOR, Bad Homburg, Alemania) por 1 hora a temperatura ambiente. Se incubó anti-pTyr 4G10 (Millipore, Schwalbach, Alemania) durante 2 h a 25

temperatura ambiente. Después de incubar el anticuerpo primario, las células se lavaron con PBS + 0,1% Tween 20 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE. UU.). El anticuerpo secundario antirratón-IgG-800-CW (LICOR, Bad Homburg, Alemania) se incubó durante 1 h. Los resultados se normalizaron por cuantificación de ADN con tinte TO-PRO3 (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). Los datos se obtuvieron como unidades relativas (RU).

Los resultados de los ensayos de autofosforilación del receptor de insulina para los análogos ensayados en relación con la insulina humana se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Afinidades relativas de unión al receptor de insulina y actividades de autofosforilación de los análogos de insulina humana ensayados (para las secuencias, véase la Tabla 4).

Anál ogo	Esqueleto	A14	B16	B25	Afinidad de unión al receptor de insulina*	actividad de autofosfo rilación*
WT	Insulina humana (tipo salvaje)	Tyr	Tyr	Phe	1	1
2	Glu(A14)Des(B30)-Insulina	Glu	Tyr	Phe	1,05	0,87
3	Leu(B16)Des(B30)-Insulina	Tyr	Leu	Phe	0,24	0,34
4	Gly(A21)Trp(B16)Des(B30)-Insulina	Tyr	Trp	Phe	0,57	0,4
5	His(B16)Des(B30)-Insulina	Tyr	His	Phe	nd	nd
6	Val(B16)Des(B30)-Insulina	Tyr	Val	Phe	nd	0,32
7	Ala(B25)-Insulina	Tyr	Tyr	Ala	0,05	0,2
8	Ala(B25)Des(B30)-Insulina	Tyr	Tyr	Ala	nd	0,17

5

10

15

20

25

9	Glu(B25)Des(B30)-Insulina	Tyr	Tyr	Glu	nd	nd
10	His(B25)Des(B30)-Insulina	Tyr	Tyr	His	0,37	0,31
11	Leu(B25)Des(B30)-Insulina	Tyr	Tyr	Leu	0,01	0,06
12	Val(B25)Des(B30)-Insulina	Tyr	Tyr	Val	0,01	0,06
13	His(B16)His(B25)Des(B30)-Insulina	Tyr	His	His	0,11	0,1
14	Gly(A21)Trp(B16)His(B25)Des(B30)- Insulina	Tyr	Trp	His	0,4	0,35
15	Gly(A21)Trp(B16)Trp(B25)Des(B30)- Insulina	Tyr	Trp	Trp	0,43	0,38
16	Glu(A14)His(B16)Des(B30)-Insulina	Glu	His	Phe	0,36	0,29
17	Glu(A14)Gly(A21)Trp(B16)Des(B30)- Insulina	Glu	Trp	Phe	0,63	0,38
18	Glu(A14)Ile(B16)Des(B30)-Insulina	Glu	Ile	Phe	0,23	0,18
19	Glu(A14)Val(B16)Des(B30)-Insulina	Glu	Val	Phe	nd	0,32
20	Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Des(B30)- Insulina	Glu	Val	Phe	0,4	0,28
21	Glu(A14)His(B25)Des(B30)-Insulina	Glu	Tyr	His	nd	nd
22	Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-Insulina	Glu	Tyr	Ile	0,01	0,04
23	Glu(A14)Gly(A21)Trp(B25)Des(B30)- Insulina	Glu	Tyr	Trp	0,56	0,37
24	Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-Insulina	Glu	Tyr	Val	0,01	0,04
25	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B25)De s(B30)-Insulina	Glu	Tyr	Val	0,02	0,03

5

10

15

20

25

26	Glu(A14)Glu(B16)His(B25)Des(B30)- Insulina	Glu	Glu	His	0,01	0,07
27	Glu(A14)His(B16)Ala(B25)Des(B30)- Insulina	Glu	His	Ala		0,11
28	Glu(A14)His(B16)His(B25)Des(B30)- Insulina	Glu	His	His	0,12	0,11
29	Glu(A14)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)- Insulina	Glu	Ile	Ile		0,01
30	Glu(A14)Glu(B3)Ile(B16)Ile(B25)Des(B30)-Insulina	Glu	Ile	Ile	0**	0,01
31	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Trp(B25)Des(B30)-Insulina	Glu	Ile	Trp	0,12	0,13
32	Glu(A14)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)- Insulina	Glu	Ile	Val	0	0,04
33	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Ile(B16)Val(B25)Des(B30)-Insulina	Glu	Ile	Val	0,01	0,02
34	Glu(A14)Leu(B16)Ala(B25)Des(B30)- Insulina	Glu	Leu	Ala	0,01	0,04
35	Glu(A14)Val(B16)Ile(B25)Des(B30)- Insulina	Glu	Val	Ile	0	0,01
36	Glu(A14)Gly(A21)Val(B16)Trp(B25)D es(B30)-Insulina	Glu	Val	Trp	0,17	0,23
37	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Trp (B25)Des(B30)-Insulina	Glu	Val	Trp	0,21	0,19

38	Glu(A14)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-Insulina	Glu	Val	Val	0	0,03
39	Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-Insulina	Glu	Val	Val	0	0,02
40	Glu(A14)Gly(A21)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-Insulina	Glu	Val	Val	0,01	0,01

* en relación a la insulina humana, *nd*: no determinado

** un valor 0 significa que la afinidad de unión estuvo debajo del límite de detección

C) Conclusiones

Como se puede observar a partir de la Tabla 5, se ensayaron varias sustituciones hidrófobas en las posiciones B16 y/o B25 (triptófano, alanina, valina, leucina e isoleucina). Si bien en un grado diferente, todos los análogos de insulina ensayados con sustituciones hidrófobas en estas posiciones exhibieron una reducción de la actividad de unión al receptor de insulina. En comparación con las sustituciones de triptófano (véanse, p. ej., los Análogos 4, 15 y 23), las sustituciones con aminoácidos alifáticos tales como alanina, valina, leucina e isoleucina tuvieron un impacto más fuerte sobre la actividad de unión al receptor de insulina. Los efectos más fuertes se observaron para valina, leucina e isoleucina, que son todos aminoácidos de cadena ramificada. Las sustituciones con isoleucina, valina y leucina resultaron en una reducción importante de la actividad de unión al receptor de insulina. Cabe destacar que los análogos de insulina con dichas sustituciones en la posición B25 (como sustitución de valina, leucina o isoleucina en B25, Análogos 11, 12, 22, 24, 25, 29, 30, 32, 33, 35 38, 39, 40) exhibieron una mejoría de hasta 6 veces en la transducción de señal en comparación con la esperada en función de sus afinidades de unión al IR-B. Concretamente, Leu(B25)Des(B30)-Insulina y Val(B25)Des(B30)-Insulina (Análogos 11 y 12, respectivamente) exhibieron solamente 1% unión al receptor de insulina B y 6%

autofosforilación en relación con la insulina humana. De modo similar, una sola sustitución de leucina en la posición B16 (Análogo 3) también demostró una mejora similar en la transducción de señales aunque en un grado ligeramente inferior. En comparación, con la excepción del Análogo 26, los análogos que portan una sustitución de histidina en B25 (Análogos 10, 13, 14, 21, 28) también exhibieron menor unión al receptor, no obstante, una reducción concomitante en autofosforilación.

En algunos casos (Análogos 30, 32, 35, 38, 39), la unión al receptor de insulina fue 0% si bien siguieron exhibiendo actividad en el ensayo de autofosforilación. Todos estos análogos tienen combinaciones de sustituciones de valina y/o isoleucina en las posiciones B16 y B25 en común, lo que sugiere que la combinación es responsable de una mayor reducción en la unión al receptor de insulina. Las insulinas sin ninguna sustitución en la posición B25 pero con intercambios en la posición B16 exhibieron afinidades de unión superiores en comparación con sus valores de autofosforilación (Análogos 3, 4, 16, 17, 18, 19, 20).

La alanina en la posición B25 exhibe efectos similares a la sustitución con valina, leucina o isoleucina (análogos 11, 12, 22), aunque en un grado inferior. La afinidad de unión al receptor y la actividad de autofosforilación de los análogos con sustitución de valina, leucina o isoleucina es inferior que en los análogos con sustitución de alanina.

Ejemplo 9: Determinación de estabilidad *in vitro* en diferentes proteasas recombinantes y fluido gástrico simulado

Los análogos de insulina se ensayaron para actividad proteolítica (α -quimotripsina, catepsina D, enzima degradadora de insulina (IDE) y fluido gástrico simulado).

A) Condiciones de ensayo

Proteasa	Concentración de proteasa final en el ensayo [µg/ml]	Sistema tampón utilizado
Tripsina	2	Bicarbonato de amonio 0,1 M, pH 8,3
α-Quimotripsina	0,5	Bicarbonato de amonio 0,1 M, pH 8,3
Carboxipeptidasa A	0,1	Pre-activación (60 min) con Tripsina en tampón TCNB, tampón de ensayo Tris 7,5
Carboxipeptidasa B	0,1	Pre-activación (30 min) con Tripsina en tampón TCNB, tampón de ensayo Tris 7,5
Catepsina D	2	Tampón de acetato, pH 4,5
IDE	2	Tampón Tris pH 7,5

B) Preparación de fluido gástrico simulado

Se disolvieron 2 gramos de cloruro de sodio y 3,2 g de pepsina purificada (de mucosa de estómago porcino, con una actividad de 800 a 2500 unidades por mg de proteína) en 7,0 ml de ácido clorhídrico. El volumen se ajustó con agua hasta 1000 ml. La disolución resultante se mezcló y ajustó o bien con hidróxido sódico 0,2 N o con ácido clorhídrico 0,2 N hasta un pH de $1,2 \pm 0,1$.

C) Procedimiento de ensayo general

Se determinó la estabilidad usando puntos de tiempo apropiados (para SIF y SGF 15, 30, 60, 120 y 240 minutos; para proteasas 15, 30, 60 y 120 minutos). La incubación se realizó a 37°C y se calculó el % de compuesto principal remanente en referencia al punto de tiempo T0.

Para la determinación del compuesto principal, se usó un método bioanalítico de LC-MS/MS o LC-HRMS apropiado, usando el sobrenadante, después de la precipitación de proteínas con etanol (1 eq. v/v) y una etapa de centrifugación.

D) Preparación de muestras

5 Los compuestos se disolvieron en ácido clorhídrico diluido a una concentración final de 40 μ M. La concentración del compuesto en el ensayo fue 2 μ M. Se realizó una dilución 1:20 de la disolución de trabajo en el tampón de proteasa y las muestras se incubaron a 37°C, con agitación. En el punto de tiempo apropiado se recogió una alícuota, la reacción se inactivó con etanol (1 eq. v/v), luego se centrifugó. Se analizó el sobrenadante.

E) Conclusiones

10 En particular, se investigaron sustituciones de aminoácidos lipófilas tales como valina e isoleucina en las posiciones 16 y 25 en la cadena B. De los análogos ensayados (2, 7, 11, 12, 14, 16, 19, 22, 23, 24 y 38), se observaron solamente diferencias menores en estabilidad contra las proteasas tripsina, carboxipeptidasa A y carboxipeptidasa B en relación a la
15 insulina humana (no se muestran los datos). En general, todas las sustituciones de análogos que portan A14 y B25 (Análogos 22, 24, 38) exhibieron mejor estabilidad proteolítica contra α -quimotripsina, catepsina D y enzima degradadora de insulina (IDE). Por ejemplo, en el caso de α -quimotripsina, la insulina humana se degradó completamente dentro de 2 horas, mientras que el Análogo 22 fue casi absolutamente resistente. De modo
20 similar, todos los análogos sustituidos en B25 ensayados exhibieron mejor estabilidad contra catepsina D, sin embargo el Análogo 38 (una variante B16/B25) exhibe estabilidad comparado con las otras variantes de B25.

Se observó una excepción notable en el caso de IDE, en donde el Análogo 19 con sustituciones A14/B16 exhibió mejor desempeño comparado con las variantes de B25. Los
25 datos sugieren, sin embargo, que una sustitución en A14, ensayada aquí con ácido

glutámico, es importante para una mejor estabilidad. También se demostró que otras sustituciones son beneficiosas para una mayor estabilidad: tal como las sustituciones en la posición B16 y en la posición B25. Por ejemplo, el Análogo 7 con un intercambio de aminoácido en la posición B25, produjo mayor inestabilidad.

5 Tabla 6: Porcentaje remanente de análogo de insulina después de la incubación de diferentes análogos de insulina durante 30 o 120 minutos con cuatro proteasas diferentes (para las secuencias de los análogos ensayados, véase la Tabla 4).

Análogo	Esqueleto	A14	B16	B25	Fluidico (30 minutos) [%]	α -Quimotripsina (120 minutos) [%]	Catepsin D (30 minutos) [%]	Enzima degradadora de insulina, IDE (30 minutos) [%]
WT	Insulina	Tyr	Tyr	Ph e	0	5	0	38
2	Glu(A14) Des(B30) -Insulina	Glu	Tyr	Ph e	0	35	0	81
7	Ala(B25)- Insulina	Tyr	Tyr	Ala	30	58	52	2
11	Leu(B25) Des(B30) -Insulina	Tyr	Tyr	Leu	nd	nd	nd	12

5

10

15

20

25

12	Val(B25) Des(B30) -Insulina	Tyr	Tyr	Val	44	31	43	11
14	Gly(A21) Trp(B16) His(B25) Des(B30) -Insulina	Tyr	Trp	His	nd	nd	nd	41
16	Glu(A14) His(B16) Des(B30) -Insulina	Glu	His	Phen	nd	nd	nd	88
19	Glu(A14) Val(B16) Des(B30) -Insulina	Glu	Val	Phen	0	30	0	98
22	Glu(A14)I le(B25)D es(B30)- Insulina	Glu	Tyr	Ile	52	99	20	77
23	Glu(A14) Gly(A21) Trp(B25) Des(B30) -Insulina	Glu	Tyr	Trp	nd	nd	nd	80

5	24	Glu(A14) Val(B25) Des(B30) -Insulina	Glu	Tyr	Va I	52	40	59	86
	38	Glu(A14) Val(B16) Val(B25) Des(B30) -Insulina	Glu	Val	Va I	36	34	62	86

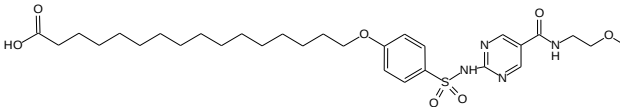
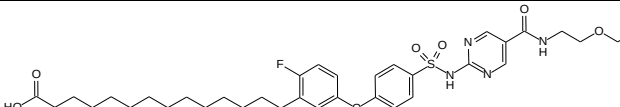
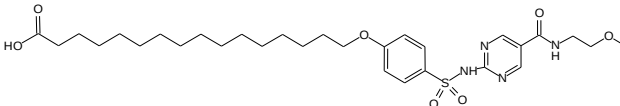
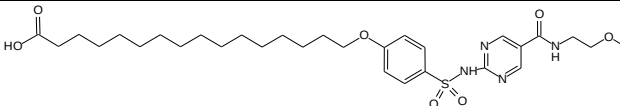
nd: no determinado

Ejemplo 10: Generación de otros conjugados – ensayos *in vivo* – evaluación de efectos de farmacocinética

Se prepararon y ensayaron los conjugados de insulina 1 a 4 (como se describe en el Ejemplo 3.4.1). Como control, se preparó el conjugado de insulina 5, que se ha descrito en el documento WO2018109162A1.

Los conjugados de insulina preparados se resumen en la siguiente tabla (Tabla 7). Asimismo, los conjugados de insulina 1 a 4 se muestran en las Fig. 5 a 8.

Tabla 7: Panorama general de los conjugados 1 a 5

Conju gado de insulin a	Esqueleto de insulina*	Cadena lateral	Aglutinante de albúmina
Conju gado 1 (ver Fig. 5)	Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-Insulina (Análogo 24 en la Tabla 4)	aglutina nte No. 5 en la Tabla 1	
Conju gado 2 (ver Fig. 6)	Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-Insulina (Análogo 24 en la Tabla 4)	aglutina nte No. 8 en la Tabla 1	
Conju gado 3 (ver Fig. 7)	Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-Insulina (Análogo 39 en la Tabla 4)	aglutina nte No. 5 en la Tabla 1	
Conju gado 4	Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-Insulina (Análogo 22 en la Tabla 4)	aglutina nte No. 5 en la Tabla 1	

(ver Fig. 8)			
Conju gado 5 (descr ito en WO20 18109 162A 1)	Glu(A14)His(B16)H is(B25)Des(B30)- Insulina Análogo 28 en la Tabla 4	Eicosa ndioil- gamaGl u-OEG ₂	Eicosandioil-gamaGlu-OEG ₂

*para la secuencia, véase la Tabla 4 en el Ejemplo 7

Se usaron minicerdos Göttingen normoglucémicos sanos para evaluar los efectos de farmacodinamia y farmacocinética de conjugados de insulina de acción muy prolongada *in vivo* (se usaron cerdos entre 0,5-6 años con intervalos de peso corporal, dependiendo de la edad, entre ~12-40 kg). Los cerdos se mantuvieron bajo condiciones estándar de alojamiento animal de laboratorio y recibieron alimento una vez al día con acceso voluntario a agua corriente. Después de ayunar durante toda la noche, los cerdos fueron tratados con una inyección subcutánea de una disolución que contiene o bien la formulación de placebo o el conjugado de insulina respectivo. Se ensayaron los conjugados de insulina 1-4, así como también el conjugado de insulina 5 (descrito en el documento WO2018109162A1).

Se extrajo sangre mediante catéteres venosos centrales implantados para determinación de la glucosa sanguínea, farmacocinética y biomarcadores adicionales de plasma K-EDTA. Las extracciones de sangre comenzaron antes de la administración del artículo de ensayo (situación inicial) y se repitieron 1-4 veces por día hasta el final del estudio. Durante el estudio, los animales recibieron alimento después de la última extracción de sangre del día.

Los animales fueron controlados regularmente y se registraron los signos clínicos por lo menos dos veces por día el día del tratamiento y una vez por día durante el resto del estudio. Se vigiló cautelosamente a los animales para detectar cualquier signo clínico de hipoglucemia, incluidos comportamiento, piel, orina y heces, condición de los orificios corporales y cualquier signo de enfermedad. En caso de hipoglucemia severa, se permitió que el investigador ofreciera alimento o infundiera disolución de glucosa por vía intravenosa (i.v.) en caso de que la ingesta de alimento no fuera posible. Después de la última extracción de sangre, los animales fueron nuevamente transportados a la instalación de alojamiento animal.

A) Efectos sobre la glucosa sanguínea en ayunas

Los resultados se muestran también en la Figura 3

Tabla 8: Efecto sobre la glucosa sanguínea

	Conjugado de insulina	Esqueleto de insulina	Cadena lateral	Dosis [nM/kg]	FPG Duración de reducción de glucosa > 15% frente a Placebo [h]	Reducción de glucosa máxima [%]
5						
10						
15	Conjugado 1	Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-Insulina (Análogo 24 en la Tabla 4)	aglutinante No. 5	30	>128	45
	Conjugado 2	Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-Insulina, (Análogo 24 en la Tabla 4)	aglutinante No. 8	30	>104	39
20	Conjugado 3	Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-Insulina (Análogo 39 en la Tabla 4)	aglutinante No. 5	30	>152	30

Conjugado 4	Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-Insulina (Análogo 22 en la Tabla 4)	aglutinante No. 5	30	>104	27
Conjugado 5	Glu(A14)His(B16)His(B25)Des(B30)-Insulina, Análogo 28 en la Tabla 4	Eicosandioil-Glu-OEG2	18	>128	62

B) Mediciones de los parámetros de farmacocinética

Los resultados se muestran también en la Figura 4

Tabla 9: Efecto sobre la glucosa sanguínea

Conjugado	Secuencia	Cadena lateral	Dosis [nM/kg]	PK $t_{\text{máx}}$ [h]	PK $t_{1/2}$ [h]
Conjugado 1	Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-Insulina	aglutinante No. 5	30	8	45
Conjugado 2	Glu(A14)Val(B25)Des(B30)-Insulina	aglutinante No. 8	30	20	38, 9
Conjugado 3	Glu(A14)Glu(B3)Val(B16)Val(B25)Des(B30)-Insulina	aglutinante No. 5	30	8	42, 8
Conjugado 4	Glu(A14)Ile(B25)Des(B30)-Insulina	aglutinante No. 5	30	14, 7	45, 2

Conjugado 5	Glu(A14)His(B16)His(B25)Des(B30)- Insulina	Eicosandioi I-Glu- OEG2	18	32	39
-------------	---	-------------------------------	----	----	----

5

C) Conclusiones

Una sola administración del conjugado de insulina 4 (Ile(B25)), en una dosis 30 nM/kg exhibió un efecto reductor de la glucosa moderado con un perfil plano de hasta 152 horas. El conjugado de insulina 3, que contiene las mutaciones Val(B16) y Val(B25), exhibió un perfil plano de hasta 152 horas con un efecto reductor de la glucosa moderado a medio. Asimismo, ambos conjugados de insulina 1 y 2, que contienen la mutación Val(B25), condujeron a un efecto reductor de la glucosa estable sin inducción de hipoglucemia en una dosis de 30 nM/kg. En contraste, se descubrió que el conjugado de insulina 5 (descrito en el documento WO2018109162A1) exhibe un efecto reductor de la glucosa más fuerte con un perfil de la acción en el tiempo menos plano en comparación con los conjugados de insulina 1-4 en una dosis de solamente 18 nM/kg. El compuesto puede tener un riesgo mayor de hipoglucemia.

15

20

Los parámetros de farmacocinética demuestran que los conjugados de insulina 1-4 exhiben un $T_{\text{máx}}$ más temprano en el intervalo de 8-20 horas en combinación con una meseta a $C_{\text{máx}}$ de hasta 50 horas. Dado que exhiben un $t_{1/2}$ terminal prolongado en el intervalo de 39-45, se logra un perfil de PK (farmacocinética) plano que se desea para una administración una vez por semana debido al riesgo potencialmente reducido de eventos hipoglucémicos.

25

Breve descripción de las Figuras

- Fig. 1 muestra el efecto reductor de la glucosa en la sangre después de la aplicación s.c. de los conjugados del análogo de insulina 41 con el aglutinante no. 50 y el aglutinante no. 54, respectivamente en minicerdos (Göttingen) (12-18 kg, n = 3). Ambos compuestos se ensayaron en una dosis de (18 nmol/kg).
- 5 Fig. 2 muestra el efecto reductor de la glucosa en la sangre después de la aplicación s.c. de las insulinas y los conjugados de insulina, respectivamente en minicerdos (Göttingen) (19-20 kg, n = 3): Insulina humana + aglutinante no. 5 (18 nmol/kg), insulina humana (3 nmol/kg), análogo de insulina 41 + aglutinante no. 5 (18 nmol/kg), análogo de insulina 41 (3 nmol/kg).
- 10 Fig. 3 muestra los niveles de glucosa en la sangre [% relativo al placebo] después de la administración subcutánea de los conjugados de insulina 1 a 5 (véase la Tabla 7 en el Ejemplo 10).
- Fig. 4 muestra la concentración plasmática normalizada [ng/ml] – curvas de tiempo [h] para los conjugados de insulina 1 a 5 (véase la Tabla 7 en el Ejemplo 10).
- 15 Fig. 5 muestra el conjugado de insulina No. 1 (véase el Ejemplo 10 para más detalles). Las secuencias de la cadena A (SEQ ID NO: 47) y de la cadena B (SEQ ID NO: 48) se indican con un código de tres letras, excepto por el último aminoácido en la cadena B (lisina en la posición B29). Se muestra la estructura del residuo lisina. El residuo lisina está covalentemente unido al aglutinante (mediante el aminoácido
- 20 épsilon del residuo lisina).
- Fig. 6 muestra el conjugado de insulina No. 2 (véase el Ejemplo 10 para más detalles). Las secuencias de la cadena A (SEQ ID NO: 47) y de la cadena B (SEQ ID NO: 48) se indican con el código de tres letras, excepto por el último aminoácido en la cadena B (lisina en la posición B29). Se muestra la estructura del residuo lisina. El

residuo lisina está covalentemente unido al aglutinante (mediante el aminoácido épsilon del residuo lisina).

Fig. 7 muestra el conjugado de insulina No. 3 (véase el Ejemplo 10 para más detalles).

Las secuencias de la cadena A (SEQ ID NO: 77) y la cadena B (SEQ ID NO: 78)

5

se indican con el código de tres letras, excepto por el último aminoácido en la

cadena B (lisina en la posición B29). Se muestra la estructura del residuo lisina. El

residuo lisina está covalentemente unido al aglutinante (mediante el aminoácido

épsilon del residuo lisina).

Fig. 8 muestra el conjugado de insulina No. 4 (véase el Ejemplo 10 para más detalles).

10

Las secuencias de la cadena A (SEQ ID NO: 43) y la cadena B (SEQ ID NO: 44)

se indican con el código de tres letras, excepto por el último aminoácido en la

cadena B (lisina en la posición B29). Se muestra la estructura del residuo lisina. El

residuo lisina está covalentemente unido al aglutinante (mediante el aminoácido

épsilon del residuo lisina).

15

Bibliografía citada

- Senshang Lin, Li-Lan H. Chen y Yie W. Chien, The journal of pharmacology and experimental therapeutics, 1998, 286, 959-966.

- Clinical Pharmacokinetics Concepts and applications de Tozer y Rowland, 3ª edición (Editor Lippincott Williams & Wilkins), 1995- Sección II-6).

20

- Hartmann *et al.*, Effect of the long-acting insulin analogues glargine and degludec on cardiomyocyte cell signaling and function, Cardiovasc Diabetol. 2016;15:96.

- Sommerfeld *et al.*, PLoS One. 2010; 5(3): e9540.

- Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use de Stahl y Wermuth (Wiley-VCH, 2002).

25