

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 985 989**

51 Int. Cl.:

C07K 14/62 (2006.01)

A61K 38/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.12.2020** **PCT/EP2020/085541**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.06.2021** **WO21116292**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2020** **E 20820432 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2024** **EP 4073097**

54 Título: **Análogos de insulina novedosos y usos de estos**

30 Prioridad:

11.12.2019 EP 19215315

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

08.11.2024

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)

Novo Allé

2880 Bagsværd, DK

72 Inventor/es:

HUBALEK, FRANTISEK;

NORRMAN, MATHIAS;

OLSEN, HELLE, BIRK;

MADSEN, PETER;

KJELDSEN, THOMAS, BØRGLUM y

STURIS, JEPPE

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

Observaciones:

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

ES 2 985 989 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Análogos de insulina novedosos y usos de estos

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a análogos novedosos de la insulina humana, composiciones farmacéuticas que comprenden tales análogos de insulina y al uso de tales análogos para el tratamiento o prevención de afecciones médicas relacionadas con la diabetes.

10

Incorporación del listado de secuencias como referencia

La presente solicitud se presenta con un Listado de Secuencias en forma electrónica. El contenido completo del listado de secuencias se incorpora aquí como referencia.

15

Antecedentes de la invención

La terapia con insulina para el tratamiento de la diabetes se ha usado durante décadas. Una de las mejoras fundamentales en la terapia con insulina ha sido la introducción de análogos de insulina de acción rápida.

20

La insulina posee propiedades de autoasociación y su concentración representa un factor importante de autoasociación. A altas concentraciones, especialmente en las composiciones farmacéuticas, la insulina se autoasociará en forma de dímeros, hexámeros, dodecámeros o estructuras moleculares superiores. Sin embargo, la forma fisiológicamente activa de la insulina es el monómero, que se une al receptor de insulina y desencadena una respuesta biológica. Es un desafío reducir la autoasociación de los análogos de insulina, particularmente a alta concentración en una composición farmacéutica.

25

La rapidez de la acción de la insulina depende de la rapidez con que se absorba la insulina desde el tejido subcutáneo. En general, cuando una composición de insulina disponible comercialmente se inyecta por vía subcutánea, la composición está compuesta principalmente por hexámeros que contienen dos iones zinc. Aunque estos dos iones de zinc ubicados dentro del hexámero estabilizan la molécula frente a la degradación química y física en una composición, debido a su tamaño, la insulina hexamérica tiene una velocidad de difusión más baja y, en consecuencia, la velocidad de absorción es más lenta que para especies más pequeñas.

30

Los documentos WO2017/032795 y WO2017/032798 se refieren a análogos de insulina acilados en una composición baja en zinc o libre de zinc.

35

YAO ZHI-PING y otros se refiere a la estructura de un dímero de insulina en un cristal ortorrómbico.

40

Las composiciones de insulina libres de zinc permiten una absorción subcutánea más rápida, pero la estabilidad química y física de las composiciones libres de zinc es un desafío, particularmente a altas concentraciones.

Existe una gran necesidad de análogos de insulina que sean de acción rápida, mientras que al mismo tiempo sean suficientemente estables física y químicamente a altas concentraciones en una composición libre de zinc.

45

Resumen

En un aspecto, la presente invención se refiere a análogos de insulina humana, en donde el análogo comprende A9Glu o A9Asp y comprende, además, B3Glu y/o desB30 con relación a la insulina humana.

50

En un aspecto, la presente invención se refiere a análogos de insulina humana, en donde el análogo comprende A9Glu o A9Asp y comprende, además, B3Glu y/o desB30 con relación a la insulina humana y/o comprende, además, al menos uno de B26Glu, B27Glu y/o B28Glu.

55

En un aspecto, la presente invención se refiere a análogos de insulina humana, en donde el análogo comprende A9Glu o A9Asp y comprende, además, B3Glu y/o desB30 con relación a la insulina humana y/o comprende, además, al menos uno de B26Glu, B27Glu y/o B28Glu y comprende, adicionalmente, la sustitución A21Ala.

En un aspecto, la presente invención proporciona análogos de insulina que son monoméricos en una composición farmacéutica libre de zinc.

60

En un aspecto, la presente invención proporciona análogos de insulina que son física y/o químicamente estables en una composición farmacéutica libre de zinc.

65

En otro aspecto, los análogos de insulina de la presente invención son monoméricos, química y físicamente estables, incluso a una alta concentración, en una composición farmacéutica libre de zinc.

En un aspecto, la presente invención proporciona análogos de insulina que se absorben más rápidamente después de la administración subcutánea, que demuestran de esta manera una utilidad clínica potencial como insulinas de acción rápida (también llamadas insulinas en bolo o prandiales).

5 En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica libre de zinc que comprende los análogos de insulina de la invención y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto adicional, los análogos de insulina de la presente invención son compatibles con el sistema de suministro de insulina.

10 En un aspecto adicional, los análogos de insulina de la presente invención son compatibles con un sistema de suministro de insulina de lazo cerrado.

15 En un aspecto adicional, los análogos de insulina de la presente invención son adecuados para el uso en bombas de insulina.

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

20 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el perfil PD de los análogos de insulina del ejemplo 1 y del ejemplo 2 en la composición farmacéutica C de la invención después de la dosificación a cerdos LYD en comparación con Fiasp® (Insulina Aspart)

25 La Figura 2 muestra el perfil PK de los análogos de insulina del ejemplo 1 y del ejemplo 2 en la composición farmacéutica C de la invención después de la dosificación a cerdos LYD en comparación con Fiasp® (Insulina Aspart)

30 Descripción

La presente invención se refiere a análogos de insulina de acción rápida que son monoméricos, proporcionan una estabilidad química y física aceptable en una composición farmacéutica libre de zinc y una absorción más rápida después de la administración subcutánea que el Fiasp® (Insulina Aspart) disponible comercialmente.

35 Definiciones

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

40 Los términos "invención" y "presente invención" se usan indistintamente.

El término "aproximadamente" se usa en la presente descripción con la intención de referirse a más o menos el 10 %, tal como más o menos el 5 %. Por lo tanto, el término "aproximadamente 100 U" es desde 90 U a 110 U.

45 La tabla a continuación proporciona la concentración de insulina humana en mM y la concentración correspondiente en (U) equivalente a la insulina humana:

50	Concentración del análogo de Insulina (en mM)	Concentración del análogo de insulina en (U) equivalente a la insulina humana
	0,6	100 U
	1,2	200 U
	1,8	300 U
55	2,4	400 U
	3,0	500 U
	3,6	600 U

60 El término "aminoácido" incluye los aminoácidos proteinogénicos (o naturales) (entre ellos los 20 aminoácidos estándar), así como también los aminoácidos no proteinogénicos (o no naturales). Los aminoácidos proteinogénicos son aquellos que se incorporan naturalmente en las proteínas. Los aminoácidos estándar son los codificados por el código genético. Los aminoácidos no proteinogénicos o no se encuentran en proteínas, o no se producen por la maquinaria celular estándar (por ejemplo, pueden haberse sometido a modificación postraduccional).

65 En general, los residuos de aminoácidos (secuencias de péptidos/proteínas) como se usa en la presente descripción, pueden identificarse por su nombre completo, su código de una letra y/o su código de tres letras. Estas tres maneras

son completamente equivalentes e intercambiables. Por ejemplo: El ácido aspártico se representa con Asp o D; el ácido glutámico se representa con Glu o E; la alanina se representa con Ala o A.

En lo que sigue, cada aminoácido de los péptidos de la invención para los cuales no se indica el isómero óptico debe entenderse que se refiere al L-isómero (a menos que se especifique de cualquier otra manera). Los aminoácidos son moléculas que contienen un grupo amino y un grupo ácido carboxílico, y, opcionalmente, uno o más grupos adicionales, frecuentemente referidos como una cadena lateral. En la presente descripción, el término "residuo de aminoácido" es un aminoácido del cual, formalmente, un grupo hidroxilo se ha eliminado de un grupo carboxilo y/o del cual, formalmente, un átomo de hidrógeno se ha eliminado de un grupo amino.

El término "compuesto" se usa en la presente descripción para referirse a una entidad molecular, y por lo tanto, los "compuestos" pueden tener diferentes elementos estructurales además del elemento mínimo definido para cada compuesto o grupo de compuestos. El término "compuesto" también está destinado a cubrir las formas farmacéuticamente relevantes de este, es decir, la invención se refiere a un compuesto como se define en la presente descripción o una sal, amida o éster farmacéuticamente aceptable de este.

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

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

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

"Una insulina" de acuerdo con la invención debe entenderse en la presente descripción como insulina humana o una insulina de otra especie tal como insulina porcina o bovina.

"Insulina de acción rápida" como se usa en la presente descripción significa análogos de insulina de acuerdo con la invención que comienzan a actuar aproximadamente 15 minutos después de la inyección, alcanzan su punto máximo en aproximadamente 1 hora y continúan su acción durante 2 a 4 horas. Tipos: Insulina glulisina (Apidra), insulina lispro (Admelog, Humalog) e insulina aspart (Fiasp, NovoLog).

El término "péptido de insulina", "compuesto de insulina" o "insulina" como se usa en la presente descripción significa un péptido que es insulina humana o un análogo de esta con actividad insulínica, es decir, que activa el receptor de insulina.

Nomenclatura

La denominación de los análogos de insulina de la presente invención se realiza de acuerdo con los siguientes principios:

Por ejemplo, el análogo de insulina de la insulina humana B3E, B27E, B28E, desB30, indica que el aminoácido en la posición B3, Asparagina (N) se ha sustituido con ácido glutámico (E), el aminoácido en la posición B27, Treonina (T) en la insulina humana, se ha sustituido con ácido glutámico (E), el aminoácido en la posición B28, Prolina (P) en la insulina humana, se ha sustituido con ácido glutámico (E) y el aminoácido en la posición B30, Treonina, T, en la insulina humana, se ha eliminado.

Análogo de insulina

El término "análogo de la insulina" como se usa en la presente descripción significa la insulina humana modificada en donde uno o más residuos de aminoácidos de la insulina se han sustituido por otros residuos de aminoácidos y/o en donde uno o más residuos de aminoácidos se han eliminado de la insulina y/o en donde uno o más residuos de aminoácidos se han adicionado y/o insertado a la insulina. Los términos "análogo de insulina" o "análogo de insulina humana" se usan indistintamente.

El término "modificación de aminoácidos" como se usa en la presente descripción, significa sustitución, eliminación, adición o inserción de aminoácidos y cualquier combinación de estas con relación a la insulina humana.

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

En una modalidad, un análogo de insulina comprende hasta 10 modificaciones de aminoácidos (sustituciones, eliminaciones, adiciones (que incluyen, inserciones) y cualquier combinación de estas) con relación a la insulina humana, alternativamente hasta 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 modificación con relación a la insulina humana.

Los análogos "que comprenden" determinados cambios especificados pueden comprender otros cambios, en comparación con la cadena A (SEQ ID NO:1) y/o la cadena B (SEQ ID NO:2) de la insulina humana.

Por "péptido enlazador" o "péptido C" se entiende una porción enlazadora "C" de la secuencia polipeptídica B-C-A de una molécula de proinsulina de cadena simple. En la cadena de la insulina humana, el péptido C enlaza la posición 30 de la cadena B y la posición 1 de la cadena A y tiene 35 residuos de aminoácidos de longitud. El péptido enlazador incluye una secuencia terminal de dos aminoácidos dibásicos, por ejemplo, Arg-Arg y Lys-Arg que sirven como sitios de escisión para la escisión del péptido enlazador de las cadenas A y B para formar la molécula de insulina de dos cadenas.

Por "desB30" o "B(1-29)" se entiende una cadena B de insulina natural o un análogo de esta que carece del aminoácido B30 y "A(1-21)" significa la cadena A de la insulina natural. Por lo tanto, por ejemplo, insulina humana desB30 es un análogo de la insulina humana donde se elimina el aminoácido en la posición 30 en la cadena B.

El término "péptido" o "polipéptido", como se usa, por ejemplo, en el contexto de la invención, se refiere a un compuesto que comprende una serie de aminoácidos interconectados mediante enlaces amida (o peptídicos). En una modalidad particular el péptido consiste en aminoácidos interconectados mediante enlaces peptídicos.

El término "estabilidad química" de la preparación de proteína, como se usa en la presente descripción, se refiere a cambios en la estructura covalente de la proteína que conducen a la formación de productos de degradación química con una posible potencia biológica menor y/o posibles propiedades inmunogénicas incrementadas en comparación con la estructura de la proteína nativa. Pueden formarse varios productos de degradación química en dependencia del tipo y la naturaleza de la proteína nativa y del entorno al que se expone la proteína. Frecuentemente se observan cantidades crecientes de productos de degradación química durante el almacenamiento y uso de la preparación de proteína. La mayoría de las proteínas tienden a la desamidación, un proceso en donde el grupo amida de la cadena lateral en los residuos de glutaminilo o asparaginilo se hidroliza para formar un ácido carboxílico libre o los residuos de asparaginilo para formar un derivado isoAsp. Otras vías de degradación implican la formación de Productos de Alto Peso Molecular (HMWP) donde dos o más moléculas de proteína se unen covalentemente entre sí a través de, por ejemplo, transamidación y/o interacciones disulfuro que conducen a la formación de productos de degradación dimericos, oligoméricos y poliméricos unidos covalentemente (Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern TJ & Manning MG, Plenum Press, Nueva York 1992). La oxidación puede mencionarse como otra variante de degradación química. La estabilidad química de la preparación de proteína puede evaluarse mediante la medición de la cantidad de productos de degradación química en varios momentos después de la exposición a diferentes condiciones ambientales (frecuentemente, la formación de productos de degradación puede acelerarse, por ejemplo, mediante el aumento de la temperatura). Frecuentemente, la cantidad de cada producto de degradación individual se determina mediante la separación de los productos de degradación en dependencia del tamaño de la molécula, su hidrofobicidad y/o carga mediante el uso de varias técnicas cromatográficas (por ejemplo, SEC-HPLC y/o RP-HPLC). Dado que los productos de HMWP son potencialmente inmunogénicos y no son biológicamente activos, los niveles bajos de HMWP son ventajosos.

El término "estabilidad física" de la preparación de insulina como se usa en la presente descripción se refiere a la tendencia de la proteína a formar agregados biológicamente inactivos y/o insolubles de la proteína como resultado de la exposición de la proteína a estrés termomecánico y/o su interacción con interfaces y superficies que son desestabilizantes, tales como superficies e interfaces hidrófobas. La estabilidad física de las preparaciones acuosas de proteínas se evalúa por medio de inspección visual y/o mediciones de turbidez después de exponer recipientes adecuados (por ejemplo, cartuchos o frascos) llenos con la preparación a estrés mecánico/físico (por ejemplo, agitación) a diferentes temperaturas durante varios períodos de tiempo. La inspección visual de las preparaciones se realiza con una luz enfocada nítida con un fondo oscuro. Una preparación se clasifica como físicamente inestable con respecto a la agregación de proteínas, cuando muestra turbidez visual a la luz del día. Alternativamente, la turbidez de la preparación puede evaluarse mediante simples mediciones de turbidez bien conocidas por el experto. La estabilidad física de las preparaciones acuosas de proteínas también puede evaluarse mediante el uso de un agente espectroscópico o sonda del estado conformacional de la proteína. La sonda es preferentemente una molécula pequeña que se une preferentemente a un conformero no nativo de la proteína. Un ejemplo de una sonda espectroscópica molecular pequeña de la estructura proteica es la tioflavina T. La tioflavina T es un colorante fluorescente que se ha usado ampliamente para la detección de fibrillas amiloides. En presencia de fibrillas, y quizás también de otras configuraciones proteicas, la tioflavina T da lugar a un nuevo máximo de excitación a aproximadamente 450 nm y una emisión mejorada a aproximadamente 482 nm cuando se une a una proteína en forma de fibrilla. La tioflavina T libre es esencialmente no fluorescente en las longitudes de onda.

El término "alta concentración" de la preparación de insulina, como se usa en la presente descripción, se refiere a la concentración de insulina que es 200 U o superior; 1,2 mM o superior.

5 En una modalidad, la presente invención se refiere a análogos de insulina humana, en donde el análogo comprende A9Glu o A9Asp y comprende, además, B3Glu y/o desB30 con relación a la insulina humana.

10 En un aspecto, la presente invención se refiere a análogos de insulina humana, en donde el análogo comprende A9Glu o A9Asp y comprende, además, B3Glu y/o desB30 con relación a la insulina humana y comprende, además, al menos uno de B26Glu, B27Glu y/o B28Glu.

10 En un aspecto, la presente invención se refiere a análogos de insulina humana, en donde el análogo comprende A9Glu o A9Asp y comprende, además, B3Glu y/o desB30 con relación a la insulina humana y/o comprende, además, al menos uno de B26Glu, B27Glu y/o B28Glu y comprende, adicionalmente, la sustitución A21A.

15 En un aspecto, la presente invención se refiere a análogos de insulina humana, en donde el análogo es:

20 A9D, B3E;
A9E, B3E;
A9D, desB30;
A9E, desB30;
A9D, B3E, desB30;
A9E, B3E, desB30;
A9D, B3E, B26E;
A9E, B3E, B26E;
25 A9D, B26E, desB30;
A9E, B26E, desB30;
A9D, B3E, B26E, desB30;
A9E, B3E, B26E, desB30;
A9D, A21A, B3E, B26E;
30 A9E, A21A, B3E, B26E;
A9D, A21A, B26E, desB30;
A9E, A21A, B26E, desB30;
A9D, A21A, B3E, B26E, desB30;
A9E, A21A, B3E, B26E, desB30;
35 A9D, B3E, B27E;
A9E, B3E, B27E;
A9D, B27E, desB30;
A9E, B27E, desB30;
A9D, B3E, B27E, desB30;
40 A9E, B3E, B27E, desB30;
A9D, A21A, B3E, B27E;
A9E, A21A, B3E, B27E;
A9D, A21A, B27E, desB30;
A9E, A21A, B27E, desB30;
45 A9D, A21A, B3E, B27E, desB30;
A9E, A21A, B3E, B27E, desB30;
A9D, B3E, B28E;
A9E, B3E, B28E;
A9D, B28E, desB30;
50 A9E, B28E, desB30;
A9D, B3E, B28E, desB30;
A9E, B3E, B28E, desB30;
A9D, A21A, B3E, B28E;
A9E, A21A, B3E, B28E;
55 A9D, A21A, B28E, desB30;
A9E, A21A, B28E, desB30;
A9D, A21A, B3E, B28E, desB30;
A9E, A21A, B3E, B28E, desB30;
A9D, B3E, B26E, B27E;
60 A9E, B3E, B26E, B27E;
A9D, B26E, B27E, desB30;
A9E, B26E, B27E, desB30;
A9D, B3E, B26E, B27E, desB30;
A9E, B3E, B26E, B27E, desB30;
65 A9D, A21A, B3E, B26E, B27E;
A9E, A21A, B3E, B26E, B27E;

5 A9D, A21A, B26E, B27E, desB30;
 A9E, A21A, B26E, B27E, desB30;
 A9D, A21A, B3E, B26E, B27E, desB30;
 A9E, A21A, B3E, B26E, B27E, desB30;
 A9D, B3E, B27E, B28E;
 A9E, B3E, B27E, B28E;
 A9D, B27E, B28E, desB30;
 A9E, B27E, B28E, desB30;
 10 A9D, B3E, B27E, B28E, desB30;
 A9E, B3E, B27E, B28E, desB30;
 A9D, A21A, B3E, B27E, B28E;
 A9E, A21A, B3E, B27E, B28E;
 A9D, A21A, B27E, B28E, desB30;
 A9E, A21A, B27E, B28E, desB30;
 15 A9D, A21A, B3E, B27E, B28E, desB30;
 A9E, A21A, B3E, B27E, B28E, desB30;
 A9D, B3E, B26E, B28E;
 A9E, B3E, B26E, B28E;
 A9D, B26E, B28E, desB30;
 20 A9E, B26E, B28E, desB30;
 A9D, B3E, B26E, B28E, desB30;
 A9E, B3E, B26E, B28E, desB30;
 A9D, A21A, B3E, B26E, B28E;
 A9E, A21A, B3E, B26E, B28E;
 25 A9D, A21A, B26E, B28E, desB30;
 A9E, A21A, B26E, B28E, desB30;
 A9D, A21A, B3E, B26E, B28E, desB30;
 A9E, A21A, B3E, B26E, B28E, desB30;
 A9D, B3E, B26E, B27E, B28E;
 30 A9E, B3E, B26E, B27E, B28E;
 A9D, B26E, B27E, B28E, desB30;
 A9E, B26E, B27E, B28E, desB30;
 A9D, B3E, B26E, B27E, B28E, desB30;
 A9E, B3E, B26E, B27E, B28E, desB30;
 35 A9D, A21A, B3E, B26E, B27E, B28E;
 A9E, A21A, B3E, B26E, B27E, B28E;
 A9D, A21A, B26E, B27E, B28E, desB30;
 A9E, A21A, B26E, B27E, B28E, desB30;
 A9D, A21A, B3E, B26E, B27E, B28E, desB30; o
 40 A9E, A21A, B3E, B26E, B27E, B28E, desB30.

En un aspecto, la presente invención se refiere a análogos de insulina humana, en donde el análogo es:

45 A9E, B3E, B26E;
 A9E, B3E, B27E, B28E;
 A9E, B3E, B26E, desB30;
 A9E, B3E, B27E, B28E, desB30;
 A9D, B3E, B26E, desB30; o
 50 A9E, A21A, B3E, B26E, desB30.

En un aspecto, la presente invención se refiere a análogos de insulina humana, en donde el análogo es A9E, B3E, B26E, desB30.

55 En un aspecto, la presente invención se refiere a análogos de insulina humana, en donde el análogo es A9E, B3E, B27E, B28E, desB30.

Indicaciones farmacéuticas

Diabetes

60 El término "diabetes" o "diabetes mellitus" incluye diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, diabetes gestacional (durante el embarazo) y otros estados que provocan hiperglucemia. El término se usa para un trastorno metabólico en el que el páncreas produce cantidades insuficientes de insulina, o en el que las células del cuerpo no responden adecuadamente a la insulina, lo que impide, por lo tanto, que las células absorban glucosa. Como resultado, la glucosa se acumula en la sangre.

La diabetes tipo 1, también llamada diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM) y diabetes juvenil, es provocada por la destrucción de las células B, lo que conduce usualmente a una deficiencia absoluta de insulina.

- 5 La diabetes tipo 2, también conocida como diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM) y diabetes de comienzo en el adulto, se asocia con la resistencia predominante a la insulina y, por lo tanto, con la deficiencia relativa de insulina y/o con un defecto predominantemente en la secreción de insulina con resistencia a la insulina.

Métodos de Síntesis

- 10 Los análogos de insulina de la invención pueden obtenerse mediante métodos convencionales para la preparación de análogos de insulina y, en particular, los métodos descritos en los ejemplos de trabajo.

Actividad Biológica

- 15 Los análogos de insulina de la invención son de acción rápida.

- 20 Todos los análogos de insulina de la invención poseen afinidades por el receptor de insulina adecuadas para activar el receptor de insulina con el fin de brindar la respuesta glucémica necesaria, es decir, poder reducir la glucosa en sangre en animales y seres humanos. Como medida de la actividad funcional (agonista) de las insulinas de la invención, se demuestra la actividad de lipogénesis en adipocitos de rata.

Se ha encontrado que los análogos de insulina de la invención tienen una relación de afinidad (IR/IGF-1R) equilibrada entre el receptor de insulina (IR) y el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1R).

- 25 En un aspecto, la insulina de la invención tiene una relación IR/IGF-1R superior a 1; superior a 1,5; o superior a 2.

En una modalidad, el análogo de insulina humana de la invención tiene la capacidad de reducir los niveles de glucosa en sangre.

- 30 En una modalidad, el análogo de insulina humana de la invención activa el receptor de insulina.

En una modalidad, el análogo de insulina humana de la invención reduce la glucosa en sangre.

- 35 En una modalidad, el análogo de insulina humana de la invención tiene propiedades de autoasociación reducidas.

En una modalidad, el análogo de insulina humana de la invención es monomérico.

- 40 En un aspecto, la invención proporciona análogos de insulina novedosos para usar como medicamentos o para usar en la fabricación de medicamentos o composiciones farmacéuticas. El análogo de insulina de la invención puede ser útil en particular como medicamentos para el tratamiento de trastornos metabólicos que incluyen diabetes, particularmente diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2.

Composiciones Farmacéuticas

- 45 La presente invención se refiere a análogos de insulina útiles como medicamentos o para la fabricación de una composición farmacéutica/medicamento.

- 50 Por lo tanto, en otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas novedosas que comprenden una cantidad con eficacia terapéutica de un análogo de insulina de acuerdo con la presente invención.

- 55 La composición farmacéutica de acuerdo con la invención comprende opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender, además, otros excipientes usados comúnmente en composiciones farmacéuticas, por ejemplo, conservantes, agentes quelantes, agentes de tonicidad, potenciadores de la absorción.

- En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica de la invención es una preparación acuosa, es decir, una preparación que comprende agua. Típicamente, tal preparación es una solución. En una modalidad adicional de la invención adicional, la composición farmacéutica es una solución acuosa.

- 60 El término "preparación acuosa" se define como una preparación que comprende al menos 50 % p/p de agua. Igualmente, el término "solución acuosa" se define como una solución que comprende al menos 50 % p/p de agua.

- 65 En una modalidad de la invención, la preparación de insulina comprende una solución acuosa de un análogo de insulina de la presente invención, en donde dicho análogo de insulina está presente en una concentración de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 20,0 mM; más particularmente de aproximadamente 0,2 mM a aproximadamente 6,0 mM; de aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 4,0 mM; de aproximadamente 0,6 mM

- a aproximadamente 3,6 mM. En una modalidad, el análogo de insulina de la presente invención está en una concentración de aproximadamente 0,6 mM a aproximadamente 3,0 mM. En una modalidad, el análogo de insulina de la presente invención está en una concentración de aproximadamente 0,6 mM. En una modalidad, el análogo de insulina de la presente invención está en una concentración de aproximadamente 1,2 mM. En una modalidad, el análogo de insulina de la presente invención está en una concentración de aproximadamente 1,8 mM. En una modalidad, el análogo de insulina de la presente invención está en una concentración de aproximadamente 2,4 mM. En una modalidad, el análogo de insulina de la presente invención está en una concentración de aproximadamente 3 mM. En una modalidad, el análogo de insulina de la presente invención está en una concentración de aproximadamente 3,6 mM.
- En una modalidad, el análogo de insulina de la presente invención está en una concentración de aproximadamente 100 U a aproximadamente 600 U. En una modalidad, el análogo de insulina de la presente invención está en una concentración de aproximadamente 100 U. En una modalidad, el análogo de insulina de la presente invención está en una concentración de aproximadamente 200 U. En una modalidad, el análogo de insulina de la presente invención está en una concentración de aproximadamente 300 U. En una modalidad, el análogo de insulina de la presente invención está en una concentración de aproximadamente 400 U. En una modalidad, el análogo de insulina de la presente invención está en una concentración de aproximadamente 500 U. En una modalidad, el análogo de insulina de la presente invención está en una concentración de aproximadamente 600 U.
- La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender, además, un sistema tampón. En una modalidad, la concentración de tampón está en el intervalo de aproximadamente 0,1 mM a 20 mM. Aun en otra modalidad, la concentración de dicho tampón está en el intervalo de 0,1 mM a aproximadamente 10 mM, o de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 8 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 8 mM, o de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 8 mM o de 3 mM a 7 mM. En una modalidad de la invención, el tampón es un tampón fosfato. En una modalidad de la presente invención, la concentración del tampón fosfato es 3 mM. En una modalidad de la invención, el tampón es Tris. En una modalidad de la presente invención, la concentración del tampón Tris es 7 mM.
- En una modalidad, la composición farmacéutica de la presente invención puede no comprender un tampón.
- El pH de la composición farmacéutica inyectable de la invención está en el intervalo de 3 a 8,5. Preferentemente, la composición farmacéutica inyectable de acuerdo con la invención tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,0. En una modalidad de la invención, el pH está en el intervalo de aproximadamente 7,2 a aproximadamente 7,8, o de 7,4 a 7,6. En una modalidad de la invención, el pH es 7,0. En una modalidad de la invención, el pH es 7,2. En una modalidad de la invención, el pH es 7,4. En una modalidad de la invención, el pH es 7,6. En una modalidad de la invención, el pH es 7,8. En una modalidad de la invención, el pH es 8,0.
- Las preparaciones de insulina de la presente invención pueden comprender, además, un agente de tonicidad.
- En una modalidad de la invención, el agente de tonicidad es glicerol y/o propilenglicol y/o cloruro de sodio que puede estar presente en una concentración de 0 a aproximadamente 250 mM, desde 0 a aproximadamente 200 mM o desde 0 a aproximadamente 100 mM. En una modalidad, el agente de tonicidad puede estar presente en una concentración de aproximadamente 230 mM. En una modalidad, el agente de tonicidad puede estar presente en una concentración de 233 mM. En una modalidad, el agente de tonicidad puede estar presente en una concentración de 230 mM. En una modalidad, el agente de tonicidad puede estar presente en una concentración de aproximadamente 200 mM. En una modalidad, el agente de tonicidad puede estar presente en una concentración de 200 mM. En una modalidad, el agente de tonicidad puede estar presente en una concentración de aproximadamente 195 mM. En una modalidad, el agente de tonicidad puede estar presente en una concentración de 195 mM. En una modalidad, el agente de tonicidad puede estar presente en una concentración de aproximadamente 185 mM. En una modalidad, el agente de tonicidad puede estar presente en una concentración de 185 mM. En una modalidad, el agente de tonicidad puede estar presente en una concentración de aproximadamente 165 mM. En una modalidad, el agente de tonicidad puede estar presente en una concentración de 163 mM. En una modalidad, el agente de tonicidad puede estar presente en una concentración de 130 mM. En una modalidad, el agente de tonicidad puede estar presente en una concentración de aproximadamente 100 mM. En una modalidad, el agente de tonicidad puede estar presente en una concentración de 103 mM.
- Las preparaciones de insulina de la presente invención pueden comprender, además, un conservante farmacéuticamente aceptable. El conservante puede estar presente en una cantidad suficiente para obtener un efecto conservante. La cantidad de conservante en una composición farmacéutica de la invención puede determinarse, por ejemplo, a partir de la bibliografía en el campo y/o la cantidad(es) conocida(s) de conservante en, por ejemplo, productos comerciales. Cada uno de estos conservantes específicos o sus mezclas constituyen una modalidad de la invención alternativa. El uso de un conservante en preparaciones farmacéuticas se describe, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19na Edición, 1995.
- En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica inyectable comprende al menos un compuesto fenólico como agente conservante. En una modalidad, el compuesto fenólico para usar de acuerdo con la invención puede

estar presente en hasta aproximadamente 6 mg/ml de la composición farmacéutica inyectable final, en particular hasta aproximadamente 4 mg/ml de la composición farmacéutica inyectable final. En una modalidad, el compuesto fenólico para usar de acuerdo con la invención puede estar presente en una cantidad de hasta aproximadamente 4,0 mg/ml de composición farmacéutica inyectable final; en particular de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 4,0 mg/ml; o de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 4,0 mg/ml. En una modalidad de la invención, el conservante es fenol. En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica inyectable comprende una mezcla de fenol y m-cresol como agente conservante. En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica inyectable comprende fenol a aproximadamente 16 mM (1,5 mg/ml) y m-cresol a aproximadamente 16 mM (1,72 mg/ml). En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica inyectable comprende fenol a aproximadamente 19 mM (1,79 mg/ml) y m-cresol a aproximadamente 19 mM (2,05 mg/ml).

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender, además, un agente quelante. En un aspecto, la composición farmacéutica de la presente invención puede no comprender un agente quelante. El experto en la técnica conoce bien el uso de un agente quelante en preparaciones farmacéuticas. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19na Edición, 1995.

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender, además, un potenciador de la absorción. El grupo de potenciadores de la absorción puede incluir, pero no se limita a, compuestos nicotínicos.

En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica comprende un compuesto nicotínico. En una modalidad, el compuesto nicotínico es nicotinamida, y/o ácido nicotínico y/o una sal de estos. En otra modalidad, el compuesto nicotínico es nicotinamida. En otra modalidad de la invención, el compuesto nicotínico está presente en la cantidad de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 200 mM; en particular en la cantidad de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 200 mM, tal como aproximadamente 10 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 170 mM.

En una modalidad, la composición farmacéutica de la presente invención no comprende un compuesto nicotínico.

En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica comprende citrato en una concentración desde 1 mM a 50 mM. Debe entenderse que el término citrato incluye la sal citrato así como también el ácido cítrico. En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica comprende citrato en una concentración desde 5 mM a 20 mM. En una modalidad de la invención, el citrato está presente en una concentración de 5 mM. En una modalidad de la invención, el citrato está presente en una concentración de 10 mM. En una modalidad de la invención, el citrato está presente en una concentración de 15 mM. En una modalidad de la invención, el citrato está presente en una concentración de 20 mM.

En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica comprende nicotinamida y citrato. En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica comprende una combinación de nicotinamida y citrato, donde la nicotinamida está presente en la cantidad de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 200 mM, en particular en la cantidad de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 200 mM, tal como aproximadamente 10 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 170 mM y el citrato está presente en un intervalo de concentración de 5 mM a 20 mM, en particular en una concentración de aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 20 mM. En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica comprende nicotinamida 5 mM y citrato 5 mM. En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica comprende nicotinamida 10 mM y citrato 5 mM. En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica comprende nicotinamida 20 mM y citrato 5 mM. En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica comprende nicotinamida 40 mM y citrato 5 mM. En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica comprende nicotinamida 60 mM y citrato 5 mM. En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica comprende nicotinamida 80 mM y citrato 5 mM. En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica comprende nicotinamida 100 mM y citrato 5 mM. En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica comprende nicotinamida 120 mM y citrato 5 mM. En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica comprende nicotinamida 140 mM y citrato 5 mM. En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica comprende nicotinamida 160 mM y citrato 5 mM. En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica comprende nicotinamida 170 mM y citrato 5 mM. En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica comprende nicotinamida 5 mM y citrato 10 mM. En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica comprende nicotinamida 10 mM y citrato 10 mM. En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica comprende nicotinamida 20 mM y citrato 10 mM. En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica comprende nicotinamida 40 mM y citrato 10 mM. En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica comprende nicotinamida 60 mM y citrato 10 mM. En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica comprende nicotinamida 80 mM y citrato 10 mM. En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica comprende nicotinamida 100 mM y citrato 10 mM. En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica comprende nicotinamida 120 mM y citrato 10 mM. En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica comprende nicotinamida 140 mM y citrato 10 mM. En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica comprende nicotinamida 160 mM y citrato 10 mM. En una modalidad de la invención, la composición farmacéutica comprende nicotinamida 170 mM y citrato 10 mM.

- 5 En una modalidad, una composición farmacéutica comprende aproximadamente 0,6 a aproximadamente 3,6 mM del análogo de insulina A9E, B3E, B26E, desB30 o A9E, B3E, B27E, B28E, desB30 y comprende, además, fenol de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 4 mg/ml, m-cresol de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 4 mg/ml, glicerol de aproximadamente 0 a aproximadamente 250 mM, Tris o fosfato de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 20 mM, nicotinamida de aproximadamente 0 mM y tiene un valor de pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,0.
- 10 En una modalidad, una composición farmacéutica comprende aproximadamente 0,6 a aproximadamente 3,6 mM del análogo de insulina A9E, B3E, B26E, desB30 o A9E, B3E, B27E, B28E, desB30 y comprende, además, fenol de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 4 mg/ml, m-cresol de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 4 mg/ml, glicerol de aproximadamente 0 a aproximadamente 250 mM, Tris o fosfato de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 20 mM, nicotinamida de aproximadamente 40 mM y tiene un valor de pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,0.
- 15 En una modalidad, una composición farmacéutica comprende aproximadamente 0,6 a aproximadamente 3,6 mM del análogo de insulina A9E, B3E, B26E, desB30 o A9E, B3E, B27E, B28E, desB30 y comprende, además, fenol de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 4 mg/ml, m-cresol de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 4 mg/ml, glicerol de aproximadamente 0 a aproximadamente 250 mM, Tris o fosfato de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 20 mM, nicotinamida de aproximadamente 20 mM, citrato de
- 20 aproximadamente 10 mM y tiene un valor de pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,0.
- 25 La composición farmacéutica de la invención puede comprender, además, una cantidad de una base aminoacídica suficiente para disminuir la formación de agregados por el polipéptido o proteína durante el almacenamiento de la composición. El término "base aminoacídica" se refiere a un aminoácido o una combinación de aminoácidos, donde cualquier aminoácido dado está presente en su forma de base libre o en su forma de sal.
- La invención se refiere, además, a un método para la preparación de tales preparaciones de insulina.
- 30 Las preparaciones de insulina de esta invención pueden prepararse mediante el uso de cualquiera de los diversos métodos reconocidos. Por ejemplo, las preparaciones pueden prepararse mediante la mezcla de una solución acuosa de excipientes con una solución acuosa del análogo de insulina, después de lo cual el pH se ajusta a un nivel deseado y la mezcla se completa hasta el volumen final con agua seguido de filtración estéril.
- 35 En una modalidad, el análogo de insulina de la invención es monomérico en una composición farmacéutica.
- En una modalidad, el análogo de insulina de la invención tiene propiedades de autoasociación reducidas en una composición farmacéutica.
- 40 En una modalidad, el análogo de insulina de la invención es químicamente estable en una composición farmacéutica.
- En una modalidad, el análogo de insulina de la invención es físicamente estable en una composición farmacéutica.
- En una modalidad, el análogo de insulina de la invención es química y físicamente estable en una composición farmacéutica.
- 45 En una modalidad, el análogo de insulina de la invención es monomérico y físicamente estable en una composición farmacéutica.
- En una modalidad, el análogo de insulina de la invención es monomérico y químicamente estable en una composición farmacéutica.
- 50 En una modalidad, el análogo de insulina de la invención es monomérico y química y físicamente estable en una composición farmacéutica.
- 55 En una modalidad, el análogo de insulina de la invención es monomérico y química y físicamente estable en una composición farmacéutica incluso a una alta concentración.
- En una modalidad, las velocidades de absorción de los análogos de insulina de la invención son más rápidas en comparación con Fiasp®.
- 60 En una modalidad de la invención, esta diferencia permitirá mejorar aún más el algoritmo de dosificación de insulina para el sistema de lazo cerrado para aumentar el tiempo en el intervalo (es decir, el tiempo en que la glucosa en sangre del paciente está en el intervalo saludable).
- 65 Composiciones Farmacéuticas Libres de Zinc

- Las preparaciones de insulina comprenden tradicionalmente zinc añadido, por ejemplo, como sal de cloruro o acetato para obtener una estabilidad aceptable de la preparación farmacéutica. Sin embargo, se ha descubierto sorprendentemente que los análogos de insulina de la invención, al tiempo que mantienen una autoasociación reducida, suficiente estabilidad química y física, pueden formularse en composiciones farmacéuticas con alta concentración de insulina pero sin la adición de zinc, para brindar de esta manera un inicio de la acción más rápido que los análogos de insulina comparables que necesitan iones Zn^{2+} para mantener suficiente estabilidad química y física. Las composiciones libres de zinc se absorben más rápidamente del tejido subcutáneo y, por lo tanto, permiten el uso prandial.
- Sin embargo, siempre que puedan proporcionarse excipientes libres de zinc, los análogos de insulina de la presente invención permiten de hecho la preparación de composiciones farmacéuticas libres de zinc. Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona "composiciones farmacéuticas libres de zinc" que comprenden un análogo de insulina de la invención y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, desprovistos de cualquier zinc o sin iones de zinc añadidos.
- El análogo de insulina de la presente invención aumenta la estabilidad química y física de las composiciones farmacéuticas formuladas sin adición de iones de zinc y sin surfactantes añadidos.
- En una modalidad, la composición farmacéutica de la presente invención está libre de zinc.
- En una modalidad, la composición farmacéutica que comprende el análogo de insulina de la invención está libre de zinc.
- En una modalidad, el análogo de insulina de la invención es monomérico en una composición farmacéutica libre de zinc.
- En una modalidad, el análogo de insulina de la invención es químicamente estable en una composición farmacéutica libre de zinc.
- En una modalidad, el análogo de insulina de la invención es físicamente estable en una composición farmacéutica libre de zinc.
- En una modalidad, el análogo de insulina de la invención es química y físicamente estable en una composición farmacéutica libre de zinc.
- En una modalidad, el análogo de insulina de la invención es monomérico y química y físicamente estable en una composición farmacéutica libre de zinc.
- En una modalidad, el análogo de insulina de la invención es monomérico y química y físicamente estable, incluso a alta concentración, en una composición farmacéutica libre de zinc.
- Métodos de administración**
- La composición farmacéutica de la invención puede administrarse mediante métodos convencionales.
- La administración parenteral puede realizarse mediante inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa tipo pluma. Alternativamente, la administración parenteral puede realizarse por medio de una bomba de infusión. Como una opción adicional, las preparaciones de insulina que contienen el compuesto de insulina de la invención pueden adaptarse, además, a la administración transdérmica, por ejemplo, mediante inyección sin aguja o a partir de un parche de microagujas, opcionalmente un parche iontoforético o administración transmucosal, por ejemplo, bucal.
- La composición farmacéutica de la invención puede administrarse a un paciente que necesita de tal tratamiento en varios sitios, por ejemplo, en sitios tópicos, por ejemplo, en sitios de la piel y las mucosas, en sitios que no necesitan de la absorción, por ejemplo, la administración en una arteria, en una vena, en el corazón y en sitios que implican la absorción, por ejemplo, administración en la piel, debajo de la piel, en un músculo o en el abdomen.
- La composición farmacéutica de la invención puede usarse en el tratamiento de la diabetes mediante administración parenteral. La dosis real depende de la naturaleza y de la gravedad de la enfermedad que se trata y queda a criterio del médico y puede variarse mediante el ajuste de la dosificación a las circunstancias particulares de esta invención para producir el efecto terapéutico conveniente. Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden prepararse para usar en varios dispositivos médicos normalmente usados para la administración de insulina, que incluyen los dispositivos tipo pluma usados para la terapia con insulina mediante inyección, la terapia de infusión continua de insulina subcutánea mediante el uso de bombas.

	En una modalidad, la composición farmacéutica de la invención se formula en un dispositivo tipo pluma para usar en la terapia con insulina mediante inyección.
5	En una modalidad, la composición farmacéutica de la invención se formula en una bomba externa para la administración de insulina.
	En una modalidad, la composición farmacéutica de la invención se formula en una bomba de insulina para la administración de insulina.
10	En una modalidad, la composición farmacéutica de la invención es adecuada para una bomba de insulina para la administración de insulina.
	En una modalidad, la composición farmacéutica de la invención es adecuada para una bomba de insulina que puede contener análogos de insulina equivalentes a 100-600 U de insulina humana.
15	Métodos de Terapia
	La presente invención se refiere a fármacos para su uso terapéutico. Más específicamente, la invención se refiere al uso de análogos de insulina de la invención para el tratamiento o prevención de afecciones médicas relacionadas con la diabetes.
20	
	En otra modalidad, la invención se refiere al uso de tales análogos de insulina para el tratamiento, prevención o alivio de enfermedades, trastornos o afecciones relacionadas con la diabetes, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 o intolerancia a la glucosa, cuyo método comprende la administración a un sujeto que lo necesite de una cantidad con eficacia terapéutica de los análogos de insulina de la invención.
25	
	En otra modalidad, la invención se refiere al uso de tales análogos de insulina para el tratamiento, prevención o alivio de enfermedades, trastornos o afecciones relacionadas con la diabetes y, en particular, la diabetes tipo 1 o diabetes tipo 2.
30	
	Ejemplos
	Materiales y métodos
35	Lista de abreviaturas
	ACN - Acetonitrilo
	ALP – proteasa de <i>Achromobacter lyticus</i>
	AUC – Área bajo la curva
40	Péptido C – péptido enlazador
	DCM – diclorometano
	DIC – diisopropilcarbodiimida;
	DIPEA = DIEA – N,N-diisopropiletilamina
	DMF – N,N-dimetilformamida
45	DMSO – dimetilsulfóxido
	Fmoc – fluorenilmetiloxycarbonilo
	Glu (gGlu) – gamma L-glutamilo
	HFIP - Hexafluoro-2-propanol
	HPLC- cromatografía líquida de alto rendimiento
50	IR – receptor de insulina
	IGF-1R – receptor del factor de crecimiento 1 similar a insulina
	LC – cromatografía líquida
	MALDI-TOF – desorción/ionización láser asistida por matriz con detector de tiempo de vuelo
	MS – espectrometría de masas
55	NMP – N-metilpirrolidona
	PAL - Enlazador amida peptídico
	PCR – reacción en cadena de la polimerasa
	PD – farmacodinámica (efecto reductor de la glucosa en sangre/plasma)
	PK – farmacodinámica (perfil de concentraciones de insulina en sangre/plasma vs. tiempo)
60	RT – temperatura ambiente
	tBu – terc-butilo
	TFA – ácido trifluoroacético; y
	TRIS – tris (hidroximetil) aminometano.
65	Métodos Generales de Preparación

Procedimiento general (A)

Síntesis en fase sólida y purificación de análogos de la invención

- 5 Un procedimiento general para la síntesis en fase sólida y la purificación de los análogos de insulina de la invención se describe en detalle más abajo y se ha aplicado a la síntesis de compuestos adicionales como se indica más abajo.

Las cadenas A y B de la insulina se prepararon en un sintetizador de péptidos Prelude mediante el uso de un método general de acoplamiento de péptidos en fase sólida basado en Fmoc.

10

Resinas usadas:

Fmoc-Thr(OtBu)-Wang; y Fmoc-Asp-OtBu acoplado a resina PAL.

- 15 Los aminoácidos (enumerados más abajo) y la oxima se disolvieron en DMF a una concentración de 0,3 M:

Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Glu(OtBu)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; y Fmoc-Val-OH.

20

Aminoácidos especiales/no naturales: Boc-Phe-OH; Boc-Gly-OH; y Fmoc-Cys(Acm)-OH.

Procedimiento

25

Escala: 0,25 mmol.

Las condiciones de acoplamiento estándar usadas en las resinas fueron: 8 eq de aminoácidos, DIC, colidina y oxima (etil (hidroxiimino)cianoacetato) en NMP durante 1 hora, en el caso de Fmoc-Arg(Pbf)-OH, se usó un protocolo de doble acoplamiento (2x1h).

30

Las condiciones de desprotección estándar usadas fueron: piperidina al 20 % en NMP (2x 5,5 ml durante 2x 7,5 min o 2x 10 min), seguido de lavado con NMP y DCM.

- 35 Formación del disulfuro A6C-A11C

La resina se trató durante 15 min con una solución de yodo al 0,5 % en DCM/HFIP (30 ml de mezcla 1:1). Después de eliminar el solvente por filtración, la resina se lavó con DCM (3x20 ml) y se secó en corriente de nitrógeno.

- 40 Escisión de la cadena A de la resina y activación de A20-Cys como S-S-Piridilo

La resina se trató con una solución de TFA (30 ml), triisopropilsilano (1 ml), agua (0,75 ml) y ditiodipiridina (0,75 g) durante 3 h, y después se recolectó el filtrado y se añadió a 150 ml de éter (dividido en 6 tubos NUNC de plástico) para precipitar el péptido. Los tubos se centrifugaron a 3500 rpm durante 3 min, la capa de éter se decantó y esta etapa con éter se repitió 3 veces más. El material crudo se combinó y se dejó secar durante la noche a RT para obtener el péptido de cadena A deseado.

45

Escisión de la cadena B de la resina

- 50 La resina se trató con una solución de TFA (30 ml), triisopropilsilano (1 ml), agua (0,75 ml) y ditiotreitol (0,5 g) durante 3 h, y después se recolectó el filtrado y se añadió a éter (150 ml, dividido en 6 tubos NUNC de plástico) para precipitar el péptido. Los tubos se centrifugaron a 3500 rpm durante 3 min, la capa de éter se decantó y esta etapa con éter se repitió 3 veces más. Se dejó secar el material crudo durante la noche a RT para obtener el péptido de cadena B deseado.

55

Formación del disulfuro A20C-B19C

A una mezcla de cadena A (0,33 g) y cadena B (0,33 g) se le añadió DMSO (8 ml) y DIPEA (1 ml) y la mezcla se agitó durante 20 min, después se añadió gota a gota con agitación a 140 ml de solución tampón neutra (agua, TRIS (10 mM), sulfato de amonio (15 mM), acetonitrilo al 20 %) hasta un volumen total de aproximadamente 150 ml.

60

Después la mezcla se purificó por cromatografía de fase inversa mediante el uso de la siguiente configuración

- 65
- Columna Phenomenex Gemini 5 μ M 5u C18 110 Å 30x250 mm, que funciona a 20 ml/min de 10 % B a 60 % B durante 40 min
 - Eluyente A=TRIS 10 mM, sulfato de amonio 15 mM, pH=7,3, ACN al 20 % en agua milliQ

- Eluyente B=agua milliQ al 20 % en acetonitrilo

Las fracciones puras se combinaron, se congelaron instantáneamente y se liofilizaron.

5 Formación del disulfuro A7C-B7C

El intermediario liofilizado de la etapa anterior se volvió a disolver en 5 ml de DMSO. Se añadió ácido acético (20 ml) y agua (4 ml), seguido de yodo en AcOH (3 ml de 40 mM)

- 10 Después de un tiempo total de reacción de 20 min, la reacción se inactivó con ascorbato de sodio 1 M y después se añadió a una solución agitada de agua (90 ml).

Después la mezcla se purificó por cromatografía de fase inversa mediante el uso de la siguiente configuración

- 15
- Columna Phenomenex Gemini 5 μ M 5u C18 110 Å 30x250mm, que funciona a 20 ml/min de 10 % B a 45 % B durante 40 min
 - Eluyente A=TFA al 0,1 % en agua milliQ
 - Eluyente B=TFA al 0,1 % en acetonitrilo

- 20 Las fracciones puras se combinaron, se congelaron instantáneamente y se liofilizaron para obtener el producto deseado.

Procedimiento general (B)

25 Expresión y purificación del análogo de insulina

Expresión del análogo de insulina en *S. cerevisiae*

- 30 El análogo de insulina, es decir, los análogos de insulina no acilados de dos cadenas, para usar de acuerdo con la invención se produjeron de forma recombinante mediante la expresión de una secuencia de ADN que codifica el análogo de insulina en cuestión en una célula hospedadora adecuada mediante técnicas bien conocidas, por ejemplo, como se describe en el documento US 6500645. El análogo de insulina se expresa directamente o como una molécula precursora que puede tener una extensión N-terminal en la cadena B y/o un péptido enlazador (péptido C) entre la cadena B y la cadena A. Esta extensión N-terminal y el péptido C se escinden in vitro con una proteasa adecuada, por ejemplo, la proteasa de *Achromobacter lyticus* (ALP) o tripsina y, por lo tanto, tendrán un sitio de escisión junto a la posición B1 y A1, respectivamente. Las extensiones N-terminales y los péptidos C del tipo adecuado para usar de acuerdo con esta invención se describen, por ejemplo, en los documentos US 5395922, EP 765395 y WO 9828429.

- 40 La secuencia polinucleotídica que codifica el precursor del análogo de insulina para usar de acuerdo con la invención puede prepararse por síntesis mediante métodos establecidos, por ejemplo, el método de fosfoamidita descrito por Beaucage y otros (1981) Tetrahedron Letters 22 1859-1869, o el método descrito por Matthes y otros (1984) EMBO Journal 3 801-805. De acuerdo con el método de fosfoamidita, los oligonucleótidos se sintetizan, por ejemplo, en un sintetizador automático de ADN, se purifican, se hibridan y se ligan para formar la construcción de ADN sintético. Una forma actualmente preferida de preparar la construcción de ADN es mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

- 50 El método recombinante hará uso típicamente de un vector que es capaz de replicarse en el microorganismo o célula hospedadora seleccionados y que porta una secuencia polinucleotídica que codifica el precursor del análogo de insulina para usar de acuerdo con la presente invención. El vector recombinante puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para garantizar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula hospedadora, se integra en el genoma y se replica junto con los cromosomas en los que se ha integrado. Además, puede usarse un solo vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total a introducir en el genoma de la célula hospedadora o puede usarse un transposón. El vector puede ser un plásmido lineal o circular cerrado y, preferentemente, contendrá unos elementos que permitan la integración estable del vector en el genoma de la célula hospedadora o la replicación autónoma del vector en la célula independientemente del genoma.

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

- 65 El vector puede contener uno o más marcadores de selección, que permitan una fácil selección de las células transformadas. Un marcador de selección es un producto génico, que proporciona resistencia a biocidas o virus, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos y similares. Ejemplos de marcadores de selección bacterianos

son los genes *dal* de *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis* o marcadores que confieren resistencia a antibióticos tales como resistencia a ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Los marcadores de selección para usar en una célula hospedadora de hongo filamentoso incluyen *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina carbamoiltransferasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato descarboxilasa) y *trpC* (antranilato sintasa). Los marcadores adecuados para las células hospedadoras de levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Un marcador de selección muy adecuado para la levadura es el gen de TPI de *Schizosaccharomyces pombe* (Russell (1985) Gene 40 125-130).

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

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

Típicamente, la secuencia polinucleotídica que codifica la cadena principal del péptido de insulina para usar de acuerdo con la invención también estará conectada operativamente a un terminador adecuado. En levadura, un terminador adecuado es el terminador de TPI (Alber y otros (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1 419-434).

Los procedimientos usados para combinar la secuencia polinucleotídica que codifica el análogo de insulina para usar de acuerdo con la invención, el promotor y el terminador, respectivamente, y para insertarlos en un vector adecuado que contiene la información necesaria para la replicación en el hospedador seleccionado, se conocen bien por los expertos en la técnica. Se debe entender que el vector puede construirse ya sea mediante la preparación, primero, de un constructo de ADN que contiene la secuencia de ADN completa que codifica las cadenas principales de insulina para usar de acuerdo con la invención, y subsecuentemente insertar este fragmento en un vector de expresión adecuado, o mediante la inserción secuencial de fragmentos de ADN que contienen información genética para los elementos individuales tales como la señal y el propéptido (extensión N-terminal de la cadena B), péptido C, cadenas A y B, seguido de la ligadura.

El vector que comprende la secuencia polinucleotídica que codifica el análogo de insulina para usar de acuerdo con la invención se introduce en una célula hospedadora, de manera que el vector se mantiene como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autorreplicante. El término "célula hospedadora" abarca cualquier progenie de una célula progenitora que no es idéntica a la célula progenitora debido a mutaciones que ocurren durante la replicación. La célula hospedadora puede ser un microorganismo unicelular, por ejemplo, un procarionte, o un microorganismo no unicelular, por ejemplo, un eucariote. Las células unicelulares útiles son células bacterianas tales como bacterias grampositivas, que incluyen, pero no se limitan a, células de *Bacillus*, una célula de *Streptomyces*, o bacterias gramnegativas tales como *E. coli* y *Pseudomonas* sp. Las células eucariotas pueden ser células de mamíferos, de insectos, de plantas o de hongos.

En particular, la célula hospedadora puede ser una célula de levadura. El organismo de levadura puede ser cualquier organismo de levadura adecuado que, al cultivarlo, secreta al medio de cultivo la cadena principal del péptido de insulina o su precursor. Ejemplos de organismos de levadura adecuados incluyen cepas seleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces uvarum*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia kluyveri*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida* sp., *Candida utilis*, *Candida cacaoi*, *Geotrichum* sp. y *Geotrichum fermentans*.

La transformación de las células de levadura puede efectuarse, por ejemplo, mediante la formación de protoplastos seguida de la transformación por métodos conocidos. El medio usado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para el cultivo de organismos de levadura.

Purificación de análogos de insulina

El análogo de insulina secretado o su precursor puede recuperarse del medio mediante procedimientos convencionales que incluyen la separación de las células de levadura del medio por centrifugación, filtración o por captura o adsorción del análogo de insulina o precursor de esta en una matriz de intercambio iónico o en una matriz de absorción de fase inversa, la precipitación de los componentes proteicos del sobrenadante, o por filtración por medio de una sal, por ejemplo, sulfato de amonio, seguido de purificación mediante una variedad de procedimientos cromatográficos, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, etcétera.

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

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

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

Digestión con ALP

15 El eluato de la etapa de cromatografía de intercambio catiónico que contiene el precursor de la cadena principal del péptido de insulina se diluye con agua hasta una concentración de etanol de 15-20 %. Se añade glutamato de sodio a una concentración de 15 mM y se ajusta el pH a 9,7 con NaOH. Se añade ALP inmovilizada (4 gramos/L) en una proporción de 1:100 (volumen:volumen) y se deja que prosiga la digestión con agitación suave a temperatura ambiente durante la noche.

20 La reacción de digestión se analiza mediante LC analítica en un sistema de cromatografía líquida de ultra rendimiento Waters Acquity mediante el uso de una columna C18 y el peso molecular se confirma mediante espectrometría de masas (MS) de desorción/ionización láser asistida por matriz con detector de tiempo de vuelo (MALDI-TOF) (Bruker Daltonics Autoflex II TOF/TOF).

25 La ALP inmovilizada se elimina por filtración mediante el uso de un filtro de 0,2 µm. La cadena principal del péptido de insulina de dos cadenas se purifica por HPLC de fase inversa (sistema Waters 600) en una columna C18 mediante el uso de un gradiente de acetonitrilo. La insulina deseada se recupera mediante liofilización.

30 La pureza se determina mediante LC analítica en un sistema de Cromatografía Líquida de Ultra Rendimiento Waters Acquity mediante el uso de una columna C18 y el peso molecular se confirma mediante MS MALDI-TOF.

Ejemplo 1

35 Preparado mediante el procedimiento General (B)
Insulina humana A9E, B3E, B26E, desB30 (SEQ ID NOS:3 y 4)

Ejemplo 2

40 Preparado mediante el procedimiento General (B)
Insulina humana A9E, B3E, B27E, B28E, desB30 (SEQ ID NOS:3 y 5)

Ejemplo 3

45 Preparado mediante el procedimiento General (A)
Insulina humana A9E, B3E, B26E; (SEQ ID NOS:3 y 6)

Ejemplo 4

50 Preparado mediante el procedimiento General (A)
Insulina humana A9E, B3E, B27E, B28E; (SEQ ID NOS:3 y 7)

Ejemplo 5

55 Preparado mediante el procedimiento General (B)
A9D, B3E, B26E, desB30 (SEQ ID NOS:8 y 4)

Ejemplo 6

60 Preparado mediante el procedimiento General (B)
A9E, A21A, B3E, B26E, desB30 (SEQ ID NOS:9 y 4)

Compuesto comparador 1

65 Insulina humana B3E, B26E, desB30;

Compuesto comparador 2

- Insulina humana B3E, B27E, B28E, desB30;
- Compuesto comparador 3
Insulina humana B28D (Insulina Aspart)
- 5 Compuesto comparador 4
Insulina humana A21A, B3E, B26E, desB30
- Ejemplo 7
- 10 Afinidad por el receptor de insulina de derivados de insulina seleccionados de la invención, medidos en receptores solubilizados

La afinidad de unión relativa de los análogos de insulina de la invención para el receptor de insulina humano (IR) se determinó mediante la unión competitiva en un ensayo de proximidad de centelleo (SPA) (de acuerdo con Glendorf T y otros (2008) Biochemistry 47 4743-4751).

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

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

Las afinidades por el receptor de insulina y otros datos *in vitro* de los análogos de insulina seleccionados de la invención se presentan en la Tabla 1, más abajo.

Tabla 1: Afinidades por el receptor de insulina, afinidades por el receptor de IGF-1 y potencias de lipogénesis funcional de las insulinas de la invención

Ejemplo núm.	hIRA (% rel a HI) Ej. 7	hIRA mem (% rel a HI) Ej. 8	hIGF1R mem (% rel a HI) Ej. 8	Lipogénesis (% rel a HI) Ej. 9
1	83,2	55,8	10,2	68,2
2	59,5	35,4	16,5	46,5
5	75,5	ND	ND	ND
6	35,3	ND	ND	ND

En conclusión, los análogos de insulina de la invención tienen una alta afinidad por el receptor de insulina y son capaces de activar el receptor y provocar una respuesta funcional. Además, la afinidad relativa de los análogos de insulina de la invención por el receptor de IGF-1 es menor en comparación con la afinidad por el receptor de insulina. Esto representa un beneficio potencial con respecto a la seguridad de los análogos de la invención en la práctica clínica ya que la respuesta mitogénica sería menor en comparación con la respuesta metabólica.

Ejemplo 8

Afinidades por el receptor de insulina y el factor de crecimiento-1 similar a la insulina de los derivados de insulina de la invención seleccionados, medidas en receptores asociados a la membrana

El IR y el IGF-1R humano asociado a membrana se purificaron a partir de células BHK transfectadas de manera estable con el vector pZem219B que contiene el inserto de IR-A, IR-B o IGF-IR humano. Las células BHK se cultivaron y se homogeneizaron en tampón helado (HEPES 25 mM pH 7,4, CaCl2 25 mM y MgCl2 1 mM, bacitracina 250 mg/L, Pefablock 0,1 mM). Los homogeneizados se extendieron en forma de capa sobre un colchón de sacarosa al 41 % (p/v) y se centrifugaron durante 75 minutos a 95 000 g a 4 °C. Las membranas plasmáticas se recolectaron, se diluyeron 1:5 con tampón (como antes) y se centrifugaron de nuevo durante 45 minutos a 40 000 g a 4 °C. Los sedimentos se suspendieron nuevamente en un volumen mínimo de tampón y se aspiraron a través de una aguja (tamaño 23) tres veces antes de almacenarlos a -80 °C hasta su uso.

La afinidad de unión relativa por cualquiera de los IR-A, IR-B o IGF-1R humanos asociados a membrana se determinó mediante unión competitiva en una configuración de SPA. Los ensayos de IR se realizaron por duplicado en OptiPlates

de 96 pocillos (Perkin-Elmer Life Sciences). La proteína de membrana se incubó con agitación suave durante 150 minutos a 25 °C con insulina humana-[125I-A14Y] 50 pM en un volumen total de 200 µl de tampón de ensayo (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, MgSO₄ 5 mM, Tritón X-100 al 0,01 %, HSA (Sigma A1887) al 0,1 % (p/v), inhibidores de proteasa completos sin EDTA), 50 µg de microesferas de PVT recubiertas con aglutinato de germen de trigo (WGA) (GE Healthcare) y concentraciones crecientes del ligando. Los ensayos se terminaron por centrifugación de la placa a 2000 rpm durante 2 minutos y la radioactividad unida se cuantificó mediante recuento en un instrumento TopCount NXT (Perkin-Elmer Life Sciences).

Los ensayos de IGF-1R se realizaron esencialmente del mismo modo que para los ensayos de unión a IR, excepto que se empleó IGF-1R asociado a membrana e IGF-1 humano-[125I-Tyr31] 50 pM. Los datos del SPA se analizaron de acuerdo con el modelo logístico de cuatro parámetros (Vølund A (1978) Biometrics 34 357-365) y las afinidades de unión de los análogos a evaluar se calcularon con relación al estándar de insulina humana medido dentro de la misma placa.

Los datos de unión a IR (isoforma A) e IGF-1R de los análogos de insulina seleccionados de la invención se muestran en la Tabla 1 anterior.

Ejemplo 9

Lipogénesis en adipocitos de rata

Como una medida de la potencia in vitro de los análogos de insulina de la invención, puede usarse la lipogénesis.

Los adipocitos primarios de rata se aislaron a partir de las almohadillas de grasa epididimales y se incubaron con glucosa 3H en tampón que contiene, por ejemplo, HSA libre de grasa al 0,1 % con insulina estándar (insulina humana, HI) o insulina de la invención. La glucosa marcada se convierte en lípidos extraíbles de forma dependiente de la dosis, lo que da como resultado curvas de respuesta a las dosis completas. El resultado se expresó como la potencia relativa (%), con límites de confianza del 95 %, de la insulina de la invención en comparación con la estándar (HI).

Los datos se muestran en la Tabla 1 anterior.

Ejemplo 10

Preparación de composiciones de insulina

Las composiciones de insulina de la presente invención pueden prepararse como soluciones acuosas. La solución acuosa se hace isotónica, por ejemplo, con cloruro de sodio y/o glicerol. Además, el medio acuoso puede contener tampones y conservantes. El valor de pH de la preparación se ajusta al valor deseado y puede estar entre aproximadamente 3 y aproximadamente 8,5, entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5, o aproximadamente 6,5, o aproximadamente 7,4, o aproximadamente 7,5, en dependencia del punto isoelectrico, pI, del análogo de insulina en cuestión.

Preparación de composiciones de insulina libres de zinc

Los análogos de insulina libres de zinc se disolvieron en una solución acuosa, que en la composición final contenía entre 0,1 mM y 10 mM del análogo de insulina, m-cresol 16 mM, fenol 16 mM y cantidades adecuadas de nicotinamida y glicerol y el pH se ajustó al valor deseado (entre 7,0-8,0, medido a temperatura ambiente) mediante el uso de ácido clorhídrico 1 N/NaOH 1 N. Se añadió agua al volumen final y la solución se esterilizó mediante filtración a través de un filtro de 0,2 µm. Se llenaron frascos con la composición (frascos de 2 ml sellados mediante el uso de tapas engarzadas, cartuchos penfill sellados con tapas engarzadas o frascos de HPLC con tapas de rosca).

Tabla 2: Composiciones ilustrativas de preparaciones de insulina

Composición	Insulina (mM)	Fenol (mM)	m-Cresol (mM)	Nicotinamida (mM)	Glicerol % mM		Propilenglicol %	Fosfato (mM)	Tris (mM)	pH	Citrato (mM)
A	0,6	16	16	0	2,15	233	0	3		7,4	
B	0,6	16	16	40	1,85	200	0	3		7,4	
B1	0,6	16	16	40	1,5	163	0	3		7,4	5
B2	0,6	16	16	40	1,5	163	0	3		7,4	10
B3	0,6	16	16	40	1,2	130	0	3		7,4	15
B4	0,6	16	16	40	1,2	130	0	3		7,4	20
C	0,6	16	16	170	0,95	103	0	3		7,4	

	I	0,6	16	16	40	1,7	185	0	3		7,2	
	I1	0,6	16	16	20	1,7	185	0	3		7,4	10
5	L	0,6	16	16	40	0	0	1,5		7	7,4	
	M	0,6	16	16	40	1,8	195	0		7	7,4	
	M1	0,6	16	16	10	1,8	195	0	3		7,4	10
10	D	1,2	16	16	40	1,85	200	0	3		7,4	
	D1	1,2	16	16	40	1,5	163	0	3		7,4	10
	E	1,8	16	16	40	1,85	200	0	3		7,4	
15	F	2,4	16	16	40	1,85	200	0	3		7,4	
	G	3,0	16	16	40	1,85	200	0	3		7,4	
	H	3,0	16	16	40	1,85	200	0	3		7,0	
20	J	3,0	16	16	0	1,8	195	0	3		7,0	
	K	3,0	16	16	0	2,1	230	0	3		7,4	
	K1	3,0	16	16	0	2,1	230	0	3		7,4	20
25	O	3,0	19	19	40	1,7	185	0	3		7,2	
	P	3,0	19	19	40	1,7	185	0	3		7,6	
	Q	3,0	19	19	40	1,7	185	0	3		8,0	
30												

Ejemplo 11

Autoasociación de composiciones de insulina medida por Dispersión de Rayos X de Ángulo Pequeño (SAXS)

35 Los datos de SAXS se usaron para estimar el estado de autoasociación de los análogos de insulina de la invención en diferentes condiciones.

La curva de dispersión de cada experimento se describió mediante el radio promedio de giro (Rg) y la dimensión máxima (Dmáx).

40 Además, las cantidades relativas de monómero, dímero y especies más grandes en la curva de dispersión se estimaron mediante el uso del hecho de que un perfil de dispersión de SAXS tiene una contribución de intensidad de todos los componentes individuales en una mezcla multicomponente. Mediante el uso de las intensidades (factores de forma) de cada componente, es posible estimar la contribución de la fracción volumétrica de cada componente en la mezcla. Se usa un sistema de ecuaciones lineales que usa el algoritmo de mínimos cuadrados no negativos o no restringidos para minimizar la discrepancia entre las curvas de dispersión experimental y calculada. Los factores de forma se calculan a partir de las estructuras cristalinas de un monómero, dímero, hexámero, etcétera. Las fracciones volumétricas se expresan en porcentajes (%).

50 Los resultados obtenidos de los derivados de la invención y de los derivados de la técnica anterior se muestran en la Tabla 3, más abajo.

Tabla 3: Datos de SAXS de derivados de la invención y análogos de insulina de comparación

Ejemplo núm.	Composición	SAXS* formulación como se describió en el ejemplo 10	
		M	D+>D
55	1	100	0
	1	100	0
60	1	100	0
	1	99	1
	1	100	0
65	1	98	2
	1	100	0

5	1	M1	100	0
	1	D	100	0
	1	D1	97	3
	1	E	100	0
	1	F	100	0
	1	G	100	0
10	1	H	79	21
	1	O	90	10
	1	P	100	0
	1	Q	100	0
15	1	B1	100	0
	1	B2	100	0
	1	B3	100	0
20	1	B4	100	0
	2	A	100	0
	2	I	100	0
	2	B	100	0
25	2	L	100	0
	2	M	100	0
	2	O	100	0
30	2	P	100	0
	2	Q	100	0
	5	B	98	2
	5	G	95	5
35	6	B	91	9
	Comparador 1	B	97	3
	Comparador 1	B4	95	5
40	Comparador 1	G	77	23
	Comparador 1	H	4	96
	Comparador 2	A	100	0
	Comparador 2	J	0	100
45	Comparador 2	K	87	13
	Comparador 2	K1	0	100
	Comparador 3	A#	35	65
50	Comparador 3	B#	0	100
	Comparador 3	A + Zn	0	100
	Comparador 4	A	86	14
	Comparador 4	K	42	58
55	Comparador 4	B4	87	13
	Comparador 4	K1	0	100
60	*) M: Porcentaje de especies monoméricas en la composición; D: Porcentaje de especies diméricas en la composición; >D: Porcentaje de especies mayores que diméricas en la composición; #) concentración de fosfato 7 mM en lugar de 3 mM			

En conclusión, los análogos de insulina de la invención están menos autoasociados que los compuestos de comparación de acuerdo con los resultados de SAXS. Esta diferencia es más pronunciada a concentraciones más altas de los análogos de insulina de la invención. Por lo tanto, se esperará que los análogos de insulina de la invención se absorban más rápidamente después de la inyección subcutánea de composiciones de concentración especialmente alta.

Ejemplo 12

Análisis de la estabilidad física de las composiciones de insulina

5 Las composiciones (1 ml) de los análogos de insulina de la invención, como se describió en el ejemplo 10, se transfirieron a frascos de 2 ml y se sellaron mediante el uso de tapas de engarce. Los frascos se incubaron a 30 °C acostados. Cada 2 días, un brazo robótico recogió el frasco y se tomó una fotografía de un frasco parado con la luz de fondo de 10 000 lux. Las imágenes resultantes se analizaron para detectar la presencia de partículas mediante el uso de un algoritmo de análisis de píxeles. El primer día en que se detectaron las partículas se muestra en la tabla más abajo.

Tabla 4. Estabilidad física y química de los análogos de insulina de la invención en composiciones clínicamente relevantes

Ejemplo núm.	Composición	Tiempo de retraso de estabilidad física (días)	Formación de HMWP (4 semanas a 37 °C)
1	A	>35	0,1
1	B	>35	0,2
1	C	>35	0,2
1	I	>35	0,1
1	L	ND	0,2
1	M	ND	0,4
1	D	>35	0,3
1	E	>35	0,8
1	F	>35	1,3
1	G	>35	1,9
1	H	30	1,6
1	O	>35	1,6
1	P	>35	3,8
1	Q	>35	8,6
1	B1	>35	0,1
1	B2	>35	0,8
1	B3	>35	0,6
1	B4	>35	0,1
2	A	>35	0,1
2	I	>36	0,1
2	B	>40	0,1
2	L	>40	0,1
2	M	>40	0,1
2	O	>36	0,7
2	P	>36	0,6
2	Q	>36	1,1
5	B	>35	0,4
6	B	>35	-0,1
6	G	15	2,1*
Comparador 1	B	12	1,9
Comparador 1	B4	2	1,7*
Comparador 1	G	2	3,5*
Comparador 1	H	4	3,2*
Comparador 2	A	>36	0,8
Comparador 2	J	24	2,4*
Comparador 2	K	13	3,9*

5	Comparador 2	K1	5	1,1*
	Comparador 3	A#	5,3	1,6*
	Comparador 3	B#	3,3	1,8*
	Comparador 3	A + Zn	>43	0,5
	Comparador 4	A	14	1,6*
	Comparador 4	B4	4	2,9*
10	#) concentración de fosfato 7 mM en lugar de 3 mM ND: No determinado *) El HMWP se determinó en sobrenadantes para muestras que contenían partículas; las partículas no se solubilizaron.			

15 En conclusión, los análogos de insulina de la invención tienen una mayor estabilidad física en las composiciones libres de Zn clínicamente relevantes, especialmente a una alta concentración de insulina.

Ejemplo 13

20 Análisis de la estabilidad química de las composiciones de insulina

Contenido de HMWP

25 Las proteínas de alto peso molecular (HMWP) se separaron de la forma monomérica de la insulina por cromatografía de exclusión por tamaño mediante el uso de una columna Waters de Insulina de HMWP (125 Å, 10 µm, WAT 201549, 7,8 x 300 mm) con un flujo de 0,5 ml/min de un eluyente que contenía isopropanol al 50 % (v/v), NaCl 600 mM, NaH₂PO₄ 20 mM y detección UV a 215 nm.

El volumen de inyección típico de una composición de insulina 600 µM fue de 5 µl.

30 Los resultados se muestran en la Tabla 4, anterior.

Ejemplo 14

35 Perfiles subcutáneos de PK/PD en cerdos LYD

Los análogos de insulina de la invención pueden evaluarse mediante administración subcutánea a cerdos, por ejemplo, mediante la comparación con insulina aspart en la composición clínica (FIASP®) o mediante la comparación con análogos de insulina similares de la técnica anterior de acuerdo con este protocolo. Los análogos pueden evaluarse para determinar los parámetros farmacocinéticos y/o farmacodinámicos.

Métodos generales usados

45 Durante la anestesia para la colocación de catéteres intravenosos permanentes, los cerdos se examinaron mediante ultrasonido con un escáner de ultrasonido Esaote modelo "MyLabFive" y una sonda lineal tipo "LA435 6-18 MHz".

En la mitad del cuello entre la oreja y la escápula, en el lado derecho e izquierdo, se identificó y se marcó con un tatuaje un área de 2 x 2 cm sin músculo subyacente y adecuada para inyección subcutánea.

50 Horario de alimentación

Los cerdos se mantuvieron en ayunas (sin desayuno) antes del experimento.

55 Los cerdos están en sus corrales habituales durante todo el experimento y no están anestesiados. Los cerdos se mantienen en ayunas hasta que se haya recolectado la muestra de sangre de 5 horas, pero con libre acceso al agua. Después de la muestra de sangre de 5 horas, los cerdos se alimentan con comida y manzanas.

Dosificación subcutánea

60 El Penfill se monta en un NovoPen Echo® con una aguja Novofine 30G de 8 mm, mediante el uso de un reductor de aguja con 5 mm de profundidad, se usa para cada cerdo. Cada cerdo se dosifica con 10 U=60 µL de composiciones que contienen el análogo de insulina a 600 nmol/ml.

65 El cerdo se dosifica lateralmente en el tejido celular subcutáneo en el lado derecho o izquierdo (opuesto al catéter) del cuello y la aguja se mantiene en el tejido celular subcutáneo durante un mínimo de 10 segundos después de la inyección para garantizar la deposición del compuesto.

Tratamiento de la hipoglucemia

Después de la dosificación subcutánea, la solución de glucosa debe estar lista para la inyección i.v. para prevenir la hipoglucemia, es decir, 4-5 jeringas (20 ml) son rellenas con glucosa estéril al 20 %, listas para usar. El diagnóstico de hipoglucemia se basa en los síntomas clínicos y las mediciones de glucosa en sangre en un glucómetro (Glucocard X-meter).

El tratamiento consiste en una inyección i.v. lenta de 50-100 ml de glucosa al 20 % (10-20 g de glucosa). La glucosa se administra en fracciones durante 5-10 minutos hasta que surta efecto.

Obtención de muestras de sangre

La permeabilidad de los catéteres yugulares se comprueba antes del experimento con NaCl al 0,9 % estéril sin adición de heparina a 10 UI/ml.

Antes y después de la dosificación, se tomarán muestras de sangre en el establo a partir de un catéter venoso central en los siguientes momentos:

Predosis (-15, -5), 3, 6, 9, 12, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 150, 180, 240, 300 min.

Las muestras se tomaron con un interruptor de flujo. Se extrajeron 4-5 ml de sangre residual y se desecharon antes de tomar la muestra.

Se recolectaron muestras de sangre de 0,8 ml en tubos recubiertos con EDTA para los análisis de glucosa e insulina.

Después de cada muestra de sangre, el catéter se enjuagó con 5 ml de NaCl estéril al 0,9 % sin la adición de heparina a 10 UI/ml.

El tubo se inclinó suavemente un mínimo de 10 veces para garantizar una mezcla suficiente de la sangre y el anticoagulante (EDTA) y después de un minuto se coloca en hielo húmedo. Los tubos se centrifugaron durante 10 min a 3000 rpm y 4 °C dentro de 1 hora después de la toma de muestra. Las muestras se almacenaron en hielo húmedo hasta el pipeteo.

Se exige una técnica aséptica para evitar el crecimiento bacteriano en el catéter con aumento del riesgo de coagulación.

Cierre de los catéteres después del experimento

Después de recolectar la última muestra en los días de la dosificación, se administra lentamente por vía i.v. un único tratamiento intravenoso con 1 ml de Pentrexyl® (1 g de ampicilina disuelta en 10 ml de NaCl al 0,9 %) por cada 10 kg a través del catéter usado para la toma de muestra de sangre. Después de este tratamiento, el catéter se enjuagó con 10 ml de NaCl al 0,9 %.

Los catéteres se cerraron con 0,5 ml de TauroLockHep500 que se inyecta a través de la membrana como un cierre para el catéter.

Análisis de muestras de sangre

Glucosa en plasma: se pipetea 10 µl de plasma en 500 µl de solución tampón para medir la concentración de glucosa en plasma en el autoanalizador BIOSEN.

Insulina en plasma: se pipetea 1 x 50 µl de plasma en tubos Micronic® de 0,65 ml (configuración ELISA/LOC/SPA) para su análisis.

El plasma se almacenó congelado a -20 °C.

Cálculos de PK: El área bajo la curva (AUC) hasta el infinito y las AUC parciales, AUC0-5, AUC0-10, AUC0-15, AUC0-20 y AUC0-30, se calcularon mediante análisis no compartimentales que aplican el método trapezoidal lineal logarítmico en Phoenix 64 (Certara, Estados Unidos). La relación entre un AUC parcial/AUCinf se usó como una medida de la velocidad de absorción basada en las propiedades iv similares de los análogos de insulina en cerdos LYD.

La Figura 1 y la Figura 2 muestran que los análogos de la invención son más adecuados para usar en bombas de insulina que FIASP® ya que su inicio de acción es más rápido en comparación con FIASP®; los niveles mínimos de glucosa para los análogos de insulina de la invención son menores en comparación con FIASP®. Además, la

compensación de la acción es más rápida para los análogos de insulina de la invención en comparación con FIASP®. La compensación de la acción más rápida es beneficiosa para las bombas de insulina.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un análogo de insulina, en donde el análogo comprende A9E o A9D y comprende, además, B3E y/o desB30 con relación a la insulina humana.
2. El análogo de insulina de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el análogo comprende, además, al menos uno de B26E, B27E y/o B28E.
3. El análogo de insulina de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el análogo comprende, adicionalmente, la sustitución A21A.
4. El análogo de insulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el análogo es
 - A9D, B3E;
 - A9E, B3E;
 - A9D, desB30;
 - A9E, desB30;
 - A9D, B3E, desB30;
 - A9E, B3E, desB30;
 - A9D, B3E, B26E;
 - A9E, B3E, B26E;
 - A9D, B26E, desB30;
 - A9E, B26E, desB30;
 - A9D, B3E, B26E, desB30;
 - A9E, B3E, B26E, desB30;
 - A9D, A21A, B3E, B26E;
 - A9E, A21A, B3E, B26E;
 - A9D, A21A, B26E, desB30;
 - A9E, A21A, B26E, desB30;
 - A9D, A21A, B3E, B26E, desB30;
 - A9E, A21A, B3E, B26E, desB30;
 - A9D, B3E, B27E;
 - A9E, B3E, B27E;
 - A9D, B27E, desB30;
 - A9E, B27E, desB30;
 - A9D, B3E, B27E, desB30;
 - A9E, B3E, B27E, desB30;
 - A9D, A21A, B3E, B27E;
 - A9E, A21A, B3E, B27E;
 - A9D, A21A, B27E, desB30;
 - A9E, A21A, B27E, desB30;
 - A9D, A21A, B3E, B27E, desB30;
 - A9E, A21A, B3E, B27E, desB30;
 - A9D, B3E, B28E;
 - A9E, B3E, B28E;
 - A9D, B28E, desB30;
 - A9E, B28E, desB30;
 - A9D, B3E, B28E, desB30;
 - A9E, B3E, B28E, desB30;
 - A9D, A21A, B3E, B28E;
 - A9E, A21A, B3E, B28E;
 - A9D, A21A, B28E, desB30;
 - A9E, A21A, B28E, desB30;
 - A9D, A21A, B3E, B28E, desB30;
 - A9E, A21A, B3E, B28E, desB30;
 - A9D, B3E, B26E, B27E;
 - A9E, B3E, B26E, B27E;
 - A9D, B26E, B27E, desB30;
 - A9E, B26E, B27E, desB30;
 - A9D, B3E, B26E, B27E, desB30;
 - A9E, B3E, B26E, B27E, desB30;
 - A9D, A21A, B3E, B26E, B27E;
 - A9E, A21A, B3E, B26E, B27E;
 - A9D, A21A, B26E, B27E, desB30;
 - A9E, A21A, B26E, B27E, desB30;
 - A9D, A21A, B3E, B26E, B27E, desB30;

- 5 A9E, A21A, B3E, B26E, B27E, desB30;
 A9D, B3E, B27E, B28E;
 A9E, B3E, B27E, B28E;
 A9D, B27E, B28E, desB30;
 A9E, B27E, B28E, desB30;
 A9D, B3E, B27E, B28E, desB30;
 A9E, B3E, B27E, B28E, desB30;
 A9D, A21A, B3E, B27E, B28E;
 A9E, A21A, B3E, B27E, B28E;
 10 A9D, A21A, B27E, B28E, desB30;
 A9E, A21A, B27E, B28E, desB30;
 A9D, A21A, B3E, B27E, B28E, desB30;
 A9E, A21A, B3E, B27E, B28E, desB30;
 A9D, B3E, B26E, B28E;
 15 A9E, B3E, B26E, B28E;
 A9D, B26E, B28E, desB30;
 A9E, B26E, B28E, desB30;
 A9D, B3E, B26E, B28E, desB30;
 A9E, B3E, B26E, B28E, desB30;
 20 A9D, A21A, B3E, B26E, B28E;
 A9E, A21A, B3E, B26E, B28E;
 A9D, A21A, B26E, B28E, desB30;
 A9E, A21A, B26E, B28E, desB30;
 A9D, A21A, B3E, B26E, B28E, desB30;
 25 A9E, A21A, B3E, B26E, B28E, desB30;
 A9D, B3E, B26E, B27E, B28E;
 A9E, B3E, B26E, B27E, B28E;
 A9D, B26E, B27E, B28E, desB30;
 A9E, B26E, B27E, B28E, desB30;
 30 A9D, B3E, B26E, B27E, B28E, desB30;
 A9E, B3E, B26E, B27E, B28E, desB30;
 A9D, A21A, B3E, B26E, B27E, B28E;
 A9E, A21A, B3E, B26E, B27E, B28E;
 A9D, A21A, B26E, B27E, B28E, desB30;
 35 A9E, A21A, B26E, B27E, B28E, desB30;
 A9D, A21A, B3E, B26E, B27E, B28E, desB30; o
 A9E, A21A, B3E, B26E, B27E, B28E, desB30.
- 40 5. El análogo de insulina de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el análogo es
- 45 A9E, B3E, B26E;
 A9E, B3E, B27E, B28E;
 A9E, B3E, B26E, desB30;
 A9E, B3E, B27E, B28E, desB30;
 A9D, B3E, B26E, desB30; o
 A9E, A21A, B3E, B26E, desB30.
6. El análogo de insulina de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el análogo es A9E, B3E, B26E, desB30.
- 50 7. El análogo de insulina de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el análogo es A9E, B3E, B27E, B28E, desB30.
- 55 8. Una composición farmacéutica que comprende un análogo de insulina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
9. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el análogo de insulina está en una concentración de 0,6 mM a 3 mM.
- 60 10. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en donde la composición está libre de zinc.
11. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, que comprende un compuesto nicotínico y en particular nicotinamida.
- 65 12. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde la composición está libre de un compuesto nicotínico y, en particular, nicotinamida.

	13.	El análogo de insulina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el análogo de insulina es monomérico en una composición farmacéutica libre de zinc.
5	14.	El análogo de insulina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el análogo de insulina es química y/o físicamente estable en una composición farmacéutica libre de zinc.
10	15.	El análogo de insulina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, o una sal farmacéuticamente aceptable de este o la composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-12, para usar como un medicamento.
15		
20		
25		
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		

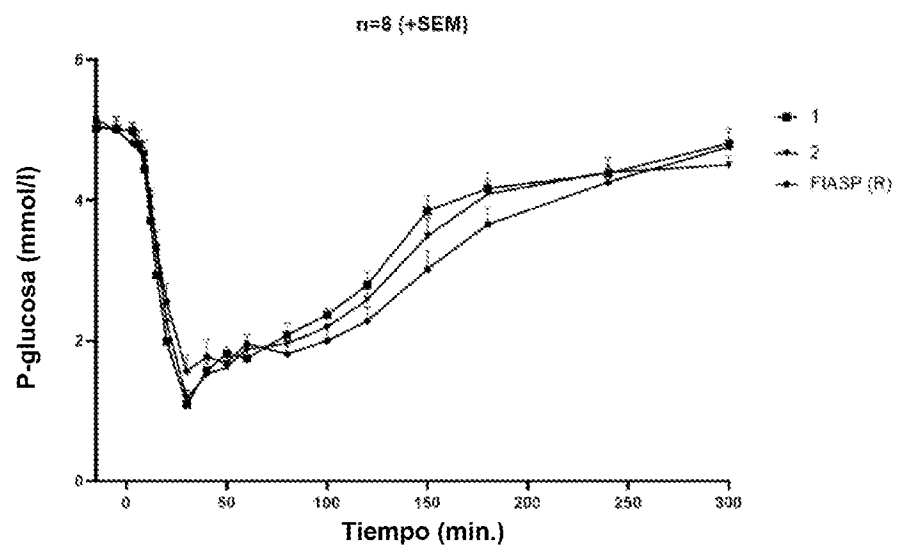


Figura 1

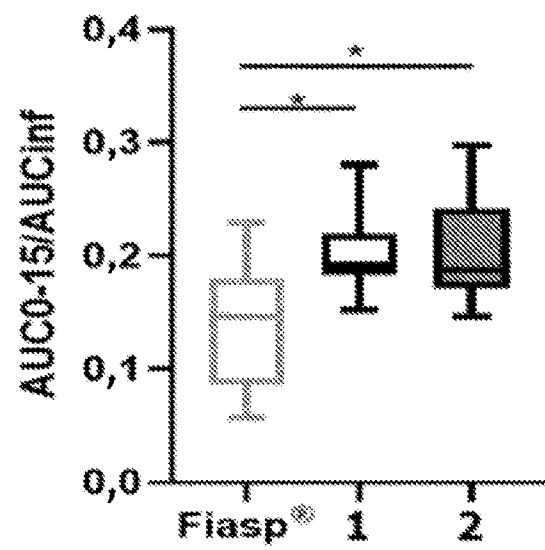


Figura 2