



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 287 930**

51 Int. Cl.:
A61K 38/28 (2006.01)
A61K 38/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **94923788 .7**
86 Fecha de presentación : **15.08.1994**
87 Número de publicación de la solicitud: **0725648**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **14.08.1996**

54 Título: **Compuestos farmacéuticos activos hepatoselectivos.**

30 Prioridad: **13.08.1993 GB 9316895**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2007

73 Titular/es: **BTG INTERNATIONAL LIMITED**
10 Fleet Place, Limeburner Lane
London EC4M 7SB, GB

72 Inventor/es: **Jones, Richard, Henry;**
Shojaee-Moradi, Fariba;
Sonksen, Peter, Henri;
Brandenburg, Dietrich;
Schuttler, Achim y
Eckey, Heike

74 Agente: **Polo Flores, Carlos**

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

Compuestos farmacéuticos activos hepatoselectivos.

5 La presente invención se refiere a nuevos compuestos farmacéuticos activos hepatoselectivos. En particular, se refiere a nuevos análogos de la insulina hepatoselectivos adecuados para su uso en un tratamiento mejorado de la diabetes mellitus.

10 Cuando se administran fármacos y otros compuestos farmacéuticos activos al cuerpo humano o animal se puede requerir que el compuesto activo tenga que estar presente principalmente en el hígado o actuar principalmente sobre los tejidos del hígado. Esto es, es necesario que el compuesto activo sea hepatoselectivo. La consecución de la hepatoselectividad puede ser difícil, en particular cuando el compuesto activo se administra mediante inyección en la piel. Un caso en el que la consecución de la hepatoselectividad sería especialmente deseable es la administración de insulina.

15 La hormona insulina, segregada por el páncreas, desempeña diversos papeles importantes en el metabolismo de la glucosa. En el hígado, después de unirse a los receptores de la superficie celular, la insulina promueve la conversión de glucosa en glucógeno (glucogénesis), promueve la síntesis de proteínas e inhibe la lisis de las grasas. La deficiencia en insulina da como resultado la lisis del glucógeno (glucogenolisis), de proteínas y la conversión de los productos de la lisis de las grasas y las proteínas en glucosa (gluconeogénesis) dando lugar a un nivel de glucosa en plasma incrementado (hiperglucemia). En sujetos que producen cantidades adecuadas de insulina el nivel de glucosa en sangre permanece dentro de un cierto intervalo. Cualquier exceso de glucosa se almacena en el hígado y los músculos en forma de glucógeno.

25 La insulina también actúa sobre los receptores de la membrana celular en otros tejidos para potenciar la entrada de glucosa en las células, disminuyendo así la concentración de glucosa en plasma.

Así, la insulina actúa para reducir el nivel de glucosa en plasma reduciendo la producción de glucosa en el hígado e incrementando la captación y el metabolismo de la glucosa en el hígado e incrementando la captación y el metabolismo de la glucosa en tejidos periféricos.

30 La deficiencia de insulina debido a una enfermedad de los islotes de Langerhans y/o la deficiencia de la acción de la insulina da como resultado la diabetes mellitus, una dolencia en la que la concentración de glucosa en sangre es elevada.

35 En sujetos que no son diabéticos la insulina se produce en el páncreas y se transporta directamente a la circulación hepática y de allí se transporta al hígado antes que a cualquier otro órgano o región del cuerpo. Así, el hígado experimenta una exposición muy elevada a la insulina producida. Normalmente al menos el 50% de la insulina producida está unida a receptores en el hígado, y de ahí actúa en el hígado. La insulina unida a receptores en el hígado se retira de la circulación y se degrada en las células hepáticas. La insulina que no está unida al hígado y pasa a la circulación periférica por tanto está en una concentración mucho más pequeña. Así, los tejidos periféricos (por ejemplo, grasa y músculo) que también son dianas de la insulina experimentan una menor exposición a la insulina segregada.

45 En sujetos diabéticos el tratamiento a menudo se lleva a cabo mediante terapia de sustitución de insulina. En general, una preparación de insulina se inyecta subcutáneamente. El régimen de insulina subcutánea más habitual supone dos inyecciones diarias de mezclas de preparaciones de insulina de actuación rápida y a medio plazo. La insulina se absorbe desde el subcutis a la circulación periférica y desde allí al resto del cuerpo, incluyendo el hígado. Con ese sistema el hígado y los tejidos periféricos tienden a experimentar una exposición aproximadamente igual a la insulina.

50 Hay diversas desventajas y efectos secundarios negativos con el uso de este sistema.

Primero, si se inyecta insulina suficiente para permitir que esté presente una concentración suficientemente elevada en la circulación hepática entonces estará presente una concentración demasiado elevada en la circulación periférica. De manera similar, si está presente una concentración adecuada en la circulación periférica, la concentración de insulina en la circulación hepática será inadecuada.

Se cree que existe un peligro de enfermedades cardiovasculares asociado a concentraciones elevadas de insulina en la circulación periférica (hiperinsulinemia).

60 Segundo, existe un riesgo grave de hipoglucemia en sujetos diabéticos que reciben terapia de sustitución de insulina por inyección subcutánea. Una concentración de insulina en la circulación periférica que sea demasiado elevada puede dar lugar a un nivel de azúcar en sangre que es demasiado bajo y el posterior colapso.

65 Por tanto sería deseable ser capaces de dirigir una gran concentración de insulina directamente a los receptores de insulina hepáticos con una menor concentración de insulina dirigida a los receptores de insulina periféricos. También sería deseable conseguir tal hepatoselectividad para otras moléculas activas.

Se han llevado a cabo algunos intentos para obtener la hepatoselectividad deseada de la insulina. La inyección intravenosa directamente en la circulación portal hepática podría permitir a la insulina inyectada pasar directamente al hígado antes de alcanzar la circulación periférica. Tal sistema es inadecuado para su uso general debido a la dificultad y la naturaleza complicada de su operación; en particular no es adecuado para el uso por los propios pacientes diabéticos excepto en circunstancias excepcionales.

Se ha llevado a cabo un intento de fabricar insulina hepatoselectiva inyectándola subcutáneamente mientras está encapsulada en vesículas de lípidos. (Spangler, Ronald S., "Selective Insulinisation of Liver in Conscious Diabetic Dogs", Am. J. Physiol. 249 (Endocrinol. Metab. 12): E152-E159, 1985). La insulina encapsulada en vesículas de lípidos (denominada insulina encapsulada en vesículas, IEV) se dirigió a los hepatocitos por medio de un resto digalactosil diglicérido incorporado en el exterior de las vesículas de lípidos. Usando esta aproximación fue posible alterar la distribución de una carga de glucosa administrada para favorecer la deposición hepática.

Los autores de la presente invención han encontrado (British Diabetic Association Medical and Scientific section Conference, Manchester, 13-15 Abril de 1989) que dímeros covalentes de insulina (peso molecular $\pm$ 12.000 Daltons en lugar de los $\pm$ 6000 para el monómero de insulina) tienen un mayor efecto sobre la producción de glucosa hepática que sobre la captación y utilización periféricas. Esto es, los dímeros de insulina covalentes parecen actuar preferentemente sobre los hepatocitos que sobre las células de los tejidos periféricos. También se ha encontrado que la proinsulina muestra esta hepatoselectividad en un menor grado. La proinsulina es el zimógeno que se escinde para formar la hormona insulina activa. La molécula de proinsulina es mayor que la molécula de insulina activa.

Las células de los tejidos periféricos, por ejemplo, la grasa y el músculo, están separadas de los vasos sanguíneos por el endotelio capilar. No obstante, en el hígado no existe tal barrera entre los vasos sanguíneos y los hepatocitos.

Se piensa que el transporte a través del endotelio capilar es principalmente mediante difusión, es decir, el transporte activo de la insulina a través del endotelio capilar no se produce en un grado importante. Por tanto, los autores de la presente invención creen que la absorción de insulina en los tejidos periféricos está determinada por factores influyentes en el transporte difusivo, en particular, por impedimentos estéricos o el tamaño de las moléculas. Se cree que esto es una razón para la hepatoselectividad relativa de dímeros de insulina covalentes y proinsulina cuando se compara con monómeros de insulina; ambos tienen un acceso libre a los hepatocitos pero el dímero de insulina covalente más grande o la proinsulina se absorbe en los tejidos periféricos desde el torrente sanguíneo más lentamente que el monómero de insulina. Así, las moléculas más grandes permanecen más tiempo en el torrente sanguíneo antes de ser absorbidas en los tejidos periféricos y así es más probable que alcancen el hígado, donde pueden ser activas más fácilmente.

Las insulinas aciladas se describen en el documento JP-A-01-254699. Los compuestos reducen el nivel de azúcar en sangre.

Según la presente invención se proporciona un análogo de una insulina caracterizado porque el análogo comprende una insulina covalentemente unida a un grupo molecular lateral, siendo dicho grupo molecular lateral una hormona tiroidea o un grupo IGF-1. El grupo molecular lateral tiene afinidad por una o más proteínas de unión presentes en el plasma sanguíneo.

Como resultado de la administración de la composición al cuerpo humano o animal, está presente un complejo activo teniendo un peso molecular de 25.000 Daltons o superior en el sistema circulatorio humano o animal.

La invención es de particular utilidad cuando el análogo es un análogo de insulina que comprende una insulina o uno de sus equivalentes funcionales covalentemente unido a un grupo molecular lateral, de manera que como resultado de la administración de la composición al cuerpo humano o animal está presente un complejo de insulina teniendo un peso molecular de 25.000 Daltons o superior en el sistema circulatorio humano o animal.

Así, cuando el análogo se introduce en el torrente sanguíneo la una o más proteínas de unión se unirán de manera no covalente al grupo molecular adicional, formando un complejo que tiene un peso molecular de 25.000 Daltons o superior.

Tal análogo de la insulina se puede inyectar subcutáneamente y absorberse al torrente sanguíneo a través del endotelio capilar sin dificultad. Cuando está en el torrente sanguíneo el análogo de la insulina se pondrá en contacto con la proteína de unión por la cual el grupo molecular lateral unido covalentemente tiene afinidad. Así, al menos algunas moléculas del análogo de la insulina se unirán a dicha proteína de unión, formando un complejo de insulina. Las proteínas de unión tienden a ser moléculas voluminosas de elevado peso molecular. Por tanto tienden a no difundir fácilmente hacia fuera a través del endotelio capilar y permanecen en el torrente sanguíneo. Así, el tamaño efectivo de la molécula y por tanto el peso molecular del análogo de la insulina unido se incrementa dramáticamente. La absorción desde los vasos sanguíneos a los tejidos periféricos, por ejemplo la grasa y el músculo, a través del endotelio capilar ahora está enormemente inhibida debido a la unión del análogo de la insulina a la proteína de unión de elevado peso molecular. No obstante, en el hígado no existe tal barrera y por tanto el análogo de la insulina, incluso con la proteína de unión asociada, puede tener acceso a los receptores de insulina del hepatocito esencialmente en el mismo grado que tendría la insulina convencional.

La unión del grupo molecular lateral y la proteína de unión no es covalente. Las fuerzas de unión pueden ser, por ejemplo, electrostáticas (por ejemplo, atracción de cargas opuestas, puentes de hidrógeno) o hidrófobas. Así, la unión no es permanente. El análogo de la insulina se puede absorber sobre los tejidos hepáticos en su forma unida. Las moléculas del análogo de la insulina que no se han unido mediante la proteína de unión o que se han unido y posteriormente se han liberado son capaces de pasar a través del endotelio capilar a los tejidos periféricos.

El grupo molecular unido covalentemente está unido de tal forma que el sitio (o sitios) activo de la insulina o su equivalente permanente disponible para llevar a cabo sus funciones prescritas.

La unión de un grupo molecular adecuado a la insulina o su equivalente se puede llevar a cabo mediante procedimientos químicos convencionales conocidos por aquellos expertos en la materia.

El análogo se puede usar en un procedimiento de terapia de sustitución de insulina que comprende la inyección subcutánea de una preparación que comprende el análogo de la insulina como se ha descrito anteriormente.

Las características preferidas de la primera forma de realización de la invención se describirán ahora en detalle.

La insulina o su equivalente funcional, cuando la insulina es el compuesto activo usado, puede ser cualquiera de las insulinas usadas convencionalmente en terapia de sustitución de insulina.

J. Brange y col. ("Monomeric Insulins and their Experimental and Clinical Implications", Diabetes Care, vol. 13, Nº 9, septiembre 1990) y otros han estudiado la posibilidad de desarrollar insulinas con tendencias reducidas a la auto-asociación. Estas insulinas se absorben desde el subcutis al torrente sanguíneo más rápidamente que la forma en la cual la insulina se encuentra normalmente en formulaciones farmacéuticas. La insulina adopta un estado asociado en una formulación farmacéutica. Seis monómeros de insulina se asocian para formar hexámeros. La asociación es no covalente. Con el uso de la tecnología del ADN, J. Brange y col. y otros han preparado insulinas que permanecen diméricas o incluso monoméricas a una concentración (farmacéutica) elevada mediante la introducción de una o unas pocas sustituciones de aminoácidos en la insulina humana. Se prefieren insulinas con una capacidad de asociación reducida como se ha descrito por J. Brange y col. y otros para su uso como equivalente de la insulina al cual se une el grupo molecular adicional. Cuando el compuesto farmacéutico activo es un equivalente de la insulina, se prefieren tales insulinas debido a que su reducida tendencia a la auto-asociación significa que se absorben más rápidamente al torrente sanguíneo desde el subcutis de lo que lo hacen las insulinas convencionales que tienden a ser inyectadas en forma hexamérica.

También se han desarrollado insulinas de este tipo por Eli Lilly. Éstas se describen en Protein Engineering, Vol 5, 519-525 y 527-533 (1992) (ambas de D. N. Brems y col.). También se han descrito estudios de insulinas monoméricas con aminoácidos modificados en Diabetes 40 Suppl. 1 (1991), 423A (Howey y col.) y 464A (Shaw y col.).

El grupo molecular lateral covalentemente unido a la insulina tiene afinidad por una proteína de unión presente en el plasma sanguíneo y por sí mismo no actuará en el cuerpo para producir efectos perjudiciales. El grupo molecular es de un peso molecular similar a o inferior al de la insulina. El peso molecular total de la insulina o de su equivalente funcional y el grupo molecular adicional es inferior a 25.000, más preferentemente inferior a 20.000 ó 15.000, y puede ser inferior a 12.000. Esto es para que la unión del grupo molecular lateral a la insulina para formar el análogo no impida el paso por difusión del análogo inyectado desde el subcutis a través del endotelio capilar al torrente sanguíneo. El grupo molecular lateral es inocuo cuando se administra al cuerpo; esto se puede conseguir, por ejemplo, asegurando que la concentración del análogo de insulina en el torrente sanguíneo sea suficientemente elevada para permitir los efectos beneficiosos de la insulina u otra terapia a la que es sensible pero suficientemente baja para prevenir cualquier efecto que se pudiera deber al grupo molecular lateral al que es sensible, o asegurando que el análogo de la insulina no está presente en partes del cuerpo en las que el grupo molecular lateral podría ser activo, o volviendo inactivo el grupo molecular lateral mediante modificación estructural que no obstante preserva su capacidad para unirse a su proteína de unión.

El grupo molecular lateral puede ser un factor de crecimiento de tipo insulínico 1 (IGF1). Este polipéptido tiene afinidad por las proteínas de unión IGF1, que circulan naturalmente en el torrente sanguíneo humano.

El grupo molecular lateral puede ser un grupo tiroxilo nativo o modificado, derivado de la hormona tiroidea humana tiroxina 3,5,3',5'-L-tetrayodotironina (T4). Hay varias proteínas de unión presentes en el plasma sanguíneo humano que tienen afinidad por el grupo T4, por ejemplo, la globulina de unión a tiroxina (TBG), la prealbúmina de unión a tiroxina (TBPA) y la albúmina. Estas proteínas se conocen colectivamente como proteínas de unión a tiroxina (TBP).

El grupo molecular lateral con afinidad por una proteína de unión puede estar unido de manera covalente directamente a la insulina o su equivalente, como se ha explicado anteriormente en un lugar escogido de manera que el grupo molecular adicional no inhibe la acción de la insulina o su equivalente. La estructura de la insulina y las localizaciones de sus sitios activos son muy conocidas, por tanto cuando se usa insulina aquellos expertos en la materia serán capaces de establecer las posiciones apropiadas a las que unir dicho grupo molecular de manera que no interfiera de manera significativa con la acción de la insulina o su equivalente.

Alternativamente se puede usar una cadena molecular corta (o "brazo espaciador") para unir la insulina o equivalente de la insulina y dicho grupo molecular. El brazo espaciador está unido covalentemente tanto a la insulina o su equivalente como al grupo molecular lateral. Tal brazo espaciador asegura que la insulina o su equivalente y la proteína de unión están distanciados entre sí, previniendo así una interferencia sustancial con la actividad de la insulina por la proteína de unión de elevado peso molecular (normalmente voluminosa). El brazo espaciador normalmente es una cadena lineal, preferentemente de entre 3-10 átomos de carbono de longitud. Tal brazo espaciador puede ser, por ejemplo, un grupo aminohexanoilo (AH), que es una cadena de seis carbonos. Naturalmente se pueden usar otros grupos como brazo espaciador. Por ejemplo, se podrían usar aminoácidos solos o unidos en forma de secuencias peptídicas pequeñas.

Se debe asegurar que la proteína de unión que tiene afinidad por el grupo molecular lateral esté presente en el plasma sanguíneo en cantidades suficientemente grandes que la captura de la proteína de unión por el análogo de la insulina teniendo el grupo molecular covalentemente unido no agotará los niveles de proteína de unión en la sangre hasta un efecto perjudicial. Por ejemplo, el nivel de proteína de unión no se debe agotar de manera que esté disponible proteína de unión insuficiente para llevar a cabo su función habitual en el cuerpo, si la hubiese.

El análogo de insulina de la invención se puede producir mediante diversos procedimientos, por ejemplo: reacción química de la insulina o equivalente de la insulina u otro compuesto activo con una sustancia o sustancias que incluyen el grupo molecular lateral; síntesis de proteínas del conjugado completo; producción mediante un microorganismo manipulado genéticamente.

El análogo de insulina de la invención se puede usar en un procedimiento de terapia de sustitución de insulina.

Un análogo de la insulina según la invención o una mezcla de dos o más análogos de la insulina diferentes según la invención forman parte de una preparación de insulina. Esta preparación de insulina es adecuada para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal, preferentemente adecuado para inyección subcutánea, y puede comprender un tratamiento para la diabetes. Se pueden añadir principios adicionales que modifican la velocidad de absorción desde el depósito subcutáneo a la circulación. La preparación basada en insulina preferentemente es adecuada para la inyección subcutánea, en cuyo caso por tanto es adecuada para su uso en enfermos de diabetes por sí mismos.

La preparación de insulina puede comprender el análogo de insulina hepatoselectivo de la invención y una insulina no hepatoselectiva convencional. Tras la inyección subcutánea y el paso al torrente sanguíneo la insulina convencional actuará en los tejidos periféricos mientras que el conjugado de insulina de la invención proporciona una acción hepatoselectiva controlada.

En la invención, se puede administrar un análogo de la insulina con un grupo molecular lateral unido covalentemente con una proteína de unión ya unida de manera no covalente al grupo molecular lateral. Una composición que comprende tal análogo de la insulina será más adecuada para la administración intravenosa que para la administración subcutánea debido al peso molecular muy elevado del análogo de la insulina en la composición (comparado con el análogo de la insulina solo, que forma un complejo de insulina de peso molecular superior a 25.000 sólo después de su administración al sistema circulatorio). No obstante en algunos casos puede ser deseable proporcionar tal análogo de la insulina o análogo de otro compuesto activo para su uso en la fabricación de una composición adecuada para la administración intravenosa.

La invención también incluye preparaciones comprendiendo el nuevo análogo y un excipiente farmacéuticamente aceptable, y el uso de los nuevos análogos para la fabricación de preparaciones para su uso en un procedimiento de tratamiento de un humano o un animal.

Ejemplos

Los autores de la presente invención han abordado un estudio para explorar la posibilidad de que análogos de la insulina con un acceso restringido a los tejidos periféricos puedan presentar una hepatoselectividad relativa *in vivo*.

Se han diseñado y probado análogos de la insulina que incluyen un resto tiroxilo que se une a la proteína de unión a la hormona tiroidea (TBP). La N^{αB1}-tiroxil-insulina (T4-Ins) y la N^{αB1}-tiroxil-aminohexanoil-insulina (T4-AH-Ins) se sintetizaron usando procedimientos de síntesis química dados a continuación.

Preparación de tiroxil-insulinas

Abreviaturas:

Msc = metilsulfoniletiloxicarbonilo

Boc = *tert*-butiloxicarbonilo

DMF = dimetilformamida

ES 2 287 930 T3

DMSO = dimetilsulfóxido

Pf = punto de fusión

5 ONSu = éster N-oxisuccinimida

Ejemplo 1

B1-tiroxil-insulina (porcina) (T4-Ins)

10

Derivados de tiroxina protegidos:

Msc-L-tiroxina (I)

15 Se hicieron reaccionar 776 mg (1 mmol) de L-tiroxina en 2 ml de dimetilsulfóxido con 530 mg (2 mmol) de Msc-ONSu en presencia de 139 μ l (1 mmol) de trietilamina a temperatura ambiente durante 18 horas. Después de la concentración a vacío el residuo oleoso se recogió en acetato de etilo, la fase orgánica se lavó con agua, se secó sobre Na₂SO₄, y el disolvente se extrajo a vacío. El residuo sólido se cristalizó en hexano.

20 Rendimiento: 651 mg (70,2% del teórico),

pf: 200°C.

Éster de Msc-L-tiroxin-N-oxisuccinimida (II)

25

A una disolución enfriada (0°C) de 371 mg (0,4 mmol) de Msc-tiroxina y 40 mg (0,4 mmol) de N-hidroxisuccinimida en 1 ml de tetrahidrofurano se le añadió una disolución enfriada previamente de 82,5 mg de N,N'-diciclohexilcarbodiimida en 0,5 ml de tetrahidrofurano con agitación. Después de agitar adicionalmente durante 3 horas el precipitado se retiró por filtración, y el filtrado se concentró a vacío. La cristalización del residuo sólido en cloruro de metileno/éter de petróleo.

30

Rendimiento: 295 mg (71% en relación a I)

pf: 180°C.

35

B1-tiroxil-insulina (porcina) (III)

A una disolución de 100 mg (0,016 mmol aproximadamente) de A1,B29-Msc₂-insulina (preparada según Schüttler y Brandenburg, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1721 - 1725 (1979)) y 18 μ l (0,160 mmol) de N-metilmorfolina en 2 ml de DMSO se le añadió 116,4 ml (0,160 mmol) de II en 0,2 ml de DMSO. Después de agitar durante 6 h a temperatura ambiente el derivado de insulina se precipitó con éter/metanol (9:1, v/v), se aisló por centrifugación, se lavó tres veces con éter/metanol, y se secó a vacío.

40

Los grupos Msc se eliminaron por tratamiento con NaOH/dioxano/metanol a 0°C, y III se purificó por filtración en gel en una columna Sephadex G 50 fina como se ha descrito (Geiger y col., Chem. Ber. 108, 2758 - 2763 (1975)). La liofilización dio 78,4 mg de B1-tiroxil-insulina (75%, en relación a la Msc₂-insulina).

45

Ejemplo 2

B1-tiroxil-aminohexanoil-insulina (porcina) (IV) (T4-AH-Ins)

50

1. Se preparó ácido BOC- ϵ -aminohexanoico haciendo reaccionar 1,32 g (10 mmol) de ácido ϵ -aminohexanoico con 2,4 g (11 mmol) de di-*terc*-butildicarbonato en dioxano/agua a pH 9 y se obtuvo un rendimiento del 87% (2,2 g). Punto de fusión después de la recristalización en acetato de etilo: 75°C.

55

2. 22,8 mg (0,096 mmol) de ácido BOC-aminohexanoico se activó previamente con 13 mg de 1-hidroxibenzotriazol y 17,8 mg (0,09 mmol) de diciclohexilcarbodiimida en 0,7 ml de dimetilformamida durante 1 h a 0°C y 1 hora más a temperatura ambiente.

60

3. A continuación, se añadió una disolución de 100 mg (0,016 mmol aproximadamente) de A1,B29-Msc₂-insulina y 18 μ l (0,160 mmol) N-metilmorfolina en 1 ml de DMF. Después de agitar durante 70 minutos a temperatura ambiente las mezclas se filtraron, y el derivado de insulina se precipitó con etiléter/metanol (9:1, v/v), se aisló por centrifugación, se lavó tres veces con éter/metanol, y se secó a vacío.

65

4. El grupo protector Boc se escindió por tratamiento del producto con 3 ml de ácido trifluoroacético durante 1 hora a temperatura ambiente. La disolución se concentró a vacío, el derivado de la insulina se precipitó con éter, se aisló, se lavó con éter, y se secó.

ES 2 287 930 T3

Rendimiento: 77,8 mg de B1-aminohehexil-A1,B29-Msc₂-insulina.

5 5. 102 mg (0,016 mmol) de este derivado se disolvieron en 2 ml de dimetilformamida y 18 μ l (0,16 mmol) de N-metilmorfolina. Después de la adición de 116 mg (0,16 mmol) del éster de Msc-tiroxin-N-oxisuccinimida en 0,2 ml de dimetilformamida la mezcla se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. La insulina protegida se aisló por precipitación con metanol/éter y se aisló como se ha descrito anteriormente.

10 6. Los grupos Msc se retiraron por tratamiento con NaOH/dioxano/metanol a 0°C, y IV se purificó por filtración en gel en una columna Sephadex G 50 fina como se ha descrito (Geiger y col., op. cit.). La liofilización dio 39,1 mg de B1-tiroxil-aminohehexanoil-insulina (37%, en relación a la aminohehexil-Msc₂-insulina).

15 La T4-Ins, la T4-AH-Ins e insulina (Ins) se infundieron en cuatro perros beagle anestesiados con D-³H-3-glucosa para la medición de las velocidades de producción de glucosa (Ra) y la eliminación de glucosa (Rd). La euglucemia y la actividad específica de la glucosa se mantuvieron mediante la infusión variable de D-glucosa con D-³H-3-glucosa.

20 Con los tres materiales la Rd de la glucosa se incrementó y la Ra de la glucosa se redujo desde un nivel basal de $2,70 \pm 0,19 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, ($p < 0,05$). En cada experimento se calculó la actividad de tipo insulínica para Ra y Rd como el área entre los valores basales de cada una de estas variables y los subsiguientes valores representados gráficamente frente al tiempo (AUC). Para la Ins, T4-Ins y T4-AH-Ins, respectivamente, el AUC para los valores de Ra fueron de -431 ± 121 , -226 ± 154 y -357 ± 50 (media $\pm$ SEM, mg/kg), (sin diferencias significativas) y el AUC para los valores de Rd fueron de 1142 ± 160 , 629 ± 125 y 830 ± 178 mg/kg, ambos conjugados diferentes de la Ins, $p < 0,05$.

25 Estos resultados indican que los análogos de la insulina de la invención actúan en un mayor grado sobre los tejidos del hígado que sobre aquellos de las regiones periféricas del cuerpo, tales como la grasa y el músculo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un análogo de una insulina **caracterizado** porque el análogo comprende una insulina unida covalentemente a un grupo molecular lateral, siendo dicho grupo molecular lateral una hormona tiroidea o un grupo IGF 1.
2. Un análogo según la reivindicación 1 que tiene afinidad por las proteínas de unión a IGF, albúmina, prealbúmina de unión a tiroxina o globulina de unión a tiroxina.
- 10 3. Un análogo según la reivindicación 1 ó 2 en el que el grupo molecular lateral es un grupo tiroxilo.
4. Un análogo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el grupo molecular lateral está unido a la insulina por un espaciador molecular.
- 15 5. Un análogo según la reivindicación 4 en el que el espaciador molecular comprende una cadena lineal de 3-10 átomos de carbono.
6. Un análogo según la reivindicación 5 en el que el espaciador molecular es un grupo aminohexanoilo.
- 20 7. Una preparación adecuada para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal que comprende al menos un análogo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Una preparación según la reivindicación 7 que es adecuada para la inyección subcutánea.

25

30

35

40

45

50

55

60

65