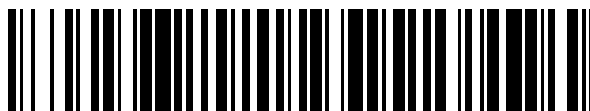


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 510**

51 Int. Cl.:

C07K 14/62 (2006.01)

A61K 38/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2006** **E 06707955 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2013** **EP 1846446**

54 Título: **Derivados de insulina**

30 Prioridad:

02.02.2005 DK 200500157

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

08.11.2013

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)

Novo Allé

2880 Bagsvaerd, DK

72 Inventor/es:

MADSEN, PETER;

TAGMOSE, TINA MØLLER;

KODRA, JÁNOS TIBOR;

GARIBAY, PATRICK WILLIAM;

HOEG-JENSEN, THOMAS y

JONASSEN, IB

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 428 510 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

Derivados de insulina

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a nuevos derivados de insulina humana que son solubles en valores de pH fisiológico y tienen un perfil de acción prolongado. La invención también se refiere a métodos para proveer tales derivados, en composiciones farmacéuticas que los contienen, para un método de tratamiento de la diabetes y la hiperglucemia usando los derivados de insulina de la invención y al uso de tales derivados de insulina en el tratamiento de la diabetes y la hiperglucemia.

Antecedentes de la invención

15 [0002] Actualmente, el tratamiento de la diabetes, tanto la diabetes de tipo 1 como la diabetes de tipo 2, se basa en medida creciente en el tratamiento denominado tratamiento intensivo de insulina. Según este tratamiento, los pacientes se tratan con varias inyecciones de insulina diarias que comprenden una o dos inyecciones diarias de insulina de acción prolongada para cubrir la necesidad de insulina basal complementada por inyecciones en bolo de una insulina de acción rápida para cubrir la necesidad insulina relacionada con las comidas.

20 [0003] Las composiciones de insulina de acción prolongada son bien conocidas en la técnica. De este modo, un tipo principal de composiciones de insulina de acción prolongada comprende suspensiones acuosas inyectables de cristales de insulina o de insulina amorfa. En estas composiciones, los compuestos de insulina utilizados típicamente son insulina de protamina, insulina de zinc o insulina cínica protamínica.

25 [0004] Algunos inconvenientes están asociados con el uso de suspensiones de insulina. De este modo, para garantizar una dosificación exacta, las partículas de insulina deben ser suspendidas de forma homogénea agitándolas ligeramente antes de extraer un volumen definido de dicha suspensión de un vial o antes de que el cartucho las expida. Además, para el almacenamiento de las suspensiones de insulina, la temperatura se debe mantener dentro de límites más estrechos que para las soluciones de insulina para evitar la formación de grumos o la coagulación.

30 [0005] Otro tipo de composiciones de insulina de acción prolongada son soluciones que tienen un valor de pH inferior al pH fisiológico a partir del cual la insulina se precipitará debido al aumento en el valor del pH cuando se inyecta la solución. Un inconveniente derivado de estas soluciones es que la distribución del tamaño de las partículas del precipitado formado en el tejido durante la inyección, y de este modo, el perfil de liberación de la medicación, depende del flujo sanguíneo en el sitio de inyección y de otros parámetros de manera bastante imprevisible. Otro inconveniente es que las partículas sólidas de la insulina pueden actuar como irritante local causando inflamación del tejido en el sitio sobre el que se administra la inyección.

35 [0006] La insulina humana presenta tres grupos amino primarios: el grupo N-terminal de la cadena A y de la cadena B y el grupo ϵ -amino de LysB29. A partir de la técnica anterior se conocen varios derivados de insulinas que se sustituyen en uno o más de estos grupos. De este modo, la patente estadounidense n.º 3.528.960 (Eli Lilly) se refiere a insulinas de N-carboxiaroil en las que uno, dos o tres grupos amino primarios de la molécula de insulina presentan un grupo carboxiaroil.

40 [0007] Según la patente GB n.º 1.492.997 (Nat. Res. Dev. Corp.), se ha descubierto que la insulina con una sustitución de carbamilo en N ϵ B29 tiene un perfil mejorado de efecto hipoglucémico.

45 [0008] La solicitud de patente pública JP n.º 1-254699 (Kodama Co., Ltd.) divulga una insulina donde un ácido graso está ligado al grupo amino de PheB1 o al grupo ϵ -amino de LysB29 o a ambos. El objetivo declarado de la derivación es obtener una preparación de insulina estable farmacológicamente aceptable.

50 [0009] Las insulinas que en la posición B30 tienen un aminoácido con al menos cinco átomos de carbono que no tienen que ser codificados necesariamente por un triplete de nucleótidos, se describen en la solicitud de patente pública JP n.º: 57-067548 (Shionogi). Se reivindica que los análogos de insulina son útiles en el tratamiento de la diabetes mellitus, particularmente en pacientes que son insulino-resistentes debido a la generación de anticuerpos de insulina bovina o porcina.

55 [0010] WO 95/07931 (Novo Nordisk A/S) divulga derivados de insulina humana en los que el grupo ϵ -amino de LysB29 tiene un sustituyente lipofílico. Estos derivados de insulina tienen un perfil de acción prolongada y son solubles en valores de pH fisiológico.

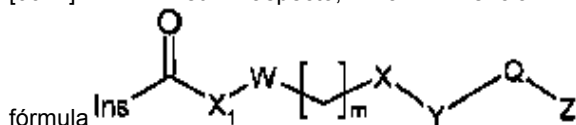
[0011] EP 894095 divulga derivados de insulina en los que el grupo N-terminal de la cadena B y/o el grupo ε-amino de Lys en la posición B28, B29 o B30 tiene un sustituyente de la fórmula -CO-W-COOH, donde W puede ser un grupo hidrocarburo de cadena larga. Estos derivados de insulina tienen un perfil de acción prolongada y son solubles en valores de pH fisiológico.

[0012] No obstante, sigue existiendo la necesidad de insulinas con un perfil de acción más prolongada que los derivados de insulina conocidos hasta hoy y que sean al mismo tiempo solubles en valores de pH fisiológico y presenten una potencia comparable a la de la insulina humana.

Resumen de la invención

[0013] La presente invención se basa en el reconocimiento de que la hidrofobicidad global de una molécula de derivado de insulina juega un papel importante para la potencia in vivo del derivado.

[0014] En su aspecto, la invención se refiere a derivados de insulina que tienen la



donde Ins es la fracción de insulina progenitora la cual por vía del grupo α-amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B o un grupo ε-amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la fracción de insulina se enlaza al grupo CO- en la cadena lateral por medio de un enlace amida;

X₁ es

, un enlace

W es un enlace;

m es 0;

X es

, un enlace;

Y es

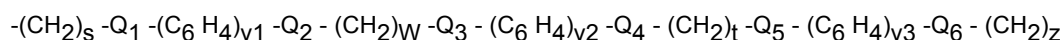
, -(CR₁ R₂)_q -NR-CO-, donde R₁ y R₂ independientemente uno del otro e independientemente para cada valor de q puede ser H, -COOH, un enlace u OH, q es 1-6; y R es hidrógeno o -(CH₂)_p -COOH; -(CH₂)_p -SO₃ H; -(CH₂)_p -PO₃ H₂; -(CH₂)_p -O- SO₃ H₂; -(CH₂)_p -O-PO₃ H₂; arileno sustituido con 1 o 2 grupos -(CH₂)_p -O-COOH; -(CH₂)_p -tetrazolil, donde p es un número entero en el intervalo de 1 a 6;

Q es

, -(CH₂)_r - donde r es un número entero de 4 a 22;

, una cadena de hidrocarburo bivalente que comprende 1, 2 o 3 grupos -CH=CH- y varios grupos -CH₂ - suficientes para proporcionar un número total de átomos de carbono en la cadena en el intervalo de 4 a 22, o

, una cadena de hidrocarburo bivalente de la fórmula



donde Q₁ - Q₆ independientemente uno de otro puede ser O; S o un enlace; donde s, w, t y z independientemente uno de otro son cero o un número entero de 1 a 10 de modo que la suma de s, w, t y z

está en el intervalo de 4 a 22 y v_1 , v_2 y v_3 independientemente uno de otro puede ser cero o 1, siempre que cuando

Y es un residuo de α -amino ácido con un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral, este residuo forma, con uno de sus grupos de ácido carboxílico, un grupo de amida con el grupo α -amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B o con el grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina progenitora; o

una cadena compuesta de dos, tres o cuatro residuos de α -aminoácido unidos entre sí por enlaces amida, cuya cadena —a través de un enlace amida— se une al grupo α -amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B o al grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina progenitora. Los residuos de aminoácidos de W son seleccionados en el grupo de residuos de aminoácidos con una cadena lateral neutra y residuos de aminoácidos con un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral de modo que W tiene al menos un residuo de aminoácido que tiene un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral; y

Z es -COOH; -CO-Asp; -CO-Glu; -CO-Gly; -CO-Sar; -CH(COOH)₂; -N(CH₂ COOH)₂; -SO₃ H; o -PO₃ H;

entonces Q no es una cadena de hidrocarburo bivalente de la fórmula -(CH₂)_{v4} C₆ H₄ (CH₂)_{w1} - donde v_4 y w_1 son números enteros o uno de estos es cero de modo que la suma de v_4 y w_1 está en el intervalo de 6 a 22; y

Z es:

-COOH;
-CO-Asp;
-CO-Glu;
-CO-Gly;
-CO-Sar;
-CH(COOH)₂;
-N(CH₂ COOH)₂;
-SO₃ H
-PO₃ H₂;
O-SO₃ H;
O-PO₃ H₂;
-tetrazolil o
-O-W₁,

donde W₁ es arileno o heteroarileno sustituido con un o dos grupos seleccionados de -COOH, -SO₃ H y -PO₃ H₂ y tetrazolilo;

a condición de que si W es un enlace y v_1 , v_2 y v_3 son todos cero y Q₁₋₆ son todos un enlace, entonces Z es W₁ y

cualquier complejo de Zn²⁺ del mismo y donde el derivado de insulina tiene un índice hidrofóbico (k_{rel}) que está en el intervalo de 0,02 a 10.

[0015] En un aspecto de la invención, el lado se fija al grupo α -amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B de la insulina progenitora.

[0016] En otro aspecto de la invención, la cadena lateral se fija al grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina progenitora. En otro aspecto, la cadena lateral se fija al grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la posición 28 o 29 de la cadena B.

[0017] En un aspecto Q es -(CH₂)_r - donde r es un número entero de 4 a 22,8 a 20,12 a 20,12-16,10- 16,10-20,14-18 o 14-16.

[0018] En otro aspecto Q es una cadena de hidrocarburo bivalente que comprende 1, 2 o 3 grupos CH=CH- y varios grupos -CH₂ - suficiente para proporcionar un número total de átomos de carbono en la cadena en el intervalo de 4 a 20,12- 16,10- 16,10-20,14-18 o 14-16.

[0019] El diácido graso típicamente comprende de 4 a 18, de 6 a 18, de 8 a 16, de 8 a 22, de 8 a 17, de 8 a 15, de 10 a 18, de 10 a 16 y de 6 a 17 átomos de carbono en la cadena de carbono.

[0020] Ejemplos no limitativos de la fracción de diácido graso son diácidos con la fórmula $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{r1}-\text{COOH}$, donde $r1$ es de 4 a 22

5 [0021] En un aspecto Q_1-Q_6 son todos un enlace y la suma de s, w, t y z es de 6 a 18.

[0022] En otro aspecto Q_1-Q_6 son todos un enlace, la suma de s y z es de 6 a 18 y w y t son cero.

[0023] En otro aspecto Q_1-Q_6 son todos un enlace, v_1 es cero, la suma de s y z es de 6 a 18, y w y t son cero.

10 [0024] En otro aspecto dos de Q_1-Q_6 son oxígeno y las otras Q 's son enlaces.

[0025] En un aspecto Q_1, Q_2, Q_5 y $-Q_6$ son todos un enlace, v_2 es 1 y v_1 y v_3 son cero.

15 [0026] En otro aspecto Q_1, Q_2, Q_5 y $-Q_6$ son todos un enlace, v_2 es 1 y v_1 y v_3 son cero y Q_3 y Q_4 son oxígeno.

[0027] En un aspecto R es hidrógeno.

Descripción detallada de la invención

20

[0028] El derivado de insulina de la invención tiene la fórmula:

$$\text{Ins}-\text{C}(=\text{O})-\text{X}_1-\text{W}-\left[\text{C}(\text{X})\text{C}(\text{Y})\right]_m-\text{Q}-\text{Z}$$

donde Ins es la fracción de insulina progenitora la cual por vía del grupo α -amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B o un grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la fracción de insulina se enlaza al grupo $\text{CO}-$ en la cadena lateral por medio de un enlace amida;

25

X_1 es

, un enlace

30

W es un enlace;

m es 0;

X es

35 • un enlace;

Y es

40

, $-(\text{CR}_1\text{R}_2)_q-\text{NR}-\text{CO}-$, donde R_1 y R_2 independientemente uno del otro e independientemente para cada valor de q puede ser H , $-\text{COOH}$, un enlace u OH , q es 1-6; y R es hidrógeno o $-(\text{CH}_2)_p-\text{COOH}$; $-(\text{CH}_2)_p-\text{SO}_3\text{H}$; $-(\text{CH}_2)_p-\text{PO}_3\text{H}_2$; $-(\text{CH}_2)_p-\text{O}-\text{SO}_3\text{H}_2$; $-(\text{CH}_2)_p-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$; arileno sustituido con 1 o 2 grupos $-(\text{CH}_2)_p-\text{O}-\text{COOH}$; $-(\text{CH}_2)_p$ -tetrazolil, donde p es un número entero en el intervalo de 1 a 6;

45

Q es

- $-(\text{CH}_2)_r-$ donde r es un número entero de 4 a 22;
- una cadena de hidrocarburo bivalente que comprende 1, 2 o 3 grupos $-\text{CH}=\text{CH}-$ y varios grupos $-\text{CH}_2-$ suficientes para proporcionar un número total de átomos de carbono en la cadena en el intervalo de 4 a 22, o
- una cadena de hidrocarburo bivalente de la fórmula

50

$-(\text{CH}_2)_s-Q_1-(\text{C}_6\text{H}_4)_{v1}-Q_2-(\text{CH}_2)_w-Q_3-(\text{C}_6\text{H}_4)_{v2}-Q_4-(\text{CH}_2)_t-Q_5-(\text{C}_6\text{H}_4)_{v3}-Q_6-(\text{CH}_2)_z$

-

donde $Q_1 - Q_6$ independientemente uno de otro puede ser O; S o un enlace; donde s, w, t y z independientemente uno de otro son cero o un número entero de 1 a 10 de modo que la suma de s, w, t y z está en el intervalo de 4 a 22 y v_1 , v_2 y v_3 independientemente uno de otro puede ser cero o 1,

5 siempre que cuando

Y es un residuo de α -amino ácido con un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral, este residuo forma, con uno de sus grupos de ácido carboxílico, un grupo de amida con el grupo α -amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B o con el grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina progenitora; o

10

una cadena compuesta por dos, tres o cuatro residuos de α -aminoácido unidos entre sí por enlaces amida; esta cadena -por un enlace amida- se une al grupo α -amino del residuo aminoácido N-terminal de la cadena B o al grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina progenitora. Los residuos de aminoácidos de W son seleccionados en grupo de residuos de aminoácidos con una cadena lateral neutra y residuos de aminoácidos con un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral de modo que W tiene al menos un residuo de aminoácido que tiene un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral; y

15

Z es -COOH; -CO-Asp; -CO-Glu; -CO-Gly; -CO-Sar; -CH(COOH)₂; -N(CH₂ COOH)₂; -SO₃ H; o -PO₃ H;

20

entonces Q no es una cadena de hidrocarburo bivalente de la fórmula -(CH₂)_{v4} C₆ H₄ (CH₂)_{w1} - donde v_4 y w_1 son números enteros o uno de estos es cero de modo que la suma de v_4 y w_1 está en el intervalo de 6 a 22; y

Z es:

25

-COOH;
-CO-Asp;
-CO-Glu;
-CO-Gly;
-CO-Sar;
-CH(COOH)₂;
-N(CH₂ COOH)₂;
-SO₃ H
-PO₃ H₂;
O-SO₃ H;
O-PO₃ H₂;
-tetrazolil o
-O-W₁,

30

35

40 donde W₁ es arileno o heteroarileno sustituido con un o dos grupos seleccionados de -COOH, -SO₃ H y -PO₃ H₂ y tetrazolilo;
a condición de que si W es un enlace y v_1 , v_2 y v_3 son todos cero y Q_{1-6} son todos un enlace, entonces Z es W₁ y cualquier complejo de Zn²⁺ del mismo y donde el derivado de insulina tiene un índice hidrofóbico (k'rel) que está en el intervalo de 0,02 a 10.

45

[0029] Los presentes derivados de insulina se caracterizan por el hecho de tener una cadena lateral fijada a un grupo Lys en la cadena B o la cadena A o al grupo amino N-terminal en la cadena B de la molécula de insulina progenitora cuya cadena lateral comprende un grupo aromático y una fracción de diácido graso.

50

[0030] El derivado de insulina según la invención es además caracterizado por el hecho de tener al menos un grupo de ácido carboxílico libre en la cadena lateral y puede comprender hasta 2 o tres grupos de ácido carboxílico libre o un grupo que está negativamente cargado a pH neutro.

[0031] Los derivados de insulina solo contienen un residuo de lisina. Este residuo de lisina puede estar en la posición B29 como en la insulina humana o en uno de posición B3; B30 o B23 a B28.

55

[0032] La fracción de insulina -en el presente texto también denominada la insulina progenitora- de una insulina derivada según a la invención puede ser una insulina de origen natural tal como insulina humana o insulina porcina. De forma alternativa, la insulina progenitora puede ser un análogo de insulina.

5 [0033] En un grupo de análogos de insulina progenitora, el residuo de aminoácido en la posición A21 es Asn.

[0034] En otro grupo de análogos de insulina progenitora, el residuo de aminoácido en la posición A21 es Gly. Ejemplos específicos de este grupo de análogos son insulina humana Gly^{A21}, insulina humana GlyA21 des(B30); e insulina humana Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}.

10

[0035] En otro grupo de análogos de insulina progenitora, el residuo de aminoácido en la posición B1 ha sido eliminado. Un ejemplo específico de este grupo de análogos de insulina progenitora es insulina humana desB1.

15

[0036] En otro grupo de análogos de insulina progenitora, el residuo de aminoácido en la posición B30 ha sido eliminado. Un ejemplo específico de este grupo de análogos de insulina progenitora es insulina humana desB30.

[0037] En otro grupo de análogos de insulina progenitora, el residuo de aminoácido en la posición B28 es Asp. Un ejemplo específico de este grupo de análogos de insulina progenitora es insulina humana Asp^{B28}.

20

[0038] En otro grupo de análogos de insulina progenitora, el residuo de aminoácido en la posición B28 es Lys y el residuo de aminoácido en la posición B29 es Pro. Un ejemplo específico de este grupo de análogos de insulina progenitora es insulina humana Lys^{B28}Pro^{B29}.

25

[0039] En otro grupo de análogos de insulina progenitora el residuo de aminoácido en la posición B30 es Lys y el residuo de aminoácido en la posición B29 es cualquier aminoácido codificable excepto Cys, Met, Arg y Lys. Un ejemplo es un análogo de insulina donde el residuo de aminoácido en la posición B29 es Thr y el residuo de aminoácido en la posición B30 es Lys. Un ejemplo específico de este grupo de análogos de insulina progenitora es insulina humana Thr^{B29}Lys^{B30}.

30

[0040] En otro grupo de análogos de insulina progenitora, el residuo de aminoácido en la posición B3 es Lys y el residuo de aminoácido en la posición B29 es Glu. Un ejemplo específico de este grupo de análogos de insulina progenitora es insulina humana Lys^{B3}Glu^{B29}.

35

[0041] Derivados de insulina según la invención se pueden proporcionar en forma de compuestos esencialmente libres de zinc o en forma de complejos de zinc. Cuando se proveen complejos de zinc de un derivado de insulina según la invención, dos iones Zn²⁺, tres iones Zn²⁺ o cuatro iones Zn²⁺ se pueden unir a cada hexámero de insulina. Las soluciones de complejos de zinc de los derivados de insulina contendrán mezclas de estas especies.

40

[0042] En otro aspecto de la invención, se puede proveer una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de insulina según la invención junto con un portador farmacéuticamente aceptable para el tratamiento de la diabetes de tipo 1, la diabetes de tipo 2 y otros estados que causan hiperglucemia en pacientes que necesitan este tratamiento. Un derivado insulina humana según la invención se puede usar para la producción de una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento de diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 y otros estados que provocan hiperglucemia.

45

[0043] En otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica para tratar la diabetes de tipo 1, la diabetes de tipo 2 y otros estados que provocan hiperglucemia en un paciente que necesita este tratamiento, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de insulina según la invención en mezcla con una insulina o un análogo de insulina que tiene un inicio de acción rápido, junto con portadores y aditivos farmacéuticamente aceptables.

50

[0044] En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para tratar la diabetes de tipo 1, la diabetes de tipo 2 y otros estados que causan hiper glicemia en un paciente que requiere tal tratamiento, que comprende la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de insulina según la invención junto con un portador y aditivos farmacéuticamente aceptables.

55

[0045] En otro aspecto de la invención, se proporciona un método de tratamiento de la diabetes de tipo 1, la diabetes de tipo 2 y otros estados que causan hiperglucemia en un paciente que requiere tal tratamiento, que comprende la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de insulina según la invención en

mezcla con una insulina o un análogo de insulina que tiene un inicio de acción rápido, junto con un portador y aditivos farmacéuticos aceptables.

5 [0046] En otro aspecto de la invención, se proporciona un uso de un derivado de insulina según la invención para la producción de un medicamento para la reducción de la glucosa en sangre.

[0047] En otro aspecto de la invención, se proporciona un uso de un derivado de insulina según la invención para la producción de un medicamento para el tratamiento de la diabetes.

10 [0048] En otro aspecto, la presente invención se refiere a derivados de insulina que tienen una hidrofobicidad total que es esencialmente similar a la de insulina humana.

15 [0049] En un aspecto, los derivados de insulina de la presente invención tienen un índice hidrofóbico, k'_{rel} , que está en el intervalo de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 10, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5; de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 o de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2.

[0050] En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que incluye un derivado de insulina según la invención que es soluble a valores de pH fisiológico.

20 [0051] En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un derivado de insulina según la invención que es soluble a valores de pH en el intervalo de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 8.5.

[0052] En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica con un perfil de acción prolongada que comprende un derivado de insulina según la invención.

25 [0053] En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que es una solución que contiene de aproximadamente 120 nmol/ml a aproximadamente 2400 nmol/ml, de aproximadamente 400 nmol/ml a aproximadamente 2400 nmol/ml, de aproximadamente 400 nmol/ml a aproximadamente 1200 nmol/ml, de aproximadamente 600 nmol/ml a aproximadamente 2400 nmol/ml, o de aproximadamente 600 nmol/ml a aproximadamente 1200 nmol/ml de un derivado de insulina según la invención o de una mezcla del derivado de insulina según la invención con un análogo de insulina de acción rápida.

35 [0054] El producto de inicio para la acilación, la insulina progenitora o análogo de insulina o un precursor de la misma se puede producir por síntesis orgánica bien conocida o bien por producción recombinante bien conocida en microorganismos transformados adecuados. De esta manera, el producto de inicio de la insulina se puede producir por un método que comprende el cultivo de una célula huésped que contiene una secuencia de ADN que codifica el polipéptido y capaz de expresar el polipéptido en un medio nutritivo adecuado bajo condiciones que permiten la expresión del péptido, después de lo cual el péptido resultante es recuperado del cultivo. Como un ejemplo, la insulina humana desB(30) se puede producir a partir de un precursor de insulina humana B(1-29)-Ala-Ala-Lys- A(1-21) que se produce en levadura como se describe en la patente estadounidense No. 4916212. Este precursor de insulina después puede ser convertido en insulina humana desB30 por escisión de ALP de la cadena peptídica Ala-Ala-Lys para dar insulina humana desB30 que luego puede ser acilada para dar los presentes derivados de insulina.

45 [0055] El medio usado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para hacer crecer las células huéspedes, tal como medios mínimos o complejos que contienen suplementos apropiados. Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según recetas publicadas (p. ej. en catálogos de la Colección Americana de Cultivos Tipo). El péptido producido por las células puede luego ser recuperado del medio de cultivo por procedimientos convencionales, entre ellos, separación de las células huéspedes del medio por centrifugado o filtración, precipitación de los componentes proteínicos del sobrenadante o el filtrado mediante una sal, por ejemplo sulfato de amonio, purificación por una variedad de procedimientos cromatográficos, por ejemplo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad, o similar, dependiendo del tipo de péptido en cuestión.

50 [0056] La secuencia de ADN que codifica la insulina progenitora puede adecuadamente ser de origen genómico o ADNc, por ejemplo obtenida preparando una biblioteca genómica o de ADNc y seleccionando secuencias de ADN que codifican todo o parte del polipéptido por hibridación usando sondas de oligonucleótidos sintéticas conforme a técnicas estándar (véase, por ejemplo, Sambrook, J, Fritsch, EF and Maniatis, T, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989). La secuencia de ADN que codifica el polipéptido puede también ser preparada sintéticamente por métodos estándares establecidos, por ejemplo el método de fosfoamidita descrito por Beaucage y Caruthers, Tetrahedron Letters 22 (1981), 1859-1869, o el método descrito por Matthes et al., EMBO Journal 3 (1984), 801-805. La secuencia de ADN puede también ser preparada por reacción en cadena de polimerasa

usando cebadores específicos, por ejemplo como se describe en US 4.683.202 o Saiki et al., Science 239 (1988), 487-491.

[0057] La secuencia de ADN se puede insertar en cualquier vector que puede convenientemente ser sometido a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector frecuentemente dependerá de la célula huésped en la que debe ser introducido. Así, el vector puede ser un vector de replicación autónomo, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica con el (los) cromosoma(s) en que ha(n) sido integrado(s).

[0058] El vector es preferiblemente un vector de expresión en el que la secuencia de ADN que codifica el péptido está operativamente unido a segmentos adicionales requeridos para la transcripción del ADN, tal como un promotor. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestra actividad transcripcional en la célula huésped de elección y se puede derivar de genes que codifican proteínas bien homólogas o heterólogas a la célula huésped. Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción del ADN que codifica la insulina progenitora en una variedad de células huéspedes son bien conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, supra.

[0059] La secuencia de ADN que codifica la insulina progenitora puede también, de ser necesario, ser operativamente conectada a un terminador adecuado, señales de poliadenilación, secuencias potenciadoras transcripcionales y secuencias potenciadoras traduccionales. El vector recombinante de la invención puede comprender además una secuencia de ADN que permita que el vector se replique en la célula huésped en cuestión.

[0060] El vector puede también comprender un marcador seleccionable, por ejemplo, un gen cuyo producto complementa un defecto en la célula huésped o uno que confiere resistencia a un fármaco, por ejemplo, ampicilina, canamicina, tetraciclina, cloranfenicol, neomicina, higromicina o metotrexato.

[0061] Para dirigir un péptido de la presente invención en la vía secretora de las células huéspedes, una secuencia señal secretora (también conocida como una secuencia líder, secuencia prepro o secuencia pre) se puede proporcionar en el vector recombinante. La secuencia señal secretora se une a la secuencia de ADN que codifica el péptido en el marco de lectura correcto. Secuencias señal secretoras son comúnmente situadas en 5' a la secuencia de ADN que codifica el péptido. La secuencia señal secretora puede ser aquella normalmente asociada al péptido o puede ser de un gen que codifica otra proteína segregada.

Los procedimientos usados para enlazar las secuencias de ADN que codifican para la insulina progenitora, el promotor y opcionalmente el terminador y/o la secuencia señal secretora, respectivamente, y para insertarlas en vectores adecuados que contienen la información necesaria para la replicación son bien conocidas para expertos en la técnica (cf., por ejemplo, J. Fritsch, EF and Maniatis, T, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989).).

[0062] La célula huésped en la que la secuencia de ADN o el vector recombinante es introducido puede ser cualquier célula que es capaz de producir la insulina progenitora e incluye bacterias, levadura, hongos y células eucarióticas superiores. Ejemplos de células huéspedes adecuadas bien conocidas y usadas en la técnica son, sin limitación, *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, o BHK de mamífero o líneas celulares CHO.

[0063] La molécula de insulina progenitora es luego convertida en los derivados de insulina de la invención por introducción de la cadena lateral pertinente en la posición B1 o en la posición de Lys elegida en la cadena B. La cadena lateral se puede introducir por cualquier método conveniente y muchos métodos son descritos en la técnica anterior para acilación de un grupo amino. Más detalles aparecerán de los siguientes ejemplos.

Composiciones farmacéuticas

[0064] Las composiciones farmacéuticas que contienen un derivado de insulina según la presente invención se pueden administrar parenteralmente a pacientes que necesitan tal tratamiento. La administración parenteral se puede realizar por inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa mediante una jeringa, opcionalmente una jeringa tipo pluma. Alternativamente, la administración parenteral se puede realizar mediante una bomba de infusión. Otras opciones son la administración de la insulina por vía nasal o pulmonar, preferiblemente en composiciones, polvos o líquidos específicamente diseñados para este fin.

[0065] Composiciones inyectables de los derivados de insulina de la invención pueden ser preparadas usando las técnicas convencionales de la industria farmacéutica que implican disolver y mezclar los ingredientes según sea apropiado para dar el producto final deseado. Así, según un procedimiento, un derivado de insulina según la invención

es disuelto en una cantidad de agua que es un tanto inferior que el volumen final de la composición que debe prepararse. Un agente isotónico, un conservante y un tampón se añaden según sea necesario y el valor de pH de la solución es ajustado –de ser necesario- usando un ácido, por ejemplo, ácido clorhídrico, o una base, por ejemplo, hidróxido sódico acuoso según sea necesitado. Finalmente, el volumen de la solución se ajusta con agua para dar la concentración deseada de los ingredientes.

[0066] En otro aspecto de la invención, el tampón es seleccionado del grupo que consiste en acetato sódico, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrógeno fosfato de sodio, hidrógeno fosfato de disodio, fosfato sódico y tris (hidroximetil) -aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas de los mismos. Cada uno de estos tampones específicos constituye un aspecto alternativo de la invención.

[0067] En otro aspecto de la invención, la formulación además comprende un conservante aceptable farmacéuticamente que puede ser seleccionado del grupo que consiste en fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, metil p-hidroxibenzoato, propil p-hidroxibenzoato; 2-fenoxietanol, butil p-hidroxibenzoato, 2-feniletanol, alcohol bencílico, clorobutanol y tiomerosal, bronopol, ácido benzoico, imidurea, clorhexidina, deshidroacetato de sodio, clorocresol, etil p-hidroxibenzoato, cloruro de bencetonio, clorfenesina, (3p-clorofenoxipropano-1, 2-diol) o mezclas de los mismos. En otro aspecto de la invención el conservante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 20 mg/ml. En otro aspecto de la invención el conservante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml. En otro aspecto de la invención el conservante está presente en una concentración de 5 mg/ml a 10 mg/ml. En otro aspecto de la invención el conservante está presente en una concentración de 10 mg/ml a 20 mg/ml. Cada uno de estos conservantes específicos constituye un aspecto alternativo de la invención. El uso de un conservante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por el experto en la técnica. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19.^a edición, 1995.

[0068] En otro aspecto de la invención la formulación comprende además un agente isotónico que puede ser seleccionado del grupo que consiste en una sal (p. ej. cloruro sódico), un azúcar o alcohol de azúcar, un aminoácido (p. ej. glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (p. ej. glicerol (glicerina), 1, 2-propanodiol (propilenglicol), 1, 3-propanodiol, 1, 3-butanodiol) polietilenglicol (p. ej. PEG400), o mezclas de los mismos. Cualquier azúcar tal como mono-, di-, o polisacáridos, o glucanos hidrosolubles, entre ellos, por ejemplo fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, hidroxietil almidón y carboximetilcelulosa de sodio puede ser utilizado. En un aspecto el aditivo de azúcar es sacarosa. El alcohol de azúcar es definido como un hidrocarburo C4-C8 que tiene al menos un grupo OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabitól. En un aspecto el aditivo de alcohol de azúcar es manitol. Los azúcares o polialcoholes mencionados más arriba pueden ser utilizados individualmente o en combinación. No hay ningún límite fijo para la cantidad usada, puesto que el azúcar o alcohol de azúcar es soluble en la preparación líquida y no afecta contrariamente a los efectos estabilizantes conseguidos usando los métodos de la invención. En un aspecto, la concentración de azúcar o de alcohol de azúcar es entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml. En otro aspecto de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/ml a 50 mg/ml. En otro aspecto de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/ml a 7 mg/ml. En otro aspecto de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de 8 mg/ml a 24 mg/ml. En otro aspecto de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de 25 mg/ml a 50 mg/ml. Cada uno de estos agentes isotónicos específicos constituye un aspecto alternativo de la invención. El uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas es bien conocido por el experto en la técnica. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19.^a edición, 1995 .

[0069] Agentes isotónicos típicos son cloruro sódico, manitol, dimetil sulfona y glicerol y conservantes típicos son fenol, m-cresol, metil p-hidroxibenzoato y alcohol bencílico.

[0070] Ejemplos de tampones adecuados son acetato sódico, glicil-glicina, HEPES (ácido de 4-(2-hidroxietil) -1-piperazina etanosulfónico) y fosfato sódico.

[0071] Una composición para administración nasal de un derivado de insulina según la presente invención puede, por ejemplo, ser preparado como se describe en la patente europea n.º 272097 (a Novo Nordisk A/S).

[0072] Las composiciones que contienen las insulinas de esta invención se pueden usar para el tratamiento de estados sensibles a la insulina. De este modo, se pueden utilizar para el tratamiento de la diabetes de tipo 1, la diabetes de tipo 2 y la hiperglicemia, por ejemplo, como se ha visto a veces en personas gravemente heridas y en personas sometidas a una cirugía mayor. El nivel de dosis óptimo para cualquier paciente dependerá de una variedad de factores que incluyen: la eficacia del derivado de insulina específico empleado, la edad, el peso corporal, la actividad física y la dieta del paciente, una combinación posible con otros fármacos y la gravedad del estado a tratar. Se recomienda que la

dosificación diaria del derivado de insulina de esta invención sea determinada para cada paciente por expertos en la técnica de una manera similar a las composiciones de insulina conocidas.

[0073] En caso de ser conveniente, los derivados de insulina de esta invención se pueden utilizar en una mezcla con otros tipos de insulina, por ejemplo, análogos de insulina con un inicio de acción más rápido. Ejemplos de tales análogos de insulina se describen, por ejemplo, en las solicitudes de patentes europeas con los números de publicación EP 214826 (Novo Nordisk A/S), EP 375437 (Novo Nordisk A/S) y EP 383472 (Eli Lilly & Co.).

[0074] En otro aspecto de la presente invención los compuestos presentes se administran en combinación con una o más sustancias activas adicionales en cualquier proporción adecuada. Tales agentes activos adicionales se pueden seleccionar de agentes antidiabéticos, agentes antihiperlipidémicos, agentes antiobesidad, agentes antihipertensivos y agentes para el tratamiento de complicaciones resultantes de la diabetes o asociados con esta.

[0075] Entre los agentes antidiabéticos adecuados figuran insulina, GLP-1 (péptido 1 de tipo glucagón), derivados tales como los que se indican en WO 98/08871 (Novo Nordisk A/S), cuyo contenido se incorpora aquí a modo de referencia, así como agentes hipoglucémicos oralmente activos.

[0076] Los agentes hipoglucémicos adecuados oralmente activos incluyen preferentemente imidazolininas, sulfonilureas, biguanidas, meglitinidas, oxadiazolidinadionas, tiazolidinadionas, sensibilizadores de insulina, inhibidores de α -glucosidasa, agentes que actúan sobre el canal de potasio dependientes de ATP de las células β pancreáticas, por ejemplo, abridores del canal de potasio tales como los descritos en WO 97/26265, WO 99/03861 y WO 00/37474 (Novo Nordisk A/S), abridores del canal de potasio tales como ormitiglinida, bloqueantes del canal de potasio tales como nateglinida o BTS-67582, antagonistas de glucagón tales como los descritos en WO 99/01423 y WO 00/39088 (Novo Nordisk A/S y Agouron Pharmaceuticals, Inc), agonistas de GLP-1 tales como los descritos en WO 00/42026 (Novo Nordisk A/S y Agouron Pharmaceuticals, Inc), inhibidores de DPP-IV (dipeptil peptidasa-IV), inhibidores de PTPasa (proteína tirosina fosfatasa), inhibidores de enzimas hepáticas involucradas en la estimulación de gluconeogénesis y/o glicogenolisis, moduladores de la incorporación de glucosa, inhibidores de GSK-3 (glucógenosintasa quinasa-3), compuestos que modifican el metabolismo de lípidos tales como agentes antihiperlipidémicos y agentes antilipidémicos, compuestos que reducen la ingestión de alimentos y agonistas de PPAR (receptor de peroxisoma activado por proliferador) y RXR (receptor x retinoide) tales como ALRT-268, LG-1268 o LG-1069.

Definiciones

[0077] Con "**desB30**" o "**B(1-29)**" se entiende una cadena de insulina B natural o un análogo de la misma carente del residuo de aminoácido B30 y "**A(1-21)**" significa la cadena A de insulina natural. El péptido C y su secuencia de aminoácidos se indican en el código de aminoácido de tres letras. La insulina humana desB30, desB29 es una insulina humana que carece de B29 y B30.

[0078] Con, "**B1**", "**A1**" etc. se entiende el residuo de aminoácido en la posición 1 en la cadena B de insulina (contado desde el extremo N-terminal) y el residuo de aminoácido en la posición 1 en la cadena A de insulina (contado desde el extremo N-terminal), respectivamente. El residuo de aminoácido en una posición específica puede también ser denominado, por ejemplo, Phe^{B1} que significa que el residuo de aminoácido en la posición B1 es un residuo de fenilalanina.

[0079] Con "**insulina**", según se utiliza en este caso, se entiende insulina humana con puentes disulfuro entre Cys^{A7} y Cys^{B7} y entre Cys^{A20} y Cys^{B19} y un puente disulfuro interno entre Cys^{A6} y Cys^{A11}, insulina porcina e insulina bovina.

[0080] Por "**análogo de insulina**", según se utiliza en este caso, se propone un polipéptido que tiene una estructura molecular que puede derivarse formalmente de la estructura de una insulina de origen natural, por ejemplo aquella de la insulina humana, al suprimir y/o intercambiar por lo menos un residuo de aminoácido que se encuentra en la insulina de origen natural y/o agregar por lo menos un residuo de aminoácido. Los residuos de aminoácidos agregados y/o sustituidos pueden ser residuos de aminoácidos codificables u otros residuos de origen natural o residuos de aminoácidos puramente sintéticos.

[0081] Los análogos de insulina pueden ser tales que en la posición 28 de la cadena B se pueden modificar desde el residuo Pro natural hasta uno de Asp, Lys o Ile. Lys, en la posición B29, también se puede modificar a Pro. Además, B30 puede ser Lys en cuyo caso B29 es diferente de Cys, Met, Arg y Lys.

[0082] También, Asn en la posición A21 se puede cambiar a Ala, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, en particular a Gly, Ala, Ser o Thr y en particular a Gly. Además, Asn en la posición B3 se puede cambiar a Lys o Asp. Más ejemplos de análogos de insulina son análogos de insulina humana des(B30), análogos de insulina donde uno

o ambos de B1 y B2 han sido deleccionados; análogos de insulina donde la cadena A y/o la cadena B tienen una extensión N-terminal y análogos de insulina donde la cadena A y/o la cadena B tienen una extensión C-terminal. Además, análogos de insulina son aquellos en los cuales uno o más de B26-B30 han sido deleccionados.

5 [0083] Por "**derivado de insulina**", según se utiliza en este caso, se entiende una insulina de origen natural o un análogo de insulina que ha sido modificado químicamente, por ejemplo, por introducción de una cadena lateral en una o más posiciones de la estructura de insulina o por oxidación o reducción de los grupos de residuos de aminoácidos presentes en la insulina o por acilación de un grupo amino libre o grupo hidroxilo.

10 [0084] La expresión "**aminoácido codificable**" o "**residuo de aminoácido codificable**" se utiliza para indicar un aminoácido o un residuo de aminoácido que puede ser codificado por un triplete ("codón") de nucleótidos.

hGlu es ácido homoglutámico.

α -Asp es la forma L de $\text{-HNCH(CO-)}\text{CH}_2\text{COOH}$.

15 β -Asp es la forma L de $\text{-HNCH(COOH)}\text{CH}_2\text{CO-}$.

α -Glu es la forma L de $\text{-HNCH(CO-)}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$.

γ -Glu es la forma L de $\text{-HNCH(COOH)}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO-}$.

α -hGlu es la forma L de $\text{-HNCH(CO-)}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$.

δ -hGlu es la forma L de $\text{-HNCH(COOH)}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO-}$.

20 β -Ala es $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$.

Sar es sarcosina (N-metilglicina).

[0085] La expresión "**residuo de aminoácido con un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral**" designa residuos de aminoácidos tales como Asp, Glu y hGlu. Los aminoácidos pueden presentar una configuración L o D. Si no se especifica nada, se entiende que el residuo de aminoácido tiene la configuración L.

[0086] La expresión "**residuo de aminoácido con una cadena lateral neutra**" designa residuos de aminoácidos tales como Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro, Ser, Thr, Cys, Met, Tyr, Asn y Gln.

30 [0087] Con "**ácido activado**" se entiende un ácido carboxílico en el que un grupo de salida activado ha sido fijado al carbono de acilo permitiendo la reacción con un grupo amino bajo formación de un enlace amida y la liberación del grupo de salida. Ácidos grasos activados pueden ser ésteres activados de ácidos grasos, amidas activadas de ácidos grasos y anhídridos o cloruros. Ácidos grasos activados incluyen derivados de los mismos tales como N-hidroxibenzotriazola y N-hidroxisuccinimida.

35 [0088] Con "**ácido graso**" se entiende un ácido carboxílico lineal o ramificado que tiene al menos 2 átomos de carbono y que es saturado o insaturado. Ejemplos de ácidos grasos son ácido cáprico, ácido láurico, ácido tetradecanoico (ácido mirístico), ácido pentadecanoico, ácido palmítico, ácido heptadecanoico y ácido esteárico.

40 [0089] El término "arileno" como se utiliza en este caso tiene el objeto de incluir sistemas de anillos aromáticos, carbocíclicos, bivalentes, tales como sistemas de anillos aromáticos monocíclicos de 6 miembros y bi- y tricíclicos, bivalentes, carbocíclicos de 9 a 14 miembros. Ejemplos representativos son fenileno, bifenilileno, naftileno, antracenileno, fenantrenileno, fluorenileno, indenileno, azulenileno y similares. El arileno también incluye los derivados parcialmente hidrogenados de los sistemas de anillos enumerados más arriba. Ejemplos no limitativos de tales derivados parcialmente hidrogenados son 1,2,3,4-tetrahidronaftileno; 1,4-dihidronaftileno y similares.

[0090] El término "**heteroarileno**" como se utiliza en este caso se destina a incluir sistemas de anillos bivalentes, aromáticos, heterocíclicos que contienen uno o varios heteroátomos seleccionados de nitrógeno, oxígeno y azufre tales como sistemas de anillos aromáticos heterocíclicos monocíclicos de 5 a 7 miembros y bi- y tricíclicos de 8 a 14 miembros que contienen uno o varios heteroátomos seleccionados de nitrógeno, oxígeno y azufre. Ejemplos representativos son furileno, tienileno, pirrolileno, oxazolileno, tiazolileno, imidazolileno, isoxazolileno, isotiazolileno; 1,2,3-triazolileno; 1,2,4-triazolileno, piranileno, piridileno, piridazinileno, pirimidinileno, pirazinileno; 1,2,3-triazinileno; 1,2,4-triazinileno; 1,3,5-triazinileno; 1,2,3-oxadiazolileno; 1,2,4-oxadiazolileno; 1,2,5-oxadiazolileno; 1,3,4-oxadiazolileno; 1,2,3-tiadiazolileno; 1,2,4-tiadiazolileno; 1,2,5-tiadiazolileno; 1,3,4-tiadiazolileno, tetrazolileno, tiadiazinileno, indolileno, isoindolileno, benzofurileno, benzotienileno, indazolileno, bencimidazolileno, benzotiazolileno, bencisotiazolileno, benzoxazolileno, bencisoxazolileno, purinileno, quinoxalinileno, quinazolinileno, quinolicinileno, quinolinileno, isoquinolinileno, quinoxalinileno, naftiridinileno, pteridinileno, carbazolileno, azepinileno, diazepinileno, acridinileno y similares. El heteroarileno también tiene el objeto de incluir los derivados parcialmente hidrogenados de los sistemas de anillos enumerados más arriba. Ejemplos no limitativos de tales derivados parcialmente hidrogenados son 2,3-dihydrobenzofuranileno, pirrolinileno, pirazolinileno, indolinileno, oxazolidinileno, oxazolinileno, oxazepinileno y similares.

[0091] El término “**opcionalmente sustituido**” como se utiliza en este caso significa que los grupos en cuestión son insustituídos o sustituidos por uno o varios de los sustituyentes específicos. Cuando los grupos en cuestión son sustituidos por más de un sustituyente, los sustituyentes pueden ser iguales o diferentes.

[0092] Cuando un derivado de insulina de acuerdo con la invención se establece que es “**soluble en valores de pH fisiológico**” significa que el derivado de insulina se puede utilizar para preparar composiciones de insulina que se disuelven completamente en valores de pH fisiológico. Esta solubilidad favorable puede ser ya sea debido a las propiedades inherentes del derivado de insulina solo o un resultado de una interacción favorable entre el derivado de insulina y uno o más ingredientes contenidos en el vehículo.

[0093] Las siguientes abreviaturas y métodos se han utilizado en la especificación y los ejemplos:

Bzl = Bn: bencilo
 DIPEA=DIEA: N,N-diisopropiletilamina
 DMF: N,N-dimetilformamida
 tBu: tert-butilo
 TSTU: tetrafluoroborato de O- (N-succinimidil) -1, 1, 3, 3-tetrametiluronio
 THF: tetrahidrofurano
 EtOAc=AcOEt: acetato de etilo
 DIPEA: diisopropiletilamina
 HOAt: 1-Hidroxi-7-azabenzotriazol
 TEA: trietilamina
 Su: succinimidil= 2,5-dioxo-pirrolidina-1-il
 TFA: ácido trifluoroacético
 DCM: diclorometano
 DMSO: dimetilsulfóxido
 HOBt: 1-hidroxibenzotriazol
 TRIS: triisopropilsilano
 EDAC: hidrocloreuro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
 NMP: 1-metil-2-pirrolidona
 TLC: cromatografía en capa fina
 RT: temperatura ambiente
 R_t : tiempo de retención
 MeOH: metanol
 DCC: dicitclohexilcarbodiimida
 AcOH: ácido acético
 DIC: diisopropilcarbodiimida

Ejemplos

[0094] HPLC-MS: Se utilizó la siguiente instrumentación:

- Bomba Hewlett Packard serie 1100 G1312A Bin
- Compartimento para columnas Hewlett Packard serie 1100
- Detector de diodo array Hewlett Packard serie 1100 G13 15A DAD• Hewlett Packard serie 1100 MSD
- Detector de dispersión de la luz evaporable Sedex 55

El instrumento fue controlado por el software HP Chemstation.

La bomba HPLC fue conectada a dos depósitos de eluyente que contenían:

A: TFA al 0,01% en el agua
 B: TFA al 0,01% en acetonitrilo

[0095] El análisis fue realizado a 40° C inyectando un volumen apropiado de la muestra (preferiblemente 1 µl) sobre la columna, que fue eluida con un gradiente de acetonitrilo.

[0096] Las condiciones de HPLC, los ajustes del detector y los ajustes del espectrómetro de masas usados están proporcionados a continuación:

Columna: Waters Xterra MS C-18 X 3 mm id 5 µm
 Gradiente: 5% - 100% acetonitrilo lineal durante 7,5 min a 1,5 ml/min
 Detección: 210 nm (salida analógica de DAD)

ELS (salida analógica de ELS)

[0097] Después de DAD el flujo es dividido produciendo aproximadamente 1 ml/min al ELS y 0,5 ml/min al MS.

HPLC-MS (método grad. rápido): Se utilizó la siguiente instrumentación:

- Bomba Hewlett Packard serie 1100 G1312A Bin
- Compartimento para columnas Hewlett Packard serie 1100
- Detector de diodo array Hewlett Packard serie 1100 G13 15A DAD
- Hewlett Packard serie 1100 MSD
- Detector de dispersión de la luz evaporable Sedex 55

El instrumento fue controlado por el software HP Chemstation.

La bomba HPLC fue conectada a dos depósitos de eluyente que contenían:

- A: TFA al 0,05% en el agua
- B: TFA al 0,05% en acetonitrilo

[0098] El análisis fue realizado a 40° C inyectando un volumen apropiado de la muestra (preferiblemente 1 µl) sobre la columna, que fue eluida con un gradiente de acetonitrilo.

[0099] Las condiciones de HPLC, los ajustes del detector y los ajustes del espectrómetro de masas usados están proporcionados a continuación:

- Columna: Waters Xterra MS C-18 X 3 mm id 5 µm
- Gradiente: 5% - 95% acetonitrilo lineal durante 3 min a 2,7 ml/min
- Detección: 210 nm (salida analógica de DAD) ELS (salida analógica de ELS)

[0100] Después de DAD el flujo es dividido produciendo aproximadamente 1 ml/min al ELS y 0,5 ml/min al MS.

HPLC-MS (50-99)

Se utilizan los mismos instrumentos y el procedimiento que en el método de grad. rápido. La única diferencia es que el gradiente va de 50 a 99% de acetonitrilo.

HPLC (neutro)

- Tampón A: 10 mMtris, 15 mM (NH₄)₂ SO₄, pH ajustado a 7.3 con 4N H₂ SO₄, 20% v/v de acetonitrilo
- Tampón B: 80% v/v acetonitrilo
- Flujo: 1,5 ml/min
- Gradiente: 0-20 min 10-50% B
- Columna: PhenomereX, Jupiter 4,6 mm x 150 mm, C₄, 5 µ, 300 Å
- Temperatura de columna: 40 °C.

HPLC-MS (Sciex)

Se utilizó la siguiente instrumentación:

- Bomba Hewlett Packard serie 1100 G1312A Bin
- Detector de diodo array Hewlett Packard serie 1100 G1315A DAD
- Espectrómetro de masas cuádrupolo triple Sciex3000
- Microinyector Gilson 215
- Detector de dispersión de la luz evaporable Sedex 55

[0101] Las bombas y los detectores se controlan por el software MassChrom 1.1.1 ejecutado en un ordenador Macintosh G3. Gilson Unipoint Version 1.90 controla el autoinyector.

[0102] La bomba de HPLC es conectada a dos depósitos de eluyente que contienen:

- A: TFA al 0,01% en agua
- B: TFA al 0,01% en acetonitrilo

[0103] El análisis se realiza a temperatura ambiente por inyección de un volumen apropiado de la muestra (preferiblemente 10 µl) sobre la columna, que es eluida, con un gradiente de acetonitrilo. El eluato de la columna pasa a través del detector de UV para encontrar un separador de flujo, que atraviesa aproximadamente 30 µl/min (1/50) para pasar a la interfaz de spray iónico turbo API del espectrómetro API 3000. Los restantes 1,48 ml/min (49/50) se pasan a través del detector ELS.

[0104] Las condiciones de HPLC, los ajustes del detector y los ajustes del espectrómetro de masas usados están proporcionados a continuación:

Columna	Waters X-Terra C18, 5 μ , 50 mmx3 mm id
Gradiente	5% - 90% de acetonitrilo linealmente durante 7,5 min a 1,5 ml/min
Detección	210 nm (salida analógica de DAD)
MS	espray iónico turbo API de modo de ionización
ELS	Ganancia 8 y 40°C

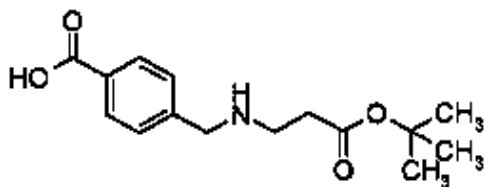
5

NNC 0100-0000-0496 **Ejemplo 1 (Procedimiento general A, acilación usando insulina humana desB30)**

Insulina humana N^{εB29}-[N-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-N-(carboxietil)-CH₂-para-C₆H₄CO] desB30

10 Paso 1: Síntesis de ácido 4-[(2-terc-butoxicarboniletilamino)metil]benzoico

[0105]



15

[0106] Hidrocloruro de terc-butil 3-aminopropanoato (5 g, 27,7 mmol) se disolvió en metanol (150 ml). Se añadió diisopropiletilamina (4,73 mL, 27,7 mmol) seguida de 4-carboxibenzaldehído. La mezcla fue calentada a temperatura de reflujo durante 1 hora. Tras el enfriamiento a temperatura ambiente, se añadió cianoborohiduro de sodio (1,77 g, 22. 1 mmol) bajo nitrógeno y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadió ácido acético (15 mL) y la mezcla se agitó durante 1 hora adicional. La mezcla se vertió en agua (300 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. La solución acuosa se lavó con acetato de etilo (3x250 ml). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄) y el solvente se retiró *in vacuo* para producir el producto bruto como un aceite que se solidifica en reposo. El producto bruto fue usado en el siguiente paso sin purificación adicional.

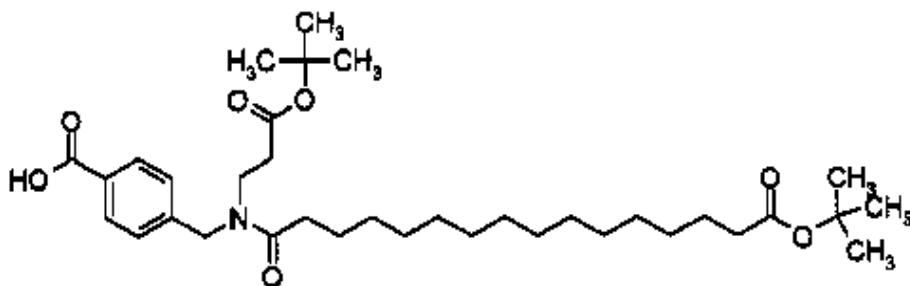
20

HPLC-MS: m/z = (280); R_t = 2,09 min.

25

Paso 2: Síntesis de ácido 4-[(2-terc-butoxicarboniletil)-(15-terc-butoxicarbonil-pentadecanoil)amino]metil]benzoico

[0107]



30

[0108] Se disolvió mono-terc-butil éster de ácido hexadecanodioico (0,3 g, 0,88 mmol) en acetato de etilo. Se añadió hidrocloruro de N-Etil-N-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (0,167 g, 0,88 mmol) y 1-hidroxi-7- azabenzotriazol (0,119 g, 0,88 mmol) y la mezcla se agitó a 50°C durante 1 hora. Después del enfriamiento a temperatura ambiente, se añadió diisopropiletilamina (0,45 mL, 2,63 mmol) seguido de ácido 4-[(2-terc-butoxicarboniletilamino)metil]benzoico (0,489 g, 1,75 mmol). La mezcla se agitó durante toda la noche bajo nitrógeno a temperatura ambiente. La mezcla se separó entre acetato de etilo (100 ml) y agua (2x50 ml). La fase orgánica se secó (Na₂ SO₄) y el solvente se retiró *in vacuo*. El

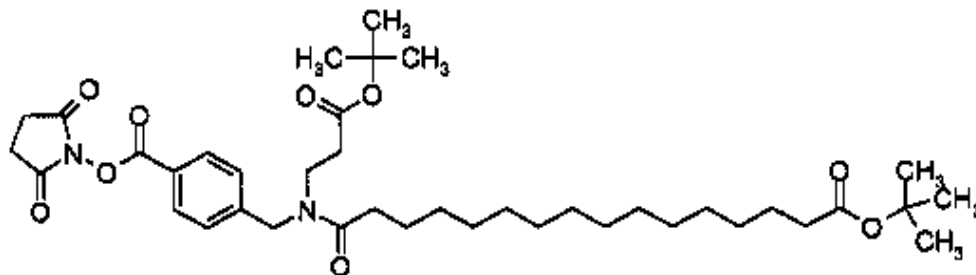
35

producto bruto fue purificado por RP- HPLC en la columna C18, tampón A: TFA al 0,1%, tampón B: MeCN + TFA al 0,1 % ; gradiente 80-100 % B para dar el compuesto del título (145 mg, 27 %).

^1H NMR (Acetona- d_6): δ 8,04 (dd, 2H), 7,40 (dd, 2H), 4,75 (d, 2H), 3,60 (q, 2H), 1,55 (m, 4H), 1,45-1,15 (m, 38H).

5 Paso 3: Síntesis de 2,5-dioxopirrolidin-1-il éster de ácido 4-[[[(2-*tert*-butoxicarboniletil)-(15-*tert*-butoxicarbonil-pentadecanoil)amino]metil]benzoico

[0109]

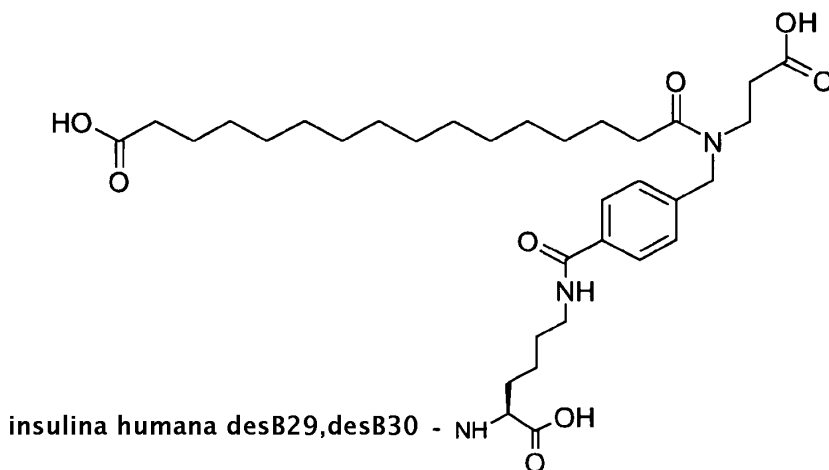


[0110] Se disolvió ácido 4-[[[(2-*tert*-butoxicarboniletil)-(15-*tert*-butoxicarbonil-pentadecanoil)amino]metil]benzoico (70 mg, 0,12 mmol) en THF (5 ml). La mezcla se enfrió con un baño de hielo. Se añadió diisopropiletilamina (0,024 mL, 0,14 mmol) y O-(N-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato (42 mg, 0,14 mmol). La mezcla se agitó bajo nitrógeno a 0°C. Después de 30 minutos se quitó el enfriamiento con hielo y la mezcla se agitó durante 3 horas adicionales. El solvente se retiró *in vacuo* seguido por reevaporación de tolueno. El producto bruto se disolvió en acetato de etilo (25 ml) y se lavó con agua (10 ml). La fase orgánica se secó (Na_2SO_4), el solvente se quitó *in vacuo* para producir el compuesto del título (73 mg, 87 %) que se utilizó en un paso posterior.

HPLC-MS: m/z = (723 (M+Na)); R_t = 6,24 min.

Paso 4: Síntesis de insulina humana B29N(esp)(4-[[[(2-carboxietil)-(15-carboxipentadecanoil)amino]-metil]benzoil) desB30

[0111]



[0112] Se disolvió insulina humana DesB30 (594 mg, 0,104 mmol) en Na_2CO_3 acuoso (100 mM, 5mL). Se disolvió 2,5-dioxopirrolidin-1-il éster de ácido 4-[[[(2-*tert*-butoxicarboniletil)-(15-*tert*-butoxicarbonil-pentadecanoil)amino]metil]benzoico (73 mg, 0,104 mmol) en acetonitrilo (3 mL) y se añadió. La mezcla se agitó muy lentamente durante 1 hora a RT. El pH se ajustó a 5,5 con HCl acuoso (1 N) y la suspensión se dejó en reposo durante 10 minutos a 0°C. El precipitado fue aislado por centrifugado y tratado con TFA/agua (95:5,12 ml) durante 30 minutos. Se vertió en el dietileter enfriado con hielo (30 ml), y el producto bruto fue aislado por centrifugador y purificado con RP-HPLC en un Waters Prep LC2000, en C18,5 cmx20 cm, flujo 20 ml/min usando gradiente de acetonitrilo/agua al 33-53 % que contenía TFA al 0,1 %. Las fracciones que contenían producto fueron recogidas y liofilizadas. Al material

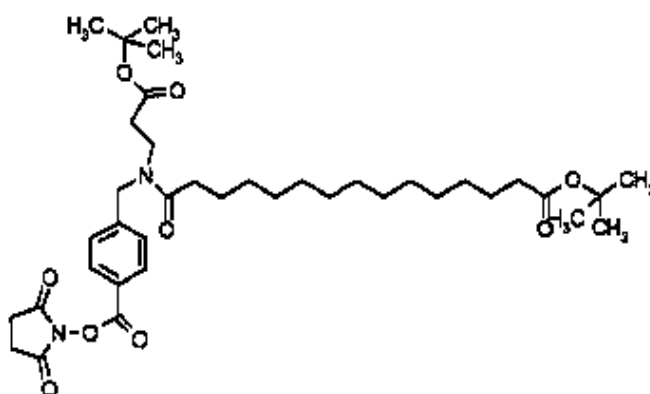
lío filizado se añadió agua (7,2 ml) y se ajustó el pH a 8,98 con 1 N+0,1 N NaOH. El pH fue ajustado de nuevo a 5,2-5,5 con 0,1 N HCl. El producto fue precipitado, aislado por centrifugador y lío filizado para dar el compuesto del título.

NNC 0100-0000-0515 Ejemplo 2 (procedimiento general B. Acilación usando insulina humana A1,B1-diBoc desB30)

Insulina humana N^εB29-[N-(HOOC(CH₂)₁₃ CO)-N-(carboxietil)-CH₂-para-C₆ H₄ CO] desB30

Paso 1: Síntesis de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster de ácido 4-[[[(2-tert-butoxicarbonil-etil)-(14-tert-butoxicarbonil-tetradecanoil)-amino]-metil]-benzoico

[0113]

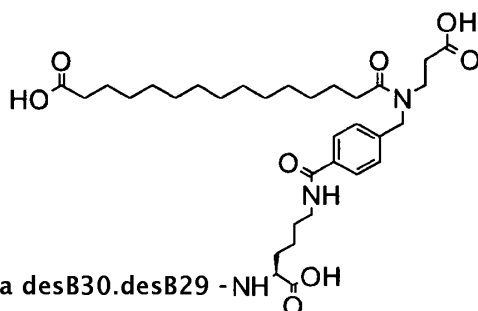


[0114] El compuesto fue preparado de forma similar al modo descrito en el paso 2 y el paso 3 en el procedimiento general A usando en cambio éster de mono-tert-butilo de ácido pentadecanedioico.

HPLC-MS: m/z = (709 (M+Na)); R_t = 6,03 min.

Paso 2: Síntesis de insulina humana N^εB29 (4-[[[(2-carboxietil)-(14-carboxitetradecanoil)amino]-metil]benzoil) desB30

[0115]



insulina humana desB30-desB29 -NH

[0116] La insulina desB30 A1B1BocBoc (Kurtzhals P; Havelund S; Jonassen I; Kiehr B; Larsen UD; Ribel U; Markussen J Biochemical Journal, 1995, 312, 725-731) (0,1 g, 0,017 mmol) se disolvió en DMSO (2 ml). Se añadió trietilamina (0,024 mL, 0,17 mmol). 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster de ácido 4-[[[(2-tert-butoxicarbonil-etil)-(14-tert-butoxicarbonil-tetradecanoil)-amino]-metil]-benzoico se disolvió en THF (1 mL) y se añadió. La mezcla se agitó a RT durante 1 hora. La solución se enfrió con un baño de hielo y se añadió agua (5 ml). El pH se ajustó a 5,2 con 1 N HCl. La mezcla se dejó precipitar durante 1 hora a 5°C. El precipitado se aisló por centrifugador y se trató con TFA 10 ml durante 15 minutos. Se vertió en el dietileter enfriado con hielo (35 mL), y el producto bruto fue aislado por centrifugador y purificado en C-18 RP-HPLC 5 cmX20 cm, flujo 20 ml/min usando gradiente de acetonitrilo/agua al 25-45 % que contenía TFA al 0,1 %. Las fracciones que contenían producto fueron recogidas y lío filizadas. Al material lío filizado se añadió agua (7,2 ml) y se ajustó el pH a 8,98 con 1 N+0,1 N NaOH. El pH se ajustó de nuevo a 5,2-5,5 con 0,1 N HCl. El producto fue precipitado, aislado por centrifugado y lío filizado para dar el compuesto del título.

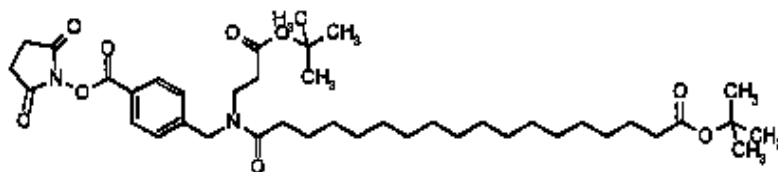
HPLC-MS: m/z = 1542 (m/4), 1234 (m/5); R_t = 3,55 min.

NNC 0100-0000-0488 **Ejemplo 3 (Procedimiento general B)**

5 Insulina humana N^{εB29}-[N-(HOOC(CH₂)₁₆CO)-N-(carboxietil)-CH₂-para-C₆H₄CO] desB30

Paso 1: Síntesis de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster de ácido 4-[[[(2-tert-butoxicarbonil-etil)-(17-tert-butoxicarbonilheptadecanoil)amino]metil]benzoico

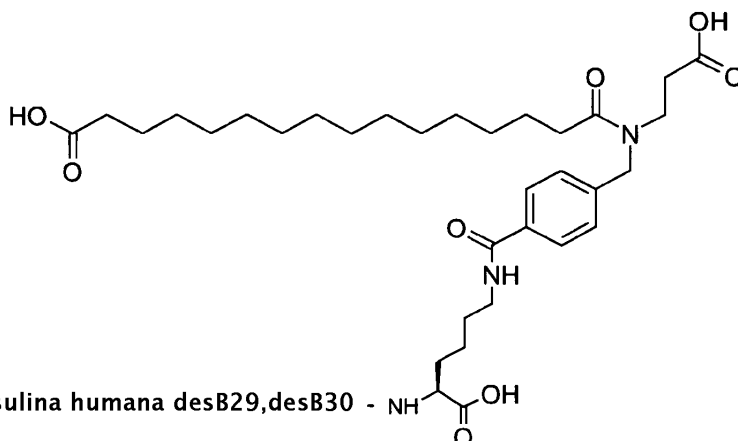
10 [0117]



15 [0118] El compuesto fue preparado de forma similar al modo descrito en el paso 2 y el paso 3 en el procedimiento general A usando en cambio mono-terc-butil éster de ácido octadecanodióico.
HPLC-MS: m/z = (752 (M+Na)); R_t = 6,62 min

Paso 2: Síntesis de insulina humana N^{εB29}-(4-[[[(2-carboxietil)-(17-carboxiheptadecanoil)-amino]metil]benzoil)desB30

20 [0119]



[0120] El compuesto del paso 1 fue reaccionado con insulina desB30 A1, B1-diBoc como se describe en el procedimiento general B. El examen fue similar usando gradiente de acetonitrilo/agua al 45-70 % que contenía TFA al 0,1%. Las fracciones agrupadas que contenían producto fueron liofilizadas y disueltas en 1 ml de NH₃ al 2,5 % y diluidas a 10 mL y sometidas a purificación en un purificador ÄKTA empleando una HPLC de fase inversa, Jupiter 5269, C4 250/20 mm, 15 μM, 300 Å. El tampón consistió en tampón A 10 mM TRIS + 15 mM (NH₄)₂ SO₄ en EtOH al 20 %, pH 7.3 y un tampón B de EtOH al 80 %. El producto fue eluido con un gradiente B al 15-60 % con 8 ml/min. Las fracciones apropiadas fueron agrupadas y eluidas en un Sep-Pak con CH₃ CN al 70 % que contenía TFA al 0,1%. Se precipitó y liofilizó para dar el producto deseado.

30 Maldi: 6199.2

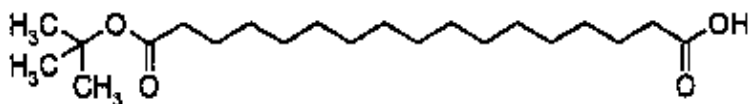
NNC 0100-0000-0522 **Ejemplo 4 (Procedimiento general B)**

Insulina humana N^{εB29}-[N-(HOOC(CH₂)₁₅CO)-N-(carboxietil)-CH₂-para-C₆H₄CO] desB30

35

Paso 1: Síntesis de mono-terc-butil éster de ácido heptadecanodioico

[0121]



1-metil éster de ácido de 2-metoxicarbonil-heptadecanodioico:

[0122] El sodio (1,11 g, 48, 2 mmol) fue disuelto en metanol seco (30 ml) y calentado a 50°C. Se añadió malonato de dimetilo (5,87 ml, 51,4 mmol) durante 15 min. La mezcla fue calentada a reflujo y se añadió una suspensión de ácido 15-bromopentadecanoico (5 g, 15,6 mmol) en metanol seco (50 ml) durante 45 min. La mezcla resultante fue refluída durante otros 30 min. Tras el enfriamiento a RT, se añadió agua y la mezcla fue concentrada. Se añadió agua al residuo y se convirtió en alcalino con 1 N NaOH y se extrajo con éter (1x50 ml). El estrato acuoso fue acidificado con 1 N HCl y extraído con éter (3x 30 ml). Los estratos orgánicos combinados se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron para dar el compuesto del título en rendimiento de 98% (5.7 g).

HPLC-MS: 395 (M+Na), rt 5.38. ¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,2-1,35 (m, 22H), 1.65 (pent, 2H), 1.90 (m, 2H), 2,34 (t, 2H), 3,37 (t, 1 H), 3,71 ppm (s, 6H).

Ácido heptadecanodioico:

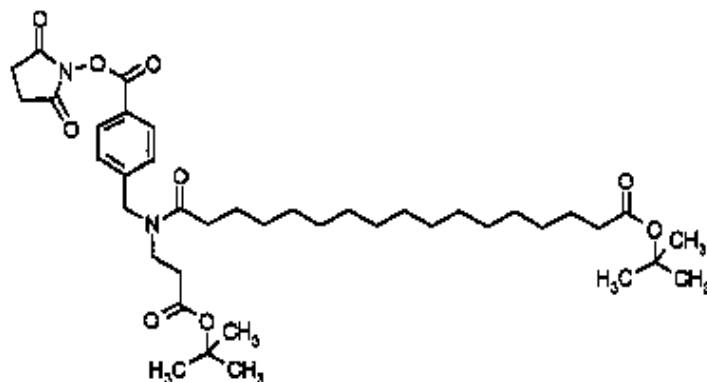
[0123] 1-metil éster de ácido de 2-metoxicarbonil-heptadecanodioico (4,63, 12,4 mmol g) se disolvió en KOH acuoso al 20% (15 ml) calentándolo. La solución resultante fue refluída durante 2,5 h. La mezcla reactiva fría fue cuidadosamente concentrada. El residuo fue suspendido en agua (30 ml) en un baño de hielo y acidificado con HCl acuoso HCl al 10%. El compuesto acuoso resultante fue refluído durante 2 h. Tras el enfriamiento, el precipitado fue aislado por filtración y secado durante toda la noche al vacío. El compuesto fue decarboxilado calentándolo bajo agitación a 140°C durante 2 h. (la reacción debería ser seguida, podría ser necesaria calentarla a 180°). El producto bruto (4,0 g, 100%) fue usado sin purificación adicional. HPLC-MS: 323 (M+Na), R_t 4.61. ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 1,22 (br s, 22H) 1,47 (m, 4H), 2,18 (t, 4H).

Mono-tert-butil éster de ácido heptadecanodioico

[0124] El ácido heptadecanodioico crudo (0,99 g, 3,3 mmol) se disolvió en tolueno (15 ml) a 115°C. Se añadió di-tert-butil-acetato de N,N-dimetilformamida (0,79 ml, 3,3 mmol) gota a gota durante 10 min. Después del refluído durante 1 h., se añadió más di-tert-butil-acetato de N,N-dimetilformamida (0,79 ml) durante 10 min. Después del refluído durante 1 h. más, se añadió una última eq de di-tert-butil-acetato de N,N-dimetilformamida (0,79 ml) durante 10 min. El reflujo se continuó durante 1 h. En el enfriamiento a RT apareció un precipitado; este fue filtrado (diácido). El licor madre fue extraído con agua (25 ml) y DCM (25 ml). La estrato orgánico fue secado y concentrado. El residuo fue purificado por cromatografía en columna rápida usando DCM/MeOH 15:1 como eluyente. El éster de mono-terc-butilo de ácido heptadecanodioico fue aislado en 33% de rendimiento (0,330 g). HPLC-MS: 379 (M+Na), rt 6,11. ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 1,22 (br s, 22H), 1,39 (s, 9H), 1,47 (m, 4H), 2,16 (t, 2H), 2,19 ppm (t, 2H).

Paso 2: Síntesis de 2,5-dioxopirrolidin-1-il éster de ácido 4-[(2-tert-butoxicarboniletil)-(16-tert-butoxicarbonilhexadecanoil)amino]metil]benzoico

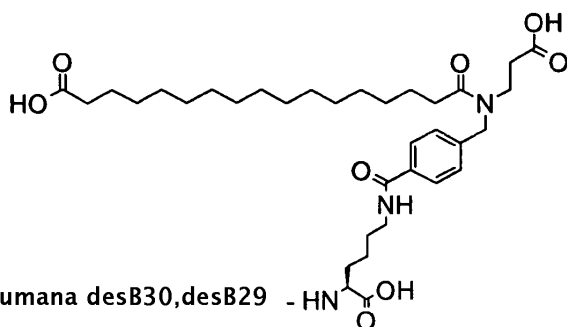
[0125]



[0126] El compuesto fue preparado de forma similar al modo descrito en el paso 2 y el paso 3 en el procedimiento general A usando en cambio mono-terc-butil éster de ácido heptadecanodioico.

Paso 3: Síntesis de insulina humana N^εB²⁹-(4-[[[(2-carboxietil)-(16-carboxihexadecanoil)amino]-metil]benzoil) desB30

[0127]



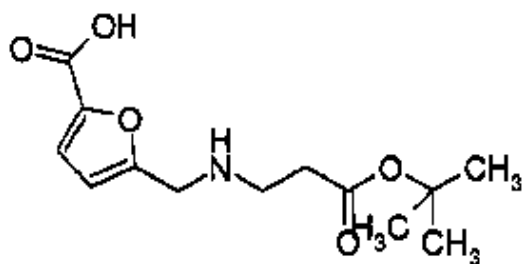
[0128] 2,5- dioxopirrolidin-1-il éster de ácido 4-[[[(2-tert-butoxicarboniletil)-(16-tert-butoxicarbonilhexadecanoil)-amino]metil]benzoico fue reaccionado con insulina desB30 A1,B1-diBoc como se describe el procedimiento general B. El examen fue similar usando gradiente de acetonitrilo/agua al 28-48 % que contenía TFA al 0,1%. HPLC-MS: m/z = 1549 (m/4), 1239 (m/5); R_t = 3,53 min.

NNC 0100-0000-0529 **Ejemplo (Procedimiento general B)**

Insulina humana N^εB²⁹-(5-[[[(2-carboxietil)-(15-carboxipentadecanoil)amino]metil]furan-2-carbonil)desB30

Paso 1: Ácido 5-[(2-tert-butoxicarboniletilamino)metil]furan-2-carboxílico

[0129]

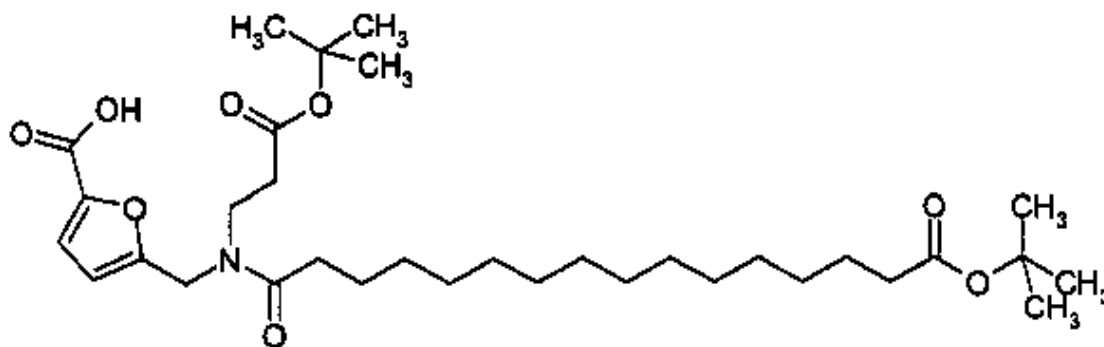


[0130] Este compuesto fue sintetizado usando un procedimiento similar al descrito en el paso 1 en el procedimiento general A usando ácido 5-formilfuran-2-carboxílico en vez de 4-carboxibenzaldehído.

¹H NMR (CDCl₃): δ 7,12 (d, 1H), 6,65 (d, 1H), 4,37 (s, 2H), 3,35 (t, 2H), 2,80 (t, 2H), 1,45(s, 9H).

Paso 2: Ácido 5-[[[(2-tert-butoxicarboniletil)-(15-tert-butoxicarbonilpentadecanoil)amino]-metil]furan-2-carboxílico

[0131]



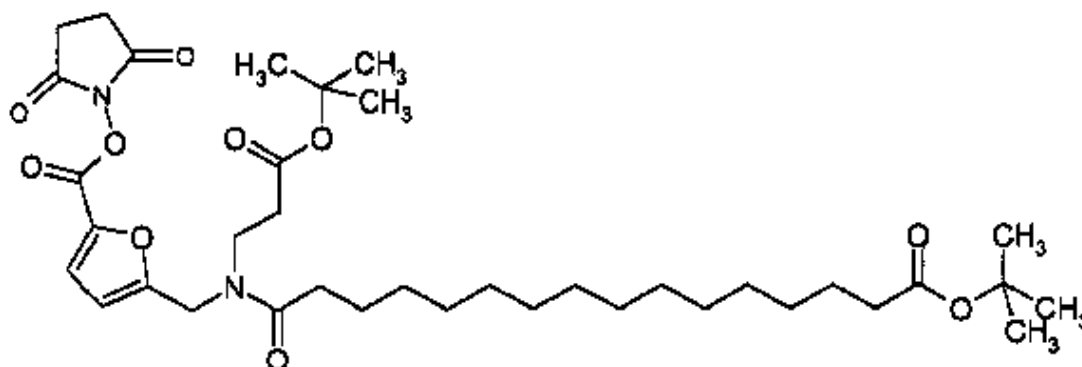
[0132] Este compuesto fue sintetizado usando un procedimiento similar al descrito en el paso 1 en el procedimiento general A usando ácido 5-[(2-*tert*-butoxicarboniletilamino)metil]furan-2-carboxílico en vez de ácido 4-[(2-*tert*-butoxicarboniletilamino) metil]benzoico.

^1H NMR (DMSO- d_6): δ 7,15 (dd, 1 H), 6,45 (dd, 1 H), 4,57 (d, 2H), 2,43-2,10 (m, 6H), 1,60-1,20 (m, 42H).

HPLC-MS: m/z = (616 (M+Na), 538 (pérdida de *tert*-butilo, 482 (pérdida de dos *tert*-butilo), R_t = 6,17 min.

Paso 3: 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster de ácido 5-[[[(2-*tert*-butoxicarboniletil)-(15-*tert*-butoxicarbonilpentadecanoil)-amino]metil]-furan-2-carboxílico

[0133]

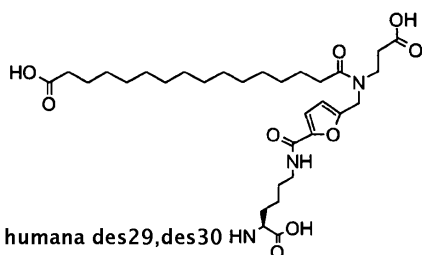


[0134] Este compuesto fue sintetizado usando un procedimiento similar al descrito en el paso 3 en el procedimiento general A

HPLC-MS: m/z = (713 (M+Na), R_t = 6,4 min.

Paso 4: Insulina humana N^εB²⁹-[(5-[[[(2-carboxietil)-(15-carboxipentadecanoil)amino]metil]furan-2-carbonil)desB30

[0135]



insulina humana des29,des30 HN

[0136] 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster de ácido 5-[[[(2-*tert*-butoxicarboniletil)-(15-*tert*-butoxicarbonilpentadecanoil)amino]metil]furan-2-carboxílico fue reaccionado con insulina desB30 A1,B1-diBoc como se describe el procedimiento general B. El examen fue similar usando un gradiente de acetonitrilo/agua al 25-45 % que contenía 0,1 % de TFA. Las fracciones agrupadas que contenían producto fueron liofilizadas y disueltas en NH_3 1 ml al 2,5 % y diluidas a 38 ml y sometidas a purificación en un purificador ÄKTA empleando una HPLC de fase inversa,

Jupiter 5269, C4 250/20 mm, 15 μ M, 300 A. El tampón consistió en tampón A 10 mM TRIS + 15 mM $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ en EtOH al 20 %, pH 7.3 y un tampón B de EtOH al 80 % . El producto fue eluido con un gradiente B al 15-60 % con 8 ml/min. Las fracciones apropiadas fueron agrupadas y eluidas en un Sep-Pak con 3 mL de $\text{CH}_3 \text{CN}$ al 70 % que contenía TFA al 0,1%. Se precipitó y liofilizó para dar el producto deseado.

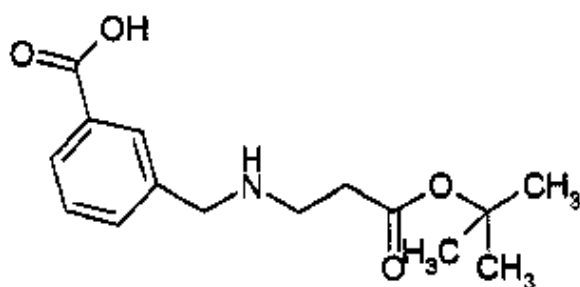
MS. $m/z=6169$.

NNC 0100-0000-0543 Ejemplo 6 (Procedimiento general B)

Insulina humana N^{B29} -[N-($\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}$)-N-(carboxietil)- CH_2 -meta $\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}$] desB30

Paso 1: Ácido 3-[(2-*tert*-butoxicarboniletilamino)metil]benzoico

[0137]

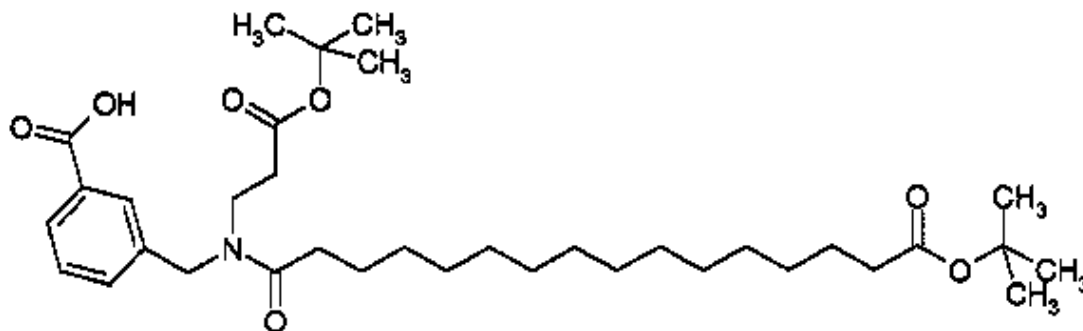


[0138] Este compuesto fue sintetizado usando un procedimiento similar al descrito en el paso 1 en el procedimiento general A usando ácido 3-carboxibenzaldehído en vez de 4-carboxibenzaldehído.

HPLC-MS (Método de grad. rápido): $m/z = (302, \text{M}+\text{Na})$; $R_t = 1,1$ min.

Paso 2: Ácido 3-[[2-*tert*-butoxicarboniletil)-(15-*tert*-butoxicarbonilpentadecanoil)amino]metil]benzoico

[0139]

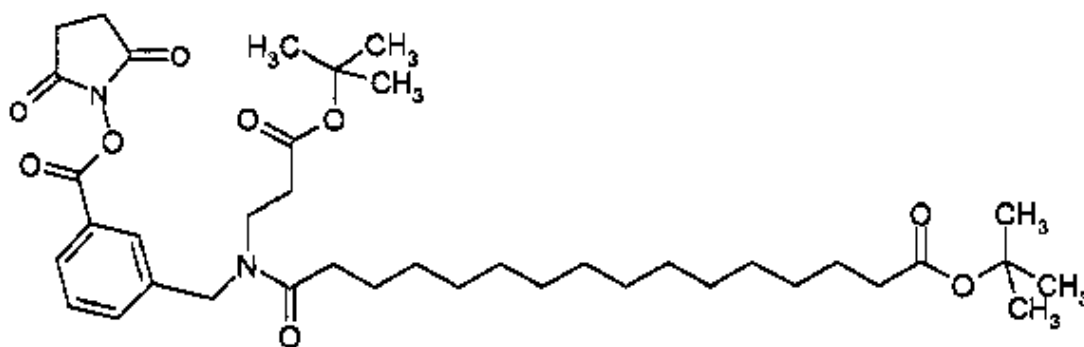


[0140] Este compuesto fue sintetizado usando un procedimiento similar al descrito en el paso 1 en el procedimiento general A usando ácido 3-[(2-*tert*-butoxicarboniletilamino)metil]benzoico en vez de 4-[(2-*tert*-butoxicarboniletilamino)metil]benzoico.

HPLC-MS (Método de grad. rápido): $m/z = (603, \text{M}+1)$; $R_t = 3,09$ min.

Paso 3: 2,5-dioxo- pirrolidin-1-il éster de ácido 2-[[2-*tert*-butoxicarbonil-etil)-(15-*tert*-butoxicarbonil-pentadecanoil)-amino]-metil]-benzoico

[0141]

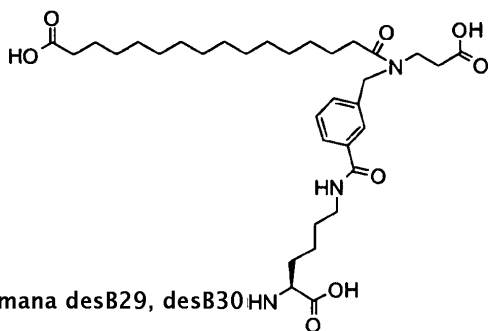


[0142] Este compuesto fue sintetizado usando un procedimiento similar al descrito en el paso 3 en el procedimiento general A

5 HPLC-MS (Método de grad. rápido): $m/z = 723$, (M+Na); $R_t = 3,15$ min.

Paso 4: Síntesis de insulina humana $N^{\epsilon B29}$ - (3-[[[(2-carboxietil)-(15-carboxipentadecanoil)amino]-metil]benzoil] desB30

[0143]



insulina humana desB29, desB30

[0144] 2,5- dioxo-pirrolidin-1-il éster de ácido 3-[[[(2-terc-butoxicarbonil-etil)-(15-terc-butoxicarbonil-pentadecanoil)-amino]-metil]-benzoico fue reaccionado con insulina humana desB30 A1 B1 BocBoc como se describe el procedimiento general B. El examen fue similar usando gradiente de acetonitrilo/agua al 25-45 % que contenía TFA al 0,1%. Las fracciones agrupadas que contenían producto fueron precipitadas y liofilizadas.

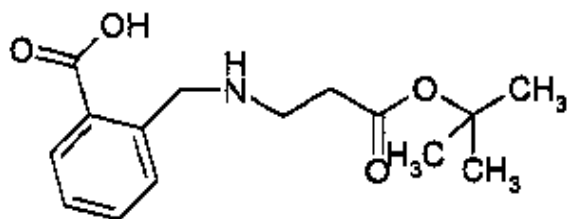
HPLC-MS: $m/z = 1236$ (m/5), 1030 (m/6); $R_t = 3,7$ min.

NNC 0100-0000-0549 Ejemplo 7 (Procedimiento general B)

Insulina humana $N^{\epsilon B29}$ -[N-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-N-(carboxietil)-CH₂-orto C₆H₄CO] desB30

Paso 1: Ácido 2-[[[(2-terc-butoxicarboniletilamino)metil]benzoico

[0145]

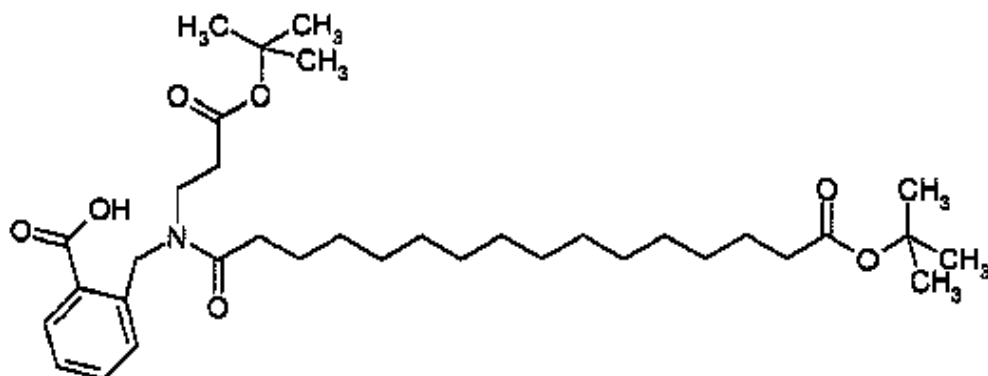


[0146] Este compuesto fue sintetizado usando un procedimiento similar al descrito en el paso 1 en el procedimiento general A usando ácido 2-carboxibenzaldehído en vez de 4-carboxibenzaldehído.

HPLC-MS (Método de grad. rápido): $m/z = 280$, (M+1); $R_t = 1,13$ min.

Paso 2: Ácido 3-[[[(2-terc-butoxicarboniletil)-(15-terc-butoxicarbonilpentadecanoil)amino]metil]benzoico

[0147]



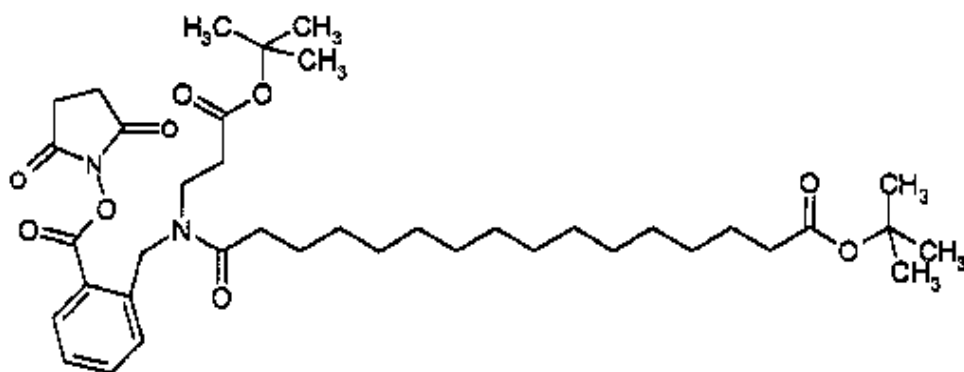
5

[0148] Este compuesto fue sintetizado usando un procedimiento similar al descrito en el paso 1 en el procedimiento general A usando ácido 2-[(2-*tert*-butoxicarboniletilamino)metil]benzoico en vez de 4-[(2-*tert*-butoxicarboniletilamino)metil]benzoico.

HPLC-MS (Método de grad. rápido): $m/z = 604$; $R_t = 3,09$ min.

10 Paso 3: 2,5-dioxo- pirrolidin-1-il éster de ácido 2-[(3-*tert*-butoxicarbonil-etil)-(15-*tert*-butoxicarbonil-pentadecanoil)-amino]-metil]-benzoico

[0149]



15

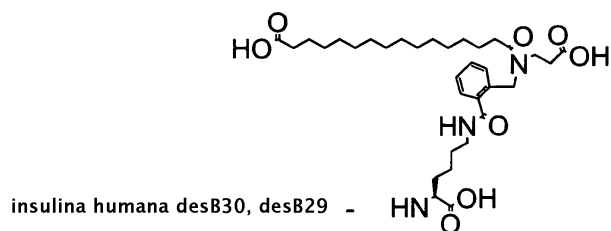
[0150] Este compuesto fue sintetizado usando un procedimiento similar al descrito en el paso 3 en el procedimiento general A

HPLC-MS (Método de grad. rápido): $m/z = (723, M+Na)$; $R_t = 3,15$ min.

20

Paso 4: Síntesis de insulina humana N^{εB29} (3-[(2-carboxietil)-(15-carboxipentadecanoil)amino]-metil}benzoil) desB30

[0151]



25

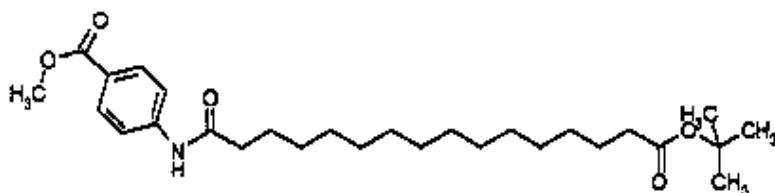
[0152] 2,5- dioxo-pirrolidin-1-il éster de ácido 2-[[2-*terc*-butoxicarbonil-etil)-(15-*terc*-butoxicarbonil-pentadecanoil)-amino]-metil]-benzoico fue reaccionado con insulina des(B30) A1,B1-diBoc como se describe el procedimiento general B. El examen fue similar usando gradiente de acetonitrilo/agua al 28-48 % que contenía TFA al 0,1%. Las fracciones agrupadas que contenían producto fueron precipitadas y liofilizadas. Las fracciones agrupadas que contenían producto fueron liofilizadas y disueltas en NH₃ 1 ml al 2,5 % y diluidas a 38 ml y sometida a purificación en un purificador ÄKTA empleando una HPLC de fase inversa, Jupiter 5269, C4 250/20 mm, 15 µM, 300 Å. El tampón consistió en tampón A 10 mM TRIS + 15 mM (NH₄)₂ SO₄ en acetonitrilo al 10%, pH, 3 y un tampón B de acetonitrilo al 70 %. El producto fue eluido con un gradiente B al 27-33 % con 6 ml/min durante 90 minutos. Las fracciones apropiadas fueron agrupadas y eluidas en un Sep-Pak con 3 ml de CH₃ CN al 70 % que contenían TFA al 0,1%. Se precipitó y liofilizó para dar el producto deseado.

NNC 0100-0000-0544 **Ejemplo**

Insulina humana N^{EB29}-[N-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-N-(carboxietil)-para-C₆H₄CO] desB30

Paso 1: Éster metílico del ácido 4-(15-*terc*-butoxicarbonilpentadecanoilamino)benzoico

[0153]

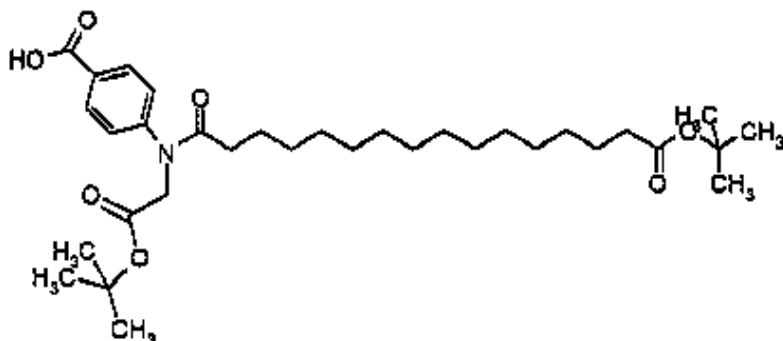


[0154] El mono-*terc*-butil éster de ácido hexadecadioico de hexadecandioato (0,4 g, 1,17 mmol) se disolvió en NMP (6 ml). Se agregó clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (0,223 g, 1,17 mmol) y 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (0,156 g, 1,17 mmol) y la mezcla se agitó a 50°C 1 hora y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadió diisopropiletilamina (0,6 ml, 3,5 mmol) seguida de 4-aminobenzoato de metilo (0,353 g, 2,34 mmol). La mezcla se agitó durante toda la noche bajo nitrógeno a temperatura ambiente. La mezcla se vertió en NaCl acuoso saturado (50 mL), lavada con dietileter (3x 100 ml entre acetato de etilo. Las fases orgánicas se recogieron, se secaron (Na₂ SO₄) y el solvente se retiró *in vacuo*. El material bruto fue purificado en sílice usando acetato/heptano de etilo (50:50), para dar éster metílico del ácido 4-(15-*terc*-butoxicarbonilpentadecanoilamino)benzoico puro (235 mg, 42 %).

¹H-NMR (CDCl₃) δ 8,00 (d, 2H), 7,61 (d, 2H), 7,32 (br s, 1 H), 3,90 (s, 3H), 2,37 (t, 2H), 2,20 (t, 2H), 1,70 (m, 2H), 1,43 (s, 9H), 1,40-1,20 (m, 20H)

Paso 2: Ácido 4-[*terc*-butoxicarbonilmetil-(15-*terc*-butoxicarbonilpentadecanoil)amino]benzoico

[0155]



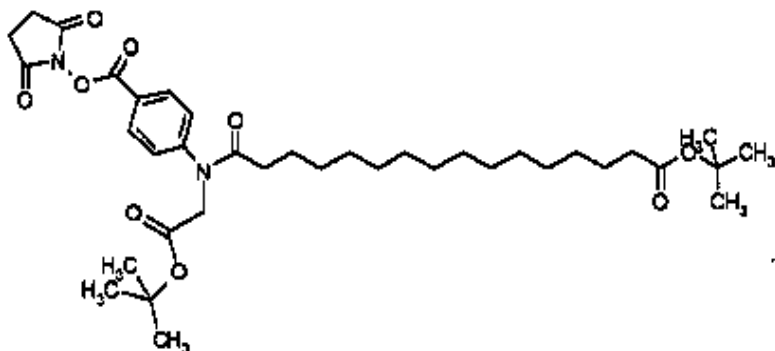
[0156] El éster metílico del ácido 4-(15-*terc*-butoxicarbonilpentadecanoilamino)benzoico (235 mg, 0,495 mmol) fue evaporado dos veces de piridina seca y una vez de acetonitrilo seco, disuelto en DMF seco (4 ml) bajo nitrógeno. Se añadió NaH al 60 % (14 mg, 0,594 mmol) y la mezcla se agitó durante 20 minutos a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Se añadió bromoacetato de *terc*-butilo (0,11 ml, 0,742 mmol) y la mezcla se agitó durante 1 hora, la reacción fue apagada con hielo y separada entre agua (50 ml) y dietileter (75 ml). La fase orgánica se secó (Na₂ SO₄) y el solvente se retiró *in vacuo*. El material bruto se disolvió en etanol (4 ml). Se añadió (5 N, 0,15 ml) y la mezcla se agitó

durante 1 hora. El pH se ajustó a pH=5 con ácido acético y la mezcla se separó entre agua y acetato de etilo. La fase orgánica se secó (Na_2SO_4) y el solvente se retiró *in vacuo* para dar el producto bruto que fue purificado en el RP-HPLC, C-18 con gradiente de acetonitrilo/agua (75-95 %) que contenía TFA al 0,1%. Para dar ácido 4-[*tert*-butoxicarbonilmetil-(15-*tert*-butoxicarbonilpentadecanoil)amino]benzoico puro (53 mg, 19 %)

HPLC-MS (grad rápido): $m/z=598$ (M+Na), $R_t=3,02$ min.

Paso 3: 2,5-dioxopirrolidin-1-il éster del ácido 4-[*tert*-butoxicarbonilmetil(15-*tert*-butoxicarbonilpentadecanoil)amino]benzoico

[0157]

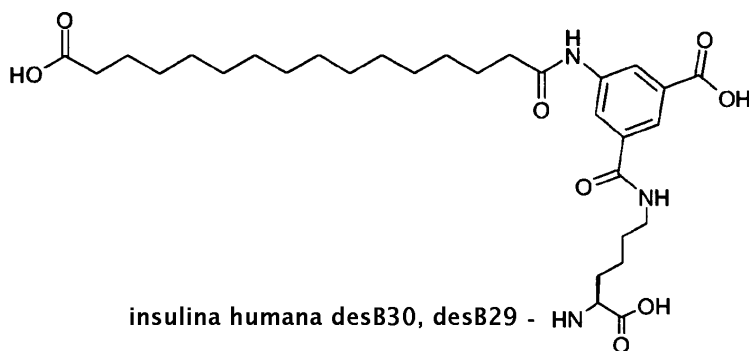


[0158] Este compuesto fue sintetizado de ácido 4-[*tert*-butoxicarbonilmetil-(15-*tert*-butoxicarbonilpentadecanoil) amino]benzoico usando un procedimiento similar al descrito en el paso 3 el procedimiento general A.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 8,19 (d, 2H), 7,49 (d, 2H), 4,27 (s, 2H), 2,94 (s, 4H), 2,17 (m, 4H), 1,57 (m, 4H), 1,46 (s, 9H), 1,44 (s, 9H), 1,30-1,15 (m, 20H)).

Paso 4:

[0159]



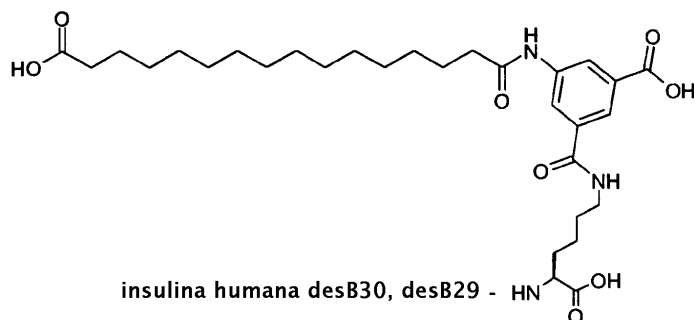
[0160] 2,5-dioxopirrolidin-1-il éster del ácido 4-[*tert*-butoxicarbonilmetil(15-*tert*-butoxicarbonilpentadecanoil)amino]benzoico fue reaccionado con insulina desB30 A1, B1-diBoc como se describe en el procedimiento general B.

HPLC-MS: $m/z = 1539$ (m/4).

Ejemplo 9 0547

Insulina $N^{\epsilon}\text{B}29$ -(3-carboxi-5-hexadecandioilaminobenzoil)des(B30)

[0161]



mono *t*-butil éster de ácido 5-nitro-isoftálico

(NNC 0100-0000-3414-2A)

5

[0162] A una suspensión de ácido 5-nitro-isoftálico (5,0 g, 23,7 mmol) en el tolueno seco (100 ml) a 110°C se añadió dimetilformamida di-*t*-butilacetato (3,4 ml, 71 mmol) gota a gota durante 60 min. La calefacción fue continua durante 45 min y la mezcla reactiva se dejó a Rt durante toda la noche. El material de inicio precipitado se quitó por filtración. El filtrado fue concentrado para dar un aceite amarillo (7,88 g). Este fue purificado por cromatografía en columna rápida usando EtOAc/Hept 1:2 y EtOAc/Hept 1:2 + AcOH al 5% en dos partes para dar el compuesto del título en 38% de rendimiento (2,38 g).

10

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,65 (s, 9H), 8,98 (s, 1 H), 9,01 (s, 1 H), 9,06 ppm (s, 1H).

T-butil éster de ácido 5-amino-isoftálico (NNC 0100-0000-3406-4A)

15

[0163] El mono *t*-butil éster de ácido 5-Amino-isoftálico (2,38 g, 8,9 mmol) se disolvió en EtOAc (50 ml). Se añadió paladio al 10% en carbón activo y la mezcla fue hidrogenada a 1 atm y temperatura ambiente. Después de 24 h, la mezcla se filtro a través de un filtro de microfibras de vidrio y el filtrado fue concentrado para dar el compuesto del título como cristales blancos en 98% de rendimiento (2,07 g).

20

¹H-NMR (DMSO, d₆): δ 1,54 (s, 9H), 5,59 (br, 2H, NH₂); 7,33 (s, 1H), 7,37 (s, 1H), 7,60 ppm (s, 1H),

Mono-*terc*-butil éster de ácido 5-(15-*terc*-butoxicarbonil-pentadecanoilamino)-isofáltico

(NNC 0100-0000-3416-1A)

25

[0164] A una solución de monoéster de *t*-butilo de ácido hexadecanodioico (100 mg, 0,29 mmol) en DCM seco (2 ml), se añadió HOAt (44 mg, 0,29 mmol) y DCC (72 mg, 32 mmol). La mezcla se agitó a 50°C durante 1 h. Se retiró el baño de aceite. Se añadió mono *t*-butil éster de ácido 5-amino-isoftálico (69 mg, 0,29) y DIPEA (0,07 ml, 0,32 mmol). La mezcla se agitó a RT durante toda la noche bajo nitrógeno. Se filtró la suspensión amarilla y el filtrado fue concentrado. El residuo fue redisoluto en EtOAc y extraído con 0,1 N HCl (2x), solución salina (1x), se secó (Na₂ SO₄) y se concentró para dar un sólido blanco, que fue purificado dos veces por cromatografía en columna rápida usando EtOAc/Hept 1:2 + AcOH al 5%. El compuesto del título se obtuvo en 86% del rendimiento (0,140 g) como un aceite con una impureza.

30

¹H NMR (400 MHz) δ : 1,25 (s, 22 H) 1,42 - 1,45 (m, 9 H) 1,53 - 1,65 (m, 11 H) 1,68 - 1,79 (m, 2 H) 2,20 (s, 2 H) 2,41 (s, 2 H) 7,58 (brs, 1 H) 8,35 (s, 1 H) 8,39 (s, 2 H)

35

1-*terc*-butil éster 3-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-il) éster (NNC 0100-0000-3420-2A) de ácido 5-(15-*terc*-butoxicarbonil-pentadecanoilamino)-isofáltico

[0165] Se disolvió mono-*terc*-butil éster de ácido 5-(15-*terc*-butoxicarbonil-pentadecanoilamino)-isofáltico (140 mg, 0,25 mmol) en THF seco (3,5 ml). Se añadieron TSTU (95 mg, 0,30 mmol) y DIPEA (70 ul, 0,30 mmol). La mezcla se agitó a RT bajo nitrógeno durante el fin de semana. La mezcla reactiva fue casi seca. Se añadió EtOAc y el precipitado se quitó por filtración. El filtrado se extrajo con 0,1 N HCl (2x), solución salina (1x), se secó (Na₂ SO₄) y se concentró para dar el compuesto del título como un jarabe con un rastro de una impureza en un rendimiento cuantitativo (0,165 mg).

40

¹H NMR (400 MHz) δ : ppm 1,20 - 1,35 (m, 22 H) 1,44 (s, 9 H) 1,52 - 1,64 (m, 11 H) 1,68 - 1,79 (m, 2 H) 2,12 - 2,24 (m, 2 H) 2,34 - 2,42 (m, 2 H) 2,91 (s, 4 H) 7,39 (s, 1 H, NH) 8,34 (s, 1 H) 8,43 (s, 1 H) 8,54 (s, 1 H)

45

Insulina humana N^εB29-(3-carboxi-5-hexadecanodioilamino-benzoil)desB30 (0100-0000-0547)

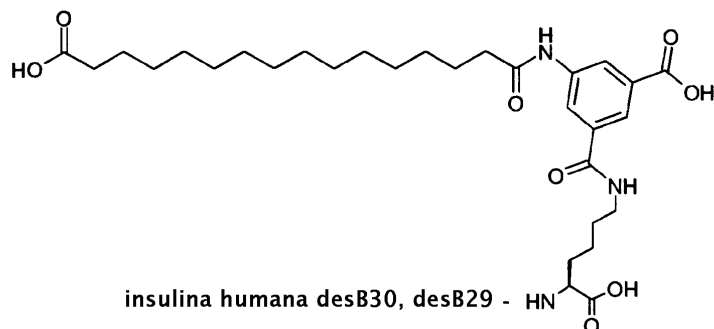
[0166] Insulina humana desB30 A1 N, B1 N-diBoc (100 mg, 0,017 mmol) fue acilada con 1-terc-butil éster 3-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-il) éster de ácido 5-(15-terc-butoxicarbonilo-pentadecanoilamino)-isofáltico (15 mg, 0,022 mmol) como se describe en el procedimiento general B. El producto fue purificado por HPLC preparativa e hidrolizado como se describe el procedimiento general B para dar el compuesto del título, 9 mg.

[0167] MALDI-MS (SA): 6130.8. anal. HPLC (neut; AArg), 96,5% pureza, rt 6,11 min. (columna: C4 5μ 150x4,60mm "phenomenex, Jupiter" Tampón A: 10mM Tris, 15 mM (NH₄)₂ SO₄, pH 7,3, 20% CH₃ CN en agua MQ. Tampón B: 80 % CH₃ CN, 20% agua MQ, flujo: 1,5 ml/min; gradiente: 0 min 10 % B -> 20 min 50 % B -> 21 min 50 % B -> 23 min 10 % B -> 30 min 10 % B) anal. HPLC (ácido), 100% pureza, rt 12,24 min (columna: C4 5μ 150x4,60mm "phenomenex, Jupiter" Tampón A: 0,1 % TFA, 10% CH₃ CN, 89,9 % agua, Tampón B: 0,1% TFA, 80 % CH₃ CN, 19,9% agua MQ, flujo: 1,5 ml/min; gradiente: 0 min 20 % B -> 17 min 90 % B -> 21 min 90 % B -> 23 min 20 % B -> 30 min 20 % B.

Ejemplo 10°548

Insulina humana N^εB29-(3-carboxi-5-octadecandioilaminobenzoil) des(B30)

[0168]

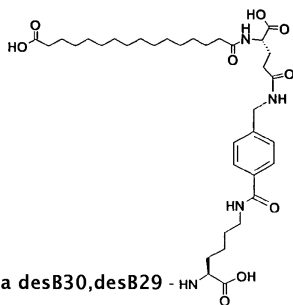


[0169] El compuesto del título fue preparado como se describe en el ejemplo 9 usando éster monoterbutílico de ácido octadecanedioco en lugar de ácido hexadecandioico. MALDI-MS (SA): 6160.9. anal. HPLC (neut), 96,0% pureza, rt 8.93 min. (columna: C4 5μ 150x4,60mm "phenomenex, Jupiter" Tampón A: 10mM Tris, 15 mM (NH₄)₂ SO₄, pH 7,3, 20% CH₃ CN en agua MQ. Tampón B: 80 % CH₃ CN, 20% agua MQ, flujo: 1,5 ml/min; gradiente: 0 min 10 % B -> 20 min 50 % B -> 21 min 50 % B -> 23 min 10 % B -> 30 min 10 % B). anal. HPLC (ácido), 100% pureza, rt 13,62 min (columna: C4 5μ 150x4,60mm "phenomenex, Jupiter" Tampón A: 0,1% TFA, 10% CH₃ CN, 89,9 % agua, Tampón B: 0,1% TFA, 80 % CH₃ CN, 19,9% agua MQ, flujo: 1,5 ml/min; gradiente: 0 min 20 % B -> 17 min 90 % B -> 21 min 90 % B -> 23 min 20 % B -> 30 min 20 % B).

0100-0000-0539 Ejemplo 11

Síntesis de insulina humana N^εB29 - ω-carboxipentadecanoil-γ-L-glutamil 4-aminometil-benzoil) desB30

[0170] _



insulina humana desB30,desB29

0100-0000-0539

Hexadecandioato de mono-tert-butilo:

[0171] El ácido hexadecadioico (40,0 g, 140 mmol) fue suspendido en tolueno (250 ml) y la mezcla fue calentada a reflujo. El di-tert-butil acetal de *N, N*-dimetilformamida (76, 3 g, 375 mmol) se agregó gota a gota durante 4 horas. La mezcla fue hizo refluir durante toda la noche. El solvente se eliminó *in vacuo* a 50°C, y el material bruto fue suspendido en DCM/AcOEt (500 ml, 1:1) y agitado durante 15 min. Los sólidos fueron recogidos por filtración y triturados con DCM (200 ml). El filtrado fue *evaporado in vacuo* para dar hexadecandioato de mono-tert-butilo crudo, 30 gramos. Este material fue suspendido en DCM (50 ml), enfriado con hielo durante 10 min. y se filtró. El solvente se retiró *in vacuo* para dejar 25 gramos de hexadecandioato de mono-tert-butilo crudo, el cual se recrystalizó a partir de heptano (200 ml) para proporcionar el hexadecandioato de mono-tert-butilo, 15, 9 g (33%). Alternativamente a la recrystalización, el monoéster se puede purificar por cromatografía de sílice en AcOEt/heptano.

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 2,35 (t; 2H), 2,20 (t; 2H), 1,65-1,55 (m; 4H), 1,44 (s; 9H), 1,34-1,20 (m, 20 H),

Hexadecandioato de succinimidil-tert-butilo:

[0172] El éster mono-tert-butilico (2 g, 5, 8 mmol) se disolvió en THF (20 ml) y se trató con TSTU (2, 1 g, 7, 0 mmol) y DIEA (1, 2 ml, 7, 0 mmol) y se agitó durante toda la noche. La mezcla se filtró y el producto filtrado se evaporó *in vacuo*. El residuo se disolvió en AcOEt y se lavó dos veces con HCl 0,1 M y agua fríos. El secado sobre MgSO₄ y la evaporación *in vacuo* proporcionaron el hexadecandioato de succinimidil-tert-butilo, 2, 02 g (79%).

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 2,84 (s, 4H), 2,60 (t, 2H), 2,20 (t, 2H), 1,74 (p, 2H), 1,56 (m, 2H), 1,44 (s, 9H), 1,40 (m, 2H), 1,30-1,20 (m, 18H),

Tert-butil hexadecandioil-L-Glu

[0173] El hexadecandioato de succinimidil-tert-butilo (1 g, 2,27 mmol) se disolvió en DMF (15 ml) y se trató con L-Glu-OtBu (0,51 g, 2,5 mmol) y DIEA (0,58 ml, 3,41 mmol) y la mezcla se agitó durante toda la noche. El solvente se evaporó *in vacuo* y el producto crudo se disolvió en AcOEt y se lavó dos veces con HCl 0, 2M, con agua y solución salina. El secado sobre MgSO₄ y la evaporación *in vacuo* proporcionaron la terc-butil hexadecandioil-L-Glu-OtBu, 1,2 g (100%).

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 6,25 (d, 1 H), 4,53 (m, 1 H), 2,42 (m, 2H), 2,21 (m, 4H), 1,92 (m, 1 H), 1,58 (m, 4H), 1,47 (s, 9H), 1,43 (s, 9H), 1,43-1,22 (m, 18H),

Tert-butil hexadecandioil-L-Glu(OSu)-OtBu:

[0174] El terc-butil hexadecandioil-L-Glu(OSu)-OtBu (1,2 g, 2,27 mmol) se disolvió en THF (15 ml) y se trató con TSTU (0,82 g, 2,72 mmol) y DIEA (0,47 ml, 2,72 mmol) y se agitó durante toda la noche. La mezcla se filtró y el producto filtrado se evaporó *in vacuo*. El residuo se disolvió en AcOEt y se lavó dos veces con HCl 0,1 M y agua fríos. El secado sobre MgSO₄ y la evaporación *in vacuo* proporcionaron terc-butil hexadecandioil-L-Glu(OSu)-OtBu, 1,30 g (92%).

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 6,17 (d, 1H), 4,60 (m, 1H), 2,84 (s, 4H), 2,72 (m, 1H), 2,64 (m, 1 H), 2,32 (m, 1 H), 2,20 (m, 4H), 2,08 (m, 1 H), 1,6 (m, 4H), 1,47 (s, 9H), 1,43 (s, 9H), 1,33-1,21 (m, 20 H),

Tert-butil hexadecandioil-L-Glu(NHCH₂ PhCOOH)-OtBu:

[0175] Tert-butil hexadecandioil-L-Glu(NHCH₂ PhCOOH)-OtBu (100 mg, 0,16 mmol) i DMF (1 ml) fue tratado con ácido 4-aminometilbenzoico (27 mg, 0,18 mmol) y DIEA (41 µL, 0,24 mmol) y la mezcla se agitó durante toda la noche. El

solvente fue evaporado y el residuo se disolvió en AcOEt. La fase orgánica se lavó con 2 x 0,2M HCl, agua y solución salina.

[0176] El secado sobre MgSO_4 y la evaporación *in vacuo* proporcionaron terc-butil hexadecandioil-L-Glu(NHCH_2 PhCOOH)-OtBu, 92 mg (87%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,85 (d, 2H, J = 8 Hz), 7,30 (d, 2H, J = 8 Hz), 7,16 (t, 1H), 7,43 (d, 1 H), 4,50, (m, 3H), 2,39 (t, 2H), 2,29 (m, 1 H), 2,25 (t, 2H), 2,18 (t, 2H), 1,89 (m, 1H), 1,59 (m, 6H), 1,47 (s, 9H), 1,43 (s, 9H), 1,25 (m, 20 H).

Terc-butil hexadecandioil-L-Glu(NHCH_2 PhCOOSu)-OtBu:

[0177] Tert-butil hexadecandioil-L-Glu(NHCH_2 PhCOOH)-OtBu (92 mg, 0,14 mmol) se disolvió en THF (1 ml) y se trató con TSTU (50 mg, 0,17 mmol) y DIEA (29 L, 0,177 mmol) y se agitó durante toda la noche. La mezcla se filtró y el producto filtrado se evaporó *in vacuo*. El residuo se disolvió en AcOEt y se lavó dos veces con HCl 0,1 M y agua fríos. El secado sobre MgSO_4 y la evaporación *in vacuo* proporcionaron terc-butil hexadecandioil-L-Glu(NHCH_2 PhCOOSu)-OtBu, 95 mg (90%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8,07 (d, 2H, J = 8 Hz), 7,45 (d, 2H, J = 8 Hz), 7,37 (t, 1 H), 6,38 (d, 1 H), 4,53, (m, 2H), 4,40 (m, 1 H), 2,89 (s, 4H), 2,32 (t, 2H), 2,20 (m, 6H), 1,86 (m, 2H), 1,59 (m, 6H), 1,46 (s, 9H), 1,44 (s, 9H), 1,25 (m, 20 H).

Insulina humana N^{B29} - ω -carboxipentadecanoil- γ -L-glutamil 4-aminometil-benzoil) desB30:

[0178] La insulina humana Des(B30) (500 mg, 0,090 mmol) se disolvió en Na_2CO_3 100 mM (6,5 ml, pH 10.2) a temperatura ambiente. Terc-butil hexadecandioil-L-Glu(NHCH_2 PhCOOSu)-OtBu (80 mg, 105 mmol) se disolvió en acetonitrilo (6,5 ml) y se agregó a la solución de insulina. Después de 30 minutos, se agregó metilamina 0,2 M (0,5 ml). El pH se ajustó por medio de HCl a 5,5 usando HCl 1 M y el producto precipitado isoelectrico se recolectó por medio de la centrifugación y se secó *in vacuo*. El rendimiento de acoplamiento fue 84% (RP-HPLC, columna C4; Tampón A: MeCN al 10% en TFA-agua al 0,1%, Tampón B: MeCN al 80% en TFA-agua al 0,1%; gradiente de 20% a 90% de B en 16 minutos). El producto protegido se disolvió en TFA al 95% (15 ml), se dejó durante 30 minutos y se evaporó *in vacuo*. El producto bruto se disolvió en agua y se liofilizó.

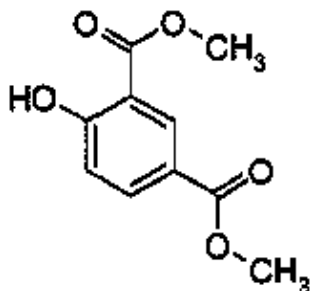
[0179] La insulina N^{B29} -hexadecandioil-gamma-Glu-(4-aminometil-benzoil) desB30 se purificó por medio de la RP-HPLC en una columna C4, tampón A: EtOH al 20% + TFA al 0, 1%, tampón B: EtOH al 80% + TFA al 0,1%; gradiente de 15-60% de B, seguido por la HPLC en una columna C4, tampón A: Tris 10 mM + sulfato de amonio 15 mM en EtOH al 20%, pH 7,3, tampón B: EtOH al 80%, gradiente de 15-60% de B. Las fracciones recolectadas se desalinizaron en Sep-Pak con acetonitrilo al 70% + TFA al 0,1%, se neutralizaron por la adición de amoníaco y se liofilizaron. El rendimiento no optimizado fue 11 mg (2%). La pureza evaluada por medio de la HPLC fue >98%. LCMS 6236, $\text{C}_{282}\text{H}_{418}\text{N}_{66}\text{O}_{82}\text{S}_6$ requiere 6237.

Ejemplo 12

0100-0000-0538 Insulina humana N^{B29} -(3-carboxi-4-(14-carboxitetradeciloxi)benzoil) desB30 human

Paso 1: 0042-0000-4416 Éster dimetilo de ácido 4-hidroxi isoftálico

[0180]

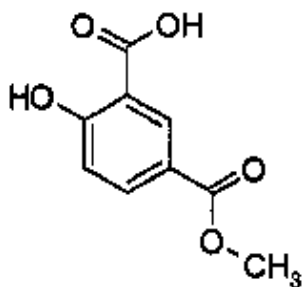


[0181] El ácido 4-hidroxi isoftálico (5 g, 27,5 mmol) se disolvió en 100 ml de metanol, se enfrió a 0 °C bajo un flujo de N₂, y el cloruro de tionilo se añadió durante aproximadamente 5 min. La reacción se agitó a 0 °C durante 30 min. y luego a temperatura ambiente durante 1 h. La reacción se hizo refluir durante 16 h. El solvente se quitó al vacío y el sólido blanco se disolvió en AcOEt (100 ml). La solución se lavó con agua (2 x 50 ml), se secó sobre MgSO₄ y se concentró al vacío para producir un sólido cristalino blanco (5,28 g, 92%).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ: 11,20 (s, 1 H), 8,57 (s, 1 H), 8,12 (d, 1 H), 7,02 (d, 1 H), 3,99 (s; 3H), 3,91 (s; 3H)

Paso 2: **0100-0000-3369** éster 1-metilo de ácido 4-hidroxiisofáltico

[0182]



[0183] El compuesto fue preparado de la manera descrita por Coutts, Ian G. C.; Edwards, Mark; Richards, David J. *Synthesis* **1981**, 487. El éster dimetilo de ácido 4-hidroxi isoftálico (5,28 g, 25,1 mmol) fue refluído en piridina bajo un flujo de N₂. La reacción fue monitoreada por medio de TLC (20:10:1 heptano/AcOEt/AcOH) que indicó la finalización de la reacción después 8 h. La mayoría de la piridina se quitó al vacío, y se añadió AcOEt (100 ml). La solución se lavó con 0,5 M HCl (3 x 50 ml). Los lavados ácidos fueron luego extraídos con AcOEt (100 ml). Las dos fases orgánicas fueron agrupadas, se secaron (MgSO₄) y se concentraron para producir un sólido blanco (4,85 g, 99%). El sólido fue

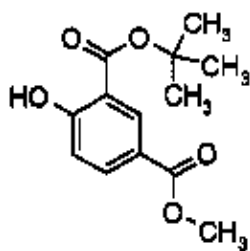
recristalizado de tolueno (200 ml) para producir cristales blancos (4,6 g, 92%).

¹H-NMR (DMSO, 400 MHz) δ: 8,39 (s, 1 H), 8,05 (d; 1H), 7,07 (d, 1 H), 3,84 (s, 3H),

¹³C-NMR (DMSO, 400 MHz) δ 171,38, 165,59, 165,00, 136,26, 132,47, 120,91, 118,11, 113,72, 52,40,

Paso 3: **0100-0000-3369** 3-tert-butil éster 1-metil éster de insulina 4-hidroxi isoftálico

[0184]



[0185] 1-metilo éster de ácido 4-hidroxiisofáltico (2 g, 10,2 mmol) se calentó a 80 °C en tolueno (50 ml) bajo un flujo de N₂, y se añadió di-terc-butilo acetal de N, N-dimetilformamida (4,88 ml, 20,4 mmol durante 30 seg. La reacción se agitó a 80 °C y se monitoreó por medio de TLC (20:10:1 (heptano/AcOEt/AcOH). Después de 1 h más, se añadió di-terc-butilo acetal de N, N-dimetilformamida (4,88 ml, 20,4 mmol), y otra vez después una hora adicional. La reacción se agitó a 80 °C durante 1 h. y el solvente se quitó al vacío. Se añadió AcOEt (100 ml) y la solución se lavó con agua (3 x 50 ml), se secó sobre MgSO₄ y se concentró al vacío para producir cristales amarillos ligeros (2,64 g). La muestra fue

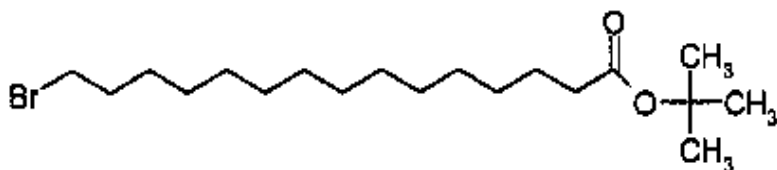
recristalizada a partir de heptano (10 ml) para producir cristales blanco mate (1,26 g, 49%).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ: 11,55 (s, 1 H), 8,47 (s, 1 H), 8,08 (d, 1 H), 6,98 (d, 1 H), 3,91 (s, 3H), 1,64 (s, 9H),

(también algunas señales de contaminación a 1,58 y 1,46).

Paso 4: **0090-0000-3126** terc-butil éster de ácido 15-bromo-pentadecanoico

[0186]

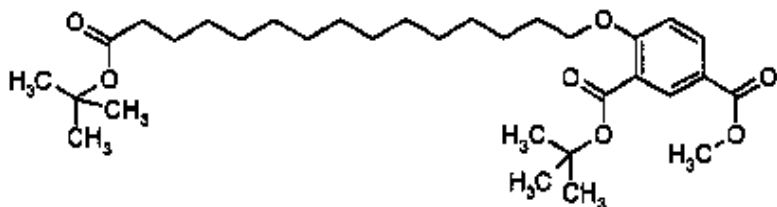


[0187] Ácido 15-bromo-pentadecanoico (5 g, 15,6 mmol) se calentó a 70 °C bajo un flujo de N₂ en tolueno (50 ml). Se añadió di-terc-butilo acetal de N, N-dimetilformamida (18,7 ml, 77,8 mmol) durante 10 min. La reacción se agitó a 55 °C durante 16 h. La muestra se concentró al vacío a un sólido amarillento. El sólido se disolvió en DCM (100 ml), se lavó con agua (2 x 40 ml) y se secó sobre MgSO₄ para producir un residuo blanco (5,35 g). La muestra fue recrystallizada a partir de etanol (50 ml), inicialmente enfriando ligeramente y filtrando el primer precipitado. El filtrado luego se enfrió en un baño de hielo para formar los cristales deseados, que fueron filtrados y secados para producir un polvo blanco (1,37 g, 23%). El concentrando del filtrado a 20 ml y el enfriamiento dieron otro lote de cristales (0,99 g, 15%).

HPLC-MS: m/z: 399+401 (M+23), Rt = 7,04 min.

Paso 5: **0100-0000-3376** 3-terc-butil éster 1-metil éster de ácido 4-(14-terc-butoxicarbonil-tetradeciloxi)-isofatólico

[0188]

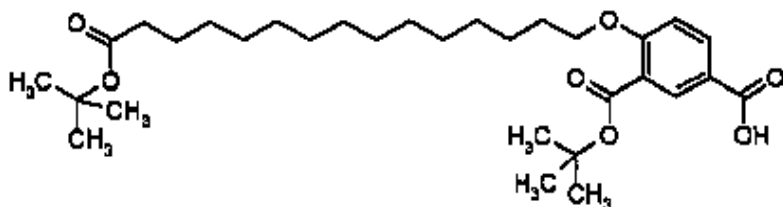


[0189] Tert-butil éster de ácido 15-bromo-pentadecanoico (598 mg, 1,59 mmol), 3-terc-butil éster 1-metil éster de ácido 4-hidroxi isofatólico (400 mg, 1,59 mmol) y K₂ CO₃ (329 mg, 2,38 mmol) se colocaron en un matraz con acetonitrilo (25 ml) y se hicieron refluir bajo N₂. La reacción fue seguida por medio de TLC (4:1 heptano/AcOEt). Después 13 h la muestra se concentró al vacío casi hasta sequedad. Se añadieron AcOEt (50 ml) y agua (25 ml) al residuo. Las fases fueron separadas y la fase orgánica se lavó con agua y solución salina (25 ml cada una), se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron para producir un aceite (841 mg, 97%).

HPLC-MS m/z: 571 (M+23) Rt = 7.18 min.

Paso 6: **0100-0000-3376** 3-terc-butil éster de ácido 4-(14-terc-butoxicarbonil tetradeciloxi) isofatólico

[0190]

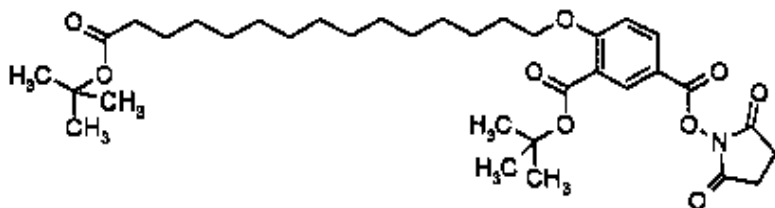


[0191] 3-terc-butil éster 1-metil éster de ácido 4-(14-terc-butoxicarbonil tetradeciloxi) isofatólico (381 mg, 0,69 mmol) se disolvió en metanol (10 ml). La solución se enfrió a 0 °C y se añadió 4 N NaOH (1 ml). La solución se dejó calentar a rt y se añadió más metanol (15 ml). La reacción se agitó a rt durante 30 min bajo N₂, y a reflujo durante 2 h. La solución se enfrió a 0 °C y se añadió HCl 1 N (1 ml) lentamente. Se añadió agua (25 ml) y la solución se extrajo con AcOEt (2 x 50 ml). Las fases orgánicas fueron agrupadas y lavadas con 1:1 agua/ NaCl saturado, se lavó sobre MgSO₄ y se concentró al vacío para dar un sólido aceitoso (326 mg, 89%).

HPLC-MS m/z: 557 (M+23), Rt = 6,5 min.

Paso 7: **0100-0000-3386** 3-terc-butil éster 1-(2,5-dioxo pirrolidin-1-il) éster de ácido 4-(14-terc-butoxicarbonil-tetradeciloxi)isofatólico

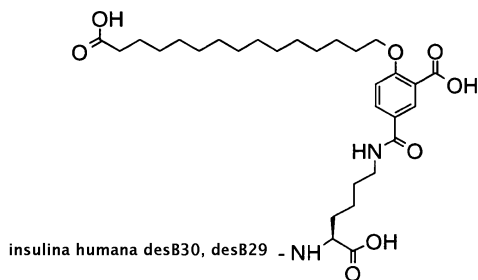
[0192]



- 5 [0193] 3-tert-butyl éster de ácido 4-(14-terc-butoxicarbonil tetradeciloxi) isoftálico (0,15 g, 0,28 mmol) se disolvió en THF (2ml). Se añadió DIEA (58 µl, 0,34 mmol) y la solución se enfrió a 0 °C. Se añadió TSTU (0,10 g, 0,28 mmol). La reacción se agitó a 0 °C durante 30 min. y luego a rt durante 16 h. La muestra fue concentrada al vacío casi hasta sequedad. Se añadió AcOEt (20 ml) y la solución se lavó con HCl 0,2 N y NaHCO₃ saturado (3 x 5 ml cada uno), se secó sobre MgSO₄ y se concentró para dar un residuo (0,18 g). El residuo fue purificado por cromatografía en columna
- 10 rápida (sílice: AcOEt/heptano 3:7 (0,5 l), 1:1 (0,2 l)) produciendo un aceite con sólidos blancos (55 mg, 31%).
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 8,43 (s, 1H), 8,16 (d, 1H), 7,00 (d, 1H), 4,10 (t, 2H), 2,90 (s, 4H), 2,20 (t, 2H), 1,86 (t, 2H), 1,58 (s, 12H = 9H+H₂ O), 1,49 (m, 2H), 1,44 (s, 9H), 1,26 (m, 20H).

15 Paso 8: 0100-0000-0538 Insulina humana N^εB29-(3-carboxi-4-(14-carboxitetradeciloxi)benzoil)desB30

[0194]



- 20 [0195] 3-tert-butyl éster 1-(2,5-dioxo pirrolidin-1-il) éster (13 mg, 0,021 mmol) de ácido 4-(14-terc-butoxicarbonil-tetradeciloxi)isofáltico (13 mg, 0,021 mmol) fue acoplado a insulina humana A1,B1-d-Boc-desB30 (123 mg, 0,021 mmol), y tratado con TFA análogo al método usado en el procedimiento general B, y purificado como tal para dar 38 mg de producto.
 MS: m/z: 1528,8, calculado: 6111,1: (M+4)/4),.

25

Ejemplo 13

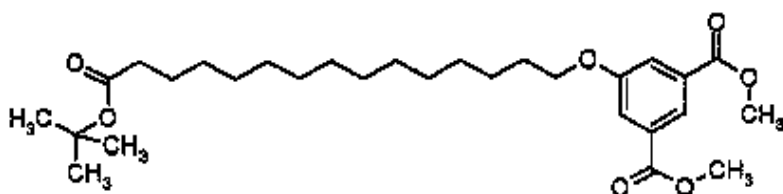
0100-0000-0546 Insulina humana N^εB29-(3-carboxi-5-(14-carboxitetradeciloxi)benzoil) desB30

30 [0196]



Paso 1: **0100-0000-3483** Éster dimetilo de ácido 5-(14-tert-butoxicarboniltetradeciloxi) isoftálico

[0197]



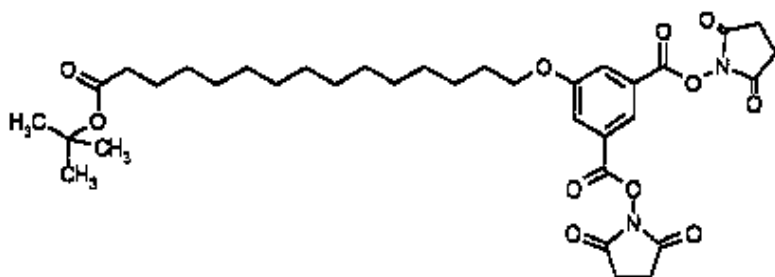
[0198] Éster dimetil de ácido 5-hidroxi-isoftálico (420 mg, 2 mmol), terc-butil éster de ácido 15-bromo-pentadecanoico (755 mg, 2 mmol) y K_2CO_3 (415 mg, 3 mmol) se colocaron en un matraz con acetonitrilo (25 ml) y se hizo refluir bajo N_2 . La reacción fue seguida por TLC (4:1 heptano/AcOEt), que indicó la finalización de la reacción después de 6 h. La muestra fue concentrada casi hasta sequedad. Se añadieron AcOEt (50 ml) y agua (25 ml) al residuo. Las fases fueron separadas y la fase orgánica se lavó con agua y solución salina (25 ml cada una), se secaron sobre $MgSO_4$ y se concentraron para producir un sólido cristalino blanco (1,0 g, 100%).

HPLC-MS m/z: 529 (M+23), Rt = 7,12 min.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ: 8.26 (s, 1 H), 7.74 (s, 2H), 4.03 (t, 2H), 3.94(s, 6H), 2.20 (t, 2H), 1.80 (m, 2H), 1.57 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.26 (m, 20H).

Paso 2: **0100-0000-3441** bis-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-il) éster de ácido 5-(14-tert-butoxicarbonil-tetradeciloxi)isoftálico

[0199]



[0200] Éster dimetil de ácido 5-(14-tert-butoxicarboniltetradeciloxi) isoftálico (965 mg, 1,91 mmol) se disolvió en metanol (50 ml) a 50 °C bajo un flujo de N₂. Después 30 min. se añadió NaOH 1 N (3,8 ml) y la solución se hizo refluir durante 100 min. La solución se enfrió y se añadió HCl 1 N (4,5 ml). La muestra fue concentrada al vacío, y el residuo fue absorbido en AcOEt (20 ml) y agua (25 ml). Las fases fueron separadas y la fase orgánica se lavó con agua (15 ml), se secó (MgSO₄) y se concentró a un sólido blanco (900mg).

[0201] Este residuo se disolvió en THF (10 ml) y se colocó en un baño de hielo. Se añadió DIEA (386 µl, 2,26 mmol), seguido de TSTU (675 mg, 1,88 mmol). La reacción se agitó a 0 °C durante 30 min. y a rt durante 16 h. La mezcla reactiva fue concentrada bajo al vacío y se añadió AcOEt (50 ml). La solución se lavó con HCl 0,2 N (3 x 50 ml), agua (50 ml) y NaCl saturado (30 ml), se secó sobre MgSO₄, y se concentró al vacío para producir un aceite (1,12 g). El compuesto fue purificado por cromatografía en columna rápida (sílice: 2:3 AcOEt/heptano) para producir un aceite con algunos cristales (330 mg).

[0202] Parte de este compuesto (290 mg) se disolvió en metanol (15 ml) y NaOH 1 N (2,5 ml), y se calentó en un baño de aceite a 70 °C durante 4,5 h. La muestra se evaporó a sequedad, y se añadieron AcOEt (25 ml), agua (15 ml) y HCl 1 N (2,8 ml). Las fases fueron separadas y la fase orgánica se lavó con agua (15 ml), se secó sobre MgSO₄ y se concentró a un residuo blanco (210 mg).

[0203] El residuo se disolvió en THF (10 ml), se añadió DIPEA (75 µL, 0,44 mmol), y la solución se enfrió a 0 °C. Se añadió TSTU (173 mg, 0,48 mmol) y la reacción se agitó durante 30 min a 0 °C y 16 h a rt. La reacción se evaporó a sequedad y se añadieron AcOEt (25 ml) y HCl 0,2 N (26 ml). Las fases fueron separadas y la fase orgánica se lavó con HCl 0,2 N (2 x 25 ml), NaHCO₃ saturado (3 x 25 ml) y NaHCO₃ saturado (3 x 25 ml) y NaCl saturado (25 ml), se secó sobre MgSO₄ y se concentró al vacío. Se añadió DCM y la muestra se concentró para producir un residuo. El lavado de residuo purificado por cromatografía en columna rápida (sílice: 7:3 AcOEt/heptano) para producir 90 mg, que fue otra vez purificado por cromatografía en columna rápida (sílice: AcOEt/heptano 4:6 (100 ml) luego 7:3 (100 ml) para producir un residuo blanco (19 mg, 8%).

HPLC-MS (gradiente) m/z: 696 (M+23); Rt: 6,04 min.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 8,46 (s, 1 H), 7,90 (s, 2H), 4,06 (t, 2H), 2,92 (s, 8H), 2,19 (t, 2H) 1,82 (m, 2H), 1,47 (m, 2H), 1,44 (s, 9H), 1,26 (m, 20H).

Paso 3: 0100-0000-546 Insulina humana N^εB²⁹-(3-carboxi-5-(14-carboxi-tetradecilo)-benzoil)desB30

[0204] El bis-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-il) éster de ácido 5-(14-terc-butoxicarbonil-tetradecioxi)isofáltico fue reaccionado con insulina A1-B1-di-Boc-des-B30, tratado con TFA y análogo purificado según el método general B para dar el producto deseado.

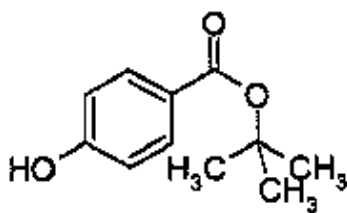
Maldi-MS: m/z 6119,6 : calculado: 6111,1

0100-0000-0552 Ejemplo 14

Insulina humana N^εB²⁹-[4-carboxi-4-[10-(4-carboxi-fenoxi)-decanoilaminol-butiril]desB30

Paso 1: 0100-0000-3398 Tert-butil éster de ácido 4-hidroxi-benzoico

[0205]

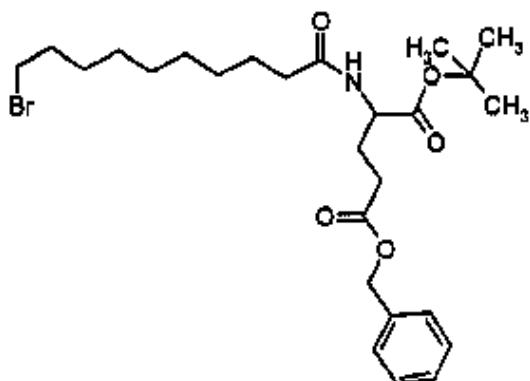


[0206] Se calentó ácido 4-hidroxi-benzoico (2 g, 14,5 mmol) a 80 °C en tolueno seco (tamices moleculares 3A) bajo un flujo de N₂. Se agregó di-terc-butil-acetal de N, N-dimetilformamida (11,8 g, 57,92 mmol) durante más de 5 minutos. La mezcla se agitó a 80 °C durante 50 minutos. La solución se lavó con agua, NaHCO₃ saturado y NaCl saturado (15 ml cada uno), se secó sobre MgSO₄ y se concentró para producir un aceite amarillo (2,92 g). Parte del aceite (aprox. 1,7 g)

fue purificado por destilación küglerohr (195 °, 0,07 torr) para producir un aceite incoloro (1,18 g). ¹H-NMR indicó que el producto contenía aproximadamente 30% de un subproducto donde el grupo de fenol se protegió con un grupo de tert-butilo. El producto bruto fue usado en la reacción posterior.

Paso 2: 0100-0000-3409 5-bencil éster 1-terc-butil éster de ácido 2-(10-bromodecanoilamino) pentanodioico

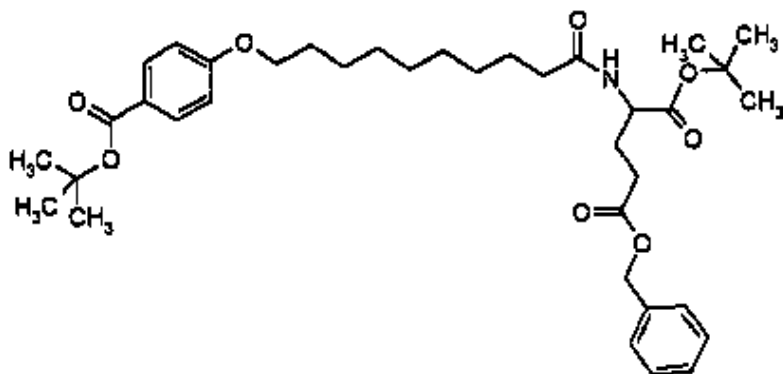
[0207]



[0208] El ácido 10-bromodecanoico (3,20 g, 12,7 mmol) se disolvió en DMF (50 ml) y se enfrió a 0 °C bajo un flujo de N₂. Se añadieron DIEA (3,92 g, 30,3 mmol) y EDAC (2,56 g, 13,3 mmol) y la solución se agitó a 0 ° durante 30 min. Se añadió Glu-(OBn)-tBu HCl (2 g, 6,06 mmol) y la solución se agitó durante 30 min. a 0 °C y durante 16 h a rt. La muestra se concentró al vacío y se transfirió a un embudo separador con AcOEt (100 ml). La solución se lavó una vez con agua y dos veces con NaOH 0,5 N y AcOH al 5 % (50 ml cada una), usando un poco de NaCl saturado y metanol para asistir en la separación de fases con los lavados ácidos. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y se concentró para dar un aceite (2,84 g). El aceite se disolvió en 5 ml de AcOEt y se dispersó en un lecho de sílice en un filtro de vidrio. La elución con AcOEt (150 ml) y el concentrado al vacío dieron un aceite marrón claro (1,65 g, 52%)
HPLC-MS m/z: 550 (M+23), Rt = 5,19 min.

Paso 3: **0100-0000-3411** 1-terc- butil éster 5-bencil éster de ácido 2-[10-(4-tert-butoxicarbonilfenoxi) decanoilamino] pentanodioico

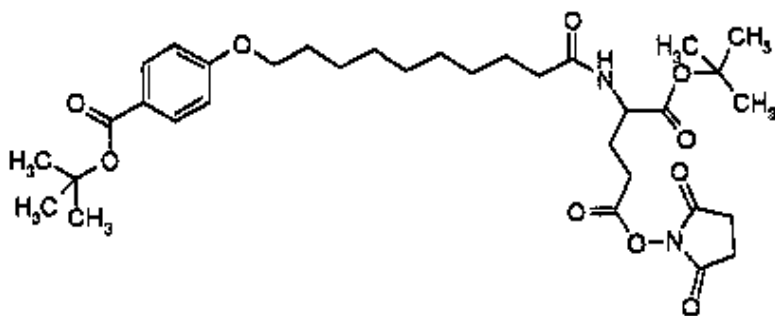
[0209]



[0210] Terc-butil éster de ácido 4 -hidroxi-benzoico (0,65 g, 3,08 mmol) se disolvió en acetonitrilo (7,5 ml) y se añadió a 5-bencil éster 1-terc-butyl éster de ácido 2-(10-bromodecanoilamino) pentanodioico (1,62 g, 3,08 mmol). Se añadieron acetonitrilo (90 ml) y K₂ CO₃ (0,64 g, 4,62 mmol) y la mezcla se hizo refluir durante 16 h bajo un flujo de N₂. El solvente se quitó al vacío. Se añadió AcOEt (100 ml) y la solución se lavó con agua (2 x 50 ml) usando NaCl saturado y metanol para ayudar en la separación de fases, se secó sobre MgSO₄ y se concentró para producir un aceite marrón claro (2,18 g). El aceite fue purificado por cromatografía en columna rápida (sílice, 95:5 DCM/AcOEt) para producir un aceite (160 mg, 8%).
¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ: (señales seleccionadas) 7,91 (d, 2H), 7,25 (s, 5H), 6,87 (d, 2H), 6,06 (d, 1 H), 5,11 (s, 2H), 4,52 (m, 1H), 3,98 (d, 2H), 2,2-2,6 (m, 3H), 2,17 (t, 2H), 1,90-2,02 (m, 1 H), 1,73-1,82 (m, 2H), 1,58 (s, 9H).
HPLC-MS (grad. rápido) m/z: 640 (M+1), Rt = 3.0 min.

Paso 4: **0100-0000-3447** 1-tert-butyl éster 5- (2,5-dioxopirrolidin-1-il) éster de ácido 2-[10-(4-tert-butoxicarbonilfenoxi) decanoilamino] pentanedioico

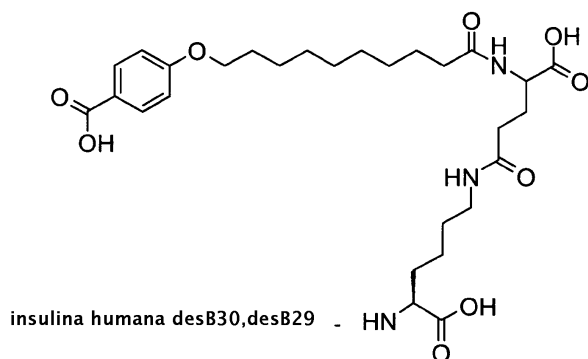
[0211]



- [0212] 5-bencil éster 1-tert-butil éster de ácido 2-[10-(4-terc-butoxicarbonilfenoxi) decanoilamino] pentanodioico (160 mg, 0,25 mmol) se disolvió en THF (10 ml) bajo un flujo de N_2 y se añadió paladio (26 mg, 10% en carbono, 50% agua). El matraz se evacuó y se llenó de N_2 cuatro veces, y se conectó al sistema un globo lleno de H_2 . La solución se agitó durante 16 h a rt, y se filtró a través de un lecho de celita, lavando con THF (100 ml). El filtrado se concentró para producir el ácido carboxílico (190 mg). El producto bruto se disolvió en THF (5 ml) y se enfrió a 0 °C. Se añadieron DIEA (64 μ l, 0,375 mmol) y TSTU (0,09 g, 0,3 mmol). La mezcla se agitó a 0 °C durante 1 h y a rt durante 16 h. Se añadió AcOEt (50 ml) y la solución se lavó con HCl 0,2 M (3 x 15 ml) y $NaHCO_3$ saturado (2 x 15 ml), se secó sobre $MgSO_4$ y se concentró para producir un aceite (167 mg). La purificación por cromatografía en columna rápida (2:1 AcOEt/heptano) produjo un 107 mg de un aceite incoloro.
- 1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) (señales seleccionadas) δ 7,92 (d, 2H), 6,87 (d, 2H), 6,22 (d, 1 H), 4,61 (m, 1 H) 3,99 (t, 2H), 2,83 (s, 4H), 2,62-2,75 (m, 2H), 2,30 (m, 1 H), 2,22 (t, 2H), 2,10 (m, 1H), 1,58 (s, 9H).

- Paso 5: 0100-0000-0552 Insulina humana $N^{\epsilon B29}$ -[4-carboxi-4-10-(4-carboxi-fenoxi)-decanoilamino]-butiril} desB30

[0213]

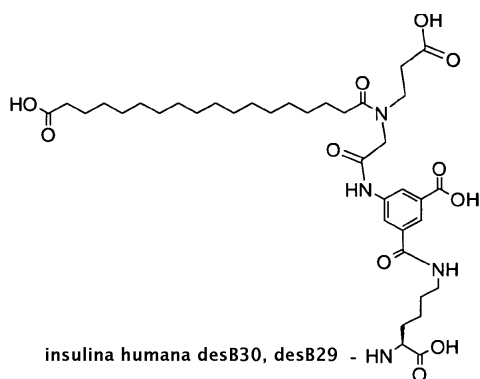


- [0214] 1-tert-butil éster 5-(2,5- dioxopirrolidin-1-il) éster de ácido 2-[10-(4-terc-butoxicarbonilfenoxi) decanoilamino] pentanedioico se acopló a insulina humana desB30 en forma similar a la descrita en el procedimiento en general A. El producto intermedio fue purificado por HPLC preparatoria (C18 -5cm diám.) antes del tratamiento con TFA. El producto fue purificado por HPLC preparatoria (C₄ 2 cm diám.) 15-65% acetonitrilo) seguido de cromatografía de intercambio de iones (columna: Amersham Resource Q-6ml, Tampón A: 0,24% p/p tris, 0,25% p/p acetato amónico, 42,5% p/p etanol, pH 7,5 con ácido acético, Tampón B: 0,24% p/p tris, 2,5% p/p acetato amónico, 42,5% p/p etanol, pH 7,5 con ácido acético.
- HPLC-MS: m/z: 1532,6 (M+4)/4, calculado: 6126

Ejemplo 15

Insulina humana $N^{\epsilon B29}$ -[3-carboxi-5-(octadecandioil-N-carboxietilglicin)aminobenzoil] desB30

[0215]



Paso 1

Síntesis de terc-butil éster de ácido 3-(benciloxycarbonilmetilamino)propionico

[0216] Se disolvió H-Gly-OBn, HCl (3,03 g, 15 mmol) en DMF seco (15 ml) y se enfrió en un baño de hielo. Se añadió TEA (2,10,15 mmol) bajo precipitación de TEA-hidrocloreto. La suspensión se agitó durante 5 min antes de añadir t-butyl acrilato (2,20 ml, 15 mmol). Se permitió que el baño de enfriamiento alcanzara RT lentamente y la agitación fue continuada bajo nitrógeno durante 2 días. La mezcla reactiva fue filtrada y el filtrado fue concentrado. El residuo, que aún contenía DMF, se disolvió en EtOAc y se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado (2x) y agua (1x). El estrato orgánico fue filtrado antes del secado (Na₂ SO₄) y la concentración para dar una purificación de aceite por cromatografía o la HPLC preparatoria dio terc-butilo de ácido 3- (benciloxycarbonilmetilamino)propionico como un aceite claro (0,39 g, 17%).

¹H-NMR (CDCl₃) δ: ppm 1,46 (s; 9H) 2,50 - 2,61 (m, 2H) 2,82 - 2,99 (m; 2H) 3,31 (s, 2H) 5,14 (s; 2H) 7,29 - 7,43 (m, 5 H).

Paso 2

Síntesis de tert-butil éster de ácido 17-[benciloxycarbonilmetil-(2-tert-butoxycarbonil-etil)-carbamoyl]-heptadecanoico

[0217] Tert-butil éster de ácido 3-(benciloxycarbonilmetilamino)propionico (0,030 g, 0.1 mmol) y terc-butil éster 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster de ácido octadecanedioico (0,050 mg, 0.1 mmol) se suspendieron en DMF seco (1 ml). Se añadieron HOAt (0,014 g, 0.1 mmol) y DIPEA (0,21 ml, 1,2 mmol). La mezcla reactiva amarilla se agitó bajo nitrógeno durante 42 h. La mezcla reactiva fue concentrada. El residuo fue redisoluto en EtOAc y lavado con HCl 0,1 N (2x), agua (1x), (Na₂ SO₄) seco y concentrado para dar terc-butil éster de ácido 17-[benciloxycarbonilmetil-(2-tert-butoxycarbonil-etil)-carbamoyl]- heptadecanoico en 85% de rendimiento (55 mg).

¹H-NMR (CDCl₃) δ: ppm 1,3 (m, 26H) 1,38 (s, 9H), 1,46 (s, 9 H), 1,6 (m, 4H), 2,2 (m, 2H), 2,35 (m, 2 H), 2,65 (m, 2H), 2,85 (s, 2 H) 3,65 (m, 2H), 5,15 (s, 2 H) 7,35 (m, 5 H).

Paso 3

Síntesis de tert-butil éster de ácido 17-[(2-tert-butoxycarbonil-etil)-carboximetil-carbamoyl]-heptadecanoico

[0218] Tert-butil éster de ácido 17-[benciloxycarbonilmetil-(2-tert-butoxycarbonil-etil)-carbamoyl]-heptadecanoico (0,054 g, 0,08 mmol) se disolvió en THF (2 ml). Se añadió paladio al 10% en carbón y la mezcla fue hidrogenada a 1 atm y RT durante el fin de semana. La mezcla reactiva seca se disolvió en EtOAc y se filtró 3 veces para eliminar el carbono. El filtrado fue concentrado para dar terc-butil éster de ácido 17-[(2-tert-butoxycarbonil-etil)-carboximetil-carbamoyl]-heptadecanoico en 80% de rendimiento (37 mg).

¹H-NMR (CDCl₃) δ: ppm 1,3 (m, 26H) 1,40 (s, 9H), 1,46 (s, 9 H), 1,6 (m, 4H), 1,75 (p, 2H), 2,2 (m, 2H), 2,35 (m, 2 H), 2,63 (m, 2H), 2,83 (s, 2 H),

Paso 4

Síntesis de mono-tert-butil éster de ácido 5-{2-[(2-terc-butoxicarbonil-etil)-(17-terc-butoxicarbonil-heptadecanoil)-amino]-acetilamino}-isofáltico

[0219] Se disolvió terc-butil éster de ácido 17-[(2-terc-butoxicarbonil-etil)-carboximetil-carbamoyl]-heptadecanoico (0,130 g) en DCM seco (5 ml). Se añadió HOAt (0,36 mg) y DIC (0,045 ml) y la mezcla se hizo refluir durante 1 h bajo nitrógeno. La mezcla reactiva se enfrió a temperatura ambiente y se añadió mono t-butil éster de ácido 5-amino-isofáltico (60 mg). Después de agitar durante 1 h, se añadió DIPEA (0,050 ml), la mezcla reactiva anaranjada se vuelve amarilla. Después de agitar durante 2 días, se concentró la mezcla reactiva. El residuo fue redisoluto en EtOAc y se extrajo con HCl 0,1 N (2x) y solución salina (1x), se secó (Na₂ SO₄) y se concentró para dar un almíbar, que se solidifica en reposo. Mono-terc-butil éster de ácido 5-{2-[(2-terc-butoxicarbonil-etil)-(17-terc-butoxicarbonil-heptadecanoil)-amino]-acetilamino}-isofáltico se obtuvo en un rendimiento cuantitativo (214 mg), contaminado con una impureza. HPLC/MS 775 (M), rt 7,64min.

Paso 5

Síntesis de 1-tert-butil éster 3-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-yl) éster de ácido 5-{2-[(2-terc-butoxicarbonil-etil)-(17-terc-butoxicarbonil-heptadecanoil)-amino]-acetilamino}-isofáltico

[0220] Se disolvió mono-terc-butil éster de ácido 5-{2-[(2-terc-butoxicarbonil-etil)-(17-terc-butoxicarbonil-heptadecanoil)-amino]-acetilamino}-isofáltico (214 mg) en THF seco se añadió TSTU (0,105 mg) y DIPEA (0,1 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Después de 20 h la mezcla reactiva fue concentrada. El residuo fue redisoluto en EtOAc y se filtró. El filtrado fue extraído con HCl 0.1 N (2x) y solución salina (1x), se secó (Na₂ SO₄) y se concentró para dar 1-tert-butil éster 3-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-il) éster de ácido 5-{2-[(2-terc-butoxicarbonil-etil)-(17-terc-butoxicarbonil-heptadecanoil)-amino]-acetilamino}- isofáltico como un jarabe amarillo en 90% de rendimiento (218 mg).

Paso 6

Síntesis de insulina N^{εB29}-[3-carboxi-5-(octadecandioil-N-carboxietilglicin)aminobenzoil] desB30

[0221] 1-tert-butil éster 3-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-il) éster de ácido 5-{2-[(2-terc-butoxicarbonil-etil)-(17-terc-butoxicarbonil-heptadecanoil)-amino]-acetilamino}-isofáltico fue reaccionado con insulina A1,B1-diBoc como se describe en el procedimiento general B. El producto fue purificado por HPLC preparativa para dar el compuesto del título. Rendimiento global para acoplamiento e hidrólisis, 18% (21 mg).

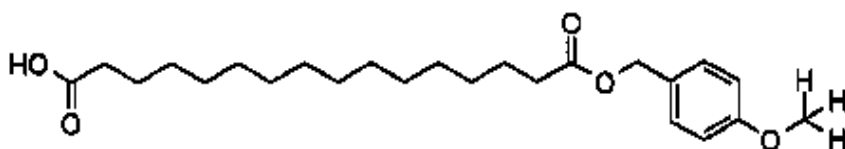
[0222] MALDI-MS (SA): 6288.8. anal. HPLC (neut), 93. 8.5% pureza, rt 10,22 min. (columna: C45μ 150x4,60mm " phenomex, Jupiter" Tampón A: 10mM Tris, 15 mM (NH₄)₂SO₄, pH 7,3, 20% CH₃ CN en agua MQ. Tampón B: 80 % CH₃ CN, agua MQ al 20%, flujo: 1,5 ml/min; gradiente: 0 min 5 % B -> 20 min 55 % B -> 22 min 80 % B -> 24 min 80 % B -> 25 min 5 % B) anal. HPLC (ácido), 100% pureza, rt 11,694 min (columna: C4 5μ 150x4,60mm " phenomex, Jupiter " Tampón A: 0,1 % TFA, 10% CH₃ CN, 89,9 % agua, Tampón B: 0,1 % TFA, 80 % CH₃ CN, 19,9% agua MQ, flujo: 1,5 ml/min; gradiente: 0 min 20 % B -> 17 min 80 % B -> 22 min 80 % B -> 23 min 20 % B -> 30 min 20 % B.

NNC 0100-0000-0486 Ejemplo 16 (Procedimiento general A, Acilación usando insulina humana desB30)

Insulina humana N^{εB29}{3-[(3,5-Bis-carboximetoxi-bencil)-(15-carboxipentadecanoil)amino]-propionil desB30

Paso 1: Síntesis de mono-(4-metoxi-bencil) éster de ácido hexadecanodioico

[0223]



[0224] Se disolvió ácido hexadecandioico (2 g, 7 mmol) en NMP seco (25 ml). Se añadió diisopropilamina (1,2 ml, 7 mmol) y 4-metoxibencil cloruro (0,95 ml, 7 mmol), seguido de NaI (0,52 g, 3,5 mmol). La mezcla fue calentada a 80°C

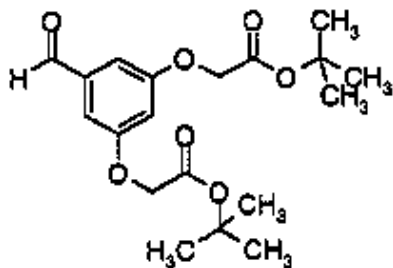
durante 1 hora, se vertió en agua (100 ml) y se filtró. El precipitado se lavó con diclorometano (150 mL), la fase de diclorometano se secó (Na_2SO_4) y el solvente se quitó al vacío para producir el producto bruto, que fue recristalizado varias veces de heptano para producir mono-(4-metoxi-bencil) éster de ácido hexadecanodioico.

^1H NMR (CDCl_3): δ 7,28 (d, 2H), 6,87 (d, 2H), 5,02 (s, 2H), 3,78 (s, 3H), 2,31 (m, 4H), 1,60 (m, 4H), 1,20 (m, 20 H).

5

Paso 2: Síntesis de *tert*-butil éster de ácido (3-*tert*-butoxicarbonilmetoxi-5-formilfenoxi)acético

[0225]



10

[0226] Se disolvió 4,5 dihidroxibenzaldehído (2.5 g, 18.1 mmol) en NMP (120 mL). Se añadió carbonato potásico (10 g, 72,4 mmol), seguido de *tert*-butilo bromoacetato.

15

[0227] La mezcla se agitó a temperatura ambiente, bajo nitrógeno durante toda la noche. La reacción fue filtrada y separada entre éter dietílico (400 ml) y agua (400 ml). La fase orgánica se secó (Na_2SO_4) y el solvente se quitó al vacío para producir el producto bruto como un aceite que se solidifica en reposo. El producto bruto fue usado en el siguiente paso sin purificación adicional.

HPLC-MS: m/z = (389, $\text{M}+\text{Na}$); R_t = 4,50 min.

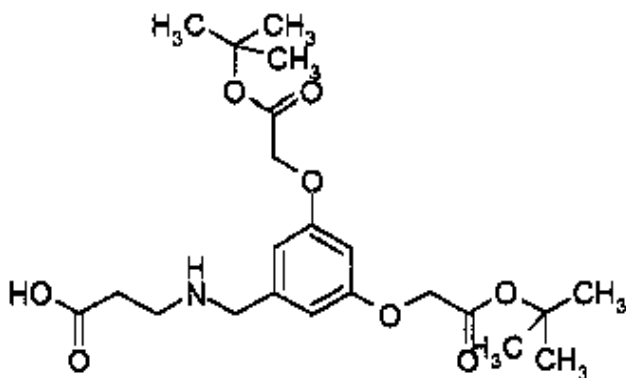
20

^1H NMR (CDCl_3): δ 9,85 (s, 1H), 7,00 (s, 2H), 6,75 (s, 1H), 4,58 (s, 4H), 1,44 (2, 18H)

Paso 3: Síntesis de ácido 3-(3,5-Bis-*tert*-butoxicarbonilmetoxibencilamino)propionico

[0228]

25



30

[0229] Se disolvió beta-alanina (0,5 g, 5,68 mmol) en metanol (20 mL). Se disolvió *tert*-butil éster de ácido (3-*Tert*-Butoxicarbonilmetoxi-5- formilfenoxi)acético (2,08 g, 5,58 mmol) en metanol (2 ml) y se añadió. La mezcla fue calentada a reflujo durante 1 hora y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadió cianoborohiduro de sodio (282 mg, 4,54 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente, después de 1 hora se añadió ácido acético (2 mL) y la mezcla se agitó durante una hora adicional antes de ser vertida en agua (50 mL) y agitada durante toda la noche. La fase acuosa se lavó con acetato de etilo (2x50 mL). La fase orgánica se secó (Na_2SO_4) y solvente se quitó *in vacuo* para producir el producto bruto. El producto bruto se utilizó en el siguiente paso sin purificación adicional.

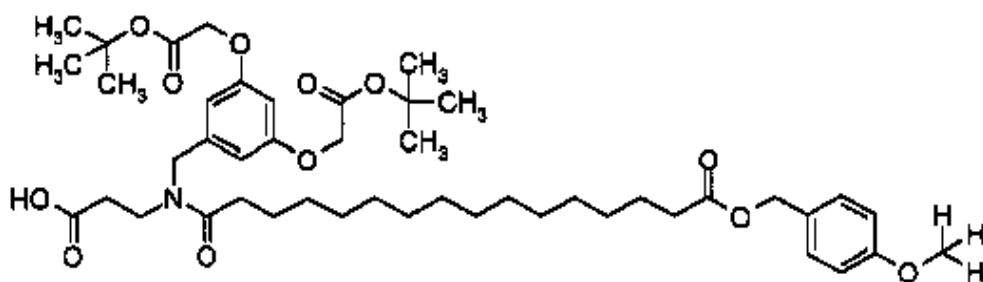
35

HPLC-MS: m/z = (440, $\text{M}+\text{Na}$); R_t = 3,24 min.

Paso 4: Síntesis de 4- metoxibencil éster de ácido 15-[(3,5-Bis-*tert*-butoxicarbonilmetoxibencil)-(2-carboxietil)carbamoi]pentadecanoico

[0230]

40

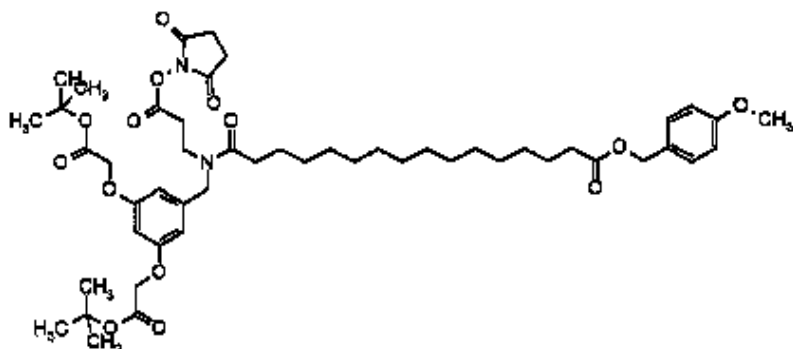


[0231] Se disolvió mono-(4-metoxi-bencil) éster de ácido hexadecanedioico (0,4 g, 0,98 mmol) en acetato de etilo (10 mL). Se añadió hidrocloreto *N*-Etil-*N*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (0,187 g, 0,98 mmol) y 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (0,134 g, 0,98 mmol) y la mezcla fue agitada a 50°C durante 1 hora. Tras el enfriamiento a temperatura ambiente, se añadió diisopropiletilamina (0,50 mL, 2,95 mmol) seguida de ácido 3-(3,5-Bis-terc-butoxicarbonilmetoxibencilamino)propionico (0,432 g, 0,98 mmol). La mezcla se agitó durante toda la noche bajo nitrógeno a temperatura ambiente. La mezcla fue separada entre acetato de etilo (200 mL) y agua (2x100 mL). La fase orgánica se secó (Na₂ SO₄) y el solvente se retiró *in vacuo*. El producto bruto fue purificado por RP- HPLC en la columna C18, tampón A: TFA al 0,1%, tampón B: MeCN + TFA al 0,1%; gradiente al 80-100 % B para producir el compuesto del título.

HPLC-MS: m/z = (547, M+Na); R_t = 6,17 min.

Paso 5: Síntesis de 4-metoxi-bencil éster de ácido 15-[(3,5-Bis-terc-butoxicarbonilmetoxibencil)-[2-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-iloxicarbonil) etil]carbamoil]pentadecanoico

[0232]

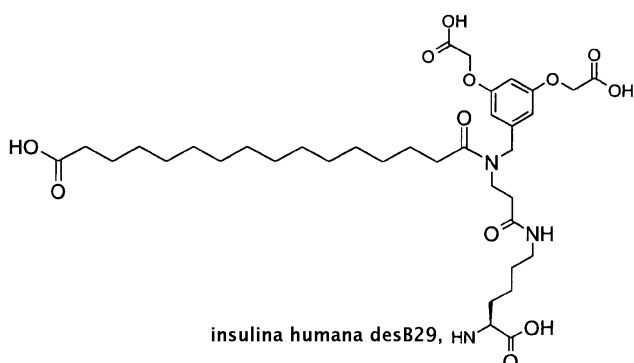


[0233] Se disolvió 4- metoxibencil éster de ácido 15-[(3,5-Bis-terc-butoxicarbonilmetoxibencil)-(2-carboxietil)carbamoil]pentadecanoico (190 mg, 0.23 mmol) en TF (5 mL). La mezcla se enfrió con un baño de hielo. Se añadió diisopropiletilamina (0,047 mL, 0,28 mmol) y O-(*N*-succinimidil)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio tetrafluoroborato (83 mg, 0,28 mmol). La mezcla se agitó bajo nitrógeno a 0°C. Después de 30 minutos se quitó el enfriamiento con hielo y la mezcla se agitó durante 3 horas adicionales. El solvente se quitó *in vacuo*. El producto bruto se disolvió en acetato de etilo (50 mL), se lavó con tampón de fosfato acuoso (pH=5,5) (3x25 mL). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄), el solvente se quitó *in vacuo* para producir el compuesto del título (163 mg) que fue usado en el paso posterior.

HPLC-MS: m/z = 924; R_t = 6,5 min.

Paso 6: Síntesis de insulina humana N^εB²⁹{3-[(3,5-Bis-carboximetoxi-bencil)-(15-carboxi-pentadecanoil)-amino]-propionil desB³⁰}

[0234]



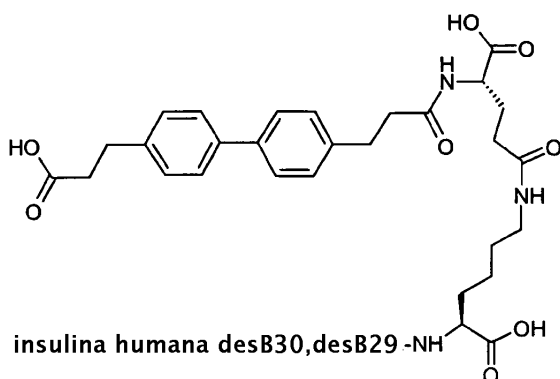
[0235] Se disolvió insulina humana DesB30 (742 mg, 0,13 mmol) en Na_2CO_3 acuoso (100 mM, 14,7 mL). Se disolvió 4-metoxi-bencil éster de ácido 15- $\{(3,5\text{-Bis-terc-butoxicarbonilmetoxibencil})\text{-[2-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-iloxycarbonil)etil]carbamoil}\}$ pentadecanoico (120 mg, 0,13 mmol) en acetonitrilo (7,4 mL) y se añadió. La mezcla se agitó muy lentamente durante 1 hora a RT. El pH se ajustó a 5,5 con HCl acuoso (1 N) y la suspensión se dejó reposar por 10 minutos a 0°C. El precipitado fue aislado por centrifugado y tratado con mezcla de p-cresol (0,750 mL) y TFA (14.25 mL) durante 10 minutos. Se vertió en el dietileter enfriado con hielo (30 ml), y el producto bruto fue aislado por centrifugador y purificado con RP-HPLC en un Waters Prep LC2000, en C18,5 cmx20 cm, flujo 20 ml/min usando gradiente de acetonitrilo/agua al 15-55 % que contiene TFA al 0,1%. Las fracciones que contenían producto fueron recogidas y liofilizadas. Al material liofilizado se añadió agua (7,2 ml) y se ajustó el pH a 8,98 con 1 N+0,1 N NaOH. El pH se ajustó de nuevo a 5,2-5,5 con 0,1 N HCl. El producto fue precipitado, aislado por centrifugado y liofilizado para dar el compuesto del título.

HPLC-MS: m/z = 1257 (m/5), R_t = 3,27 min.

Ejemplo 17

0100-0000-0562 Insulina N^{εB29}-3-[4'-(2-carboxietil)bifenil-4-il]propionil-γ-L-glutamil desB30

[0236]



20

[0237] Paso 1: Síntesis de terc-butil 3-(4-bromofenil)propionato. Se disolvió ácido 3-(4-Bromofenil)propiónico (1,0 g, 4,4 mmol) en tolueno (15 ml) y se trató con dterc-butil acetal de *N,N*-dimetilformamida (1,8 g, 8,7 mmol). La mezcla fue calentada a 90 °C durante 5 horas, y luego fue tratada con más dterc-butil acetal de *N,N*-dimetilformamida (1,8 g, 8,7 mmol). La mezcla fue dejada a 90 °C durante toda la noche. Se añadió acetato de etilo (25 ml) y la fase orgánica se lavó con 2x HCl 0,1 M, 2x Na_2CO_3 al 5% y agua. El secado sobre MgSO_4 y la evaporación *in vacuo* dieron 3-(4-bromofenil)propionato de *terc-butilo*, 0,735 g (59 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7,47 (d, 2H), 7,08 (d, 2H), 2,87 (t, 2H), 2,52 (t, 2H), 1,42 (s, 9H).

30

Paso 2: Síntesis de 3-[4'-(2-carboxi-etil)-bifenil-4-il]-propionato de tert-butilo.

[0238] Se trató 3-(4-bromofenil)propionato de terc-butilo (433 mg, 1,52 mmol) en agua de acetonitrilo (3:1,13 ml) bajo atmósfera de argón con ácido 4-(2-carboxietil)bencenoborónico (294 mg, 1,52 mmol), K_2CO_3 (251 mg, 1,82 mmol) y $(Ph_3P)_4Pd$ (87 mg, 73 μ mol), y la mezcla agitada fue calentada a 90 °C durante 4 horas. El exceso de acetato de etilo y HCl 2 M se añadieron y la fase orgánica se lavó con 2x HCl 2 M y 2x agua. El secado sobre $MgSO_4$ y la evaporación *in vacuo* dieron el producto bruto, que fue purificado por cromatografía en la columna de sílice eluida con ácido acetato/hexano/acético 50:50:1 para proporcionar 3-[4'-(2-carboxi-etil)-bifenil-4-il]-propionato de terc-butilo, 330 mg (62 %)

1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 7,50 (dd, 4H), 7,26 (dd, 4H), 3,00 (t, 2H), 2,94 (t, 2H), 2,72 (t, 2H), 2,57 (t, 2H), 1,42 (s, 9H).

10 Paso 3: Síntesis de 3-[4'-(2-O-succinimidil-carboxi-etil)-bifenil-4-il]-propionato de *terc-butilo*.

[0239] Se disolvió 3-[4'-(2-carboxi-etil)-bifenil-4-yl]-propionato de *tert*-butilo (330 mg, 0,93 mmol) en THF (5 ml) y se trató con TSTU (336 mg, 1,12 mmol) y DIEA (191 μ L, 1,12 mmol), y la mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante toda la noche. La mezcla fue filtrada, el solvente fue evaporado *in vacuo* y el producto bruto fue disuelto en el acetato de etilo y lavado con 2x HCl 0,1 M, 2x Na_2CO_3 al 5% y agua. El secado sobre $MgSO_4$ y la evaporación *in vacuo* dieron 3-[4'-(2-O-succinimidil-carboxi-etil)-bifenil-4-il]-propionato de *terc-butilo*, 374 mg (89 %).

1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 7,50 (dd, 4H), 7,27 (dd, 4H), 3,10 (t, 2H), 2,95 (m, 4H), 2,84 (s, 4H), 2,57 (t, 2H), 1,42 (s, 9H).

Paso 4: Síntesis de 3-[4'-(2-O-succinimidil-carboxi-etil)-bifenil-4-il]-propionato-L-glutamil α -*terc*-butil éster *terc-butilo*.

20 [0240] Se disolvió 3-[4'-(2-O-succinimidil-carboxi-etil)-bifenil-4-yl]-propionato *terc-butilo* (100 mg, 0,22 mmol) en DMF (1,0 ml) y se trató con L-Glu-OtBu (50 mg, 0,25 mmol) y DIEA (56 μ L, 0,33 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. El solvente se eliminó *in vacuo* y el residuo se disolvió en acetato de etilo y lavado con 2x HCl 0,2 M, agua y solución salina. El secado sobre $MgSO_4$ y la evaporación *in vacuo* dieron 3-[4'-(2-O-succinimidil-carboxi-etil)-bifenil-4-il]-propionato-L-glutamil α -*terc*-butil éster *terc-butilo*, 119 mg (100 %).

25 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 7,48 (dd, 4H), 7,24 (dd, 4H), 6,30 (bd, 1 H), 4,54 (m, 1 H), 2,95 (m, 4H), 2,56 (m, 4H), 2,31 (m, 2H), 2,16 (m, 1 H), 1,86 (m, 1 H), 1,44 (s, 9H), 1,42 (s, 9H).

Paso 5: Síntesis de 3-[4'-(2-O-succinimidil-carboxi-etil)-bifenil-4-il]-propionato-L-glutamil- γ -O-succinimidil α -*terc*-butil éster *terc-butilo*.

30 [0241] 3-[4'-(2-O-succinimidil-carboxi-etil)-bifenil-4-il]-propionato-L-Glu-OtBu *terc-butilo* (120 mg, 0,22 mmol) en THF (2 ml) y reaccionó con TSTU (80 mg, 0,27 mmol) y DIEA (46 μ L, 0,27 mmol) como se describe en el paso 3 anterior para proporcionar 3-[4'-(2-O-succinimidil-carboxi-etil)-bifenil-4-il]-propionato-L-glutamil- γ -O-succinimidil α -*terc*-butil éster *terc-butilo*, 136 mg (96%).

35 1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 7,50 (dd, 4H), 7,25 (dd, 4H), 6,21 (d, 1 H), 4,60 (m, 1 H), 3,00 (t, 2H), 2,94 (t, 2H), 2,78 (s, 4H), 2,56 (m, 6H), 2,36 (m, 1H), 2,04 (m, 1 H), 1,46 (s, 9H), 1,43 (s, 9H).

Paso 5: Síntesis de insulina N^{EB29}-3-[4'-(2-carboxi-etil)-bifenil-4-yl]-propionil- γ -L-glutamil desB30

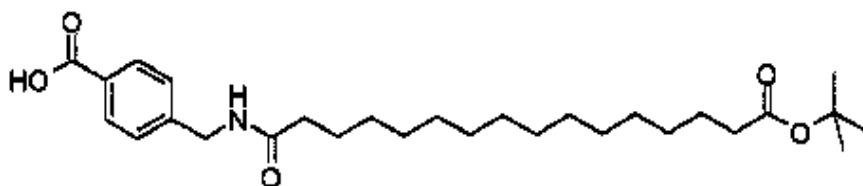
40 [0242] La insulina humana DesB30 (500 mg, 88 μ mol) fue reaccionada con 3-[4'-(2-O-succinimidil-carboxi-etil)-bifenil-4-il]-propionato-L-glutamil- γ -O-succinimidil α -*terc*-butil éster *terc-butilo* (67 mg, 105 μ mol) y el producto fue aislado, desprotegido y purificado con HPLC como describe por ejemplo 11. LCMS: 6114,0, C₂₇₆ H₃₉₉ N₆₅ O₈₁ S₆ requiere 6116,0.

45 NNC 0100-0000-0565 **Ejemplo 18 (Procedimiento general A, Acilación usando de insulina desB30)**

Insulina humana N^{EB29}- ω -carboxipentadecanoi- -(4-aminometilbenzoil)- γ -L-glutamil Insulina desB30 -Glu-desB30

Paso 1: Síntesis de ácido 4-[(15-*terc*-butoxicarbonilpentadecanoilamino)metil]benzoico

50 [0243]

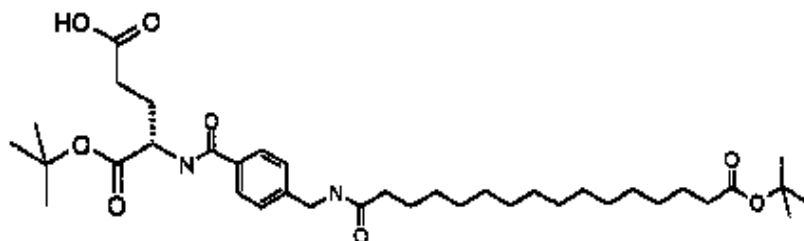


[0244] A ácido 4-(Aminometil)benzoico (0,2 g, 1,32 mmol) se añadió en NMP (5 mL). Se añadió *tert*-butil éster 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster de ácido hexadecanedioico (0,58 g, 1,32 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. La mezcla se vertió en agua (100 mL), el precipitado fue aislado por filtración y se secó *in vacuo*. El material bruto fue recristalizado de tolueno para dar ácido 4-[(15-*tert*-butoxicarbonilpentadecanoilamino)metil]benzoico (413 mg).

^1H NMR (DMSO- d_6): δ 12,77 (br s, 1 H), 8,36 (t, 1 H), 7,87 (d, 2H), 7,32 (d, 2H), 4,32 (d, 2H), 2,15 (q, 4H), 1,48 (m, 4H), 1,38 (s, 9H), 1,28-1,18 (br s, 20H)

Paso 2: Síntesis de 1- *tert*-butil éster de ácido (S)-2-{4-[(15-*tert*-Butoxicarbonil-pentadecanoilamino)-metil]-benzoilamino}-pentanedioico

[0245]

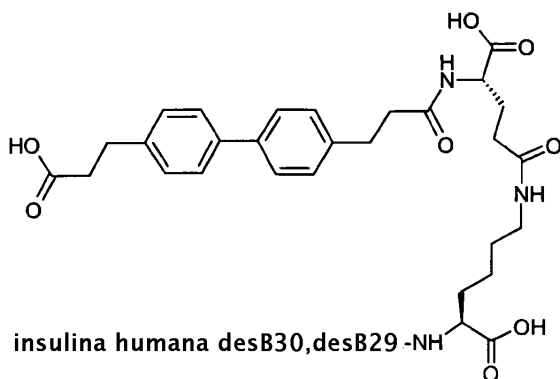


[0246] Se disolvió ácido 4-[(15-*tert*-butoxicarbonilpentadecanoilamino)metil]benzoico (413 mg, 0,868 mmol) en THF (5 mL), la solución se enfrió con un baño de hielo. Se añadieron DIPEA (0,33 mL, 1,91 mmol) y TSTU (314 mg, 1,04 mmol). La mezcla se agitó bajo nitrógeno mientras se mantenía el enfriamiento. Después de 30 minutos, se quitó el baño de hielo y la mezcla se agitó durante 3 horas adicionales a temperatura ambiente. La mezcla fue diluida con NMP (5mL) y se añadió H- GluOtBu (0,21 g, 1,04 mmol); la mezcla se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. La mezcla fue separada entre acetato de etilo (100 mL) y agua (100 mL), la fase orgánica se secó (Na_2SO_4) y se quitó el solvente *in vacuo*. El material bruto fue purificado en sílice usando DCM/etanol (90:10) para dar 1-*tert*-butil éster de ácido (S)-2-{4-[(15-*tert*-Butoxicarbonil- pentadecanoilamino)-metil]-benzoilamino}-pentanedioico.

^1H NMR (CDCl_3): δ 7,63 (d, 2H), 7,20 (m, 3H), 6,52 (t, 1 H), 4,62 (m, 1 H), 4,40 (d, 2H), 2,50 (m, 2H), 2,30-2,10 (m, 6H), 1,70-1,55 (m, 4H), 1,50 (s, 9H), 1,45 (s, 9H), 1,35-1,20 (m, 20H)

Paso 3: Síntesis de Insulina humana N^{B29} - ω -carboxipentadecanoil-(4-aminometilbenzoil) - γ -L-glutamil desB30

[0247]



[0248] El compuesto fue preparado de modo similar al que describe en el paso 3 y el paso 4 del procedimiento general B usando 1-terc-butil éster de ácido (S)-2- {4-[(15-terc-Butoxicarbonil-pentadecanoilamino)-metil]-benzoilamino}-pentanedioico.

Ejemplo 19

0572 Insulina humana N^{εB29}(4-[(2-carboxi-etil)-(15-carboxi-pentadecanoil)amino]metil)benzoil)-γ-D-glutamil desB30

Paso 1: Síntesis de Fmoc-D-Glu-OtBu unido a resina

[0249] 1 g de resina de poliestireno funcionalizada con un enlazador 2-clorotritil cloruro (1,4 mmol/g) fue agitado en vortex con NMP (10 mL) y 1,2-dicloropropano (10 mL) durante 1 hora. La resina fue filtrada y lavada con diclorometano (20 mL). Se disolvió Fmoc-D-Glu-OtBu (596 mg, 1.4 mmol) junto con diisopropiletilamina (0,96 mL, 5,6 mmol) en el diclorometano (20 mL) y se añadió a la resina. Después de la agitación de la suspensión durante 2 horas a 25 °C, la resina fue aislada por filtración y se lavó con NMP (2x20 mL).

Paso 2: Síntesis de 4-formilbenzoil-D-Glu-OtBu unido a resina

[0250] El Fmoc-d-Glu-OtBu unido a resina anterior fue tratado con una solución de piperidina al 20% en NMP (2x20 mL en 2 x 5 min), después de que la resina fuera drenada y lavada con NMP (6 x 20 mL). Se añadió NMP (10 mL) y diisopropiletilamina (0,96 mL) a la resina. Se disolvieron ácido 4-formilbenzoico (0,841 g, 5,6 mmol) y 1-hidroxibenzotriazol (0,757 g, 5,6 mmol) en NMP (10 mL), seguido de diisopropilcarbodiimida (0,867 mL, 5,6 mmol) y se agitó durante 10 minutos antes de añadirse a la resina. La mezcla se agitó durante 2 horas a 25 °C seguida de filtración y lavado de la resina con N-metil-2-pirrolidinona (3 x 20 mL).

Paso 3: Síntesis de 4-[(2-tertbutoxilcarboniletillamino)-metil]benzoil-D-Glu-OtBu unido a resina

[0251] El 4-formilbenzoil-D-Glu-OtBu unido a resina fue tratado con hidrocloreto de terc-butil beta- alanina (0,902g, 5 mmol) y diisopropilamina (0,856 mL, 5 mmol) en una mezcla de NMP y trimetilortoformato (1:1 10 mL) y ácido acético glacial(1 mL) durante 1 hora a 25 °C. El cianoborohiduro de sodio (314 mg, 5 mmol) se disolvió en una mezcla de N-metil-2-pirrolidinona y metanol (1:1,5 mL) y se añadió. La mezcla fue agitada en vortex a 25 °C durante 4 horas seguidas de filtración y lavado con una mezcla de NMP y metanol (1:1,2 x 20 mL), NMP (3 x 20 mL) y una mezcla de 1,2-dicloropropano y diisopropiletilamina (7:1,2 x 20 mL).

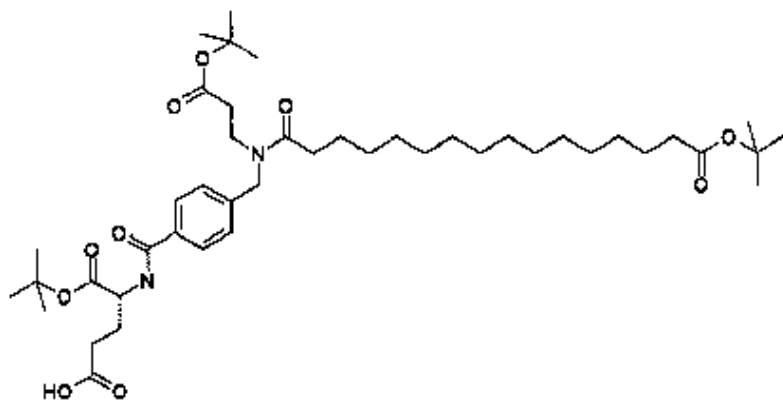
Paso 4: Síntesis de 4-[(2-terc-butoxicarboniletil)-(15-terc butoxicarbonilpentadecanoil)-amino]- metil]benzoil-D-Glu-OtBu unido a resina

[0252] Al 4-[(2-tertbutoxicarboniletillamino)-metil]benzoil-D-Glu-OtBu unido a resina anterior se añadió solución de mono-terc-butil éster de ácido hexadecanodioico (685 mg, 2 mmol) en NMP, 1,2-dicloropropano, DIPEA (4,5:4,5:1,10 mL) seguido de una solución de bromo-tris-pirrolidino-fosfonio hexafluorofosfato (pyBroP) (0,93 g, 2 mmol) disuelto en 1,2-

dicloropropano (10 mL). La mezcla fue agitada en vortex a 50 °C durante 3 horas seguidas de filtración y lavado con NMP (4 x 20 mL) y DCM (10 x 20 mL).

Paso 5: Síntesis de 4-[[[(2-*tert*-butoxicarboniletil)-(15-*tert* butoxycarbonilpentadecanoil)-amino]-metil]benzoil-D- Glu-OtBu

[0253]

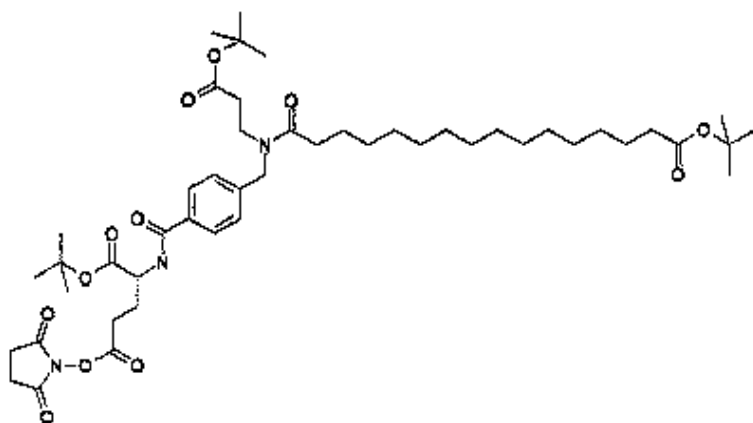


[0254] El 4-[[[(2-*tert*-butoxicarboniletil)-(15-*tert* butoxycarbonilpentadecanoil)-amino]- metil]benzoil-d-Glu-OtBu unido a resina fue tratado con DCM con TFA al 1 % (2x20mL, 2x 10 min). Después de la filtración, la fracción de DCM/TFA fue recogida y lavada con NaHCO₃ al 5% (20 mL). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄), el solvente se quitó *in vacuo* y el material bruto se purificó en la columna de silicagel eluida con DCM/EtOH 95:5 para dar 4-[[[(2-*tert*-butoxicarboniletil)-(15-*tert* butoxycarbonilpentadecanoil)-amino]-metil]benzoil-D-Glu-OtBu

¹H-NMR (CDCl₃): δ 7,80 (dd, 2H), 7,30-7,08 (m, 3H), 4,72-4,60 (m, 3H), 3,60-3,50 (m, 2H), 2,57-2,40 (m, 5H), 2,37-2,04 (m, 5H), 1,70-1,53 (m, 4H), 1,50 (s, 9H), 1,45 (m, 18H), 1,25 (m, 20 H). HPLC-MS (método 50-99): m/z = 811 (M+Na); R_t = 2,32 min.

Paso 6: Síntesis de 1-*tert*-butil éster 5-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-il) éster de ácido (R)-2-(4-[[[(2-*tert*-Butoxicarbonil-etil)-(15-*tert*-butoxicarbonil- decanoil)-amino]- metil]-benzoilamino)-pentanedioico.

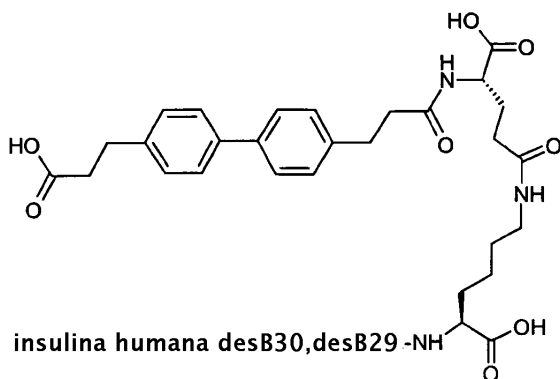
[0255]



[0256] El compuesto fue preparado de modo similar al que describe en el paso 3 en el procedimiento general A usando 1-*tert*-butil éster de ácido (R)-2-{4-[(15-*tert*-Butoxicarbonil-pentadecanoilamino)-metil]-benzoilamino)-pentanedioico. HPLC-MS (método 50-99): m/z = (908, M+Na); R_t = 2,37 min.

Paso 7: Síntesis de insulina humana N^{B29} (4-[[[(2-carboxi-etil)-(15-carboxi-pentadecanoil)amino]metil]benzoil) -γ-D-glutamil desB30

[0257]



[0258] Se disolvió insulina humana Des-B30 (386 mg, 0,068 mmol) en DMSO (3,5 mL) junto con trietilamina (0,094 mL, 0,677 mmol). Se disolvió 1-terc-butil éster 5-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-il) éster de ácido (R)-2-(4-[[[(2-terc-butoxicarbonil-etil)-(15-terc-butoxicarbonil-decanoil)-amino]-metil]-benzoilamino]-pentanedioico (60 mg, 0,068 mmol) en THF (1 mL) y se añadió. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se enfrió en un baño de hielo y se diluyó con agua Milli-Q (7 mL). El pH se ajustó a 5,5 con HCl 1 N, que condujo a precipitación. El tubo fue centrifugado y el solvente fue decantado del sólido. El sólido se lavó una vez con agua Milli-Q (7 mL), y se centrifugó otra vez. El solvente fue decantado del sólido y al sólido se añadió TFA (10 mL). La mezcla se agitó durante 30 minutos y se vertió en el dietileter (35 mL) y se centrifugó, tras el secado *in vacuo*. El material bruto fue purificado con purificador ÄKTA de modo similar al descrito anteriormente.

HPLC-MS (método Sciex): m/z = 1578 (m/4), 1262 (m/5); R_t = 3,38 min

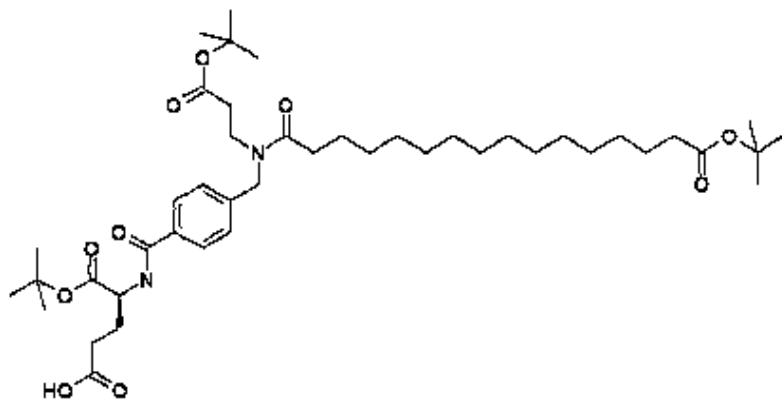
Ejemplo 20

NNC 0100-0000-0580 Insulina humana N^{εB29}-4-[[[(2-carboxietil)-(15-carboxipentadecanoil)aminolmetil]benzoil]-γ-L-glutamil desB30

(Procedimiento general A, Acilación usando de insulina humana desB30)

Paso 1: Síntesis de 1-terc-butil éster de ácido (S)-2-(4-[[[(2-terc-butoxicarbonil-etil)-(15-terc-butoxicarbonil-decanoil)-amino]-metil]-benzoilamino]-pentanedioico

[0259]



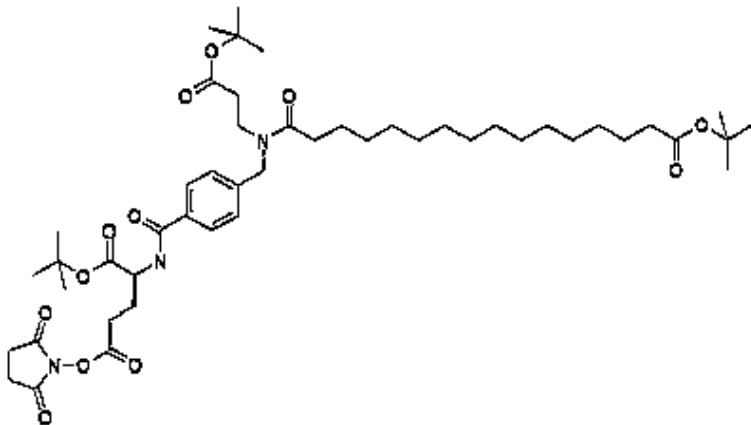
[0260] A H-Glu-OtBu, HCl (30,5 mg, 0,128 mmol) en DMF (1 mL) se añadió DIPEA (0,022 mL, 0,128 mmol), 2,5-dioxopirrolidin-1-il éster de ácido 4-[[[(2-terc-butoxicarboniletil)-(15-terc-butoxicarbonil-pentadecanoil)amino]metil]benzoico (45 mg, 0.064 mmol) se disolvió en DMF (1 mL) y se añadió. La mezcla fue agitada bajo nitrógeno a temperatura

ambiente durante toda la noche y se separó entre etilacetato y agua. La fase orgánica se secó (MgSO_4) y solvente se quitó *in vacuo*.

HPLC-MS (Método de grad. rápido): $m/z = (789, M+1)$; $R_t = 2,39$ min.

Paso 2: Síntesis de 1-terc-butil éster 5-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-il) éster de ácido (S)-2-(4-[(2-terc-Butoxicarbonil-etil)-(15-terc-butoxicarbonil-decanoil)-amino]-metil)-benzoilamino)-pentanedioico

[0261]

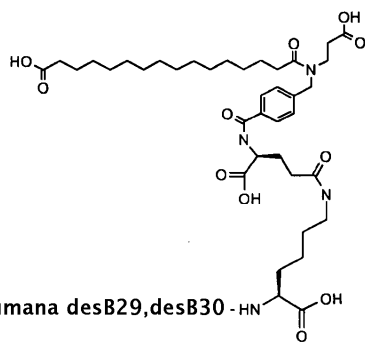


[0262] El compuesto fue preparado de modo similar al que se describe en la fase 3 en el procedimiento general A usando 1-terc-butil éster de ácido (S)-2-(4-[(15-terc-Butoxicarbonil-pentadecanoil-amino)-metil]-benzoilamino)-pentanedioico.

HPLC-MS (Método de grad. rápido): $m/z = (908, M+\text{Na})$; $R_t = 2,51$ min.

Paso 3: Síntesis de Insulina humana N^{B29} -4-[(2-carboxietil)-(15-carboxipentadecanoil)amino]metil]benzoil)- γ -L-glutamil desB30

[0263]



[0264] El compuesto fue preparado de modo similar al que se describe en el paso 4 en el procedimiento general B usando 1-terc-butil éster 5-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-il) éster de ácido (S)-2-(4-[(2-terc-butoxicarbonil-etil)-(15-terc-butoxicarbonil-decanoil)-amino]-metil)-benzoilamino)-pentanedioico.

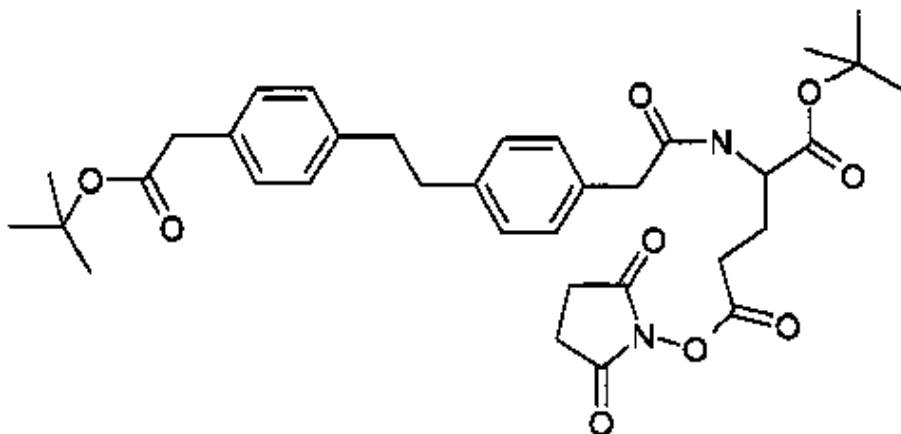
Ejemplo 21

NNC 0100-0000-0584 (Procedimiento general A)

Insulina humana N^{B29} -{4-[2-(4-carboximetilfenil)etil]fenil}acetil)- γ -L-glutamil desB30

Paso 1: Síntesis de 5-tert- butil éster 1-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-il) éster de ácido 2-(2-{4-[2-(4-tert-Butoxicarbonilmetil-feinil)-etil]-feinil}-acetilamino)-pentanedioico

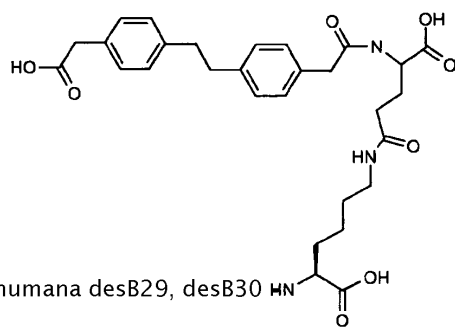
5 [0265]



10 [0266] El compuesto fue preparado de modo similar al que se describe en el ejemplo 11 paso 1 a 4 (para hexadecandioil- L-Glu(OSu)-OtBu terc-butilo) empezando de 4,4-dimetilbis(ácido fenilacético) (comprado en Sigma-Aldrich Library of Rare Chemicals).

Paso 2: Síntesis de Insulina humana N^{B29}-{4-[2-(4-carboximetilfenil)etil]fenil}acetil-γ-L-glutamil desB30

15 [0267]



Insulina humana desB29, desB30

0584

20 [0268] 5-tert-butyl éster 1-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-il) éster de ácido 2-(2-{4-[2-(4-tert-Butoxicarbonilmetil-feinil)-etil]-feinil}-acetilamino)-pentanedioico fue reaccionado con insulina humana des(B30) seguida de tratamiento con TFA de modo similar al que se describe en el procedimiento general A. Se realizó purificación por RP-HPLC en un Sistema Gilson 215 usando una columna SP 250/21 Nucleosil 300-7 C4 y un gradiente de agua/acetonitrilo al 30-80% que contenía TFA al 0,1%. Las fracciones que contenían producto fueron recogidas y liofilizadas.

25 [0269] MALDI-MS: (SA); m/z: 6117.57. HPLC ácida: Rt = 9,61 min; 98,8 % de pureza. Tiempo de ejecución 30 min. Columna: C4 5μ 150x4_60mm "phenomenex, Jupiter". Tampón A: 0,1% TFA, 99,9 % agua MQ, Tampón B: 0,1% TFA, 99,9 % acetonitrilo. Flujo: 1,5 ml/min. Gradiente: 0-17 min, 20 - 90 % B, 17 - 21 min 90 % B, 21- 23 min 90 - 20 % B, 23 - 30 min 20 % B. HPLC neutra: Rt = 4,20 min; 99,44 % de pureza. Tiempo de ejecución: 30 min. Columna: C4 5μ 150x4_60mm "phenomenex, Jupiter". Tampón A: 10 mM Tris, 15 mM (NH₄)₂SO₄, 20% acetonitrilo en agua Mili Q, pH 7,3 tampón B: 20,0 % agua MQ en acetonitrilo. Flujo: 1,5 ml/min, 1-20 min: 10 - 50% B, 20-22 min: 50-60% B, 22- 23 min: 60 - 10% B, 23-30 min 10%B 30-31 min 10%B flujo: 0,15 ml/min. 214 nm.

30

Ejemplo 22

Insulina humana N^{εB29}-(3-carboxi-4-hexdecandioilaminobenzoil) desB30

5 Paso 1: Ácido 4-nitro-isoftálico

[0270] Se disolvió permanganato de potasio (13,07 g) en agua (80 ml) en un matraz equipado con un termómetro y se añadió un condensador de reflujo. Se añadió 4-nitro-m-xileno (2,23 ml). La mezcla fue cuidadosamente calentada a 85°C. No fue necesario enfriamiento para mantener la mezcla reactiva a 85°C. Después de 20 min. la mezcla se hizo refluir suavemente durante 3h (el color morado había desaparecido y la mezcla estaba casi negra). La mezcla tibia se filtró a través de celita. El filtrado frío fue acidificado con ácido sulfúrico concentrado y se obtuvo una suspensión láctea. Extracción con EtOAc (3x)). Las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂ SO₄) y se concentraron para dar un compuesto blanco cristalino. La purificación por cromatografía en columna rápida usando EtOAc/Heptano/AcOH 10:10:1 como eluyente dio un compuesto blanco cristalino en 44% del rendimiento (1,55 g).

15 ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 8,07 (d, 1 H) 8,26 (d, 1 H) 8,33 ppm (s, 1 H).

Paso 2: 3-tert-Butil 4-Nitro-isoftalato

20 [0271]



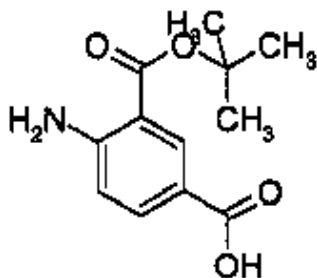
[0272] Se disolvió ácido 4-nitro-isoftálico (1,0 g) en tolueno caliente (30 ml) y DMF (2 ml). Se añadió dimetilformamida-di-tert-butyl acetato (3,4 ml) gota a gota durante 1 h como mínimo a 100°C. La agitación a 100°C fue continua durante 135 min. La mezcla reactiva fría fue concentrada para dar una mezcla cruda de materia prima, di-tert-butyl éster de ácido 4-nitro-isoftálico, 1-tert-butyl 4-nitro-isoftalato y 3-tert-butyl 4-nitro-isoftalato. La purificación por cromatografía en columna rápida usando EtOAc/Heptano/AcOH 5:15:1 o DCM/AcOH 20:1 dio como resultado aislamiento de 3-tert-butyl 4-Nitro-isoftalato contaminado con 1-tert-butyl 4-Nitro-isoftalato (10:1). Los isómeros fueron determinados por experimentos de NOE.

25 ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1,55 (s 9H), 7,89 (d, 1 H) 8,32 (d, 1 H) 8,49 ppm (s, 1 H). HPLC-MS: 268 (M+1).

30

Paso 3: 3-tert-butyl 4-amino-isoftalato

35 [0273]



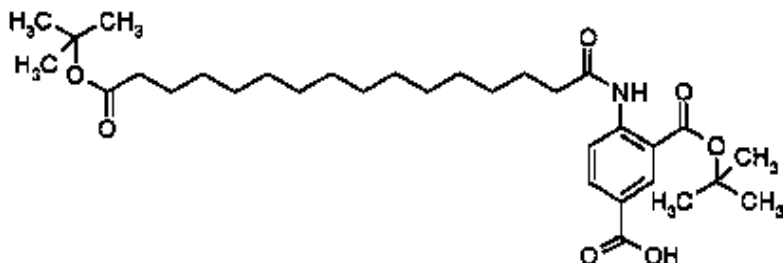
[0274] Se disolvió 3-tert-butyl 4-nitro-isoftalato (100 mg) en EtOAc (3 ml) y se añadió Pd/C al 10%. La mezcla fue hidrogenada a 1 atm durante 2 h. La mezcla fue filtrada y concentrada para dar el compuesto del título como una espuma blanca en el rendimiento cuantitativo (90 mg).

40 ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.60 (s 9H), 6.32 (d, 1 H) 7.86 (d, 1 H) 8.58 ppm (s, 1 H). HPLC-MS: 238 (M+1).

Paso 4: 3-terc-butil éster de ácido 4-(15-terc-butoxicarbonil-pentadecanoilamino)-isofáltico

[0275]

5

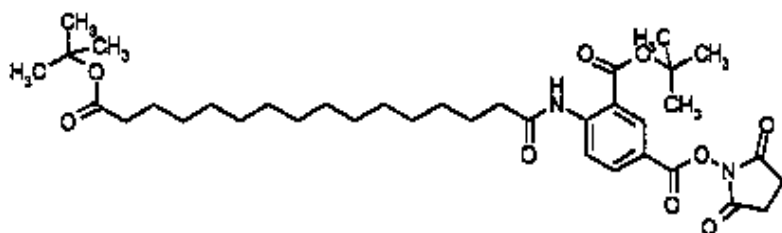


[0276] Se disolvió ácido hexadecanodioico (60 mg) en THF seco (1 ml). Se añadió N,N,N',N'-Tetrametilfluorformamidiniohexafluorofosfato (46 mg). La mezcla se agitó a RT bajo nitrógeno. Se observó un precipitado fino después de un tiempo. Después de 75 min., se añadieron 3-terc-butil 4-amino-isofalato (9:1 mezcla, 45 mg) y DIPEA (0,05 ml). Después 5 días la mezcla fue concentrada. El residuo se disolvió en EtOAc y se extrajo con HCl 0,1 M (2x), se lavó con solución salina (1x), se secó (Na₂ SO₄) y se concentró para dar un almíbar, que fue purificado por cromatografía en columna rápida usando EtOAc/Hept/AcOH 4:16:1 para dar el producto contaminado con mono-T-Bu éster de ácido hexadecanodioico 1:4. (63 mg).
HPLC-MS: 562 (M+1).

Paso 5: 3-terc-butil éster 1-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-il) éster de ácido 4-(15-terc-Butoxicarbonil-pentadecanoilamino)-isofáltico

[0277]

20

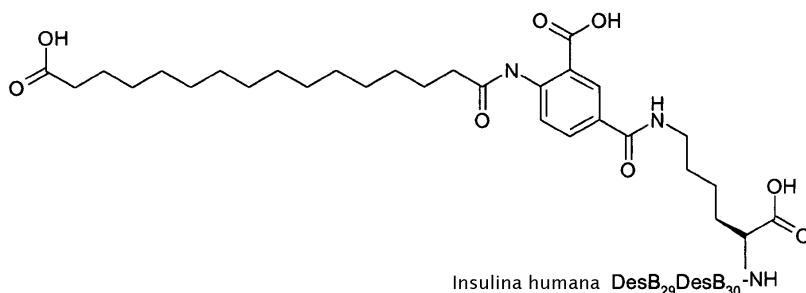


[0278] El compuesto fue preparado de modo similar al que se describe en el ejemplo 1 (procedimiento general A) paso 3 usando en cambio 3-terc-butil éster de ácido 4-(15-terc-butoxicarbonilo-pentadecanoilamino)-isofáltico.
HPLC-MS: 659 (M+1).

Paso 6: Insulina humana N^{B29}-(3-carboxi-4-hexdecandioilaminobenzoil) desB30

[0279]

30



0588

3-tert-butil éster 1-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-il) éster de ácido 4-(15-terc-Butoxicarbonil-pentadecanoilamino)-isofáltico fue reaccionado con insulina humana B30 A1,B1,BOC,BOC seguido por tratamiento de TFA de modo similar al descrito en el procedimiento general B. Se realizó purificación por RP-HPLC en un Sistema Gilson 215 usando una columna SP 250/21 Nucleosil 300-7 C4 y un gradiente de agua/acetonitrilo al 20-80% que contenía TFA al 0,1%. Las fracciones que

5

10

[0280] MALDI-MS: (SA); m/z: 6140.3. HPLC acídica: Rt = 11,27 min; 83,4% de pureza. Tiempo de ejecución: 30 min. Columna :C4 5μ 150x4 60mm " fenomenex, Júpiter ". Tampón A: 0,1 % TFA, 99,9 % agua MQ, Tampón B: 0,1 % TFA, 99,9 % acetonitrilo. Flujo: 1,5 ml/min. Gradiente: 0-17 min, 20 - 90 % B, 17 - 21 min 90 % B, 21- 23 min 90 - 20 % B, 23 - 30 min 20 % B. HPLC neutra: Rt = 9,10 min; 92,6% de pureza: Tiempo de ejecución: 30 min columna: C4 5μ 150x4 60mm " phenomenex, Jupiter ". Tampón A: 10 mM Tris, 15 mM (NH₄)₂SO₄,20% acetonitrilo en agua Mili Q, pH 7,3 tampón B: 20,0 % agua MQ en acetonitrilo. Flujo:1,5 ml/min 1-20 min: 5% B til 50% B, 20- 22 min: 50-60% B, 22- 23 min: 60% B til 5% B, 23-30 min 5 til 0%B 30-31min 0-5%B, flujo:0,15 ml/min. 214 nm.

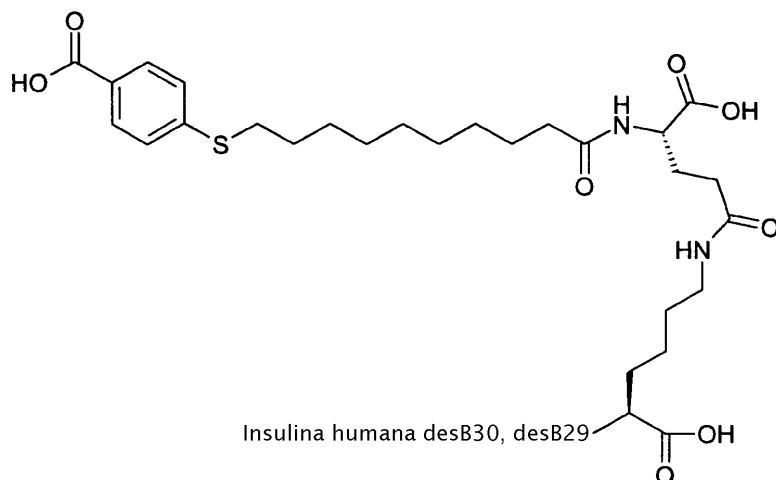
15

Ejemplo 23

0100-0000-0593 Insulina humana N^εB₂₉-10-(4-carboxifenilsulfanil) decanoil-γ-L-glutamil desB30

20

[0281]



25

Paso 1: Ácido 4-(9-metoxycarbonil nonilsulfanil) benzoico

[0282] El ácido 4-mercaptobenzoico (2,0 g, 13 mmol) fue colocado en THF (25 ml). Se añadió DIEA (3.7 g, 28,5 mmol) seguido de una solución de metilo 10-bromodecanoato (3,44 g, 13 mmol) en THF (10 ml). Después 1 h, el solvente se quitó al vacío para producir un compuesto acuoso, que fue almacenado a rt durante 3 días. Se añadieron AcOEt (100 ml) y 1 N HCl (50 ml), pero el precipitado no se disolvió muy bien. Se añadió NaCl saturado y luego metanol para ayudar a la separación de fases. Se quitó la fase acuosa y se añadió DCM a la fase orgánica, pero los precipitados todavía no se disolvieron. La fase orgánica fue concentrada en vacío y se secó con tolueno añadiendo y evaporando dos veces. El secado al vacío liberó un sólido blanco (4,4 g, rendimiento cuantitativo).
HPLC-MS (grad. rápido) m/z: 361 (M+23), R_t = 2,34 min.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 300 MHz) δ 12,86 (br, 1H), 7,84 (d, 2H), 7,37 (d, 2H), 3,57 (s, 3H), 3,03 (t, 2H), 2,28 (t, 2H), 1,33- 1,69 (m, 6H), 1,24 (s, 8H).

Paso 2: tert-butil éster de ácido 4-(9-metoxycarbonil nonilsulfanil) benzoico

[0283] Se suspendió ácido 4-(9-metoxycarbonil nonilsulfanil) benzoico (4,4 g, 13 mmol) en tolueno seco (150 ml), bajo N_2 . La mezcla se hizo refluir y se añadió una solución de di-terc-butilo acetal de N,N-dimetilformamida (7,93 g, 39 mmol) en tolueno (50 ml) durante aproximadamente 15 min. Después de refluir 16 h, se dejó enfriar la reacción y se produjo alguna precipitación. TLC (1:2 AcOEt/heptano) indicó aproximadamente 50% de finalización. La reacción fue calentada a 70 °C y se añadió otra parte de di-terc-butilo acetal de N,N-dimetilformamida (7,93 g, 39 mmol) en tolueno (50 ml) durante 1.5 h. Después de agitar durante una hora adicional a 70 °C, la muestra fue concentrada al vacío para producir un aceite marrón. La purificación por cromatografía en columna rápida (15 cm x 40 mm dia., 1:2 AcOEt/heptano) produjo un aceite amarillo (3,65 g, 71%)
HPLC-MS (grad. rápido) m/z: 417 (M+23), R_t = 3,03 min.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7,88 (d, 2H), 7,26 (d, 2H), 3,66 (s, 3H), 2,96 (t, 2H), 2,30 (t, 2H), 1,60-1,75 (m, 4H), 1,59 (s, 9H), 1,43 (t-br, 2H), 1,29 (s, 8H).

Paso 3: Tert-butil éster de ácido 4-(9-carboxinonilsulfanil) benzoico

[0284] Tert-butil éster de ácido 4-(9-metoxycarbonil nonilsulfanil) benzoico (2,46 g, 6,2 mmol) fue disuelto en THF (25 ml). Se añadió NaOH 1 N (6,2 ml, 6,2 mmol) y la mezcla se agitó bajo N_2 durante 1 d. Se añadió HCl 1 N (6,5 ml) diluido con agua (100 ml) y luego se añadió AcOEt (100 ml). La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 y se concentró al vacío para producir un sólido blanco (2,5 g).
HPLC-MS (grad. rápido) m/z: 403 (M+23), R_t = 2,69 min.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 300 MHz) δ 11,99 (br, 1 H), 7,79 (d, 2H), 7,36 (d, 2H), 3,03 (t, 2H), 2,18 (t, 2H), 1,60 (m, 2H), 1,53 (s, 9H), 1,32-1,51 (m, 4H), 1,24 (s, 8H).

[0285] Paso 4: Se disolvió 5-bencil éster 1- terc-butil éster de ácido (S)-2-[10-(4-terc-Butoxicarbonilfenilsulfanil) decanoilamino] pentanedioico terc-butil éster de ácido 4-(9-carboxinonilsulfanil) benzoico (1 g, 2,6 mmol) en THF (10 ml) y se añadieron EDAC (0,53 g, 2,8 mmol), HOBT (0,39 g, 2,9 mmol) y DIEA (1,0 g, 7,8 mmol). La solución se agitó bajo N_2 . Se formó un precipitado formado y se añadió DMF (10 ml) y se obtuvo una solución clara. Después de agitar a rt durante 30 min, se añadió H-Glu(OBzl)-OtBu (0,87 g, 2,6 mmol). La solución se agitó bajo N_2 durante 16 h a rt. La muestra fue concentrada al vacío. Se añadió AcOEt (100 ml) y la solución se lavó con agua (50 ml), y HCl 0,2 M (2 x 50 ml), y se secó sobre MgSO_4 y se concentró al vacío para producir un petróleo ligero. La purificación por cromatografía en columna rápida (15 cm x 40 mm diá., 1:2 AcOEt/heptano) produjo un aceite incoloro (401 + 525 mg, 54% de rendimiento).

HPLC-MS (50-99) m/z: 656 (M+1), R_t = 2,44 min.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7,87 (d, 2H), 7,35 (s, 5H), 7,25 (d, 2H), 6,07 (d, 1 H), 4,52 (m, 1 H), 2,95 (t, 2H), 2,31- 2,35 (m, 2H), 2,11-2,27 (m, 3H), 1,88-2,03 (m, 1 H), 1,53-1,71 (m, 13H), 1,46 (s, 9H), 1,42 (m, 2H), 1,28 (m, 8H).

[0286] Paso 5: Se disolvió 1-terc-butil éster de ácido (S)-2-[10-(4-terc-butoxicarbonilfenilsulfanil) decanoilamino] pentanedioico 5-bencil éster 1-terc-butil éster de ácido (S)-2-[10-(4-terc-butoxicarbonilfenilsulfanil) decanoilamino] pentanedioico (385 mg, 0,587 mmol) en THF. Se añadió NaOH 1 N (587 μl , 0,587 mmol) y la solución se agitó durante 16 h a rt bajo N_2 . El solvente se había evaporado, de modo que se añadió más THF (3 ml). Se añadió AcOEt (40 ml) y HCl diluido (1 ml HCl 1N en 25 ml de agua). Las fases fueron separadas y la fase acuosa se extrajo con AcOEt (15 ml). Las fases orgánicas fueron agrupadas y lavadas con NaCl saturado y se secaron sobre MgSO_4 . La solución fue concentrada al vacío para producir un aceite marrón claro. El aceite fue purificado por cromatografía en columna rápida (7,5 cm x 40 mm diá., 20:20:1 AcOEt/heptano/AcOH) y después de concentrar las fracciones apropiadas al vacío, se

añadió tolueno y se quitó al vacío un par de veces para eliminar el AcOH residual para producir un aceite incoloro (160 mg, 48% de rendimiento).

HPLC-MS (50-99) m/z: 566 (M+1), $R_t = 1,65$ min.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7,87 (d, 2H), 7,26 (d, 2H), 6,25 (d, 1H), 4,52 (m, 1H), 2,96 (t, 2H), 2,38-2,47 (m, 2H), 2,12-2,30 (m, 3H), 1,82-1,99 (m, 1 H), 1,60-1,75 (m, 4H), 1,58 (s, 9H), 1,47 (s, 9H), 1,36-1,45 (m, 2H), 1,28 (s, 8H).

[0287] Paso 6: 5-terc-butil éster 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) éster de ácido (S)-2-[10-(4-terc-Butoxicarbonilfenilsulfanil) decanoilamino] pentanedioico 1- terc-butil éster de ácido (S)-2-[10-(4-terc-Butoxicarbonilfenilsulfanil) decanoilamino] pentanedioico (156 mg, 0,276 mmol) se disolvió en THF (3 ml). Se añadió DIEA (47 μl , 0,276 mmol) y la solución se enfrió a 0 °C. Se añadió TSTU (99 mg, 0,276 mmol) y la solución se agitó bajo nitrógeno a 0 °C durante 30 min, y luego a rt durante 16 h. La muestra fue concentrada al vacío y dividida entre AcOEt y HCl 0,2 N. La fase orgánica se secó sobre MgSO_4 y concentrada al vacío para producir un residuo (194 mg).

HPLC-MS (50-99) m/z: 686 (M+23), $R_t = 1,46$ min.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400 MHz) δ 8,12 (d, 1 H), 7,79 (d, 2H), 7,36 (d, 2H), 4,16 (m, 1 H), 3,03 (t, 2H), 2,81 (s, 4H), 2,61-2,78 (m, 4H), 2,10 (t, 2H), 1,99-2,07 (m, 1 H), 1,80-1,94 (m, 1 H), 1,42-1,66 (m, 11 H), 1,38 (s, 9H), 1,24 (s, 8H). (singlete a 2,69, aprox. 2H de impureza posible).

Paso 7: Insulina humana N^{εB29}-10-(4-carboxifenilsulfanil) decanoil-γ-L-glutamil desB30

Método de acoplamiento general y desprotección A:

[0288] Se disolvió insulina Des-B30 (125 mg, 0,022 mmol) añadiendo Na_2CO_3 100 mM (1,5 ml) y acetonitrilo (1,5 ml) en un matraz de fondo redondo de 10 ml. Se añadió 5-terc-butil éster 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-il) éster de ácido (S)-2-[10-(4-terc-butoxicarbonilfenilsulfanil) decanoilamino] pentanedioico (14,5 mg, 0,022 mmol) en acetonitrilo (750 μl) y se añadió Na_2CO_3 (750 μl) de modo que la solución final fue 50:50 Na_2CO_3 /acetonitrilo 100 mM. La solución se agitó a rt durante 1 h. La solución fue transferida a un tubo de centrifugador de 15 ml, lavando con agua Milli-Q (6 ml). La solución se enfrió en hielo y el pH se ajustó a 5,1 añadiendo HCl 1 N, lo que produjo precipitación. El tubo fue centrifugado a 5000 r.p.m. durante 10 min a 10 °C. El solvente fue decantado del sólido. Se añadió 95:5 TFA/agua (2,5 ml) al sólido. La solución fue vertida en un matraz, lavando con más 95:5 TFA/agua (2,5 ml). La solución se agitó durante 30 min a rt, y se concentró al vacío. DCM se añadió y se quitó dos veces, y el matraz se secó al vacío a rt. El producto fue purificado por HPLC preparatoria (columna C_{18} 2 cm diám., acetonitrilo/agua/TFA al 0,05%). Las fracciones pertinentes fueron agrupadas (dos lotes) y diluidas 1:1 con agua. Las soluciones se enfriaron en hielo, y la precipitación fue inducida por ajuste del pH a aprox. 5 con 1 N NaOH. Las muestras fueron centrifugadas (5000 r.p.m., 10 min, 5 °C). El líquido fue decantado y los gránulos fueron liofilizados para producir un sólido blanco (30 mg + 5 mg).

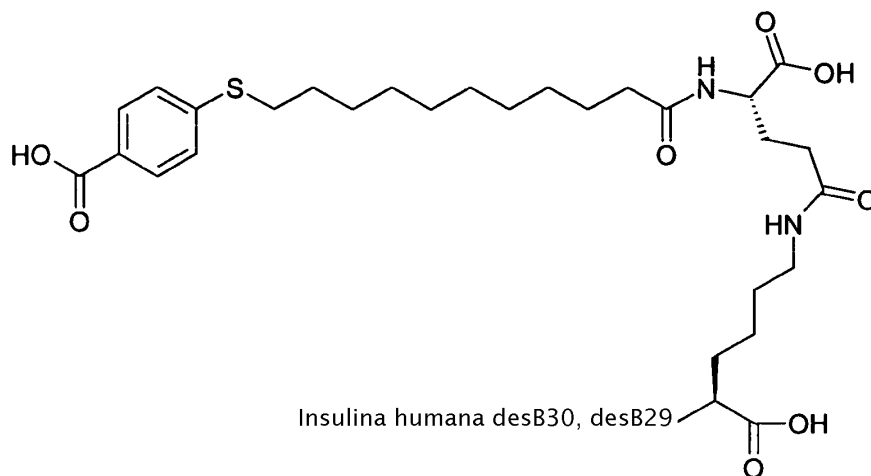
HPLC-MS (Sciex) m/z: 1536,7 (M/4+1=1536.5), $R_t = 3,2$ min.

HPLC (neutra) $R_t = 5,60$ min.

Ejemplo 24

Insulina humana N^{εB29}-11-(4-carboxifenilsulfanil) undecanoil-γ-L-glutamil desB30

[0289]



[0290] Se realizaron los siguientes pasos en la síntesis de Insulina humana $N^{\epsilon}B^{29}$ -11-(4-carboxifenilsulfanil) undecanoil- γ -L-glutamil desB30 de forma similar a las descritas para la insulina humana $N^{\epsilon}B^{29}$ -10-(4-carboxifenilsulfanil) decanoil- γ -glutamil desB30

5

Paso 1: Ácido 4-(10-metoxicarbonildecilsulfanil) benzoico

[0291] HPLC-MS (grad. rápido) m/z: 375 (M+23), R_t = 2,44 min.

10 1H -NMR (DMSO, 300 MHz) δ 12,85 (br, 1 H), 7,83 (d, 2H), 7,36 (d, 2H), 3,57 (s, 3H), 3,03 (t, 2H), 2,28 (t, 2H), 1,60 (m, 2H), 1,58 (m, 2H), 1,40 (m, 2H), 1,23 (s, 10H).

Paso 2: Tert-butil éster de ácido 4-(10-metoxicarbonildecilsulfanil) benzoico

15 [0292] 1H -NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,87 (d, 2H), 7,26 (d, 2H), 3,67 (s, 3H), 2,96 (t, 2H), 2,30 (t, 2H), 1,57-1,75 (m, 13H), 1,45 (m, 2H), 1,28 (s, 10H),

Paso 3: Tert-butil éster de ácido 4-(10-carboxidecilsulfanil) benzoico

[0293] HPLC-MS (50-99) m/z: 417 (M+23), R_t = 1,82 min.

20 1H -NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,87 (d, 2H), 7,26 (d, 2H), 2,96 (t, 2H), 2,35 (t, 2H), 1,55-1,74 (m, 13H), 1,43 (m, 2H), 1,28 (s, 10H).

Paso 4: 5-bencil éster 1-terc-butil éster de ácido (S)-2-[11-(4-terc-Butoxicarbonilfenilsulfanil) undecanoilamino] pentanedioico

25

[0294] 1H -NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,86 (d, 2H), 7,35 (s, 5H), 7,26 (d, 2H), 6,06 (d, 1 H), 5,11 (s, 2H), 4,52 (m, 1 H), 2,96 (t, 2H), 2,39 (m, 2H), 2,11-2,28 (m, 3H), 1,88-2,06 (m, 1 H), 1,60-1,73 (m, 4H), 1,58 (s, 9H), 1,46 (s, 9H), 1,35-1,43 (m, 2H), 1,26 (s, 10H).

30 Paso 5: 1-terc-butil éster de ácido (S)-2-[11-(4-terc-butoxicarbonilfenilsulfanil) undecanoilamino] pentanedioico

[0295] HPLC-MS (50-99) m/z: 602 (M+23), R_t = 1,80 min.

1H -NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,87 (d, 2H), 7,26 (d, 2H), 6,25 (d, 1 H), 4,52 (m, 1 H), 2,96 (t, 2H), 2,40 (m, 2H), 2,14-2,31 (m, 3H), 1,80-1,98 (m, 1 H), 1,60-1,75 (m, 4H), 1,58 (s, 9H), 1,47 (s, 9H), 1,36-1,45 (m, 2H), 1,26 (s, 10H).

35

Paso 6: 5-terc-butil éster 1-(2,5- dioxo-pirrolidin-1-il) éster de ácido(S)-2-[11-(4-terc-butoxicarbonilfenilsulfanil) undecanoilamino] pentanedioico

[0296] HPLC-MS (50-99) m/z: 699 (M+23), R_t = 2,05 min.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,87 (d, 2H), 7,26 (d, 2H), 6,19 (d, 1 H), 4,60 (m, 1 H), 2,96 (t, 2H), 2,84 (s, 4H), 2,68- 2,78 (m, 1 H), 2,56-2,67 (m, 1 H), 2,27-2,39 (m, 1 H), 2,22 (t, 2H), 2,01-2,14 (m, 1 H), 1,59-1,75 (m, 4H), 1,58 (s, 9H), 1,48 (s, 9H), 1,37-1,46 (m, 2H), 1,28 (s, 10H).

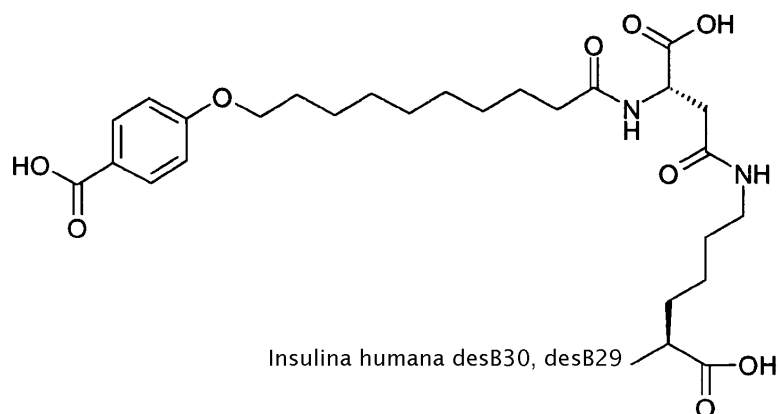
5 Paso 7: Insulina B29N(eps)-11-(4-carboxi-fenilsulfanil) undecanoil gamma-Glu desB30

[0297] HPLC-MS (Sciex) m/z: 1539,8 (M/4+1=1540) Rt: 3,5 min.
HPLC (neutra) R_t = 5,93.

10 Ejemplo 25

Insulina 0100-0000-0602 N^{B29}-10-(4-carboxifenoxi) decanoil beta-Asp desB30

[0298]



15

[0299] Paso 1: Se disolvieron terc-butil éster de ácido 4-(9-metoxycarbonilnoniloxi) benzoico terc-butil éster de ácido 4-hidroxibenzoico (500 mg, 2,57 mmol) y éster de metilo de ácido 10-bromodecanoico (683 mg, 2,57 mmol) en acetonitrilo y se añadió K₂ CO₃. La mezcla se hizo refluir bajo nitrógeno durante 16 h. Los sólidos fueron filtrados y el filtrado se concentró al vacío. El residuo se disolvió en AcOEt (50 ml) y agua (25 ml). Las fases fueron separadas y la fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y se concentró para producir un aceite incoloro (874 mg, 90% de rendimiento).
HPLC-MS (50-99) m/z: 402 (M+23), R_t = 1,65 min.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,92 (d, 2H), 6,87 (d, 2H), 3,99 (t, 2H), 3,67 (s, 3H), 2,31 (t, 2H), 1,78 (m, 2H), 1,62 (m, 2H), 1,58 (s, 9H), 1,45 (m, 2H), 1,31 (s, 8H).

25

[0300] Paso 2: Se disolvió terc-butil éster de ácido 4-(9-carboxinoniloxi) benzoico terc-butil éster de ácido 4-(9-metoxycarbonilnoniloxi) benzoico (858 mg, 2,27 mmol) en THF (5 ml). Se añadió 1 N NaOH (2,27 ml) y la mezcla se cubrió ligeramente con un septo de goma y se agitó durante 16 h a rt. Se añadieron AcOEt (40 ml) y 1,05 eq 1 N HCl en agua (25 ml). Las fases fueron separadas y la fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y se concentró al vacío para producir un sólido blanco (781 mg, 95% de rendimiento).
HPLC-MS (50-99) m/z: 387 (M+23), R_t = 1,46 min.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,92 (d, 2H), 6,87 (d, 2H), 3,99 (t, 2H), 2,35 (t, 2H), 1,75 (m, 2H), 1,64 (m, 2H), 1,58 (s, 9H), 1,45 (m, 2H), 1,32 (s, 8H).

35

[0301] Paso 3: Se disolvió terc-butil éster de ácido 4-[9-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxycarbonil) noniloxi] benzoico terc-butil éster de ácido 4-(9-carboxinoniloxi) benzoico (779 mg, 2,14 mmol) en THF (15 ml) y se añadió DIEA (366 µl, 2,14 mmol). La solución se enfrió a 0 °C y se colocó bajo nitrógeno. Se añadió TSTU (768 mg, 2,14 mmol). La solución se agitó a 0 °C durante 30 min luego a rt durante 16 h. La muestra fue concentrada al vacío. Se añadió AcOEt (40 ml), y la solución se lavó con 0,2 N HCl (2 x 25 ml), se secó sobre MgSO₄ y se concentró al vacío para producir un sólido amarillento. El sólido fue recristalizado de AcOEt para producir un polvo blanco (276 mg, 28%).
HPLC-MS (50-99) m/z: 484 (M+23), R_t = 1,71 min.

40

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,92 (d, 2H), 6,87 (d, 2H), 3,99 (t, 2H), 2,83 (s, 4H), 2,61 (t, 2H), 1,67-1,88 (m, 4H), 1,58 (s, 9H), 1,27-1,52 (m, 10H).

[0302] Paso 4: Se disolvió 1-terc-butil éster de ácido (S)-2-[10-(4-terc-butoxicarbonilfenoxi) decanoilamino] succínico terc-butil éster de ácido 4-[9-(2,5- dioxopirrolidin-1-iloxycarbonil) noniloxi] benzoico (264 mg, 0,57 mmol) en DMF (2,5 ml). Se añadió H-Asp-OtBu y más DMF (2, ml). Después 1 h s añadió A (1 eq., 98 ul) y después de 30 min se añadió más DMF (5 ml). Todavía había numerosos sólidos no disueltos. Después 1 d a rt, el solvente se quitó al vacío. Se añadió AcOEt (40 ml) y la solución se lavó con 0,2 N HCl (2 x 25 ml), se secó sobre MgSO₄ y se concentró al vacío para producir un aceite opaco (283 mg, 92% de rendimiento).

HPLC-MS (50-99) m/z: 558 (M+23), R_t = 1,57 min.

¹H-NMR (DMSO, 300 MHz) δ 12,40 (br, 1 H), 8,14 (d, 1H), 7,82, (d, 2H), 6,99 (d, 2H), 4,44 (q, 1 H), 4,02 (t, 2H), 2,52-2,92 (m, 2H), 2,08 (t, 2H), 1,71 (t, 2H), 1,20-1,55 (m, 28H).

[0303] Paso 5: Se disolvió 4-terc-butil éster 1-(2,5- dioxopirrolidin-1-il) éster de ácido (S)-2-[10-(4-terc-butoxicarbonilfenoxi) decanoilamino] succínico 1-terc-butil éster de ácido (S)-2-[10-(4-terc-butoxicarbonilfenoxi) decanoilamino] succínico (261 mg, 0,49 mmol) en THF (5 ml). La solución se enfrió a 0 °C y se añadieron DIEA (100 µl, 0,59 mmol) y TSTU (175 mg, 0,49 mmol). La mezcla se agitó durante 16 h en un baño de hielo pequeño, de manera que éste pudiera calentarse a RT después de aprox. 1 h. La muestra se concentró al vacío. Se añadió AcOEt (40 ml) y la solución se lavó con 0,2 N HCl (2 x 25 ml), se secó sobre MgSO₄ y se concentró al vacío para producir un aceite incoloro que contenía algún sólido blanco. El producto fue purificado por cromatografía en columna rápida (35 g de sílice, 400 ml 1:1 AcOEt/heptano y 100 ml 7:3 AcOEt/heptano) para producir un sólido blanco (200 mg, 65% de rendimiento).

HPLC-MS (Sciex) m/z: 633 (M+1), R_t = 6,09 min.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,91 (d, 2H), 6,87 (d, 2H), 6,51 (d, 1 H), 4,83 (m, 1H), 3,99 (t, 2H), 3,24 (m, 2H), 2,83 (s, 4H), 2,25 (t, 2H), 1,78 (m, 2H), 1,62-1,70 (m, 2H), 1,58 (s, 9H), 1,47 (s, 9H), 1,36-1,46 (m, 2H), 1,31 (s, 8H).

Paso 6: Insulina 0100-0000-0602 N^εB²⁹-10-(4-carboxifenoxi) decanoil beta-Asp desB30

[0304] El compuesto fue preparado usando el Método de acoplamiento general y desprotección A para producir un sólido blanco (26 mg y 8 mg).

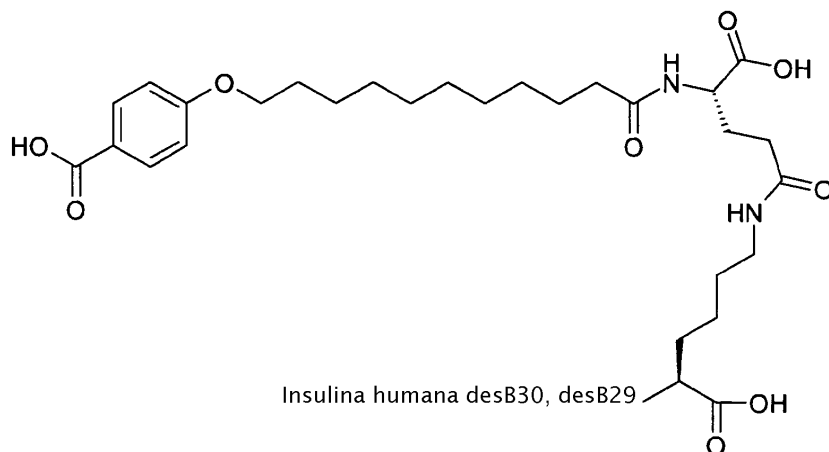
HPLC-MS (Sciex) m/z: 1529,3 (M/4+1=1529), R_t = 3,4 min.

HPLC (neutra) R_t = 5,31 min.

Ejemplo 26

Insulina 0100-0000-0600 N^εB²⁹-11-(4-carboxi-fenoxi) undecanoil γ-L-glutamil desB30

[0305]



[0306] Los siguientes pasos en la síntesis de la insulina N^εB²⁹-11-(4-carboxi-fenoxi) undecanoil γ-L-glutamil desB30 se realizaron de forma similar a las descritas para la insulina N^εB²⁹-10-(4-carboxifenoxi) decanoil beta-Asp desB30.

Paso 1: Terc-butil éster de ácido 4-(10-metoxicarbonildeciloxi) benzoico

[0307] HPLC-MS (50-99) m/z: 415 (M+23), R_t = 2,31 min.

5 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7,92 (d, 2H), 6,87 (d, 2H), 3,99 (t, 2H), 3,67 (s, 3H), 2,30 (t, 2H), 1,79 (m, 2H), 1,62 (m, 2H), 1,58 (s, 9H), 1,43 (m, 2H), 1,30 (s, 10H).

Paso 2: Tert-butil éster de ácido 4-(10-carboxideciloxi) benzoico

10 [0308] HPLC-MS (grad. rápido) m/z: 401 (M+23), R_t = 2,71 min.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7,92 (d, 2H), 6,87 (d, 2H), 3,98 (t, 2H), 2,34 (t, 2H), 1,78 (m, 2H), 1,62 (m, 2H), 1,58 (s, 9H), 1,44 (m, 2H), 1,30 (s, 10H).

Paso 3: Terc-butil éster de ácido 4-[10-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxycarbonil) deciloxi] benzoico

15

[0309] HPLC-MS (50-99) m/z: 498 (M+23), R_t = 1,89 min.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7,92 (d, 2H), 6,88 (d, 2H), 3,99 (t, 2H), 2,84 (s, 4H), 2,60 (t, 2H), 1,66-1,90 (m, 4H), 1,58 (s, 9H), 1,43 (m, 2H), 1,32 (s, 10H).

20 Paso 4: 1-terc-butil éster de ácido (S)-2-[11-(4-terc-butoxicarbonilfenoxi) undecanoilamino] pentanedioico

[0310] HPLC-MS (50-99) m/z: 564 (M+1), R_t = 1,68 min.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7,92 (d, 2H), 6,87 (d, 2H), 4,50 (br, 1 H), 3,98 (t, 2H), 2,38 (br, 2H), 2,24 (t, 2H), 2,04-2,20 (br, 1 H), 1,82-1,98 (br, 1 H), 1,69-1,82 (m, 2H), 1,59-1,67 (m, 2H), 1,57 (s, 9H), 1,38-1,50 (m, 11 H), 1,29 (s, 10H).

25

Paso 5: 1-terc-butil éster 5-(2,5- dioxopirrolidin-1-yl) éster de ácido (S)-2-[11-(4-terc-butoxicarbonilfenoxi) undecanoilamino] pentanedioico

[0311] HPLC-MS (50-99) m/z: 683 (M+23), R_t = 1,91 min.

30 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7,92 (d, 2H), 6,87 (d, 2H), 6,20 (d, 1 H), 4,60 (m, 1 H), 3,99 (t, 2H), 2,84 (s, 4H), 2,54-2,80 (m, 2H), 2,26-2,42 (m, 1 H), 2,22 (t, 2H), 2,04-2,15 (m, 1 H), 1,72-1,88 (m, 2H), 1,60-1,70 (m, 2H), 1,58 (s, 9H), 1,48 (s, 9H), 1,39-1,46 (m, 2H), 1,30 (s, 10H).

Paso 6: Insulina N^{B29} -11-(4-carboxi-fenoxi) undecanoil γ -L-glutamyl desB30

35

[0312] HPLC-MS (Sciex) m/z: 1536,4 (M/4+1=1536,0), R_t = 3,92 min.

HPLC (neutra) R_t = 5,18 min.

Ejemplo 27

40

Unión al receptor de insulina de los derivados de insulina de la invención

[0313] La afinidad de los derivados de insulina de la invención para el receptor de insulina humana fue determinado por un ensayo de captura de anticuerpo de placa de microtitulación de ensayo SPA (ensayo de proximidad de centelleo). Las perlas de unión al anticuerpo SPA-PVT, reactivo anti-ratón (Amersham Biosciences, Cat No. PRNQ0017) se mezclaron con 25 ml de tampón de unión (100 mM HEPES pH 7, 8,100 mM de cloruro sódico, 10 mM de MgSO_4 , 0,025% Tween-20). La mezcla reactiva para un solo Packard Optiplate (Packard No. 6005190) está compuesta de 2,4 μl de un receptor insulina humana recombinante purificada :5000 diluido 1:5000 - exón 11, una cantidad de una solución madre de A14 Tyr ^{125}I -insulina humana correspondiente a 5000 cpm por 100 μl de mezcla reactiva, 12 μl de una dilución 1:1000 de anticuerpo F12, 3 ml de perlas de SPA y tampón de unión a un total de 12 ml. Luego se añadió un total de 100 μl y se hizo una serie de dilución de muestras apropiadas. A la serie de dilución luego se añadió 100 μl de mezcla reactiva y las muestras fueron incubadas durante 16 horas mientras se agitaban suavemente. Las fases luego fueron separadas por centrifugado durante 1 min y las placas contadas en un Topcounter. Los datos de unión fueron equipados usando el algoritmo de regresión no lineal en el GraphPad Prism 2.01 (GraphPad Software, San Diego, CA).

50

Producto	Unión al receptor (% de insulina humana)
Insulina humana	100
Insulina humana 0496 N ^ε B ²⁹ -[N-(HOOC(CH ₂) ₁₄ CO)-N-(carboxietil)-CH ₂ - para-C ₆ H ₄ CO] desB30	18
Insulina humana 0515 N ^ε B ²⁹ -[N-(HOOC(CH ₂) ₁₃ CO)-N-(carboxietil)-CH ₂ - para-C ₆ H ₄ CO] desB30	28
Insulina humana 0544 N ^ε B ²⁹ -[N-(HOOC(CH ₂) ₁₄ CO)-N-(carboximetil)- para-C ₆ H ₄ CO] desB30	17
Insulina humana 0549 N ^ε B ²⁹ -[N-(HOOC(CH ₂) ₁₄ CO)-N-(carboxietil)-CH ₂ - orto-C ₆ H ₄ CO] desB30	11
Insulina humana 0539 N ^ε B ²⁹ -[N-(HOOC(CH ₂) ₁₄ CO)-γ-glutamil-N-CH ₂ - para-C ₆ H ₄ CO] desB30	14
Insulina 0547 N ^ε B ²⁹ -(3-carboxi-5-hexadecandioilamino-benzoil)desB30	12
Insulina humana 0488 N ^B 29-[N-(HOOC(CH ₂) ₁₆ CO)-N-(carboxietil)-CH ₂ - para-C ₆ H ₄ CO] desB30	15
Insulina humana 0529 N ^ε B ²⁹ -[(5-[(2-carboxietil)-(15-carboxipentadecanoil) amino]metil)furan-2-carbonil)desB30	13
Insulina humana 0548 N ^ε B ²⁹ -(3-carboxi-5-octadecandioilamino-benzoil) des(B30)	19
Insulina humana 0552 N ^ε B ²⁹ -[4-carboxi-4-[10-(4-carboxi-fenoxi)-decanoilamino]- butiril]desB30	46
Insulina 0593 N ^ε B ²⁹ -10-(4-carboxi-fenilsulfanil) decanoil -γ-L-glutamil desB30	101
Insulina 0602 N ^ε B ²⁹ -10-(4-carboxifenoxi) decanoil beta-Asp desB30	42
Insulina 0600 N ^ε B ²⁹ -11-(4-carboxi-fenoxi) undecanoil -γ-L-glutamil desB30	55

Ejemplo 28

5 Preparación de anticuerpos mIR monoclonales

[0314] Se produjeron anticuerpos específicos (F12) por técnica monoclonal: Ratones RBF fueron inmunizados por inyección de 50 µg de mIR purificado en FCA subcutáneamente seguido por dos inyecciones con 20 µg de mIR en el fluoroinmunoanálisis. Los ratones de alta respuesta recibieron por vía intravenosa 25 µg de mIR y los bazo fueron cosechados después 3 días. Las células de bazo fueron fusionadas con la línea celular Fox de mieloma (Köhler, G & Milstein C. (1976), European J. Immunology, 6:511-19 ; Taggart RT et al (1983), Science 219:1228-30). Los sobrenadantes fueron seleccionados para producción de anticuerpos en una ELISA específica de mIR. Los pocillos positivos fueron clonados y evaluados en la transferencia de Western.

Ejemplo 29

15

Datos de hidrofobicidad en derivados de insulina según la invención.

[0315] La hidrofobicidad (índice hidrofóbico) de los derivados de insulina de la invención con relación a la insulina humana, k'_{rel} , fueron medidos en una columna de HPLC LiChrosorb RP18 (5µm, 250x4 mm) por elución isocrática a 40 °C usando mezclas de A) 0,1 M de tampón de fosfato sódico, pH 7,3, que contenía 10% de acetonitrilo y B) 50% de

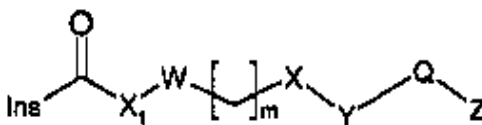
20

acetonitrilo en agua como eluyentes. La elución fue monitoreada siguiendo la absorción de UV del eluato a 214 nm. El tiempo muerto se determinó por inyección de 0,1 mM de nitrato sódico. El tiempo de retención para la insulina humana, t_{human} , se ajustó a por lo menos $2t_0$ variando la proporción entre las soluciones A y B. $k'_{rel} = (t_{derivative} - t_0)/(t_{human} - t_0)$. k'_{rel} encontrada para varios derivados de insulina según la invención.

5 [0316] En las siguientes tablas se muestran datos en la unión al receptor y datos de hidrofobicidad de derivados de insulina según la presente invención

Derivado de insulina	k'_{rel}
Insulina humana O496 N ^ε B ²⁹ -[N-(HOOC(CH ₂) ₁₄ CO)-N-(carboxietil)-CH ₂ -para-C ₆ H ₄ CO] desB30	1,19
Insulina humana O515 N ^ε B ²⁹ -[N-(HOOC(CH ₂) ₁₃ CO)-N-(carboxietil)-CH ₂ -para-C ₆ H ₄ CO] desB30	0,81
Insulina humana O544 N ^ε B ²⁹ -[N-(HOOC(CH ₂) ₁₄ CO)-N-(carboximetil)-para-C ₆ H ₄ CO] desB30	1,08
Insulina humana O539 N ^ε B ²⁹ -[N-(HOOC(CH ₂) ₁₄ CO)-γ-Glu-N-CH ₂ -para-C ₆ H ₄ CO] desB30	1,12
Insulina 0547 N ^ε B ²⁹ -(3-carboxi-5-hexadecandioilamino-benzoil)desB30	1,7
Insulina humana 0522 N ^ε B ²⁹ -[N-(HOOC(CH ₂) ₁₅ CO)-N-(carboxietil)-CH ₂ -para-C ₆ H ₄ CO] desB30	1,23
Insulina humana 0488 N ^ε B ²⁹ -[N-(HOOC(CH ₂) ₁₆ CO)-N-(carboxietil)-CH ₂ -para-C ₆ H ₄ CO]desB30	2,03
Insulina humana 0529 N ^ε B ²⁹ -[(5-[(2-carboxietil)-(15-carboxipentadecanoil)amino]metil)furan-2-carbonil)desB30	1,19
Insulina humana 0543 N ^ε B ²⁹ -[N-(HOOC(CH ₂) ₁₄ CO)-N-(carboxietil)-CH ₂ -meta C ₆ H ₄ CO] desB30	1,63
Insulina humana 0549 N ^ε B ²⁹ -[N-(HOOC(CH ₂) ₁₄ CO)-N-(carboxietil)-CH ₂ -orto C ₆ H ₄ CO] desB30	0,905
Insulina humana 0544 N ^ε B ²⁹ -[N-(HOOC(CH ₂) ₁₄ CO)-N-(carboxietil)-para-C ₆ H ₄ CO] desB30	1,08
Insulina humana O548 N ^ε B ²⁹ -(3-carboxi-5-octadecandioilamino-benzoil) des(B30)	2,97
Insulina humana O538 N ^ε B ²⁹ -(3-carboxi-4-(14-carboxi-tetradeciloxi)-benzoil) desB30	1,51
Insulina humana O546 N ^ε B ²⁹ -(3-carboxi-5-(14-carboxi-tetradeciloxi)-benzoil) desB30	1,175
Insulina humana 0552 N ^ε B ²⁹ -{4-carboxi-4-[10-(4-carboxi-fenoxi)-decanoilamino]-butiril}desB30	0,388
Insulina humana 0559 N ^ε B ²⁹ -[3-carboxi-5-(octadecandioil-N-carboxietil-glicin)aminobenzoil] desB30	0,662
Insulina humana O486 N ^ε B ²⁹ {3-[(3,5-Bis-carboximetoxi-becil)-(15-carboxi-pentadecanoil)-amino]-propionil desB30	0,45
Insulina O562 N ^ε B ²⁹ -3-[4'-(2-carboxi-etil)-bifenil-4-il]-propionil-γ-L-glutamil desB30	0,276
Insulina humana O565 N ^ε B ²⁹ -hexadecandioil-(4-aminometil-benzoil) -γ-L-glutamil desB30	1,18
Insulina humana 0580 N ^ε B ²⁹ -4-[(2-carboxietil)-(15-carboxipentadecanoil)amino]metil}benzoil)-γ-L-glutamil desB30	0,399
Insulina humana O584 N ^ε B ²⁹ -{4-[2-(4-carboximetil-fenil)-etil]-fenil}-acetil-γ-L-glutamil desB30	0,291
Insulina O588 N ^ε B ²⁹ -(3-carboxi-4-hexadecandioilamino-benzoil) desB30-	1,075
Insulina humana O593 N ^ε B ²⁹ -10-(4-carboxi-fenilsulfanil) decanoil -γ-L-glutamil desB30	0,475
Insulina 0602 N ^ε B ²⁹ -10-(4-carboxifenoxi) decanoil beta-Asp desB30	0,348
Insulina humana O600 N ^ε B ²⁹ - 11-(4-carboxi-fenoxi) undecanoil-γ-L-glutamil desB30	0,482

REIVINDICACIONES



1. Derivado de insulina con la fórmula

donde Ins es la fracción de insulina progenitora la cual por vía del grupo α -amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B o un grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la fracción de insulina se enlaza al grupo CO- en la cadena lateral por medio de un enlace amida;

X_1 es

- un enlace

W es un enlace;

m es 0;

X es

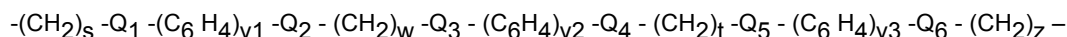
- un enlace;

Y es

- $-(CR_1R_2)_q-NR-CO-$, donde R_1 y R_2 independientemente uno del otro independientemente e independientemente para cada valor de q puede ser H, $-COOH$, un enlace u OH, q es 1-6; y R es hidrógeno o $-(CH_2)_p-COOH$; $-(CH_2)_p-SO_3H$; $-(CH_2)_p-PO_3H_2$; $-(CH_2)_p-O-SO_3H_2$; $-(CH_2)_p-O-PO_3H_2$; arileno sustituido con 1 o 2 $-(CH_2)_p-O-COOH$ grupos; $-(CH_2)_p$ -tetrazolilo, donde p es un número entero en el intervalo de 1 a 6;

Q es

- $-(CH_2)_r-$ donde r es un número entero de 4 a 22;
- una cadena de hidrocarburo bivalente que comprende 1,2 o 3 grupos $-CH=CH-$ y varios grupos $-CH_2-$ suficientes para dar un número total de átomos de carbono en la cadena en el intervalo de 4 a 22 o
- una cadena de hidrocarburo bivalente de la fórmula



donde $Q_1 - Q_6$ independientemente uno de otro pueden ser O; S o un enlace; donde s, w, t y z independientemente uno de otro son cero o un número entero de 1 a 10 de modo que la suma de s, w, t y z está en el intervalo de 4 a 22 y v_1 , v_2 y v_3 independientemente uno de otro puede ser cero o 1, siempre que cuando

Y es un residuo de α -amino ácido con un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral, este residuo forma, con uno de sus grupos de ácido carboxílico, un grupo de amida con el grupo α -amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B o con el grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina progenitora; o una cadena compuesta de dos, tres o cuatro residuos de α -aminoácido unidos entre sí por enlaces amida, cuya cadena -a través de un enlace amida- se une al grupo α -amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B o al grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina progenitora. Los residuos de aminoácidos de W son seleccionados del grupo de residuos de aminoácidos con una cadena lateral neutra y residuos de aminoácidos con un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral de modo que W tiene al menos un residuo de aminoácido que tiene un grupo de ácido carboxílico en la cadena lateral; y

Z es $-COOH$; $-CO-Asp$; $-CO-Glu$; $-CO-Gly$; $-CO-Sar$; $-CH(COOH)_2$; $-N(CH_2COOH)_2$; $-SO_3H$; o $-PO_3H$;

entonces Q no es una cadena de hidrocarburo bivalente de la fórmula $-(CH_2)_{v_4}C_6H_4(CH_2)_{w_1}-$ donde v_4 y w_1 son números enteros o uno de estos es cero de modo que la suma de v_4 y w_1 está en el intervalo de 6 a 22; y

Z es:

- $-COOH$;
- $-CO-Asp$;

-CO-Glu;
 -CO-Gly;
 -CO-Sar;
 -CH(COOH)₂ ;
 -N(CH₂COOH)₂ ;
 -SO₃H
 -PO₃H₂ ;
 O-SO₃H;
 O-PO₃H₂ ;
 -tetrazolil o
 -O-W₁,

donde W₁ es arileno o heteroarileno sustituido con un o dos grupos seleccionados de -COOH, -SO₃H y -PO₃H₂ y tetrazolilo;
 a condición de que si W es un enlace y v₁, v₂ y v₃ son todos cero y Q₁₋₆ son todos un enlace, entonces Z es W₁

y cualquier complejo de Zn²⁺ del mismo y donde el derivado de insulina tiene un índice hidrofóbico (k'rel) que está en el intervalo de 0,02 a 10.

2. Un derivado de insulina según la reivindicación 1, donde Q es -(CH₂)_r - donde r es un número entero en el intervalo de 4 a 22, de 8 a 20, de 12 a 20 o de 14-18.

3. Un derivado de insulina según la reivindicación 1, donde Q₁, Q₂, Q₅ y Q₆ son todos un enlace, v₂ es 1 y v₁ y v₃ son cero.

4. Un derivado de insulina según la reivindicación 3, donde Q₃ y Q₄ son oxígeno.

5. Un derivado de insulina según la reivindicación 1, donde Z es -COOH.

6. Un derivado de insulina según cualquiera de las de las reivindicaciones precedentes, donde la fracción de insulina progenitora es una insulina humana des(B30) o un derivado análogo.

7. Un derivado de insulina según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la fracción de insulina progenitora es seleccionada del grupo que consiste en insulina humana; insulina humana des(B1); insulina humana desB30; insulina humana GlyA21; insulina humana GlyA21 des(B30); insulina humana AspB28; insulina porcina; insulina humana LysB28ProB29; insulina humana GlyA21ArgB31ArgB32 e insulina humana LysB3GluB29.

8. Una composición farmacéutica para el tratamiento de la diabetes en un paciente un paciente que necesita este tratamiento, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de insulina según la reivindicación 1 junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

9. Una composición farmacéutica para el tratamiento de la diabetes en un paciente que necesita este tratamiento, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de insulina según la reivindicación 1 en mezcla con una insulina o un análogo de insulina que tiene un inicio de acción rápido, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

10. Derivado insulina humana según la reivindicación 1 para uso como un medicamento junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

11. Derivado insulina humana según la reivindicación 10 en mezcla con una insulina o un análogo de insulina que tiene un inicio de acción rápido.