



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0910348-1 A2



* B R P I 0 9 1 0 3 4 8 A 2 *

(22) Data do Depósito: 13/03/2009

(43) Data da Publicação Nacional: 11/08/2020

(54) **Título:** INSULINA ESTABILIZADA EM PROTEASE ACILADA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO A MESMA E SEUS USOS

(51) **Int. Cl.:** C07K 14/62; A61K 38/28.

(30) **Prioridade Unionista:** 18/03/2008 EP 08102708.8; 28/11/2008 EP 08170231.8.

(71) **Depositante(es):** NOVO NORDISK A/S.

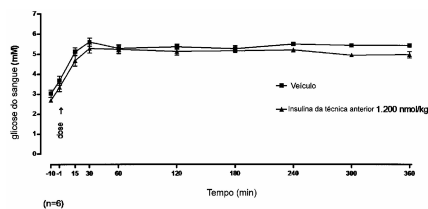
(72) **Inventor(es):** THOMAS BORGLUM KJELDSSEN; TINE GLENDORF; PATRICK WILLIAM GARIBAY; JACOB STEN PETERSEN; PETER MADSEN; THOMAS HOEG-JENSEN; PALLE JAKOBSEN; TINA MOLLER TAGMOSE; JANOS TIBOR KODRA.

(86) **Pedido PCT:** PCT EP2009053017 de 13/03/2009

(87) **Publicação PCT:** WO 2009/115469 de 24/09/2009

(85) **Data da Fase Nacional:** 17/09/2010

(57) **Resumo:** ANÁLOGOS DE INSULINA ACILADA ESTABILIZADA EM PROTEASE, SEUS USOS, E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS. A presente invenção refere-se a novos análogos de insulina acilada exibindo resistência às proteases, que podem, efetivamente, ser administrados pulmonar ou oralmente. Os análogos de insulina contêm B25H e A14E ou A14H.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**ANÁLOGOS DE INSULINA ACILADA ESTABILIZADA EM PROTEASE, SEUS USOS, E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS**".

CAMPO DESTA INVENÇÃO

5 A presente invenção refere-se aos novos análogos de insulina acilada, que exibem resistência a proteases, a um método para a preparação de tais análogos de insulina, a preparações de insulina contendo os análogos de insulina da invenção e a um método de tratar diabetes melito usando estes análogos de insulina.

10 ANTECEDENTES DESTA INVENÇÃO

Diabetes melito é um distúrbio metabólico em que a habilidade para utilizar glicose é em parte ou completamente perdida. Cerca de 5% de todas as pessoas sofrem de diabetes e o distúrbio chega a proporções epidêmicas. Desde a introdução de insulina nos anos 20, esforços contínuos têm sido feitos para melhorar o tratamento de diabetes melito. Considerando que as pessoas que sofrem de diabetes estão sujeitas a tratamento crônico durante várias décadas, há uma necessidade principal por formulações de insulina seguras, convenientes e de melhora da qualidade de vida.

15 A via oral é sem dúvida a via amplamente usada para administração de fármaco e é em geral muito bem aceita por pacientes, especialmente para terapias crônicas. Administração de peptídeos ou proteínas terapêuticos é, porém, frequentemente limitada às vias parenterais ao invés da administração oral preferida devido a várias barreiras tais como degradação enzimática no trato gastrointestinal (GI) e mucosa intestinal, bombas de efluxo do fármaco, absorção insuficiente e variável da mucosa intestinal, como também metabolismo de primeira passagem no fígado.

25 Normalmente, as formulações de insulina são administradas através de injeção subcutânea. Porém, administração através de outras vias, por exemplo, oralmente ou pulmonar, seria vantajoso devido à complacência dos pacientes, segurança e conveniência. Algumas das formulações de insulina disponíveis comerciais são caracterizadas por um princípio rápido de ação e outras formulações têm um princípio relativamente lento, mas apresentam uma ação mais ou menos prolongada. É muito importante para paci-

entes diabéticos que haja, no mercado, uma variedade grande de insulinas com durações diferentes de ações (perfis de ações). Brevemente, as insulinas podem ser classificadas como sendo de ação curta, intermediária ou longa.

5 WO 2008/034881 diz respeito a certos análogos de insulina em que pelo menos dois aminoácidos hidrofóbicos foram substituídos com aminoácidos hidrófilos cujos análogos de insulina não são acilados.

10 EP 2008/060733 e EP 2008/060733 dizem respeito a certos análogos de insulina acilada em que o análogo de insulina compreende um alongamento com um aminoácido ou um resíduo de peptídeo C-terminalmente conectado ao aminoácido de A21.

15 EP 2008/060734 diz respeito a certas insulinas aciladas em que uma porção de acila é ligada à insulina parental e em que a dita porção de acila compreende unidades de repetição de aminoácidos contendo alquilenoglicol.

ASPECTOS DESTA INVENÇÃO

Um aspecto desta invenção diz respeito ao fornecimento dos análogos de insulina que, quando administrados oralmente, podem dar um controle satisfatório do nível de glicose do sangue.

20 Outro aspecto desta invenção diz respeito ao fornecimento de análogos de insulina que, quando administrados oralmente, podem dar uma redução prolongada do nível de glicose.

25 Outro aspecto desta invenção diz respeito ao fornecimento de análogos de insulina basal que, quando administrados oralmente, podem dar uma redução prolongada do nível de glicose.

Outro aspecto desta invenção diz respeito ao fornecimento de análogos de insulina basal que, quando administrados oralmente, podem dar um controle satisfatório do nível de glicose do sangue seguindo administração diária de três vezes.

30 Outro aspecto desta invenção diz respeito ao fornecimento de análogos de insulina basal que, quando administrados oralmente, podem dar um controle satisfatório do nível de glicose do sangue seguindo administra-

ção diária de duas vezes.

Outro aspecto desta invenção diz respeito ao fornecimento de análogos de insulina basal que, quando administrados oralmente, podem dar um controle satisfatório do nível de glicose do sangue seguindo administração diária de uma vez.

Outro aspecto desta invenção diz respeito ao fornecimento de análogos de insulina basal que são hidrófilos.

Outro aspecto desta invenção diz respeito ao fornecimento de análogos de insulina basal que são mais hidrófilos que a insulina humana.

Outro aspecto desta invenção diz respeito ao fornecimento de análogos de insulina basal que são menos hidrofóbicos que a insulina humana, quando medido pela hidrofobicidade relativa (k'_{rel}) como descrito aqui.

Outro aspecto desta invenção diz respeito ao fornecimento de análogos de insulina basal que são menos hidrofóbicos que insulinas parentais aciladas não estabilizadas em protease similares com a mesma porção de acila, como medido pela hidrofobicidade relativa (k'_{rel}) como descrito aqui.

k'_{rel} dos análogos de insulina basal da invenção é preferivelmente menos que 5, mais preferivelmente menos que 3, mais preferivelmente menos que 2, mais preferivelmente menos que 1, mais preferivelmente menos que 0,8, mais preferivelmente menos que 0,6, mais preferivelmente menos que 0,5, mais preferivelmente menos que 0,4, mais preferivelmente menos que 0,3, mais preferivelmente menos que 0,2, mais preferivelmente menos que 0,1.

Outro aspecto desta invenção diz respeito ao fornecimento de análogos de insulina basal que, quando administrados oralmente, têm biodisponibilidades satisfatórias. Comparada com as biodisponibilidades das insulinas aciladas similares sem as mutações de estabilização de protease dadas em doses similares, a biodisponibilidade dos compostos preferidos desta invenção é pelo menos 10% mais alta, preferivelmente 20% mais alta, preferivelmente 25% mais alta, preferivelmente 30% mais alta, preferivelmente 35% mais alta, preferivelmente 40% mais alta, preferivelmente 45%

mais alta, preferivelmente 50% mais alta, preferivelmente 55% mais alta, preferivelmente 60% mais alta, preferivelmente 65% mais alta, preferivelmente 70% mais alta, preferivelmente 80% mais alta, preferivelmente 90% mais alta, preferivelmente 100% mais alta, preferivelmente mais que 100% mais alta que a do comparador não estabilizado em protease.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100

Outro aspecto desta invenção diz respeito ao fornecimento de análogos de insulina basal que, quando administrados oralmente, têm biodisponibilidades satisfatórias. Biodisponibilidades dos compostos preferidos desta invenção (com relação à administração i.v.) são pelo menos 0,3%, preferivelmente >0,5%, preferivelmente >1%, preferivelmente >1,5%, preferivelmente >2%, preferivelmente >2,5%, preferivelmente >3%, preferivelmente >3,5%, preferivelmente >4%, preferivelmente >5%, preferivelmente >6%, preferivelmente >7%, preferivelmente >8%, preferivelmente >9%, preferivelmente >10%.

Outro aspecto desta invenção diz respeito ao fornecimento de análogos de insulina basal que, quando administrados através de infusão intravenosa, têm potências satisfatórias. Comparadas com a potência de insulina humana, potências de análogos de insulina estabilizada em protease preferidas da invenção são preferivelmente >5%, preferivelmente >10%, preferivelmente >20%, preferivelmente >30%, preferivelmente >40%, preferivelmente >50%, preferivelmente >75% e preferivelmente >100%.

Outro aspecto desta invenção diz respeito ao fornecimento de análogos de insulina que, quando administrados pulmonarmente, podem dar um controle satisfatório do nível de glicose do sangue.

Outro aspecto desta invenção diz respeito ao fornecimento de análogos de insulina que, quando administrados pulmonarmente, podem dar um controle satisfatório do nível de glicose do sangue com um princípio relativamente lento de ação e/ou uma ação mais ou menos prolongada.

Outro aspecto desta invenção diz respeito ao fornecimento de análogos de insulina que têm uma ação prolongada satisfatória seguindo administração pulmonar. Comparada com insulina acilada similar sem as mutações de estabilização de protease dadas em doses similares, a duração

de ação dos compostos preferidos desta invenção é pelo menos 10% mais longa, preferivelmente 20% mais longa, preferivelmente 25% mais longa, preferivelmente 30% mais longa, preferivelmente 35% mais longa, preferivelmente 40% mais longa, preferivelmente 45% mais longa, preferivelmente 50% mais longa, preferivelmente 55% mais longa, preferivelmente 60% mais longa, preferivelmente 65% mais longa, preferivelmente 70% mais longa, preferivelmente 80% mais longa, preferivelmente 90% mais longa, preferivelmente 100% mais longa, preferivelmente mais que 100% mais longa que a do comparador. Duração da ação pode ser medida até que a glicose do sangue seja suprimida, ou medindo as propriedades farmacocinéticas relevantes, por exemplo, $t_{1/2}$ ou MRT (tempo de permanência médio).

Outro aspecto desta invenção diz respeito ao fornecimento de análogos de insulina que têm uma biodisponibilidade pulmonar satisfatória. Comparada com a biodisponibilidade de insulina humana ou comparada com insulina acilada similar sem mutações de estabilização de protease dada em doses similares, a biodisponibilidade dos compostos preferidos desta invenção é pelo menos 10% mais alta, preferivelmente 20% mais alta, preferivelmente 25% mais alta, preferivelmente 30% mais alta, preferivelmente 35% mais alta, preferivelmente 40% mais alta, preferivelmente 45% mais alta, preferivelmente 50% mais alta, preferivelmente 55% mais alta, preferivelmente 60% mais alta, preferivelmente 65% mais alta, preferivelmente 70% mais alta, preferivelmente 80% mais alta, preferivelmente 90% mais alta, preferivelmente 100% mais alta, preferivelmente mais que 100% mais alta que a do comparador.

Outro aspecto desta invenção diz respeito ao fornecimento de análogos de insulina que têm potência *in vivo* aparente aumentada.

Outro aspecto desta invenção diz respeito ao fornecimento de insulinas de ação prolongada com biodisponibilidade oral.

Outro aspecto desta invenção diz respeito ao fornecimento de análogos de insulina que têm uma estabilidade proteolítica aumentada comparada à estabilidade de insulina humana. Comparada com a insulina humana, a estabilidade proteolítica dos compostos preferidos desta invenção é

pelo menos 2 vezes mais estável, preferivelmente 3 vezes mais estável, preferivelmente 4 vezes mais estável, preferivelmente 5 vezes mais estável, preferivelmente 6 vezes mais estável, preferivelmente 7 vezes mais estável, preferivelmente 8 vezes mais estável, preferivelmente 9 vezes mais estável, preferivelmente 10 vezes mais estável, preferivelmente 12 vezes mais estável, preferivelmente 14 vezes mais estável, preferivelmente 16 vezes mais estável, preferivelmente 18 vezes mais estável, preferivelmente 20 vezes mais estável, preferivelmente 25 vezes mais estável, preferivelmente mais de 25 vezes mais estável que a do comparador. Estabilidade proteolítica pode ser medida expondo as insulinas às (uma mistura de) enzimas proteolíticas, por exemplo, um extrato de enzimas do intestino como descritas aqui.

O objetivo desta invenção é superar ou melhorar pelo menos uma das desvantagens da técnica anterior, ou fornecer uma alternativa útil.

DEFINIÇÕES

Aqui, o termo insulina abrange insulinas de ocorrência natural, por exemplo, insulina humana, como também análogos de insulina das mesmas. Insulina humana consiste em duas cadeias de polipeptídeo, as assim chamadas cadeias A e B contendo 21 e 30 resíduos de aminoácido, respectivamente, e que são interconectadas através de duas ligações em pontes de dissulfeto de cistina.

Aqui, o termo resíduo de aminoácido abrange um aminoácido do qual um átomo de hidrogênio foi removido de um grupo amino e/ou um grupo hidróxi foi removido de um grupo carbóxi e/ou um átomo de hidrogênio foi removido de um grupo mercapto. Impreciso, um resíduo de aminoácido pode ser designado um aminoácido.

Aqui, aminoácidos hidrofóbicos serão entendidos como o triptofano de aminoácidos de ocorrência natural (Trp, W), fenilalanina (Phe, F), valina (Val, V), isoleucina (Ile, I), leucina (Leu, L) e tirosina (Tyr, Y) (com a abreviação de três letras e uma letra entre parênteses).

Aqui, aminoácidos hidrófilos serão entendidos como aminoácidos naturais que não são aminoácidos hidrofóbicos de acordo com a definição acima. Em uma modalidade, os ácidos hidrófilos são selecionados de

acordo com a invenção do grupo que consiste em: ácido glutâmico (Glu, E), ácido aspártico (Asp, D), histidina (His, H), glutamina (Gln, Q), asparagina (Asn, N), serina (Ser, S), treonina (Thr, T), prolina (Pro, P), glicina (Gly, G), lisina (Lys, K) e arginina (Arg, R). Em uma outra modalidade, os aminoácidos hidrófilos são selecionados de acordo com a invenção do grupo que consiste em: ácido glutâmico (Glu, E), ácido aspártico (Asp, D), histidina (His, H), glutamina (Gln, Q), asparagina (Asn, N), lisina (Lys, K) e arginina (Arg, R).

Aqui, o termo análogo de insulina abrange um polipeptídeo que tem uma estrutura molecular que formalmente pode ser derivada da estrutura de uma insulina de ocorrência natural, por exemplo, insulina humana, deletando e/ou substituindo (repondo) um ou mais resíduos de aminoácido que ocorrem na insulina natural e/ou adicionando um ou mais resíduos de aminoácido. Os resíduos de aminoácido adicionados e/ou substituídos podem ser resíduos de aminoácido codificáveis ou outros resíduos de aminoácido de ocorrência natural ou resíduos de aminoácido puramente sintéticos. Em uma modalidade preferida, o análogo de insulina tem duas ou mais mutações comparadas à insulina humana.

Aqui, o termo insulina estabilizada em protease significa a insulina sem uma porção de acila ligada. As ditas insulinas estabilizadas em protease têm uma estabilidade melhorada contra degradação de proteases.

Aqui, o termo insulina parental significa a insulina sem uma porção de acila ligada e sem mutações para melhorar a estabilidade contra degradação de proteases. As ditas insulinas parentais opcionalmente têm mutações com relação à insulina humana. Insulinas parentais são, desse modo, também análogos de insulina como definidos acima. Aqui, o termo insulina parental e insulina não estabilizada em protease abrange os mesmos compostos.

Aqui, o termo mutação abrange qualquer alteração na sequência de aminoácido (substituições e inserções com aminoácidos codificáveis como também deleções).

Aqui, os termos análogos da cadeia A e análogos das cadeias B de insulina humana abrangem as cadeias A e B da insulina humana, respec-

tivamente, tendo uma ou mais substituições, deleções e ou extensões (adições) das cadeias A e B de aminoácido, respectivamente, com relação às cadeias A e B, respectivamente, da insulina humana.

Aqui, termos como A1, A2, A3, etc. indicam a posição 1, 2 e 3, respectivamente, na cadeia A de insulina (contada da extremidade N-terminal). Similarmente, termos como B1, B2, B3, etc. indicam a posição 1, 2 e 3, respectivamente, na cadeia B da insulina (contada da extremidade N-terminal). Usando os códigos de uma letra para aminoácidos, termos como A21A, A21G e A21Q designam que o aminoácido na posição de A21 é A, G e Q, respectivamente. Usando os códigos de três letras para aminoácidos, as expressões correspondentes são AlaA21, GlyA21 e GlnA21, respectivamente.

Aqui, os termos A(0) ou B(0) indicam as posições N-terminalmente avizinhandose das posições A1 ou B1, respectivamente, nas cadeias A e B, respectivamente. Os termos A(-1) ou B(-1) indicam as posições dos primeiros aminoácidos N-terminalmente para A(0) ou B(0), respectivamente. Desse modo A(-2) e B(-2) indicam as posições N-terminalmente para A(-1) e B(-1), respectivamente, A(-3) e B(-3) indicam as posições N-terminalmente para A(-2) e B(-2), respectivamente, e assim sucessivamente.

Aqui, os termos como desB29 e desB30 indicam um análogo de insulina desprovidos do resíduo de aminoácido B29 ou B30, respectivamente.

Aqui, o termo "insulina de ação rápida" abrange uma insulina que tem um princípio mais rápido de ação que a insulina humana normal ou regular.

Aqui, o termo "insulina de ação longa" ou o termo "insulina basal" abrange uma insulina que tem uma duração mais longa de ação que a insulina humana normal ou regular. Preferivelmente, a ação de tempo é mais que 5, ou 8 horas, em particularmente de pelo menos 9 horas. Preferivelmente, a insulina basal tem uma ação de tempo de pelo menos 10 horas. A insulina basal pode, desse modo, ter uma ação de tempo na faixa de cerca de 8 a 24 horas, preferivelmente na faixa de cerca de 9 a cerca de 15 horas.

A numeração das posições nos análogos de insulina, insulinas e cadeias A e B é feita de forma que o composto parental seja insulina humana com a numeração usada para o mesmo.

5 Aqui, o termo "insulina acilada" abrange modificação da insulina através da ligação de uma ou mais porções de acila por meio de um ligante à insulina estabilizada em protease.

10 Por insulina acilada tendo atividade de insulina é significada uma insulina acilada com a habilidade para diminuir a glicose do sangue em mamíferos quando medida em um modelo animal adequado que pode ser, por exemplo, um modelo de rato, coelho, ou de porco, após administração adequada, por exemplo, por administração intravenosa ou subcutânea, ou um receptor de afinidade de ligação à insulina.

Aqui, o termo alquila abrange um grupo hidrocarboneto saturado, ramificado ou reto.

15 Aqui, o termo alcóxi abrange o radical "alquil-O-". Exemplos representativos são metóxi, etóxi, propóxi (por exemplo, 1-propóxi e 2-propóxi), butóxi (por exemplo, 1-butóxi, 2-butóxi e 2-metil-2-propóxi), pentóxi (1-pentóxi e 2-pentóxi), hexóxi (1-hexóxi e 3-hexóxi) e similares.

20 Aqui, o termo alquilenos abrange um grupo hidrocarboneto bivalente, saturado, ramificado ou reto tendo de 1 a 12 átomos de carbono. Exemplos representativos incluem, mas não são limitados a, metileno; 1,2-etileno; 1,3-propileno; 1,2-propileno; 1,3-butileno; 1,4-butileno; 1,4-pentileno; 1,5-pentileno; 1,5-hexileno; 1,6-hexileno e similares.

25 Aqui, o termo "aminoácido linear neutro" abrange. Exemplos não limitativos de aminoácidos lineares neutros são.

Aqui, o termo "aminoácido cíclico" abrange. Exemplos não limitativos de aminoácidos cíclicos são.

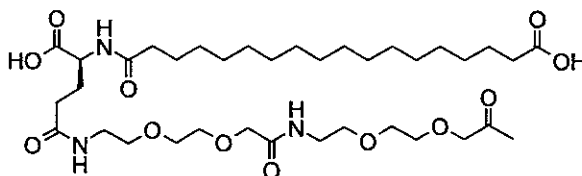
Aqui, o termo "aminoácido ácido" abrange. Exemplos não limitativos de aminoácidos ácidos são.

30 Aqui, o termo "ácido graxo" abrange uns ácidos carboxílicos lineares ou ramificados, alifáticos tendo pelo menos dois átomos de carbono e sendo saturado ou insaturado. Exemplos não limitativos de ácidos graxos

são ácido mirístico, ácido palmítico e ácido esteárico.

Aqui, o termo "diácido graxo" abrange uns ácidos dicarboxílicos lineares ou ramificados, alifáticos tendo pelo menos dois átomos de carbono e sendo saturado ou insaturado. Exemplos não limitativos de diácidos graxos são ácido succínico, ácido hexanodioico, ácido octanodioico, ácido decanodioico, ácido dodecanodioico, ácido tetradecanodioico, ácido hexadecanodioico, ácido heptadecanodioico, ácido octadecanodioico e ácido eicosanodioico.

Aqui, a nomeação das insulinas é feita de acordo com os princípios seguintes: os nomes são dados como mutações e modificações (acilações) com relação à insulina humana. Para a nomeação da porção de acila, a nomeação é feita de acordo com a nomenclatura de IUPAC e em outros casos como nomenclatura de peptídeo. Por exemplo, nomeação da porção de acila:



pode por exemplo ser "octadecanodioil- γ Glu-OEG-OEG", ou "17-carbóxi-heptadecanoil- γ Glu-OEG-OEG", em que

OEG é abreviação para o aminoácido $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_2\text{CO}_2\text{H}$,

γ Glu é abreviação para o aminoácido ácido glutâmico gama.

Outras abreviações para aminoácidos são, por exemplo:

PEG3 é $\text{NH}_2((\text{CH}_2)_2\text{O})_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$

PEG7 é $\text{NH}_2((\text{CH}_2)_2\text{O})_8\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$

Por exemplo, a insulina do exemplo 9 (com a sequência/estrutura dada abaixo) é nomeada "A14E, B25H, B29K(N^oOctadecanodioil- γ Glu-OEG-OEG), insulina humana de desB30" para indicar que o aminoácido na posição A14, Y na insulina humana, foi mutado para E, o aminoácido na posição B25, F na insulina humana, foi mutado para H, o aminoácido na posição B29, K como na insulina humana, foi modi-

tor de IGF-1 é um polipeptídeo que é capaz de interagir com um receptor de insulina e um receptor de IGF-1 humana em um ensaio de ligação adequado. Tais ensaios de receptor são bem conhecidos dentro do campo e são também descritos nos exemplos. A insulina acilada presente não ligará ao receptor de IGF-1 ou terá uma afinidade bastante baixa para o dito receptor. Mais precisamente, as insulinas aciladas desta invenção terão uma afinidade para o receptor de IGF-1 de substancialmente a mesma magnitude ou menos como a da insulina humana.

O termo "farmaceuticamente aceitável" como aqui usado significa adaptado para aplicações farmacêuticas normais, isto é, dando origem a nenhum evento adverso sério em pacientes, etc.

Os termos tratamento e trato como aqui usados significam o gerenciamento e o cuidado de um paciente para o propósito de combater uma doença, distúrbio ou condição. É intencionado que o termo inclua o retardamento da progressão da doença, do distúrbio ou da condição, a mitigação ou o alívio dos sintomas e as complicações, e/ou a cura ou a eliminação da doença, do distúrbio ou da condição. O paciente a ser tratado é preferivelmente um mamífero, em particular, um ser humano.

O termo tratamento de uma doença como aqui usado significa o gerenciamento e o cuidado de um paciente que tem desenvolvido a doença, a condição ou o distúrbio. O propósito do tratamento é combater a doença, a condição ou o distúrbio. Tratamento inclui a administração dos compostos ativos para eliminar ou controlar a doença, a condição ou o distúrbio como também aliviar os sintomas ou complicações associadas à doença, à condição ou ao distúrbio.

O termo prevenção de uma doença como aqui usado é definido como o gerenciamento e o cuidado de um indivíduo em risco de contrair a doença antes do princípio clínico da doença. O propósito da prevenção é combater o desenvolvimento da doença, condição ou distúrbio, e inclui a administração dos compostos ativos para impedir ou retardar o princípio dos sintomas ou das complicações e impedir ou retardar o desenvolvimento de doenças relacionadas, condições ou distúrbios.

O termo quantidade efetiva como aqui usado significa uma dosagem que é suficiente para que o tratamento do paciente seja efetivo comparado sem tratamento.

POT é o gene da triose fosfato isomerase *Schizosaccharomyces pombe*, e *TPI1* é o gene da triose fosfato isomerase de *S. cerevisiae*.

Por um líder é significado uma sequência de aminoácido que consiste em um pré-peptídeo (peptídeo sinal) e um pró-peptídeo.

O termo peptídeo sinal é entendido significar um pré-peptídeo que está presente como uma sequência N-terminal na forma de precursor de uma proteína. A função do peptídeo sinal é permitir a proteína heteróloga facilitar a translocação para dentro do retículo endoplásmico. O peptídeo sinal é normalmente clivado no curso deste processo. O peptídeo sinal pode ser heterólogo ou homólogo ao organismo de levedura que produz a proteína. Vários peptídeos sinal que podem ser usados com o construto de DNA desta invenção incluindo peptídeo sinal da protease aspártica de levedura 3 (YAP3) ou qualquer análogo funcional (Egel-Mitani et al. (1990) YEAST 6:127-137 e US 5.726.038) e o sinal do fator α do gene MF α 1 (Thorer (1981) em The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Strathern et al., eds., págs. 143-180, Cold Spring Harbor Laboratory, NY e US 4.870.00.

Aqui, o termo "pró-peptídeo" abrange uma sequência de polipeptídeo, cuja função é permitir direcionar o polipeptídeo expresso do retículo endoplásmico para o aparelho de Golgi e também para uma vesícula secretória para secreção no meio de cultura (isto é, exportação do polipeptídeo ao longo da parede celular ou pelo menos através da membrana celular para dentro do espaço periplásmico da célula de levedura). O pró-peptídeo pode ser o pró-peptídeo de fator α da levedura, vide US 4.546.082 e 4.870.008. Alternativamente, o pró-peptídeo pode ser um pró-peptídeo sintético, o que quer dizer um pró-peptídeo não encontrado na natureza. Pró-peptídeos sintéticos adequados são aqueles descritos na US 5.395.922; 5.795.746; 5.162.498 e WO 98/32867. O pró-peptídeo preferivelmente conterá um sítio de processamento de endopeptidase na extremidade C-terminal, tal como

uma sequência de Lys-Arg ou qualquer análogo funcional do mesmo.

A menos que explicitamente indicado, os aminoácidos mencionados aqui são L-aminoácidos. Também, as extremidades esquerda e direita de uma sequência de aminoácido de um peptídeo são, respectivamente, os terminos N e C, a menos que do contrário especificado.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Foi descoberto que insulinas que são estabilizadas para degradação proteolítica (através de mutações específicas) e aciladas na B29-lisina são eficazes e demoradas e possuem potencial alto como insulinas demoradas que podem ser administradas pulmonar ou oralmente. A acilação confere ligação à albumina sérica, e, por conseguinte, protraimento. Além disso, as insulinas aciladas da invenção exibem redução substancial de afinidade ao receptor de insulina, comparada às insulinas aciladas similares que não são estabilizadas para degradação proteolítica. Esta redução em afinidade ao receptor de insulina das insulinas ligadas à albumina da invenção contribui para o protraimento da insulina acilada em circulação, uma vez que a insulina é interiorizada e degradada sob ativação do receptor. Consequentemente, liberação das insulinas da invenção é reduzida. A redução de afinidade ao receptor de insulina provavelmente não causa uma perda de potência, por exemplo, conforme medida no grampo euglicêmico hiperinsulinêmico como descrito aqui. A combinação de afinidade de ligação alta de albumina e afinidade ao receptor de insulina baixa é, desse modo, benéfica para obter duração longa de ação das insulinas (insulinas basais). Além disso, após administração oral, estas insulinas aciladas têm um grau mais alto de biodisponibilidade que as insulinas aciladas conhecidas similares que não são estabilizadas para degradação proteolítica. Consequentemente, estes análogos de insulina acilada são valiosos para administração oral. Similarmente, após administração pulmonar, estas insulinas aciladas estabilizadas em protease apresentam potência aparente e/ou biodisponibilidade mais altas que as insulinas aciladas conhecidas similares que não são estabilizadas para degradação proteolítica. Além disso, estas insulinas aciladas estabilizadas em protease apresentam perfis de ação de tempo demorada quando admi-

nistradas pulmonarmente em mamíferos. Conseqüentemente, estes análogos de insulina acilada são valiosos para administração pulmonar.

As insulinas supracitadas que são estabilizadas para degradação proteolítica são aqui designadas insulinas estabilizadas em protease.

5 A molécula de insulina estabilizada em protease tem um número limitado dos resíduos de aminoácido de ocorrência natural substituídos com outros resíduos de aminoácido com relação à insulina humana como explicado na parte detalhada do relatório descritivo.

10 Em uma modalidade, esta invenção diz respeito a uma insulina acilada, em que o análogo de insulina estabilizada em protease diverge da insulina humana em uma ou mais das deleções ou substituições seguintes: Q na posição A18, A, G ou Q na posição A21, G ou Q na posição B1 ou nenhum resíduo de aminoácido na posição B1, Q, S ou T na posição B3 ou nenhum resíduo de aminoácido na posição B3, Q na posição B13, nenhum resíduo de aminoácido na posição B27, D, E ou R na posição B28 e nenhum aminoácido na posição B30.

15 Em ainda um outro aspecto, esta invenção diz respeito às preparações farmacêuticas compreendendo a insulina acilada desta invenção e adjuvantes e aditivos adequados tais como um ou mais agentes adequados para estabilização, conservação ou isotonia, por exemplo, íons de zinco, fenol, cresol, um parabeno, cloreto de sódio, glicerol ou manitol. O conteúdo de zinco das formulações presentes pode ser entre 0 e cerca de 6 átomos de zinco por 6 moléculas de insulina. O valor de pH da preparação farmacêutica pode ser entre cerca de 4 e cerca de 8,5, entre cerca de 4 e cerca de 25 5 ou entre cerca de 6,5 e cerca de 7,5.

Em uma outra modalidade, esta invenção refere-se ao uso da insulina acilada como um farmacêutico para redução dos níveis de glicose do sangue em mamíferos, em particularmente para o tratamento de diabetes.

30 Em um outro aspecto, esta invenção refere-se ao uso da insulina acilada para a preparação de uma preparação farmacêutica para redução do nível de glicose do sangue em mamíferos, particularmente para o tratamento

de diabetes.

Em uma outra modalidade, esta invenção refere-se a um método de reduzir o nível de glicose do sangue em mamíferos administrando uma dose terapêuticamente ativa de uma insulina acilada desta invenção a um
5 paciente em necessidade de tal tratamento.

Em um outro aspecto desta invenção, as insulinas aciladas são administradas em combinação com uma ou mais outras substâncias ativas em qualquer razão adequada. Tais agentes ativos também podem ser selecionados de insulina humana, análogos de insulina de ação rápida, agentes
10 antidiabéticos, agentes anti-hiperlipidêmicos, agentes de antiobesidade, agentes anti-hipertensivos e agentes para o tratamento de complicações que resultam ou associadas à diabetes.

Em uma modalidade, os dois componentes ativos são administrados como uma preparação farmacêutica misturada. Em outra modalidade,
15 os dois componentes são administrados separadamente de modo simultâneo ou sequencialmente.

Em uma modalidade, as insulinas aciladas desta invenção podem ser administradas junto com insulina humana de ação rápida ou análogos de insulina humana. Tal análogo de insulina de ação rápida pode ser tal
20 em que o resíduo de aminoácido na posição B28 é Asp, Lys, Leu, Val, ou Ala e o resíduo de aminoácido na posição B29 é Lys ou Pro, insulina humana de des(B28-B30), insulina humana de des(B27) ou insulina humana de des(B30), e um análogo em que o resíduo de aminoácido na posição B3 é Lys e o resíduo de aminoácido na posição B29 é Glu ou Asp. A insulina acilada desta invenção e a insulina humana de ação rápida ou análogo de insulina humana podem ser misturados em uma razão de cerca de 90% da insulina acilada a cerca de 10% da insulina humana de ação rápida ou análogo de insulina humana; preferivelmente de cerca de 70% da insulina acilada a cerca de 30% da insulina humana de ação rápida ou análogo de insulina humana, e até mesmo mais preferido de cerca de 50% da insulina acilada a cerca de 50% da insulina humana de ação rápida ou análogo de insulina humana (% sendo porcentagem em peso).
25
30

As insulinas aciladas desta invenção podem também ser usadas em tratamento de combinação junto com um agente antidiabético.

Agentes antidiabéticos incluirão insulina, GLP-1(1-37) (peptídeo-1 semelhante ao glucagon) descrito em WO 98/08871, WO 99/43706, US 5 5424286, WO 00/09666, WO 2006/097537, PCT/EP2008/061755 e PCT/EP2008/061830, GLP-2, exendin-4(1-39), fragmentos insulínótropicos dos mesmos, análogos insulínótropicos dos mesmos e derivados insulínótropicos dos mesmos. Fragmentos insulínótropicos de GLP-1(1-37) são peptídeos insulínótropicos para os quais a sequência inteira pode ser encontrada na sequência de GLP-1(1-37) e onde pelo menos um aminoácido terminal foi deletado.

As insulinas aciladas desta invenção podem também ser usadas no tratamento de combinação junto com um antidiabético oral tal como uma tiazolidindiona, metformina e outra preparação farmacêutica diabética tipo 2 para tratamento oral.

Além disso, a insulina acilada desta invenção pode ser administrada em combinação com um ou mais agentes antiobesidade ou agentes reguladores de apetite.

Em uma modalidade, esta invenção refere-se a uma preparação farmacêutica pulmonar compreendendo a insulina acilada desta invenção e adjuvantes e aditivos adequados tais como um ou mais agentes adequados para estabilização, preservação ou isotonia, por exemplo, íons de zinco, fenol, cresol, um parabeno, cloreto de sódio, glicerol, propilenoglicol ou manitol.

Deveria ser entendido que qualquer combinação adequada das insulinas aciladas com dieta e/ou exercício, um ou mais dos compostos supracitados e opcionalmente uma ou mais outras substâncias ativas são considerados estar dentro do escopo desta invenção.

DESCRIÇÃO DAS MODALIDADES PREFERIDAS

As propriedades de estabilidade e solubilidade da insulina são aspectos subjacentes importantes para a terapia de insulina atual. Esta invenção é direcionada para estes assuntos fornecendo análogos de insulina

acilada estáveis em que a acilação diminui a flexibilidade molecular e concomitantemente reduz a tendência de fibrilação e limita ou modifica a zona de precipitação de pH.

5 As insulinas aciladas desta invenção são particularmente intencionadas para administração pulmonar ou oral devido à sua biodisponibilidade relativamente alta comparada, por exemplo, com insulina humana e insulina humana acilada. Além disso, as insulinas aciladas terão uma atividade de insulina demorada.

10 Como mencionado acima, insulinas que são estabilizadas para degradação proteolítica são aqui designadas insulinas estabilizadas em protease. As insulinas aciladas desta invenção são ditas insulinas estabilizadas em protease que foram aciladas como descrito aqui.

15 As ditas insulinas estabilizadas em protease são derivadas dos compostos de insulina que aqui são designados insulinas parentais ou insulinas não estabilizadas em protease.

20 Em uma modalidade, uma insulina parental é selecionada do grupo que consiste em a) insulina humana; b) um análogo de insulina de insulina humana em que o resíduo de aminoácido na posição B28 é Pro, Asp, Lys, Leu, Val, ou Ala e o resíduo de aminoácido está na posição B29 é Lys ou Pro e opcionalmente o resíduo de aminoácido na posição B30 é deletado; c) um análogo de insulina que é insulina humana de des(B28-B30), insulina humana de des(B27) ou insulina humana de des(B30); d) um análogo de insulina da insulina humana em que o resíduo de aminoácido na posição B3 é Lys e o resíduo de aminoácido na posição B29 é Glu ou Asp; e) um análogo de insulina da insulina humana em que o resíduo de aminoácido na posição A21 é Gly e em que o análogo de insulina é também estendido para o término C com dois resíduos de arginina; f) um derivado de insulina em que o resíduo de aminoácido na posição B30 é substituído com um metil éster de treonina; e g) um derivado de insulina em que à posição de N^ε da lisina na posição B29 da insulina humana de des(B30), uma cadeia de tetradecanoíla é ligada. Cada um destes grupos é uma modalidade específica.

30 Em outra modalidade, uma insulina parental é selecionada do

grupo que consiste em insulina humana; insulina humana de desB30; insulina humana de AspB28; insulina humana de AspB28, DesB30; insulina humana de LysB3, GluB29; insulina humana de LysB28,ProB29; insulina humana de GlyA21, ArgB31, ArgB32; e insulina humana de desB30, ArgB31, ArgB32.

Mais especificamente, a insulina estabilizada em protease é uma molécula de insulina que tem duas ou mais mutações da cadeia A e/ou B com relação à insulina parental. Surpreendentemente, foi descoberto que substituindo dois ou mais aminoácidos hidrofóbicos dentro ou em proximidade íntima a dois ou mais sítios de protease em uma insulina com aminoácidos hidrófilos, um análogo de insulina (isto é, uma insulina estabilizada em protease) é obtido que é proteoliticamente mais estável comparado à insulina parental. Em um aspecto vasto, uma insulina estabilizada em protease é um análogo de insulina em que pelo menos dois aminoácidos hidrofóbicos foram substituídos com aminoácidos hidrófilos com relação à insulina parental, em que as substituições são dentro ou em proximidade íntima a dois ou mais sítios de clivagem de protease da insulina parental e em que tal análogo de insulina opcionalmente também compreende uma ou mais mutações adicionais.

Em outra modalidade, uma insulina estabilizada em protease é um análogo de insulina em que

- o aminoácido na posição A12 é Glu ou Asp e/ou o aminoácido na posição A13 é His, Asn, Glu ou Asp e/ou o aminoácido na posição A14 é Asn, Gln, Glu, Arg, Asp, Gly ou His e/ou o aminoácido na posição A15 é Glu ou Asp; e

- o aminoácido na posição B24 é His e/ou o aminoácido na posição B25 é His e/ou o aminoácido na posição B26 é His, Gly, Asp ou Thr e/ou o aminoácido na posição B27 é His, Glu, Gly ou Arg e/ou o aminoácido na posição B28 é His, Gly ou Asp; e

que opcionalmente também compreende uma ou mais mutações adicionais.

Em outra modalidade uma insulina estabilizada em protease é

um análogo que compreende as mutações B25H ou B25N em combinação com as mutações em B27, opcionalmente em combinação com outras mutações.

Em outra modalidade uma insulina estabilizada em protease é um análogo que compreende as mutações B25H ou B25N em combinação com as mutações em B27, opcionalmente em combinação com outras mutações. As mutações na posição B27 podem ser, por exemplo, Glu ou Asp.

Estes análogos de insulina estabilizada em protease acilada compreendendo as mutações B25 e B27 têm as propriedades vantajosas.

Em outra modalidade, uma insulina estabilizada em protease é um análogo de insulina que compreende uma sequência de aminoácido da cadeia A da fórmula 1:

$$\text{Xaa}_{A(-2)}\text{-Xaa}_{A(-1)}\text{-Xaa}_{A0}\text{-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Xaa}_{A8}\text{-Ser-Ile-Cys-Xaa}_{A12}\text{-Xaa}_{A13}\text{-Xaa}_{A14}\text{-Xaa}_{A15}\text{-Leu-Glu-Xaa}_{A18}\text{-Tyr-Cys-Xaa}_{A21}$$

Fórmula (1) (SEQ ID No: 1)

e uma sequência de aminoácido de cadeia B da fórmula 2:

$$\text{Xaa}_{B(-2)}\text{-Xaa}_{B(-1)}\text{-Xaa}_{B0}\text{-Xaa}_{B1}\text{-Xaa}_{B2}\text{-Xaa}_{B3}\text{-Xaa}_{B4}\text{-seu-Leu-Cys-Gly-Ser-Xaa}_{B10}\text{-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Xaa}_{B16}\text{-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Xaa}_{B24}\text{-Xaa}_{B25}\text{-Xaa}_{B26}\text{-Xaa}_{B27}\text{-Xaa}_{B28}\text{-Xaa}_{B29}\text{-Xaa}_{B30}\text{-Xaa}_{B31}\text{-Xaa}_{B32}$$

Fórmula (2) (SEQ ID No: 2)

em que

$\text{Xaa}_{A(-2)}$ está ausente ou Gly;

$\text{Xaa}_{A(-1)}$ está ausente ou Pro;

Xaa_{A0} está ausente ou Pro;

Xaa_{A8} é independentemente selecionado de Thr e His;

Xaa_{A12} é independentemente selecionado de Ser, Asp e Glu;

Xaa_{A13} é independentemente selecionado de Leu, Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser e Glu;

Xaa_{A14} é independentemente selecionado de Tyr, Thr, Asn, Asp,

Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser e Glu;

Xaa_{A15} é independentemente selecionado de Gln, Asp e Glu;

Xaa_{A18} é independentemente selecionado de Asn, Lys e Gln;

- Xaa_{A21} é independentemente selecionado de Asn e Gln;
 $Xaa_{B(-2)}$ está ausente ou Gly;
 $Xaa_{B(-1)}$ está ausente ou Pro;
 Xaa_{B0} está ausente ou Pro;
5 Xaa_{B1} está ausente ou independentemente selecionado de Phe e Glu;
 Xaa_{B2} está ausente ou Val;
 Xaa_{B3} está ausente ou independentemente selecionado de Asn e Gln;
10 Xaa_{B4} é independentemente selecionado de Gln e Glu;
 Xaa_{B10} é independentemente selecionado de His, Asp, Pro e Glu;
 Xaa_{B16} é independentemente selecionado de Tyr, Asp, Gln, His, Arg e Glu;
15 Xaa_{B24} é independentemente selecionado de Phe e His;
 Xaa_{B25} é independentemente selecionado de Asn, Phe e His;
 Xaa_{B26} está ausente ou independentemente selecionado de Tyr, His, Thr, Gly e Asp;
 Xaa_{B27} está ausente ou independentemente selecionado de Thr, 20 Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser e Glu;
 Xaa_{B28} está ausente ou independentemente selecionado de Pro, His, Gly e Asp;
 Xaa_{B29} está ausente ou independentemente selecionado de Lys, Arg e Gln; e, preferivelmente, Xaa_{B29} está ausente ou independentemente 25 selecionado de Lys e Gln;
 Xaa_{B30} está ausente ou Thr;
 Xaa_{B31} está ausente ou Leu;
 Xaa_{B32} está ausente ou Glu;
30 o término C pode ser opcionalmente derivatizado como uma amida;
em que a sequência de aminoácido de cadeia A e a sequência de aminoácido de cadeia B estão conectadas através de ligações em ponte

de dissulfeto entre as cisteínas na posição 7 da cadeia A e a cisteína na posição 7 da cadeia B, e entre a cisteína na posição 20 da cadeia A e a cisteína na posição 19 da cadeia B e em que as cisteínas na posição 6 e 11 da cadeia A estão conectadas por uma ligação em ponte de dissulfeto.

- 5 Em outra modalidade, uma insulina estabilizada em protease é um análogo de insulina que compreende uma sequência de aminoácido de cadeia A da fórmula 3:

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Xaa_{A8}-Ser-Ile-Cys-Xaa_{A12}-Xaa_{A13}-
Xaa_{A14}-Xaa_{A15}-Leu-Glu-Xaa_{A18}-Tyr-Cys-Xaa_{A21}

- 10 Fórmula (3) (SEQ ID No: 3)

e uma sequência de aminoácido de cadeia B da fórmula 4:

Xaa_{B1}-Val-Xaa_{B3}-Xaa_{B4}-seu-Leu-Cys-Gly-Ser-Xaa_{B10}-Leu-Val-
Glu-Ala-Leu-Xaa_{B16}-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Xaa_{B24}-seu-Xaa_{B26}-Xaa_{B27}-
Xaa_{B28}-Xaa_{B29}-Xaa_{B30}

- 15 Fórmula (4) (SEQ ID No: 4)

em que

Xaa_{A8} é independentemente selecionado de Thr e His;

Xaa_{A12} é independentemente selecionado de Ser, Asp e Glu;

Xaa_{A13} é independentemente selecionado de Leu, Thr, Asn, Asp,

- 20 Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser e Glu;

Xaa_{A14} é independentemente selecionado de Thr, Asn, Asp, Gln,
His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser e Glu;

Xaa_{A15} é independentemente selecionado de Gln, Asp e Glu;

Xaa_{A18} é independentemente selecionado de Asn, Lys e Gln;

- 25 Xaa_{A21} é independentemente selecionado de Asn e Gln;

Xaa_{B1} é independentemente selecionado de Phe e Glu;

Xaa_{B3} é independentemente selecionado de Asn e Gln;

Xaa_{B4} é independentemente selecionado de Gln e Glu;

Xaa_{B10} é independentemente selecionado de His, Asp, Pro e

- 30 Glu;

Xaa_{B16} é independentemente selecionado de Tyr, Asp, Gln, His,
Arg e Glu;

Xaa_{B24} é independentemente selecionado de Phe e His;

Xaa_{B26} está ausente ou independentemente selecionado de Tyr, His, Thr, Gly e Asp;

5 Xaa_{B27} está ausente ou independentemente selecionado de Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser e Glu;

Xaa_{B28} está ausente ou independentemente selecionado de Pro, His, Gly e Asp;

10 Xaa_{B29} está ausente ou independentemente selecionado de Lys, Arg e Gln; e, preferivelmente, Xaa_{B29} está ausente ou independentemente selecionado de Lys e Gln;

Xaa_{B30} está ausente ou Thr;

o término C pode ser opcionalmente derivatizado como uma amida;

15 em que a sequência de aminoácido de cadeia A e a sequência de aminoácido de cadeia B estão conectadas através de ligações em ponte de dissulfeto entre as cisteínas na posição 7 da cadeia A e a cisteína na posição 7 da cadeia B, e entre a cisteína na posição 20 da cadeia A e a cisteína na posição 19 da cadeia B e em que as cisteínas na posição 6 e 11 da cadeia A estão conectadas por uma ligação em ponte de dissulfeto.

20 Em outra modalidade, uma insulina estabilizada em protease é um análogo de insulina

em que

Xaa_{A8} é independentemente selecionado de Thr e His;

Xaa_{A12} é independentemente selecionado de Ser e Glu;

25 Xaa_{A13} é independentemente selecionado de Leu, Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser e Glu;

Xaa_{A14} é independentemente selecionado de Asp, His, e Glu;

Xaa_{A15} é independentemente selecionado de Gln e Glu;

Xaa_{A18} é independentemente selecionado de Asn, Lys e Gln;

30 Xaa_{A21} é independentemente selecionado de Asn e Gln;

Xaa_{B1} é independentemente selecionado de Phe e Glu;

Xaa_{B3} é independentemente selecionado de Asn e Gln;

Xaa_{B4} é independentemente selecionado de Gln e Glu;

Xaa_{B10} é independentemente selecionado de His, Asp, Pro e Glu;

5 Arg e Glu;

Xaa_{B24} é independentemente selecionado de Phe e His;

Xaa_{B25} é independentemente selecionado de Phe, Asn e His;

Xaa_{B26} é independentemente selecionado de Tyr, Thr, Gly e Asp;

10 His, Lys, Gly, Arg e Glu;

Xaa_{B28} é independentemente selecionado do Pro, Gly e Asp;

Xaa_{B29} é independentemente selecionado de Lys e Gln;

Xaa_{B30} está ausente ou Thr;

15 o término C pode ser opcionalmente derivatizado como uma amida;

em que a sequência de aminoácido de cadeia A e a sequência de aminoácido de cadeia B estão conectadas através de ligações em ponte de dissulfeto entre as cisteínas na posição 7 da cadeia A e a cisteína na posição 7 da cadeia B, e entre a cisteína na posição 20 da cadeia A e a cisteína na posição 19 da cadeia B e em que as cisteínas na posição 6 e 11 da cadeia A estão conectados por uma ligação em ponte de dissulfeto.

20 Outras modalidades de insulinas estabilizadas em protease são mencionadas abaixo.

25 Uma "protease" ou uma "enzima de protease" é uma enzima digestiva que degrada as proteínas e os peptídeos e que é encontrada em vários tecidos do corpo humano, por exemplo, o estômago (pepsina), o lúmen intestinal (quimiotripsina, tripsina, elastase, carboxipeptidases, etc.) ou superfícies mucosas do trato GI (aminopeptidases, carboxipeptidases, enteropeptidases, dipeptidil peptidases, endopeptidases, etc.), o fígado (enzima degradante de insulina, catepsina D, etc), e em outros tecidos.

30 Um análogo de insulina proteoliticamente estável (também designado uma insulina estabilizada em protease) é aqui para ser entendido

como um análogo de insulina que é submetido à degradação mais lenta por uma ou mais proteases com relação à insulina humana. Em uma modalidade, uma insulina estabilizada em protease é submetida à degradação mais lenta por uma ou mais proteases com relação à insulina parental. Em uma
5 outra modalidade, uma insulina estabilizada em protease é estabilizada contra degradação por uma ou mais enzimas selecionadas do grupo que consiste em: pepsina (tal como, por exemplo, as isoformas pepsina A, pepsina B, pepsina C e/ou pepsina F), quimiotripsina (tal como, por exemplo, as isoformas quimiotripsina A, quimiotripsina B e/ou quimiotripsina C), tripsina, Enzima Insulino-Degradante (IDE), elastase (tal como, por exemplo, as isoformas elastase pancreática I e/ou II), carboxipeptidase (por exemplo, as isoformas carboxipeptidase A, carboxipeptidase A2 e/ou carboxipeptidase B), aminopeptidase, catepsina D e outras enzimas presentes nos extratos intestinais derivados de rato, porco ou ser humano.
10

15 Em uma modalidade, uma insulina estabilizada em protease é estabilizada contra degradação por uma ou mais enzimas selecionadas do grupo que consiste em: quimiotripsina, tripsina, Enzima Insulino-Degradante (IDE), elastase, carboxipeptidases, aminopeptidases e catepsina D. Em uma outra modalidade, uma insulina estabilizada em protease é estabilizada contra
20 degradação por uma ou mais enzimas selecionadas do grupo que consiste em: quimiotripsina, carboxipeptidases e IDE. Em ainda uma outra modalidade, uma insulina estabilizada em protease é estabilizada contra degradação por uma ou mais enzimas selecionadas de: quimiotripsina e carboxipeptidases.

25 $T_{1/2}$ pode ser determinado como descrito nos Exemplos como uma medida da estabilidade proteolítica de uma insulina estabilizada em protease para enzimas de protease tais como quimiotripsina, pepsina e/ou carboxipeptidase A. Em uma modalidade da invenção, $T_{1/2}$ é aumentado com relação à insulina humana. Em uma outra modalidade, $T_{1/2}$ é aumentado com
30 relação à insulina parental. Em ainda uma outra modalidade, $T_{1/2}$ é aumentado pelo menos 2 vezes com relação à insulina parental. Em ainda uma outra modalidade, $T_{1/2}$ é aumentado pelo menos 3 vezes com relação à insulina

parental. Em ainda uma outra modalidade, $T_{1/2}$ é aumentado pelo menos 4 vezes com relação à insulina parental. Em ainda uma outra modalidade, $T_{1/2}$ é aumentado pelo menos 5 vezes com relação à insulina parental. Em ainda uma outra modalidade, $T_{1/2}$ é aumentado pelo menos 10 vezes com relação à insulina parental.

Um modo alternativo de medir a estabilidade proteolítica é medir a estabilidade relativa a um comparador, por exemplo, insulina humana. A estabilidade relativa é definida como $T_{1/2}/T_{1/2}(\text{comparador})$, onde $T_{1/2}$ e $T_{1/2}(\text{comparador})$ são as meia-vidas do análogo e do comparador, respectivamente, no ensaio de degradação. Na seção dos exemplos, a estabilidade relativa das insulinas selecionadas da invenção para uma mistura de enzima extraída de duodeno de ratos é dada (com relação à insulina humana como também com relação a uma insulina resistente à protease sem acilação).

Sítios de clivagem de protease (aqui também mencionados como sítios de protease) serão entendidos como resíduos de aminoácido que são reconhecidos através de proteases e/ou resíduos de aminoácido cuja ligação de peptídeo é clivada através das proteases. Sítios de clivagem de protease podem ser determinados determinando a clivagem de "áreas quentes" por análise de HPLC, MS ou LC-MS e/ou por predição com base na especificidade da enzima da enzima de protease para a qual o sítio de clivagem de protease é para ser determinado. Uma pessoa versada na técnica saberá determinar os sítios de clivagem de protease, por exemplo, com base nas especificidades da enzima como, por exemplo, descrito em Handbook of Proteolytical Enzymes, 2ª ed., Barrett, A. J., Rawlings, N. D., Woessner, J.F. editores, Elsevier Academic Press 2004. Por exemplo, quimiotripsina é prognosticada clivar ligações de peptídeo C-terminais para resíduos aromáticos (Trp, Tyr, Phe ou Leu), que não sejam seguidos por Pro. Similarmente, tripsina é prognosticada clivar ligações de peptídeo C-terminais para resíduos básicos Lys ou Arg que não sejam seguidos por Pro, elastase é prognosticada clivar resíduos C-terminais para Ala, Val, Gly ou Ser e carboxipeptidase A removerá qualquer aminoácido C-terminal, mas não Arg, Lys ou Pro. Enzima insulino-degradante (IDE) é prognosticada clivar as seguintes posições da

insulina humana B9-10, B10-11, B13-14, B14-15, B24-25, B25-26, A13-14 e A14-15.

O termo que substitui (a) aminoácido "dentro ou em proximidade íntima" a um sítio de clivagem de protease é aqui usado para indicar a substituição de um aminoácido dentro ou em proximidade íntima a uma posição da insulina parental que foi determinada para ser um sítio de clivagem de protease. Em uma modalidade, dois ou mais aminoácidos hidrofóbicos dentro ou em proximidade íntima a dois ou mais sítios de protease em uma insulina são substituídos, em que os ditos aminoácidos hidrofóbicos são substituídos com aminoácidos hidrófilos. Em uma outra modalidade, dois ou mais aminoácidos hidrofóbicos dentro de dois ou mais sítios de protease em uma insulina são substituídos com aminoácidos hidrófilos. Em ainda uma outra modalidade, dois ou mais aminoácidos hidrofóbicos situados próximos a dois ou mais sítios de protease em uma insulina são substituídos com aminoácidos hidrófilos. Em ainda uma outra modalidade, dois ou mais aminoácidos hidrofóbicos situados dois aminoácidos longe de dois ou mais sítios de protease em uma insulina são substituídos com aminoácidos hidrófilos. Em ainda uma outra modalidade, dois ou mais aminoácidos hidrofóbicos situados três aminoácidos longe de dois ou mais sítios de protease em uma insulina são substituídos com aminoácidos hidrófilos. Em ainda uma outra modalidade, dois ou mais aminoácidos hidrofóbicos situados até quatro aminoácidos longe de dois ou mais sítios de protease em uma insulina são substituídos com aminoácidos hidrófilos. Em ainda uma outra modalidade, dois ou mais aminoácidos hidrofóbicos situados um, dois ou três aminoácidos longe ou dentro de dois ou mais sítios de protease em uma insulina são substituídos com aminoácidos hidrófilos. Em ainda uma outra modalidade, dois ou mais aminoácidos hidrofóbicos situados um ou dois aminoácidos longe ou dentro de dois ou mais sítios de protease em uma insulina são substituídos com aminoácidos hidrófilos. Em ainda uma outra modalidade, dois ou mais aminoácidos hidrofóbicos situados próximos ou dentro de dois ou mais sítios de protease em uma insulina são substituídos com aminoácidos hidrófilos.

Uma insulina estabilizada em protease pode ter uma carga líqui-

da que é diferente da carga líquida da insulina parental. Em uma modalidade, a carga líquida de uma insulina estabilizada em protease é mais positiva que a carga líquida da insulina parental. Em uma modalidade, a carga líquida de uma insulina estabilizada em protease é mais negativa que a carga líquida da insulina parental. Em uma modalidade, a carga de rede positiva média de uma insulina estabilizada em protease está entre 0,5 e 5 quando medida em uma solução aquosa. Em uma modalidade, a carga de rede positiva média de uma insulina estabilizada em protease está entre 1 e 5. Em uma modalidade, a carga de rede positiva média de uma insulina estabilizada em protease está entre 1 e 4. Em uma modalidade, a carga de rede positiva média de uma insulina estabilizada em protease está entre 1 e 3. Em uma modalidade, a carga de rede positiva média de uma insulina estabilizada em protease está entre 2 e 3. Em uma modalidade, a carga de rede negativa média de uma insulina estabilizada em protease está entre -0,5 e -5 quando medida em uma solução aquosa. Em uma modalidade, a carga de rede negativa média de uma insulina estabilizada em protease está entre -1 e -5. Em uma modalidade, a carga de rede negativa média de uma insulina estabilizada em protease está entre -1 e -4. Em uma modalidade, a carga de rede negativa média de uma insulina estabilizada em protease está entre -1 e -3. Em uma modalidade, a carga de rede negativa média de uma insulina estabilizada em protease está entre -2 e -3.

Em uma modalidade, uma insulina estabilizada em protease pode ter solubilidade aumentada com relação à insulina humana. Em uma outra modalidade, uma insulina estabilizada em protease tem solubilidade aumentada com relação à insulina humana em pH 3-9. Em ainda uma outra modalidade, uma insulina estabilizada em protease tem solubilidade aumentada com relação à insulina humana em pH 4-8,5. Em ainda uma outra modalidade, uma insulina estabilizada em protease tem solubilidade aumentada com relação à insulina humana em pH 4-8. Em ainda uma outra modalidade, uma insulina estabilizada em protease tem solubilidade aumentada com relação à insulina humana em pH 4,5-8. Em uma outra modalidade, uma insulina estabilizada em protease tem solubilidade aumentada com relação à in-

5 sulina humana em pH 5-8. Em ainda uma outra modalidade, uma insulina estabilizada em protease tem solubilidade aumentada com relação à insulina humana em pH 5,5-8. Em uma outra modalidade, uma insulina estabilizada em protease tem solubilidade aumentada com relação à insulina humana em pH 6-8.

 Em uma modalidade, uma insulina estabilizada em protease tem solubilidade aumentada com relação à insulina humana em pH 2-4.

10 Em uma modalidade, uma insulina estabilizada em protease pode ter solubilidade aumentada com relação à insulina parental. Em uma outra modalidade, uma insulina estabilizada em protease tem solubilidade aumentada com relação à insulina parental em pH 3-9. Em ainda uma outra modalidade, uma insulina estabilizada em protease tem solubilidade aumentada com relação à insulina parental em pH 4-8,5. Em ainda uma outra modalidade, uma insulina estabilizada em protease tem solubilidade aumentada com relação à insulina parental em pH 4-8. Em ainda uma outra modalidade, uma insulina estabilizada em protease tem solubilidade aumentada com relação à insulina parental em pH 4,5-8. Em ainda uma outra modalidade, uma insulina estabilizada em protease tem solubilidade aumentada com relação à insulina parental em pH 5-8. Em ainda uma outra modalidade, uma insulina estabilizada em protease tem solubilidade aumentada com relação à insulina parental em pH 5,5-8. Em uma outra modalidade, uma insulina estabilizada em protease tem solubilidade aumentada com relação à insulina parental em pH 6-8.

25 Em uma modalidade, uma insulina estabilizada em protease tem solubilidade aumentada com relação à insulina parental em pH 2-4.

30 Por "tem solubilidade aumentada em um pH dado" é significado que uma concentração maior de uma insulina estabilizada em protease dissolve em uma solução aquosa ou de tampão no pH da solução com relação à insulina parental. Métodos para determinar se a insulina contida em uma solução é dissolvida são conhecidos na técnica.

 Em uma modalidade, a solução pode ser submetida à centrifugação durante 20 minutos a 30.000 g e depois a concentração de insulina no

sobrenadante pode ser determinada por RP-HPLC. Se esta concentração for igual dentro de erro experimental à concentração de insulina originalmente usada para fazer a composição, então a insulina é completamente solúvel na composição da invenção. Em outra modalidade, a solubilidade da insulina em uma composição da invenção pode ser determinada simplesmente examinando por olho o recipiente dentro do qual a composição está contida. A insulina é solúvel se a solução estiver clara ao olho e não importa particulado ou é suspensa ou precipitada nas laterais/fundo do recipiente.

Uma insulina estabilizada em protease pode ter potência aparente e/ou biodisponibilidade aumentadas com relação à insulina parental quando comparada na medição.

Ensaio-padrão para medir a potência da insulina *in vitro* são conhecidos à pessoa versada na técnica e são incluídos *inter alia* (1) ensaios radiorreceptores de insulina em que a potência relativa de uma insulina é definida como a razão de insulina para o análogo de insulina requerido para especificamente deslocar 50% da ^{125}I -insulina ligada aos receptores de insulina presentes nas membranas celulares, por exemplo, uma fração da membrana plasmática de fígado de rato; (2) ensaios de lipogênese, executados, por exemplo, com adipócitos de rato em que a potência de insulina relativa é definida como a razão de insulina para análogo de insulina requerido para alcançar 50% da conversão máxima de $[3\text{-}^3\text{H}]$ glicose em material orgânico-extraível (isto é, lipídios); (3) ensaios de oxidação de glicose em células adiposas isoladas em que a potência relativa do análogo de insulina é definida como a razão de insulina para o análogo de insulina alcançar 50% da conversão máxima de glicose-1- $[^{14}\text{C}]$ em $[^{14}\text{CO}_2]$; (4) radioimunoensaio de insulina que pode determinar a imunogenicidade dos análogos de insulina medindo a efetividade pela qual a insulina ou um análogo de insulina compete com ^{125}I -insulina ligando aos anticorpos anti-insulina específicos; e (5) outros ensaios que medem a ligação da insulina ou um análogo de insulina aos anticorpos nas amostras de plasma de sangue animal, tais como ensaios de ELISA que possuem anticorpos de insulina específicos.

Potência aparente *in vivo* aumentada pode ser estima-

da/visualizada por comparação dos perfis de glicose do sangue vs. tempo da insulina em questão com uma insulina similar sem mutações de estabilização de protease dadas em doses similares. A insulina da invenção terá efeito redutor de glicose sanguínea aumentada com relação ao comparador.

5 Ensaio-padrão para medir a biodisponibilidade da insulina são conhecidos à pessoa versada na técnica e incluem *inter alia* medição das áreas relativas sob a curva (AUC) para a concentração da insulina em questão administrada pulmonar ou oralmente e de modo intravenoso (i.v.) nas mesmas espécies. Quantificação das concentrações de insulina em amostras de sangue (plasma) pode ser feita usando, por exemplo, ensaios de anticorpo (ELISA) ou através de espectrometria de massa. Administração pulmonar pode ser executada através de vários meios. Por exemplo, insulinas podem ser dosadas em ratos através de instilação a gotas, ou em porcos através de insuflação de pó seco.

15 Insulina estabilizada em protease pode ser opcionalmente analisada para outros sítios de protease que podem estar sujeitos a mais substituições de um ou mais aminoácidos hidrofóbicos com aminoácidos hidrófilos. Uma insulina estabilizada em protease pode ser um análogo de insulina que tem pelo menos dois ácidos hidrófilos nos sítios de protease comparados à insulina parental, a primeira insulina modificada, e que tem também pelo menos uma substituição de aminoácido em um sítio de protease novo da primeira insulina modificada em que pelo menos um aminoácido hidrofóbico foi substituído com pelo menos um aminoácido hidrófilo.

25 Por causa de conveniência, aqui segue os nomes de aminoácidos naturais codificáveis, com os códigos de três letras & códigos de uma letra usuais entre parêntese: Glicina (Gly & G), prolina (Pro & P), alanina (Ala & A), valina (Val & V), leucina (Leu & L), isoleucina (Ile & I), metionina (Met & M), cisteína (Cys & C), fenilalanina (Phe & F), tirosina (Tyr & Y), triptofano (Trp & W), histidina (His & H), lisina (Lys & K), arginina (Arg & R), glutamina (Gln & Q), asparagina (Asn & N), ácido glutâmico (Glu & E), ácido aspártico (Asp & D), serina (Ser & S) e treonina (Thr & T). Se, devido a erros de tipagem, houver desvios dos códigos comumente usados, os códigos comumen-

te usados aplicam-se. Os aminoácidos presentes nas insulinas desta invenção são, preferivelmente, aminoácidos que podem ser codificados por um ácido nucleico. Em uma modalidade, a insulina ou um análogo de insulina é substituído por Gly, Glu, Asp, His, Gln, Asn, Ser, Thr, Lys, Arg e/ou Pro e/ou

5 Gly, Glu, Asp, His, Gln, Asn, Ser, Thr, Lys, Arg e/ou Pro é/são acrescentado(s) à insulina ou um análogo de insulina. Em uma modalidade, a insulina ou um análogo de insulina é substituído por Glu, Asp, His, Gln, Asn, Lys e/ou Arg e/ou Glu, Asp, His, Gln, Asn, Lys e/ou Arg é/são acrescentado(s) à insulina ou um análogo de insulina.

10 Em uma modalidade, uma insulina estabilizada em protease é selecionada do grupo que consiste nos compostos seguintes: insulina humana de A14E, B25H, desB30; insulina humana de A14H, B25H, desB30; insulina humana de A14E, B1E, B25H, desB30; insulina humana de A14E, B16E, B25H, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B28D, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B27E, desB30; insulina humana de A14E, B1E, B25H, B27E, desB30; insulina humana de A14E, B1E, B16E, B25H, B27E, desB30; insulina humana de A8H, A14E, B25H, desB30; insulina humana de A8H, A14E, B25H, B27E, desB30; insulina humana de A8H, A14E, B1E, B25H, desB30; insulina humana de A8H, A14E, B1E, B25H, B27E, desB30; insulina humana de A8H, A14E, B1E, B16E, B25H, B27E, desB30; insulina humana de A8H, A14E, B16E, B25H, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B26D, desB30; insulina humana de A14E, B1E, B27E, desB30; insulina humana de A14E, B27E, desB30; insulina humana de A14E, B28D, desB30; insulina humana de A14E, B28E, desB30; insulina humana de

15 A14E, B1E, B28E, desB30; insulina humana de A14E, B1E, B27E, B28E, desB30; insulina humana de A14E, B1E, B25H, B28E, desB30; insulina humana de A14E, B1E, B25H, B27E, B28E, desB30; insulina humana de A14D, B25H, desB30; insulina humana de B25N, B27E, desB30; insulina humana de A8H, B25N, B27E, desB30; insulina humana de A14E, B27E, B28E, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B28E, desB30; insulina humana de B25H, B27E, desB30; insulina humana de B1E, B25H, B27E, desb30; insulina humana de A8H, insulina humana de B1E, B25H, B27E,

20 25 30

desB30; insulina humana de A8H, B25H, B27E, desB30; insulina humana de B25N, B27D, desB30; insulina humana de A8H, B25N, B27D, desB30; insulina humana de B25H, B27D, desB309; insulina humana de A8H, B25H, B27D, desB30; insulina humana de A(-1)P, A(0)P, A14E, B25H, desB30; insulina humana de A14E, B(-1)P, B(0)P, B25H, desB30; insulina humana de A(-1)P, A(0)P, A14E, B(-1)P, B(0)P, B25H, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B30T, B31L, B32E; insulina humana de A14E, B25H; insulina humana de A14E, B16H, B25H, desB30; insulina humana de A14E, B10P, B25H, desB30; insulina humana de A14E, B10E, B25H, desB30; insulina humana de A14E, B4E, B25H, desB30; insulina humana de A14H, B16H, B25H, desB30; insulina humana de A14H, B10E, B25H, desB30; insulina humana de A13H, A14E, B10E, B25H, desB30; insulina humana de A13H, A14E, B25H, desB30; insulina humana de A14E, A18Q, B3Q, B25H, desB30; insulina humana de A14E, B24H, B25H, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30; insulina humana de A14E, A21G, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30; insulina humana de A14E, A21G, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30; insulina humana de A14E, A18Q, A21Q, B3Q, B25H, desB30; insulina humana de A14E, A18Q, A21Q, B3Q, B25H, B27E, desB30; insulina humana de A14E, A18Q, B3Q, B25H, desB30; insulina humana de A13H, A14E, B1E, B25H, desB30; insulina humana de A13N, A14E, B25H, desB30; insulina humana de A13N, A14E, B1E, B25H, desB30; insulina humana de A(-2)G, A(-1)P, A(0)P, A14E, B25H, desB30; insulina humana de A14E, B(-2)G, B(-1)P, B(0)P, B25H, desB30; insulina humana de A(-2)G, A(-1)P, A(0)P, A14E, B(-2)G, B(-1)P, B(0)P, B25H, desB30; insulina humana de A14E, B27R, B28D, B29K, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B27R, B28D, B29K, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B26T, B27R, B28D, B29K, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B27R, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B27H, desB30; insulina humana de A14E, A18Q, B3Q, B25H, desB30; insulina humana de A13E, A14E, B25H, desB30; insulina humana de A12E, A14E, B25H, desB30; insulina humana de A15E, A14E, B25H, desB30; insulina humana

de A13E, B25H, desB30; insulina humana de A12E, B25H, desB30; insulina humana de A15E, B25H, desB30; insulina humana de A14E, B25H, desB27, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B26D, B27E, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B27R, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B27N, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B27D, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B27Q, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B27E, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B27G, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B27H, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B27K, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B27P, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B27S, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B27T, desB30; insulina humana de A13R, A14E, B25H, desB30; insulina humana de A13N, A14E, B25H, desB30; insulina humana de A13D, A14E, B25H, desB30; insulina humana de A13Q, A14E, B25H, desB30; insulina humana de A13E, A14E, B25H, desB30; insulina humana de A13G, A14E, B25H, desB30; insulina humana de A13H, A14E, B25H, desB30; insulina humana de A13K, A14E, B25H, desB30; insulina humana de A13P, A14E, B25H, desB30; insulina humana de A13S, A14E, B25H, desB30; insulina humana de A13T, A14E, B25H, desB30; insulina humana de A14E, B16R, B25H, desB30; insulina humana de A14E, B16D, B25H, desB30; insulina humana de A14E, B16Q, B25H, desB30; insulina humana de A14E, B16E, B25H, desB30; insulina humana de A14E, B16H, B25H, desB30; insulina humana de A14R, B25H, desB30; insulina humana de A14N, B25H, desB30; insulina humana de A14D, B25H, desB30; insulina humana de A14Q, B25H, desB30; insulina humana de A14E, B25H, desB30; insulina humana de A14G, B25H, desB30; insulina humana de A14H, B25H, desB30; insulina humana de A8H, B10D, B25H; e insulina humana de A8H, A14E, B10E, B25H, desB30 e esta modalidade pode, opcionalmente, compreender insulina humana de A14E, B25H, B29R, desB30; insulina humana de B25H, desB30; e insulina humana de B25N, desB30.

30 Em uma modalidade preferida, uma insulina estabilizada em protease é selecionada do grupo que consiste nos compostos seguintes: insulina humana de A14E, B25H, desB30; insulina humana de A14E, B16H,

B25H, desB30; insulina humana de A14E, B16E, B25H, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29R, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30; insulina humana de B25H, desB30 e insulina humana de A14E, B25H, desB27, desB30.

- 5 Em uma modalidade preferida, uma insulina estabilizada em protease é selecionada de quaisquer dos grupos acima que, além disso, está contendo a mutação de desB27.

 Em uma modalidade preferida, uma insulina estabilizada em protease é selecionada do grupo que consiste nos compostos seguintes: insulina humana de A14E, B25H, desB27, desB30; insulina humana de A14E, B16H, B25H, desB27, desB30; insulina humana de A14E, B16E, B25H, desB27, desB30; insulina humana de A14E, B25H, desB27, B29R, desB30 e insulina humana de B25H, desB27, desB30.

- 15 Em uma modalidade, uma insulina estabilizada em protease é selecionada de quaisquer dos grupos acima que, além disso, está contendo as mutações seguintes na posição A21 e/ou B3 para melhorar a estabilidade química: A21G, desA21, B3Q ou B3G.

 Em uma modalidade preferida, uma insulina estabilizada em protease é selecionada das seguintes insulinas estabilizadas em protease: insulina humana de A14E, A21G, B25H, desB30; insulina humana de A14E, A21G, B16H, B25H, desB30; insulina humana de A14E, A21G, B16E, B25H, desB30; insulina humana de A14E, A21G, B25H, desB27, desB30; insulina humana de A14E, A21G, B25H, desB27, desB30; insulina humana de A14E, A21G, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30; insulina humana de A14E, A21G, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30; insulina humana de A21G, B25H, desB30 e A21G, B25N, desB30, e, preferivelmente, é selecionada das seguintes insulinas estabilizadas em protease: insulina humana de A14E, A21G, B25H, desB30; insulina humana de A14E, A21G, B16H, B25H, desB30; insulina humana de A14E, A21G, B16E, B25H, desB30; insulina humana de A14E, A21G, B25H, desB27, desB30; insulina humana de A14E, A21G, B25H, desB27, desB30; insulina humana de A21G, B25H, desB30 e insulina humana de A21G, B25N, desB30.

Em uma modalidade preferida, uma insulina estabilizada em protease é acilada na posição B29, na posição de nitrogênio epsilon de B29K.

Em uma modalidade preferida, uma insulina estabilizada em protease é acilada na posição A1, na posição de nitrogênio alfa de A1.

5 Em uma modalidade preferida, uma insulina estabilizada em protease é acilada na posição A1, na posição de nitrogênio alfa de A1, e a insulina estabilizada em protease está compreendendo a mutação de B29R.

10 As insulinas estabilizadas em protease são produzidas expressando uma sequência de DNA que codifica a insulina em questão em uma célula hospedeira adequada através de técnica bem conhecida como descrita, por exemplo, na Patente US 6.500.645. A insulina estabilizada em protease ou é expressada diretamente ou como uma molécula de precursor que tem uma extensão N-terminal na cadeia B. Esta extensão N-terminal pode ter a função de aumentar o rendimento do produto diretamente expresso e
15 pode ser de até 15 resíduos de aminoácido. A extensão N-terminal será clivada *in vitro* após isolamento do caldo de cultura e terá um sítio de clivagem, portanto próximo a B1. Extensões N-terminais do tipo adequado nesta invenção são descritas na Patente U. S. 5.395.922, e Patente europeia 765.395A.

20 A sequência de polinucleotídeo que codifica para a insulina estabilizada em protease pode ser sinteticamente preparada através de métodos-padrão estabelecidos, por exemplo, o método de fosfoamidita descrito por Beaucage et al. (1981) *Tetrahedron Letters* 22:1859-1869, ou o método descrito por Matthes et al. (1984) *EMBO Journal* 3: 801-805. De acordo com
25 o método de fosfoamidita, os oligonucleotídeos são sintetizados, por exemplo, em um sintetizador de DNA automático, purificados, duplexados e ligados para formar o construto de DNA sintética. Um modo correntemente preferido de preparar o construto de DNA é através de reação em cadeia da polimerase (PCR).

30 As sequências de polinucleotídeo podem também ser de origem genômica misturada, de cDNA e sintética. Por exemplo, uma sequência genômica ou de cDNA que codifica um peptídeo líder pode ser unida a uma

sequência genômica ou de cDNA que codifica as cadeias A e B após a qual a sequência de DNA pode ser modificada em um sítio inserindo oligonucleotídeos sintéticos que codificam a sequência de aminoácido desejada para recombinação homóloga de acordo com procedimentos bem conhecidos ou preferivelmente gerando a sequência desejada por PCR usando oligonucleotídeos adequados.

O método recombinante tipicamente fará uso de um vetor que é capaz de replicar-se no micro-organismo selecionado ou célula hospedeira e que carrega uma sequência de polinucleotídeo que codifica a insulina estabilizada em protease. O vetor recombinante pode ser um vetor de replicação autônoma, isto é, um vetor que existe como uma entidade extracromossômica, a replicação deste é independente da replicação cromossômica, por exemplo, um plasmídeo, um elemento extracromossômico, um minicromossomo ou um cromossomo artificial. O vetor pode conter quaisquer meios para assegurar autorreplicação. Alternativamente, o vetor pode ser um que, quando introduzido na célula hospedeira, é integrado no genoma e replicado junto com o(s) cromossomo(s) ao(s) qual(is) foi integrado. Além disso, um só vetor ou plasmídeo ou dois ou mais vetores ou plasmídeos que juntos contêm o DNA total a ser introduzido no genoma da célula hospedeira, ou um transpósion, pode ser usado. O vetor pode ser plasmídeos circulares lineares ou fechados e pode preferivelmente conter um/uns elemento(s) que permite(m) integração estável do vetor no genoma da célula hospedeira ou replicação autônoma do vetor na célula independente do genoma.

O vetor de expressão recombinante é capaz de replicar-se em levedura. Exemplos de sequências que permitem o vetor a se replicar em levedura são genes de replicação de 2 μ m de plasmídeo de levedura REP 1-3 e origem de replicação.

O vetor pode conter um ou mais marcadores selecionáveis que permitem seleção fácil das células transformadas. Um marcador selecionável é um produto de gene que fornece resistência biocida ou viral, resistência a metais pesados, prototrofia a auxotrofos, e outros. Exemplos de marcadores selecionáveis bacterianos são os genes *dal* de *Bacillus subtilis* ou *Bacil-*

lus licheniformis, ou marcadores que conferem resistência antibiótica tal como resistência à ampicilina, canamicina, cloranfenicol ou de tetraciclina. Marcadores selecionáveis para o uso em uma célula hospedeira fúngica filamentosa incluem *amdS* (acetamidase), *argB* (ornitina carbamoiltransferase), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato descarboxilase) e *trpC* (antranilato sintase). Marcadores adequados para células hospedeiras de levedura são ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1, e URA3. Um marcador selecionável bem conhecido para levedura é o gene *TPI* de *Schizosaccharomyces pombe* (Russell (1985) *Gene* 40:125-130).

10 No vetor, a sequência de polinucleotídeo está operavelmente conectada a uma sequência de promotor adequada. O promotor pode ser qualquer sequência de ácido nucleico que mostre atividade transcricional na célula hospedeira de escolha incluindo os promotores mutantes, truncados, e híbridos, e pode ser obtida de genes que codificam polipeptídeos extracelulares ou intracelulares homólogos ou heterólogos para a célula hospedeira.

15 Exemplos de promotores adequados para direcionar a transcrição em uma célula hospedeira bacteriana, são os promotores obtidos do operon *lac* de *E. coli*, gene da agarase de *Streptomyces coelicolor* (*dagA*), gene da levansucrase de *Bacillus subtilis* (*sacB*), gene da alfa-amilase de *Bacillus licheniformis* (*amyL*), gene da amilase maltogênica de *Bacillus stearothermophilus* (*amyM*), gene da alfa-amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* (*amyQ*), e gene da penicillinase de *Bacillus licheniformis* (*penP*). Exemplos de promotores adequados para direcionar a transcrição em uma célula hospedeira fúngica filamentosa são promotores obtidos dos genes para TAKA da amilase de *Aspergillus oryzae*, proteinase aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilase neutra de *Aspergillus niger*, e alfa-amilase estável de ácido de *Aspergillus niger*. Em um hospedeiro de levedura, promotores úteis são os promotores de Ma1, TPI, ADH ou PGK de *Saccharomyces cerevisiae*.

25 A sequência de polinucleotídeo que codifica a insulina estabilizada em protease também tipicamente será operavelmente conectada a um terminador adequado. Em levedura, um terminador adequado é o terminador de TPI (Alber et al. (1982) *J. Mol. Appl. Genet.* 1:419-434).

Os procedimentos usados para ligar a sequência de polinucleotídeo que codifica a insulina estabilizada em protease, o promotor e o terminador, respectivamente, e os inserir em um vetor adequado que contém a informação necessária para replicação no hospedeiro selecionado, são bem conhecidos às pessoas versadas na técnica. Será entendido que o vetor ou pode ser construído primeiro preparando um construto de DNA contendo a sequência de DNA inteira que codifica as insulinas desta invenção, e subsequentemente inserindo este fragmento em um vetor de expressão adequado, ou sequencialmente inserindo os fragmentos de DNA contendo informação genética aos elementos individuais (tais como o sinal, pró-peptídeo, peptídeo de conexão, cadeias A e B) seguido por ligação.

O vetor que compreende a sequência de polinucleotídeo que codifica a insulina estabilizada em protease é introduzido em uma célula hospedeira de forma que o vetor seja mantido como um cromossômico integrante ou como um vetor extracromossômico autorreplicativo. O termo "célula hospedeira" abrange qualquer progênie de uma célula parental que não seja idêntica à célula parental devido às mutações que ocorrem durante a replicação. A célula hospedeira pode ser um micro-organismo unicelular, por exemplo, um procaríoto, ou um micro-organismo não unicelular, por exemplo, um eucarioto. Células unicelulares úteis são células bacterianas tais como bactérias gram-positivas incluindo, mas não limitadas a, uma célula de *Bacillus*, célula de *Streptomyces*, ou bactérias gram-negativas tais como *E. coli* e *Pseudomonas* sp. Células eucariotas podem ser células mamíferas, de inseto, vegetais, ou fúngicas. Em uma modalidade, a célula hospedeira é uma célula de levedura. O organismo de levedura pode ser qualquer organismo de levedura adequado que, sob cultivo, produz quantidades grandes da insulina de cadeia simples da invenção. Exemplos de organismos de levedura adequados são cepas selecionadas das moedas metálicas de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces uvarum*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia kluyveri*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida* sp., *Candida utilis*, *Candida cacaoi*, *Geotrichum* sp., e *Geo-*

trichum fermentans.

A transformação das células de levedura pode ser realizada, por exemplo, por formação de protoplasto seguida por transformação de uma maneira conhecida *per se*. O meio usado para cultivar as células pode ser qualquer meio convencional adequado para cultivar organismos de levedura. A insulina segregada, uma proporção significativa desta estará presente no meio em forma corretamente processada, pode ser restabelecida do meio através de procedimentos convencionais incluindo separando as células de levedura do meio através de centrifugação, filtração ou pegando o precursor de insulina por uma matriz de permuta de íons ou por uma matriz de absorção de fase reversa, precipitando os componentes proteínicos do sobrenadante ou filtrado por meio de um sal, por exemplo, sulfato de amônio, seguido por purificação por uma variedade de procedimentos cromatográficos, por exemplo, cromatografia de permuta de íons, cromatografia de afinidade, ou outros.

Preferivelmente, as insulinas aciladas desta invenção são monossustituídas tendo apenas um grupo de acilação preso a um resíduo de aminoácido lisina na molécula de insulina estabilizada em protease.

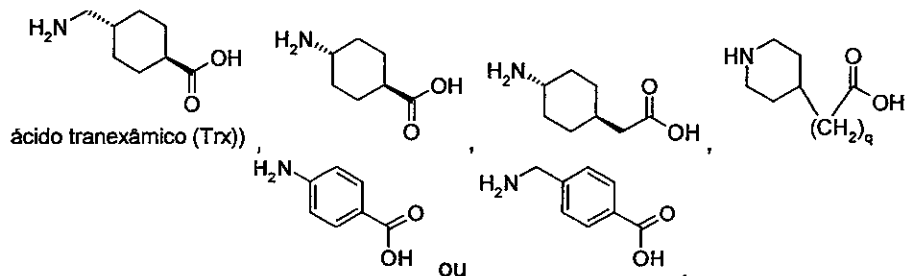
Em uma modalidade, a porção de acila ligada à insulina estabilizada em protease tem a fórmula geral:



em que n é 0 ou um número inteiro na faixa de 1 a 3; m é 0 ou um número inteiro na faixa de 1 a 10; p é 0 ou um número inteiro na faixa de 1 a 10; insulina humana de Acy é um ácido graxo ou um diácido graxo que compreende de cerca de 8 a cerca de 24 átomos de carbono; insulina humana de AA1 é um resíduo de aminoácido linear ou cíclico neutro; insulina humana de AA2 é um resíduo de aminoácido ácido; insulina humana de AA3 é um resíduo de aminoácido neutro, contendo alquilenoglicol; a ordem pela qual AA1, AA2 e AA3 aparece na fórmula pode ser independentemente trocada; insulina humana de AA2 pode ocorrer várias vezes ao longo da fórmula (por exemplo, Acy-AA2-AA3₂-AA2-); insulina humana de AA2 pode ocorrer independentemente (= sendo diferente) várias vezes ao longo da

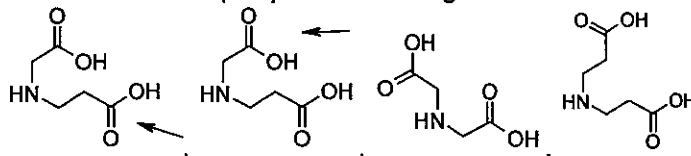
fórmula (por exemplo, $\text{Acy-AA2-AA3}_2\text{-AA2-}$); as conexões entre Acy , AA1 , AA2 e/ou AA3 são ligações de amida (peptídeo) que, formalmente, podem ser obtidas por remoção de um átomo de hidrogênio ou um grupo hidroxila (água) de cada um de Acy , AA1 , AA2 e AA3 ; e ligação à insulina estabilizada em protease pode ser da extremidade C-terminal de um resíduo de AA1 , AA2 , ou AA3 na porção de acila da fórmula (I) ou de uma das cadeias laterais de um resíduo de AA2 presente na porção da fórmula (I).

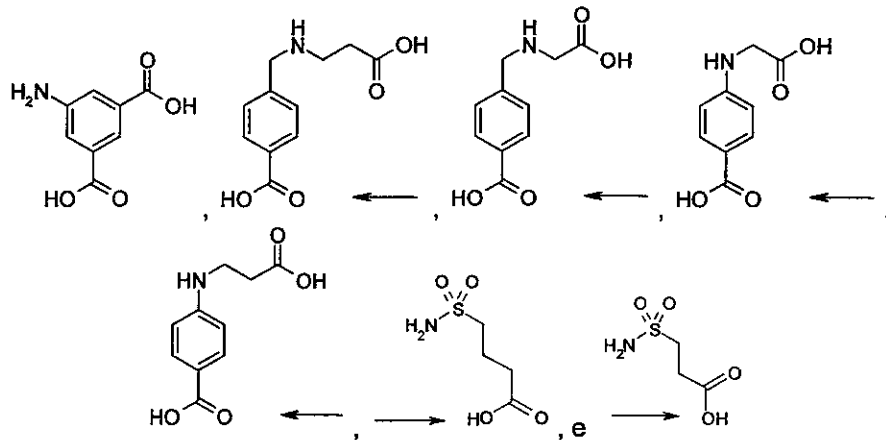
Em outra modalidade, a porção de acila ligada à insulina estabilizada em protease tem a fórmula geral $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p\text{-}$ (I), em que AA1 é selecionado de Gly, D- ou L-Ala, βAla , ácido 4-aminobutírico, ácido 5-aminovalérico, ácido 6-amino-hexanoico, D- ou L-Glu- α -amida, D- ou L-Glu- γ -amida, D- ou L-Asp- α -amida, D- ou L-Asp- β -amida, ou um grupo de uma das fórmulas:



dos quais um átomo de hidrogênio e/ou um grupo hidroxila foi(ram) removido(s) e em que q é 0, 1, 2, 3 ou 4 e, nesta modalidade, AA1 pode, alternativamente, ser ácido 7-amino-heptanoico ou ácido 8-amino-octanoico.

Em outra modalidade, a porção de acila ligada à insulina estabilizada em protease tem a fórmula geral $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p\text{-}$ (I), em que AA1 é como definido acima e AA2 é selecionado de L- ou D-Glu, L- ou D-Asp, L- ou D-homoGlu ou qualquer um dos seguintes:





dos quais um átomo de hidrogênio e/ou um grupo hidroxila foi(ram) removido(s) e em que as setas indicam o ponto de ligação ao grupo amino de AA1, AA2, AA3, ou ao grupo amino da insulina estabilizada em protease.

- 5 Em um aspecto, o resíduo de aminoácido cíclico neutro designado AA1 é um aminoácido que contém um anel carbocíclico saturado de 6 membros, contendo opcionalmente um heteroátomo de nitrogênio, e preferivelmente o anel é um anel de ciclo-hexano ou um anel de piperidina. Preferivelmente, o peso molecular deste aminoácido cíclico neutro é na faixa de
- 10 cerca de 100 a cerca de 200 Da.

- O resíduo de aminoácido ácido designado AA2 é um aminoácido com um peso molecular de até cerca de 200 Da compreendendo dois grupos de ácido carboxílico e um grupo de amino primário ou secundário. Alternativamente, resíduo de aminoácido ácido designado AA2 é um aminoácido com um peso molecular de até cerca de 250 Da compreendendo um
- 15 grupo ácido carboxílico e um grupo sulfonamida primário ou secundário.

- O resíduo de aminoácido contendo alquilenoglicol neutro designado AA3 é uma porção de alquilenoglicol, opcionalmente uma porção de oligo ou polialquilenoglicol que contém uma funcionalidade de ácido carboxílico em uma extremidade e uma funcionalidade de grupo amino na outra
- 20 extremidade.

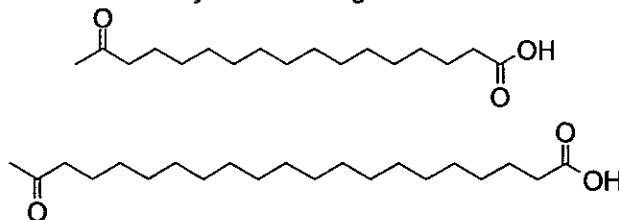
Aqui, o termo porção de alquilenoglicol abrange porções de monoalquilenoglicol como também porções de oligoalquilenoglicol. Mono e oli-

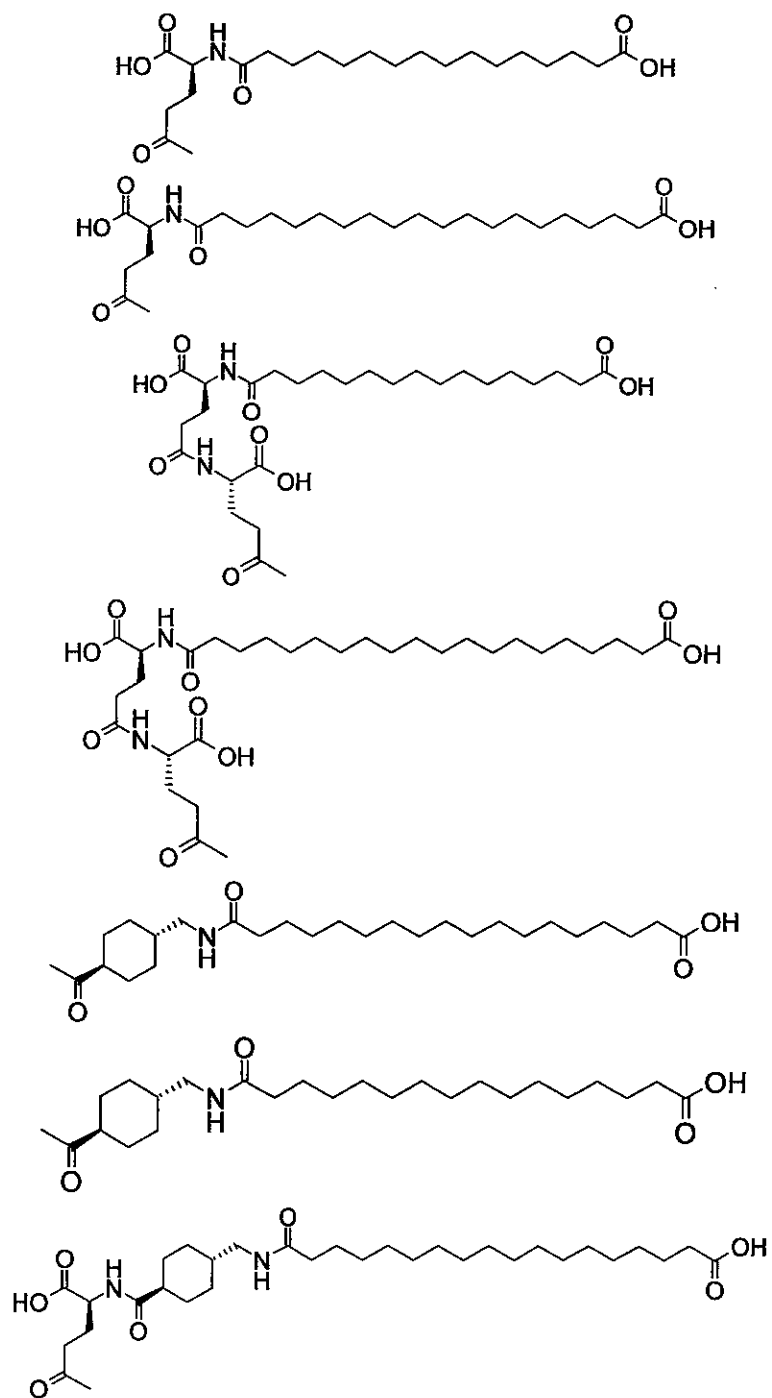
goalquilenoglicóis compreendem cadeias com base em mono e oligoetileno-
glicol, com base em mono e oligopropilenoglicol, com base em mono e oli-
gobutilenoglicol, isto é, cadeias que são com base na unidade de repetição -
CH₂CH₂O-, -CH₂CH₂CH₂O- ou -CH₂CH₂CH₂CH₂O-. A porção de alquilenog-
5 glicol é monodispersa (com comprimento / peso molecular bem definido).
Porções de monoalquilenoglicol compreendem grupos diferentes contendo -
OCH₂CH₂O-, -OCH₂CH₂CH₂O- ou OCH₂CH₂CH₂CH₂O- em cada extremida-
de.

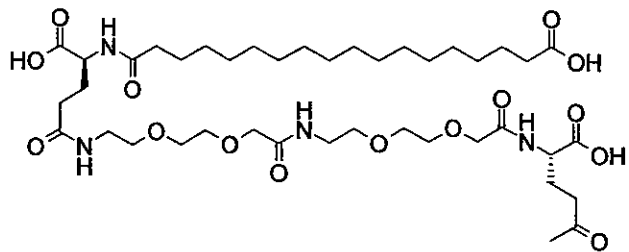
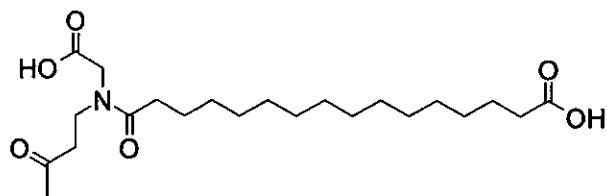
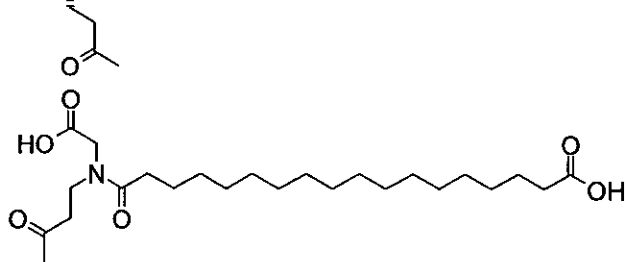
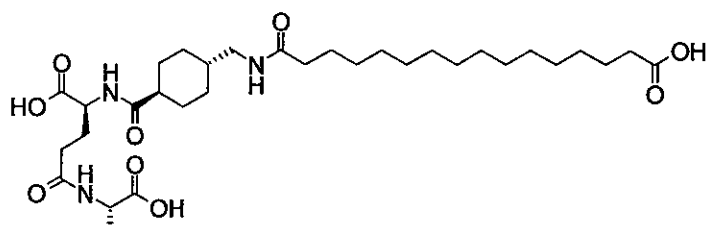
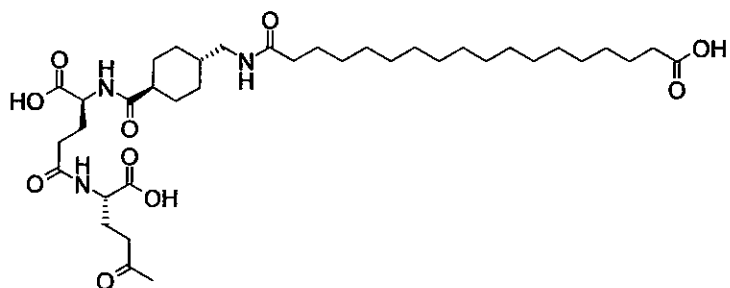
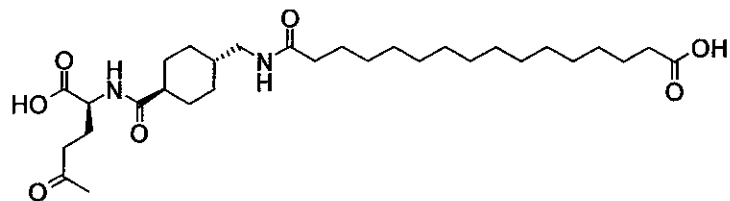
10 Como mencionado aqui, a ordem pela qual AA1, AA2 e AA3 a-
parecem na porção de acila com a fórmula (I) (Acy-AA1_n-AA2_m-AA3_p-) pode
ser trocada independentemente. Por conseguinte, a fórmula Acy-AA1_n-
AA2_m-AA3_p- também abrange porções como, por exemplo, a fórmula Acy-
AA2_m-AA1_n-AA3_p-, a fórmula Acy-AA2-AA3_n-AA2-, e a fórmula Acy-AA3_p-
AA2_m-AA1_n-, em que Acy, AA1, AA2, AA3, n, m e p são como definidos aqui.

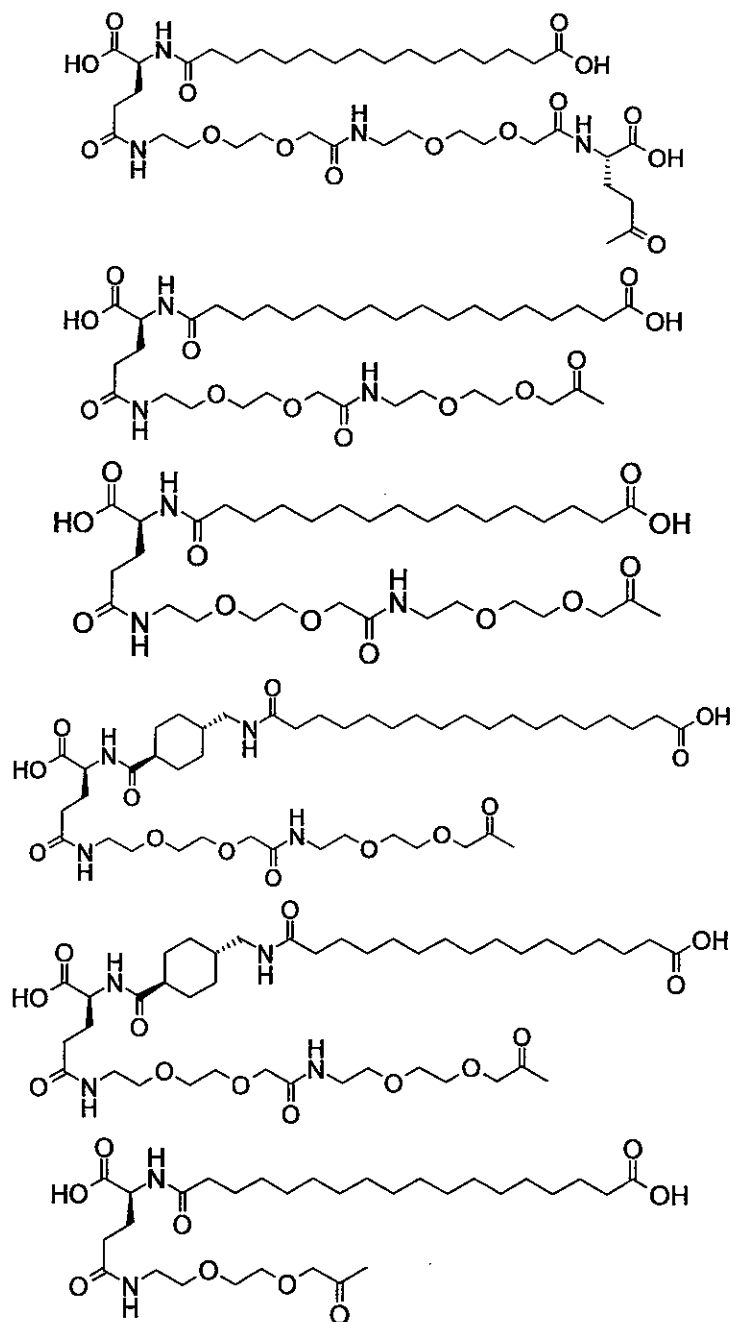
15 Como mencionado aqui, as conexões entre as porções Acy,
AA1, AA2 e/ou AA3 são obtidas formalmente através de formação da ligação
de amida (ligação de peptídeo) (-CONH-) mediante remoção de água dos
compostos parentais dos quais eles são formalmente construídos. Isto signi-
fica que para adquirir a fórmula completa para a porção de acila com a fór-
20 mula (I) (Acy-AA1_n-AA2_m-AA3_p-, em que Acy, AA1, AA2, AA3, n, m e p são
como definidos aqui), um tem, formalmente, levar os compostos dados para
os termos Acy, AA1, AA2 e AA3 e remover um hidrogênio e/ou hidroxila de-
les e, formalmente, conectar os blocos de construção assim obtidos às ex-
tremidades livres assim obtidas.

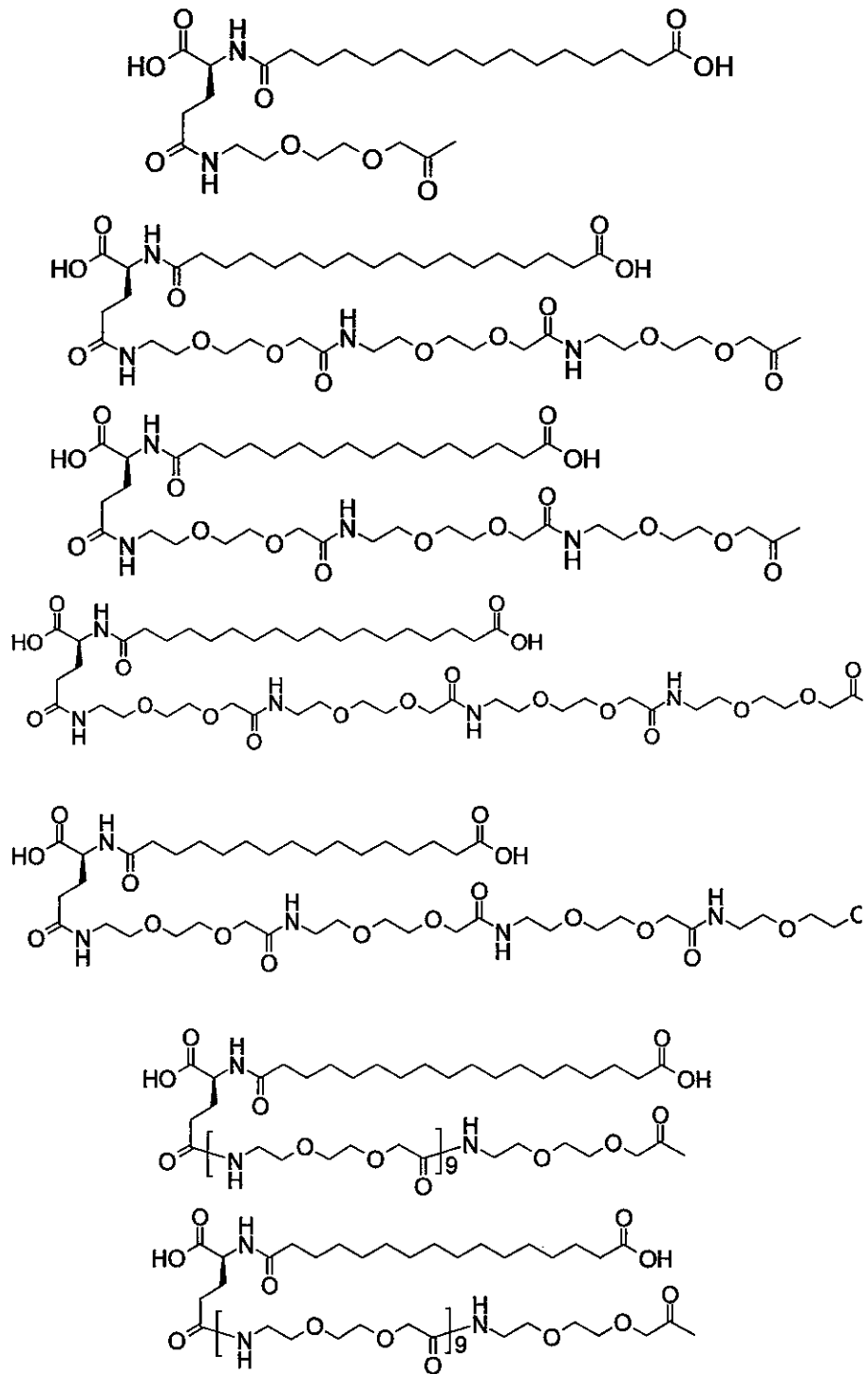
25 Exemplos não limitativos, específicos das porções de acila da
fórmula Acy-AA1_n-AA2_m-AA3_p- que podem estar presentes nos análogos de
insulina acilada desta invenção são os seguintes:

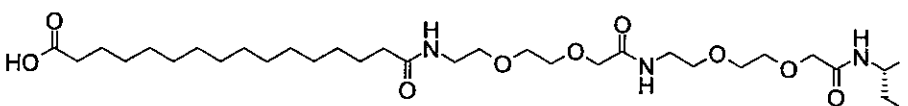
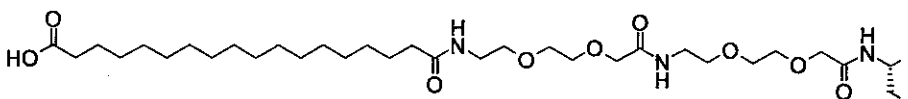
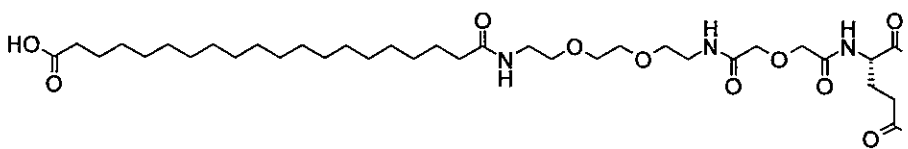
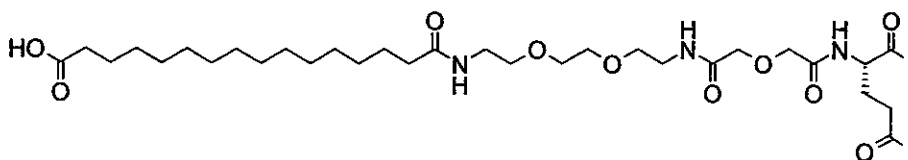
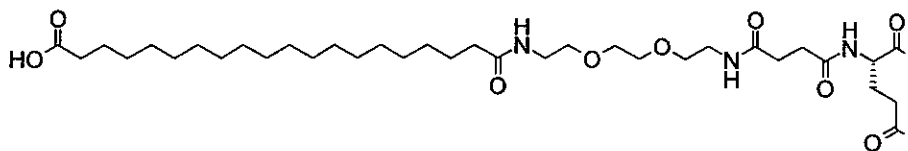
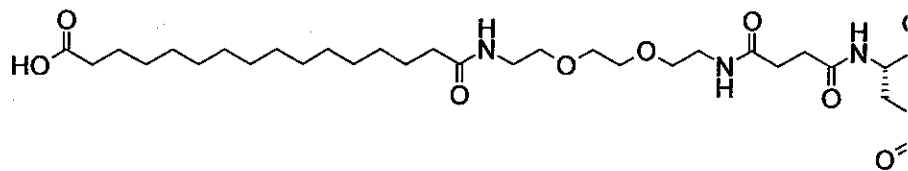


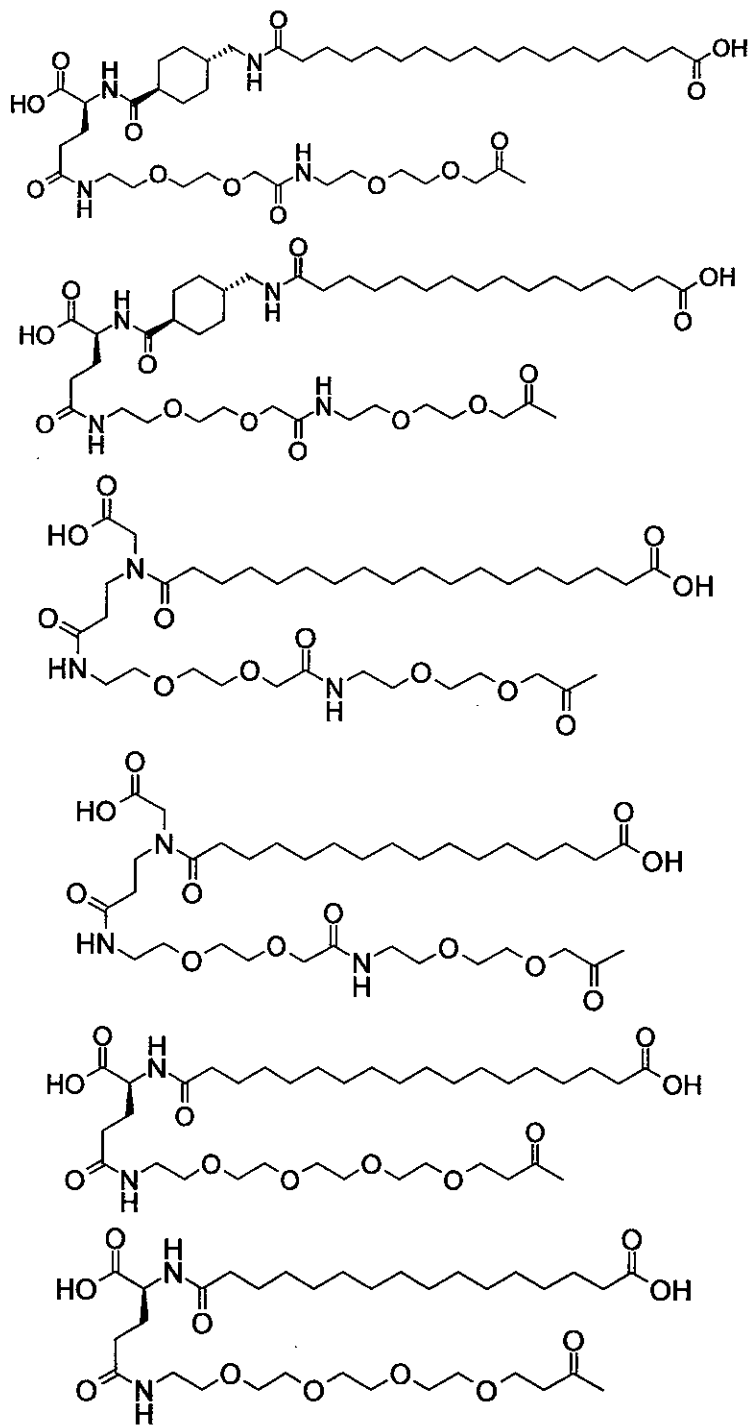


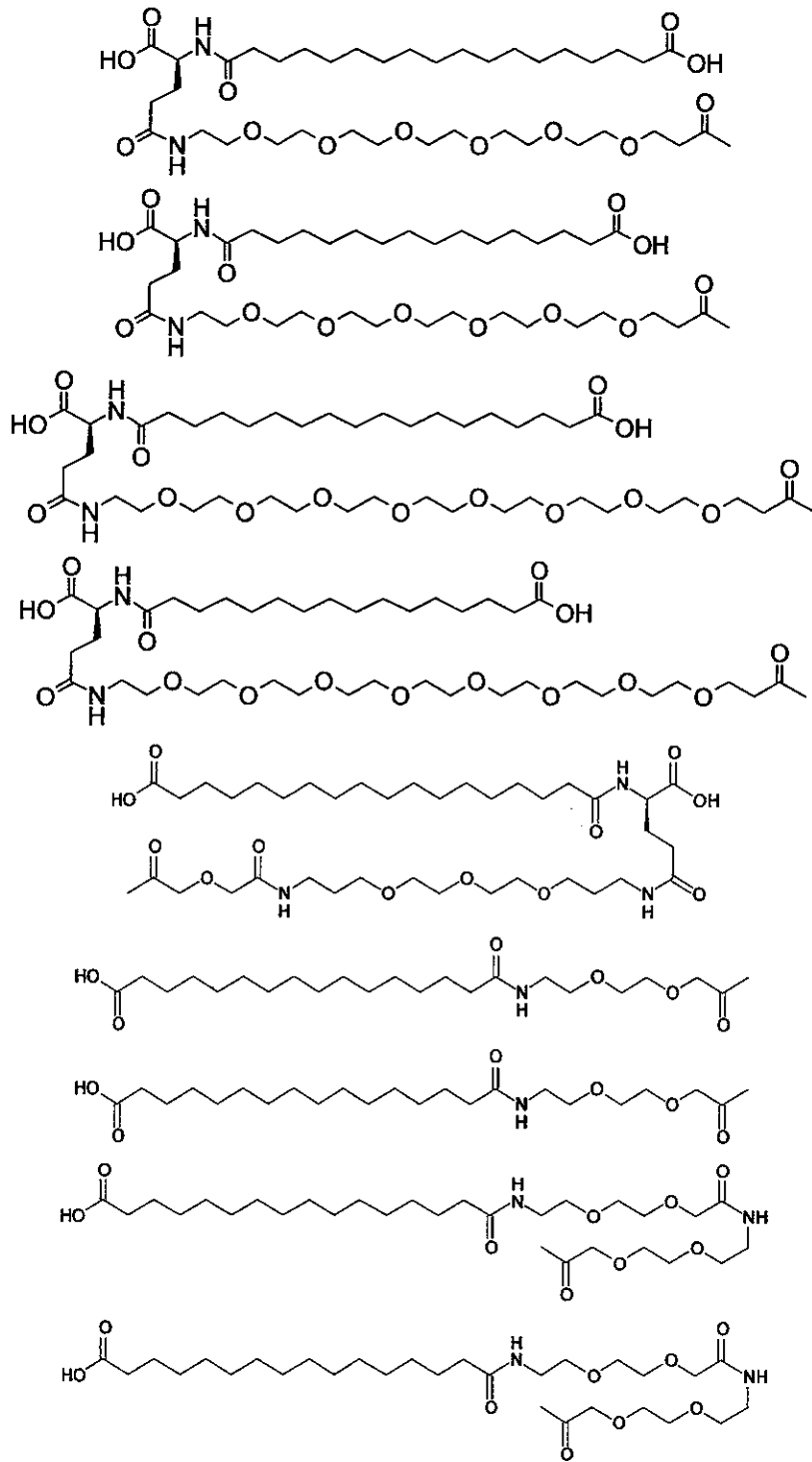


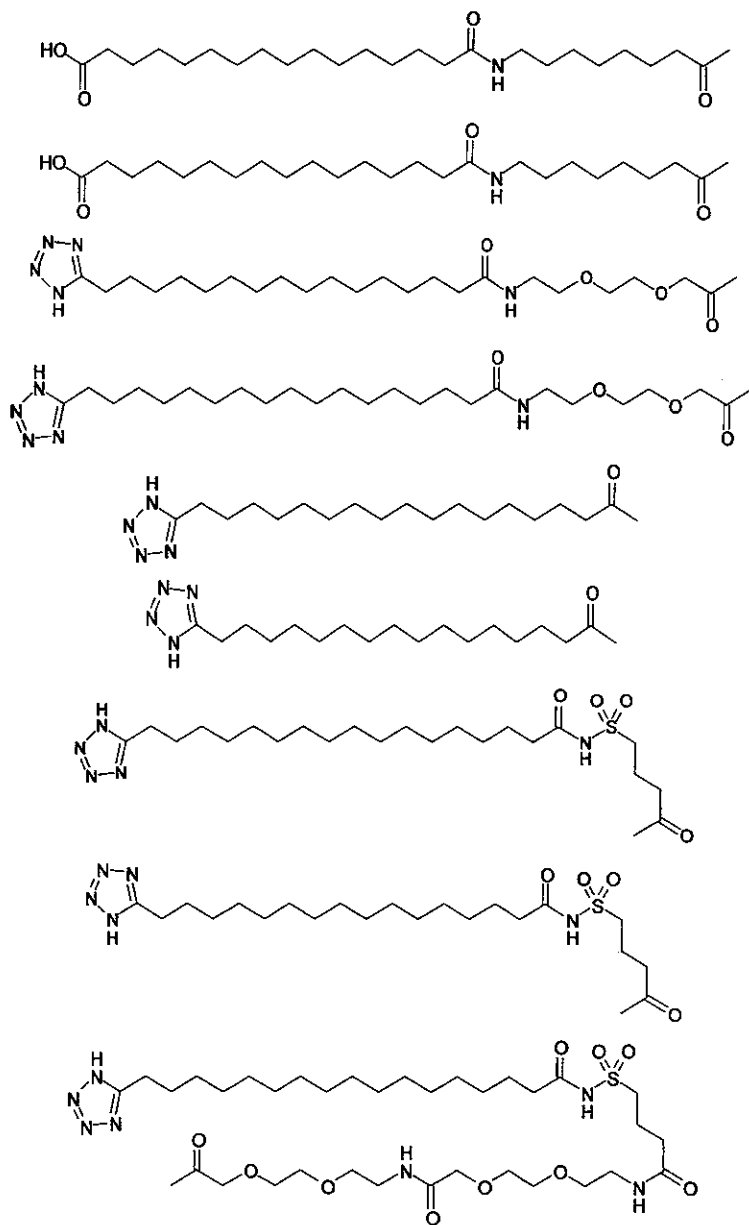


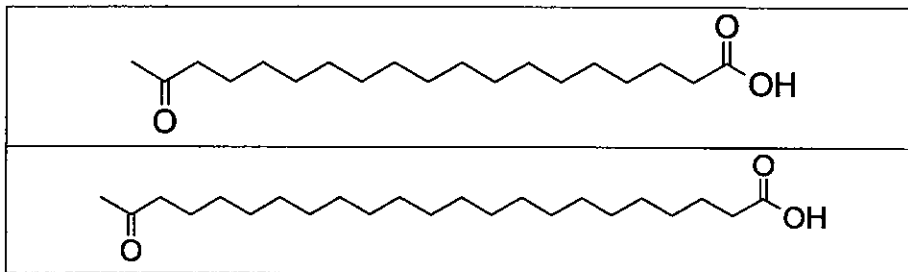
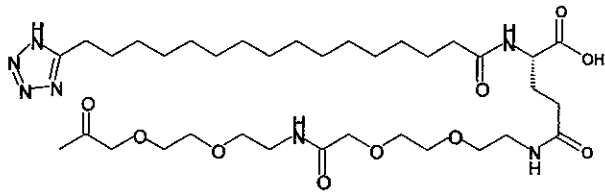
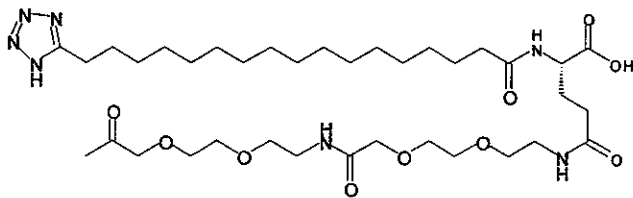
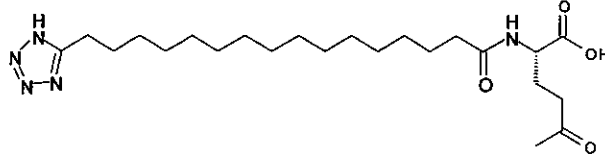
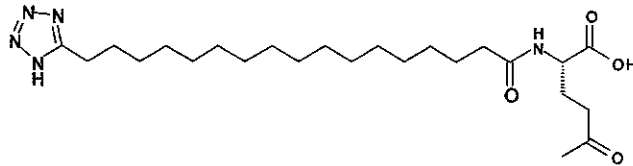
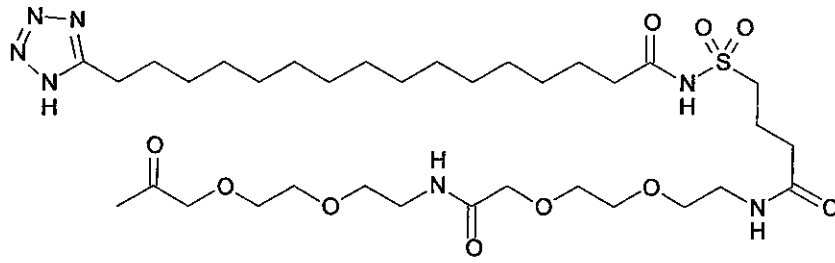


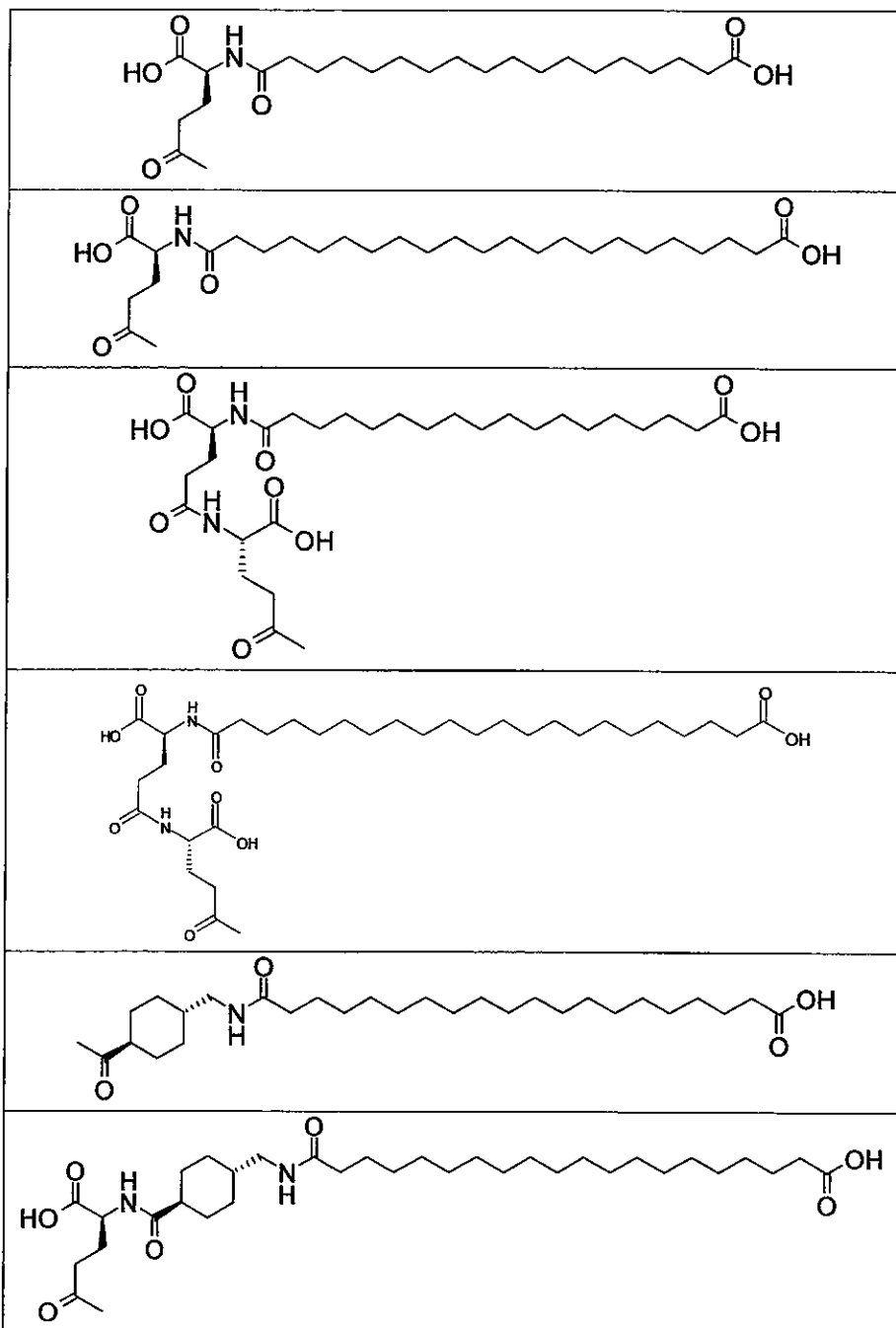


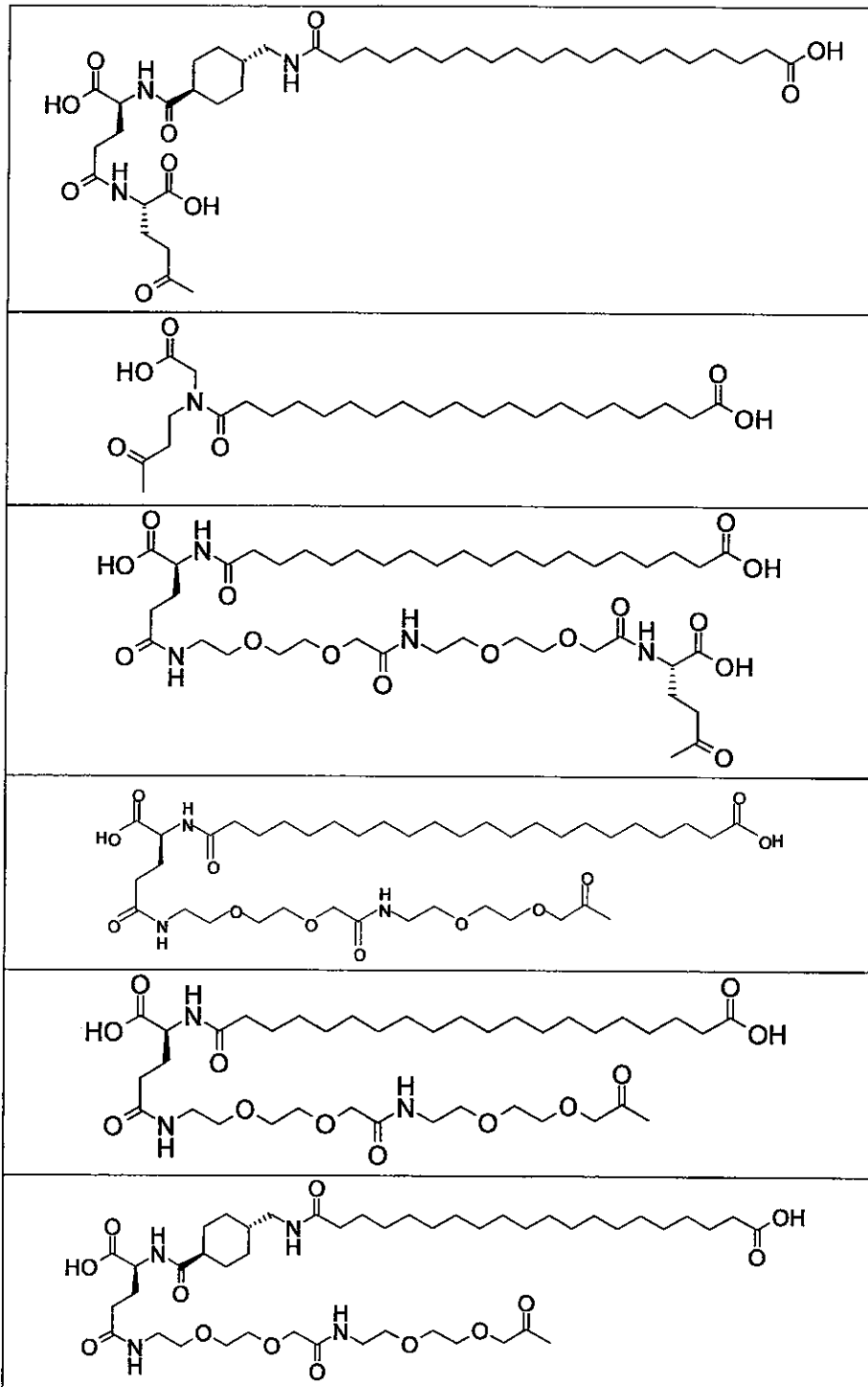


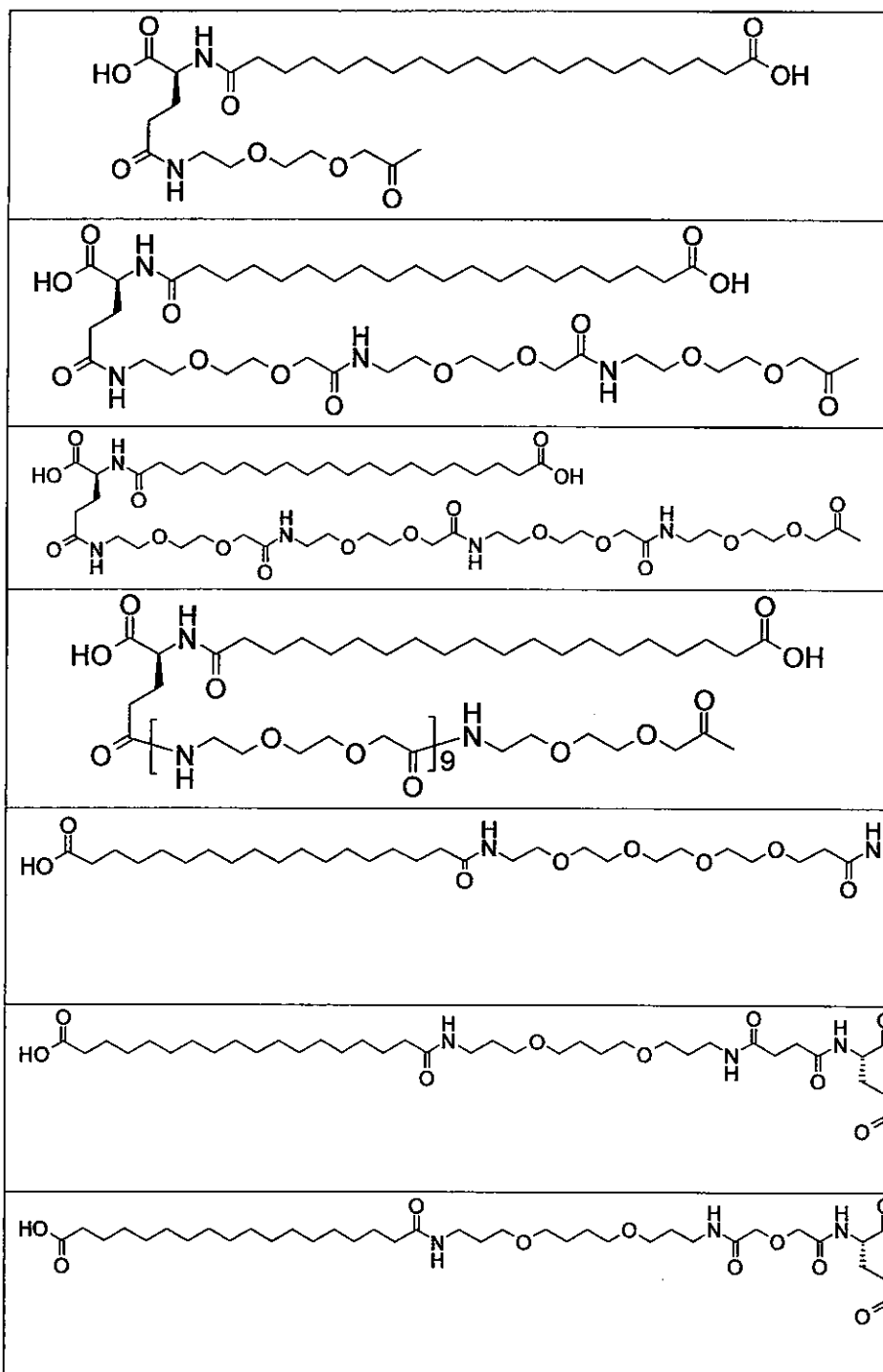


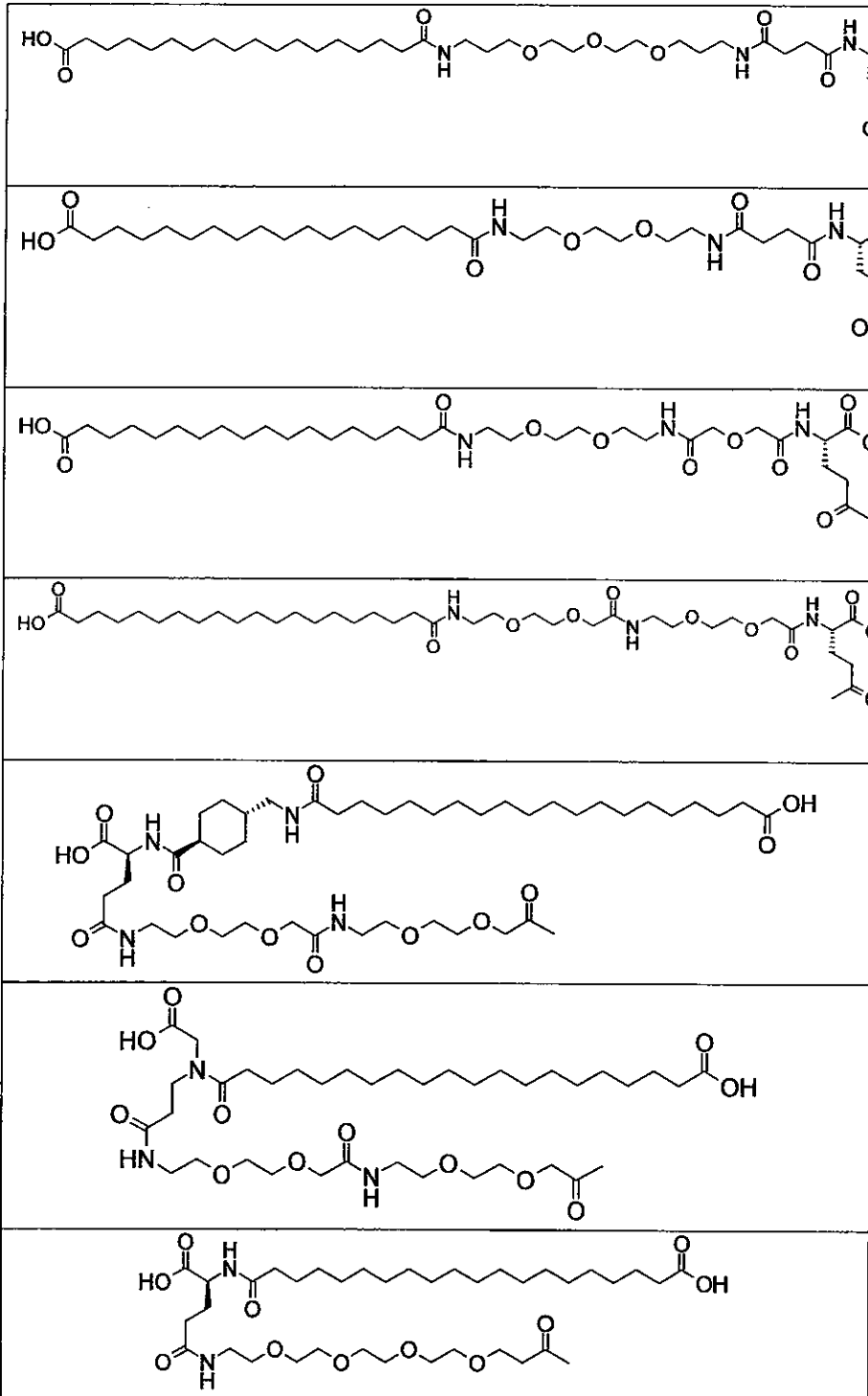


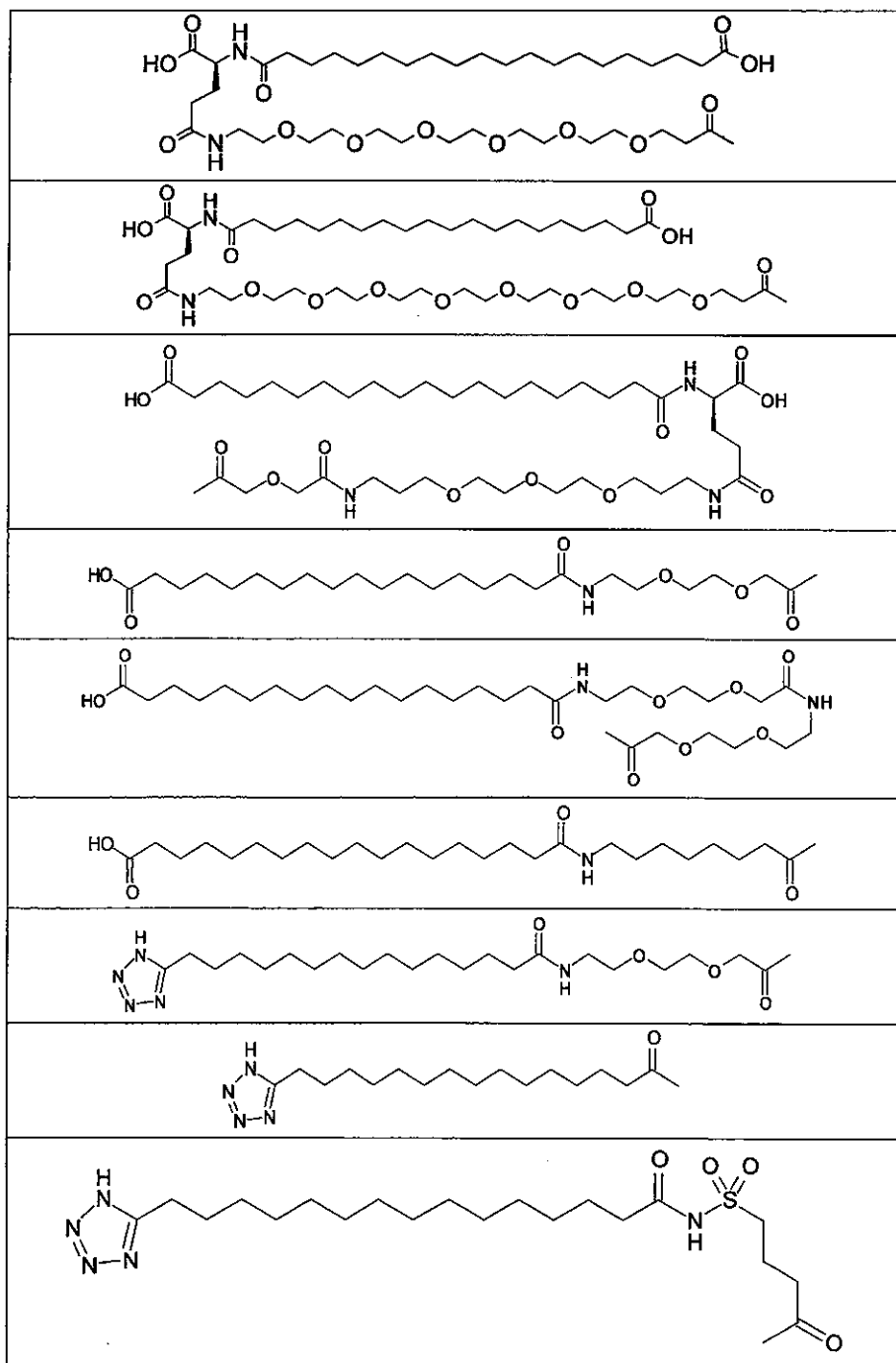


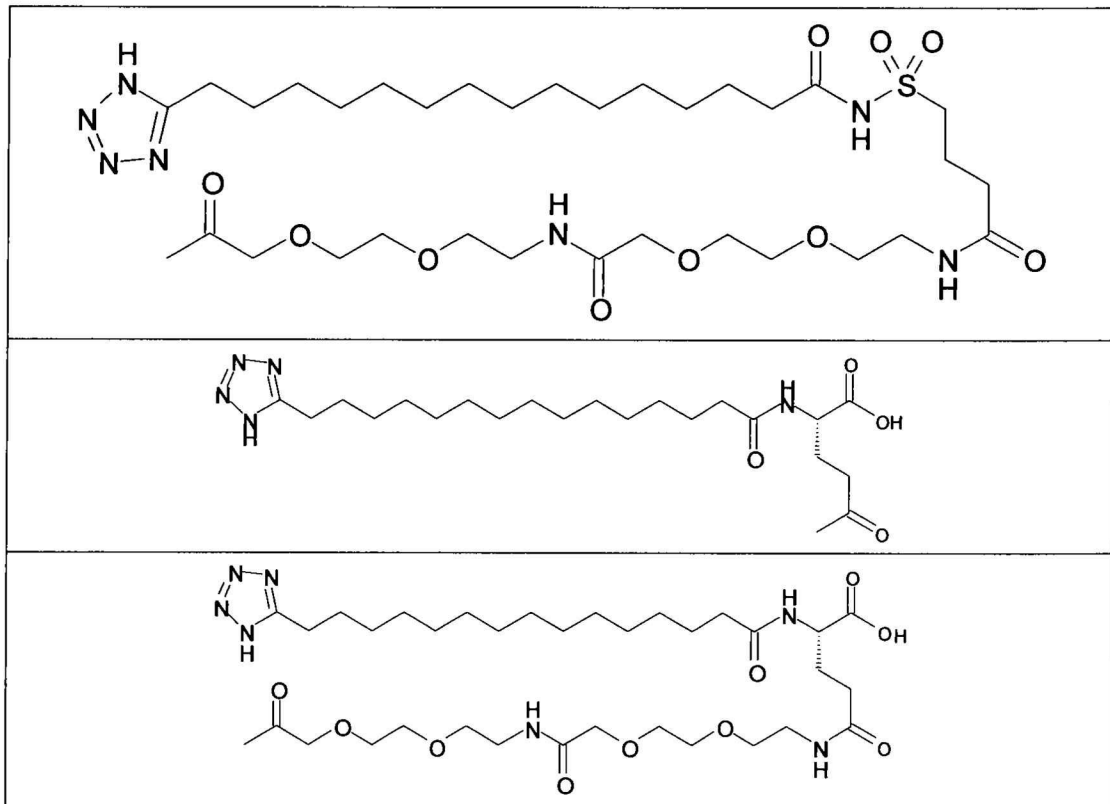












Qualquer um dos exemplos específicos não limitativos acima de porções de acila da fórmula $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$ - pode ser ligado a um grupo amino épsilo de um resíduo de lisina presente em qualquer um dos exemplos específicos não limitativos acima de análogos de insulina assim dando outros exemplos específicos de análogos de insulina acilada desta invenção.

Qualquer um dos exemplos específicos não limitativos acima de porções de acila da fórmula $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$ - pode ser ligado a um grupo alfa amino de um resíduo A1 presente em qualquer um dos exemplos específicos não limitativos acima de análogos de insulina assim dando outros exemplos específicos de análogos de insulina acilada desta invenção.

As insulinas estabilizadas em protease podem ser convertidas na insulina estabilizada em protease acilada desta invenção introduzindo o grupo desejado da fórmula $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$ - no resíduo de lisina ou em uma posição N-terminal no análogo de insulina. O grupo desejado da fórmula $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$ - pode ser introduzido por qualquer método conveniente e muitos métodos são descritos na técnica anterior por tais reações.

Mais detalhes aparecem dos exemplos aqui.

Em uma modalidade, a presente invenção não diz respeito a compostos descritos em EP 07114387.9, isto é, insulinas aciladas em que uma porção de acila é ligada à insulina parental e em que a dita porção de acila compreende unidades de repetição de alquilenos glicol que contêm aminoácidos e em que há apenas um resíduo de lisina (K & Lys) na insulina parental.

Composições farmacêuticas

As insulinas aciladas desta invenção podem ser administradas subcutânea, nasal, oral ou pulmonarmente.

Para administração subcutânea, as insulinas aciladas desta invenção são formuladas analogamente com a formulação de insulinas conhecidas. Além disso, para administração subcutânea, as insulinas aciladas desta invenção são administradas analogamente com a administração de insulinas conhecidas e, em geral, os médicos estão familiarizados com este procedimento.

Insulinas aciladas desta invenção podem ser administradas através de inalação em uma dose eficaz para aumentar os níveis de insulina circulantes e/ou diminuir os níveis de glicose circulantes. Tal administração pode ser eficaz para tratar distúrbios tais como diabetes ou hiperglicemia. Alcançar doses eficazes de insulina requer administração de uma dose inalada de mais que cerca de 0,5 µg/kg a cerca de 50 µg/kg de insulinas aciladas desta invenção. Uma quantidade terapêuticamente eficaz pode ser determinada por um médico treinado que levará em conta fatores incluindo nível de insulina, níveis de glicose do sangue, a condição física do paciente, o estado pulmonar do paciente ou similares.

As insulinas aciladas desta invenção podem ser liberadas através de inalação para alcançar absorção lenta e/ou liberação sistêmica reduzida das mesmas. Dispositivos de inalação diferentes tipicamente fornecem farmacocinética similar quando tamanhos de partícula similares e níveis similares de deposição pulmonar são comparados.

As insulinas aciladas desta invenção podem ser liberadas por

qualquer de uma variedade de dispositivos de inalação conhecidos na técnica por administração de um agente terapêutico através de inalação. Estes dispositivos incluem inaladores de dose medida, nebulizadores, geradores de pó seco, pulverizadores e similares. Preferivelmente, as insulinas aciladas são liberadas por um inalador de pó seco ou um pulverizador. Há várias características desejáveis de um dispositivo de inalação para administrar insulinas aciladas desta invenção. Por exemplo, liberação pelo dispositivo de inalação é vantajosamente seguro, reprodutível, e preciso. O dispositivo de inalação deveria liberar partículas pequenas ou aerossóis, por exemplo, menos que cerca de 10 μm , por exemplo, cerca de 1-5 μm , para respirabilidade boa. Alguns exemplos específicos de dispositivos de inalação comercialmente disponíveis adequados para a prática desta invenção são Turbohaler® (Astra), Rotahaler® (Glaxo), Diskus® (Glaxo), inalador Spiros® (Dura), dispositivos comercializados por Inhale Therapeutics, AERx® (Aradigm), o nebulizador Ultravent® (Mallinckrodt), o nebulizador de Arcon II® (Marquest Medical Products), o inalador de dose medida Ventolin® (Glaxo), o inalador de pó Spinhaler® (Fisons) ou similares.

Como aqueles versados na técnica reconhecerão, a formulação de insulinas aciladas desta invenção, a quantidade da formulação liberada e a duração de administração de uma dose simples dependem do tipo de dispositivo de inalação empregado. Para alguns sistemas de liberação de aerossol, tais como nebulizadores, a frequência de administração e o comprimento de tempo para o que o sistema é ativado dependerão principalmente da concentração de insulinas aciladas no aerossol. Por exemplo, períodos mais curtos de administração podem ser usados em concentrações mais altas de insulinas aciladas na solução de nebulizador. Dispositivos tais como inaladores de dose medida podem produzir concentrações de aerossol mais altas, e podem ser operados durante períodos mais curtos para liberarem a quantidade desejada das insulinas aciladas. Dispositivos tais como inaladores de pó liberam agente ativo até uma carga dada de agente ser expelida do dispositivo. Neste tipo de inalador, a quantidade de insulinas aciladas de insulina desta invenção em uma quantidade dada do pó determina a dose

liberada em uma administração simples.

O tamanho de partícula das insulinas aciladas desta invenção na formulação liberada pelo dispositivo de inalação é crítico com respeito à habilidade da insulina para torná-la dentro dos pulmões, e preferivelmente nas 5 vias aéreas inferiores ou alvéolos. Preferivelmente, as insulinas aciladas deste íon da invenção são formuladas de forma que pelo menos cerca de 10% das insulinas aciladas liberados sejam depositados no pulmão, preferivelmente cerca de 10 a cerca de 20%, ou mais. É conhecido que a eficiência máxima de deposição pulmonar para seres humanos respirando pela boca é 10 obtida com tamanhos de partícula de cerca de 2 μm a cerca de 3 μm . Quando tamanhos de partícula forem acima de cerca de 5 μm , deposição pulmonar diminui substancialmente. Tamanhos de partícula abaixo de cerca de 1 μm fazem a deposição pulmonar diminuir, e fica difícil de liberar partículas com massa suficiente a ser terapeuticamente efetiva. Desse modo, partículas 15 das insulinas aciladas liberadas por inalação têm um tamanho de partícula preferivelmente menos que cerca de 10 μm , mais preferivelmente na faixa de cerca de 1 μm a cerca de 5 μm . A formulação das insulinas aciladas é selecionada para render o tamanho de partícula desejado no dispositivo de inalação escolhido.

20 Vantajosamente para administração como um pó seco uma insulina acilada desta invenção é preparada em uma forma particulada com um tamanho de partícula de menos que cerca de 10 μm , preferivelmente cerca de 1 a cerca de 5 μm . O tamanho de partícula preferido é eficaz para liberação aos alvéolos do pulmão do paciente. Preferivelmente, o pó seco é grandemente 25 composto de partículas produzidas de forma que uma maior parte das partículas tenha um tamanho na faixa desejada. Vantajosamente, pelo menos cerca de 50% do pó seco é feito de partículas que têm um diâmetro menos que cerca de 10 μm . Tais formulações podem ser alcançadas por secagem por atomização, moagem, ou condensação de ponto crítico de uma 30 solução que contém a insulina acilada desta invenção e outros ingredientes desejados. Outros métodos também adequados para gerar partículas úteis na invenção atual são conhecidos na técnica.

As partículas são usualmente separadas de uma formulação de pó seco em um recipiente e depois transportadas para dentro do pulmão de um paciente por meio de uma corrente de ar de veículo. Tipicamente, em inaladores de pó seco atuais, a força para separar o sólido é fornecida somente pela inalação do paciente. Em outro tipo de inalador, fluxo de ar gerado pela inalação do paciente ativa um motor propulsor que desaglomera as partículas.

Formulações de insulinas aciladas desta invenção para administração de um inalador de pó seco tipicamente incluem um pó seco finamente dividido que contém o derivado, mas o pó pode também incluir um agente de volume, veículo, excipiente, outro aditivo ou similares. Aditivos podem ser incluídos em uma formulação de pó seco de insulina acilada, por exemplo, para diluir o pó como requerido para liberação do inalador de pó particular, para facilitar o processamento da formulação, para fornecer propriedades de pó vantajosas à formulação, para facilitar a dispersão do pó do dispositivo de inalação, para estabilizar a formulação (por exemplo, antioxidantes ou tampões), para fornecer gosto à formulação ou similares. Vantajosamente, o aditivo não adversamente afeta as vias aéreas do paciente. A insulina acilada pode ser misturada com um aditivo em um nível molecular ou a formulação sólida pode incluir partículas da insulina acilada misturadas ou revestidas em partículas do aditivo. Aditivos típicos incluem mono, di, e polissacarídeos; alcoóis do açúcar e outros polióis, tais como, por exemplo, lactose, glicose, rafinose, melezitose, lactitol, maltitol, trealose, sucrose, manitol, amido ou combinações dos mesmos; tensoativos, tais como sorbitóis, difosfatidil colina, ou lecitina; ou similares. Tipicamente um aditivo, tal como um agente de volume, está presente em uma quantidade eficaz para um propósito descrito acima, frequentemente em cerca de 50% a cerca de 90% em peso da formulação. Agentes adicionais conhecidos na técnica para formulação de uma proteína tal como proteína de análogo de insulina podem também ser incluídos na formulação.

Uma pulverização incluindo as insulinas aciladas desta invenção pode ser produzida forçando uma suspensão ou uma solução da insulina

acilada através de um bico sob pressão. O tamanho e a configuração do bico, a pressão aplicada, e a taxa de alimentação líquida podem ser selecionadas para alcançar a saída e o tamanho de partícula desejados. Uma eletropulverização pode ser produzida, por exemplo, por um campo elétrico com relação a uma alimentação capilar ou de bico. Vantajosamente, partículas do conjugado de insulina liberadas por um pulverizador têm um tamanho de partícula menos que cerca de 10 μm , preferivelmente na faixa de cerca de 1 μm a cerca de 5 μm .

Formulações de insulinas aciladas desta invenção adequadas para o uso com um pulverizador tipicamente incluirá as insulinas aciladas em uma solução aquosa a uma concentração de cerca de 1 mg a cerca de 500 mg da insulina acilada por ml de solução. Dependendo da insulina acilada selecionada e outros fatores conhecidos ao aconselhador médico, o limite superior pode ser inferior, por exemplo, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 120, 100 ou 50 mg da insulina acilada por ml de solução. A formulação pode incluir agentes tais como um excipiente, um tampão, um agente de isotonicidade, um conservante, um tensoativo, e, preferivelmente, zinco. A formulação pode também incluir um excipiente ou agente para estabilização da insulina acilada, tal como um tampão, um agente redutor, uma proteína de volume, ou um carboidrato. Proteínas de volume útil em formular conjugados de insulina incluem albumina, protamina ou similares. Carboidratos típicos úteis em formular a insulina acilada incluem sucrose, manitol, lactose, trealose, glicose ou similares. A formulação de insulinas aciladas pode também incluir um tensoativo que pode reduzir ou impedir agregação induzida por superfície do conjugado de insulina causada por atomização da solução formando um aerossol. Vários tensoativos convencionais podem ser empregados, tais como ésteres de polioxietileno de ácido graxo e alcoóis, e ésteres de polióxi-etileno sorbitol de ácido graxo. Quantidades em geral variarão entre cerca de 0,001 e cerca de 4% em peso da formulação.

Composições farmacêuticas contendo uma insulina acilada desta invenção podem também ser administradas parenteralmente em pacientes em necessidade de tal tratamento. Administração parenteral pode ser

executada através de injeção subcutânea, intramuscular ou intravenosa por meio de uma seringa, opcionalmente uma seringa semelhante à caneta. Alternativamente, administração parenteral pode ser executada por meio de uma bomba de infusão.

5 Composições injetáveis das insulinas aciladas desta invenção podem ser preparadas usando as técnicas convencionais da indústria farmacêutica que envolve dissolver e misturar os ingredientes conforme apropriado para dar o produto final desejado. Desse modo, de acordo com um procedimento, uma insulina acilada é dissolvida em uma quantidade de água
10 que é um pouco menos que o volume final da composição a ser preparada. Zinco, um agente isotônico, um conservante e/ou um tampão é/são adicionado(s) como requerido e o valor de pH da solução é ajustado - se necessário - usando um ácido, por exemplo, ácido clorídrico, ou uma base, por exemplo, hidróxido de sódio aquoso como necessário. Por fim, o volume da
15 solução é ajustado com água para dar a concentração desejada dos ingredientes.

 Em uma outra modalidade desta invenção, o tampão é selecionado do grupo que consiste em acetato de sódio, carbonato de sódio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, di-hidrogeno fosfato de sódio,
20 hidrogeno fosfato de dissódio, fosfato de sódio, e tris(hidroximetil)amino-metano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico ou misturas dos mesmos. Cada um destes tampões específicos constitui uma modalidade alternativa desta invenção.

25 Em uma outra modalidade desta invenção, a formulação também compreende um conservante farmacologicamente aceitável que pode ser selecionado do grupo que consiste em fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, p-hidroxibenzoato de metila, p-hidroxibenzoato de propila, 2-fenoxietanol, p-hidroxibenzoato de butila, 2-feniletanol, álcool benzílico, clorobutanol, e tio-
30 merosal, bronopol, ácido benzoico, imidureia, cloro-hexidina, deidroacetato de sódio, clorocresol, p-hidroxibenzoato de etila, cloreto de benzetônio, clor-fenesina (3-(4-clorofenóxi)-1,2-propanodiol) ou misturas dos mesmos. Em

uma outra modalidade desta invenção, o conservante está presente em uma concentração de cerca de 0,1 mg/ml a 20 mg/ml. Em uma outra modalidade desta invenção, o conservante está presente em uma concentração de cerca de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml. Em uma outra modalidade desta invenção, o conservante está presente em uma concentração de cerca de 5 mg/ml a 10 mg/ml. Em uma outra modalidade desta invenção, o conservante está presente em uma concentração de cerca de 10 mg/ml a 20 mg/ml. Cada um destes conservantes específicos constitui uma modalidade alternativa desta invenção. O uso de um conservante nas composições farmacêuticas é bem conhecido à pessoa versada. Para conveniência, referência é feita a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19ª edição, 1995.

Em uma outra modalidade desta invenção, a formulação também compreende um agente isotônico que pode ser selecionado do grupo que consiste em um sal (por exemplo, cloreto de sódio), um açúcar ou álcool do açúcar, um aminoácido (por exemplo, L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptofano ou treonina), um alditol (por exemplo glicerol (glicerina), 1,2-propanodiol (propilenoglicol), 1,3-propanodiol ou 1,3-butanodiol), polietilenoglicol (por exemplo, PEG400) ou misturas dos mesmos. Qualquer açúcar tal como mono-, di-, ou polissacarídeos, ou glucanos solúveis em água, incluindo, por exemplo, frutose, glicose, manose, sorbose, xilose, maltose, lactose, sucrose, trealose, dextrana, pululana, dextrina, ciclodextrina, amido solúvel, hidroxietil amido e carboximetilcelulose-Na podem ser usados. Em uma modalidade, o aditivo de açúcar é sucrose. Álcool do açúcar é definido como um C4-C8 hidrocarboneto que tem pelo menos um grupo -OH e inclui, por exemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol, e arabitól. Em uma modalidade, o aditivo de álcool do açúcar é manitol. Os açúcares ou alcoóis do açúcar mencionados acima podem ser usados individualmente ou em combinação. Não há nenhum limite fixo à quantidade usada, contanto que o açúcar ou o álcool do açúcar seja solúvel na preparação líquida e não adversamente realize os efeitos de estabilização alcançados usando os métodos desta invenção. Em uma modalidade, a concentração de açúcar ou de álcool do açúcar é entre cerca de 1 mg/ml e

cerca de 150 mg/ml. Em uma outra modalidade desta invenção, o agente isotônico está presente em uma concentração de cerca de 1 mg/ml a 50 mg/ml. Em uma outra modalidade desta invenção, o agente isotônico está presente em uma concentração de cerca de 1 mg/ml a 7 mg/ml. Em uma
5 outra modalidade desta invenção, o agente isotônico está presente em uma concentração de cerca de 8 mg/ml a 24 mg/ml. Em uma outra modalidade desta invenção, o agente isotônico está presente em uma concentração de cerca de 25 mg/ml a 50 mg/ml. Cada um destes agentes isotônicos específicos constitui uma modalidade alternativa desta invenção. O uso de um agente
10 isotônico nas composições farmacêuticas é bem conhecido à pessoa versada. Para conveniência referência é feita à *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 19ª edição, 1995.

Agentes isotônicos típicos são cloreto de sódio, manitol, dimetil sulfona e glicerol e conservantes típicos são fenol, m-cresol, p-
15 hidroxibenzoato de metila e álcool benzílico.

Exemplos de tampões adequados são acetato de sódio, glicilglicina, HEPES ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanossulfônico) e fosfato de sódio.

Uma composição para administração nasal de umas insulinas aciladas desta invenção pode, por exemplo, ser preparada como descrito na
20 Patente europeia No. 272.097.

Preparações orais contendo uma insulina estabilizada em protease acilada desta invenção podem ser preparadas de uma maneira conhecida *per se*. Um modo de fazer preparações contendo uma insulina estabiliza-
25 da em protease acilada desta invenção que pode convenientemente ser administrada oralmente é usar um procedimento que é análogo ao processo descrito em WO 2008/145728.

Outro modo de preparar preparações orais contendo uma insulina estabilizada em protease acilada desta invenção é preparar um líquido
30 livre de água ou composições farmacêuticas semissólidas compreendendo uma insulina estabilizada em protease acilada desta invenção (a), pelo menos um solvente orgânico polar (b) para a insulina estabilizada em protease

acilada, pelo menos um componente lipofílico (c), e opcionalmente um tensoativo (d) e/ou pelo menos um componente hidrófilo sólido (e). Isto poderia ser na forma de uma solução oleosa. Alternativamente, o pelo menos um componente hidrófilo sólido (d) é pelo menos um polímero hidrófilo sólido.

- 5 Alternativamente, a composição farmacêutica que compreende pelo menos um componente hidrófilo sólido é livre de tensoativo, em que o dito tensoativo tem um valor de HLB que é pelo menos 8, isto é, não há nenhum tensoativo tendo um valor de HLB que seja pelo menos 8, presente na composição.

Por exemplo, uma composição farmacêutica contendo uma insulina estabilizada em protease acilada pode ser uma solução oleosa livre de água e/ou uma composição farmacêutica de SEDDS ou SMEDDS.

Alternativamente, a dita composição farmacêutica é um sistema de liberação de fármaco autoemulsificante (aqui designado SEDDS).

É acreditado que a solubilidade alta de uma insulina estabilizada em protease acilada no solvente orgânico polar da composição farmacêutica que resulta na quantidade total relativamente baixa de solvente orgânico polar necessário na dita composição farmacêutica possa melhorar a compatibilidade da composição farmacêutica com materiais de cápsula.

A composição farmacêutica pode conter um veículo que compreende um componente lipofílico, um tensoativo e um solvente orgânico polar e opcionalmente um componente hidrófilo sólido (e). Se houver um componente hidrófilo sólido presente, pelo menos um dos componentes selecionados do grupo que consiste em um componente lipofílico e um tensoativo é líquido ou semissólido. Se houver um componente hidrófilo líquido (e) presente, o componente lipofílico e o tensoativo podem ser sólidos. Por exemplo, o tensoativo é líquido ou semissólido. Em um aspecto, um componente hidrófilo sólido está presente.

Como aqui usado, o termo "veículo" refere-se ao veículo farmacêuticamente aceitável que transporta o polipeptídeo solúvel em água terapeuticamente ativo ao longo da membrana biológica ou dentro de um fluido biológico. O veículo compreende um componente lipofílico e um solvente orgânico polar, e opcionalmente um componente hidrófilo sólido e/ou um

tensoativo. O veículo é capaz de produzir uma emulsão ou estruturas coloidais espontaneamente, quando colocado em contato, disperso, ou diluído, com um meio aquoso, por exemplo, água, fluidos contendo água, ou meios *in vivo* em mamíferos, tais como os sucos gástricos do trato gastrointestinal.

- 5 As estruturas coloidais podem ser partículas sólidas ou líquidas incluindo domínios, gotículas, micelas, micelas misturadas, vesículas e nanopartículas.

Por exemplo, quando a composição farmacêutica for colocada em contato com um meio aquoso, uma emulsão, tal como um microemulsão, espontaneamente se forma. Em particular, uma emulsão ou microemulsão forma no trato digestivo de um mamífero quando o sistema de liberação for ingerido oralmente. Além dos componentes acima mencionados, o pré-concentrado espontaneamente dispersável pode também opcionalmente conter outros excipientes, tais como tampões, ajustadores de pH, estabilizantes e outros adjuvantes reconhecidos por alguém de habilidade usual na técnica ser apropriado para um tal uso farmacêutico.

O termo "livre de água" como aqui usado refere-se a uma composição à qual nenhuma água é adicionada durante a preparação da composição farmacêutica. A insulina estabilizada em protease acilada e/ou um ou mais excipientes na composição farmacêutica podem ter quantidades pequenas de água ligadas aos mesmos antes de preparar uma composição farmacêutica. Por exemplo, uma composição farmacêutica livre de água compreende menos de 10% em p/p de água, por exemplo, menos de 5% em p/p de água, por exemplo, menos de 4% em p/p de água, por exemplo, menos de 3% em p/p de água, por exemplo, menos de 2% em p/p de água, por exemplo, menos de 1% em p/p de água.

Como aqui usado, o termo "pré-concentrado de microemulsão" significa uma composição que espontaneamente forma um microemulsão, por exemplo, uma microemulsão de óleo-em-água, em um meio aquoso, por exemplo, em água ou nos fluidos gastrointestinais após aplicação oral. A composição autoemulsifica sob diluição em um meio aquoso, por exemplo, em uma diluição de 1:5, 1:10, 1:50, 1:100 ou mais alta.

Devido à solubilidade alta da insulina estabilizada em protease acilada, a quantidade total de solvente orgânico polar no SEDDS pode ser mantida baixa, que por um lado melhora a compatibilidade da formulação com os materiais de cápsula e por outro lado dá mais espaço de projeto para a composição.

A composição farmacêutica compreende um componente lipofílico, e um componente polar orgânico. Os componentes do sistema de liberação de fármaco podem estar presentes em qualquer quantidade relativa. Por exemplo, o sistema de liberação de fármaco pode compreender até 40% em peso de componente orgânico polar da composição do veículo, por exemplo, menos que 30%, 20%, 15% ou 10%. Em outro aspecto, o sistema de liberação de fármaco compreende de 5% a 40% em peso de solvente orgânico polar da composição total do veículo. Em ainda um outro aspecto, o sistema de liberação de fármaco compreende de 10% a 30% em peso de solvente orgânico polar da composição total do veículo.

A composição farmacêutica pode ser na forma de uma composição de não pó, isto é, em uma forma semissólida ou líquida.

Como aqui usado, o termo "líquido" significa um componente ou uma composição que está em um estado líquido em temperatura ambiente ("TA"), e tendo um ponto de fusão de, por exemplo, abaixo de 20°C. Como aqui usado temperatura ambiente (TA) significa cerca de 20-25°C.

Como aqui usado, o termo "semissólido" diz respeito a um componente ou uma composição que não são líquidos em temperatura ambiente, por exemplo, tendo um ponto de fusão entre temperatura ambiente e cerca de 40°C. Um semissólido pode ter as qualidades e/ou os atributos de ambos os estados sólidos e líquidos de substância. Como usado aqui, o termo "solidificar" é intencionado tornar sólido ou semissólido.

Exemplos de composições semissólidas ou líquidas são composições farmacêuticas na forma de, por exemplo, óleos, soluções, SMEDDS líquido ou semissólido e SEDDS líquido ou semissólido.

"SMEDDS" (sendo uma abreviação para sistemas de liberação de fármaco automicroemulsificantes) é aqui definido como misturas isotrópi-

cas de um componente hidrófilo, um tensoativo, opcionalmente um cotensoativo e um fármaco que rapidamente forma um óleo sob microemulsão de água quando exposto a meios aquosos sob condições de agitação suave ou motilidade digestiva que seriam encontradas no trato GI.

5 "SEDDS" (sendo uma abreviação para sistemas de liberação de fármaco autoemulsificantes) é aqui definido como misturas de um componente hidrófilo, um tensoativo, opcionalmente um cotensoativo e um fármaco que espontaneamente formam um óleo bom sob emulsão de água quando exposto a meios aquosos sob condições de agitação suave ou motilidade
10 digestiva que seriam encontradas no trato GI.

Como aqui usado, o termo "microemulsão" refere-se a uma dispersão coloidal transparente ou translúcida, ligeiramente opaca, opalescente, não opaca ou substancialmente não opaca que é formada espontânea ou substancialmente de forma espontânea quando seus componentes são colocados em contato com um meio aquoso.
15

Como aqui usado, o termo "emulsão" refere-se a uma dispersão coloidal ligeiramente opaca, opalescente ou opaca que é formada espontânea ou substancialmente de forma espontânea quando seus componentes são colocados em contato com um meio aquoso.

20 Uma microemulsão é termodinamicamente estável e contém partículas ou domínios homogeneamente dispersos, por exemplo, de um estado sólido ou líquido (por exemplo, partículas de lipídio líquidas ou gotículas), de um diâmetro médio de menos que cerca de 500 nm, por exemplo, menos que cerca de 400 nm ou menos de 300 nm, menos de 200 nm, menos de 100 nm, e maior que cerca de 2-4 nm quando medida por técnicas de difração de luz padrão, por exemplo, usando um MALVERN ZETASIZER
25 Nano ZS. O termo "tamanho de domínio" como aqui usado refere-se às unidades de difração repetitivas e pode ser medido, por exemplo, por raios X de ângulo pequeno. Em um aspecto, o tamanho do domínio é menor que 400
30 nm, em outro aspecto, menor que 300 nm e em ainda outro aspecto, menor que 200 nm.

Como aqui usado o termo "espontaneamente dispersável" quan-

do referir-se a um pré-concentrado refere-se a uma composição que é capaz de produzir estruturas coloidais tais como microemulsões, emulsões e outros sistemas coloidais, quando diluídos com um meio aquoso quando são colocados os componentes da composição em contato com um meio aquoso, por exemplo, agitação simples à mão durante um período curto de tempo, por exemplo, durante dez segundos. Em um aspecto, um concentrado espontaneamente dispersável de acordo com a invenção é um SEDDS ou SMEDDS.

Como aqui usado, o termo "componente lipofílico" refere-se a uma substância, um material ou um ingrediente que são mais compatíveis com óleo que com água. Um material com propriedades lipofílicas é insolúvel ou quase insolúvel em água, mas é facilmente solúvel em óleo ou outros solventes não polares. O termo "componente lipofílico" pode compreender uma ou mais substâncias lipofílicas. Componentes lipofílicos múltiplos podem constituir na fase lipofílica do pré-concentrado espontaneamente dispersável e forma o aspecto de óleo, por exemplo, em uma emulsão de óleo-em-água ou microemulsão. À temperatura ambiente, o componente lipofílico e a fase lipofílica do pré-concentrado espontaneamente dispersável podem ser sólido, semissólidos ou líquidos. Por exemplo, um componente lipofílico sólido pode existir como uma pasta, forma granular, pó ou floco. Se mais de um excipiente compreender o componente lipofílico, o componente lipofílico pode ser uma mistura de líquidos, sólidos ou ambos.

Em um aspecto, o componente lipofílico está presente na composição farmacêutica em uma quantidade de pelo menos 20% em p/p. Em um outro aspecto, o componente lipofílico está presente em uma quantidade de pelo menos 30%, pelo menos 50%, pelo menos 80% ou pelo menos 90% em p/p. Por exemplo, o componente lipofílico pode estar presente de cerca de 5% a cerca de 90% em peso da composição, por exemplo, de cerca de 15% a cerca de 60%, por exemplo, de cerca de 20% a cerca de 40%. Exemplos de componentes lipofílicos sólidos, isto é, componentes lipofílicos que são sólidos ou semissólidos em temperatura ambiente, incluem, mas não são limitados a, os seguintes:

1. misturas de mono, di e triglicerídeos, tais como cocoglicerídeos hidrogenados (ponto de fusão (p.f.) de cerca de 33,5°C a cerca de 37°C], comercialmente-disponíveis como WITEPSOL HI5 da Sasol Alemanha (Witten, Alemanha); exemplos de triglicerídeos de ácido graxo por exemplo, triglicerídeos de C10-C22 ácido graxo incluem óleos naturais e hidrogenados, tais como óleos vegetais;

2. ésteres, tais como estearato de propileno glicol (PG), comercialmente disponíveis como MONOSTEOL (p.f. de cerca de 33°C a cerca de 36°C) de Gattefosse Corp. (Paramus, NJ); estearato de palmito de dietileno glicol, comercialmente disponível como HYDRINE (p.f. de cerca de 44,5°C a cerca de 48,5°C) de Gattefosse Corp;

3. glicerídeos saturados poliglicosilados, tais como ésteres de PEG-6 de óleo de semente de palma/palma hidrogenado (p.f. de cerca de 30,5°C a cerca de 38°C), comercialmente disponíveis como LABRAFIL M2130 CS de Gattefosse Corp. ou Gelucire 33/01;

4. alcoóis graxos, tais como álcool de miristila (p.f. de cerca de 39°C), comercialmente disponível como LANETTE 14 de Cognis Corp. (Cincinnati, OH); ésteres de ácidos graxos com alcoóis graxos, por exemplo, palmitato de cetila (p.f. de cerca de 50°C); monolaurato de isosorbida, por exemplo, comercialmente disponível sob o nome comercial ARLAMOL ISML de Uniqema (New Castle, Delaware), por exemplo, tendo um ponto de fusão de cerca de 43°C;

5. Éter de PEG-álcool graxo, incluindo éter de cetila de polioxietileno (2), por exemplo comercialmente disponível como BRIJ 52 de Uniqema, tendo um ponto de fusão de cerca de 33°C, ou polioxietileno (2) éter de estearila, por exemplo comercialmente disponível como BRIJ 72 de Uniqema tendo um ponto de fusão de cerca de 43°C;

6. ésteres de sorbitano, por exemplo, ésteres de sorbitano de ácido graxo, por exemplo monopalmitato de sorbitano ou monoestearato de sorbitano, por exemplo, comercialmente disponíveis como SPAN 40 ou SPAN 60 de Uniqema e tendo pontos de fusão de cerca de 43°C a 48°C ou cerca de 53°C a 57°C e 41°C a 54°C, respectivamente; e

7. ésteres de glicerila de ácido mono-C6-C14-graxo. Estes são obtidos esterificando glicerol com óleo vegetal seguido por destilação molecular. Monoglicerídeos incluem, mas não são limitados a, monoglicerídeos simétricos (isto é, β -monoglicerídeos) como também assimétricos (α - monoglicerídeos). Eles também incluem ambos glicerídeos uniformes (em que o constituinte de ácido graxo é primariamente composto de um ácido graxo simples) como também glicerídeos misturados (isto é, em que o constituinte de ácido graxo é composto de vários ácidos graxos). O constituinte de ácido graxo pode incluir ácidos graxos saturados e insaturados tendo um comprimento de cadeia de, por exemplo, C8-C14. Particularmente adequado é monolaurato de glicerila, por exemplo, comercialmente disponível como IMWITOR 312 de Sasol North America (Houston, TX), (p.f. de cerca de 56°C - 60°C); monodicocoato de glicerila, comercialmente disponível como IMWITOR 928 de Sasol (p.f. de cerca de 33°C - 37°C); citrato de monoglicerila, comercialmente disponível como IMWITOR 370, (p.f. de cerca de 59 a cerca de 63°C); ou monoestearato de glicerila, por exemplo, comercialmente disponível como IMWITOR 900 de Sasol (p.f. de cerca de 56°C -61°C); ou monoestearato autoemulsificante de glicerol, por exemplo, comercialmente disponível como IMWITOR 960 de Sasol (p.f. de cerca de 56°C -61°C).

Exemplos de componentes lipofílicos líquidos, isto é, componentes lipofílicos que são líquidos em temperatura ambiente incluem, mas não são limitados a, os seguintes:

1. misturas de mono, di e triglicerídeos, tais como mono e diglicerídeos de cadeia média, caprilato/caprato de glicerila, comercialmente disponíveis como CAPMUL MCM de Abitec Corp. (Colombo, OH);

2. éster de glicerila de ácido mono ou digraxo, por exemplo de C6-C18, por exemplo C6-C16 por exemplo C8-C10, por exemplo C8, ácidos graxos, ou derivados acetilados dos mesmos, por exemplo MYVACET 9-45 ou 9-08 de Eastman Chemicals (Kingsport, TN) ou IMWITOR 308 ou 312 de Sasol;

3. éster de propileno glicol de ácido mono ou digraxo, por exemplo de C8-C20, por exemplo C8-C12, ácidos graxos, por exemplo LAURO-

GLICOL 90, SEFSOL 218, ou CAPRYOL 90 ou CAPMUL PG-8 (mesmo como caprilato de propileno glicol) de Abitec Corp;

4. óleos, tais como óleo de cártamo, óleo de gergelim, óleo de amêndoa, óleo de amendoim, óleo de palma, óleo de germe de trigo, óleo de milho, óleo de rícino, óleo de coco, óleo de semente de algodão, óleo de soja, azeite de oliva e óleo mineral;

5. ácidos ou alcoóis graxos, por exemplo C8-C20, saturado ou mono ou di-insaturado, por exemplo ácido oleico, álcool de oleíla, ácido linoleico, ácido cáprico, ácido caprílico, ácido caproico, tetradecanol, dodecanol, decanol;

6. triglicerídeos de ácido graxo de cadeia média, por exemplo C8-C12, por exemplo MIGLYOL 812, ou triglicerídeos de ácido graxo de cadeia longa, por exemplo, óleos vegetais;

7. óleos vegetais etoxilados transesterificados, por exemplo, comercialmente disponíveis como LABRAFIL M2125 CS de Gattefosse Corp;

8. compostos estereificados de ácido graxo e álcool primário, por exemplo C8-C20, ácidos graxos e alcoóis C2-C3, por exemplo linoleato de etila, por exemplo comercialmente disponível como NIKKOL VF-E de Nikko Chemicals (Tóquio, Japão), butirato de etila, ácido oleico de caprilato de etila, oleato de etila, miristato de isopropila e caprilato de etila;

9. óleos essenciais, ou qualquer um de uma classe de óleos voláteis que dão às plantas seus odores característicos, tais como óleo de hortelã, óleo de cravo-da-índia, óleo limão e óleo de hortelã;

10. frações ou constituintes de óleos essenciais, tais como mentol, carvacrol e timol;

11. óleos sintéticos, tais como triacetina, tributirina;

12. citrato de trietila, trietil citrato de acetila, citrato de tributila, tributil citrato de acetila;

13. poliglicerol ésteres de ácido graxo, por exemplo, mono-oleato de diglicerila, por exemplo DGMO-C, DGMO-90, DGDO de Nikko Chemicals; e

14. ésteres de sorbitano, por exemplo ésteres de sorbitano de

ácido graxo, por exemplo, monolaurato de sorbitano, por exemplo comercialmente disponível como SPAN 20 de Uniqema.

15. Fosfolídeos, por exemplo, Alquil-O-fosfolídeos, Ácidos Diacil Fosfatídicos, Diacil Fosfatidil Colinas, Diacil Fosfatidil Etanolaminas, Diacil Fosfatidil Gliceróis, Ácidos Di-O-Alquil Fosfatídicos, L-alfa-lisofosfatidilcolinas (LPC), L-alfa-lisofosfatidiletanolaminas (LPE), L-alfa-lisofosfatidilglicerol (LPG), L-alfa-lisofosfatidilinositóis (LPI), ácidos L-alfa-fosfatídicos (PA), L-alfa-Fosfatidilcolinas (PC), L-alfa-Fosfatidiletanolaminas (PE), L-alfa-Fosfatidilgliceróis (PG), Cardiolipin (CL), L-alfa-Fosfatidilinositóis (PI), L-alfa-Fosfatidilserinas (PS), Liso-Fosfatidilcolinas, Liso-Fosfatidilgliceróis, sn-Glicerofosforilcolinas comercialmente disponíveis de LARODAN, ou fosfolídeo de soja (Lipoid S100) comercialmente disponível de Lipoid GmbH.

Por exemplo, o componente lipofílico é um ou mais selecionados do grupo que consiste em mono, di e triglicerídeos. Em um aspecto, o componente lipofílico é um ou mais selecionados do grupo que consiste em mono e diglicerídeos. Em ainda um outro aspecto, o componente lipofílico é Capmul MCM ou Capmul PG-8. Em um ainda outro aspecto, o componente lipofílico é Capmul PG-8.

O termo "solvente orgânico polar" refere-se em um aspecto aqui a um "solvente orgânico prótico polar" que é um hidrófilo, solvente contendo carbono miscível em água que contém uma ligação O-H ou N-H, ou misturas dos mesmos. A polaridade é refletida na constante dielétrica ou no momento de dipolo de um solvente. A polaridade de um solvente determina que tipo de compostos é capaz de dissolver e com que outros solventes ou compostos líquidos é miscível. Tipicamente, solventes orgânicos polares dissolvem melhor compostos polares e solventes não polares dissolvem melhor compostos não polares: "semelhante dissolve semelhante". Compostos fortemente polares como de sais inorgânicos (por exemplo, cloreto de sódio) dissolvem-se apenas em solventes muito polares.

Solventes orgânicos polares podem ser selecionados de solvente em que a insulina estabilizada em protease acilada mostra solubilidade

melhor nos ditos solventes orgânicos polares que em outros solventes.

Consequentemente, a insulina estabilizada em protease acilada pode ser dissolvida a um grau alto em um solvente orgânico polar livre de água farmacologicamente aceitável tal como propileno glicol, glicerol e PEG200. Por exemplo, pelo menos 20% (p/p) da insulina estabilizada em protease acilada dissolvem-se em um solvente orgânico polar livre de água farmacologicamente aceitável, isto é, ao adicionar 20% em p/p da insulina estabilizada em protease acilada ao solvente orgânico polar, uma solução clara é obtida. Em outro aspecto, pelo menos 25%, 30%, 40% ou 50% (p/p) da insulina estabilizada em protease acilada dissolvem-se em um solvente orgânico polar livre de água farmacologicamente aceitável.

O solvente orgânico polar pode desse modo referir-se a um solvente contendo carbono miscível em água, hidrófilo, que contém uma ligação O-H ou N-H, ou misturas das mesmas. A polaridade é refletida na constante dielétrica ou no momento de dipolo de um solvente. A polaridade de um solvente determina que tipo de compostos ele é capaz de dissolver e com que outros solventes ou compostos líquidos é miscível. Tipicamente, solventes polares dissolvem melhor compostos polares e solventes não polares dissolvem melhor compostos não polares: "semelhante dissolve semelhante". Compostos fortemente polares como de sais inorgânicos (por exemplo, cloreto de sódio) dissolvem-se apenas em solventes muito polares.

Por exemplo, o solvente orgânico polar é um solvente que tem uma constante dielétrica acima de 20, preferivelmente na faixa de 20-50. Exemplos de solvente orgânico polar diferente são listados na Tabela 1 junto com água como uma referência.

Tabela 1. Constantes dielétricas (permissividade estática) dos solventes orgânicos polares selecionados e água como uma referência (Handbook of Chemistry and Physics, CMC Press, constantes dielétricas são medidas em campos elétricos estáticos ou em frequências relativamente baixas onde nenhum relaxamento ocorre).

Solvente (Temperatura, Celsius (Kelvin))	Constante dielétrica ϵ^*
Água (20,1 (293,2))	80,1
Propanotriol [Glicerol] (20,1 (293,2))	46,53
Etanodiol [Etileno glicol] (20,1 (293,2))	41,4
1,3-propanodiol (20,1(293,2))	35,1
Metanol (20,1 (293,2))	33,0
1,4-butanodiol (20,1 (293,2))	31,9
1,3-butanodiol (20,1 (293,2))	28,8
1,2-propanodiol [propileno glicol] (30,1 (303,2))	27,5
Etanol (20,1 (293,2))	25,3
Isopropanol [2-propanol, álcool isopropílico] (20,1 (293,2))	20,18

No presente contexto, 1,2-propanodiol e propileno glicol são usados alternadamente. No presente contexto, propanotriol e glicerol são usados alternadamente. No presente contexto, etanodiol e etileno glicol são usados alternadamente.

Por exemplo, o solvente orgânico polar é selecionado do grupo que consiste em polióis. O termo "poliol" como aqui usado refere-se aos compostos químicos contendo grupos hidroxila múltiplos.

Em um aspecto, o solvente orgânico polar é selecionado do grupo que consiste em dióis e trióis. O termo "diol" como aqui usado refere-se aos compostos químicos contendo dois grupos hidroxila. O termo "triol" como aqui usado refere-se aos compostos químicos contendo três grupos hidroxila.

Por exemplo, o solvente orgânico polar é selecionado do grupo que consiste em glicerol (propanotriol), etanodiol (etileno glicol), 1,3-propanodiol, metanol, 1,4-butanodiol, 1,3-butanodiol, propileno glicol (1,2-propanodiol), etanol e isopropanol, ou misturas dos mesmos. Em uma alter-

nativa, o solvente orgânico polar é selecionado do grupo que consiste em propileno glicol e glicerol. Glicerol é até mesmo biocompatível em dosagens altas e tem uma capacidade de solvente alta para a insulina estabilizada em protease acilada. Alternativamente, o solvente orgânico polar é selecionado

5 do grupo que consiste em propileno glicol e etileno glicol. Este solvente orgânico polar tem uma baixa viscosidade, é biocompatível em doses moderadas, e tem capacidade de solvente orgânica polar muito alta para a insulina estabilizada em protease acilada.

O solvente orgânico polar deve preferivelmente ser de pureza alta com um conteúdo baixo de, por exemplo, aldeídos, cetonas e outras impurezas reduzindo para minimizar a deterioração química do polipeptídeo solubilizado devido à, por exemplo, reação de Maillard. Moléculas de descontaminante como glicil glicina e etileno diamina podem ser acrescentadas às formulações compreendendo solvente(s) orgânico(s) polar(es) tal(is) como

10 polióis para reduzir a deterioração do polipeptídeo enquanto que antioxidantes podem ser adicionados para reduzir a taxa de formação de outras impurezas redutoras.

Em um aspecto da invenção, o solvente orgânico polar está presente na composição farmacêutica em uma quantidade de 1-50 % em p/p, por exemplo, 5-40 % em p/p, por exemplo, 5-30 % em p/p. Alternativamente, o solvente polar orgânico está presente em uma quantidade de 10-30 % em p/p, por exemplo, 10-25 % em p/p, por exemplo, em uma quantidade de cerca de 20 % em p/p ou cerca de 15 % em p/p.

20

Por exemplo, o solvente polar orgânico polar é propileno glicol e está presente na composição farmacêutica em uma quantidade de 1-50 % em p/p, por exemplo, 5-40 % em p/p, por exemplo, 10-30 % em p/p, por exemplo, 10-25 % em p/p, por exemplo, 10-20 % em p/p, por exemplo, cerca de 20 % em p/p ou cerca de 15 % em p/p.

25

Por exemplo, o solvente orgânico polar é selecionado do grupo que consiste em glicerol, propileno glicol e misturas dos mesmos.

30

Um componente hidrófilo sólido pode ser acrescentado à composição farmacêutica a fim de tornar ou ajudar a tornar a composição farma-

cêutica sólida ou semissólida em temperatura ambiente. O componente hidrófilo pode compreender mais de um excipiente. Se mais de um excipiente compreender o componente hidrófilo, o componente hidrófilo pode ser uma mistura de líquidos, sólidos ou ambos.

5 Quando um componente hidrófilo sólido estiver presente, a composição farmacêutica pode compreender de cerca de 1% a cerca de 25% em peso de componente hidrófilo sólido, por exemplo, de cerca de 2% a cerca de 20%, por exemplo, de cerca de 3% a cerca de 15%, por exemplo de cerca de 4% a cerca de 10%.

10 Um exemplo de um componente hidrófilo é PEG que é o polímero de óxido de etileno que se conforma em geral à fórmula $H(OCH_2CH_2)_nOH$ em que n correlata com o peso molecular médio do polímero.

Os tipos de PEG úteis na preparação das composições farmacêuticas podem ser categorizados por seu estado de substância, isto é, se a substância existe em uma forma sólida ou líquida em temperatura ambiente e pressão. Como aqui usado, "PEG sólido" refere-se a PEG que tem um peso molecular de modo que a substância está em um estado sólido em temperatura ambiente e pressão. Por exemplo, PEG que tem um peso molecular que varia entre 1.000 e 10.000 é um PEG sólido. Tais PEGs incluem, mas não são limitados a PEGR 1000, PEG 1550, PEG 2000, PEG 3000, PEG 3350, PEG 4000 ou PEG 8000. Particularmente PEGs sólidos úteis são aqueles tendo um peso molecular entre 1.450 e 8.000. Especialmente útil como um PEG sólido é PEG 1450, PEG 3350, PEG 4000, PEG 8000, derivados dos mesmos e misturas dos mesmos. PEGs de vários pesos moleculares são comercialmente disponíveis como a série CARBOWAX SENTRY de Dow Chemicals (Danbury, CT). Além disso, PEGs sólidos têm uma estrutura cristalina, ou matriz polimérica, óxido de polietileno ("PEO") que tem uma estrutura idêntica a PEGR, mas para comprimento de cadeia e grupos de extremidade são também adequados. Vários graus de PEO estão comercialmente disponíveis como POLYOX de Dow Chemicals. PEO, por exemplo, tem um peso molecular que varia de cerca de 100.000 a 7.000.000. O componente hidrófilo pode compreender PEG, PEO, e qualquer combinação do

15
20
25
30

antecedente.

Os componentes hidrófilos podem opcionalmente incluir um álcool inferior, por exemplo, etanol. Embora o uso de etanol não seja essencial, ele pode melhorar a solubilidade do polipeptídeo no veículo, melhorar as características de armazenamento e/ou reduzir o risco de precipitação de fármaco.

Em um aspecto exemplar alternativo, o componente hidrófilo do veículo consiste em um componente hidrófilo simples, por exemplo, um PEG sólido, por exemplo, PEG 1450, PEG 3350, PEG 4000 e PEG 8000. Neste aspecto exemplar, a fase hidrófila do componente de microemulsão consiste em uma substância hidrófila simples. Por exemplo, se o veículo compreendesse PEG 3350, o veículo não conteria nenhuma outra substância hidrófila, por exemplo, alcoóis inferiores (alquila inferior que é C1-C4), tal como etanol; ou água.

Em ainda outro aspecto exemplar alternativo, o componente hidrófilo do veículo consiste em uma mistura de PEGs sólidos. Por exemplo, o componente hidrófilo compreende PEG 1450, PEG 3350, PEG 4000, PEG 8000, derivados dos mesmos e qualquer combinação e misturas dos mesmos.

Em um aspecto, o veículo compreende um ou mais tensoativos, isto é, opcionalmente uma mistura de tensoativos; ou agentes ativos de superfície que reduzem a tensão interfacial. O tensoativo é, por exemplo, não iônico, iônico ou anfotérico. Tensoativos podem ser misturas complexas contendo produtos laterais ou produtos de partida não reagidos envolvidos na preparação dos mesmos, por exemplo, tensoativos feitos através de polioxi-etilação pode conter outro produto lateral, por exemplo, PEG. O tensoativo ou os tensoativos têm um valor de equilíbrio hidrófilo-lipofílico (HLB) que é pelo menos 8. Por exemplo, o tensoativo pode ter um valor de HLB médio de 8-30, por exemplo, 12-30, 12-20 ou 13-15. Os tensoativos podem ser líquidos, semissólidos ou sólidos em natureza.

O termo "tensoativo" como aqui usado refere-se a qualquer substância, em particular um detergente que pode adsorver em superfícies e

interfaces, como líquido para ar, líquido para líquido, líquido para recipiente ou líquido para qualquer sólido. O tensoativo pode ser selecionado de um detergente, tal como óleo de rícino etoxilado, glicerídeos poliglicosilados, monoglicerídeos acetilados, ésteres de sorbitano de ácido graxo, polissorbato, tal como polissorbato-20, poloxâmeros, tais como poloxâmero 188 e poloxâmero 407, ésteres de polioxietileno sorbitano de ácido graxo, derivados de polioxietileno tais como derivados alquilados e alcoxilados (Tweens, por exemplo Tween-20, ou Tween-80), monoglicerídeos ou derivados de etoxilados dos mesmos, diglicerídeos ou derivados de polioxietileno dos mesmos, glicerol, ácido cólico ou derivados dos mesmos, lecitinas, alcoóis e fosfolípidos, glicerofosfolípidos (lecitinas, cefalinas, fosfatidil serina), glicero-glicolípídeos (galactopiransoide), esfingofosfolípidos (esfingomielina), e esfingoglicolípídeos (ceramidas, gangliosidas), DSS (docusato de sódio, registro de CAS no [577-11-7]), docusato de cálcio, registro de CAS no [128-49-4]), docusato de potássio, registro de CAS no [7491-09-0]), SDS (dodecil sulfato de sódio ou lauril sulfato de sódio), ácido dipalmitoil fosfatídico, caprilato de sódio, ácidos biliares e sais dos mesmos e glicina ou conjugados taurinos, ácido ursodesoxicólico, colato de sódio, desoxicolato de sódio, taurocolato de sódio, glicocolato de sódio, N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propanossulfonato, tensoativos monovalentes (alquilaril-sulfonatos) aniônicos, palmitoil lisofosfatidil-L-serina, lisofosfolípidos (por exemplo, ésteres de 1-acil-sn-glicero-3-fosfato de etanolamina, colina, serina ou treonina), alquila, alcoila (éster de alquila), derivados de alcóxi (éter de alquila) de lisofosfatidila e fosfatidilcolinas, por exemplo, derivados lauroíla e de miristoíla de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, e modificações do grupo cabeça polar que são colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol, e DODAC positivamente carregado, DOTMA, DCP, BISHOP, lisofosfatidilserina e lisofosfatidiltreonina, tensoativos zwitteriônicos (por exemplo N-alquil-N,N-dimetilamônio-1-propano-sulfonatos, 3-colamido-1-propildime-tilamônio-1-propanossulfonato, dodecilsulfocolina, lisofosfatidilcolina de miristoíla, lisolecitina de ovo de galinha), tensoativos catiônicos (bases de amônio quaternário) (por exemplo, brometo de cetil-trimetilamônio,

cloreto de cetilpiridínio), tensoativos não iônicos (por exemplo, glicosídeos de alquila como β -D-glucopiranosídeo de dodecila, β -D-maltosídeo de dodecila, β -D-glucopirano-sídeo de tetradecila, β -D-maltosídeo de decila, β -D-maltosídeo de dodecila, β -D-maltosídeo de tetradecila, β -D-maltosídeo de hexadecila, β -D-maltotriosídeo de decila, β -D-maltotriosídeo de dodecila, β -D-maltotriosídeo de tetradecila, β -D-maltotriosídeo de hexadecila, n-dodecil-sucrose, n-decil-sucrose, etoxilatos de álcool graxo (por exemplo, éteres de polioxietileno de alquila como monotridecil éter de octaetileno glicol, monododecil éter de octaetileno glicol, monotetradecil éter de octaetileno glicol), copolímeros de bloco como copolímeros de bloco de polietileno-óxido/polipropileno-óxido (Pluronic/Tetronics, Triton X-100) tensoativos alcanosatos de sorbitano etoxilados (por exemplo, Tween-40, Tween-80, Brij-35), derivados de ácido fusídico (por exemplo, tauro-di-hidrofusidato de sódio etc.), ácidos graxos de cadeia longa e sais dos mesmos C8-C20 (por exemplo, ácido oleico e ácido caprílico), acilcarnitinas e derivados, derivados N-acilados de lisina, arginina ou histidina, ou derivados acilados de cadeia lateral de lisina ou arginina, derivados N-acilados de dipeptídeos compreendendo qualquer combinação de lisina, arginina ou histidina e um aminoácido neutro ou ácido, derivados N-acilados de um tripeptídeo compreendendo qualquer combinação de um aminoácido neutro e dois aminoácidos carregados, ou o tensoativo pode ser selecionado do grupo de derivados de imidazolina, ou misturas dos mesmos.

Exemplos de tensoativos sólidos incluem, mas não são limitados a.

1. produtos de reação de um óleo de rícino natural ou hidrogenado e óxido de etileno. O óleo de rícino natural ou hidrogenado pode ser reagido com óxido de etileno em uma razão molar de cerca de 1:35 a cerca de 1:60, com remoção opcional do componente de PEG dos produtos. Vários tais tensoativos estão comercialmente disponíveis, por exemplo, a série de CREMOPHOR de BASF Corp. (Mt. Olive, NJ), tal como CREMOPHOR RH 40 que é óleo de rícino hidrogenado de PEG40 que tem um valor de saponificação de cerca de 50 a 60, um valor de ácido de menos que cerca de

um, um conteúdo de água, isto é, Fischer, menos que cerca de 2%, um n_D^{60} de cerca de 1,453-1,457, e um HLB de cerca de 14-16;

2. ésteres de polioxietileno de ácido graxo que incluem ésteres de polioxietileno de ácido esteárico, tais como a série de MYRJ de Uniqema por exemplo, MYRJ 53 que tem um p.f. de cerca de 47°C.

Compostos particulares na série de MYRJ são, por exemplo, MYRJ 53 que tem um p.f. de cerca de 47°C e PEG-40-estearato disponível como MYRJ 52;

3. derivados de sorbitano que incluem a série de TWEEN de Uniqema, por exemplo, TWEEN 60;

4. copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno e copolímeros de bloco ou poloxâmeros, por exemplo, Pluronic F127, Pluronic F68 de BASF;

5. alquil éteres de polioxietileno, por exemplo, tal como éteres de polioxietileno glicol de C12-C18 alcoóis, por exemplo, 10- ou 20-cetil éter de polioxila ou 23-lauril éter de polioxila, ou 20-oleil éter, ou 10-, 20- ou 100-estearil éter de polioxila, tão conhecidos e comercialmente disponíveis quanto à série de BRIJ de Uniqema. Produtos particularmente úteis da série de BRIJ são BRIJ 58; BRIJ 76; BRIJ 78; BRIJ 35, isto é, 23 lauril éter de polioxila; e BRIJ 98, isto é, 20 oleil éter de polioxila. Estes produtos têm um p.f. entre cerca de 32°C a cerca de 43°C;

6. ésteres de tocoferila de PEG de ácido succínico solúveis em água disponíveis de Eastman Chemical Co. com um p.f. de cerca de 36°C, por exemplo, TPGS, por exemplo, TPGS de vitamina E.

7. esterois éteres de PEG tendo, por exemplo, de 5-35 unidades $[-CH_2-CH_2-O-]$, por exemplo, 20-30 unidades, por exemplo, SOLULAN C24 (Choleth-24 e Cetheth-24) de Chemron (Paso Robles, CA); produtos similares que podem também ser usados são aqueles que são conhecidos e comercialmente disponíveis como NIKKOL BPS-30 (fitosterol 30 polietoxilado) e NIKKOL BPSH-25 (fitoestanol 25 polietoxilado) de Nikko Chemicals;

8. poliglicerol ésteres de ácido graxo, por exemplo, tendo uma faixa de unidades de glicerol de 4-10, ou 4, 6 ou 10 unidades de glicerol. Por

exemplo, particularmente adequado é monoestearato de deca-/hexa-/tetraglicerila, por exemplo, DECAGLYN, HEXAGLYN e TETRAGLYN de Nikko Chemicals;

5 9. alquilenos poliol éter ou éster, por exemplo, glicerídeos de lauroil macrogol-32 e/ou glicerídeos de estearoil macrogol-32 que são respectivamente GELUCIRE 44/14 e GELUCIRE 50/13;

10 10. monoésteres de polioxietileno de C10 a C22 saturado, tal como C18 substituído, por exemplo, ácido hidróxi graxo; por exemplo éster de PEG de ácido 12 hidróxi esteárico, por exemplo de PEG cerca de por exemplo 600-900, por exemplo 660 Dáltons MW, por exemplo, SOLUTOL HS 15 de BASF (Ludwigshafen, 20 Alemanha). De acordo com um folheto técnico de BASF, MEF 151E (1986), SOLUTOL HS 15 compreende cerca de 70% em peso de 12-hidroxiestearato polietoxilado e cerca de 30% em peso de componente de polietileno glicol não esterificado. Ele tem um valor de hidrogenação de 90 a 110, um valor de saponificação de 53 a 63, um valor ácido máximo 1, e um conteúdo de água máximo de 0,5% em peso;

20 11. éteres de polioxietileno-polioxipropileno-alquila, por exemplo éteres de polioxietileno-polioxipropileno de C12 a C18 alcoóis, por exemplo polioxietileno-20-polioxipropileno-4-cetiléter que está comercialmente disponível como NIKKOL PBC 34 de Nikko Chemicals;

12. diestearatos polietoxilados, por exemplo, comercialmente disponíveis sob os nomes comerciais ATLAS G 1821 de Uniqema e NIKKOCDS-6000P de Nikko Chemicals; e

25 13. lecitinas, por exemplo, fosfolípideo de feijão de soja, por exemplo comercialmente disponível como LIPOID S75 de Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha) ou fosfolípideo de ovo, comercialmente disponível como FOSFOLIPON 90 de Nattermann Phospholipid (Cologne, Alemanha).

Exemplos de tensoativos líquidos incluem, mas não são limitados a, derivados de sorbitano tais como TWEEN 20, TWEEN 40 e TWEEN 30 80, SYNPERONIC L44, e éter de polioxil de 10-oleíla, todos disponíveis de Uniqema, e tensoativos contendo polioxietileno, por exemplo, glicerídeos caprílicos/cápricos de PEG-8 (por exemplo, Labrasol disponível de Gattefos-

se).

A composição da invenção pode compreender de cerca de 0% a cerca de 95% em peso de tensoativo, por exemplo, de cerca de 5% a cerca de 80% em peso, por exemplo, cerca de 10% a cerca de 70% em peso, por exemplo, de cerca de 20% a cerca de 60% em peso, por exemplo, de cerca de 30% a cerca de 50%.

Em um aspecto, o tensoativo são copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno e copolímeros de bloco ou poloxâmeros, por exemplo, Pluronic F127, Pluronic F68 de BASF.

Em um aspecto, o tensoativo é um poloxâmero. Em um outro aspecto, o tensoativo é selecionado do grupo que consiste em poloxâmero 188, poloxâmero 407 e misturas de poloxâmero 407 e poloxâmero 188.

Em um aspecto, o tensoativo são tensoativos contendo polioxietileno, por exemplo, glicerídeos caprílico/cáprico de PEG-8 (por exemplo, Labrasol disponível de Gattefosse).

Em um aspecto, o tensoativo é um polioxilglicerídeo de lauroíla (por exemplo, Gelucire 44/14 disponível de Gattefosse).

Em um aspecto, o tensoativo é Cremophor RH40 de BASF.

Em certos aspectos, a composição farmacêutica pode compreender excipientes adicionais comumente encontrados nas composições farmacêuticas, exemplos de tais excipientes incluem, mas não são limitados a, antioxidantes, agentes antimicrobianos, inibidores de enzima, estabilizantes, conservantes, flavorizantes, adoçantes e outros componentes como descritos em *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Rowe et al., Eds., 4ª Edição, Pharmaceutical Press (2003), que é por este meio incorporada por referência.

Estes excipientes adicionais podem estar em uma quantidade de cerca de 0,05-5% em peso da composição farmacêutica total. Antioxidantes, agentes antimicrobianos, inibidores de enzima, estabilizantes ou conservantes tipicamente fornecem até cerca de 0,05-1% em peso da composição farmacêutica total. Agentes adoçantes ou aromatizantes tipicamente fornecem até cerca de 2,5% ou 5% em peso da composição farmacêutica total.

Exemplos de antioxidantes incluem, mas não são limitados a, ácido ascórbico e seus derivados, tocoferol e seus derivados, butil hidroxil anisol e butil hidroxil tolueno.

5 Em um aspecto, a composição compreende um tampão. O termo "tampão" como aqui usado refere-se a um composto químico em uma composição farmacêutica que reduz a tendência do pH da composição de se alterar com o passar do tempo como ocorreria do contrário devido às reações químicas. Tampões incluem químicas tais como fosfato de sódio, TRIS, glicina e citrato de sódio.

10 O termo "conservante" como aqui usado refere-se a um composto químico que é acrescentado a uma composição farmacêutica para impedir ou tardar a atividade microbiana (crescimento e metabolismo). Exemplos de conservantes farmacêuticamente aceitáveis são fenol, m-cresol e uma mistura de fenol e m-cresol.

15 O termo "estabilizante" como aqui usado refere-se às químicas acrescentadas às composições farmacêuticas contendo peptídeo para estabilizar o peptídeo, isto é, aumentar a vida de prateleira e/ou tempo de uso de tais composições. Exemplos de estabilizantes usados em formulações farmacêuticas são L-glicina, L-histidina, arginina, glicilglicina, etilenodiamina, citrato, EDTA, zinco, cloreto de sódio, polietileno glicol, carboximetilcelulose, 20 e tensoativos e antioxidantes como de alfa-tocoferol e ácido l-ascórbico.

Em um outro aspecto, um processo para preparar uma composição farmacêutica contendo insulina estabilizada em protease acilada compreende as etapas de colocar o fármaco e um veículo que compreende um 25 solvente orgânico polar, um componente lipofílico, e opcionalmente um tensoativo e/ou um componente hidrófilo em admistão íntima. Por exemplo, a insulina estabilizada em protease acilada e o veículo podem ser liquefeitos, por exemplo, aquecendo para cerca de 20°C a cerca de 80°C, e depois solidificando por esfriamento para temperatura ambiente.

30 O veículo pode ser separadamente preparado antes de colocar um veículo que compreende um solvente orgânico polar, um componente lipofílico, e opcionalmente um tensoativo e/ou um componente hidrófilo em

admistão íntima com o peptídeo de insulina derivatizado. Alternativamente, um, dois ou mais componentes do veículo podem ser misturados juntos com o polipeptídeo.

5 A insulina estabilizada em protease acilada pode ser dissolvida no solvente orgânico polar, e depois ser misturado com o componente de lipídio e opcionalmente com um tensoativo.

Alternativamente, um processo para preparar uma composição farmacêutica tal como SEDDS ou SMEDDS (que pode ser enchida em uma cápsula, por exemplo, cápsula revestida entérica, cápsula macia, cápsula 10 macia entérica) contendo uma insulina estabilizada em protease acilada compreende as etapas seguintes:

(a) dissolver o peptídeo de insulina derivatizado no solvente orgânico polar e

(b) misturar com o componente lipofílico, tensoativo e com- 15 ponente opcionalmente hidrófilo.

Por exemplo, um processo para preparar a composição farmacêutica é realizado em temperatura baixa (por exemplo, temperatura ambiente ou abaixo de temperatura ambiente).

Ao preparar a composição farmacêutica, a insulina estabilizada 20 em protease acilada pode, por exemplo, ser dissolvida no solvente orgânico polar usando o método seguinte:

a) fornecer uma solução aquosa da insulina estabilizada em protease acilada, opcionalmente compreendendo excipientes,

b) ajustar o valor de pH a um valor de pH alvo que é 1 unidade, 25 alternativamente 2 unidades e alternativamente 2,5 unidades de pH acima ou abaixo do pH da insulina estabilizada em protease acilada,

c) remover água (desidratando) da insulina estabilizada em protease acilada através de tecnologias de secagem convencionais tais como secagem por congelamento e por atomização, e

d) mistura e dissolução da insulina estabilizada em protease aci- 30 lada no dito solvente não aquoso polar, por exemplo, por agitação, tombamento ou outros métodos de mistura,

e) opcionalmente filtração ou centrifugação da solução não aquosa da insulina estabilizada em protease acilada para remover os sais inorgânicos não dissolvidos,

f) opcionalmente removendo quantidades residuais de água, por exemplo, adicionando dessecantes sólidos ou secagem de vácuo.

Por exemplo, a insulina estabilizada em protease acilada é dissolvida no solvente orgânico polar pelo método seguinte:

a) fornecer uma solução aquosa de uma insulina estabilizada em protease acilada, opcionalmente contendo estabilizantes tais como zinco e glicilglicina,

b) ajustar o valor de pH em 1 unidade, alternativamente 2 unidades e alternativamente 2,5 unidades de pH acima ou abaixo do pH do polipeptídeo, por exemplo, adicionando uma base não volátil ou um ácido, tal como ácido clorídrico ou hidróxido de sódio, à solução,

c) remover a água (desidratando) da insulina estabilizada em protease acilada através de tecnologias de secagem convencionais tais como secagem por congelamento e por atomização,

d) mistura e dissolução da insulina estabilizada em protease acilada no dito solvente não aquoso polar, por exemplo, por agitação, tombamento ou outros métodos de mistura,

e) opcionalmente filtração ou centrifugação da solução não aquosa da insulina estabilizada em protease acilada para remover sais inorgânicos não dissolvidos,

f) opcionalmente remover quantidades residuais de água, por exemplo, adicionando dessecantes sólidos ou secagem de vácuo.

Por "base volátil" é significado uma base, que até certo ponto evaporará ao aquecer e/ou em pressão reduzida, por exemplo, bases que têm uma pressão de vapor acima de 65 Pa em temperatura ambiente ou uma mistura azeotrópica aquosa incluindo uma base que tem uma pressão de vapor acima de 65 Pa em temperatura ambiente. Exemplos de bases voláteis são hidróxidos de amônio, hidróxidos de tetra-alkilamônio, aminas secundárias, aminas terciárias, aril aminas, aminas alifáticas ou bicarbonato

de amônio ou uma combinação. Por exemplo, a base volátil pode ser bicarbonato, carbonato, amônia, hidrazina ou uma base orgânica tal como aminas alifáticas inferiores, por exemplo, trimetilamina, trietilamina, dietanolaminas, trietanolamina e seus sais. Além disso, a base volátil pode ser hidróxido de amônio, etil amina ou metil amina ou uma combinação das mesmas.

Por "ácido volátil" é significado um ácido que até certo ponto evaporará ao aquecer e/ou em pressão reduzida, por exemplo, ácidos que têm uma pressão de vapor acima de 65 Pa em temperatura ambiente ou uma mistura azeotrópica aquosa incluindo um ácido que tem uma pressão de vapor acima de 65 Pa em temperatura ambiente. Exemplos de ácidos voláteis são ácido carbônico, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico.

Uma "base não volátil" como mencionado aqui significa uma base que não evapora ou apenas em parte evapora ao aquecer, por exemplo, bases com uma pressão de vapor abaixo de 65 Pa em temperatura ambiente. A base não volátil pode ser selecionada do grupo que consiste em sais de metal alcalino, hidróxidos de metal alcalino, sais de metal alcalinoterroso, hidróxidos de metal alcalinoterroso e aminoácidos ou uma combinação dos mesmos. Exemplos de bases não voláteis são hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, hidróxido de cálcio, e óxido de cálcio.

Um "ácido não volátil" como mencionado aqui significa um ácido que não evapora ou apenas evapora em parte ao aquecer, por exemplo, bases com uma pressão de vapor abaixo de 65 Pa em temperatura ambiente. Exemplos de ácidos não voláteis são ácido clorídrico, ácido fosfórico e ácido sulfúrico.

A insulina estabilizada em protease acilada pode estar presente em uma quantidade até cerca de 40% tal como até cerca de 20% em peso da composição, ou de cerca de 0,01% tal como de cerca de 0,1%, alternativamente, de cerca de 0,01% a cerca de 20%, alternativamente, de cerca de 1% a 20% ou de cerca de 1% a 10% em peso da composição. Porém, é intencionado que a escolha de um nível particular de polipeptídeo será feita de acordo com fatores bem conhecidos nas técnicas farmacêuticas, incluindo a

solubilidade do polipeptídeo no solvente orgânico polar ou componente hidrófilo opcional ou tensoativo usado, ou uma mistura dos mesmos, modo de administração e o tamanho e a condição do paciente.

Por exemplo, a formulação farmacêutica compreende uma insulina estabilizada em protease acilada em uma concentração de 0,1% em p/p a 30% em p/p.

Cada dosagem de unidade conterá adequadamente de 0,1 mg a 300 mg de polipeptídeo de insulina estabilizada em protease acilada, por exemplo, cerca de 0,1 mg, 1 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 25 mg, 50 mg, 100 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, por exemplo, entre 5 mg e 300 mg da insulina estabilizada em protease acilada. Por exemplo, cada dosagem de unidade contém entre 10 mg e 300 mg, por exemplo, 10 mg e 100 mg ou entre 20 mg e 300 mg, por exemplo, entre 20 mg e 100 mg da insulina estabilizada em protease acilada. Tais formas de dosagem de unidade são adequadas para administração 1-5 vezes diariamente dependendo do propósito particular da terapia.

A insulina estabilizada em protease acilada é pH otimizado antes da dissolução no solvente orgânico polar para melhorar a solubilidade no solvente orgânico polar.

Quando usar o termo "pH otimizado" é aqui significado que a insulina estabilizada em protease acilada foi desidratada para um pH alvo que é pelo menos 1 unidade de pH do pI da insulina estabilizada em protease acilada em solução aquosa. Desse modo, o pH alvo é mais de 1 unidade de pH acima do ponto isoelétrico da insulina estabilizada em protease acilada. Alternativamente, o pH alvo é mais de 1 unidade de pH abaixo do ponto isoelétrico da insulina estabilizada em protease acilada. Consequentemente, o pH alvo poderia ser mais de 1,5 unidade de pH acima ou abaixo do pI, por exemplo, 2,0 unidades de pH ou mais acima ou abaixo do pI, por exemplo, 2,5 unidades de pH ou mais acima ou abaixo do pI da insulina estabilizada em protease acilada.

O termo "desidratada" como aqui usado com relação a uma insulina estabilizada em protease acilada refere-se a uma insulina estabilizada

em protease acilada derivatizada que foi secada de uma solução aquosa. O termo "pH alvo" como aqui usado refere-se ao pH aquoso que estabelecerá quando a insulina estabilizada em protease acilada desidratada for reidratada em água pura para uma concentração de cerca de 40 mg/ml ou mais. O

5 pH alvo tipicamente será idêntico ao pH da solução aquosa da insulina estabilizada em protease acilada da qual a insulina estabilizada em protease acilada foi restabelecida por secagem. Porém, o pH da solução de insulina estabilizada em protease acilada não será idêntico ao pH alvo, se a solução

10 contiver ácidos ou bases voláteis. Foi descoberto que a história do pH da insulina estabilizada em protease acilada será determinante para a quantidade da insulina estabilizada em protease acilada que pode ser solubilizada no solvente orgânico polar.

O termo "o pI do polipeptídeo" como aqui usado refere-se ao ponto isoelétrico de um polipeptídeo.

15 O termo "ponto isoelétrico" como aqui usado significa o valor de pH onde a carga líquida geral de uma macromolécula tal como um peptídeo é zero. Em peptídeos pode haver vários grupos carregados, e no ponto isoelétrico a soma de todas estas cargas é zero. Em um pH acima do ponto isoelétrico, a carga líquida geral do peptídeo será negativa, enquanto que nos

20 valores de pH abaixo do ponto isoelétrico a carga líquida geral do peptídeo será positiva.

O pI de uma proteína pode ser determinado experimentalmente através de técnicas de eletroforese tais como eletrofocalização:

25 Um gradiente de pH é estabelecido em um meio anticonvectivo, tal como um gel de poliacrilamida. Quando uma proteína é introduzida ao sistema, ela migrará sob influência de um campo elétrico aplicado ao longo do gel. Proteínas carregadas positivas migrarão para o cátodo. Eventualmente, a proteína migrando alcança um ponto no gradiente de pH onde sua carga elétrica líquida é zero e é dito ser focalizada. Este é o pH isoelétrico

30 (pI) da proteína. A proteína é depois fixada no gel e tingida. O pI da proteína pode ser depois determinado por comparação da posição da proteína no gel com relação para moléculas marcadoras com valores de pI conhecidos.

A carga líquida de uma proteína em um valor de pH dado pode ser estimada teoricamente por uma pessoa versada na técnica através de métodos convencionais. Em essência, a carga líquida da proteína é o equivalente à soma das cargas fracionárias dos aminoácidos carregados na proteína: aspartato (grupo β -carboxila), glutamato (grupo δ -carboxila), cisteína (grupo tiol), tirosina (grupo fenol), histidina (cadeias laterais de imidazol), lisina (grupo ϵ -amônio) e arginina (grupo guanidínio). Adicionalmente, deve-se também levar em conta a carga dos grupos terminais de proteína (α -NH₂ e α -COOH). A carga fracionária dos grupos ionizáveis pode ser calculada dos valores de pKa intrínsecos.

A secagem, isto é, desidratação da insulina estabilizada em protease acilada pode ser executada por qualquer método de secagem convencional tal, por exemplo, através de secagem por atomização, congelamento, a vácuo, aberta e de contato. Por exemplo, a solução de insulina estabilizada em protease acilada é secada por atomização para se obter um conteúdo de água abaixo de cerca de 10%, por exemplo, abaixo de cerca de 8%, abaixo de cerca de 6%, abaixo de cerca de 5%, abaixo de cerca de 4%, abaixo de cerca de 3%, abaixo de cerca de 2% ou abaixo de cerca de 1% calculado/medido através de perda no teste de secagem (gravimétrico) como declarado na parte experimental.

Por exemplo, a insulina estabilizada em protease acilada é secada por atomização ou por congelamento.

Composições contendo insulina estabilizada em protease acilada desta invenção podem ser usadas no tratamento de estados que são sensíveis à insulina. Desse modo, elas podem ser usadas no tratamento de diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 e hiperglicemia, por exemplo, como às vezes visto nas pessoas seriamente feridas e pessoas que sofreram cirurgia principal. O ótimo nível de dose para qualquer paciente dependerá de uma variedade de fatores incluindo a eficácia do derivado de insulina específico empregado, da idade, do peso do corpo, da atividade física, e da dieta do paciente, em uma possível combinação com outros fármacos, e da severidade do estado a ser tratado. É recomendado que a dosagem diária da insulina

acilada desta invenção seja determinada para cada paciente individual por aqueles versados na técnica de um modo similar como para composições de insulina conhecidas.

CARACTERÍSTICAS PREFERIDAS DESTA INVENÇÃO

5 As características desta invenção são como segue:

1. Uma insulina estabilizada em protease acilada em que a insulina estabilizada em protease, formalmente, consiste em uma insulina estabilizada em não protease (insulina parental), em que pelo menos um aminoácido hidrofóbico foi substituído com aminoácidos hidrófilos, e em que a dita substituição é dentro ou em proximidade íntima a um ou mais sítios de clivagem de protease da insulina não estabilizada em protease (insulina parental) e em que tal insulina estabilizada em protease opcionalmente também compreende uma ou mais mutações adicionais com a condição que haja apenas um resíduo de lisina na insulina estabilizada, e em que a metade de acila seja ligada ao resíduo de lisina ou a uma posição N-terminal na insulina estabilizada em protease.

2. Uma insulina estabilizada em protease acilada, em que a insulina estabilizada em protease, formalmente, consiste em uma insulina estabilizada em não protease (insulina parental), em que pelo menos dois aminoácidos hidrofóbicos foram substituídos com aminoácidos hidrófilos, e em que as ditas substituições estão dentro ou em proximidade íntima a dois ou mais sítios de clivagem de protease da não insulina estabilizada em protease (insulina parental) e em que tal insulina estabilizada em protease opcionalmente também compreende uma ou mais mutações adicionais com a condição que haja apenas um resíduo de lisina na insulina estabilizada, e em que a metade de acila seja ligada ao resíduo de lisina na insulina estabilizada em protease.

3. Uma insulina estabilizada em protease acilada, em que a insulina estabilizada em protease, formalmente, consiste em uma insulina estabilizada em não protease (insulina parental), em que pelo menos dois aminoácidos hidrofóbicos foram substituídos com aminoácidos hidrófilos, e em que as ditas substituições estão dentro ou em proximidade íntima a dois ou mais

sítios de clivagem de protease da insulina estabilizada em não protease (insulina parental) e em que tal insulina estabilizada em protease opcionalmente também compreende uma ou mais mutações adicionais com a condição que haja apenas um resíduo de lisina na insulina estabilizada, e em que a
5 porção de acila seja ligada ao resíduo de lisina ou a uma posição N-terminal na insulina estabilizada em protease.

4. Uma insulina acilada de acordo com quaisquer cláusulas precedentes em que a insulina estabilizada em protease tem solubilidade aumentada com relação à insulina parental acilada.

10 5. Uma insulina acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes na medida do possível, em que a cadeia B da insulina compreende pelo menos uma mutação com relação à insulina parental.

6. Uma insulina acilada de acordo com a cláusula precedente na medida do possível, em que a cadeia B da insulina compreende uma, duas
15 ou três mas não mais mutações com relação à insulina parental.

7. Uma insulina acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes na medida do possível, em que a cadeia A da insulina estabilizada em protease é idêntica à cadeia A da insulina humana.

8. Uma insulina acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas
20 precedentes na medida do possível em que a cadeia A da insulina compreende pelo menos uma mutação e a cadeia B da insulina compreende pelo menos uma mutação com relação à insulina parental.

9. Uma insulina acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes na medida do possível, em que a cadeia A da insulina compreende pelo menos duas mutações e a cadeia B da insulina compreende pelo
25 menos uma mutação com relação à insulina parental.

10. Uma insulina acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes na medida do possível, em que a insulina também compreende pelo menos uma substituição de aminoácido em um sítio de protease de
30 uma primeira insulina estabilizada em protease modificada, em que a dita pelo menos uma substituição de aminoácido é de modo que pelo menos um aminoácido hidrofóbico foi substituído com pelo menos um aminoácido hidró-

filo.

11. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com quaisquer cláusulas precedentes na medida do possível em que o aminoácido na posição A12 é Glu ou Asp; e/ou o aminoácido na posição A13 é His, Asn, Glu ou Asp; e/ou o aminoácido na posição A14 é Tyr, Asn, Gln, Glu, Arg, Asp, Gly ou His; e/ou o aminoácido na posição A15 é Glu ou Asp; e o aminoácido na posição B24 é His; e/ou o aminoácido na posição B25 é His ou Asn; e/ou o aminoácido na posição B26 é His, Gly, Asp ou Thr; e/ou o aminoácido na posição B27 é His, Glu, Asp, Gly ou Arg; e/ou o aminoácido na posição B28 é His, Gly, Glu ou Asp; e que opcionalmente também compreende uma ou mais mutações adicionais.

12. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com quaisquer cláusulas precedentes na medida do possível, em que o aminoácido na posição A12 é Glu ou Asp; e/ou o aminoácido na posição A13 é His, Asn, Glu ou Asp; e/ou o aminoácido na posição A14 é Tyr, Asn, Gln, Glu, Arg, Asp, Gly ou His; e/ou o aminoácido na posição A15 é Glu ou Asp; e/ou o aminoácido na posição B16 é Tyr, His ou Glu; e/ou o aminoácido na posição B24 é His; e/ou o aminoácido na posição B25 é His ou Asn; e/ou o aminoácido na posição B26 é His, Gly, Asp ou Thr; e/ou o aminoácido na posição B27 é His, Glu, Asp, Gly, Lys, Arg ou deletado; e/ou o aminoácido na posição B28 é His, Gly, Glu, Asp, ou ausente (deletado); e/ou o aminoácido na posição B29 é Lys, Arg, ou ausente (deletado); e que opcionalmente também compreende uma ou mais mutações adicionais e, preferivelmente, insulina estabilizada em protease acilada em que o aminoácido na posição A12 é Glu ou Asp; e/ou o aminoácido na posição A13 é His, Asn, Glu ou Asp; e/ou o aminoácido na posição A14 é Tyr, Asn, Gln, Glu, Arg, Asp, Gly ou His; e/ou o aminoácido na posição A15 é Glu ou Asp; e o aminoácido na posição B24 é His; e/ou o aminoácido na posição B25 é His ou Asn; e/ou o aminoácido na posição B26 é His, Gly, Asp ou Thr; e/ou o aminoácido na posição B27 é His, Glu, Asp, Gly ou Arg; e/ou o aminoácido na posição B28 é His, Gly, Glu, ou Asp; e que opcionalmente também compreende uma ou mais mutações adicionais.

13. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com quaisquer cláusulas precedentes na medida do possível, em que o aminoácido na posição A14 é Glu, Asp ou His, o aminoácido na posição B25 é His ou Asn e que opcionalmente também compreende uma ou mais mutações
5 adicionais.

14. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com quaisquer das cláusulas precedentes na medida do possível, em que o aminoácido na posição A14 é Glu, Asp ou His, o aminoácido na posição B25 é His ou Asn e o aminoácido na posição B30 é deletado.

10 15. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com quaisquer cláusulas precedentes na medida do possível, em que o aminoácido na posição A14 é Glu, Asp ou His, o aminoácido na posição B16 é His ou Glu, o aminoácido na posição B25 é His e o aminoácido na posição B30 é deletado.

15 16. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com quaisquer cláusulas precedentes na medida do possível, em que o aminoácido na posição A14 é Glu, Asp ou His e o aminoácido na posição B25 é His e o aminoácido na posição B30 é deletado.

20 17. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com quaisquer cláusulas precedentes na medida do possível, em que o aminoácido na posição A14 é Glu ou Asp e o aminoácido na posição B28 é Glu ou Asp, e, opcionalmente, não há nenhum resíduo de aminoácido na posição B30.

25 18. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com quaisquer cláusulas precedentes na medida do possível, em que a uma ou mais mutações adicionais são selecionadas de um grupo que consiste em: A8His, A18Gln, A21Gln, A21Gly, B1Glu, B1Gln, B3Gln, B10Pro, B14Thr, B16Glu, B17Ser, B26Asp, B27Glu, B27Asp, B28Asp, B28Glu, e desB30.

30 19. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com quaisquer cláusulas precedentes na medida do possível, em que a mutação adicional é desB30.

20. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com

quaisquer cláusulas precedentes na medida do possível, em que A14 é Glu.

21. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com quaisquer cláusulas precedentes na medida do possível, em que B25 é Asn.

22. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com
5 quaisquer cláusulas precedentes na medida do possível, em que B25 é His.

23. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com quaisquer cláusulas precedentes na medida do possível, em que B25 é Asn e B27 é Glu ou Asp.

24. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com
10 quaisquer cláusulas precedentes na medida do possível, em que B25 é Asn e B27 é Glu.

25. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com quaisquer cláusulas precedentes na medida do possível, que mostra estabilidade aumentada para uma ou mais enzimas de protease com relação à
15 proteína parental.

26. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com quaisquer cláusulas precedentes na medida do possível, que mostra estabilidade aumentada para duas ou mais enzimas de protease com relação à
proteína parental.

20 27. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com quaisquer cláusulas precedentes na medida do possível, em que a insulina parental é selecionada de um grupo que consiste em a) insulina humana; b) um análogo de insulina de insulina humana em que o resíduo de aminoácido na posição B28 é Pro, Asp, Lys, Leu, Val ou Ala e o resíduo de aminoácido
25 na posição B29 é Lys ou Pro e opcionalmente o resíduo de aminoácido na posição B30 é deletado; c) Insulina humana de des(B26-B30), Insulina humana de des(B27-B30), Insulina humana de des(B28-B30), Insulina humana de des(B29-B30), Insulina humana de des(B27) ou Insulina humana de des(B30); d) um análogo de insulina de insulina humana, em que o resíduo
30 de aminoácido na posição B3 é Lys e o resíduo de aminoácido na posição B29 é Glu ou Asp; e) um análogo de insulina de insulina humana em que o resíduo de aminoácido na posição A21 é Gly e em que o análogo de insulina

é também estendido no C-terminal com dois resíduos de Arg; f) um derivado de insulina, em que o resíduo de aminoácido na posição B30 é substituído com um metil éster de treonina; e g) um derivado de insulina em que à posição Nε da lisina na posição B29 de Insulina humana de des(B30) uma cadeia de tetradecanoíla está ligada.

28. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com quaisquer cláusulas precedentes na medida do possível, em que a uma ou mais mutações adicionais são selecionadas para intensificar a estabilidade química da insulina.

29. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com a cláusula precedente na medida do possível, em que a uma ou mais mutações adicionais são selecionadas de um grupo que consiste em A18Gln, A21Gln, A21Gly e B3Gln.

30. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com quaisquer das cláusulas precedentes na medida do possível compreendendo uma sequência de aminoácido de cadeia A da fórmula 1, isto é: Xaa_{A(-2)}-Xaa_{A(-1)}-Xaa_{A0}-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Xaa_{A8}-Ser-Ile-Cys-Xaa_{A12}-Xaa_{A13}-Xaa_{A14}-Xaa_{A15}-Leu-Glu-Xaa_{A18}-Tyr-Cys-Xaa_{A21} (SEQ ID No: 1), e uma sequência de aminoácido de cadeia B da fórmula 2, isto é: Xaa_{B(-2)}-Xaa_{B(-1)}-Xaa_{B0}-Xaa_{B1}-Xaa_{B2}-Xaa_{B3}-Xaa_{B4}-His-Leu-Cys-Gly-Ser-Xaa_{B10}-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Xaa_{B16}-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Xaa_{B24}-Xaa_{B25}-Xaa_{B26}-Xaa_{B27}-Xaa_{B28}-Xaa_{B29}-Xaa_{B30}-Xaa_{B31}-Xaa_{B32} (SEQ ID No: 2), em que Xaa_{A(-2)} está ausente ou Gly; Xaa_{A(-1)} está ausente ou Pro; Xaa_{A0} está ausente ou Pro; Xaa_{A8} é independentemente selecionado de Thr e His; Xaa_{A12} é independentemente selecionado de Ser, Asp e Glu; Xaa_{A13} é independentemente selecionado de Leu, Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser e Glu; Xaa_{A14} é independentemente selecionado de Tyr, Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser e Glu; Xaa_{A15} é independentemente selecionado de Gln, Asp e Glu; Xaa_{A18} é independentemente selecionado de Asn, Lys e Gln; Xaa_{A21} é independentemente selecionado de Asn e Gln; Xaa_{B(-2)} está ausente ou Gly; Xaa_{B(-1)} está ausente ou Pro; Xaa_{B0} está ausente ou Pro; Xaa_{B1} está ausente ou independentemente selecionado de Phe e Glu; Xaa_{B2} está ausente ou

Val; Xaa_{B3} está ausente ou independentemente selecionado de Asn e Gln; Xaa_{B4} é independentemente selecionado de Gln e Glu; Xaa_{B10} é independentemente selecionado de His, Asp, Pro e Glu; Xaa_{B16} é independentemente selecionado de Tyr, Asp, Gln, His, Arg, e Glu; Xaa_{B24} é independentemente selecionado de Phe e His; Xaa_{B25} é independentemente selecionado de Phe, Asn e His; Xaa_{B26} está ausente ou independentemente selecionado de Tyr, His, Thr, Gly e Asp; Xaa_{B27} está ausente ou independentemente selecionado de Thr, Asn, Asp, Gln, His, Gly, Arg, Pro, Ser e Glu; Xaa_{B28} está ausente ou independentemente selecionado de Pro, His, Gly e Asp; Xaa_{B29} está ausente ou independentemente selecionado de Lys e Gln; Xaa_{B30} está ausente ou Thr; Xaa_{B31} está ausente ou Leu; Xaa_{B32} está ausente ou Glu; o C-terminal pode ser opcionalmente derivatizado como uma amida; em que a sequência de aminoácido da cadeia A e a sequência de aminoácido da cadeia B são conectadas por ligações em ponte de dissulfeto entre as cisteínas na posição 7 da cadeia A e a cisteína na posição 7 da cadeia B, e entre a cisteína na posição 20 da cadeia A e a cisteína na posição 19 da cadeia B e em que as cisteínas na posição 6 e 11 da cadeia A são conectadas por uma ligação em ponte de dissulfeto; em que opcionalmente a sequência de aminoácido da cadeia A N-terminal é conectada à sequência de aminoácido da cadeia B C-terminal por uma sequência de aminoácido compreendendo 3-7 aminoácidos para formar uma molécula de insulina de cadeia simples, em que opcionalmente o N-terminal da cadeia B é estendido com 1-10 aminoácidos; em que se Xaa_{A8} for Thr e Xaa_{A12} for Ser e Xaa_{A13} for Leu e Xaa_{A14} for Tyr então Xaa_{A15} é Glu ou Asp; e em que se Xaa_{B24} for Phe e Xaa_{B25} for Phe e Xaa_{B26} for Tyr e Xaa_{B27} for Thr e Xaa_{B28} for Pro então Xaa_{B29} é Gln.

31. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com quaisquer cláusulas precedentes na medida do possível compreendendo uma sequência de aminoácido de cadeia A da fórmula 3, isto é: Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Xaa_{A8}-Ser-Ile-Cys-Xaa_{A12}-Xaa_{A13}-Xaa_{A14}-Xaa_{A15}-Leu-Glu-Xaa_{A18}-Tyr-Cys-Xaa_{A21} (SEQ ID No: 3), e uma sequência de aminoácido de cadeia B da fórmula 4, isto é: Xaa_{B1}-Val-Xaa_{B3}-Xaa_{B4}-seu-Leu-Cys-Gly-Ser-Xaa_{B10}-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Xaa_{B16}-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Xaa_{B24}-

seu-Xaa_{B26}-Xaa_{B27}-Xaa_{B28}-Xaa_{B29}-Xaa_{B30} (SEQ ID No: 4), em que Xaa_{A8} é independentemente selecionado de Thr e His; Xaa_{A12} é independentemente selecionado de Ser, Asp e Glu; Xaa_{A13} é independentemente selecionado de Leu, Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser e Glu; Xaa_{A14} é independentemente selecionado de Tyr, Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser e Glu; Xaa_{A15} é independentemente selecionado de Gln, Asp e Glu; Xaa_{A18} é independentemente selecionado de Asn, Lys e Gln; Xaa_{A21} é independentemente selecionado de Asn, e Gln; Xaa_{B1} é independentemente selecionado de Phe e Glu; Xaa_{B3} é independentemente selecionado de Asn e Gln; Xaa_{B4} é independentemente selecionado de Gln e Glu; Xaa_{B10} é independentemente selecionado de His, Asp, Pro e Glu; Xaa_{B16} é independentemente selecionado de Tyr, Asp, Gln, His, Arg, e Glu; Xaa_{B24} é independentemente selecionado de Phe e His; Xaa_{B25} é independentemente selecionado de Phe, Asn e His; Xaa_{B26} está ausente ou independentemente selecionado de Tyr, His, Thr, Gly e Asp; Xaa_{B27} está ausente ou independentemente selecionado de Thr, Asn, Asp, Gln, His, Gly, Arg, Pro, Ser e Glu; Xaa_{B28} está ausente ou independentemente selecionado de Pro, His, Gly e Asp; Xaa_{B29} está ausente ou independentemente selecionado de Lys e Gln; Xaa_{B30} está ausente ou Thr; o terminal C pode ser opcionalmente derivatizado como uma amida; em que a sequência de aminoácido de cadeia A e a sequência de aminoácido de cadeia B estão conectadas através de ligações em ponte de dissulfeto entre as cisteínas na posição 7 da cadeia A e a cisteína na posição 7 da cadeia B, e entre a cisteína na posição 20 da cadeia A e a cisteína na posição 19 da cadeia B e em que as cisteínas na posição 6 e 11 da cadeia A estão conectadas por uma ligação em ponte de dissulfeto.

32. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com a cláusula precedente na medida do possível, em que Xaa_{A8} é independentemente selecionado de Thr e His; Xaa_{A12} é independentemente selecionado de Ser e Glu; Xaa_{A13} é independentemente selecionado de Leu, Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser e Glu; Xaa_{A14} é independentemente selecionado de Tyr, Asp, His, e Glu; Xaa_{A15} é independentemente selecionado de Gln e Glu; Xaa_{A18} é independentemente selecionado de Asn, Lys e

Gln; Xaa_{A21} é independentemente selecionado de Asn, e Gln; Xaa_{B1} é independentemente selecionado de Phe e Glu; Xaa_{B3} é independentemente selecionado de Asn e Gln; Xaa_{B4} é independentemente selecionado de Gln e Glu; Xaa_{B10} é independentemente selecionado de His, Asp, Pro e Glu; Xaa_{B16} é independentemente selecionado de Tyr, Asp, Gln, His, Arg, e Glu; Xaa_{B24} é independentemente selecionado de Phe e His; Xaa_{B25} é independentemente selecionado de Phe, Asn e His; Xaa_{B26} é independentemente selecionado de Tyr, Thr, Gly e Asp; Xaa_{B27} é independentemente selecionado de Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, e Glu; Xaa_{B28} é independentemente selecionado do Pro, Gly e Asp; Xaa_{B29} é independentemente selecionado de Lys e Gln; Xaa_{B30} está ausente ou Thr; o terminal C pode ser opcionalmente derivatizado como uma amida; em que a sequência de aminoácido de cadeia A e a sequência de aminoácido de cadeia B estão conectadas através de ligações em ponte de dissulfeto entre as cisteínas na posição 7 da cadeia A e a cisteína na posição 7 da cadeia B, e entre a cisteína na posição 20 da cadeia A e a cisteína na posição 19 da cadeia B e em que as cisteínas na posição 6 e 11 da cadeia A estão conectadas por uma ligação em ponte de dissulfeto.

33. Uma insulina estabilizada em protease acilada, em que, na insulina estabilizada em protease, o aminoácido na posição A14 é Glu ou His (isto é, E ou H, de acordo com o código de uma letra), o aminoácido na posição B25 é His e que opcionalmente também compreende uma ou mais mutações adicionais, e em que a porção de acila é ligada ao grupo ε amino no resíduo de lisina na posição B29.

34. Uma insulina estabilizada em protease acilada em que, na insulina estabilizada em protease, o aminoácido na posição B25 é His ou Asn, o aminoácido na posição B27 é Glu ou Asp, e que opcionalmente também compreende uma ou mais mutações adicionais seguintes: A8H, A14E/D, B1E/D, B28E/D, e desB30 e em que a porção de acila é ligada ao grupo ε amino no resíduo de lisina na posição B29.

35. Uma insulina estabilizada em protease acilada em que, na insulina estabilizada em protease, o aminoácido na posição A14 é Tyr, Glu ou His

(isto é, Y, E ou H, de acordo com o código de uma letra), o aminoácido na posição B25 é Asn, o aminoácido na posição B27 é Glu ou Asp e que opcionalmente também compreende uma ou mais mutações adicionais, e em que a porção de acila é ligada ao grupo ϵ amino no resíduo de lisina na posição

5 B29.

36. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes na medida do possível em que a insulina estabilizada em protease compreende a mutação de A14E.

37. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com

10 qualquer uma das cláusulas precedentes na medida do possível, em que, na insulina estabilizada em protease, além da mutação na posição B25, há apenas a mutação na posição A14 mencionada na cláusula precedente.

38. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes na medida do possível, em que a

15 insulina estabilizada em protease compreende a mutação de A14H.

39. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes na medida do possível, em que o análogo da insulina estabilizada em protease compreende a mutação de desB30.

20 40. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com quaisquer cláusulas precedentes na medida do possível, em que a uma ou mais mutações adicionais dentro da insulina estabilizada em protease é selecionada de um grupo que consiste em: $A_{(-1)}P$, $A(0)P$, A8H, A21G, $B(-1)P$, $B(0)P$, B1E, B1Q, B16E, B26D, B27E, B28D, desB30, B31L e B32E.

25 41. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com a cláusula precedente na medida do possível, em que a insulina estabilizada em protease, além das mutações nas posições A14 e B25, tem apenas uma das mutações mencionadas nas cláusulas anteriores.

30 42. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes fora a última (isto é, exceto a cláusula 41) na medida do possível, em que a insulina estabilizada em protease, além das mutações nas posições A14 e B25, tem exatamente duas das mu-

tações mencionadas na cláusula precedente fora duas (isto é, mencionadas na cláusula 40).

43. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes fora as duas últimas (isto é, exceto
5 as cláusulas 41 e 42) na medida do possível, em que a insulina estabilizada em protease, além das mutações nas posições A14 e B25, tem exatamente três das mutações mencionados na cláusula precedente fora duas (isto é, mencionadas na cláusula 40).

44. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com
10 qualquer uma das cláusulas precedentes fora as duas últimas (isto é, exceto as cláusulas 41 e 42) na medida do possível em que, além das mutações nas posições A14 e B25, a única mutação adicional é desB30.

45. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com
15 qualquer uma das cláusulas precedentes na medida do possível, em que o resíduo C do aminoácido terminal na cadeia A da insulina estabilizada em protease é o resíduo de aminoácido A21.

46. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com
qualquer uma das cláusulas precedentes na medida do possível, em que a insulina estabilizada em protease é selecionada do grupo que consiste em
20 Insulina humana de A8H, B25N, B27E, desB30; Insulina humana de A14E, A18L, B25H, desB30; Insulina humana de A14E, A21G, B25H, desB27, desB30; Insulina humana de A14E, B1E, B25H, B27E, B28E, desB30; Insulina humana de A14E, B1E, B25H, B28E, desB30; Insulina humana de A14E, B1E, B28E, desB30; Insulina humana de A14E, B1E, B28E,
25 desB30; Insulina humana de A14E, B16H, B25H, desB30; Insulina humana de A14E, B25H, desB30; Insulina humana de A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30; Insulina humana de A14E, B25H, B27E, desB30; Insulina humana de A14E, B25H, desB27, desB30; Insulina humana de A14E, B25H, B29R, desB30, Insulina humana de A14E, B28D, desB30, Insulina humana
30 de A14E, B28E, desB30, Insulina humana de ; Insulina humana de B25N, B27E, desB30; Insulina humana de B25H, desB30; Insulina humana de A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30; Insulina

humana de A14E, B25H, B29R, desB30; Insulina humana de A14E, A21G, B25H, desB27, desB30; Insulina humana de A14E, A21G, B25H, desB30; Insulina humana de A14E, B16H, B25H, desB30; Insulina humana de A14E, B25H, B16H, desB30; Insulina humana de A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30; Insulina humana de A14E, B25H, desB27, desB30; Insulina humana de A14E, B25H, B27K, desB28, desB29, desB30; Insulina humana de A14E, B25H, desB30; Insulina humana de A14E, desB30 e Insulina humana de A21G, B25H, desB30.

47. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes na medida do possível, em que a porção de acila ligada à insulina estabilizada em protease tem a fórmula geral $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$ (I), em que Acy, AA1, AA2, AA3, n, m e p são como definidos acima.

48. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com a cláusula precedente na medida do possível, em que Acy é um ácido graxo, preferivelmente ácido mirístico ou ácido estérico, mais preferido ácido mirístico.

49. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes exceto a última, em que Acy é um diácido graxo, preferivelmente um diácido graxo (α,ω), mais preferido ácido heptadecanodioico, ácido hexadecanodioico, ácido octadecanodioico, ácido nonadecanodioico, ácido docosanodioico, ácido eicosanodioico.

50. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes exceto a última, em que Acy é um ácido ω -(tetrazol-5-il)-graxo, preferivelmente ácido 15-(1H-tetrazol-5-il)pentadecanoico, ácido 16-(1H-tetrazol-5-il)hexadecanoico, ácido 17-(1H-tetrazol-5-il)heptadecanoico, ácido 18-(1H-tetrazol-5-il)octadecanoico, ou ácido 19-(1H-tetrazol-5-il)nonadecanoico.

51. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes na medida do possível, em que AA1 é ácido tranexâmico ou glicina.

52. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com

qualquer uma das cláusulas precedentes na medida do possível, em que AA1 é ácido tranexâmico.

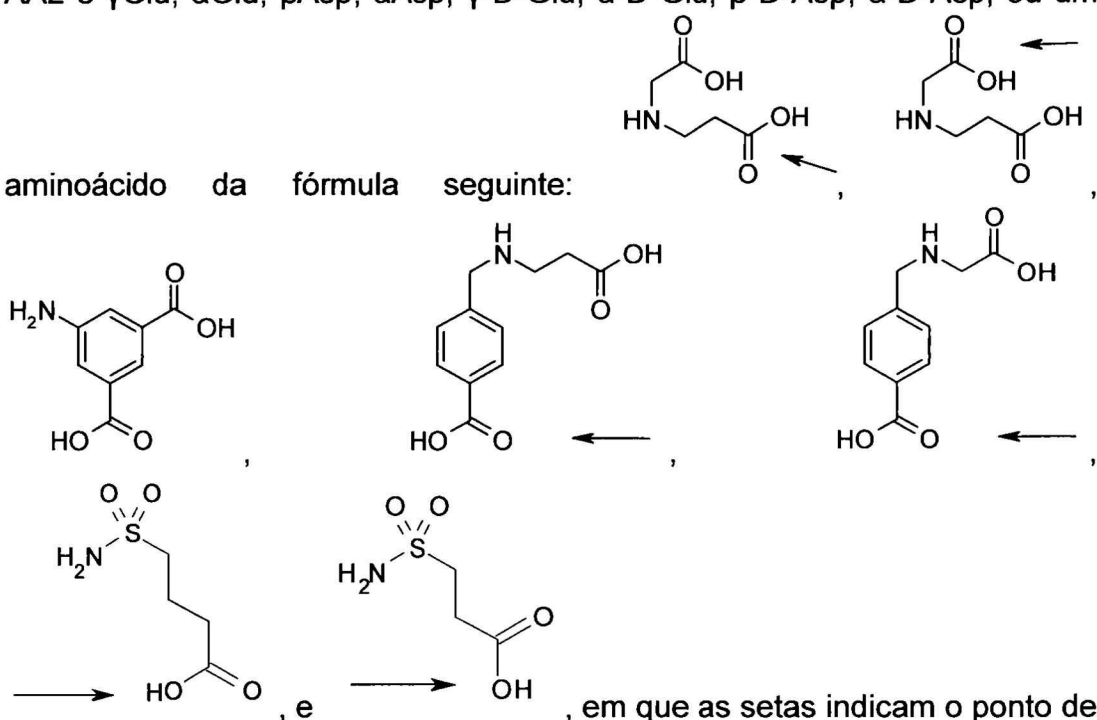
53. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes na medida do possível, em que n é 0 ou 1.

54. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes na medida do possível, em que n é 0.

55. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes na medida do possível, em que n é 1.

56. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes na medida do possível, em que AA2 é γ Glu, α Glu, β Asp, α Asp, γ -D-Glu, α -D-Glu, β -D-Asp, α -D-Asp, ou um

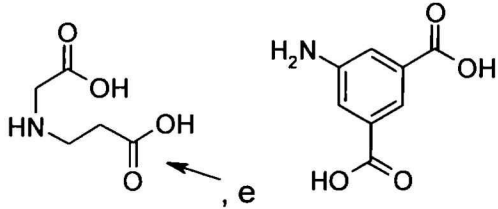
15 aminoácido da fórmula seguinte:



20

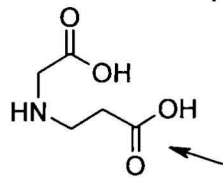
57. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes na medida do possível, em que

AA2 é γ Glu, β Asp, γ -D-Glu, β -D-Asp, ou um aminoácido da fórmula seguinte:



, em que a seta indica o ponto de ligação ao grupo amino de AA1, AA2, AA3 ou ao grupo ϵ -amino do resíduo de lisina B29 ou a uma posição N-terminal da insulina estabilizada em protease

- 5 58. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes na medida do possível, em que AA2 é γ Glu, γ -D-Glu, ou um aminoácido da fórmula seguinte:



, em que a seta indica o ponto de ligação ao grupo amino de AA1, AA2, AA3 ou ao grupo ϵ -amino do resíduo de lisina B29 ou a uma posição N-terminal da insulina estabilizada em protease

10

59. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes na medida do possível, em que m é 0, 1, 2, 3, 4, 5, ou 6.

60. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes na medida do possível, em que m é 0, 1, 2, 3, ou 4.

61. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes na medida do possível, em que m é 4.

- 20 62. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes na medida do possível, em que m é 3.

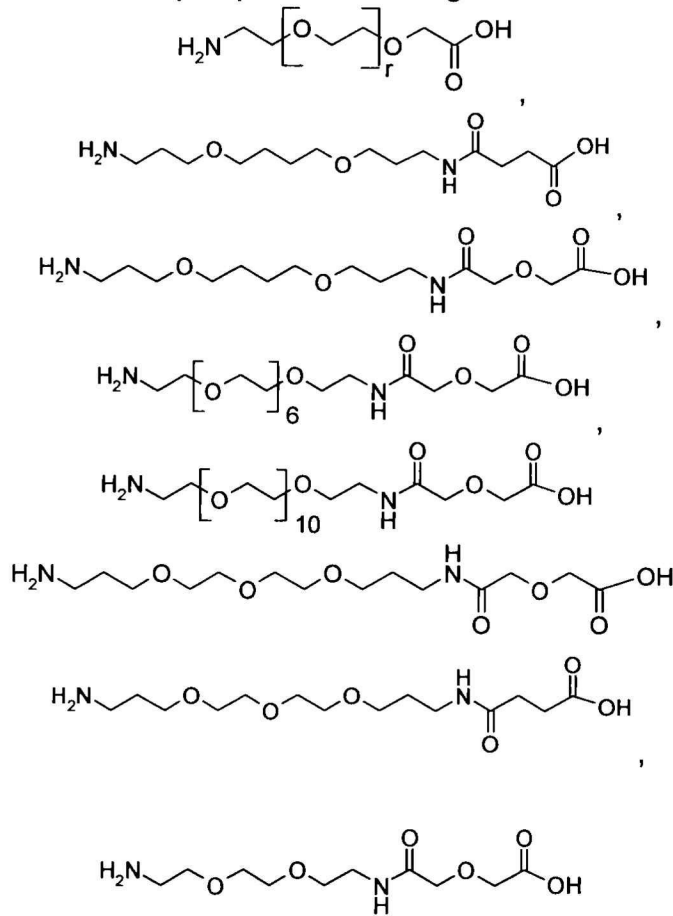
- 25 63. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes na medida do possível, em que m é 2.

64. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes na medida do possível, em que m

é 1.

65. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes na medida do possível, em que m é 0.

5 66. Uma insulina estabilizada em protease acilada, de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes na medida do possível, em que AA3 é selecionado de qualquer um dos seguintes:



em que r é 1, 2, 3, 5, 7, 11, 23 ou 27.

10 67. Uma insulina estabilizada em protease acilada, de acordo com a cláusula precedente, em que r é 1, 3, 5, ou 7.

68. Uma insulina estabilizada em protease acilada, de acordo com a cláusula precedente, em que r é 1.

69. Uma insulina estabilizada em protease acilada, de acordo com a cláusula precedente fora uma, em que r é 3.

15 70. Uma insulina estabilizada em protease acilada, de acordo com a cláusula precedente fora duas, em que r é 5.

71. Uma insulina estabilizada em protease acilada, de acordo com a cláusula precedente fora três, em que r é 7.

72. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes na medida do possível, em que p é 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10.

73. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes, em que p é 0, 1, 2, 3 ou 4.

74. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes, em que p é 0, 1 ou 2.

75. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes, em que p é 0 ou 2.

76. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes, em que p é 0.

77. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes, em que p é 1.

78. Uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes, em que p é 2.

79. Um composto de acordo com qualquer uma das cláusulas de produto precedentes, que é qualquer um dos compostos especificamente mencionados neste relatório descritivo tal como nos exemplos específicos, especialmente qualquer um dos exemplos 1 *et seq.* abaixo.

80. Um composto de acordo com qualquer uma das cláusulas de produto precedentes, que é qualquer um dos exemplos específicos das porções de acila especificamente mencionadas neste relatório descritivo presa a qualquer uma das insulinas estabilizadas em protease especificamente mencionadas neste relatório descritivo.

81. O uso de um composto de acordo com qualquer uma das cláusulas de produto precedentes para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de diabetes.

82. O uso de um composto de acordo com qualquer uma das cláusulas de produto precedentes para a preparação de uma composição farmacêutica que pode ser administrada pulmonarmente para o tratamento de dia-

betes.

83. O uso de um composto de acordo com qualquer uma das cláusulas de produto precedentes para a preparação de uma composição farmacêutica que pode ser administrada pulmonarmente para o tratamento de diabetes e que dá um efeito de ação longa.

84. O uso de um composto de acordo com qualquer uma das cláusulas de produto precedentes para a preparação de uma composição farmacêutica em pó que pode ser administrada pulmonarmente para o tratamento de diabetes.

85. O uso de um composto de acordo com qualquer uma das cláusulas de produto precedentes para a preparação de uma composição farmacêutica líquida que pode ser administrada pulmonarmente para o tratamento de diabetes.

86. O uso de um composto de acordo com qualquer uma das cláusulas de produto precedentes para a preparação de uma composição farmacêutica que pode ser administrada oralmente para o tratamento de diabetes.

87. Um método de tratamento de diabetes, o método compreendendo administrar a um sujeito em necessidade do mesmo uma quantidade terapêuticamente eficaz de um composto de acordo com qualquer uma das cláusulas de produto precedentes.

88. Uma composição que contém insulina humana como também uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes.

89. Uma composição que contém insulina asparto como também uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes.

90. Uma composição que contém insulina Lispro como também uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes.

91. Uma composição que contém insulina Glulisina como também uma insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das cláusulas precedentes.

92. Uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade biologicamente ativa da insulina estabilizada em protease de acordo com qualquer uma das cláusulas acima relativo aos análogos de insulina e um veículo farmacêuticamente aceitável.

5 93. Um método para o tratamento, a prevenção ou o alívio de hiperglicemia, diabetes tipo 2, tolerância à glicose prejudicada, diabetes tipo 1, obesidade, síndrome X ou dislipidemia em um sujeito compreendendo administrar a um sujeito uma insulina estabilizada em protease, de acordo com qualquer uma das cláusulas acima, relativo aos análogos de insulina ou uma
10 composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das cláusulas acima.

94. Uso de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma insulina estabilizada em protease, de acordo com qualquer uma das cláusulas acima, relativo aos análogos de insulina para a preparação de uma formulação farmacêutica para o tratamento ou prevenção de hiperglicemia, diabetes tipo 2,
15 tolerância à glicose prejudicada, diabetes tipo 1, obesidade, síndrome X ou dislipidemia.

95. Um método de tratamento de diabetes, o método compreendendo administrar a um sujeito em necessidade do mesmo uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma insulina acilada de acordo com qualquer uma
20 das cláusulas de produto precedentes.

Combinando uma ou mais cláusulas descritas aqui, opcionalmente também com uma ou mais reivindicações abaixo, resulta em outras cláusulas e a presente invenção diz respeito a todas as possíveis combinações das ditas cláusulas e reivindicações.

25 Todas as referências, incluindo publicações, pedidos de patente, e patentes, citadas aqui são por este meio incorporadas por referência em sua totalidade e na mesma proporção como se cada referência fosse individual e especificamente indicada para ser incorporada por referência e fosse exposta em sua totalidade aqui (na proporção máxima permitida por lei).

30 Todos os títulos e subtítulos são aqui usados para conveniência apenas e de forma alguma não deveriam ser interpretados como limitando a invenção.

O uso de qualquer um e de todos os exemplos, ou linguagem exemplar (por exemplo, "tal como") fornecidos aqui, é intencionado meramente para melhor esclarecer a invenção e não propõem uma limitação no escopo da invenção a menos que do contrário reivindicado. Nenhuma linguagem no relatório descritivo deveria ser interpretada como indicando qualquer elemento não reivindicado como essencial para a prática da invenção.

A citação e a incorporação de documentos de patente aqui são feitas para conveniência apenas e não refletem qualquer vista da validade, patentabilidade, e/ou exequibilidade de tais documentos de patente. A menção aqui das referências está fora de admissão que elas constituam técnica anterior.

Aqui, a palavra "compreendem" é para ser amplamente interpretada significando "incluem", "contêm" ou "compreendem" (diretrizes de EPO C 4.13).

Esta invenção inclui todas as modificações e equivalentes do assunto citado nas reivindicações anexadas a este conforme permitido por lei aplicável.

EXEMPLOS

Os exemplos seguintes são oferecidos por via de ilustração, não por limitação.

As abreviações aqui usadas são as seguintes: β Ala é beta-alanila, Aoc é ácido 8-amino-octanoico, tBu é terc-butila, DCM é diclorometano, DIC é di-isopropilcarbodi-imida, DIPEA = DIEA é N,N-disopropiletilamina, DMF é N,N-dimetilformamida, DMSO é sulfóxido de dimetila, EtOAc é acetato de etila, Fmoc é 9-fluorenilmetiloxicarbonila, γ Glu é gama L-glutamila, HCl é ácido clorídrico, HOBt é 1-hidroxibenzotriazol, NMP é N-metilpirrolidona, MeCN é acetonitrila, OEG é [2-(2-aminoetóxi)etóxi]metilcarbonila, Su é succinimidil-1-ila = 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ila, OSu é succinimidil-1-ilóxi = 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilóxi, RPC é cromatografia de fase reversa, TA é temperatura ambiente, TFA é ácido trifluoroacético, THF é tetraidrofurano, TNBS é ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico, TRIS é tris(hidroximetil)aminometano e TSTU é tetrafluoroborato de O-(N-

succinimidil)-1,1,3,3-tetrametilurônio.

Os seguintes exemplos e procedimentos gerais referem-se aos compostos intermediários e produtos finais identificados no relatório descritivo e nos esquemas de síntese. A preparação dos compostos da presente
5 invenção é descrita em detalhes usando os exemplos seguintes, mas as reações químicas descritas em termos de sua aplicabilidade geral são descritas para a preparação dos compostos da invenção. Ocasionalmente, a reação pode não ser aplicável como descrito em cada composto incluso dentro do escopo descrito da invenção. Os compostos para os quais isto ocorre
10 serão facilmente reconhecidos por aqueles versados na técnica. Nestes casos, as reações podem ser de forma bem sucedidas executadas por modificações convencionais conhecidas àqueles versados na técnica, ou seja, por proteção apropriada de grupos interferentes, alterando a outros reagentes convencionais, ou por modificação rotineira das condições de reação. Alternativamente, outras reações descritas aqui ou do contrário convencionais
15 serão aplicáveis à preparação dos compostos correspondentes da invenção. Em todos os métodos preparativos, todos os materiais de partida são conhecidos ou podem ser facilmente preparados de materiais de partida conhecidos. Todas as temperaturas são expostas em graus Centígrado e a menos
20 que do contrário indicado, todas as partes e porcentagens são em peso quando referem-se a rendimentos e todas as partes são em volume quando referem-se a solventes e eluentes.

Os compostos da invenção podem ser purificados empregando um ou mais procedimentos seguintes que são típicos dentro da técnica. Estes procedimentos podem - se necessário - ser modificados com respeito
25 aos gradientes, pH, sais, concentrações, fluxo, colunas e assim sucessivamente. Dependendo dos fatores tais como perfil de impureza, solubilidade das insulinas em questão et cetera, estas modificações podem ser facilmente reconhecidas e feitas por uma pessoa versada na técnica.

30 Após HPLC ácida ou dessalgação, os compostos são isolados por liofilização das frações puras.

Após HPLC neutro ou cromatografia de permuta de ânion, os

compostos são dessalgados, precipitados em pH isoelétrico, ou são purificados por HPLC acídica.

PROCEDIMENTOS DE PURIFICAÇÃO TÍPICOS:

O sistema de HPLC é um sistema de Gilson que consiste no seguinte: manipulador Líquido Modelo 215, Bomba Modelo 322-H2 e um Detector de UV Modelo 155. Detecção é tipicamente a 210 nm e 280 nm.

O sistema de FPLC de Purificador Äkta de (Amersham Biosciences) consiste no seguinte: Bomba Modelo P-900, detector de UV Modelo UV-900, pH Modelo pH/C-900 e detector de condutividade, coletor Modelo Frac-950 Frction. Detecção de UV é tipicamente a 214 nm, 254 nm e 276 nm.

HPLC ACÍDICA:

	COLUNA:	Macherey-Nagel SP 250/21 Nucleusil 300-7 C4
	FLUXO:	8 ml/min
15	TAMPÃO A:	0,1% de TFA em acetonitrila
	TAMPÃO B:	0,1% de TFA em água.
	GRADIENTE:	0,0 – 5,0 min: 10% de A
		5,00-30,0 min: 10% de A a 90% A
		30,0-35,0 min: 90% de A
20		35,0-40,0 min: 100% de A

HPLC NEUTRA:

	COLUNA:	Phenomenex, Jupiter, C4 5 µm 250 x 10,00 mm, 300 Å
	FLUXO:	6 ml/min
25	TAMPÃO A:	5 mM de TRIS, 7,5 mM de (NH ₄) ₂ SO ₄ , pH = 7,3, 20% de CH ₃ CN.
	TAMPÃO B:	60% de CH ₃ CN, 40% de água,
	GRADIENTE:	0 - 5 min: 10% de B
		5 - 35 min: 10 - 60% de B
30		35 - 39 min: 60% de B
		39 - 40 min: 70% de B
		40-43,5 min: 70% de B

CROMATOGRAFIA DE PERMUTA DE ÂNION:

	COLUNA:	RessourceQ, 1 ml
	FLUXO:	6 ml/min
5	TAMPÃO A:	0,09% de NH_4HCO_3 , 0,25% de NH_4OAc , 42,5% de etanol, pH 8,4
	TAMPÃO B:	0,09% de NH_4HCO_3 , 2,5% de NH_4OAc , 42,5% de etanol, pH 8,4
	GRADIENTE:	100% de A a 100% de B durante 30 volumes de coluna
10	DESSALGAÇÃO:	
	COLUNA:	HiPrep 26/10
	FLUXO:	10 ml/min, 6 volumes de coluna
	TAMPÃO:	10 mM de NH_4HCO_3

PROCEDIMENTO GERAL PARA A SÍNTESE DE FASE SÓLIDA

15 DOS REAGENTES DE ACILAÇÃO DA FÓRMULA GERAL (II):

(II): $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p\text{-Act}$,

em que *Acy*, *AA1*, *AA2*, *AA3*, *n*, *m*, e *p* são como definidos acima e *Act* é o grupo de partida de um éster ativo, tal como *N*-hidroxissuccinimida (OSu), ou 1-hidroxibenzotriazol, e

20 em que os ácidos carboxílicos são protegidos dentro das porções de *Acy* e de *AA2* da porção de acila como ésteres de *tert*-butila.

Compostos da fórmula geral (II) de acordo com a invenção podem ser sintetizados em suporte sólido usando procedimentos bem conhecidos às pessoas versadas na técnica de síntese de peptídeo de fase sólida.

25 Este procedimento compreende ligação de um aminoácido protegido por Fmoc a uma resina de 2-clorotritilcloro de poliestireno. A ligação pode, por exemplo, ser realizada usando o aminoácido *N*-protegido livre na presença de uma amina terciária, como trietil amina ou *N,N*-di-isopropiletilamina (vide referências abaixo). A extremidade C-terminal (que é ligada à resina) deste

30 aminoácido está na extremidade da sequência sintética que é acoplada às insulinas parentais da invenção. Após ligação do aminoácido Fmoc à resina, o grupo de Fmoc foi desprotegido usando, por exemplo, aminas secundá-

rias, como piperidina ou dietil amina, seguido por acoplamento de outro (ou o mesmo) aminoácido protegido por Fmoc e desproteção. A sequência sintética é feita mediante acoplamento de diácidos graxos protegidos por mono-*tert*-butila (α , ω), como ésteres de mono-*tert*-butila de ácido hexadecanodioico, heptadecanodioico, octadecanodioico ou eicosanodioico. Clivagem dos compostos da resina é realizada usando ácido como 0,5-5% de TFA/DCM (ácido trifluoroacético em diclorometano), ácido acético (por exemplo, 10% em DCM, ou HOAc/trifluoroetanol/DCM 1:1:8), ou hecafluoroisopropanol em DCM (Vide, por exemplo, "Organic Synthesis on Solid Phase", F. Z. Dörwald, Wiley-VCH, 2000. ISBN 3-527-29950-5, "Peptides: Chemistry and Biology", N. Sewald & H.-D. Jakubke, Wiley-VCH, 2002, ISBN 3-527-30405-3 ou "The Combinatorial Chemistry Catalog" 1999, Novabiochem AG, e referências citadas dentro do mesmo). Isto assegura que os ésteres de *tert*-butila presentes nos compostos como grupos de proteção de ácido carboxílico não são desprotegidos. Por fim, o grupo carbóxi C-terminal (liberado da resina) é ativado, por exemplo, como o éster de *N*-hidroxissuccinimida (OSu) e usado ou diretamente ou após a purificação como reagente de acoplamento ligado às insulinas parentais da invenção. Este procedimento é ilustrado no exemplo 9.

Alternativamente, os reagentes de acilação da fórmula geral (II) acima podem ser preparados através da síntese de fase de solução como descrito abaixo.

Diácidos graxos protegidos por mono-*tert*-butila, tais como ésteres de mono-*tert*-butila de ácido hexadecanodioico, heptadecanodioico, octadecanodioico ou eicosanodioico são ativados, por exemplo, como OSu-ésteres como descritos abaixo ou como qualquer outro éster ativado conhecido àqueles versados na técnica, tal como ésteres de HOBt ou HOAt. Este éster ativo é acoplado com um dos aminoácidos AA1, AA2 protegidos com mono-*tert*-butila, ou AA3 em um solvente adequado tal como THF, DMF, NMP (ou uma mistura de solventes) na presença de uma base adequada, tal como DIPEA ou trietilamina. O intermediário é isolado, por exemplo, através de procedimentos extrativos ou através de procedimentos cromatográficos.

O intermediário resultante é submetido novamente à ativação (como descrito acima) e ao acoplamento com um dos aminoácidos AA1, AA2 protegido com mono-*terc*-butila, ou AA3 como descrito acima. Este procedimento é repetido até o intermediário protegido por Acy-AA1_n-AA2_m-AA3_p-OH desejado ser ob-
5 tido. Este é por sua vez ativado para fornecer os reagentes de acilação da fórmula geral (II) Acy-AA1_n-AA2_m-AA3_p-Act. Este procedimento é ilustrado no exemplo 21.

Os reagentes de acilação preparados por qualquer um dos métodos acima podem ser desprotegidos por (*terc*-butila) após ativação como
10 ésteres de OSu. Isto pode ser feito por tratamento de TFA do reagente de acilação protegido por *terc*-butila ativado por OSu. Após acilação de qualquer insulina estabilizada em protease, a insulina estabilizada em protease acilada desprotegida resultante da invenção é obtida. Este é ilustrado, por exemplo, no exemplo 16 abaixo.

Se os reagentes preparados por qualquer um dos métodos acima não forem desprotegidos por (*terc*-butila) após ativação como ésteres de
15 OSu, acilação de qualquer insulina estabilizada em protease fornece a insulina estabilizada em protease acilada protegida por *terc*-butila correspondente da invenção. Para se obter a insulina estabilizada em protease acilada protegida da invenção, a insulina protegida será desprotegida. Isto pode ser
20 feito através de tratamento de TFA para fornecer a insulina estabilizada em protease acilada protegida da invenção. Isto é ilustrado, por exemplo, nos exemplos 1 e 2 abaixo.

Se acilação de um resíduo de lisina (na posição épsilo) de uma
25 insulina for desejada, a acilação é executada em pH alcalino (por exemplo, em pH 10, 10,5, ou 11). Isto é, por exemplo, ilustrado nos exemplos 1 e 2 abaixo.

Se acilação da posição N-terminal da cadeia A (A1) de uma insulina for desejada, acilação é executada em pH neutro (por exemplo, em
30 pH 7, 7,5, 8, ou 8,5). Isto é, por exemplo, ilustrado nos exemplos 38, e 44 abaixo.

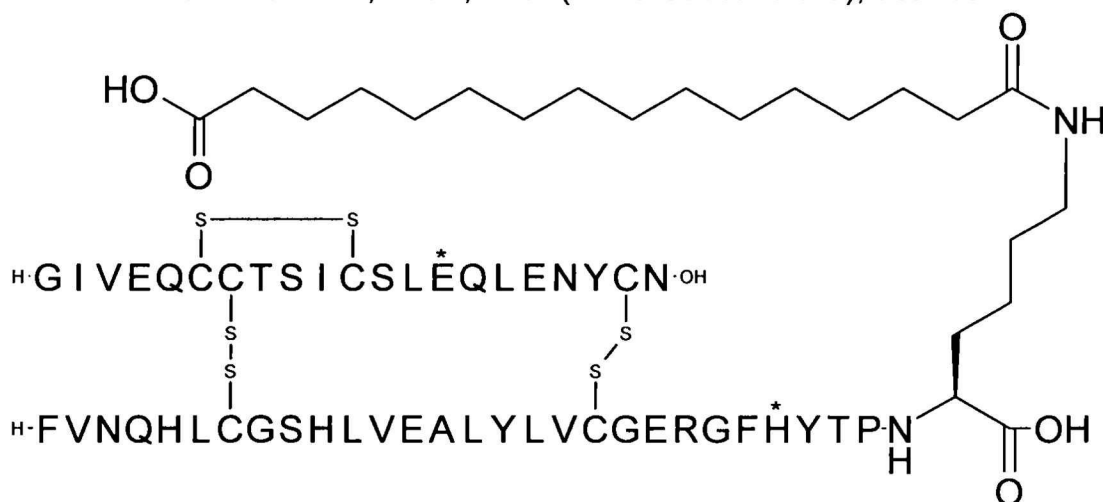
PROCEDIMENTO GERAL (A) PARA PREPARAÇÃO DE INSULINAS ES-

TABILIZADAS EM PROTEASE ACILADAS DESTA INVENÇÃO

O procedimento geral (A) é ilustrado no primeiro exemplo.

EXEMPLO 1. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N⁶-hexadecandioila), desB30



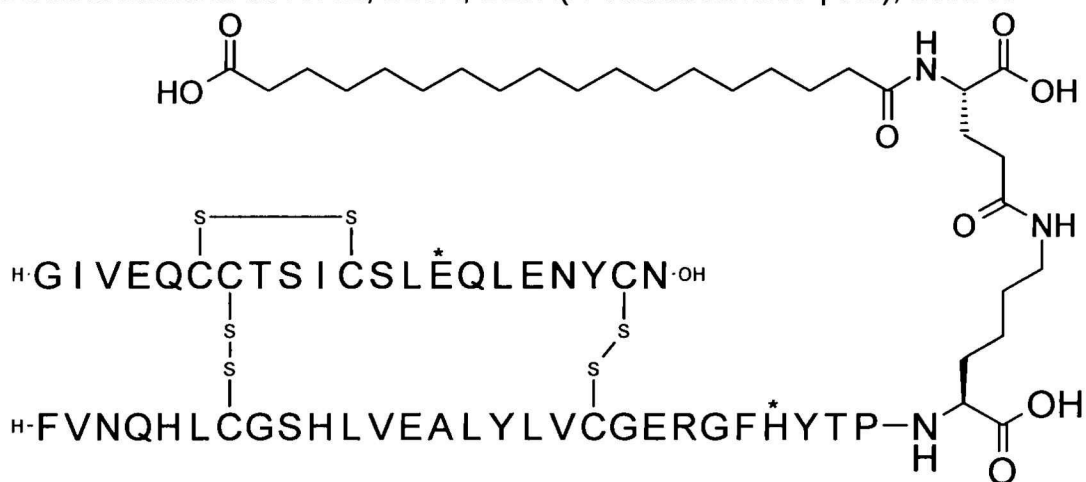
Insulina humana de A14E, B25H, desB30 (500 mg) foi dissolvida em 100 mM de Na₂CO₃ aquoso (5 ml), e pH ajustado em 10,5 com 1 N de NaOH. Éster de *N*-hidroxissuccinimida de éster de *tert*-butila de ácido hexadecanoico foi dissolvido em acetonitrila (10 em P/V%) e adicionado à solução de insulina e aquecido suavemente sob água de torneira morna, para evitar precipitação e deixada em temperatura ambiente durante 30 minutos. A mistura foi liofilizada. O sólido foi dissolvido em 95% de ácido trifluoroacético esfriado em gelo (contendo 5% de água) e mantido em gelo durante 30 minutos. A mistura foi concentrada a vácuo e re-evaporada de diclorometano. O resíduo foi dissolvido em água, e pH foi ajustado para neutro (6-7) e a mistura foi liofilizada.

5 A insulina resultante foi purificada através de cromatografia de permuta de íon em uma coluna de Fonte 15Q de 21 ml, várias passadas, eluindo com um gradiente de 15 a 300 mM de acetato de amônio em 15 mM de Tris, 50 % em v/v de etanol, pH 7,5 (ácido acético). Dessalgação final das frações puras foi executada em uma coluna de RPC de 3 ml eluindo isocra-
10 ticamente com 0,1 % em v/v de TFA, 50 % em v/v de etanol. A insulina pura resultante foi liofilizada.

LC-MS (eletropulverização): m/z = 1483,2 (M+4)/4. Calc.: 1483,5

EXEMPLO 2. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, B29K(*N*^foctadecandioil- γ Glu), desB30

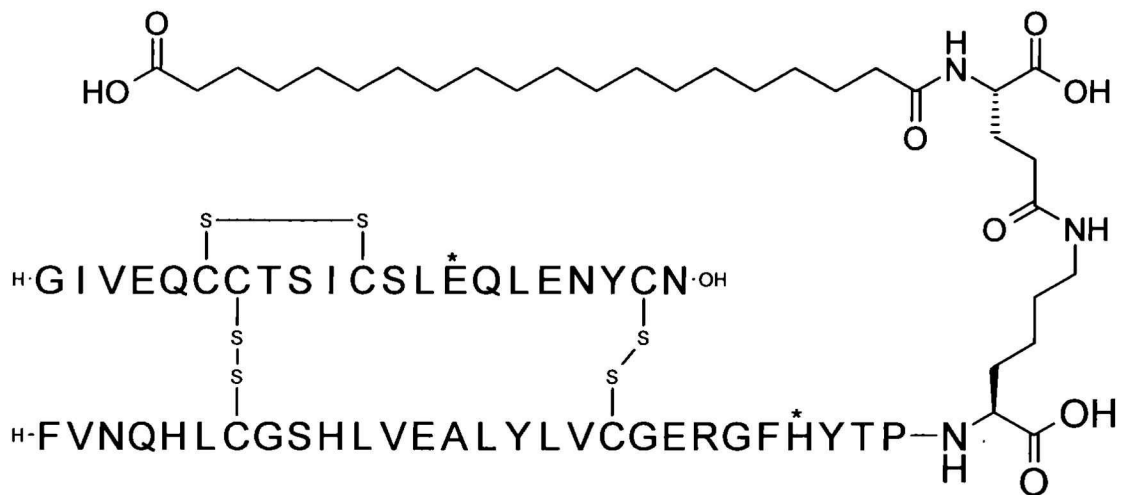


Insulina humana de A14E, B25H, desB30 (2 g) foi dissolvida em 100 mM de Na₂CO₃ aquoso (10 ml), e DMSO (4 ml) foi adicionado. pH foi ajustado para 10,5 com 1 N de NaOH. Octadecanodioil-L-Glu(OSu)-OtBu de *tert*-butila (preparado como descrito em WO 2005/012347). Mais 100 mM de Na₂CO₃ aquoso (20 ml) foram adicionados seguidos por THF (20 ml). Após 1,5 h, algumas gotas de metilamina foram adicionadas e a mistura foi subsequentemente acidificada com ácido acético. A mistura foi purificada por HPLC preparativa e liofilizada para fornecer a insulina do título como éster de di-*tert*-butila. Este foi dissolvido em diclorometano e ácido trifluoroacético 1:1 (50 ml). A mistura foi deixada por 2 horas e concentrada a vácuo. Após adição de uma pouca de água e acetonitrila, a mistura foi purificada por H-PLC preparativa. Frações puras foram liofilizadas. Isto forneceu 313 mg da insulina do título.

MALDI-TOF MS: m/z = 6089 (M+1). Calc.: 6089.

EXEMPLO 3. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, B29K(*N*^feicosanodioil- γ Glu), desB30

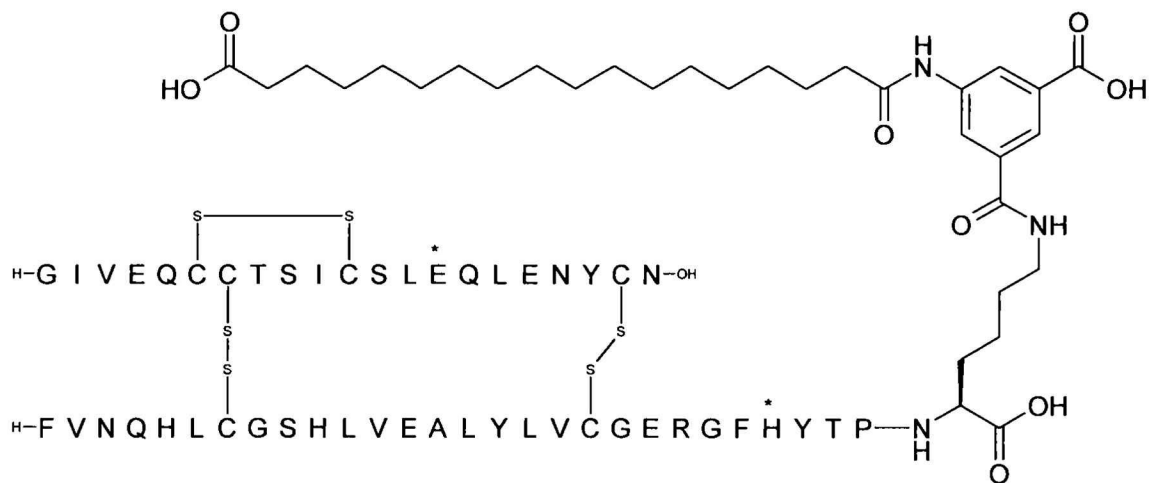


Esta insulina foi similarmente preparada como descrito acima a partir de ácido eicosanodioico por meio de éster de mono-*terc*-butila de ácido eicosanodioico e icosanodioil-L-Glu(OSu)-OtBu de *terc*-butila.

MALDI-TOF MS: $m/z = 6120 (M+1)$. Calc.: 6117.

EXEMPLO 4. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^o3-CARBÓXI-5-octadecanodioilaminobenzoíla), desB30



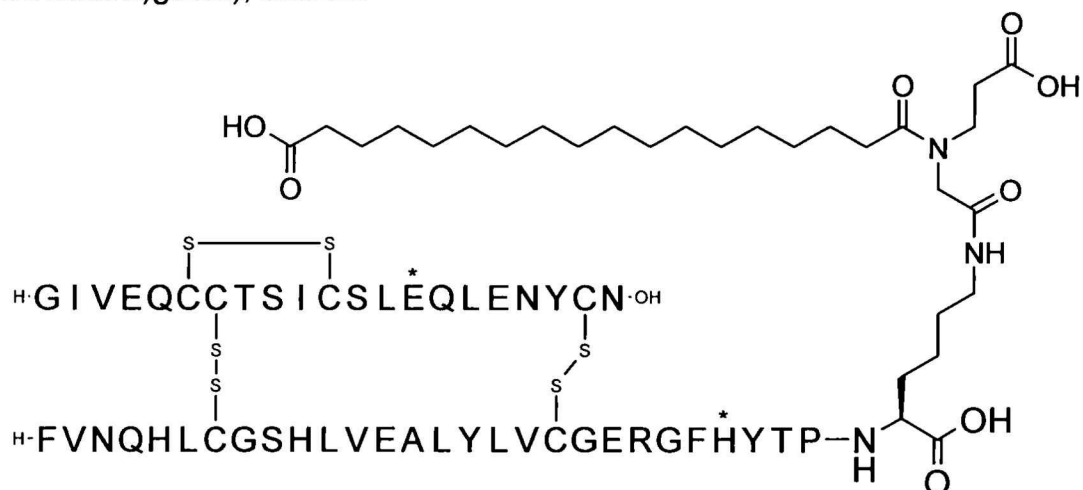
- 5 Esta insulina foi similarmente preparada como descrito acima a partir de éster de mono-(2,5-dioxopirrolidin-1-ila) de ácido 5-(17-*terc*-butoxicarbonilheptadecanoilamino)isofáltico (preparado como descrito em WO 2006/082204).

LC-MS: 1531 (M+4), Mw 6124 (desconvoluto). Calc.: 1531

(M+4), 6122.

EXEMPLO 5. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, B29K(*N*^F-N-octadecandioil-N-(2-carboxietil)glicila), desB30

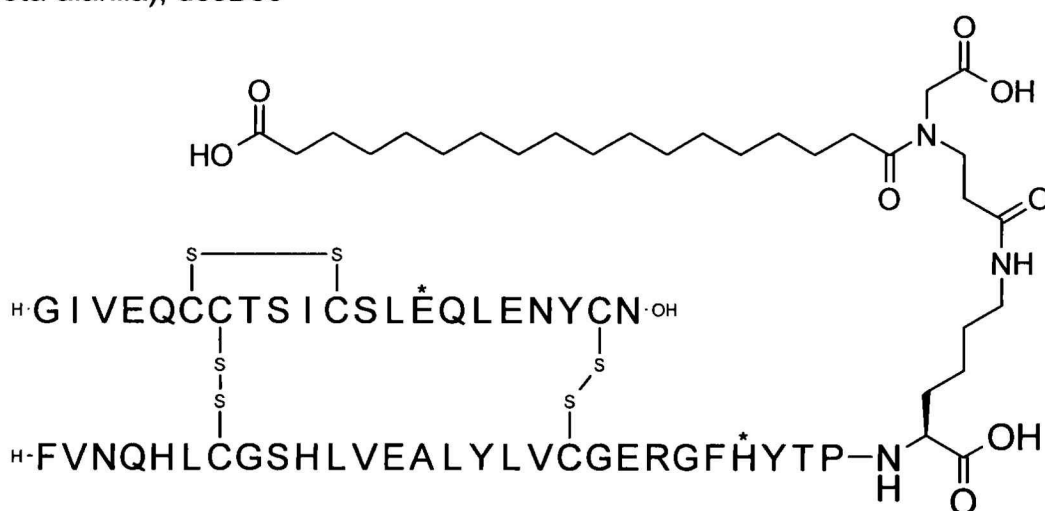


- 5 Esta insulina foi similarmente preparada como descrito acima a partir de octadecandioil-N-(2-(*tert*-butoxicarbonil)etil)-Gly-OSu de *tert*-butila (preparado como descrito em WO 2005/012347).

LC-MS (eletropulverização): m/z: 1522,52 (M+4). Calc.: 1523.

EXEMPLO 6. PROCEDIMENTO GERAL (A):

- 10 Insulina humana de A14E, B25H, B29K(*N*^F-(n-octadecandioil-n-carboximetil)-beta-alanila), desB30

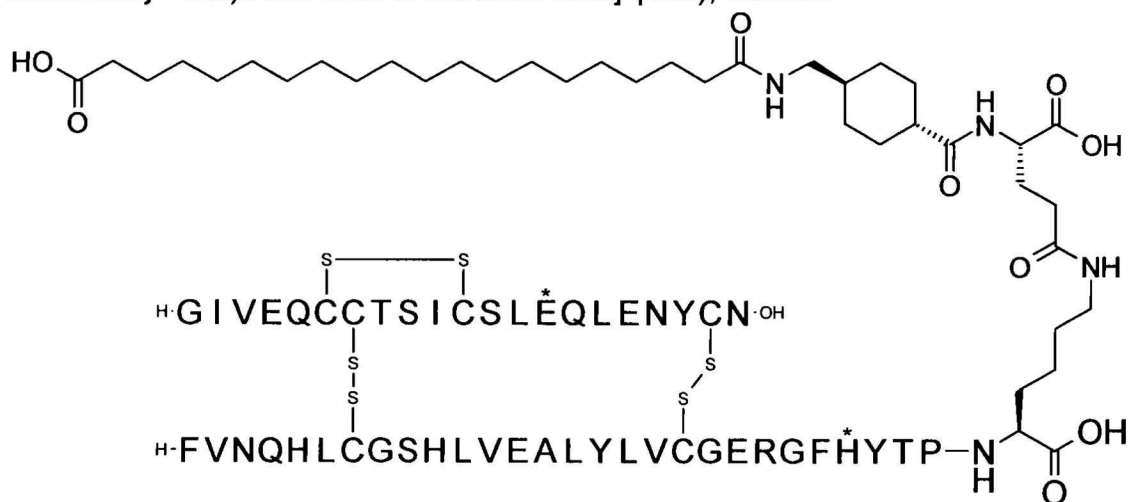


Esta insulina foi similarmente preparada como descrito acima a partir de octadecandioil-N-(*tert*-butoxicarbonilmetil)-βAla-OSu de *tert*-butila (preparado como descrito em WO 2005/012347).

MALDI-TOF MS: $m/z = 6088$ (M+1). Calc.: 6089.

EXEMPLO 7. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, B29K(*N*⁴-([4-({19-carboxinonadecanoilamino} metil)trans-ciclo-hexanocarbonil]- γ Glu), desB30



5 Esta insulina foi similarmente preparada como descrito acima a partir de éster de 5-(2,5-dioxopirrolidin-1-ila) de éster de 1-*terc*-butila de ácido

2-({4-[(19-*terc*-butoxicarbonilnonadecanoilamino)metil]ciclo-hexanocarbonil}amino)pentanodioico LC-MS (eletropulverização): m/z : 6260.

10 Calc.: 6255.

Preparação de éster de 5-(2,5-dioxopirrolidin-1-ila) de éster de 1-*terc*-butila de ácido 2-({4-[(19-*terc*-butoxicarbonilnonadecanoilamino) metil]ciclo-hexanocarbonil}amino)pentanodioico:

1. ATIVAÇÃO DE OSU DE ÁCIDO EICOSANODIOICO DE *TERC*-BUTILA

15 Ácido icosanodioico de *terc*-butila (5,0 g) foi dissolvido em THF (50 ml) e DMF (30 ml). TSTU (4,53 g) e DIPEA (2,65 ml) foram adicionados. A mistura foi agitada durante 3 dias e depois concentrada a vácuo. O resíduo sólido foi recristalizado de acetonitrila para dar éster de *N*-hidroxissuccinimida de éster de *terc*-butila de ácido icosanodioico como um

20 composto cristalino branco (5,52 g, 89%).

LC-MS (eletropulverização): m/z : 440 [M-56 (= *terc*-Bu)]

2. ACOPLAMENTO DO ÁCIDO TRANEXÂMICO

A uma solução de éster de *N*-hidroxissuccinimida de éster de *tert*-butila de ácido icosanodioico (5,52 g) em THF (100 ml) foi adicionado ácido tranexâmico (1,75 g). Um precipitado foi obtido. Tentativas para adquirir uma solução adicionando DMF (75 ml), água (25 ml) e DMSO (50 ml) e algumas gotas de DIPEA não tiveram êxito. A suspensão foi agitada durante a noite. A mistura foi concentrada a vácuo. Ao resíduo sólido foi adicionado THF e o precipitado foi filtrado. O filtrado foi concentrado e o resíduo sólido foi recristalizado em acetonitrila para dar ácido 4-[(19-*tert*-butoxicarbonilnonadecanoilamino)metil]ciclo-hexanocarboxílico como um composto cristalino branco (5,56g, 93%)

LC-MS (eletropulverização): m/z: 538 (M+1).

3. ATIVAÇÃO DE OSU DE ÁCIDO 4-[(19-*tert*-BUTOXICARBONILNONADECANOILAMINO)METIL]CICLO-HEXANOCARBOXÍLICO

A uma solução de ácido 4-[(19-*tert*-butoxicarbonilnonadecanoilamino)metil]ciclo-hexanocarboxílico (5,56 g) em THF (100 ml) foi adicionada uma solução de TSTU (3,42 g) em acetonitrila (25 ml). A mistura foi concentrada a vácuo após agitação durante a noite. O resíduo sólido foi recristalizado de acetonitrila para dar éster de 2,5-dioxopirrolidin-1-ila de ácido 4-[(19-*tert*-butoxicarbonilnonadecanoilamino)metil]ciclo-hexanocarboxílico (5,76 g, 88%).

LC-MS (eletropulverização): m/z: 635 (M+1).

4. ACOPLAMENTO DE H-Glu-OTBU E ATIVAÇÃO DE OSU.

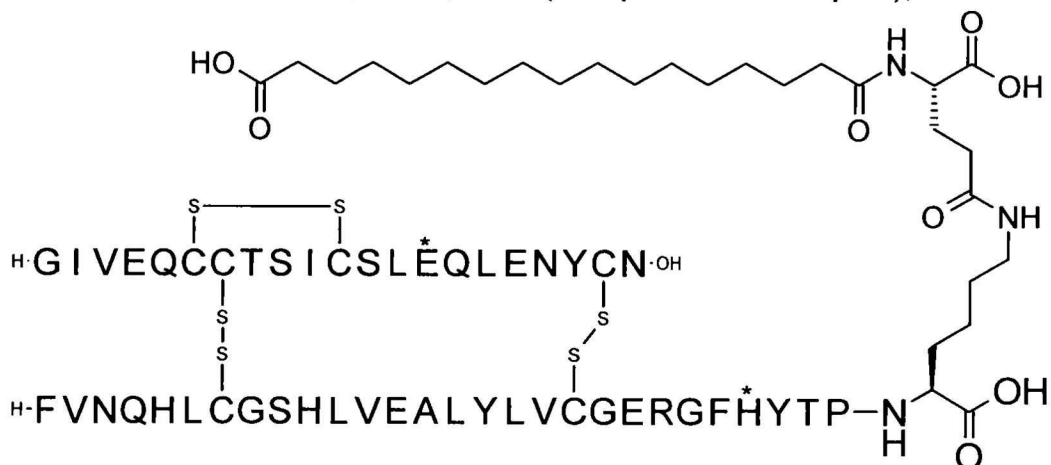
A uma solução de éster de 2,5-dioxopirrolidin-1-ila de ácido 4-[(19-*tert*-butoxicarbonilnonadecanoilamino)metil]ciclo-hexanocarboxílico em THF (150 ml) foi adicionada uma solução de H-Glu-OtBu (1,84 g) em água (25 ml) e algumas gotas de DIPEA. A mistura foi agitada durante noite e depois concentrada a vácuo. O resíduo foi dissolvido em THF quente (60°C) e filtrado. Ao filtrado frio, THF foi adicionado até 150 ml e TSTU (2,98 g) dissolvido em acetonitrila (25 ml) foi adicionado. A mistura foi concentrada após agitação por 20 min. O resíduo foi recristalizado de acetonitrila para dar um sólido branco, éster de 5-(2,5-dioxopirrolidin-1-ila) de éster de 1-*tert*-butila de ácido 2-({4-[(19-*tert*-butoxicarbonilnonadecanoilamino)metil]ciclo-

hexanocarbonil}amino)pentanodioico (6,8 g, 92%).

LC-MS (eletropulverização): m/z: 820 (M+1).

EXEMPLO 8. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^oheptadecanodioil-γGlu), desB30

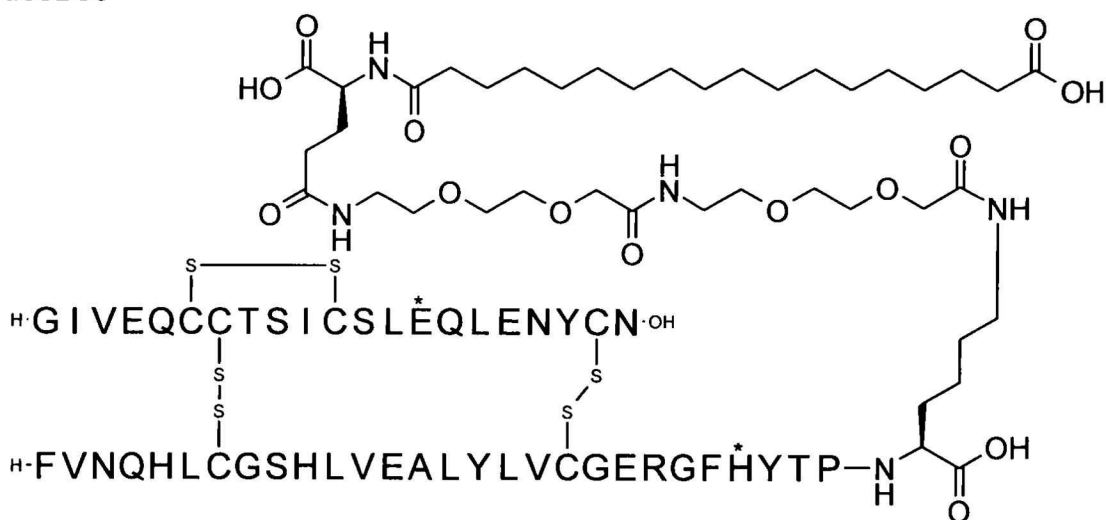


- 5 Esta insulina foi similarmente preparada como descrito acima a partir de ácido heptadecanodioico por meio de éster de mono-*tert*-butila de ácido heptadecanodioico e heptadecanodioil-L-Glu(OSu)-OtBu de *tert*-butila (preparado como descrito em WO 2006/082204).

LC-MS (eletropulverização): m/z: 1519 (M+4). Calc.: 1519.

10 EXEMPLO 9. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^ooctadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



O efeito oral deste composto em ratos Wistar machos de jejum à

noite é dado na figura 2a e figura 2b abaixo.

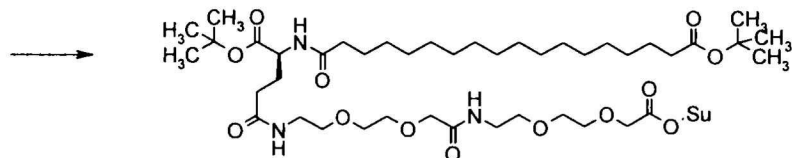
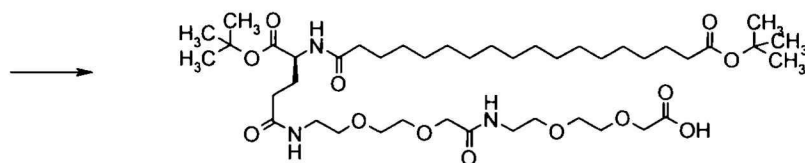
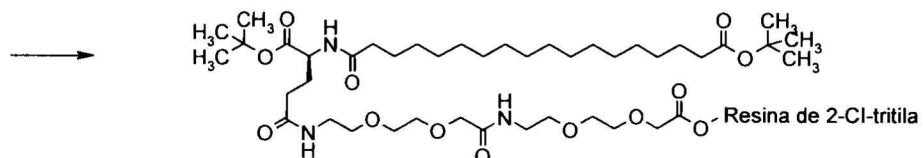
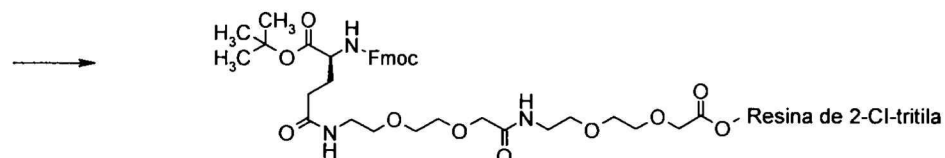
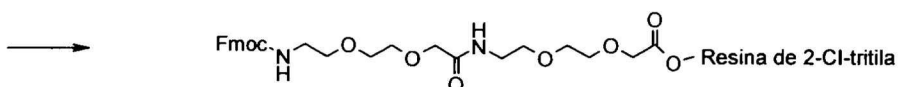
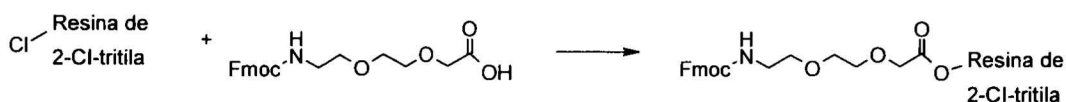
Esta insulina foi similarmente preparada como descrito acima a partir de éster de *terc*-butila de ácido 17-((S)-1-*terc*-butoxicarbonil-3-{2-[2-({2-[2-(2,5-dioxopirrolidin-1-

5 iloxicarbonilmetó-

xi)etóxi]etilcarbamoil}metóxi)etóxi]etilcarbamoil}propilcarbamoil)heptadecanoico (nome alternativo: octadecandioil-Glu(OEG-OEG-OSu)-OtBU de *terc*-butila)

LC-MS (eletropulverização): m/z: 1596 (M+4). Calc.: 1596.

10 O bloco de construção para preparação desta insulina foi preparado como descrito no seguinte:



Resina de partida: Resina de 2-clorotritila, 1,60 mmol/g.

1,0 g da resina foi intumescido por 30 min em DCM (10 ml).

1. Acilação com ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico:

0,39 g (0,63 eq, 1,0 mmol) de ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico (Fmoc-OEG-OH) foi dissolvido em DCM (15ml) e acrescentado à resina. N,N-Di-isopropiletilamina (DIEA) (0,44 ml, 2,5 mmols) foi adicionada em gotas. A mistura da reação foi submetida a vórtice durante 30 min e depois metanol (2 ml) foi adicionado e a mistura foi submetida a vórtice por um adicional de 15 min. A resina foi filtrada e lavada com NMP (2x8 ml) e DCM (8x8 ml).

20% de piperidina/NMP (8 ml) foram adicionados, repousados por 10 min repetidos uma vez. Filtrados e lavados com NMP (2x8 ml), DCM (3x8 ml), e NMP (5x8 ml). Um teste de TNBS positivo forneceu resinas vermelhas.

2. Acilação com ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico:

0,78 g (2 eq, 2,0 mmols) de ácido Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoico foi dissolvido em NMP/DCM 1:1 (10 ml). 0,28 g (2,2 eq, 2,4 mmols) de HOSu foi adicionado seguido por adição de 0,37 ml (2,2 eq, 2,4 mmols) de DIC. A mistura de reação foi deixada repousar 1 hora e depois adicionada à resina e por fim 0,407 ml (2,2 eq) de DIEA foi adicionado. A mistura foi submetida a vórtice por 16 horas, filtrada e lavada com NMP (2x8 ml), DCM (3x8 ml), e NMP (5x8 ml). Um teste de TNBS positivo forneceu resinas incolores.

20% de piperidina/NMP (10 ml) foram adicionados, repousados por 10 min repetidos uma vez. Filtrados e lavados com NMP (2x8 ml), DCM (3x8 ml), e NMP (5x8 ml). Um teste de TNBS positivo forneceu resinas vermelhas.

Acilação com Fmoc-Glu-OtBu:

0,86 g (2 eq, 2,0 mmols) de Fmoc-Glu-OtBu foi dissolvido em NMP/DCM 1:1 (10 ml). 0,32g (2,2 eq, 2,4 mmols) de HOBT foi adicionado seguido por adição de 0,37 ml (2,2 eq, 2,4 mmols) de DIC. A mistura de reação foi deixada repousar 20 min e depois transferida para a resina e por fim

0,407 ml (2,2 eq) de DIEA foi adicionado. A mistura foi submetida a vórtice por 16 horas, filtrada e lavada com NMP (2x8 ml), DCM (3x8 ml), e NMP (5x8 ml). Um teste de TNBS positivo forneceu resinas incolores.

20% de piperidina/NMP (10 ml) foram adicionados, repousados por 10 min repetidos uma vez. Filtrados e lavados com NMP (2x8 ml), DCM (3x8 ml), e NMP (5x8 ml). Um teste de TNBS positivo forneceu resinas vermelhas.

Acilação com éster de mono terc-butila de ácido octadecanodioico:

0,75 g (2 eq, 2,0 mmols) de éster de mono terc-butila de ácido octadecanodioico foi dissolvido em NMP/DCM 1:1 (10 ml). 0,32 g (2,2eq, 2,4mmols) de HOBT foi adicionado seguido por adição de 0,37 ml (2,2 eq, 2,4 mmols) de DIC. A mistura de reação foi deixada repousar 20 min e depois transferida para a resina e por fim 0,41 ml (2,2 eq) de DIEA foi adicionado. A mistura foi submetida a vórtice por 16 horas, filtrada e lavada com NMP (2x8 ml), DCM (3x8 ml), e NMP (5x8 ml).

Clivagem com TFA:

8 ml de 5% de TFA/DCM foram acrescentados à resina e a mistura de reação foi submetida a vórtice por 2 horas, filtrada e o filtrado foi colhido. Mais 5% de TFA/DCM (8 ml) foram acrescentados à resina, e a mistura foi submetida a vórtice por 10 min, filtrada e a resina foi lavada com DCM (2x10 ml). Os filtrados combinados e lavagens foram ajustados no pH para básico usando cerca de 800 ul de DIEA. A mistura foi evaporada a vácuo rendendo um óleo (3,5 g). Dietiléter (30 ml) foi adicionado e o óleo dissolvido foi separado através de decantação e evaporado a vácuo. Isto forneceu 1,1 g de éster de terc-butila de ácido 17- $\{(S)\text{-}1\text{-terc-butoxicarbonil-3-[2-(2-\{[2-(2\text{-carboximeto-xietó-xi)etilcarbamoil]metóxi}etóxi)etilcarbamoil]propilcarbamoil}\}$ heptadecanoico (nome alternativo: octadecandioil-Glu(OEG-OEG-OH)-OTBU de terc-butila) como um óleo.

LC-MS (Sciex100 API): m/z = 846,6 (M+1)+.

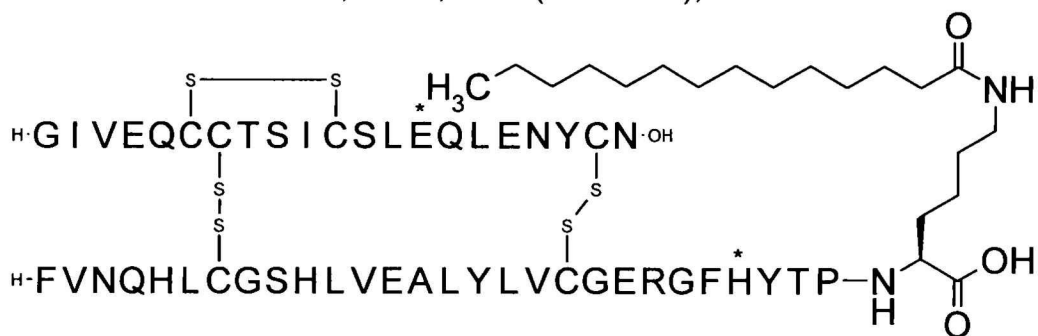
Ativação de OSu:

- O octadecandioil-Glu(OEG-OEG-OH)-OtBU de terc-butila acima (0,63 g) foi dissolvido em THF (35 ml). DIEA (0,255 ml, 2 eq.) foi adicionado seguido por TSTU (0,45 g, 2 eq.), e a mistura foi agitada em temperatura ambiente por 16 horas. A mistura foi dividida entre acetato de etila (250 ml) e NaHSO₄ aquoso (3 x 100 ml). A fase orgânica foi secada (MgSO₄) e concentrada a vácuo para fornecer 0,65 g de éster de terc-butila de ácido 17-((S)-1-terc-butoxicarbonil-3-{2-[2-({2-[2-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxicarbonilmetóxi)etóxi]etilcarbamoil}metóxi)etóxi]etilcarbamoil}propilcarbamoil)heptadecanoico (nome alternativo: octadecandioil-Glu(OEG-OEG-OSu)-OtBu de terc-butila) como um óleo.

LC-MS: m/z = 943,4 (M+1).

EXEMPLO 10. PROCEDIMENTO GERAL (A):

- 15 Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^fmiristila), desB30



Esta insulina foi similarmente preparada como descrito acima a partir de 1-tetradecanoil-pirrolidina-2,5-diona acima.

MALDI-TOF MS: m/z = 5873,6. Calc.: 5872,9.

EXEMPLO 11. PROCEDIMENTO GERAL (A):

- 20 Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^feicosanodioil-γGlu-γGlu), desB30

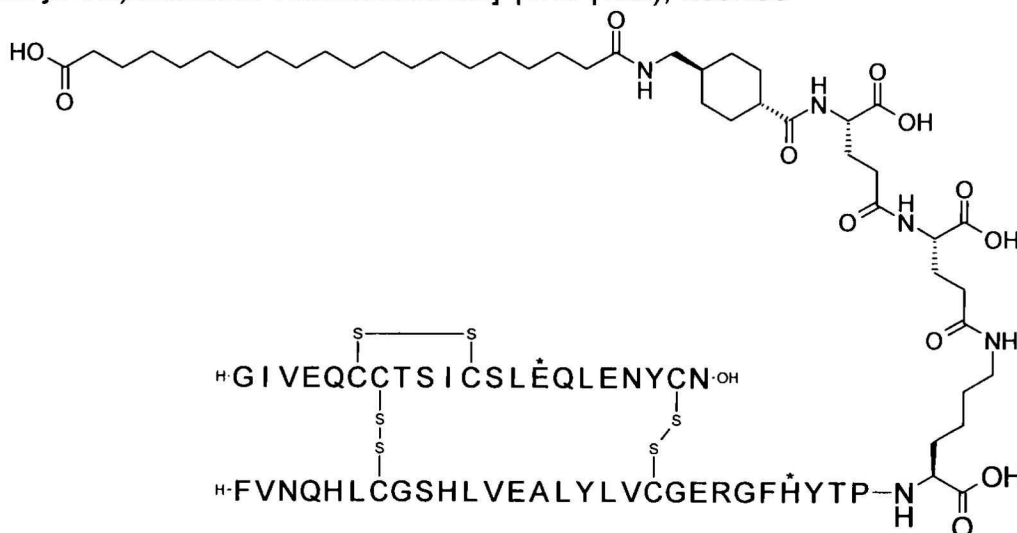
mino) butirilamino]pentanodioico

A uma solução de éster de 1-terc-butila de ácido (S)-2-[4-terc-butoxicarbonil-4-(19-terc-butoxicarbonilnonadecanoilamino)butirilamino] pentanodioico (2,81 g) em acetonitrila (80 ml) foi adicionada uma solução de
 5 TSTU (1,32 g) em acetonitrila (20 ml). O pH foi ajustado para 8 com DIPEA. Após agitar por 1,5 h, a mistura foi concentrada. O resíduo foi recristalizado de acetonitrila para dar o composto do título (1,7 g, 54%).

LC-MS: m/z = 866,4 (M+1).

EXEMPLO 12. PROCEDIMENTO GERAL (A):

10 Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^ε4-([4-({19-carboxinonadecanoila-
 mino}metil)transciclo-hexanocarbonil]-γGlu-γGlu), desB30



Esta insulina foi similarmente preparada como descrito acima a partir de éster de 5-(2,5-dioxipirrolidin-1-ila) de éster de 1-terc-butila de ácido 2-[4-terc-butoxicarbonil-4-({4-[(19-terc-butoxicarbonilnonadecanoilamino) metil]ciclo-hexanocarbonil}amino)butirilamino]pentanodioico
 15

LC-MS (eletropulverização): m/z: 6386 (M+1). Calc.: 6384.

Preparação de éster de 5-(2,5-dioxipirrolidin-1-ila) de éster de 1-terc-butila de ácido 2-[4-terc-butoxicarbonil-4-({4-[(19-terc-butoxicarbonilnona-decanoilamino)metil]ciclo-hexanocarbonil}amino)butirilamino] pentanodioico.
 20

1. Éster de 1-terc-butila de ácido 2-[4-terc-Butoxicarbonil-4-({4-[(19-terc-butoxicarbonilnonadecanoilamino)metil]ciclo-hexanocarbonil} ami-

no)butirilamino]pentanodioico

A uma solução de éster de 5-(2,5-dioxopirrolidin-1-ila) de éster de 1-terc-butila de ácido 2-({4-[(19-terc-butoxicarbonilnonadecanoilamino)metil]ciclo-hexanocarbonil}amino)pentanodioico (5,0 g) em THF (100 ml) foi
5 adicionada uma solução de H-Glu-OtBu (1,36 g) em água (25 ml). Após agitar durante a noite, a mistura foi concentrada a vácuo. O resíduo foi precipitado de água e filtrado e secado a vácuo para dar o composto do título (4,63 g, 84%).

LC-MS: m/z = 740 (M-3x56, perda de 3xt-Bu).

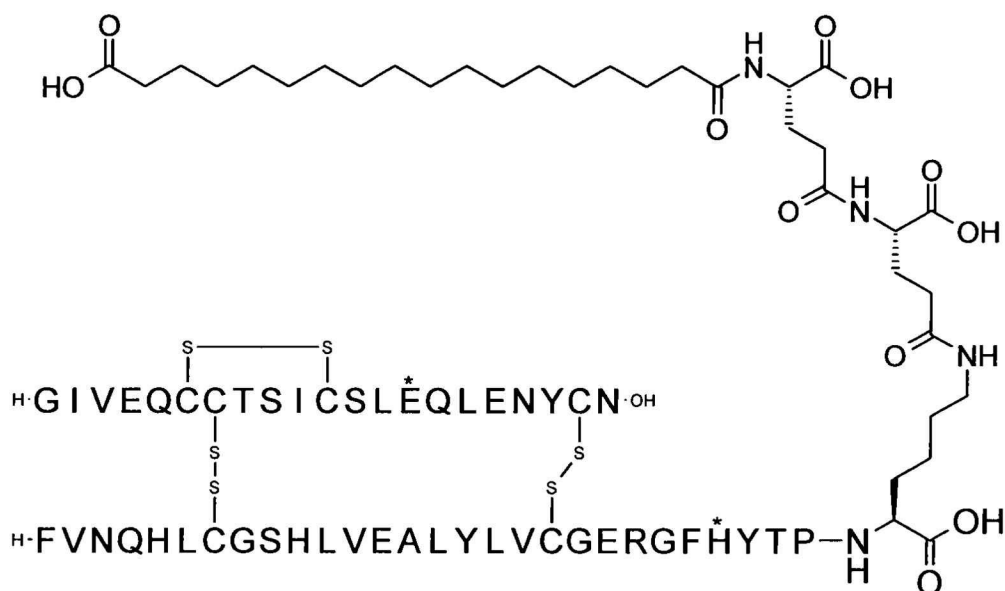
10 Éster de 5-(2,5-dioxopirrolidin-1-ila) de éster de 1-terc-butila de ácido 2-[4-terc-Butoxicarbonil-4-({4-[(19-terc-butoxicarbonilnonadecanoilamino)metil]ciclo-hexanocarbonil}amino)butirilamino]pentanodioico

A uma solução de éster de 1-terc-butila de ácido 2-[4-terc-butoxicarbonil-4-({4-[(19-terc-butoxicarbonilnonadecanoilamino)metil]ciclo-
15 hexanocarbonil}amino)butirilamino]pentanodioico (4,6 g) em THF (150 ml) foi adicionado TSTU (1,68 g). DIPEA (0,97 ml) foi adicionado. Após agitar durante a noite, a mistura foi concentrada a vácuo. O resíduo foi cristalizado de acetonitrila para fornecer o composto do título como um sólido (4,4 g, 87%)

LC-MS: m/z = 837 (M-3x56, perda de 3xt-Bu).

20 EXEMPLO 13. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^ooctadecanodioil-γGlu-γGlu), desB30

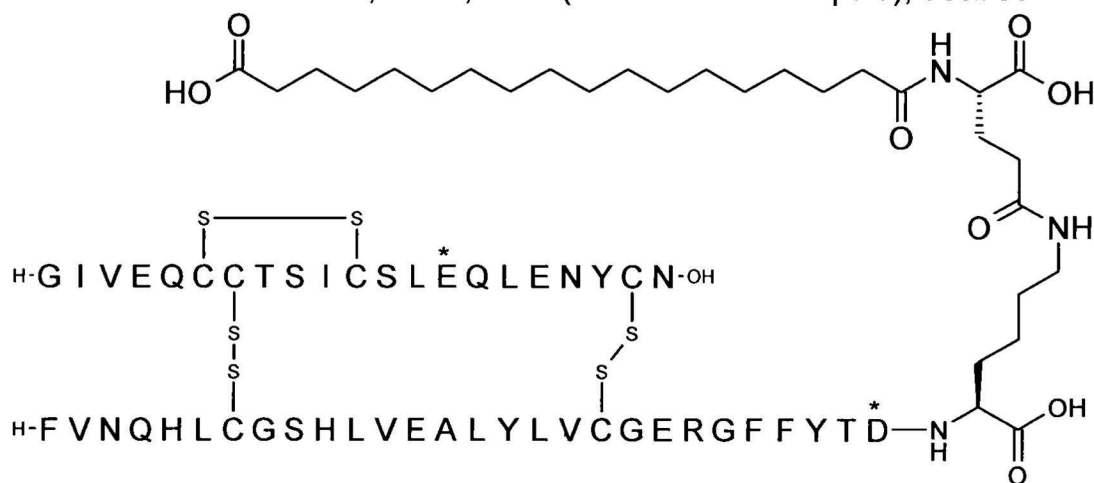


O efeito oral deste composto em ratos Wistar machos de jejum à noite é dado na figura 7 abaixo.

LC-MS: $m/z = 1555 (M+4)/4$.

EXEMPLO 14. PROCEDIMENTO GERAL (A):

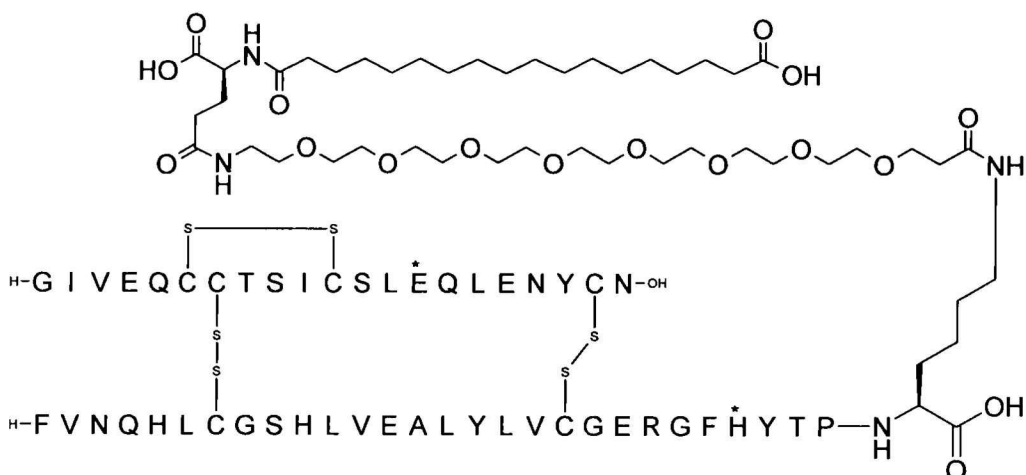
5 Insulina humana de A14E, B28D, B29K(N^{ϵ} octadecandioil- γ Glu), desB30



MALDI-TOF MS: $m/z = 6118$

EXEMPLO 15. PROCEDIMENTO GERAL (A):

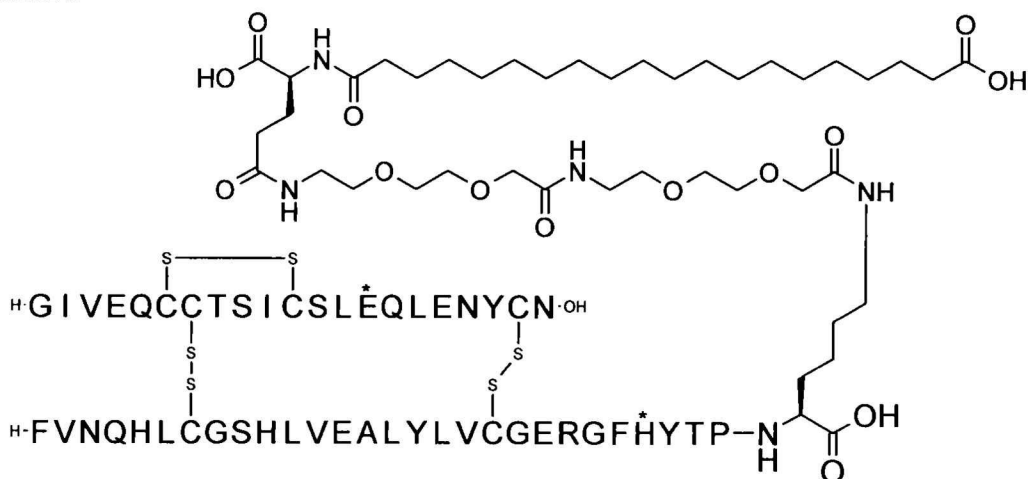
Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^{ϵ} octadecandioil- γ Glu-PEG7), desB30



MALDI-TOF MS: $m/z = 6510$

EXEMPLO 16. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^eeicosanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30

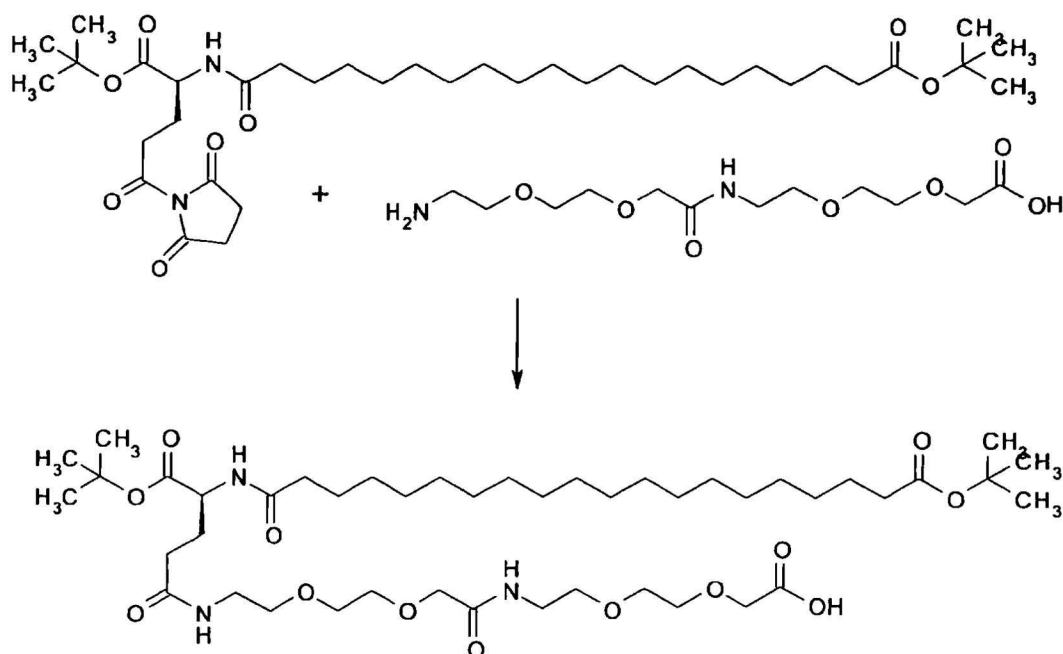


- 5 O efeito oral deste composto em ratos Wistar machos de jejum à noite é dado na figura 3 abaixo.

MALDI-TOF MS: $m/z = 6407$

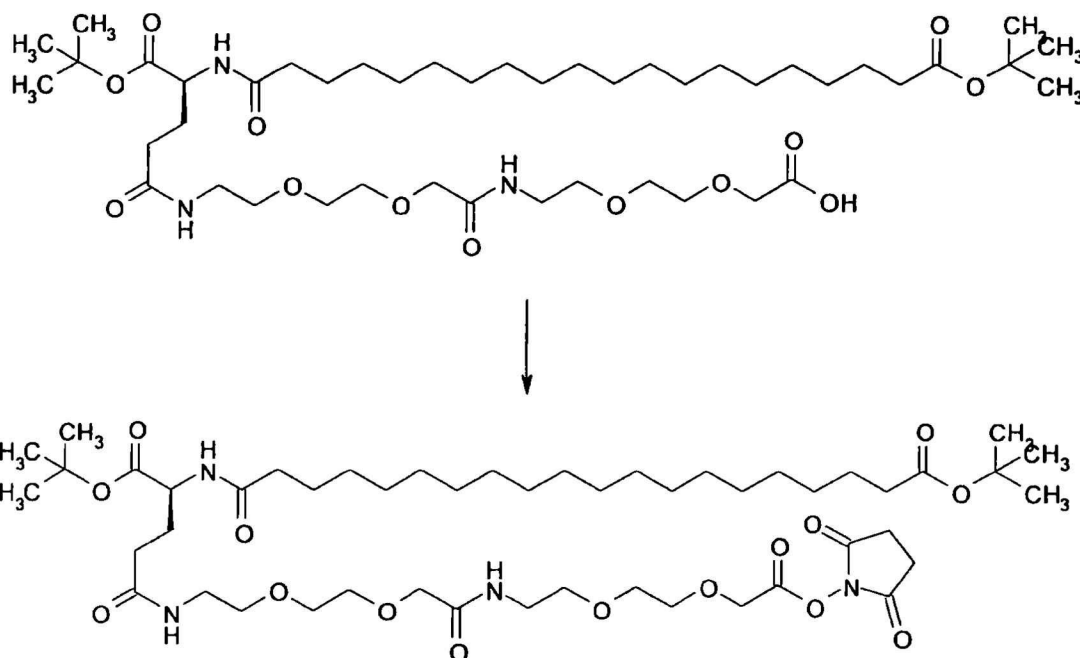
O reagente de acilação intermediário para este exemplo foi preparado como descrito no seguinte:

- 10 Etapa 1: éster de *terc*-butila de ácido 19-{(S)-1-*terc*-Butoxicarbonyl-3-[2-(2-{{2-(2-carboximethoxyethoxy)ethylcarbamoyl}-methoxy}ethoxy)ethylcarbamoyl]-propylcarbamoyl}-nonadecanoico



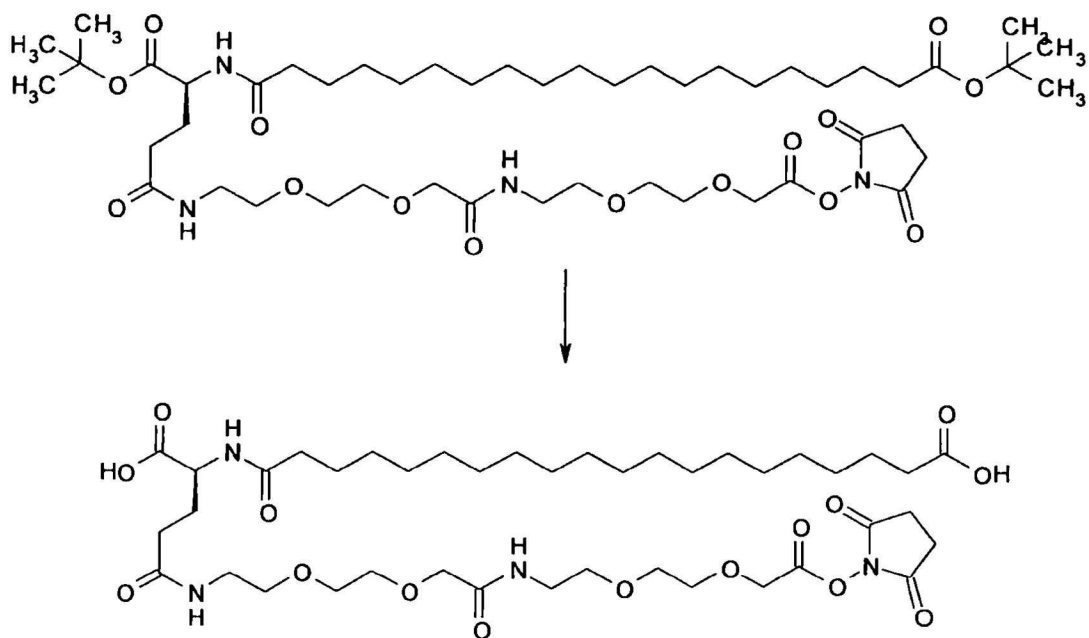
A uma solução de éster de 5-(2,5-dioxopirrolidin-1-ila) de éster de 1-*tert*-butila de ácido 2-(19-*tert*-Butoxicarbonilnonadecanoilamino) pentanodioico (2,50 g, (preparado similarmente como descrito em WO 2005/012347) e ácido [2-(2-{2-[2-(2-aminoetóxi)etóxi]acetilamino} etóxi) etóxi]acético (1,47 g, nome alternativo: dímero de ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico, IRIS Biotech GmbH, Cat. No. PEG1221) em etanol (40 ml) foi adicionado DIPEA (1,26 ml). A mistura foi agitada em temperatura ambiente durante a noite e depois concentrada a vácuo. Ao resíduo foram adicionados 0,1 N de HCl aquoso (150 ml) e acetato de etila (200 ml). As camadas foram separadas e a camada aquosa foi extraída com acetato de etila (100 ml). As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com água e salmoura, secadas (sulfato de magnésio) e concentradas a vácuo para dar um óleo, que cristalizou-se sob repouso. Rendimento 96% (3,1 g). LC-MS (eletropulverização): $m/z = 874,49$.

15 Etapa 2: éster de *tert*-butila de ácido 19-((S)-1-*tert*-Butoxicarbonil-3-{2-[2-({2-[2-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxicarbonilmetóxi)-etóxi]etilcarbamoil} metóxi)etóxi]etilcarbamoil}propilcarbamoil)nonadecanoico:



A uma solução de éster de *terc*-butila de ácido 19-((S)-1-*terc*-Butoxicarbonil-3-[2-(2-[[2-(2-carboximetoxietóxi) etilcarbamoil]metóxi] etóxi)etilcarbamoil] propilcarbamoil]nonadecanoico (3,1 g) em acetonitrila (50 ml) foram adicionados TSTU (1,39 g) e DIPEA (0,91 ml). A mistura foi agitada em temperatura ambiente durante a noite e depois concentrada a vácuo. Ao resíduo foram adicionados 0,1 N de HCl aquoso (100 ml) e acetato de etila (200 ml). As camadas foram separadas e a camada aquosa foi extraída com acetato de etila (50 ml). As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com água e salmoura, secadas (sulfato de magnésio) e concentradas a vácuo para dar um óleo. Rendimento 99% (3,4 g). LC-MS (eletropulverização): m/z: 971,8.

Etapa 3: ácido 19-((S)-1-Carbóxi-3-{2-[2-({2-[2-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxicarbonilmetóxi) etóxi]etilcarbamoil}metóxi)etóxi]etilcarbamoil} propilcarbamoil] nonadecanoico:

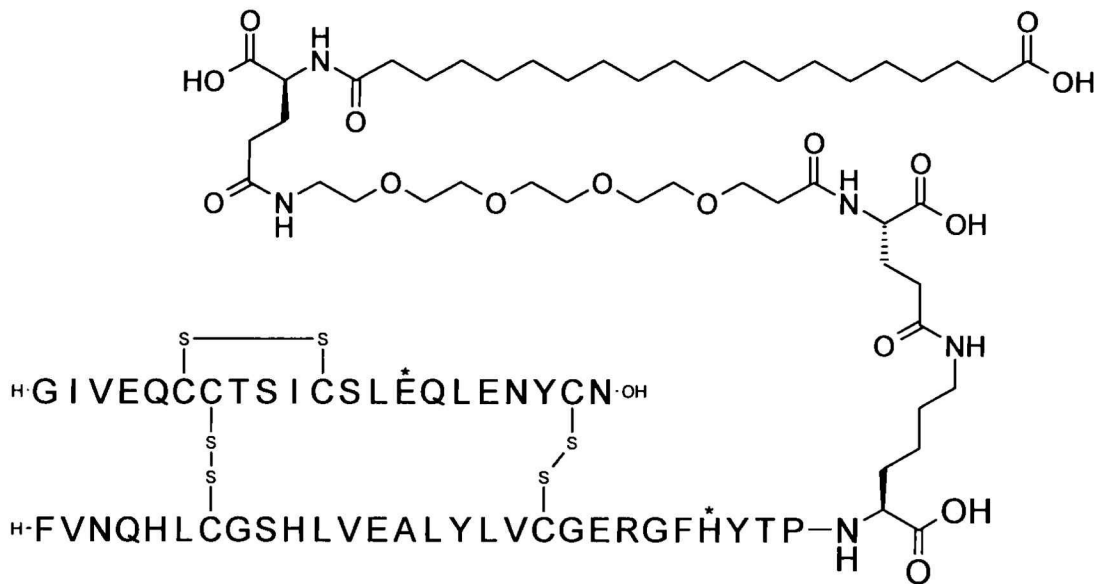


Éster de *tert*-butila de ácido 19-((S)-1-*tert*-Butoxicarbonil-3-{2-[2-({2-[2-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxicarbonilmetóxi)etóxi]etilcarbamoil} metóxi)etóxi]etilcarbamoil} propilcarbamoil)nonadecanoico (3,4 g) foi agitado em TFA (75 ml) por 45 min e depois concentrado a vácuo. O resíduo foi concentrado com tolueno 3 vezes para dar um sólido. O resíduo foi cristalizado em 2-propanol e filtrado para dar um composto cristalino branco. Rendimento 80% (2,4 g). LC-MS (eletropulverização): m/z: 859,44.

O reagente de acilação similar com o fragmento de ácido octadecanodioico (por exemplo, usado no exemplo 26 e outros exemplos) pode ser similarmente preparado.

EXEMPLO 17. PROCEDIMENTO GERAL (A):

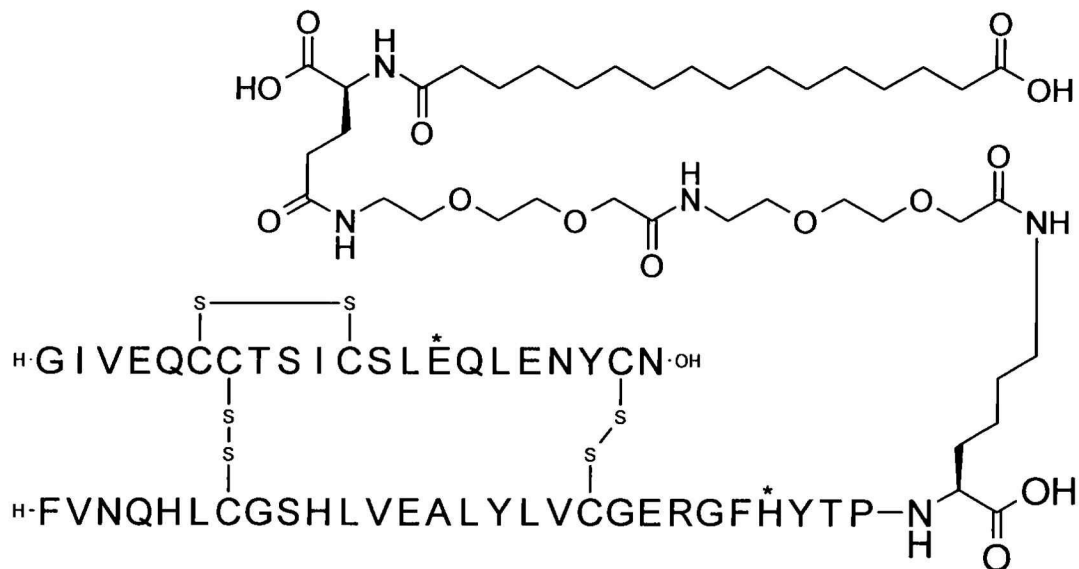
Insulina humana de A14E, B25H, B29K(*N*^εeicosanodioil-γGlu-(3-(2-{2-[2-(2-aminoetóxi)etóxi]etóxi)etóxi)propionil-γGlu), desB30



ES-MS: $m/z = 1626 (M+4)$

EXEMPLO 18. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^{ϵ} hexadecanodiol- γ Glu-OEG-OEG),
desB30

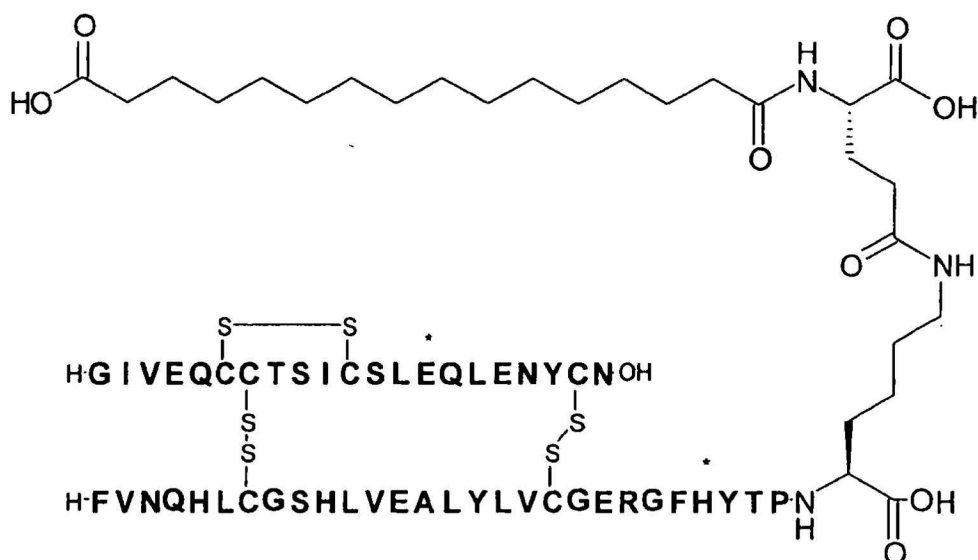


5

MALDI-TOF MS: $m/z = 6348$

EXEMPLO 19. PROCEDIMENTO GERAL (A):

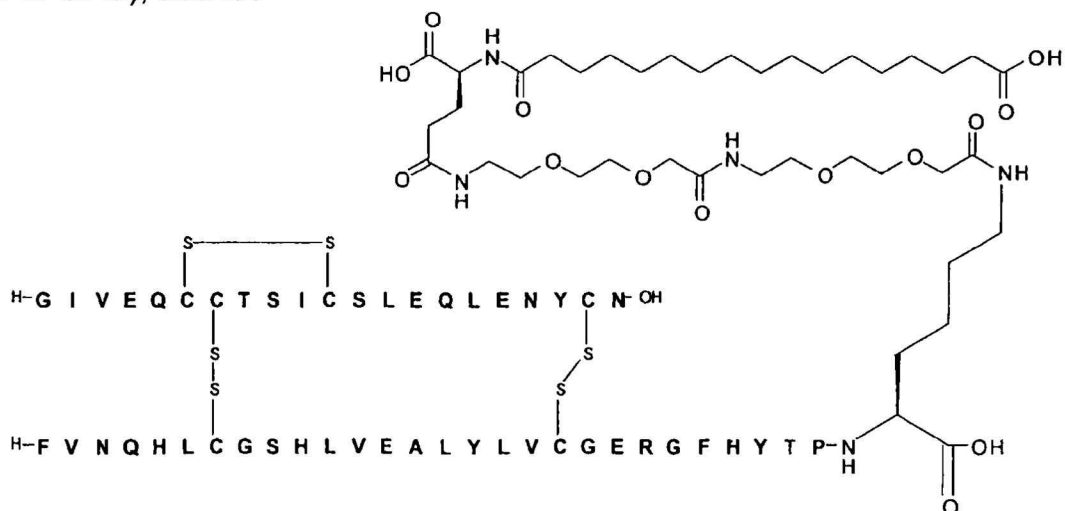
Insulina humana de A14E, B25H, B29K(n^{ϵ} hexadecanodiol- γ Glu),
desB30



MALDI-TOF MS: $m/z = 6062$

EXEMPLO 20. PROCEDIMIENTO GERAL (A):

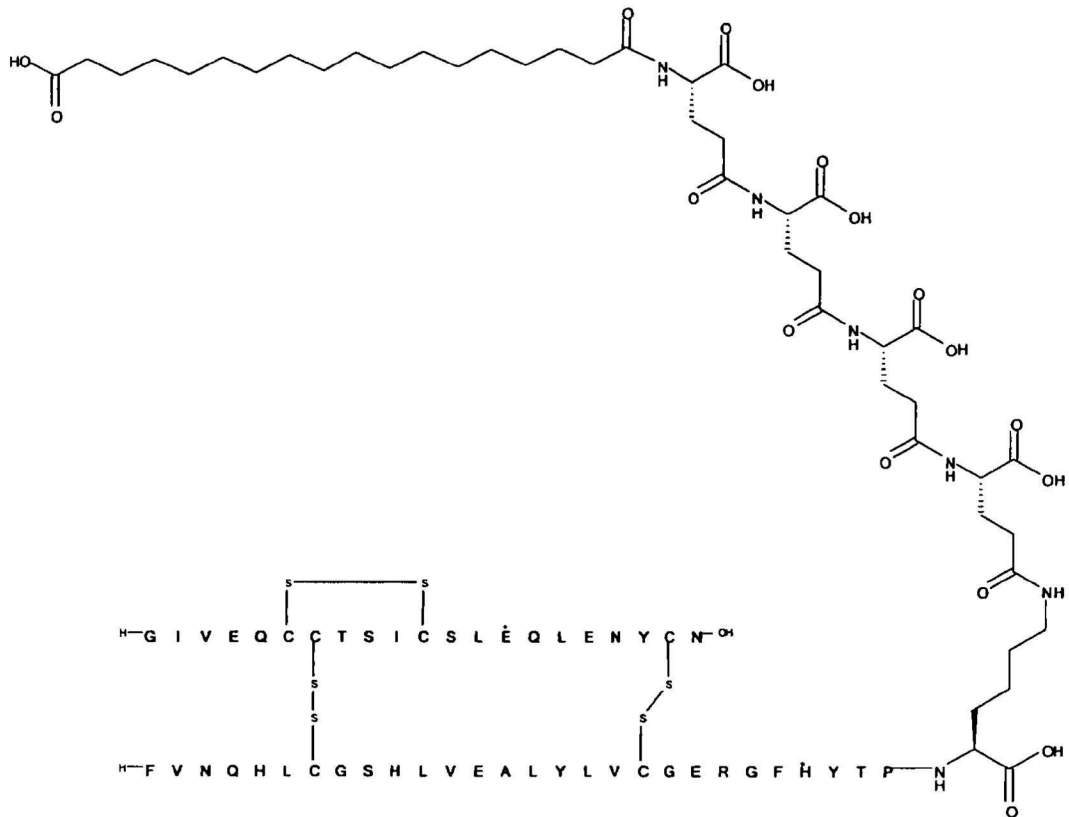
Insulina humana de A14E, B25H, B29K(*N*^εheptadecanodioil- γ Glu-OEG-OEG), desB30



5 ES-MS: $m/z = 1592 (M+4)$

EXEMPLO 21. PROCEDIMIENTO GERAL (A):

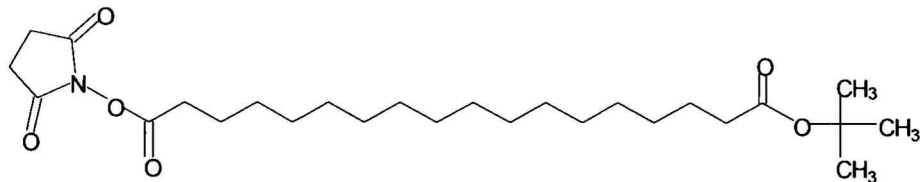
Insulina humana de A14E, B25H, B29K(*N*^εoctadecanodioil- γ Glu - γ Glu - γ Glu), desB30



ES-MS: $m/z = 1620 (M+4)$

O reagente de acilação intermediário octadecanodioil- γ Glu - γ Glu - γ Glu - γ Glu-OSu (com ésteres de terc-butila como grupos de proteção em ácidos carboxílicos restantes) foi preparado como descrito abaixo:

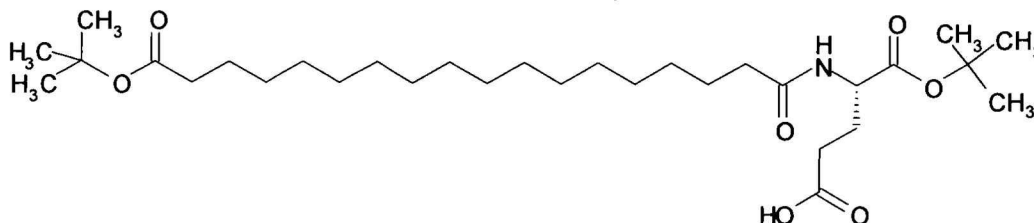
5 ÉSTER DE 2,5-DIOXOPIRROLIDIN-1-ILA DE ÉSTER DE TERC-BUTILA DE ÁCIDO OCTADECANODIOICO



10 Éster de mono-terc-butila de ácido octadecanodioico (4,2 g, 0,011 mol) foi dissolvido em THF (20 mL), TSTU (4 g, 0,013 mol) em acetonitrila (20 ml) foi adicionado e pH da solução foi ajustado para 8 com a adição em gotas de DIPEA. A mistura foi agitada em TA por 4 h, depois acidificada com HCl (2M) para pH 3 e evaporada a vácuo. O óleo residual foi subsequentemente dividido entre acetato de etila e HCl (0,1 M). A camada orgânica foi secada ($MgSO_4$), filtrada e evaporada à secra a vácuo. Isto for-

neceu 5,2 g de éster de 2,5-dioxopirrolidin-1-ila de éster de *terc*-butila de ácido octadecanodioico como um óleo que poderia ser usado na próxima etapa sem outra purificação. LC-MS (eletropulverização): $m/z = 468 (M+1)$ e $412 (M+1-{}^t\text{Bu})$.

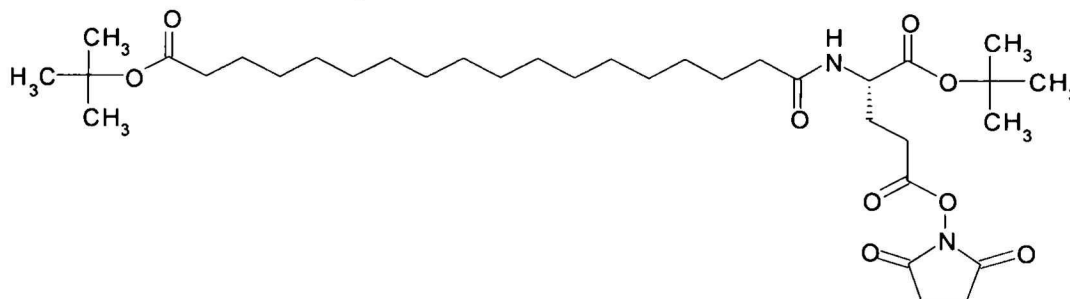
5 ÉSTER DE 1-TERC-BUTILA DE ÁCIDO (S)-2-(17-TERC-BUTOXARBONIL-HEPTADECANOILAMINO)-PENTANODIOICO.



Éster de 2,5-dioxopirrolidin-1-ila de éster de *terc*-butila de ácido octadecanodioico (7 g, 0,015 mol) foi dissolvido em THF (80 ml) e adicionado a uma solução de H-Glu-O^tBu (3,7 g, 0,0165 mol) em Na₂CO₃ (0,1 M, 40 ml). A mistura foi agitada em TA durante a noite, depois acidificada com HCl (2M) para pH 3 e evaporada a vácuo. O resíduo foi dividido entre acetato de etila e HCl (0,1 M). A camada orgânica foi secada (MgSO₄), filtrada e evaporada à secura a vácuo. Adição de acetonitrila (30 ml) causou a formação de um precipitado branco que foi isolado através de filtração e secado para fornecer 3,75 g de éster de 1-*terc*-butila de ácido (S)-2-(17-*terc*-butoxarbonil-heptadecanoilamino)pentanodioico. LC-MS (eletropulverização): $m/z = 556 (M+1)$.

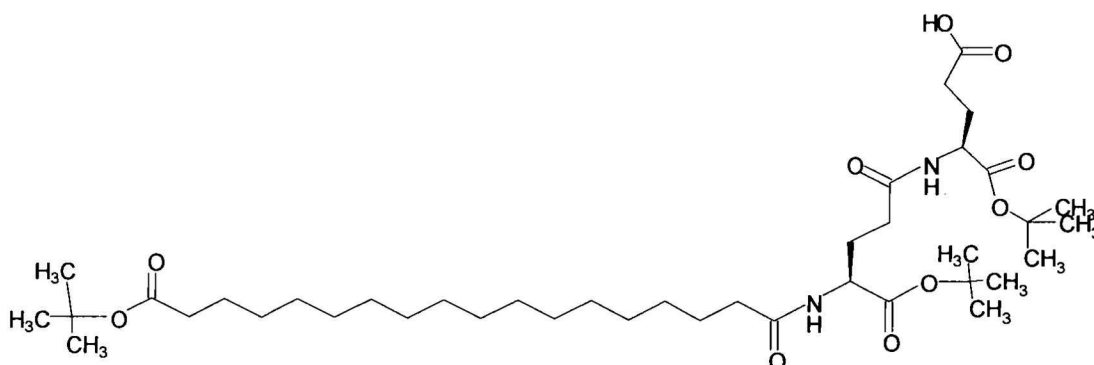
Sob evaporação do filtrado de acetonitrila mais 2,6 g de produto foram isolados.

20 ÉSTER DE 5-(2,5-DIOXOPIRROLIDIN-1-ILA) DE ÉSTER DE 1-TERC-BUTILA) DE ÁCIDO (S)-2-(17-TERC-BUTOXICARBONIL-HEPTADECANOILAMINO)PENTANODIOICO



Éster de 1-*terc*-butila de ácido (S)-2-(17-*terc*-Butoxarbonil-heptadecanoilamino)pentanodioico (3g, 0,005 mol) foi dissolvido em THF (100 ml) e adicionado a uma solução de TSTU (1,78 g, 0,006 mol) em acetonitrila (30 ml). O pH foi ajustado para 8 pela adição a gotas de DIPEA. A
 5 mistura foi agitada em TA por 1h, depois acidificada com HCl (2M) para pH 3 e evaporada a vácuo. O óleo residual foi subsequentemente dividido entre acetato de etila e HCl (0,1 M). A camada orgânica foi secada (MgSO₄), filtrada e evaporada a vácuo à secura. Isto forneceu um sólido branco (2,75 g) de
 10 éster de 5-(2,5-dioxopirrolidin-1-ila) de éster de 1-*terc*-butila de ácido (S)-2-(17-*terc*-butoxicarbonil-heptadecanoilamino)-pentanodioico. LCMS (eletropulverização): m/z = 653 (M+1).

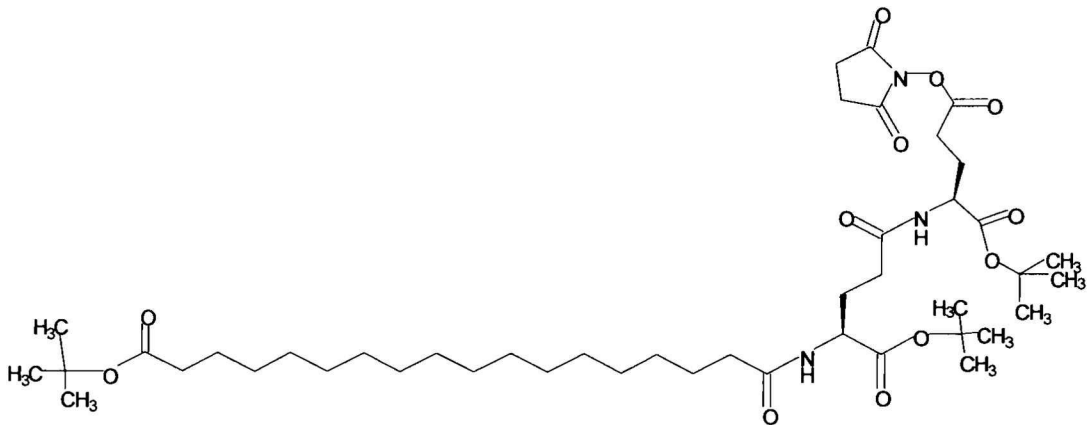
ÉSTER DE 1-TERC-BUTILA DE ÁCIDO (S)-2-[(S)-4-TERC-BUTOXICARBONIL-4-(17-TERC-BUTOXICARBONIL-HEPTADECANOILAMINO)BUTIRILAMINO]-PENTANODIOICO



15 Éster de 5-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-ila) de éster de 1-*terc*-butila de ácido (S)-2-(17-*terc*-Butoxicarbonil-heptadecanoilamino)pentanodioico (0,5 g, 0,766 mmol) foi dissolvido em acetonitrila (20 ml). Esta solução foi acrescentada a uma solução de H-Glu-OtBu (0,171g, 0,84 mmol) em água (30 ml), pH foi ajustado para 10 com DIPEA. A mistura foi agitada em TA por 15 min,
 20 depois acidificada em pH 7 com HCl (2M) e evaporada a vácuo. O resíduo foi dividido entre acetato de etila e HCl (0,1 M). A camada orgânica foi seca (MgSO₄), filtrado, e evaporada a vácuo à secura. Isto rendeu éster de 1-*terc*-butila de ácido (S)-2-[(S)-4-*terc*-butoxicarbonil-4-(17-*terc*-butoxicarbonil-heptadecanoilamino)butirilamino]pentanodioico como um óleo. LC-MS (ele-

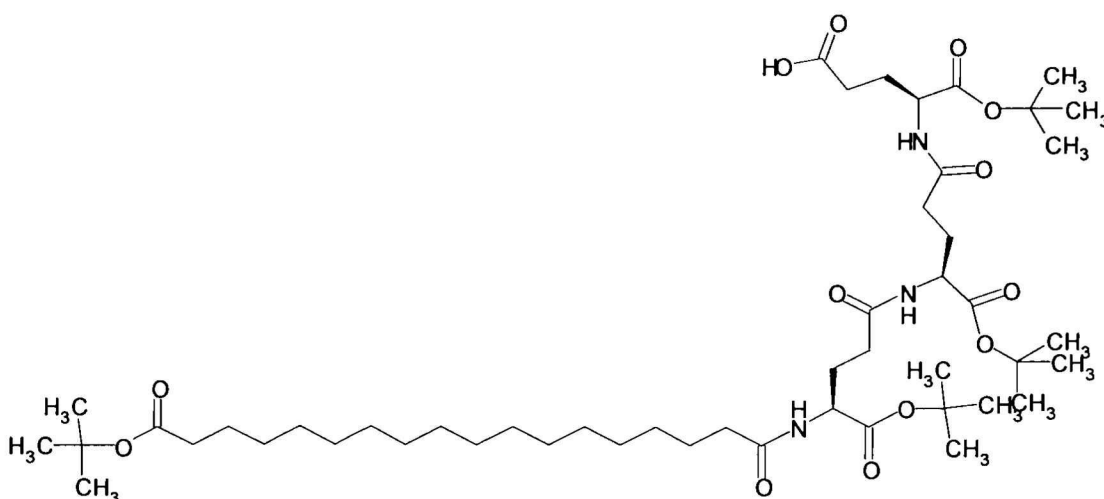
tropulverização): $m/z = 741$ ($M+1$).

ÉSTER DE 1-(2,5-DIOXOPIRROLIDIN-1-ILA) DE ÉSTER DE 5-
 TERC-BUTILA DE ÁCIDO (S)-2-[(S)-4-TERC-BUTOXICARBONIL-4-(17-
 TERC-BUTOXICARBONIL-HEPTADECANOILAMINO)BUTIRILAMINO]-
 5 PENTANODIOICO



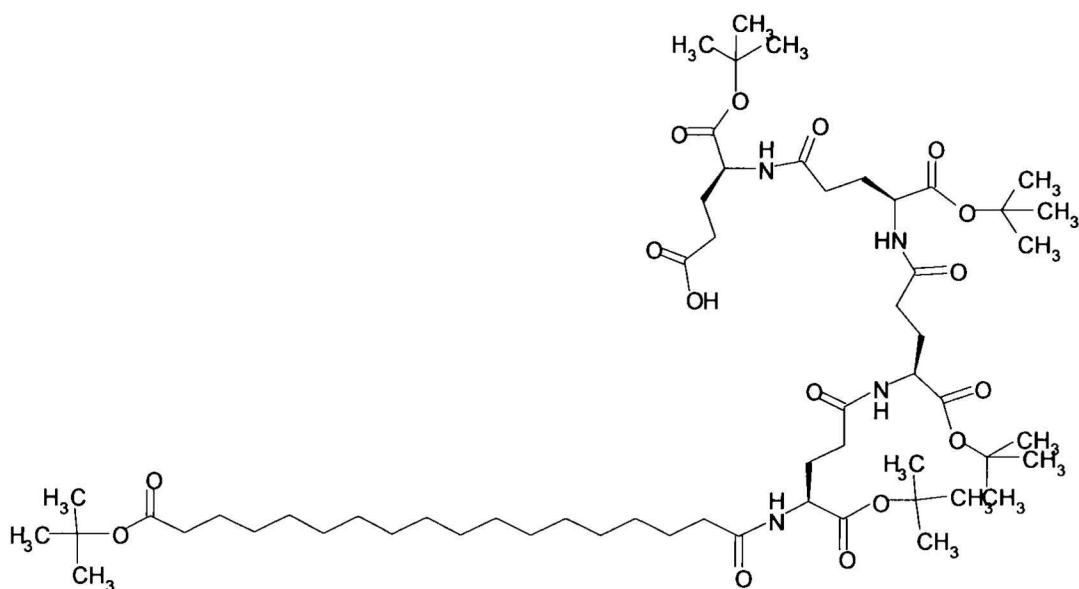
Éster de 1-*tert*-butila de ácido (S)-2-[(S)-4-*tert*-Butoxicarbonil-4-
 (17-*tert*-butoxicarbonil-heptadecanoilamino)butirilamino]-pentanodioico (8g,
 10,79 mmol) foi dissolvido em acetonitrila (40 ml) e uma solução de TSTU
 (3,89 g, 12,95 mmol) em acetonitrila (40 ml) foi adicionada. O pH foi ajustado
 para 8 pela adição em gotas de DIPEA. A mistura foi agitada em TA por 1 h,
 depois acidificada com HCl (2M) para pH 3 e evaporada a vácuo. Isto forne-
 ceu um óleo que foi subsequentemente dividido entre acetato de etila e HCl
 (0,1 M). A camada orgânica foi secada ($MgSO_4$), filtrada e evaporada à se-
 cura a vácuo. Isto forneceu 8,2 g de éster de 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-ila) de
 éster de 5-*tert*-butila de ácido (S)-2-[(S)-4-*tert*-butoxicarbonil-4-(17-*tert*-
 butoxycarbonil-heptadecanoilamino)-butirilamino]pentanodioico como um só-
 lido.

ÉSTER DE 1-TERC-BUTILA DE ÁCIDO (S)-2-[(S)-4-TERC-
 BUTOXICARBONIL-4-[(S)-4-TERC-BUTOXICARBONIL-4-(17-TERC-
 BUTOXICARBONIL-HEPTADECANOILAMINO) BUTIRILAMINO] BUTIRI-
 LAMINO} PENTANODIOICO



Éster de 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-ila) de éster de 5-terc-butila de ácido (S)-2-[(S)-4-terc-Butoxicarbonil-4-(17-terc-butoxicarbonil-heptadecanoila-mino)butirilamino]-pentanodioico (4g, 4,77 mmols) foi dissolvido em acetonitrila (30 ml) e adicionado a uma solução de H-Glu-OtBu (1,07 g, 5,25 mmols) em Na₂CO₃ (0,1 M, 20 ml). A mistura foi agitada em TA por 1 h, depois neutralizada com HCl (2M) para pH 7 e evaporada a vácuo. O óleo residual foi subseqüentemente dividido entre acetato de etila e HCl (0,1 M). A camada orgânica foi secada (MgSO₄), filtrada e evaporada à secura a vácuo. O resíduo (4 g) foi dissolvido em acetonitrila e tratado com carbono ativo. Após filtração e evaporação para secura seguida por secagem durante a noite a vácuo, 2,8 g de éster de 1-terc-butila de ácido (S)-2-[(S)-4-terc-Butoxicarbonil-4-[(S)-4-terc-butoxicarbonil-4-(17-terc-butoxicarbonil-heptadecanoilamino)butirilamino]butirilamino}pentanodioico que foi obtido como um sólido cristalino. LC-MS (eletropulverização): m/z = 927 (M+1).

15 ÉSTER DE 1-TERC-BUTILA DE ÁCIDO (S)-2-[(S)-4-TERC-BUTOXICARBONIL-4-[(S)-4-TERC-BUTOXICARBONIL-4-[(S)-4-TERC-BUTOXICARBONIL-4-(17-TERC-BUTOXICARBONIL-HEPTADECANOILAMINO)BUTIRILAMINO]BUTIRILAMINO}BUTIRILAMINO)-PENTANO-DIOICO

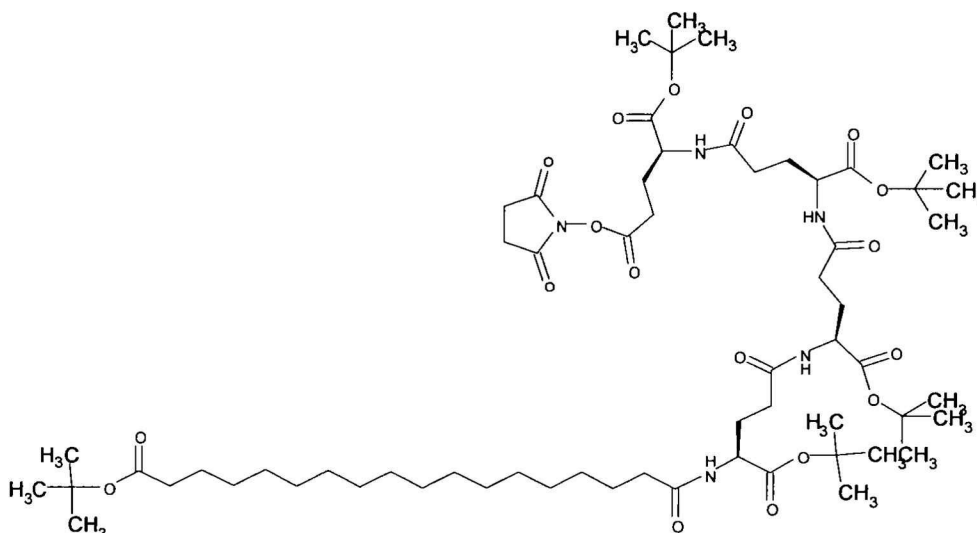


Éster de 1-*terc*-butila de ácido (S)-2-[(S)-4-*terc*-Butoxicarbonil-4-[(S)-4-*terc*-butoxicarbonil-4-(17-*terc*-butoxicarbonil-heptadecanoilamino) butirilamino] butirilamino]pentanodioico (2,8 g, 3,02 mmols) foi ativado com TS-TU (1,0 g, 3,325 mmols) usando o mesmo método como descrito acima, enquanto fornecendo éster de 5-(2,5-dioxopirrolidin-1-ila) de éster de 1-*terc*-butila de ácido (S)-2-[(S)-4-*terc*-butoxicarbonil-4-[(S)-4-*terc*-butoxicarbonil-4-(17-*terc*-butoxicarbonil-heptadecanoilamino)-butirilamino]butirilamino]-pentanodioico bruto. LC-MS (eletropulverização): $m/z = 1024 (M+1)$.

1,3 g deste composto foi dissolvido em acetonitrila (40 ml) e adicionado a uma solução de H-Glu-O^tBu (0,28 g, 1,39 mmol) em água (30 ml), pH foi ajustado para 9,3 com DIPEA. A mistura foi agitada em TA por 2 h, depois neutralizada em pH 7 com HCl (2M) e depois evaporada a vácuo à quase *secura*. O resíduo foi tratado com água que dá um precipitado branco que foi filtrado. Após secar a vácuo durante a noite, 1,1 g de éster de 1-*terc*-butila de ácido (S)-2-[(S)-4-*terc*-butoxicarbonil-4-[(S)-4-*terc*-butoxicarbonil-4-[(S)-4-*terc*-butoxicarbonil-4-(17-*terc*-butoxicarbonil-heptadecanoilamino)butirilamino]butirilamino]butirilamino]butirilamino]pentanodioico foi isolado, contendo quantidades secundárias de material de partida. LC-MS (eletropulverização): $m/z = 1111,9 (M+1)$.

ÉSTER DE 1-*TERC*-BUTILÉSTER-5-(2,5-DIOXOPIRROLIDIN-1-

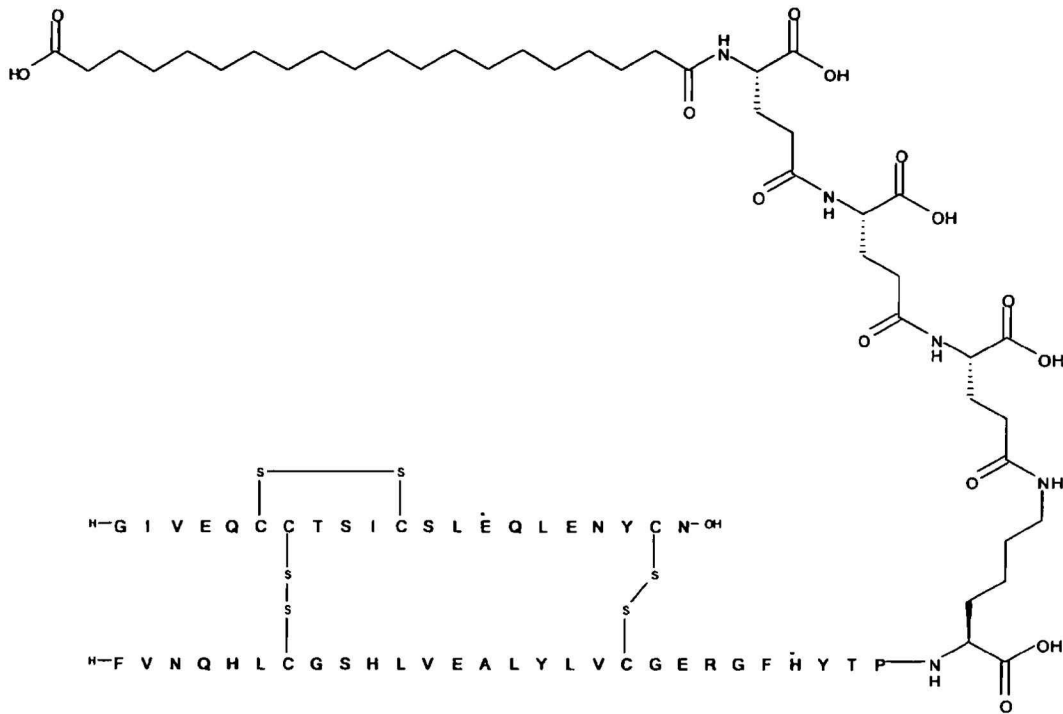
ILA) DE ÁCIDO (S)-2-((S)-4-*TERC*-BUTOXICARBONIL-4-((S)-4-*TERC*-BUTOXICARBONIL-4-[(S)-4-*TERC*-BUTOXICARBONIL-4-(17-*TERC*-BUTOXICARBONIL-HEPTADECANOILA-MINO)BUTIRILAMINO]BUTIRILAMINO) BUTIRILAMINO)-PENTANODIOICO



5 Éster de 1-*terc*-butila de ácido (S)-2-((S)-4-*terc*-Butoxicarbonil-4-
 - - - - - {(S)-4-*terc*-butoxicarbonil-4-[(S)-4-*terc*-butoxicarbonil-4-(17-*terc*-butoxicar-
 - - - - - bonil-heptadecanoilamino)butirilamino]butirilamino} butirilamino)pentanodii-
 - - - - - co (0,1g, 0,09 mmol) foi ativado com TSTU (29,8 mg, 0,099 mmol) em solu-
 - - - - - ção de acetonitrila em TA por 1h usando o mesmo método para ativação e
 10 processamento como descrito acima. Isto forneceu 100 mg de produto ativa-
 do bruto que poderia ser usado como tal para acilação de insulina sem outra
 purificação. LC-MS (eletropulverização): m/z = 1208 (M+1).

EXEMPLO 22. PROCEDIMENTO GERAL (A):

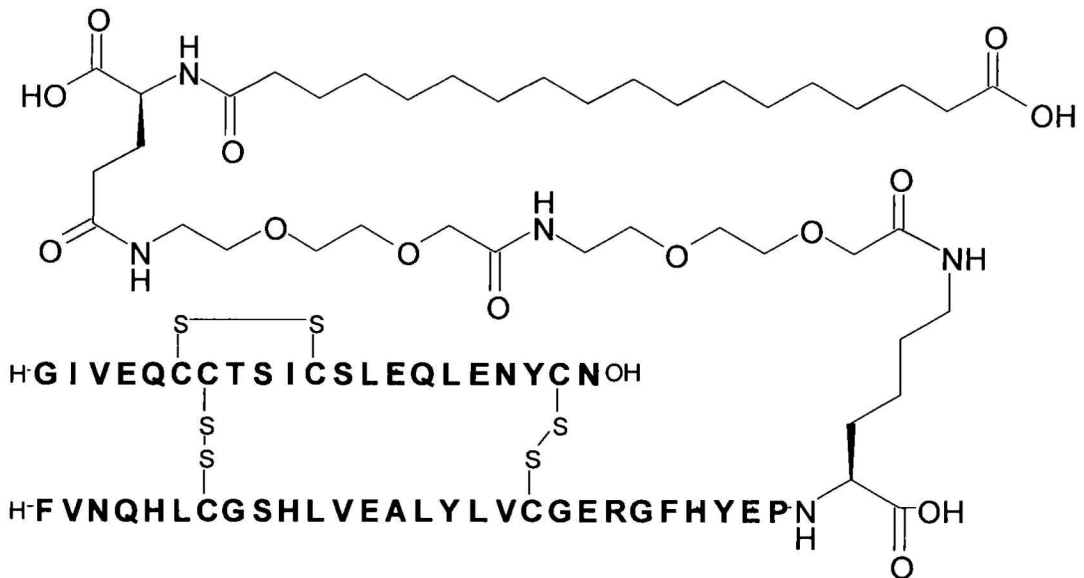
15 Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^εeicosanodioil-γGlu-
 γGlu-γGlu), desB30



MALDI-TOF MS: $m/z = 6373$

EXEMPLO 23. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, B27E, B29K(*N*^ooctadecanodioil- γ Glu-OEG-OEG), desB30

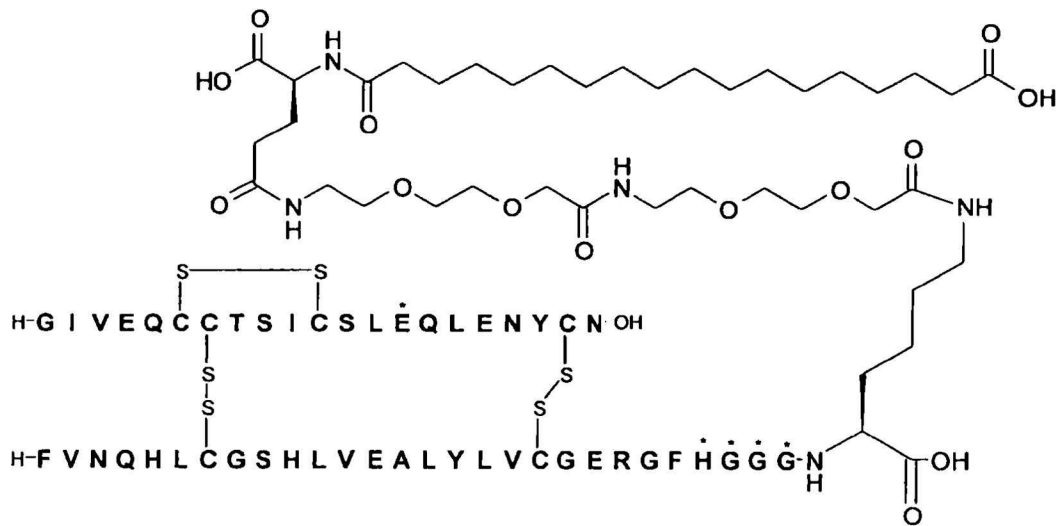


5

MALDI-TOF MS: $m/z = 6407$

EXEMPLO 24. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29K(*N*^ooctadecanodioil- γ Glu-OEG-OEG), desB30

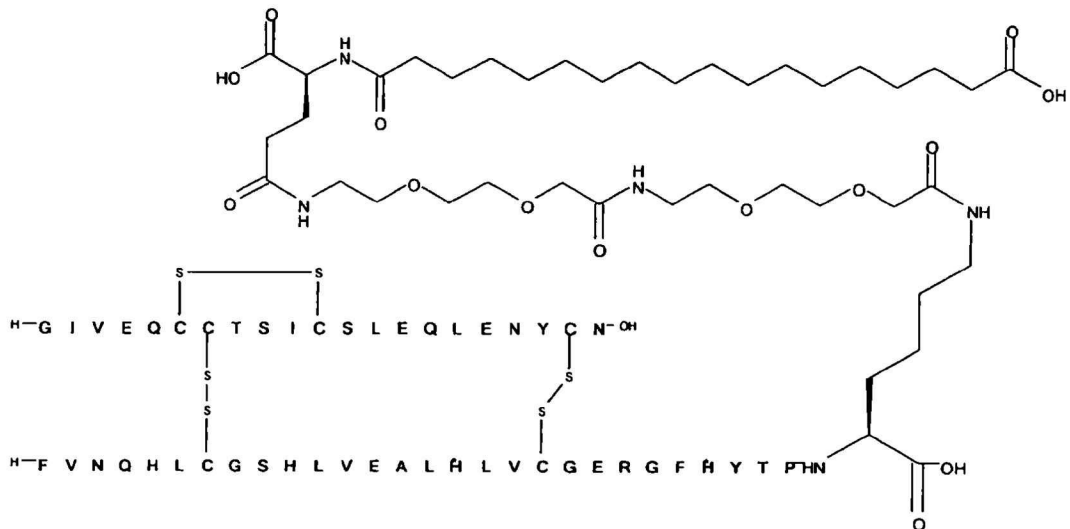


O efeito oral deste composto em ratos Wistar machos de jejum à noite é dado na figura 6 abaixo.

MALDI-TOF MS: $m/z = 6188$

EXEMPLO 25. PROCEDIMENTO GERAL (A):

- 5 Insulina humana de A14E, B16H, B25H, B29K(N^{e} octadecanoil- γ Glu-OEG-OEG), desB30

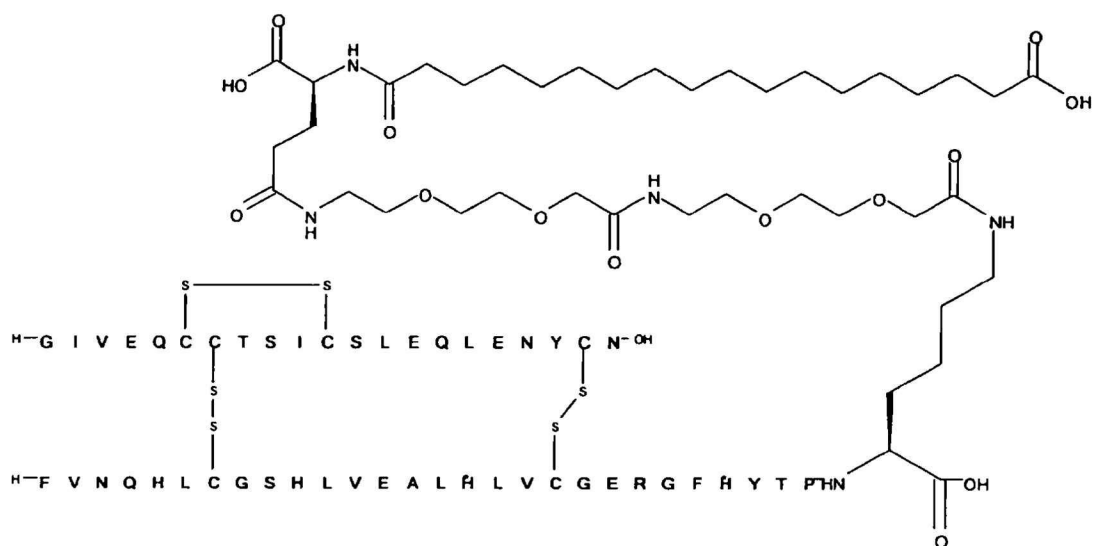


O efeito oral deste composto em ratos Wistar machos de jejum à noite é dado na figura 4 abaixo.

MALDI-TOF MS: $m/z = 6352$

- 10 EXEMPLO 26. PROCEDIMENTO GERAL (A):

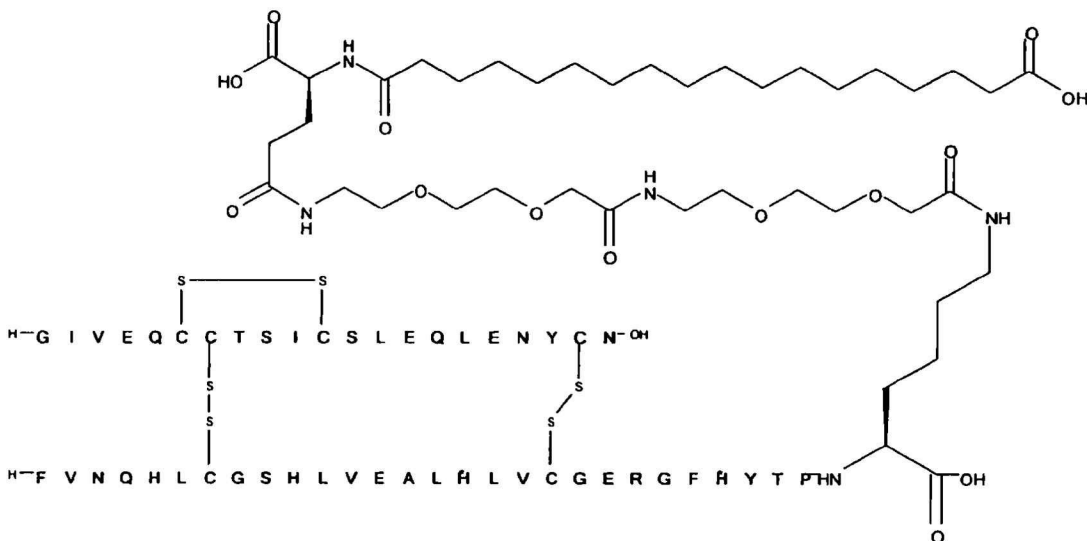
Insulina humana de A14E, B16E, B25H, B29K(N^{e} octadecanoil- γ Glu-OEG-OEG), desB30



MALDI-TOF MS: $m/z = 6345$

EXEMPLO 27. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B16H, B25H, B29K(N^{e} hexadecanodioil- γ Glu), desB30

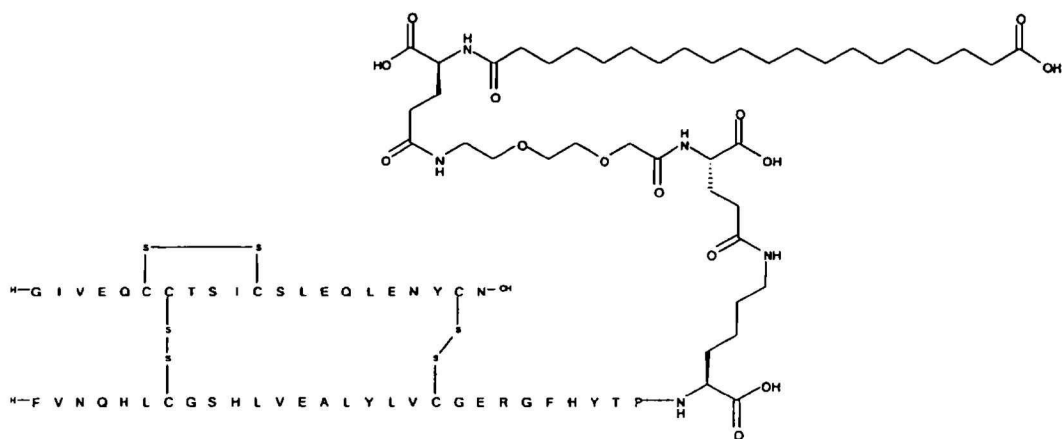


- 5 O efeito oral deste composto em ratos Wistar machos de jejum à noite é dado na figura 5 abaixo.

MALDI-TOF MS: $m/z = 6041$

EXEMPLO 28. PROCEDIMENTO GERAL (A):

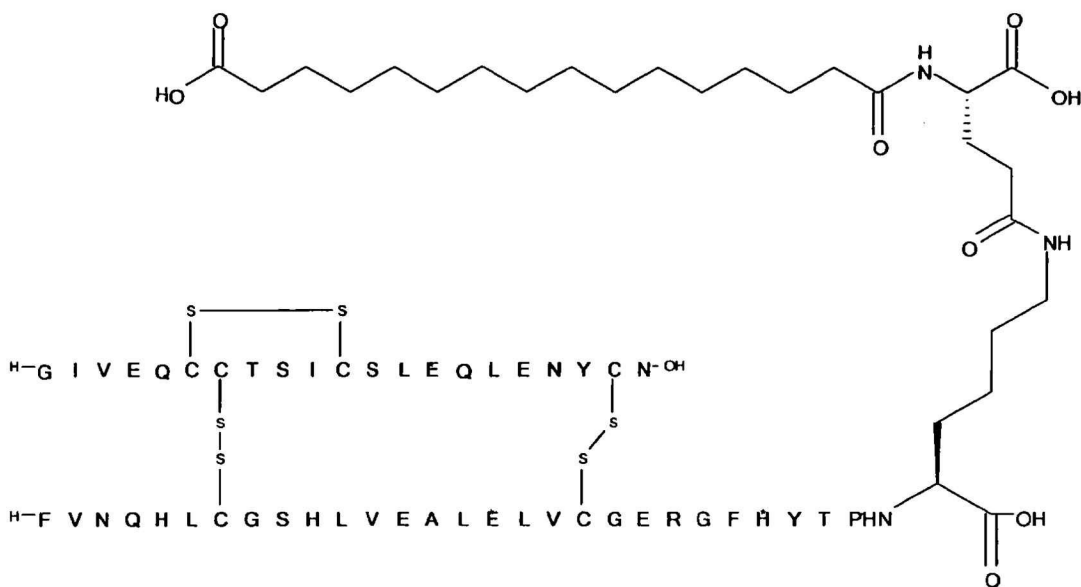
- 10 Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^{e} eicosanodioil- γ Glu-OEG - γ Glu), desB30



ES-MS: $m/z = 1598 (M+4)$

EXEMPLO 29. PROCEDIMENTO GERAL (A):

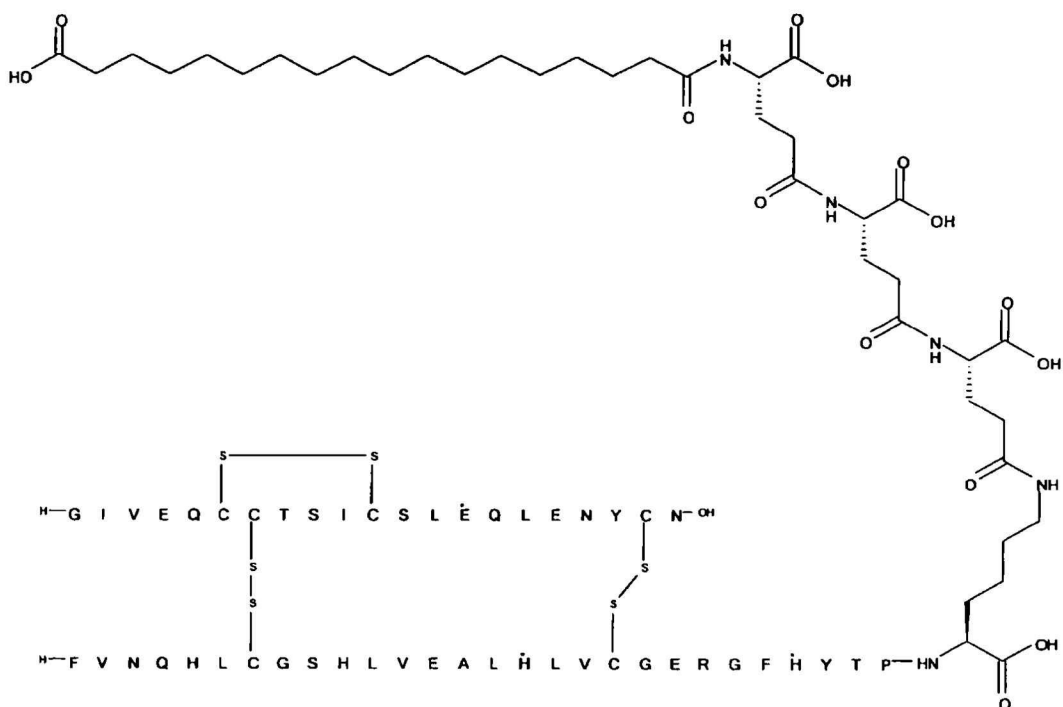
Insulina humana de A14E, B16E, B25H, B29K(N^{ϵ} hexadecandioil- γ Glu), desB30



5 MALDI-TOF MS: $m/z = 6028$

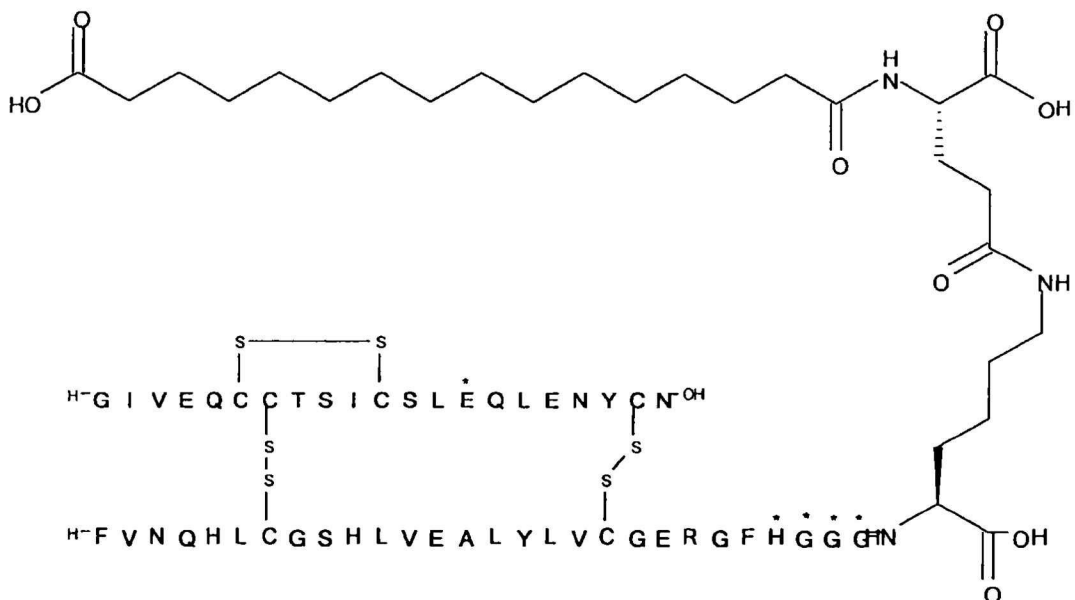
EXEMPLO 30. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B16H, B25H, B29K(N^{ϵ} octadecandioil- γ Glu - γ Glu - γ Glu), desB30



EXEMPLO 31. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29K(*N*^ohexadecandioil-γGlu), desB30

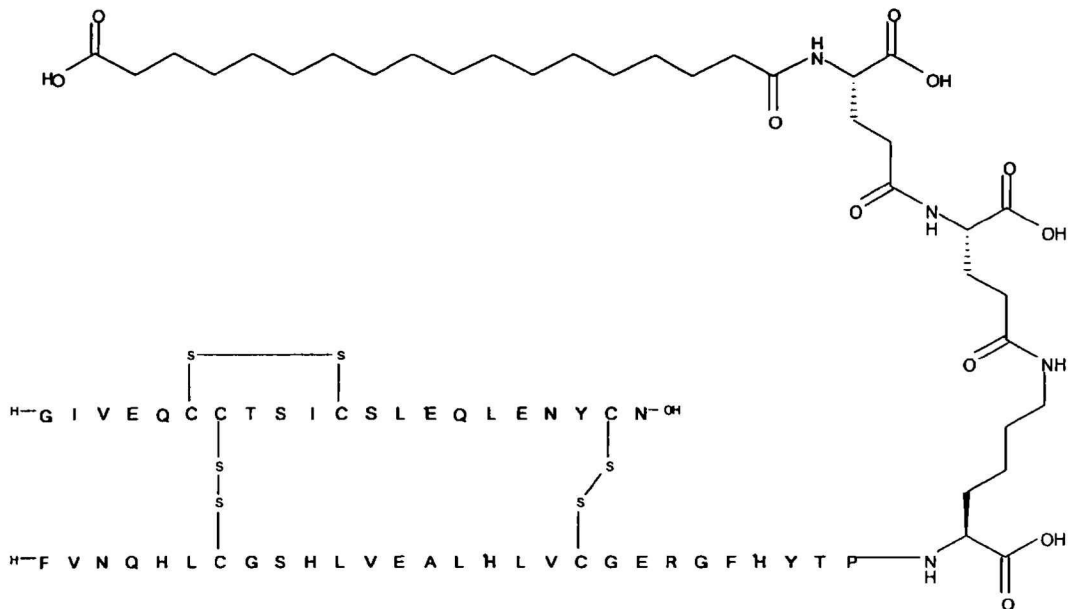


5

EXEMPLO 32. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B16H, B25H, B29K(*N*^ooctadeca-

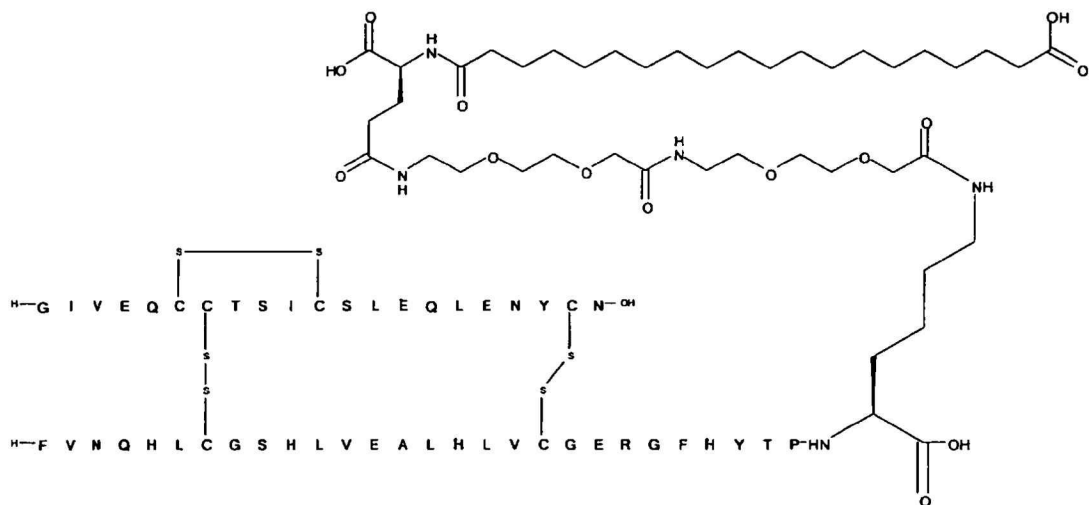
nodioil- γ Glu - γ Glu), desB30



ES-MS: $m/z = 1548 (M+4)$

EXEMPLO 33. PROCEDIMENTO GERAL (A):

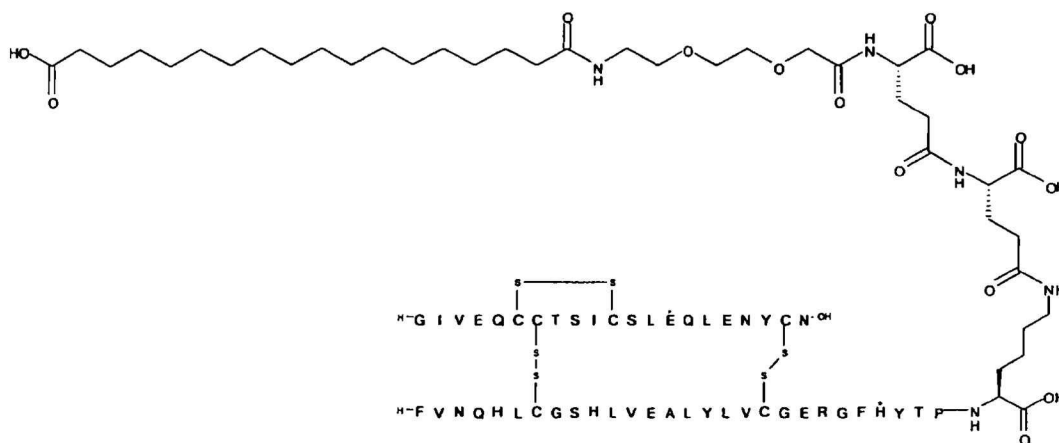
5 Insulina humana de A14E, B16H, B25H, B29K(N(EPS) eicosa-
nodioil- γ Glu-OEG-OEG), desB30



ES-MS: $m/z = 1596 (M+4)$

EXEMPLO 34. PROCEDIMENTO GERAL (A):

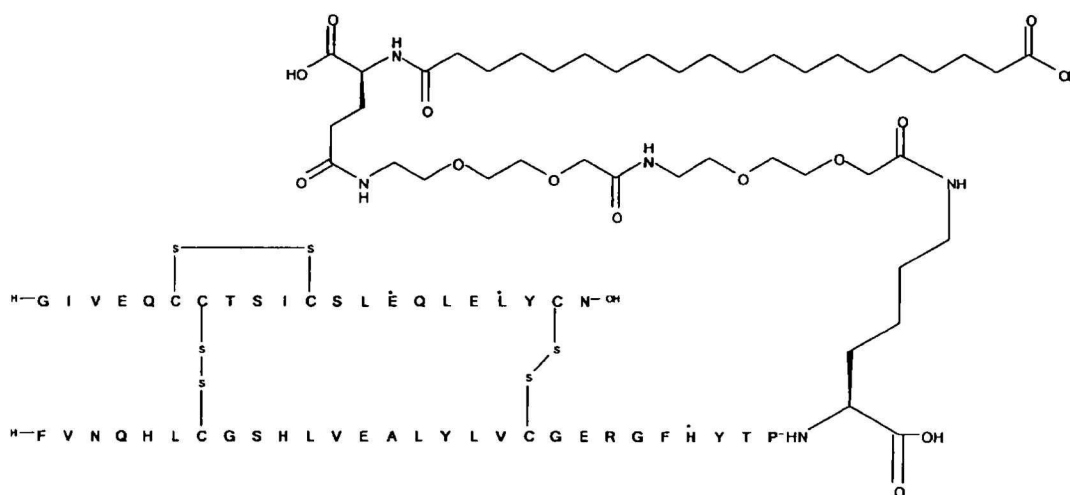
Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^ooctadecanodioil-OEG
- γ Glu - γ Glu), desB30



ES-MS: $m/z = 1592 (M+4)$

EXEMPLO 35. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, A18L, B25H, B29K(N^{ϵ} eicosanodioil-YGlu-OEG-OEG), desB30

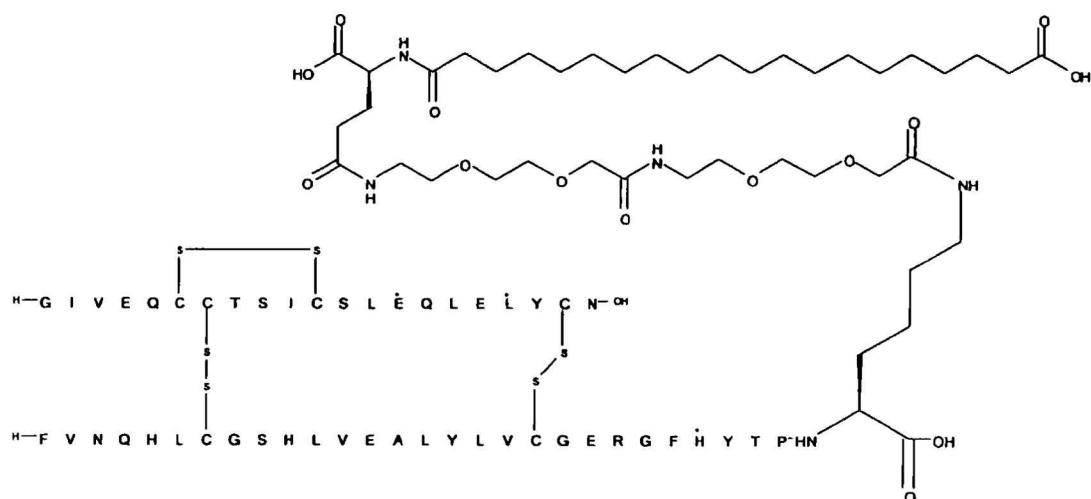


5

MALDI-TOF MS: $m/z = 6405$

EXEMPLO 36. PROCEDIMENTO GERAL (A):

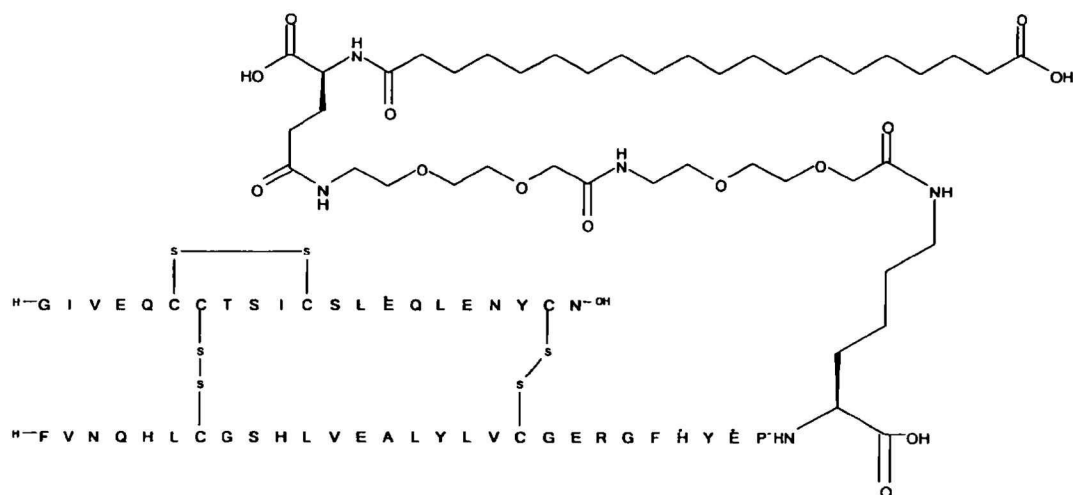
Insulina humana de A14E, A18L, B25H, B29K(N^{ϵ} octadecanodioil-yGlu-OEG-OEG), desB30



MALDI-TOF MS: $m/z = 6377$

EXEMPLO 37. PROCEDIMENTO GERAL (A):

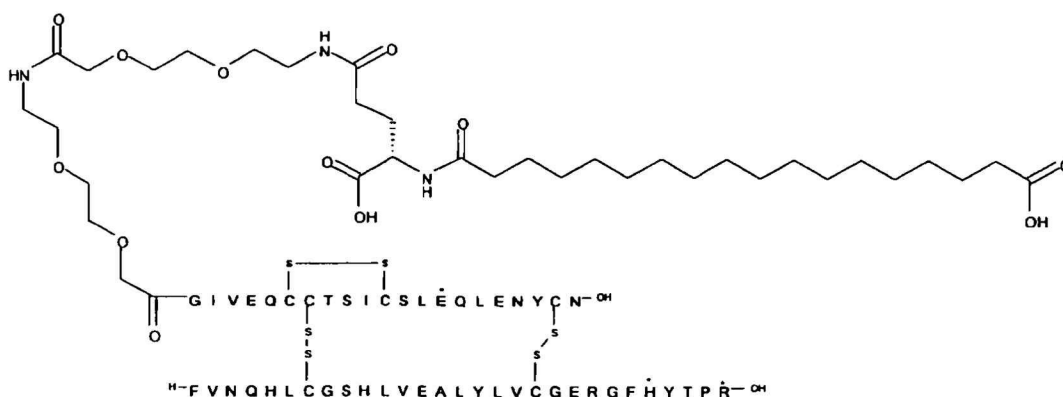
Insulina humana de A14E, B25H, B27E, B29K(N^e eicosanodioil- γ Glu-OEG-OEG), desB30



5 MALDI-TOF MS: $m/z = 6433$

EXEMPLO 38. PROCEDIMENTO GERAL (A):

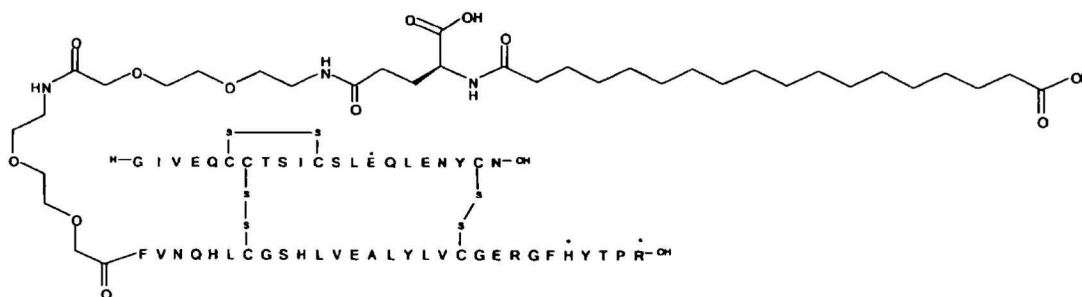
Insulina humana de A1G(N^o octadecandioil- γ Glu-OEG-OEG), A14E, B25H, B29R, desB30



Insulina de A14E, B25H, B29R, desB30 (500 mg, 88 (μ mols) foi dissolvida em 0,1 M de NaHCO_3 , pH 8 (5 ml). ω -carbóxi-heptadecanoil- γ -L-glutamil-OEG-OEG-OSu (65 mg, 88 μ mols) foi dissolvido em THF/MeCN 1:1 (5 ml) e adicionado à solução de insulina. Após 30 minutos, a reação foi extinguida por adição de 2 M de metilamina aquosa (0,5 ml). O solvente foi evaporado a vácuo e o sólido foi redissolvido na quantidade mínima de água/MeCN. O pico do produto principal foi isolado por uso de RP-HPLC em coluna de C18, tampão A: 0,1% de TFA em água, tampão B: 0,1% de TFA em MeCN, gradiente 30-55% de tampão B 45 min. As frações de produto foram parcialmente evaporadas a vácuo e secadas por congelamento para fornecer 59 mg de produto (10%). Análise de LC-MS: M_4^+ = 1602,7, calculada 1602,6. Duas etapas de análise da sequência de aminoácido padrão mostraram F-V, confirmando a acilação A1.

EXEMPLO 39. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B1F(N^{α} octadecandioil- γ Glu-OEG-OEG), B25H, B29R, desB30

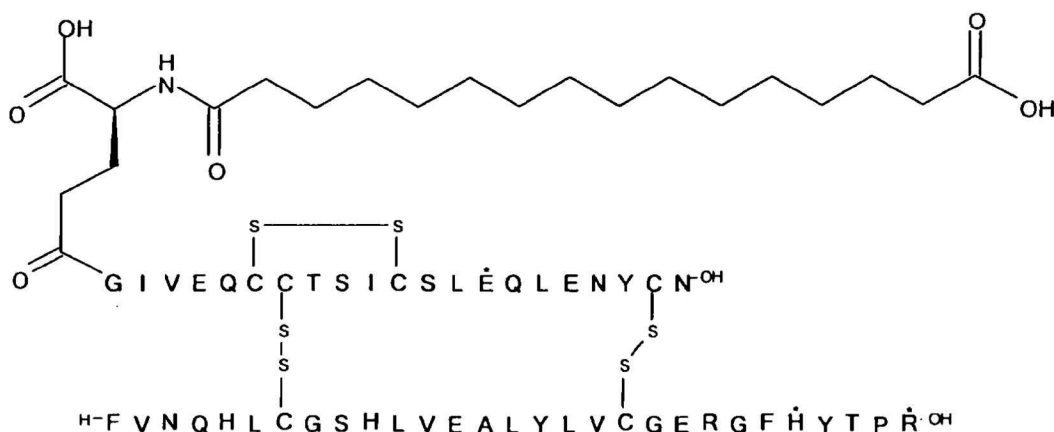


Este composto foi isolado acima como um subproduto do exemplo (exemplo 38). Análise de LCMS: M_4^+ = 1602,5, calculada 1602,6. Duas etapas de análise de sequência de aminoácido padrão mostraram G-I, con-

firmando a acilação a B1.

EXEMPLO 40. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A1G(N^ohexadecandioil-γGlu), A14E, B25H, B29R, desB30

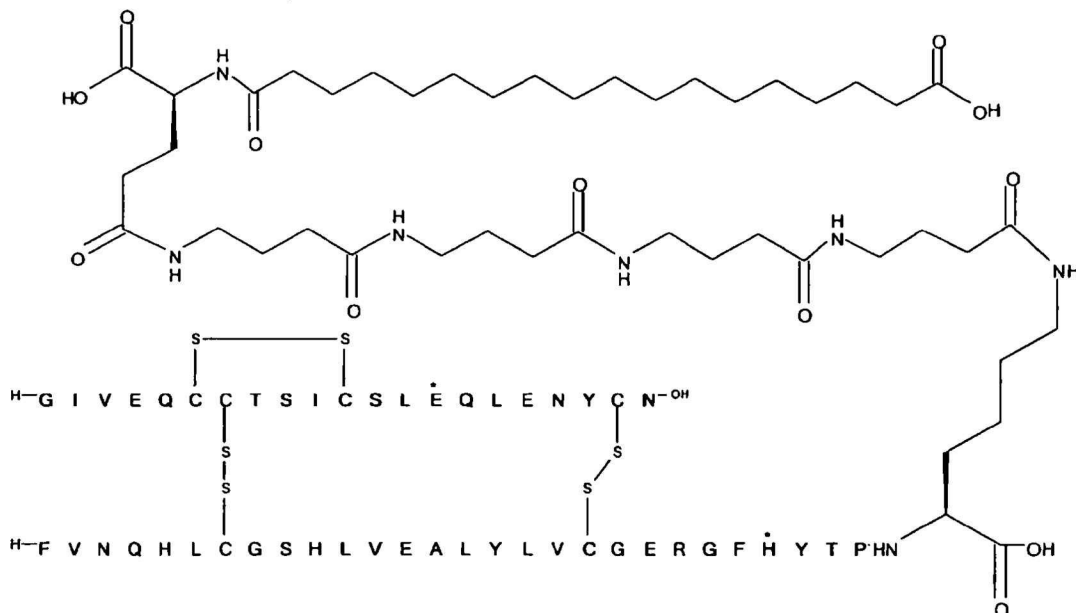


5 ES-MS: $m/z = 1523 (M+4)$

Este composto foi similarmente preparado à A1-acilação descrita acima (exemplo 38), usando ω -carboxipentadecanoil-γ-L-glutamil(OSu) como reagente de acilação. O produto mostrou LCMS: $M_4^+ = 1523,2$, calculado 1523,0. Duas etapas de análise de sequência de aminoácido padrão mostraram F-V, confirmando a acilação A1.

EXEMPLO 41. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^Eoctadecanodioil-γGlu-ABU-ABU-ABU-ABU), desB30

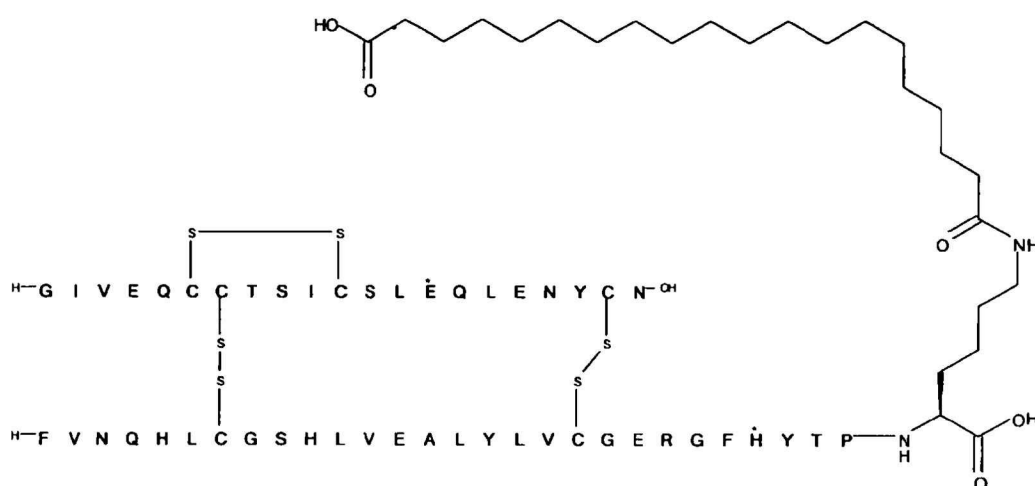


ES-MS: $m/z = 1286 (M+5)$

O reagente de acilação para este exemplo foi preparado em analogia com o reagente preparado no exemplo 9, partindo de ligação de ácido 4-aminobutírico protegido por Fmoc à resina de 2-clorotritila, seguido por 3 mais unidades de desproteção e ligação sequencial de ácido 4-aminobutírico protegido por 3 Fmoc, e como descrito no exemplo 9, Fmoc-Glu-OtBu e éster de mono-terc-butila de ácido octadecanodioico.

EXEMPLO 42. PROCEDIMENTO GERAL (A):

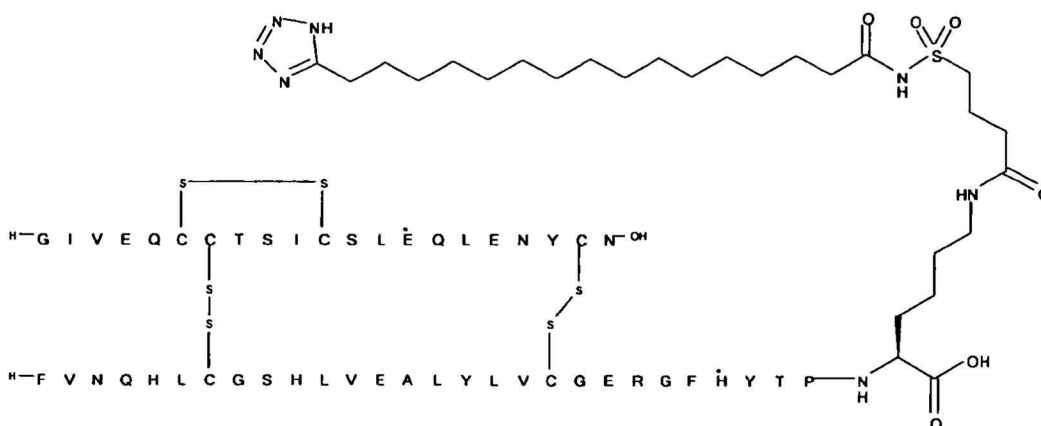
10 Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^oeicosanodioil), desB30



MALDI-TOF-MS: $m/z = 5987$

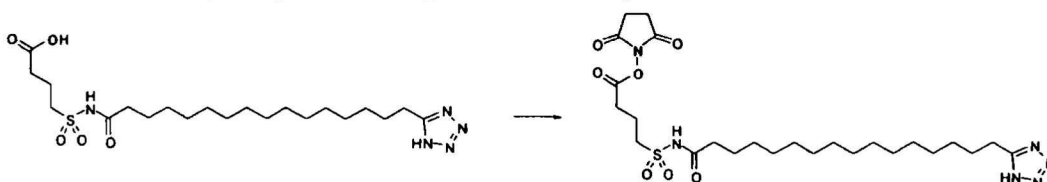
EXEMPLO 43. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^o4-[16-(1H-tetrazol-5-IL)hexadecanoilsulfamoil]butanoil), desB30



ES-MS: $m/z = 1530 (M+4)$

Preparação do reagente de acilação intermediário:



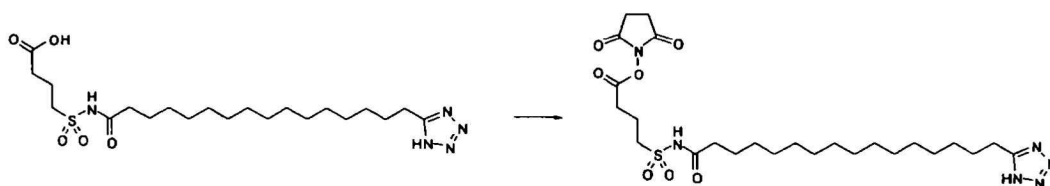
Ácido 4-[16-(1H-Tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil]butanoico (500 mg, preparado como descrito em WO 2006/005667) foi dissolvido em etanol (20 ml), e TSTU (381 mg), e DIPEA (542 μ l) foi adicionado e a mistura resultante foi agitada em temperatura ambiente por 16 horas. A mistura foi concentrada a vácuo, e o resíduo foi agitado com 0,25 M de HCl. O sólido foi isolado através de filtração, lavado com água e secado a vácuo para fornecer 580 mg (91%) do reagente de acilação.

10 Reação de acilação:

A14E, B25H, desB30 (500 mg) foi dissolvido em 0,1M de carbonato de sódio aquoso (10 ml) e etanol (4mL). O pH foi ajustado para 10,8 com 1N de NaOH. O acima reagente de acilação (101 mg) dissolvido em THF (2mL) e etanol (2 ml) foi adicionado em duas porções com 10 minutos de intervalo. A mistura resultante foi agitada lentamente para 1 hora e diluída com água (50 ml). A insulina resultante foi precipitada por adição de 1N de HCl em pH 5,5. O precipitado foi isolado através de centrifugação e purificado por HPLC. Foram agrupadas e liofilizadas frações puras.

EXEMPLO 44. PROCEDIMENTO GERAL (A):

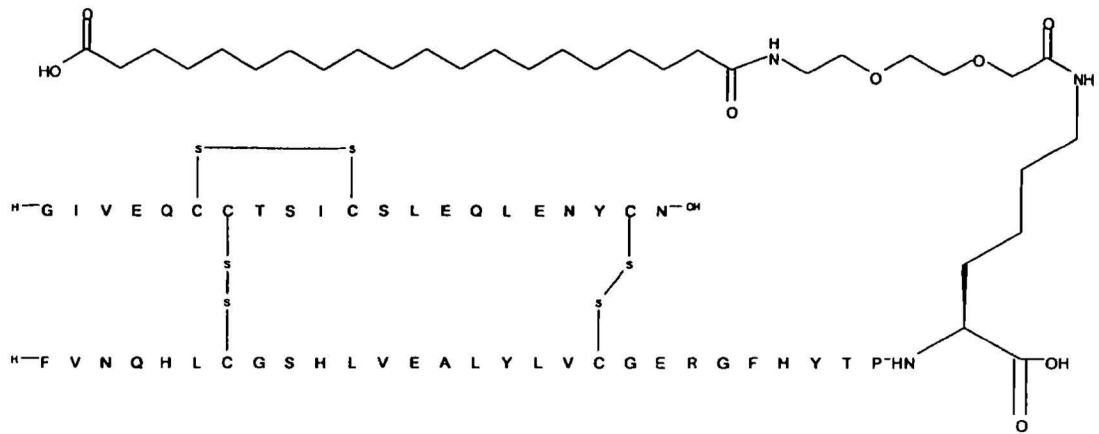
20 A1G(N^ooctadecandioil- γ Glu-OEG-OEG), A14E, A21G, B25H, desB30



MALDI-TOF-MS: $m/z = 6321$

EXEMPLO 45. PROCEDIMENTO GERAL (A):

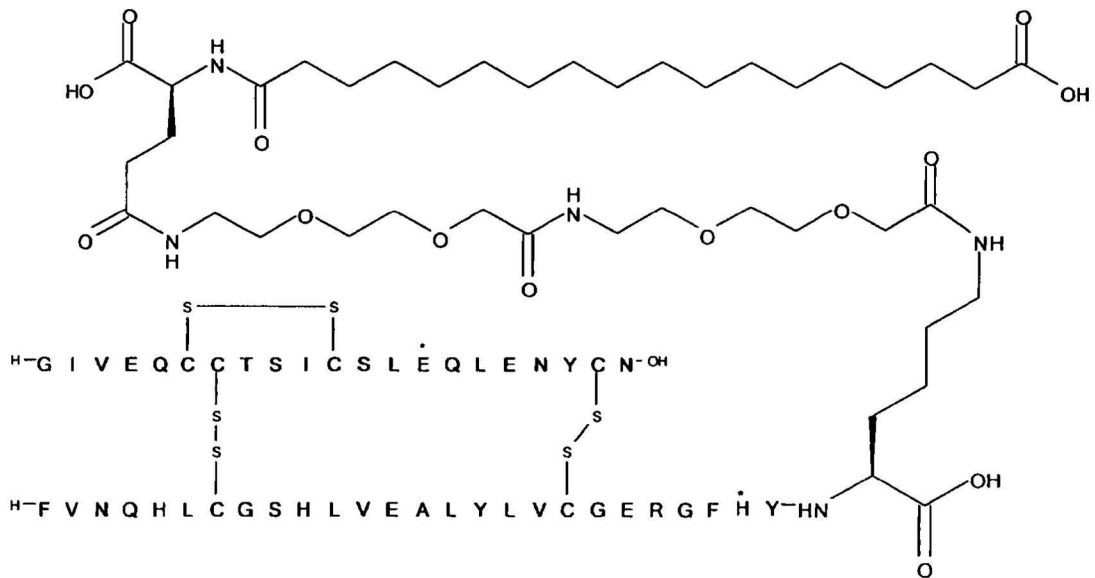
25 Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^eeicosanodioil-OEG), desB30



MALDI-TOF-MS: $m/z = 6130$

EXEMPLO 46. PROCEDIMIENTO GERAL (A):

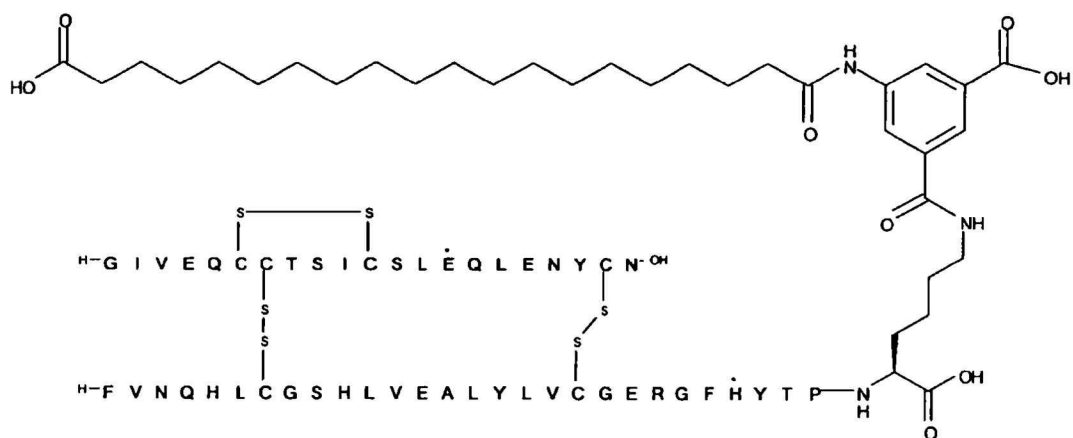
Insulina humana de A14E, B25H, B27K(N^{ϵ} octadecanodioil- γ Glu-OEG-OEG), desB28, desB29, desB30



5 MALDI-TOF-MS: $m/z = 6181$

EXEMPLO 47. PROCEDIMIENTO GERAL (A):

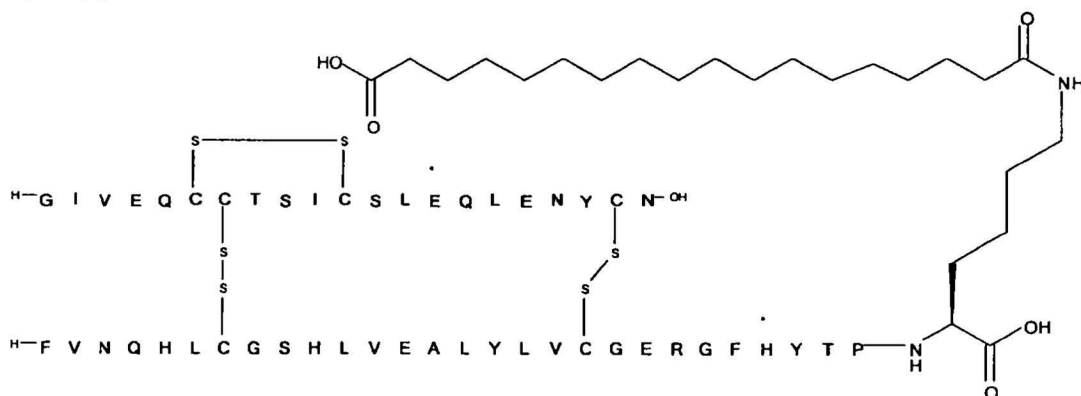
Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^{ϵ} (ácido 5-eicosanodioilaminoisoftálico)), desB30



MALDI-TOF-MS: m/z = 6150

EXEMPLO 48. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^ε-octadecanodioila), desB30

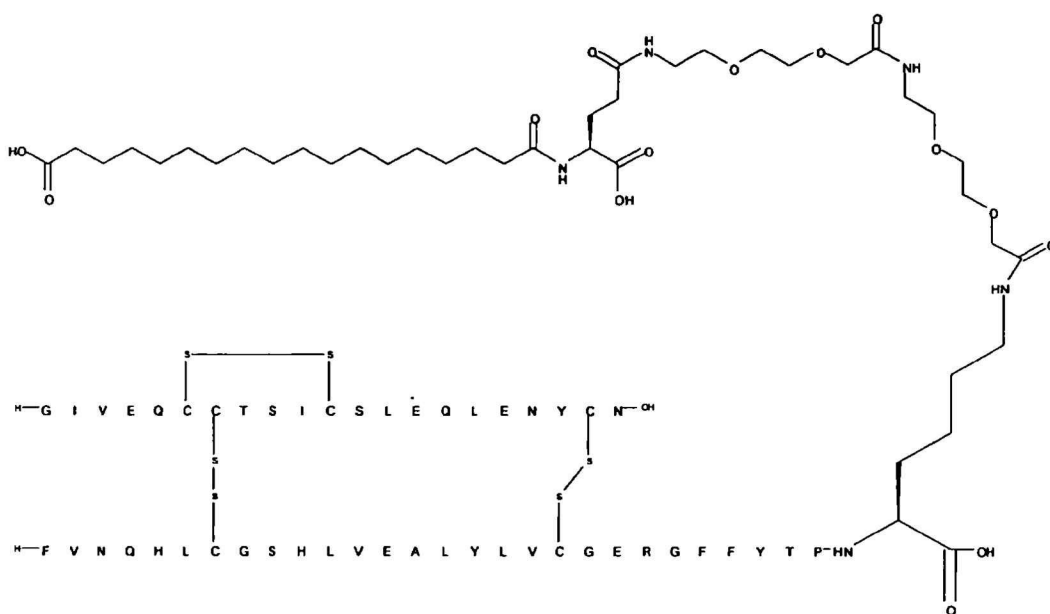


5

MALDI-TOF-MS: m/z = 5959

EXEMPLO 49. PROCEDIMENTO GERAL (A):

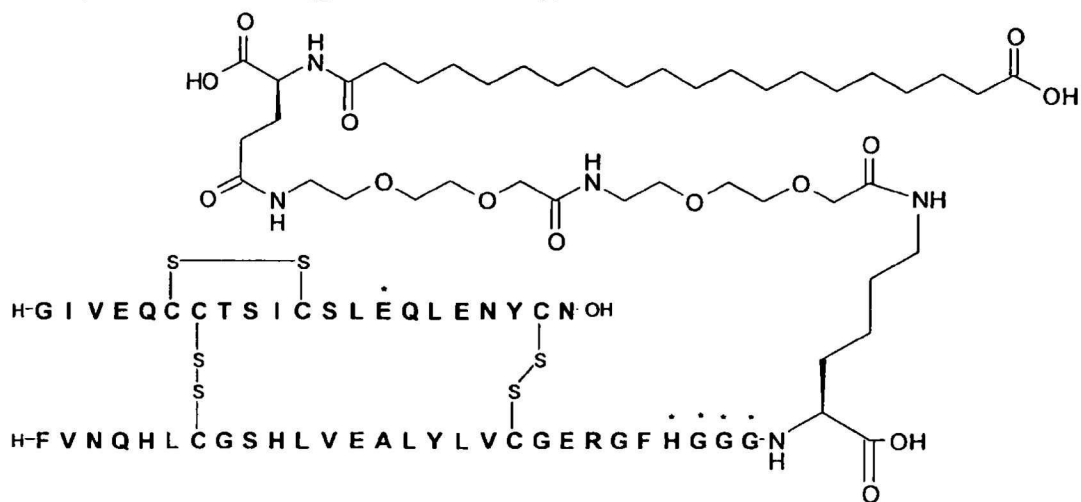
Insulina humana de A14E, B29K(N^ε-octadecanodioil-γ-Glu-OEG-OEG), desB30



ES-MS: $m/z = 1598 (M+4)$

EXEMPLO 50. PROCEDIMIENTO GERAL (A):

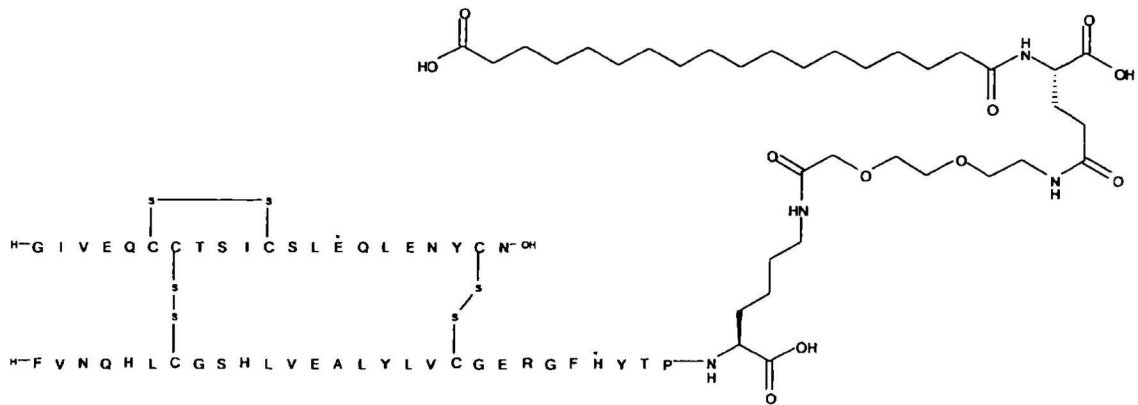
Insulina humana de A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29K(*N*^eeicosanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



5 MALDI-TOF-MS: $m/z = 6216$

EXEMPLO 51. PROCEDIMIENTO GERAL (A):

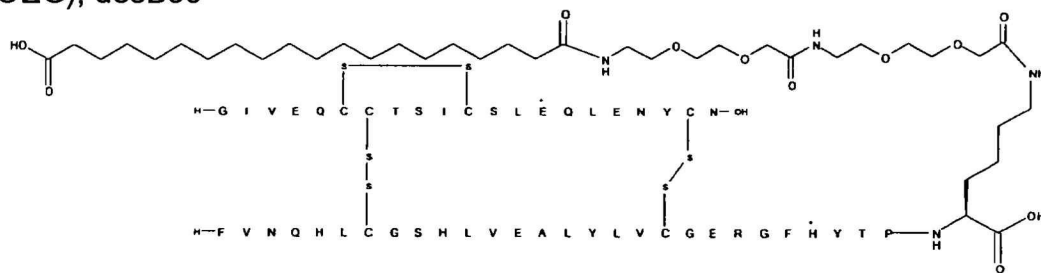
Insulina humana de A14E, B25H, B29K(*N*^eOctadecanodioil-γGlu-OEG), desB30



ES-MS: $m/z = 1559 (M+4)$

EXEMPLO 52. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^EEicosanodioil-OEG-OEG), desB30

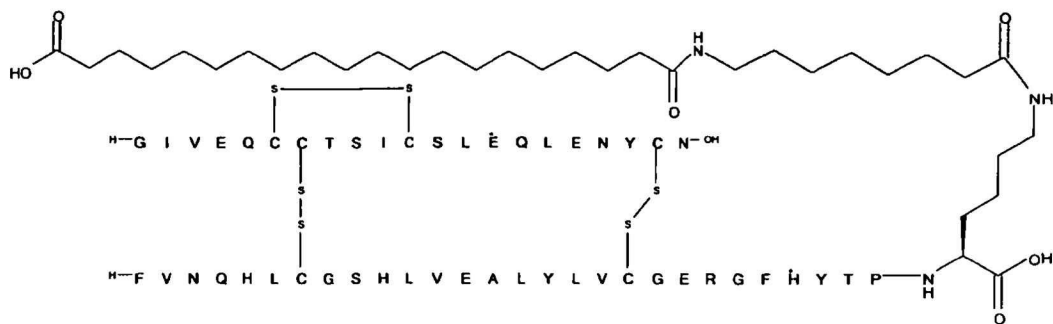


5

MALDI-TOF-MS: $m/z = 6278$

EXEMPLO 53. PROCEDIMENTO GERAL (A):

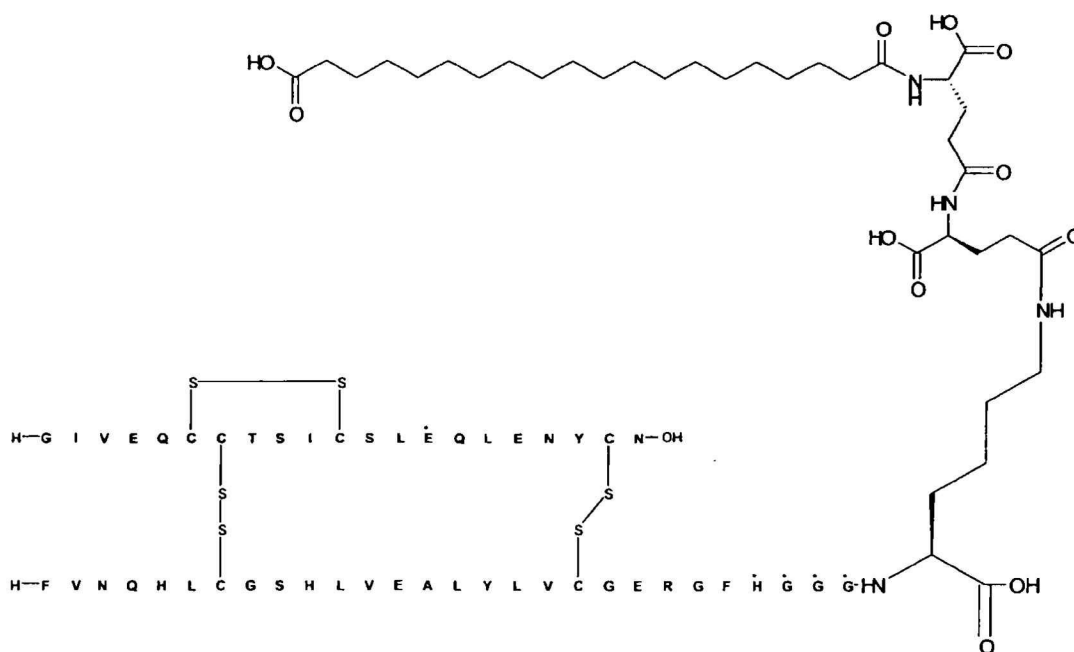
Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^EEicosanodioil-Aoc), desB30



MALDI-TOF-MS: $m/z = 6126$

10 EXEMPLO 54. PROCEDIMENTO GERAL (A):

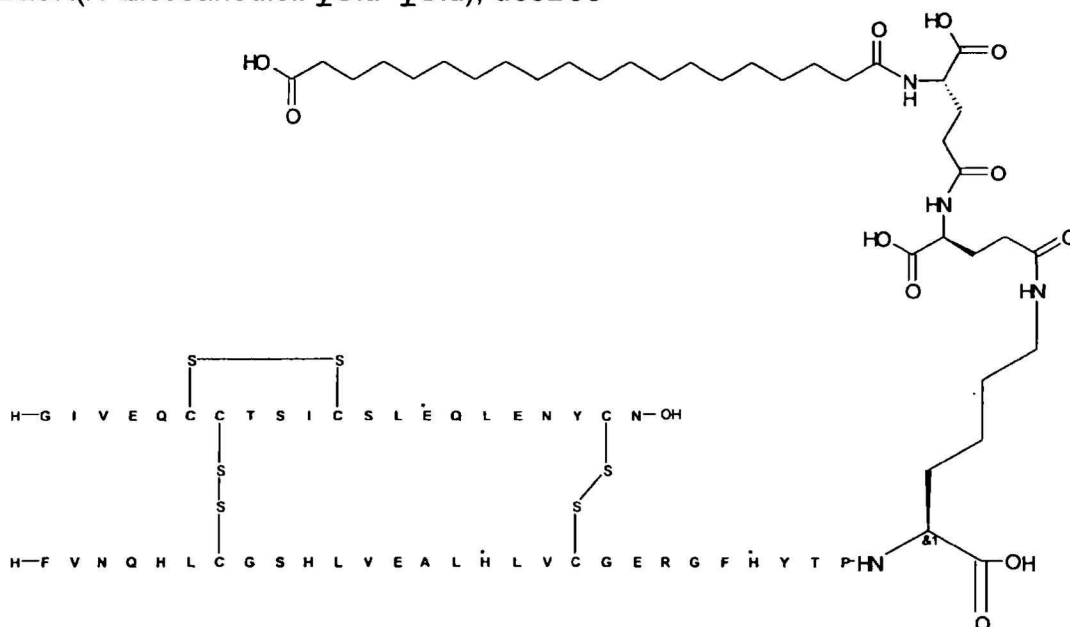
Insulina humana de A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29K(N^EEicosanodioil-γGlu-γGlu), desB30



ES-MS: $m/z = 6055$ (desconvoluto)

EXEMPLO 55. PROCEDIMENTO GERAL (A):

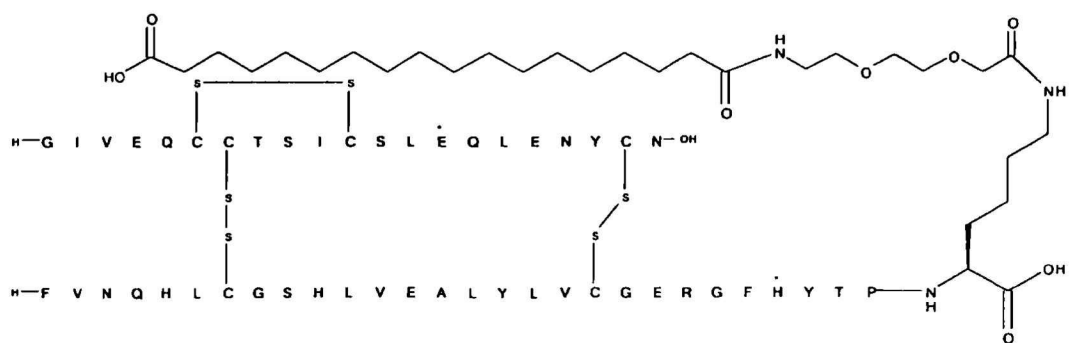
Insulina humana de A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29K(N^εEicosanodioil-γGlu -γGlu), desB30



5 ES-MS: $m/z = 6220$ (desconvoluto)

EXEMPLO 56. PROCEDIMENTO GERAL (A):

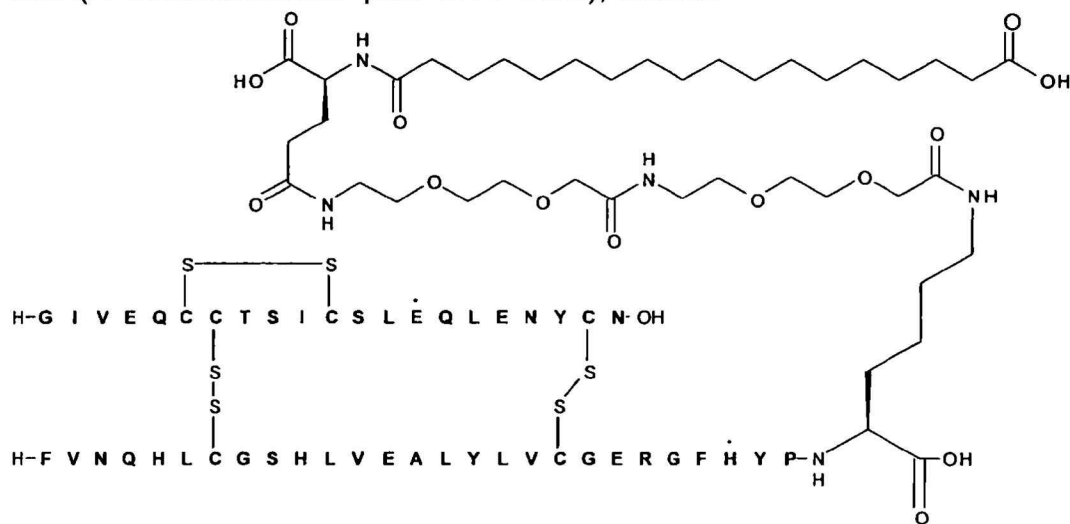
Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^εOctadecanodioil-OEG), desB30



MALDI-TOF-MS: $m/z = 6101$

EXEMPLO 57. PROCEDIMIENTO GERAL (A):

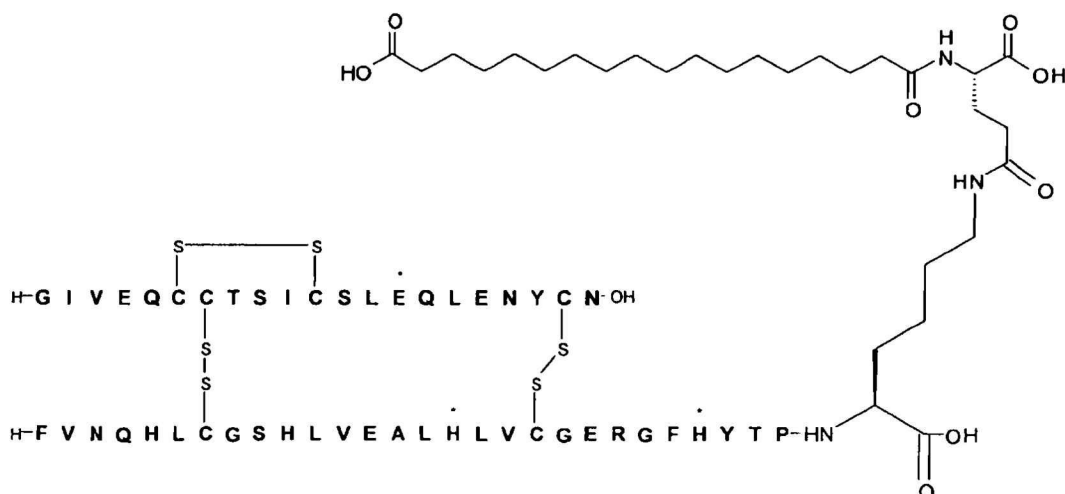
Insulina humana de A14E, B25H, desB27,
B29K(*N*^oOctadecanodioil- γ Glu-OEG-OEG), desB30



5 MALDI-TOF-MS: $m/z = 6277$

EXEMPLO 58. PROCEDIMIENTO GERAL (A):

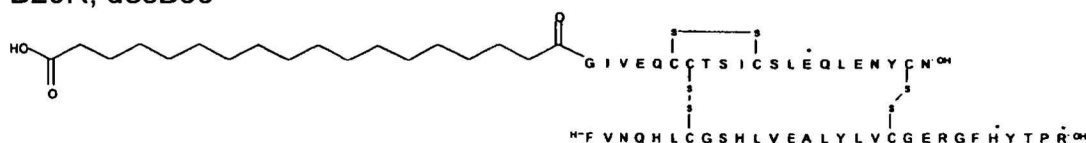
Insulina humana de A14E, B25H, B16H,
B29K(*N*^oOctadecanodioil- γ Glu), desB30



ES-MS: $m/z = 1516 (M+4)$

EXEMPLO 59. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A1G(N^αOctadecanodioil), A14E, B25H, B29R, desB30

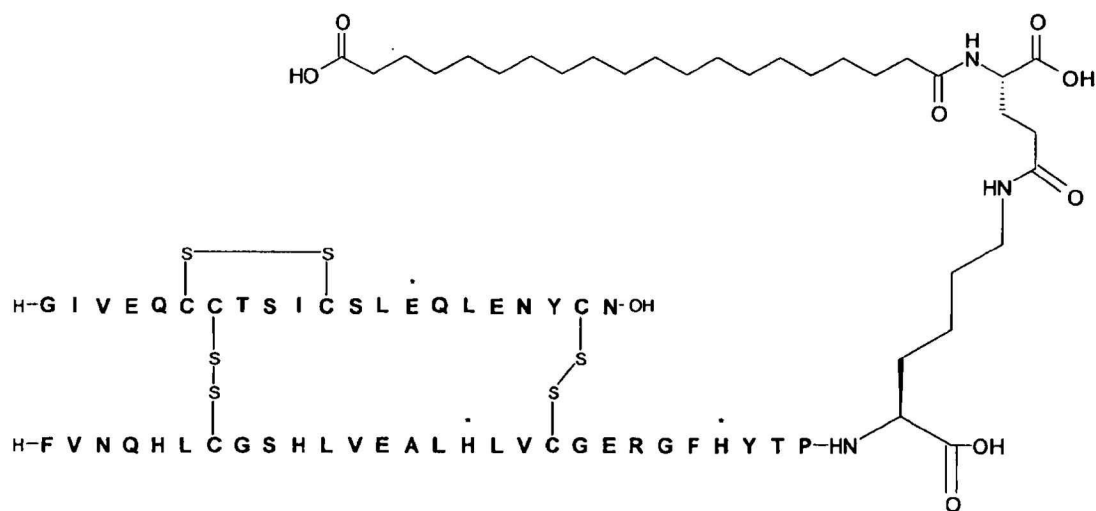


5

ES-MS: $m/z = 1498 (M+4)$

EXEMPLO 60. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B16H, B25H, B29K(N^εEicosanodioil-γGlu), desB30

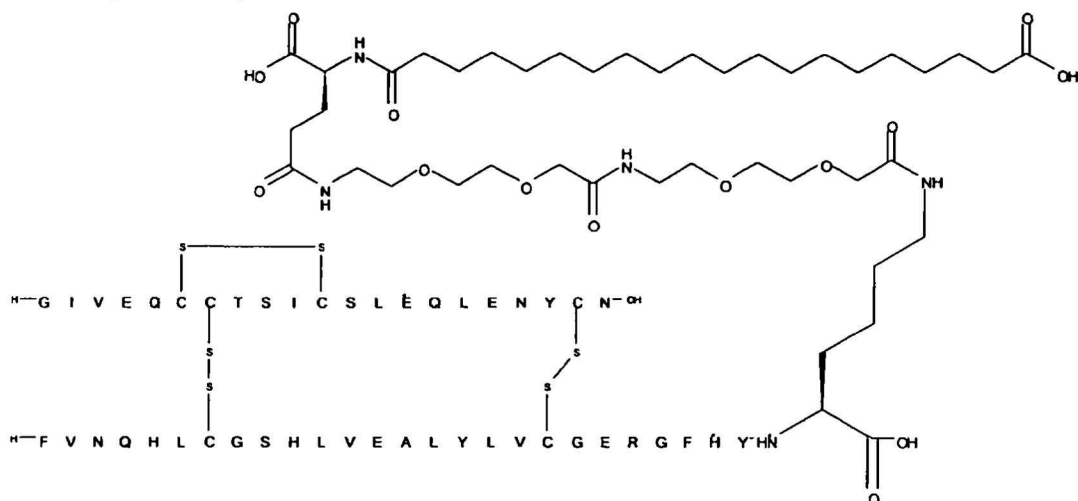


ES-MS: $m/z = 1523 (M+4)$

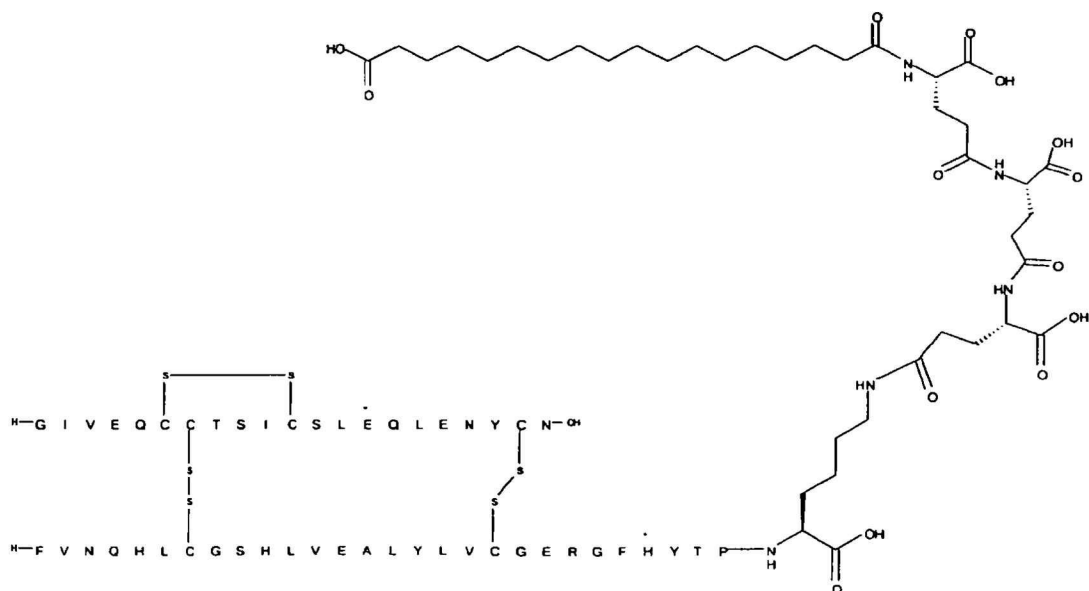
10 EXEMPLO 61. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, B27K(N^εEicosanodioil-γGlu),

desB28, desB29, desB30

MALDI-TOF MS: $m/z = 6208$

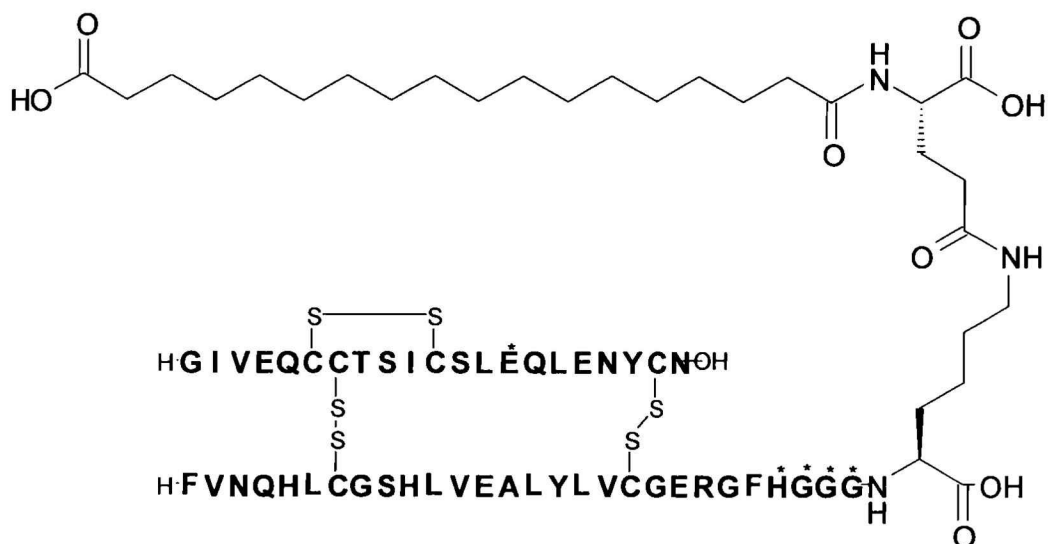
EXEMPLO 62. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^oOctadecanodioil- γ Glu5 - γ Glu - γ Glu), desB30ES-MS: $m/z = 1587 (M+4)$

As insulinas aciladas da invenção nos exemplos seguintes podem ser similarmente preparadas:

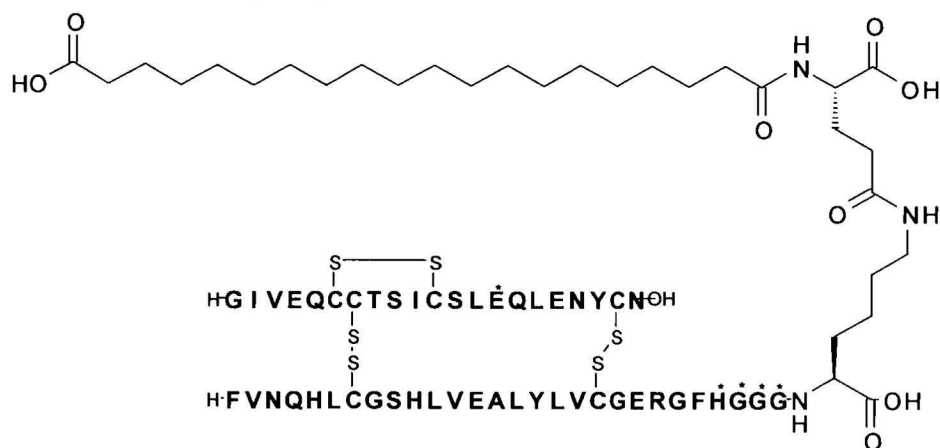
EXEMPLO 63. PROCEDIMENTO GERAL (A):

10 Insulina humana de A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29K(N^oOctadecandioil- γ Glu), desB30



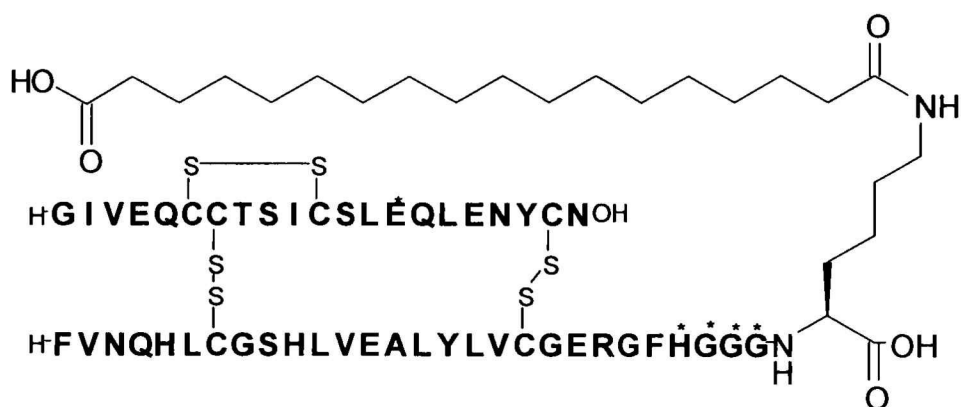
EXEMPLO 64. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29K(N^εEicosanodioil-γGlu), desB30



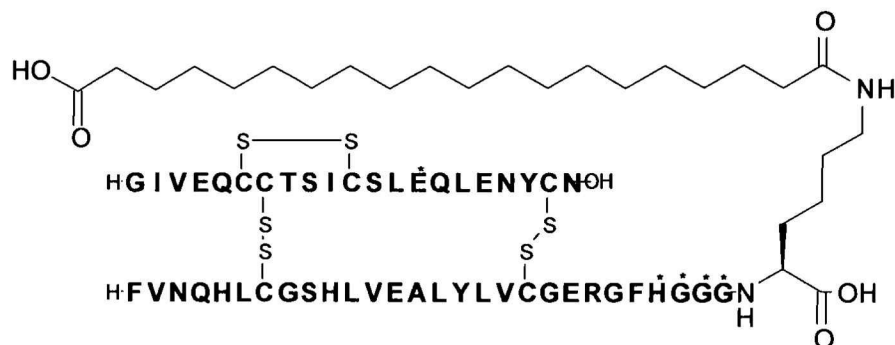
5 EXEMPLO 65. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29K(N^εOctadecandioil), desB30



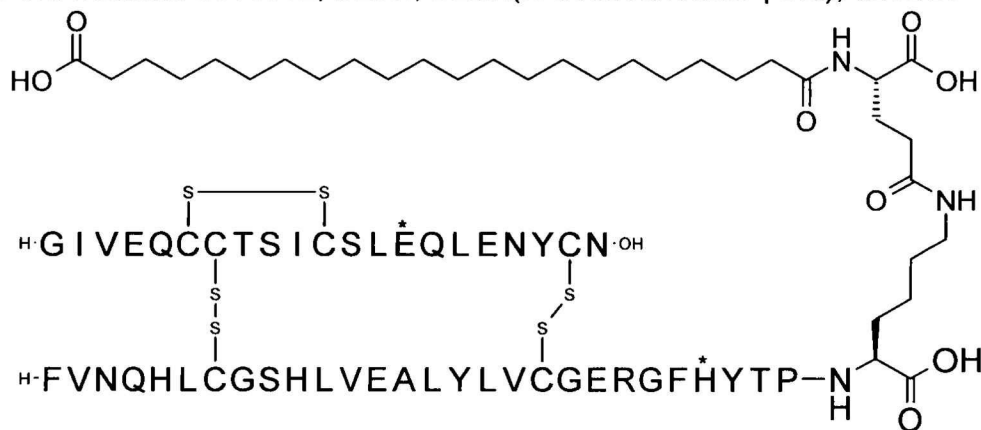
EXEMPLO 66. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29K(*N*^fEicosanodioil), desB30



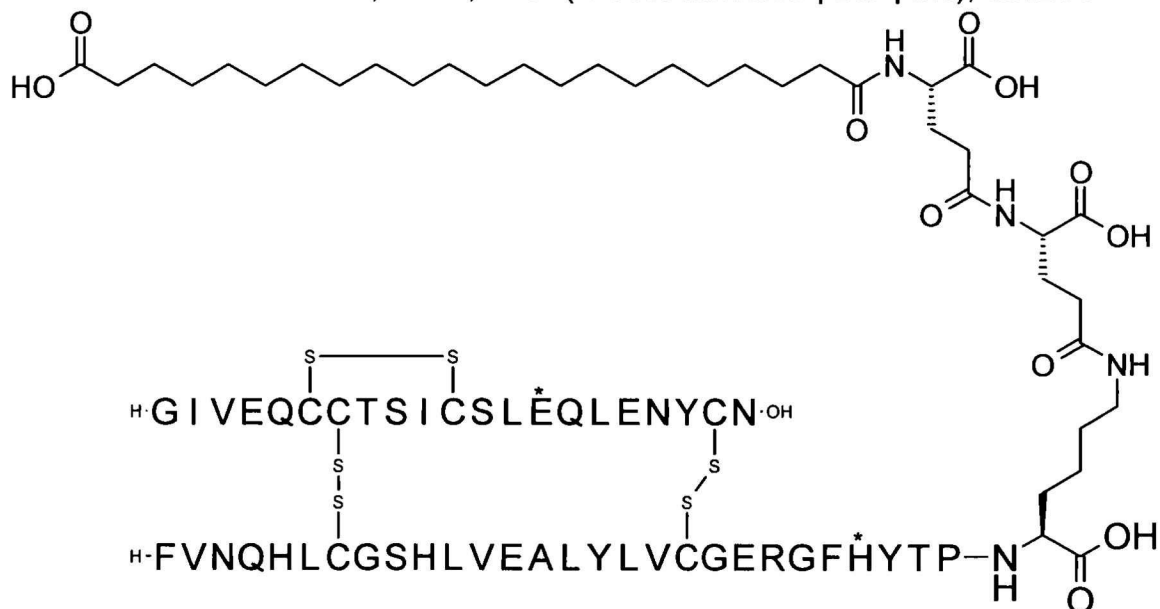
EXEMPLO 67. PROCEDIMENTO GERAL (A):

5 Insulina humana de A14E, B25H, B29K(*N*^fdocosanodioil- γ Glu), desB30



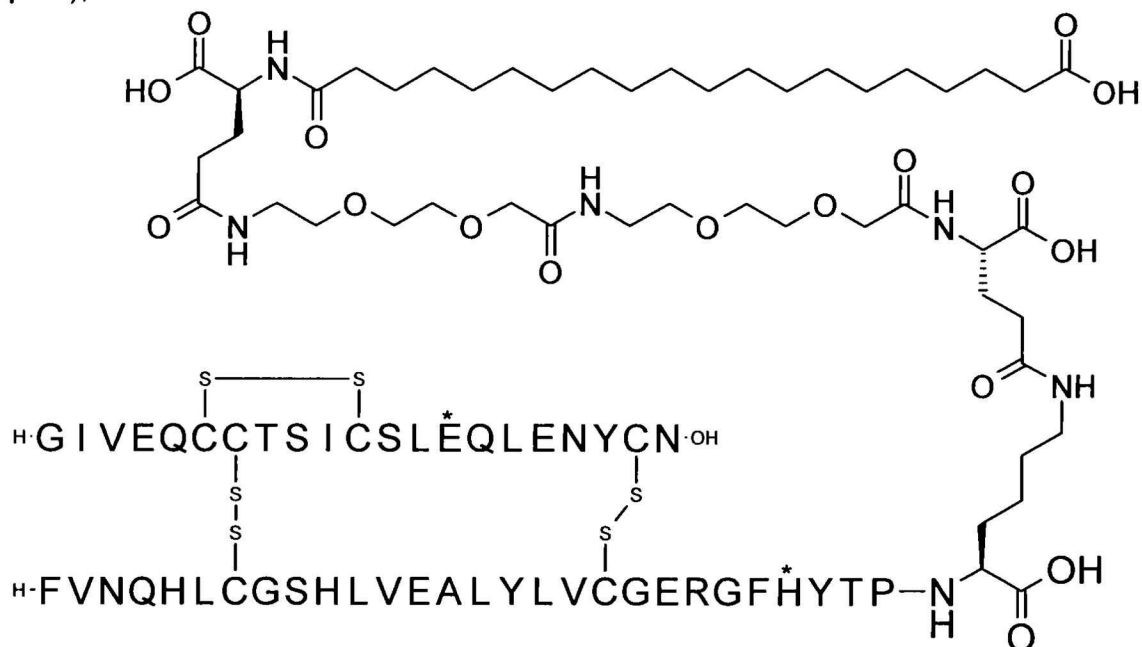
EXEMPLO 68. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, B29K(*N*^fdocosanodioil- γ Glu- γ Glu), desB30



EXEMPLO 69. PROCEDIMENTO GERAL (A):

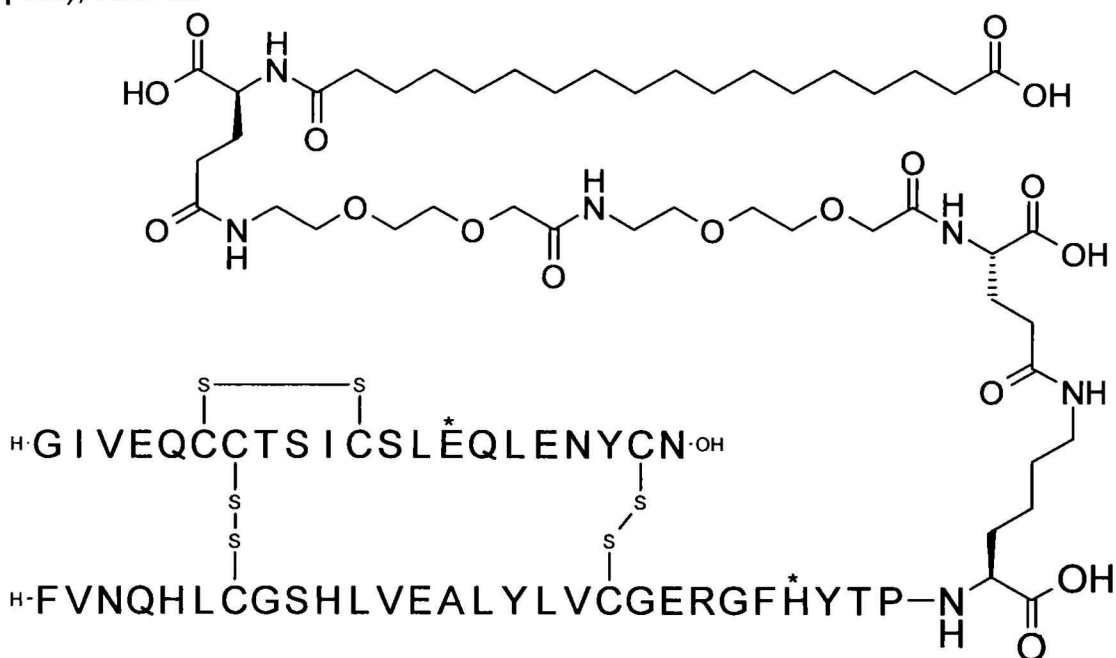
Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^ficosanodioil-γGlu-OEG-OEG-γGlu), desB30



EXEMPLO 70. PROCEDIMENTO GERAL (A):

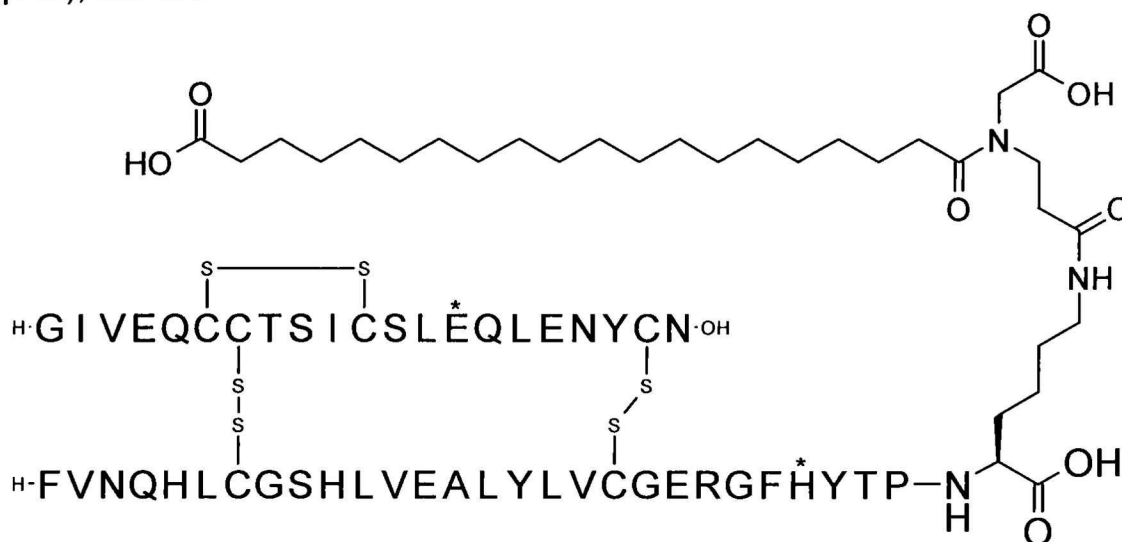
Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^foctadecanodioil-γGlu-OEG-OEG-γGlu), desB30

5



EXEMPLO 71. PROCEDIMENTO GERAL (A):

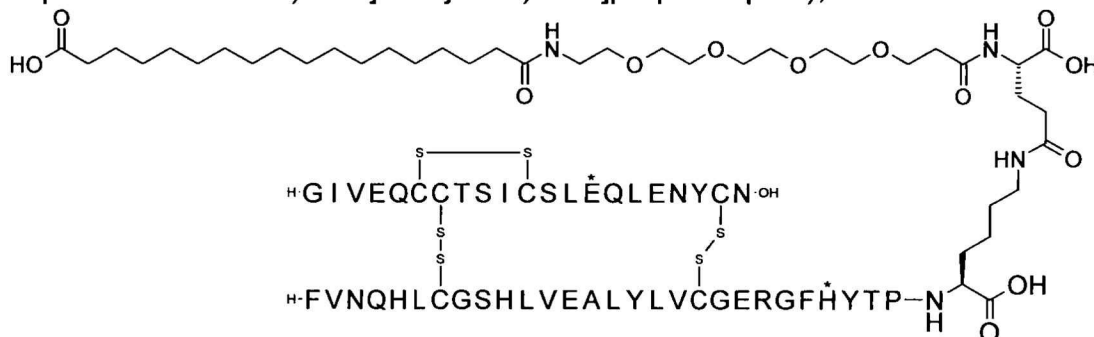
Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^{ϵ} (N-icosanodioil-N-carboximetil)- β Ala), desB30



EXEMPLO 72. PROCEDIMENTO GERAL (A):

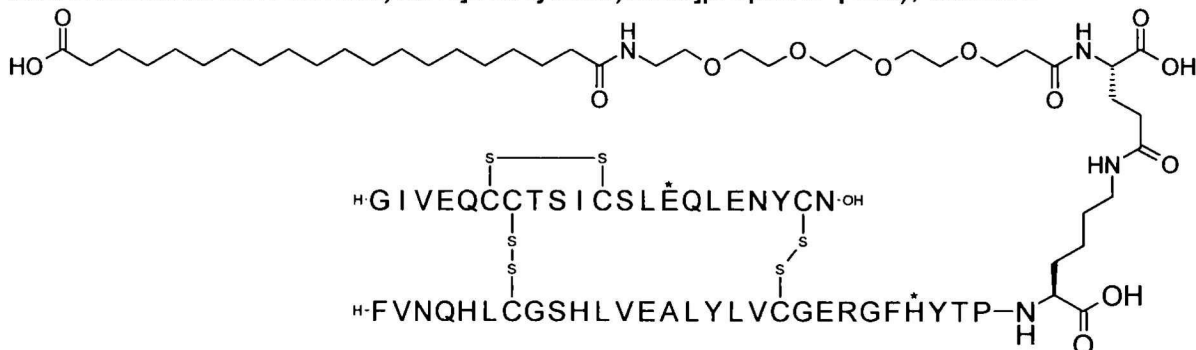
Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^{ϵ} 3-[2-(2-[2-[2-(17-carbóxi-heptadecanoilamino)etóxi]etóxi]etóxi]etóxi]propionil- γ Glu), desB30

5



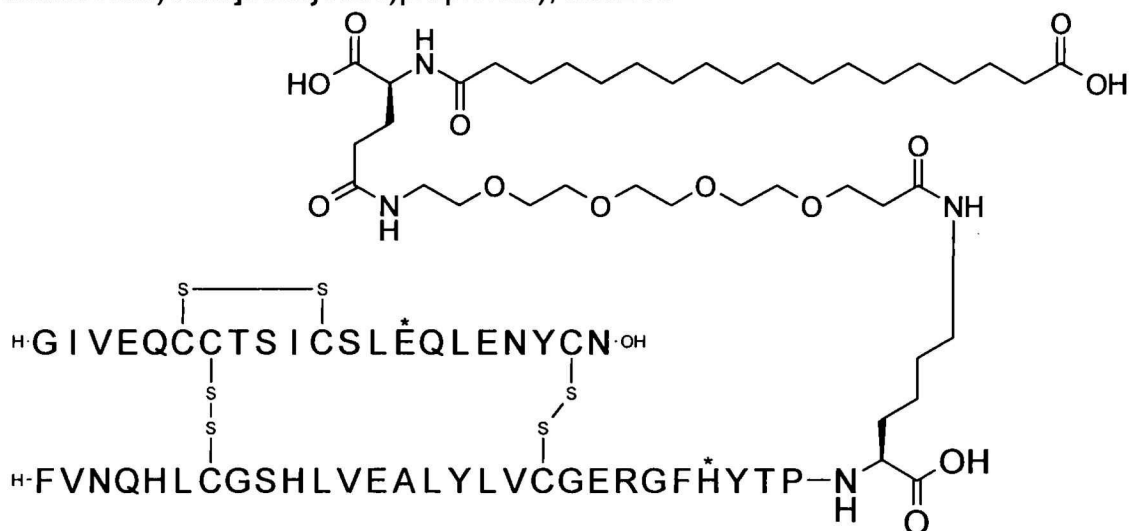
EXEMPLO 73. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^{ϵ} 3-[2-(2-[2-[2-(19-carboxinadecanoilamino)etóxi]etóxi]etóxi]etóxi]propionil- γ Glu), desB30



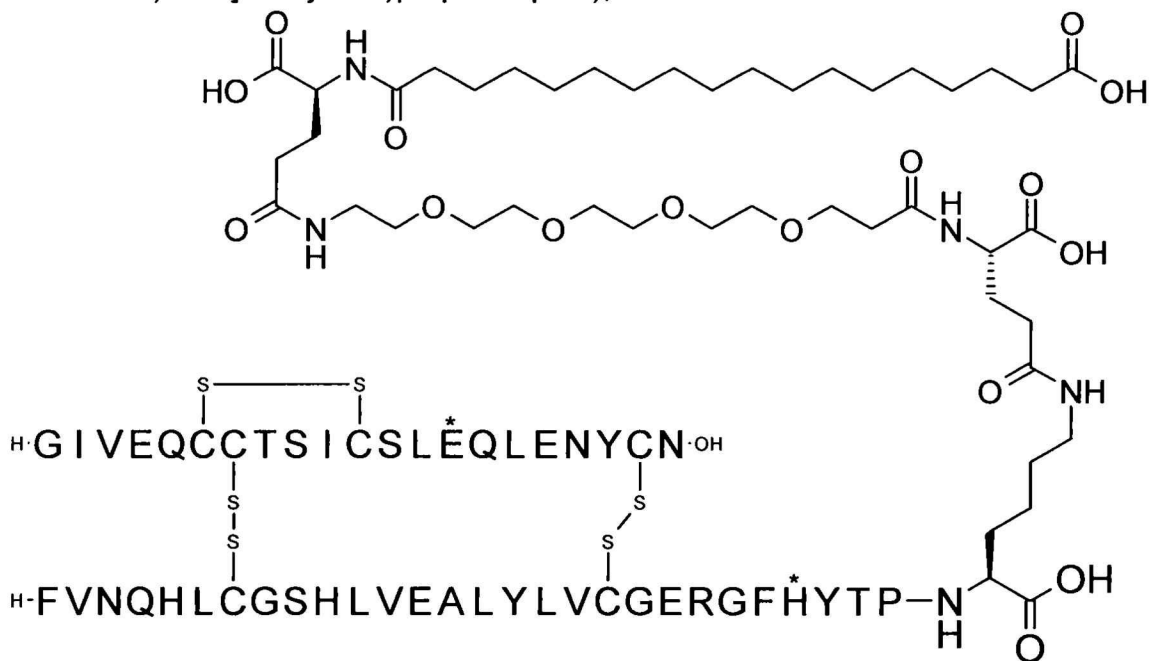
EXEMPLO 74. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^ooctadecandioil-γGlu-(3-(2-{2-[2-(2-aminoetóxi)etóxi]etóxi}etóxi)propionila), desB30



EXEMPLO 75. PROCEDIMENTO GERAL (A):

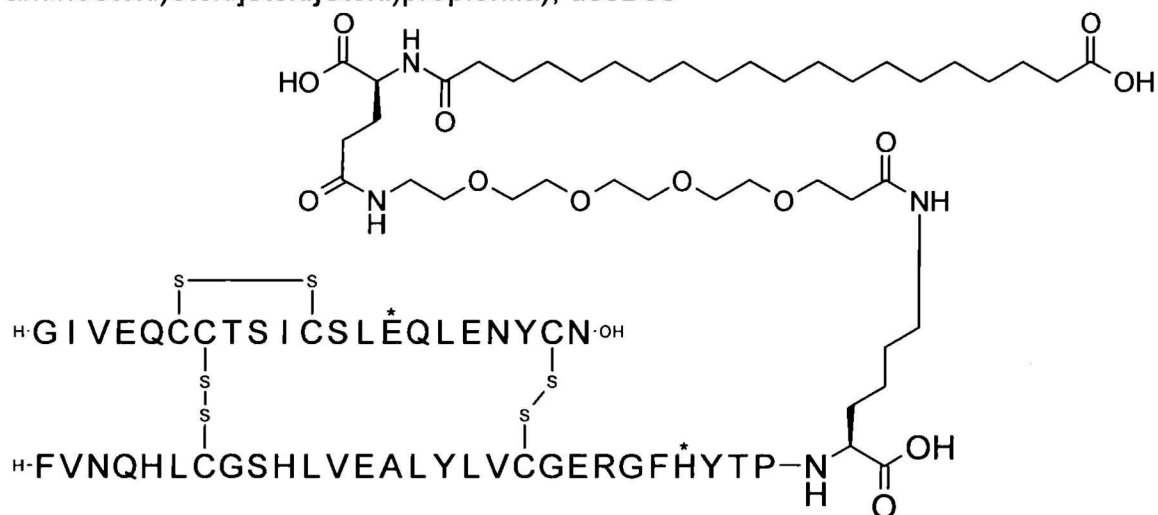
- 5 Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^ooctadecandioil-γGlu-(3-(2-{2-[2-(2-aminoetóxi)etóxi]etóxi}etóxi)propionil-γGlu), desB30



EXEMPLO 76. PROCEDIMENTO GERAL (A):

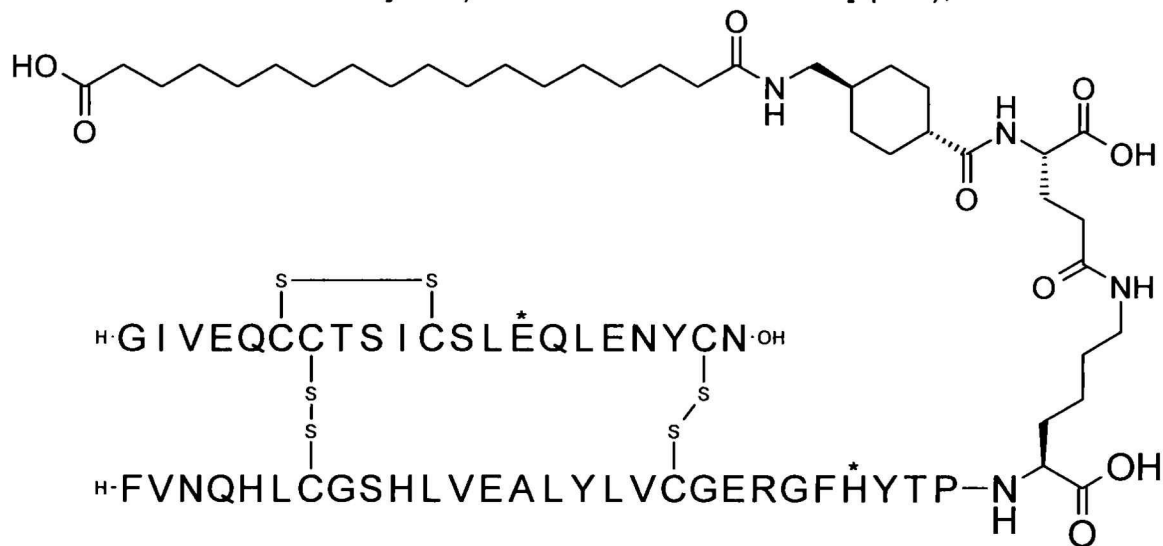
Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^oicosanodioil-γGlu-(3-(2-{2-[2-(2-

aminoetóxi)etóxi]etóxi)propionila), desB30



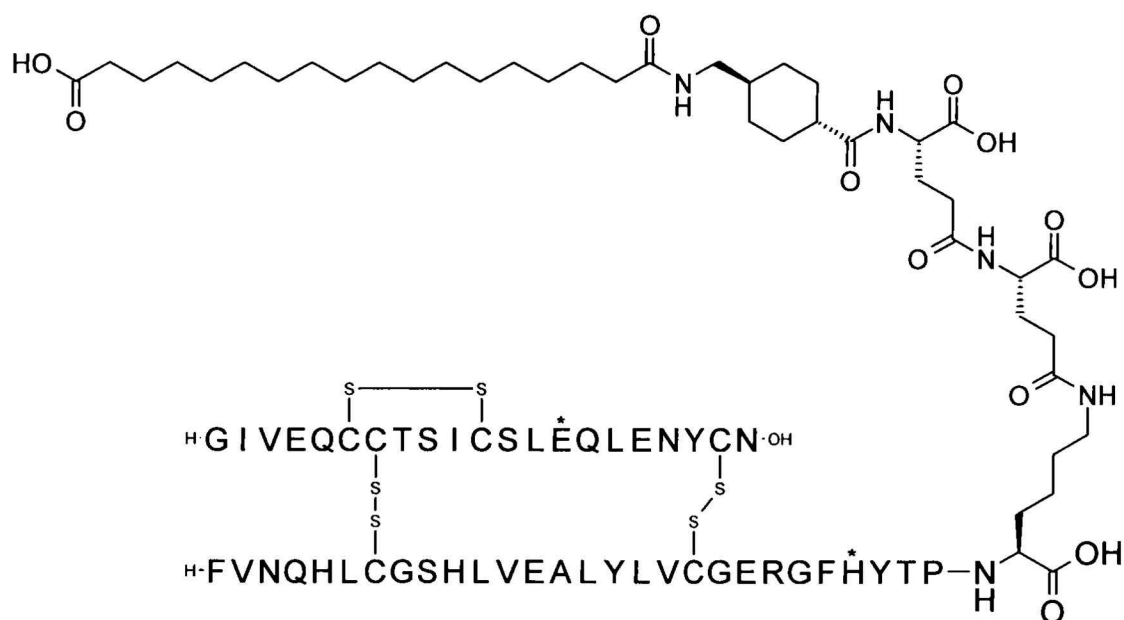
EXEMPLO 77. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^ε4-([4-({17-carboxinonadecanoilamino}metil)trans-ciclo-hexanocarbonil]-γGlu), desB30



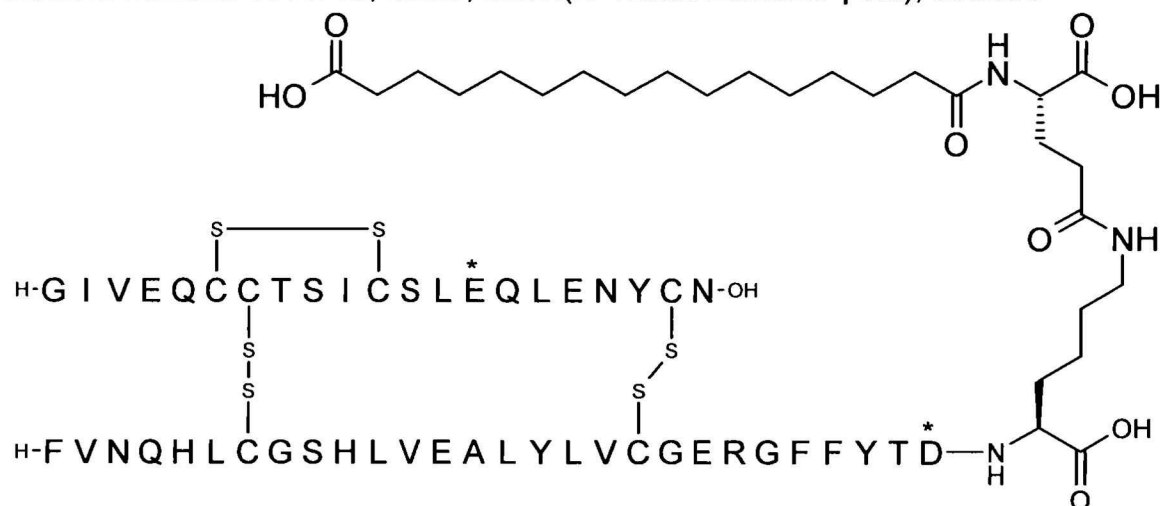
5 EXEMPLO 78. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^ε4-([4-({17-carbóxi-heptadecanoilamino}metil)trans-ciclo-hexanocarbonil]-γGlu-γGlu), desB30



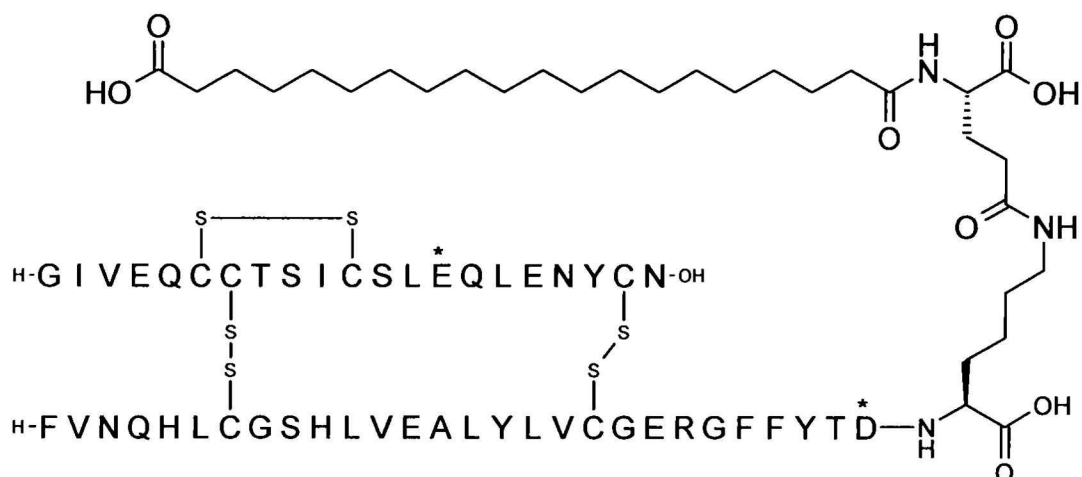
EXEMPLO 79. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B28D, B29K(N^{ϵ} hexadecandioil- γ Glu), desB30



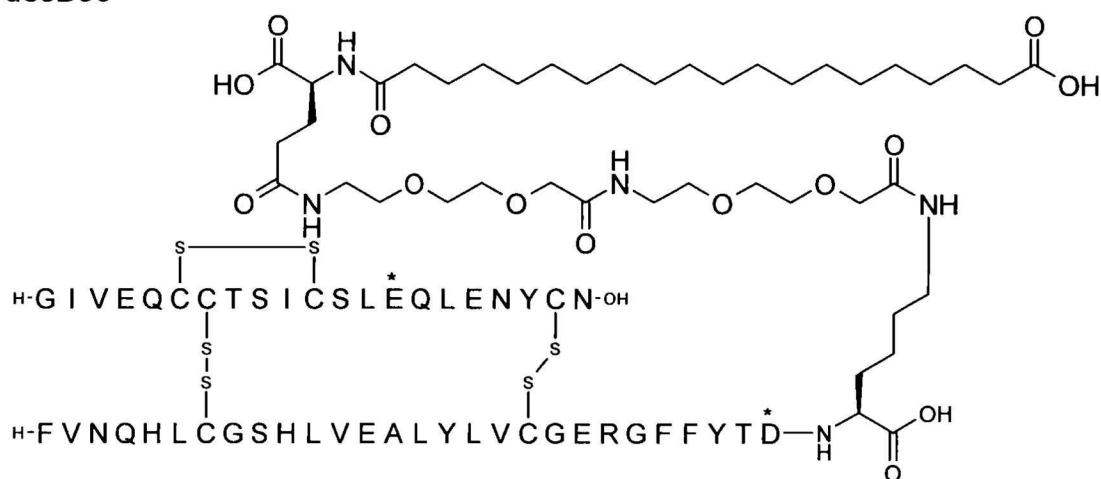
EXEMPLO 80. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B28D, B29K(N^{ϵ} eicosanodioil- γ Glu), desB30



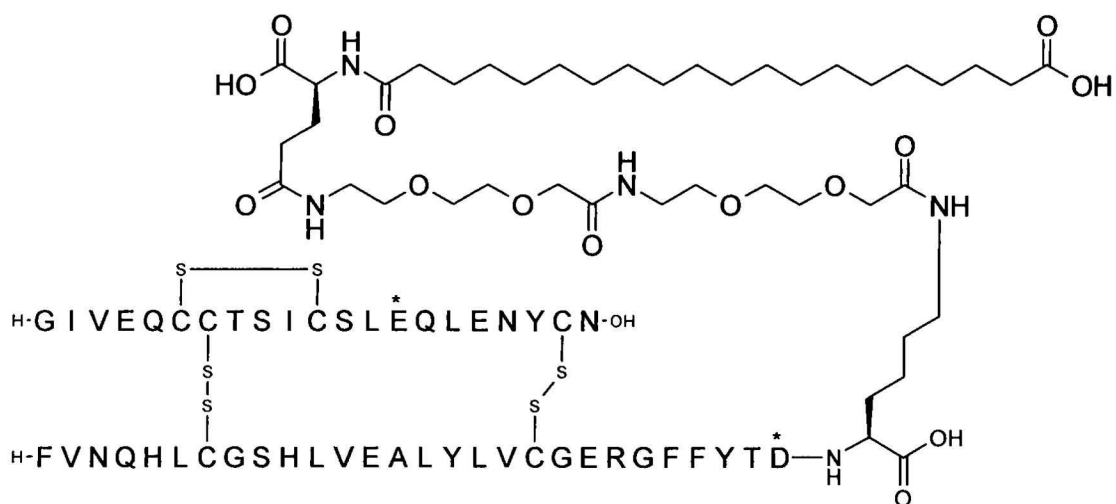
EXEMPLO 81. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B28D, B29K(N^{ϵ} octadecandioil- γ Glu-OEG-OEG),
desB30



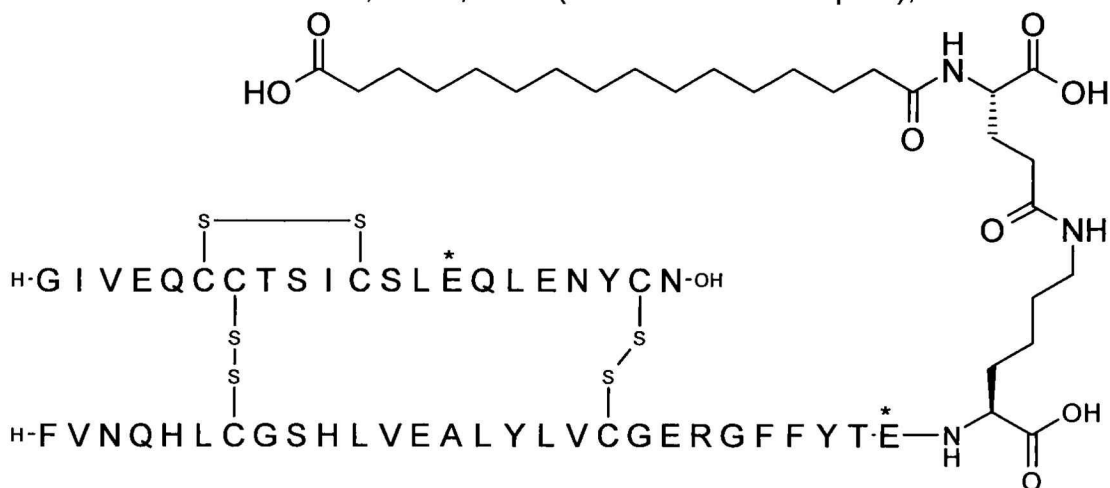
EXEMPLO 82. PROCEDIMENTO GERAL (A):

- 5 Insulina humana de A14E, B28D, B29K(N^{ϵ} eicosanodioil- γ Glu-OEG-OEG),
desB30



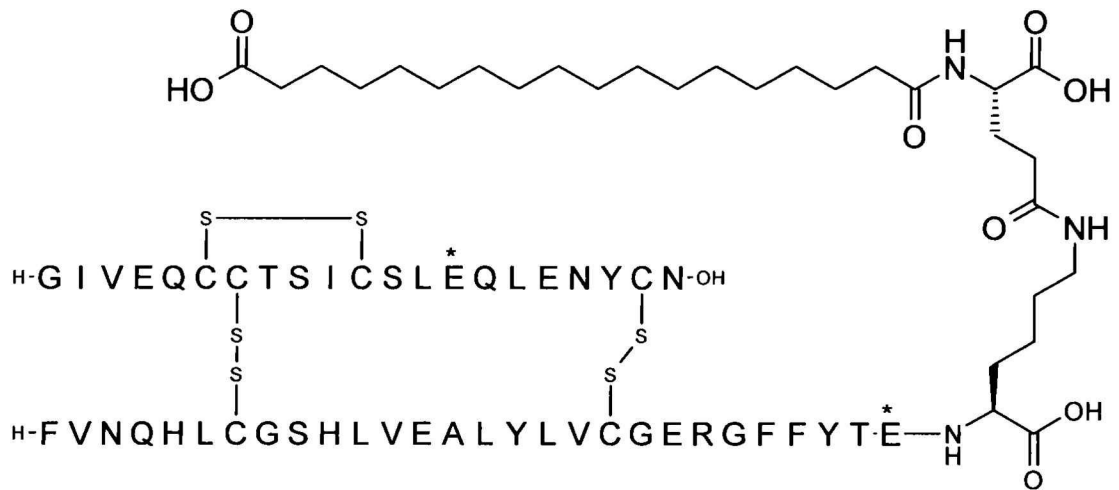
EXEMPLO 83. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B28E, B29K(N^{ϵ} hexadecandioil- γ Glu), desB30



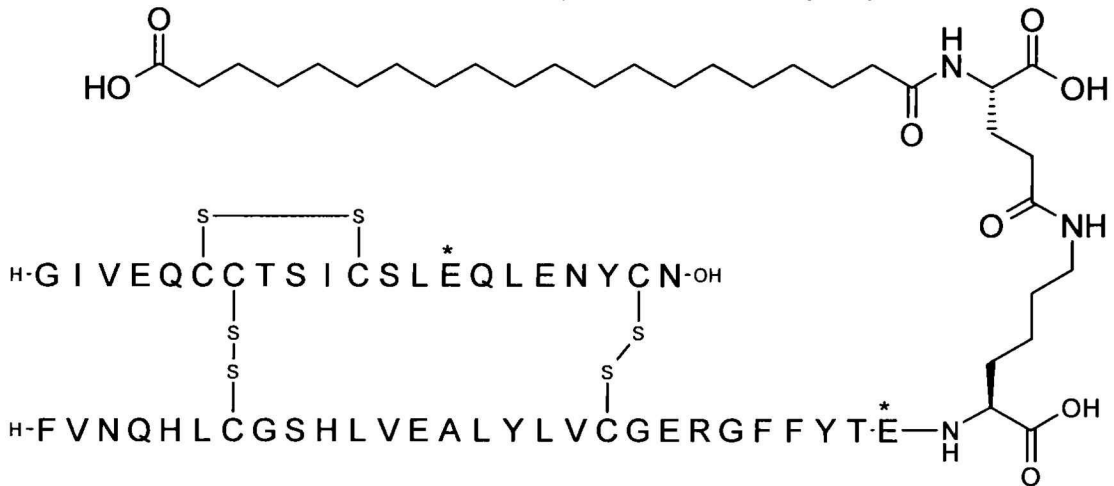
EXEMPLO 84. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B28E, B29K(N^{ϵ} octadecandioil- γ Glu), desB30



EXEMPLO 85. PROCEDIMENTO GERAL (A):

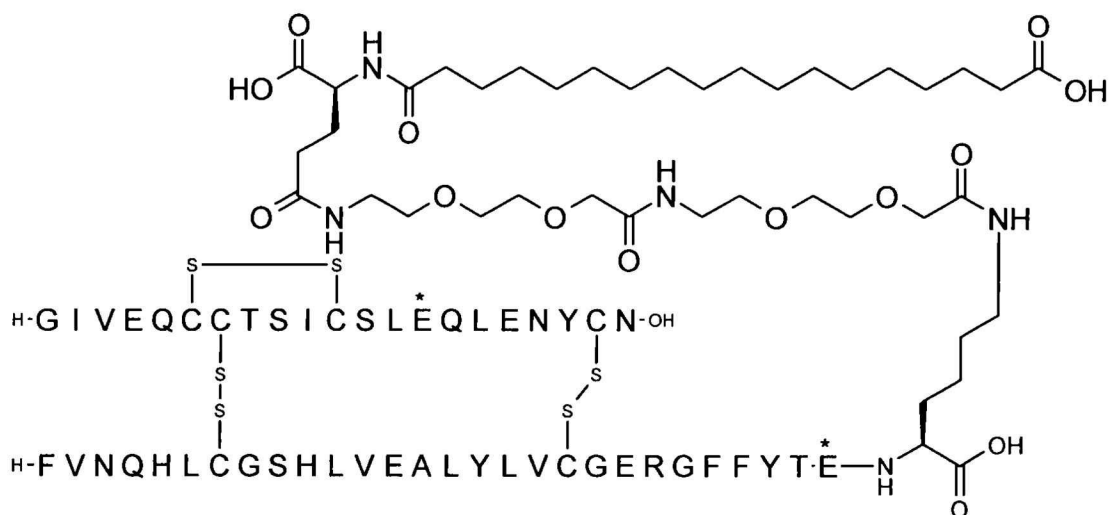
Insulina humana de A14E, B28E, B29K(*N*^ε eicosanodioil-γGlu), desB30



EXEMPLO 86. PROCEDIMENTO GERAL (A):

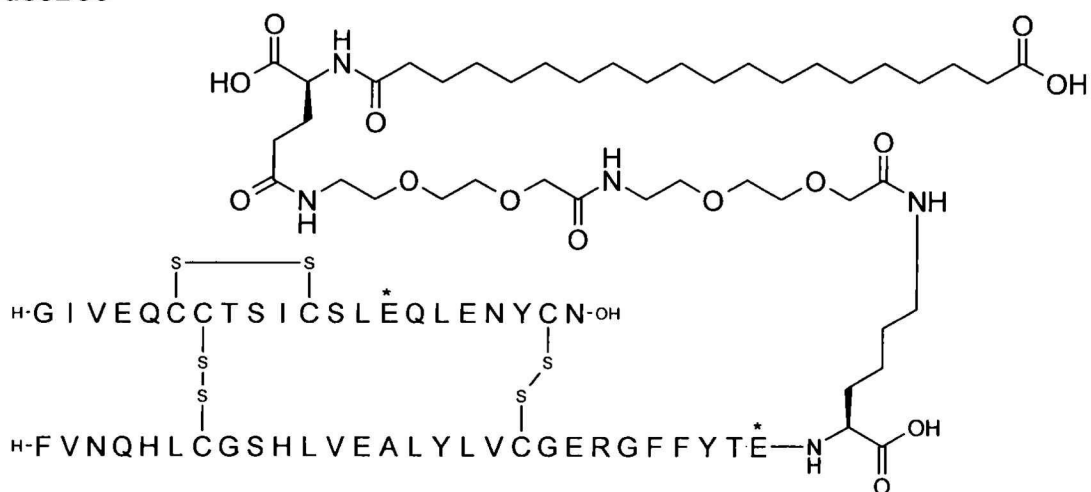
Insulina humana de A14E, B28E, B29K(*N*^ε octadecandioil-γGlu-OEG-OEG),

5 desB30



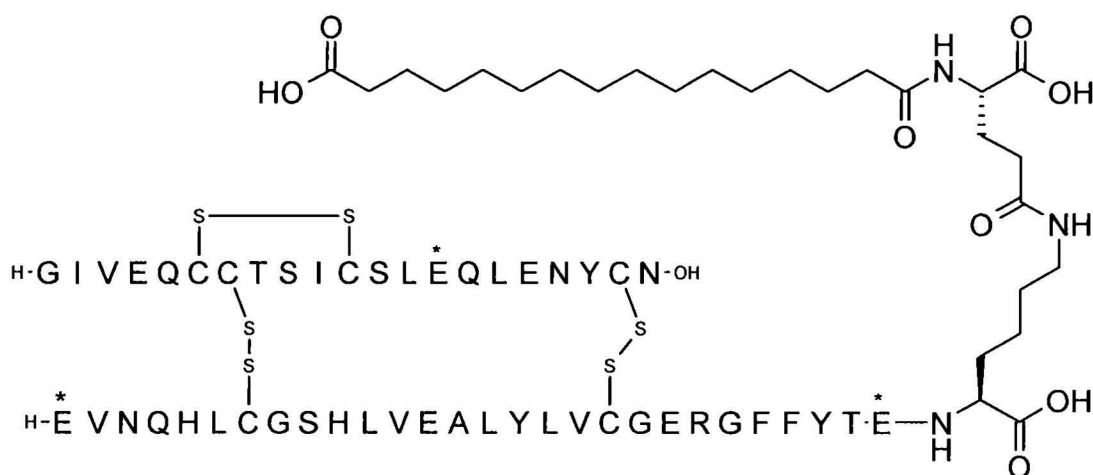
EXEMPLO 87. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B28E, B29K(N^e eicosanodioil- γ Glu-OEG-OEG), desB30



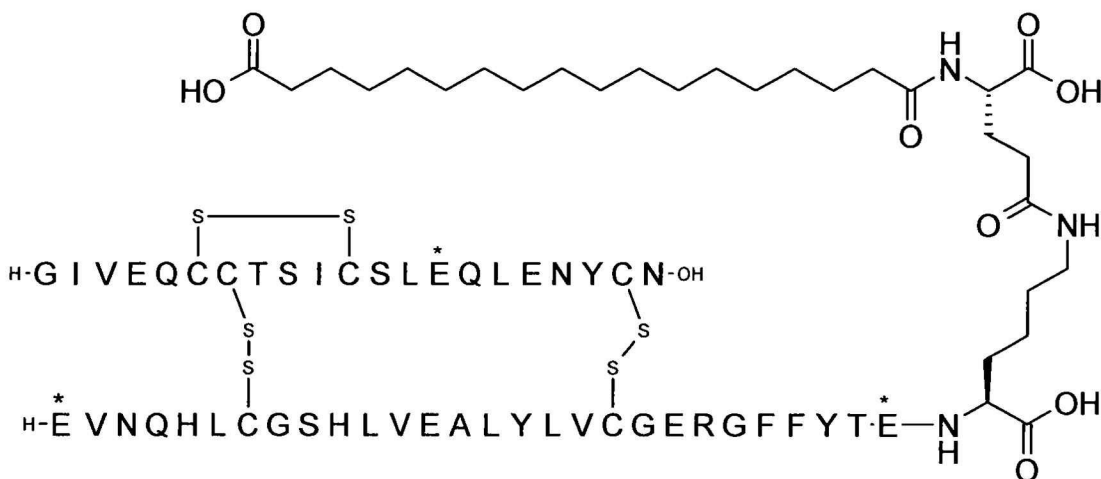
EXEMPLO 88. PROCEDIMENTO GERAL (A):

- 5 Insulina humana de A14E, B1E, B28E, B29K(N^e hexadecandioil- γ Glu), desB30



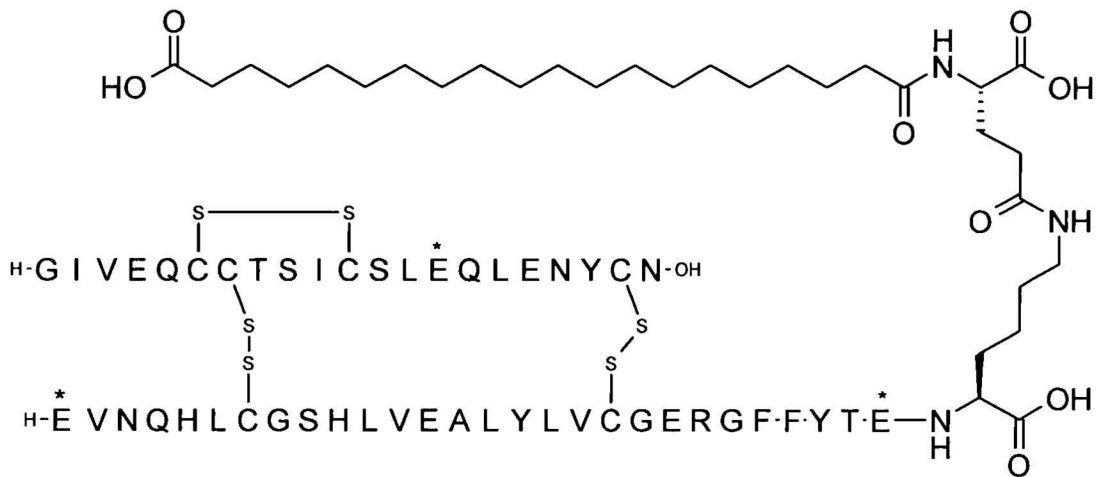
EXEMPLO 89. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B1E, B28E, B29K(N^ε octadecanodioil-γGlu), desB30



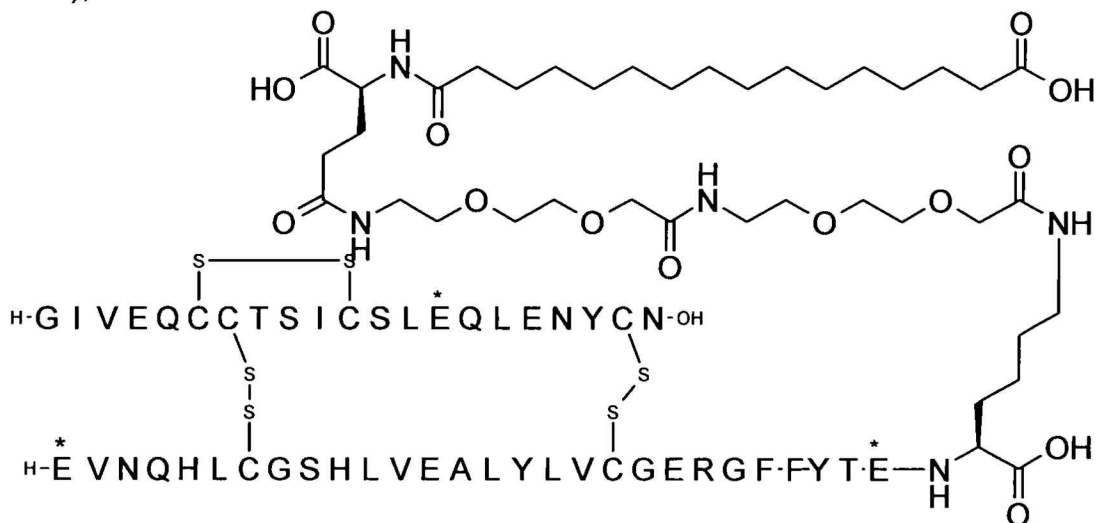
EXEMPLO 90. PROCEDIMENTO GERAL (A):

5 Insulina humana de A14E, B1E, B28E, B29K(N^ε eicosanodioil-γGlu), desB30



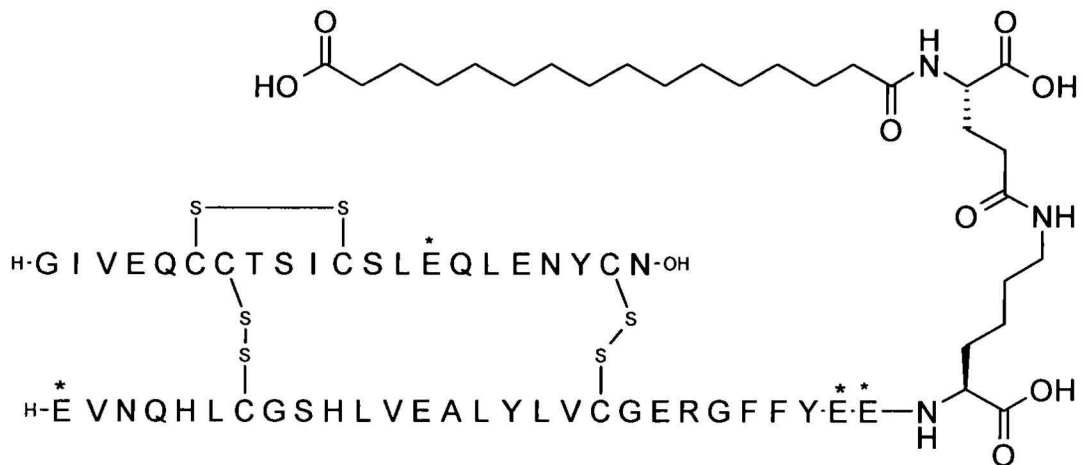
EXEMPLO 91. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B1E, B28E, B29K(*N*^ε hexadecandioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



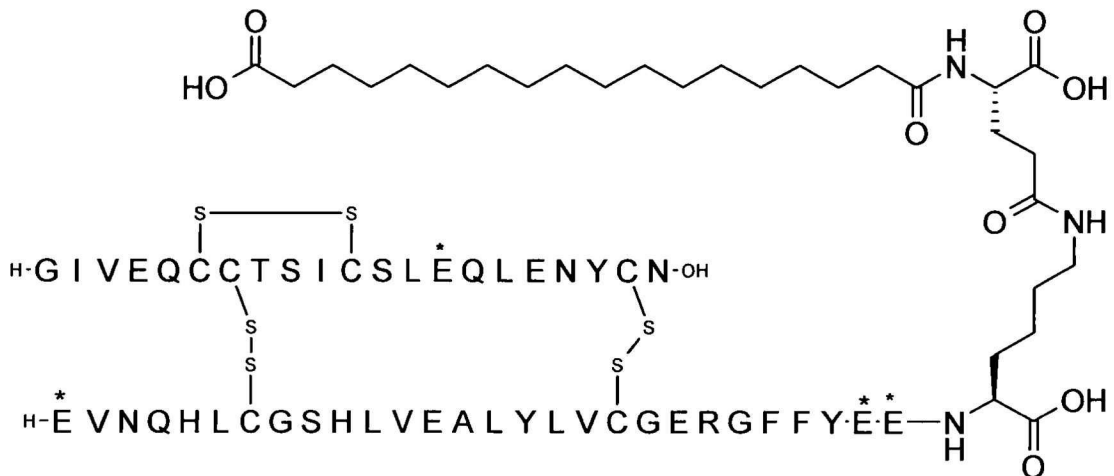
EXEMPLO 92. PROCEDIMENTO GERAL (A):

- 5 Insulina humana de A14E, B1E, B28E, B29K(*N*^ε octadecandioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



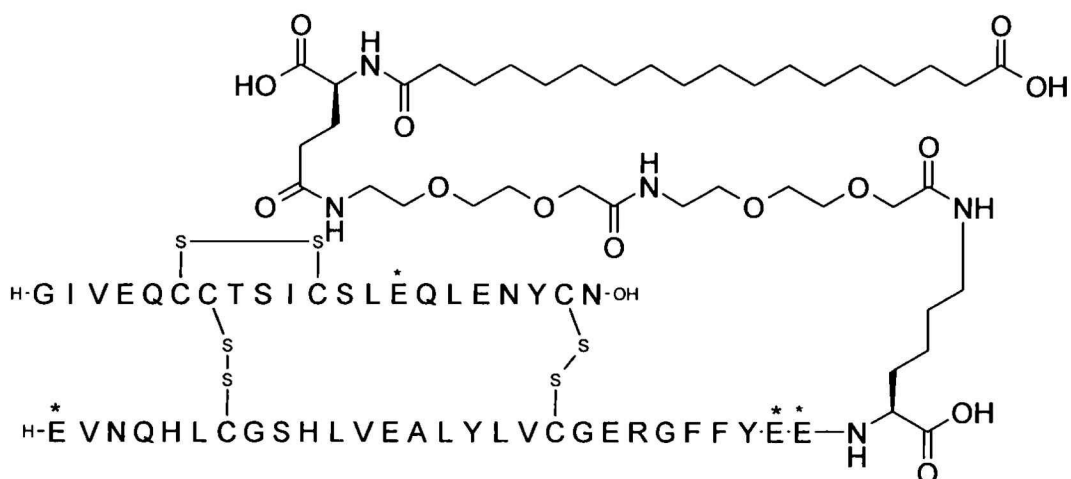
EXEMPLO 95. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B1E, B27E, B28E, B29K(N^ε octadecanodioil-γGlu), desB30



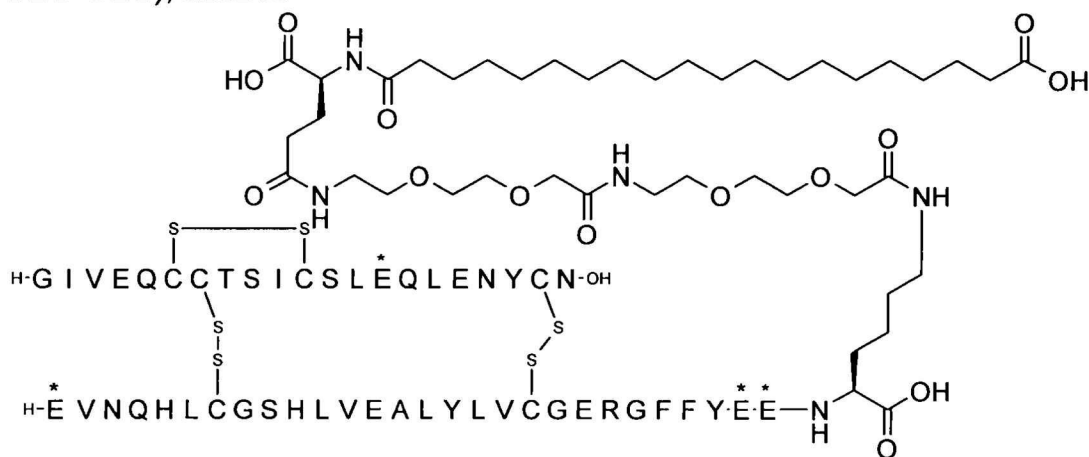
EXEMPLO 96. PROCEDIMENTO GERAL (A):

- 5 Insulina humana de A14E, B1E, B27E, B28E, B29K(N^ε eicosanodioil-γGlu), desB30



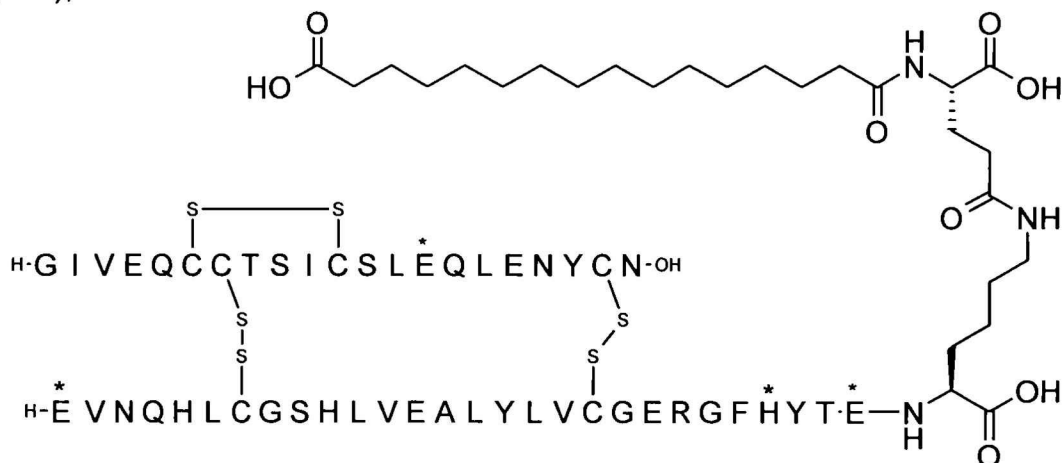
EXEMPLO 99. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B1E, B27E, B28E, B29K(N^é eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



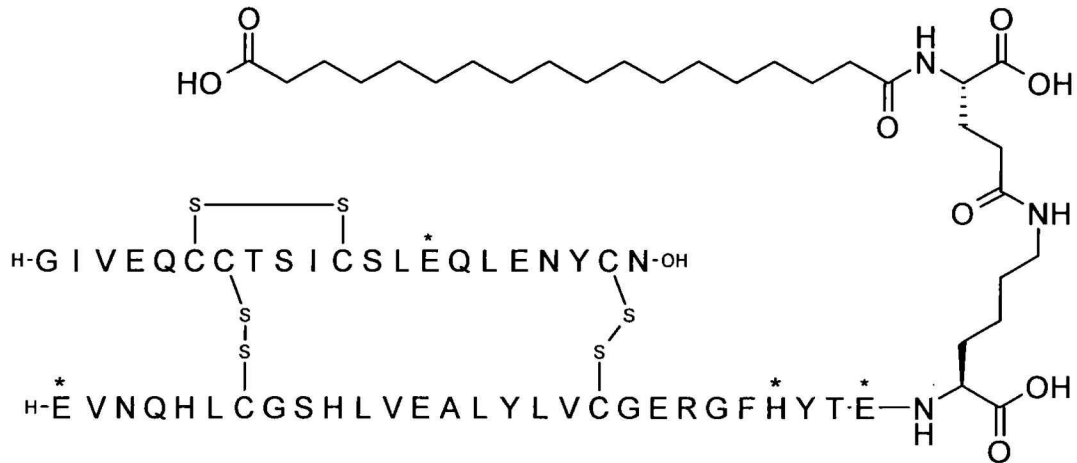
EXEMPLO 100. PROCEDIMENTO GERAL (A):

5 Insulina humana de A14E, B1E, B25H, B28E, B29K(N^é hexadecandioil-γGlu), desB30



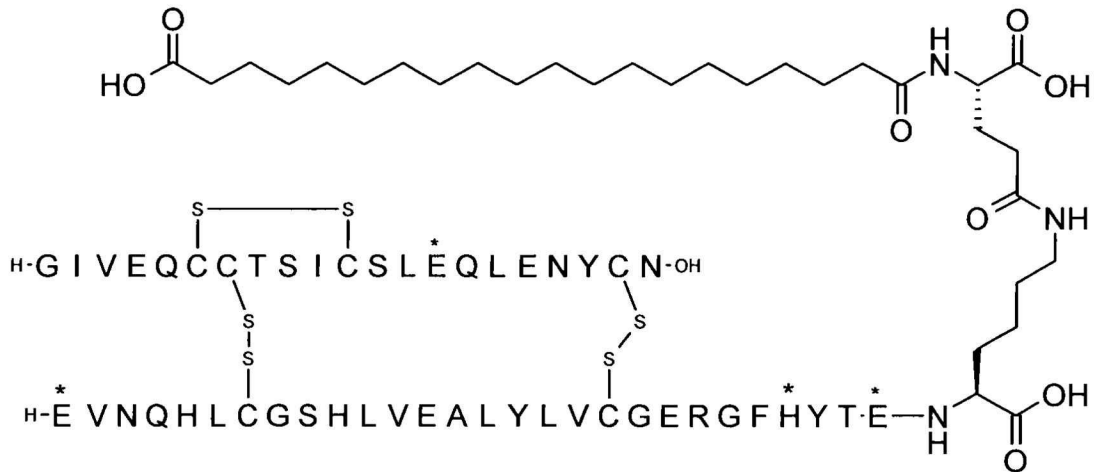
EXEMPLO 101. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B1E, B25H, B28E, B29K(N^ε octadecandioil-γGlu), desB30



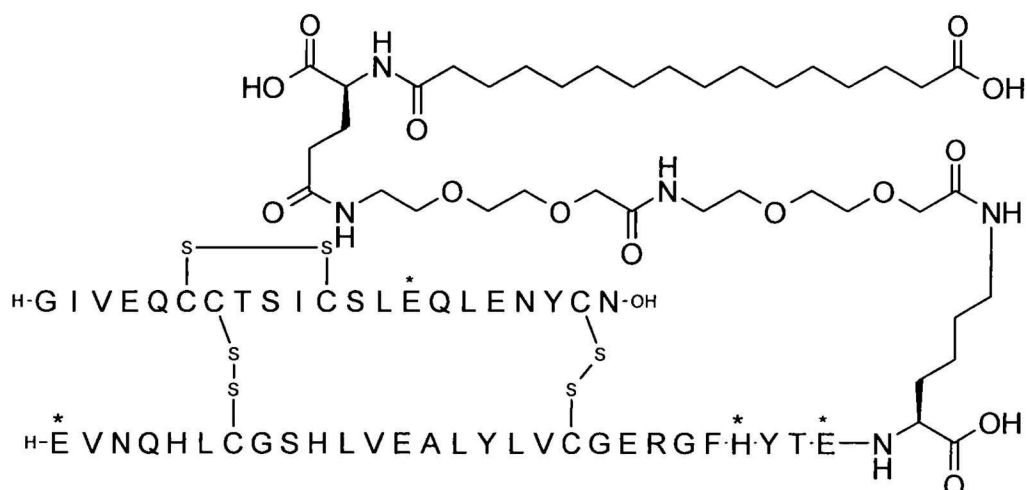
EXEMPLO 102. PROCEDIMENTO GERAL (A):

- 5 Insulina humana de A14E, B1E, B25H, B28E, B29K(N^ε eicosanodioil-γGlu), desB30



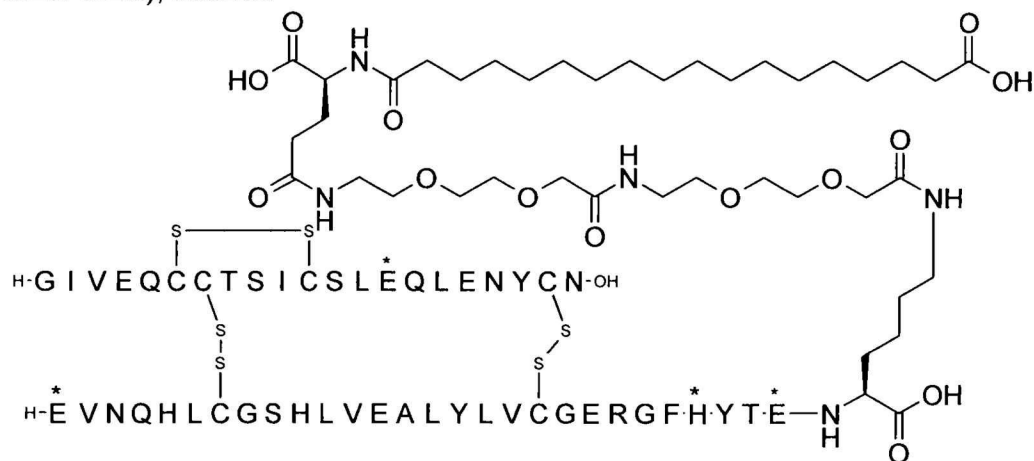
EXEMPLO 103. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B1E, B25H, B28E, B29K(N^ε hexadecandioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



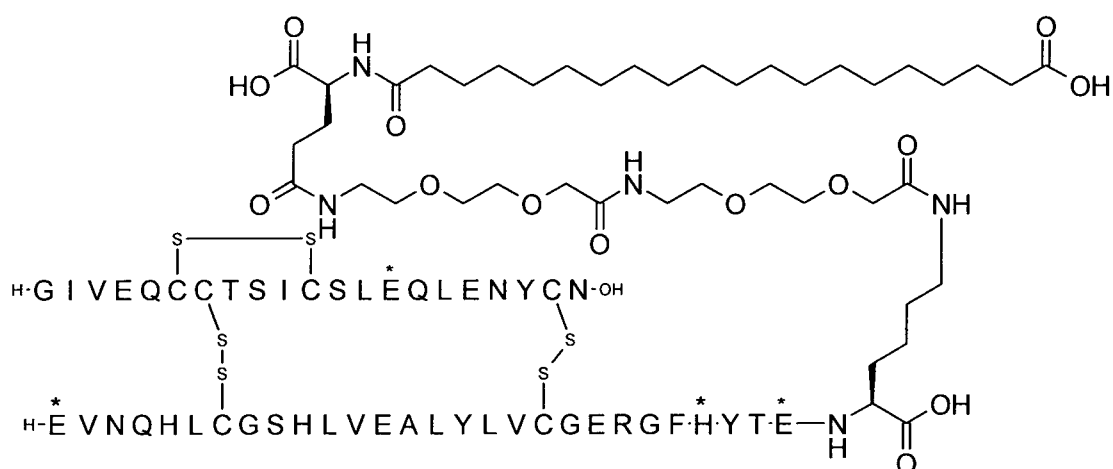
EXEMPLO 104. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B1E, B25H, B28E, B29K(*N*^e octadecandioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



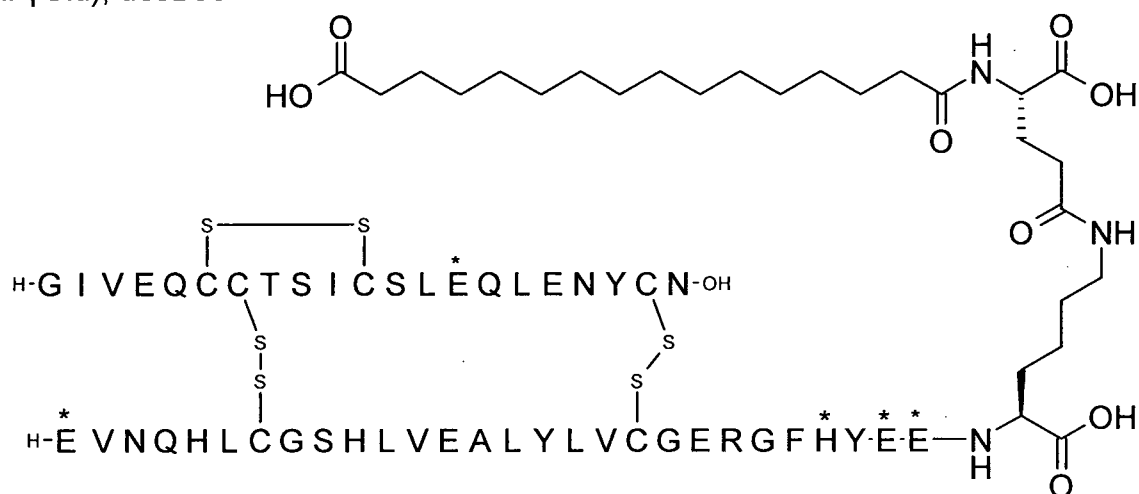
EXEMPLO 105. PROCEDIMENTO GERAL (A):

- 5 Insulina humana de A14E, B1E, B25H, B28E, B29K(*N*^e eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



EXEMPLO 106. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B1E, B25H, B27E, B28E, B29K(N^o hexadecandio-il-γGlu), desB30

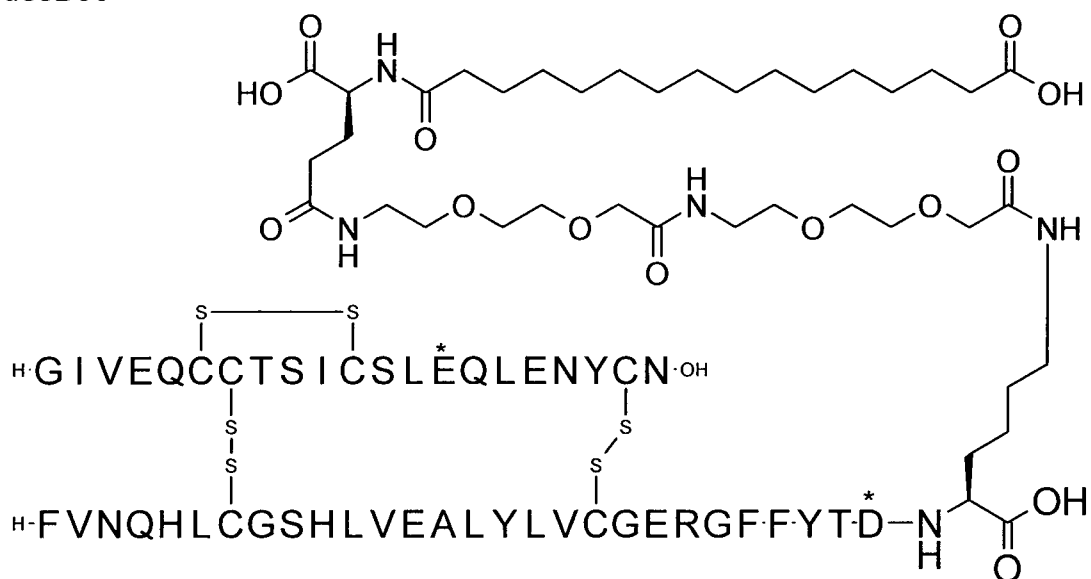


EXEMPLO 107. PROCEDIMENTO GERAL (A):

- 5 Insulina humana de A14E, B1E, B25H, B27E, B28E, B29K(N^o octadecandio-il-γGlu), desB30

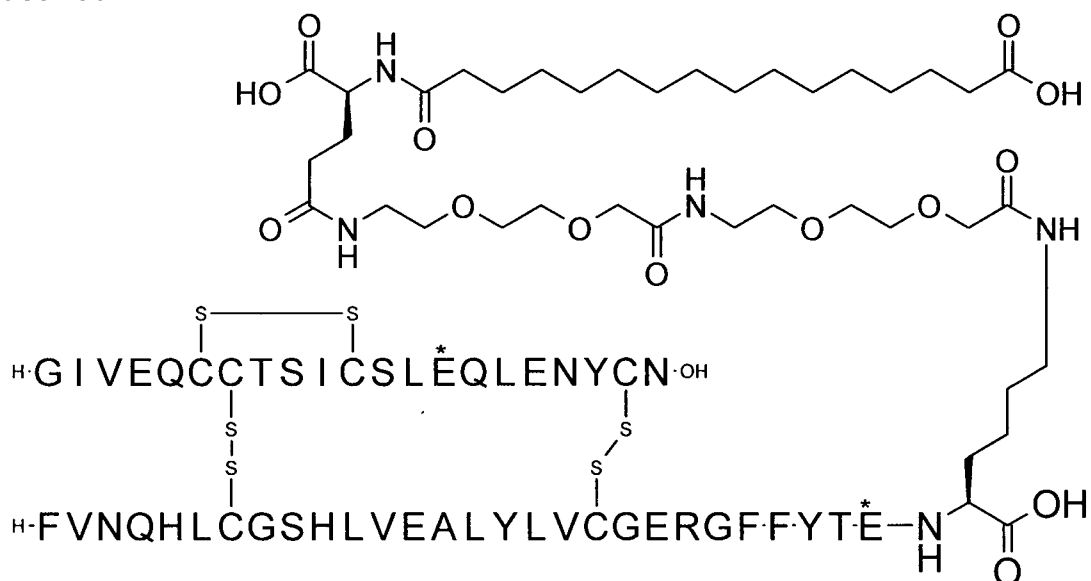
EXEMPLO 112. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B28D, B29K(N^hhexadecanodioil-γGlu-OEG-OEG),
desB30



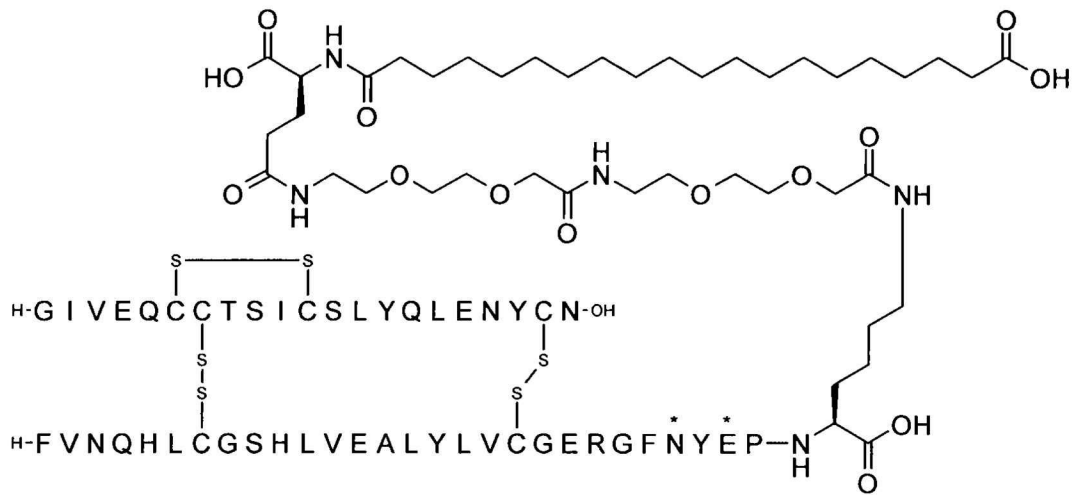
EXEMPLO 113. PROCEDIMENTO GERAL (A):

5 Insulina humana de A14E, B28E, B29K(N^hhexadecanodioil-γGlu-OEG-OEG),
desB30



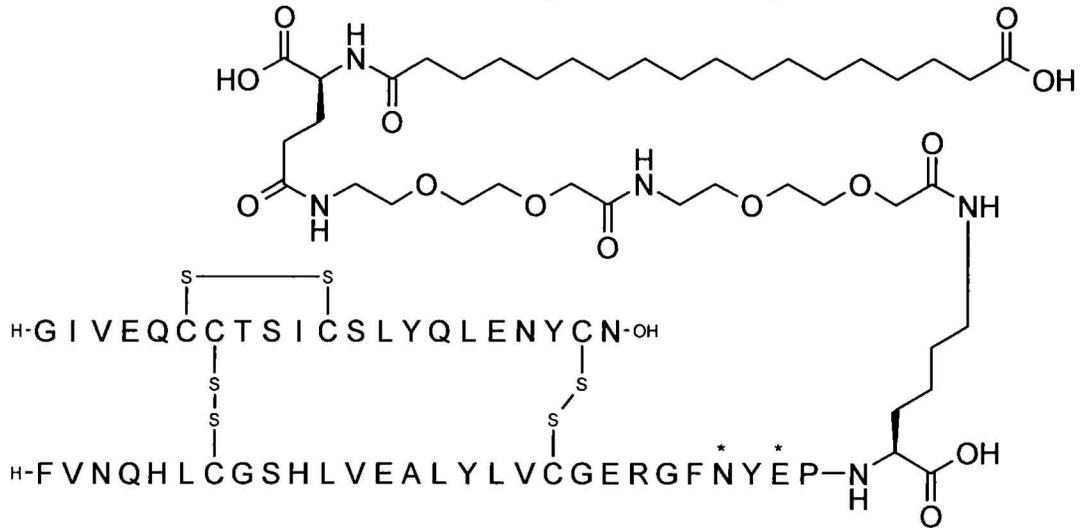
EXEMPLO 114. PROCEDIMENTO GERAL (A):

B25N, B27E, B29K(N^heicosanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



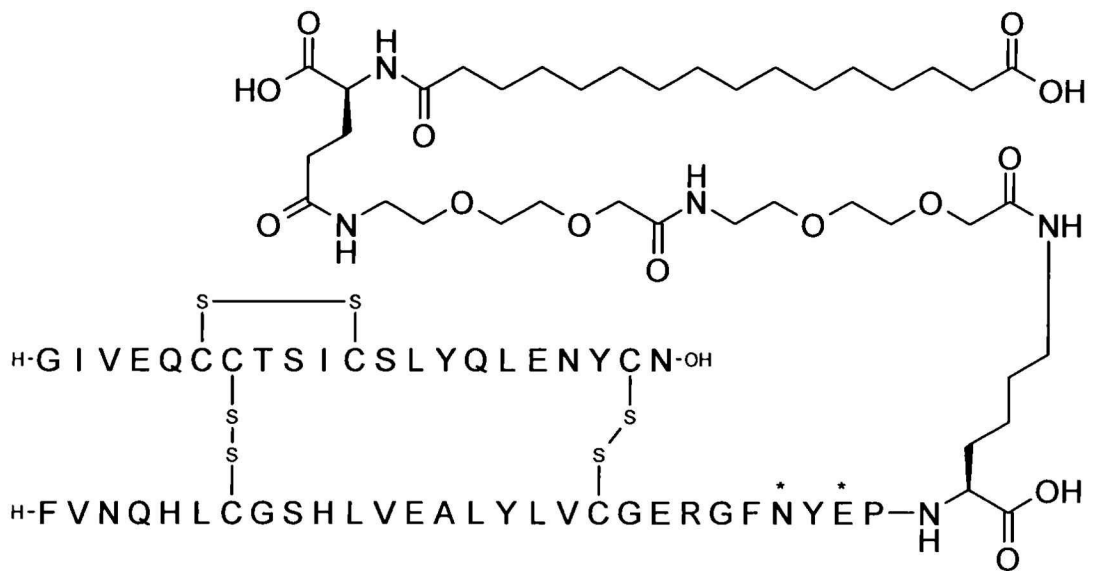
EXEMPLO 115. PROCEDIMENTO GERAL (A):

B25N, B27E, B29K(N^{f} octadecanodioil- γ Glu-OEG-OEG), desB30



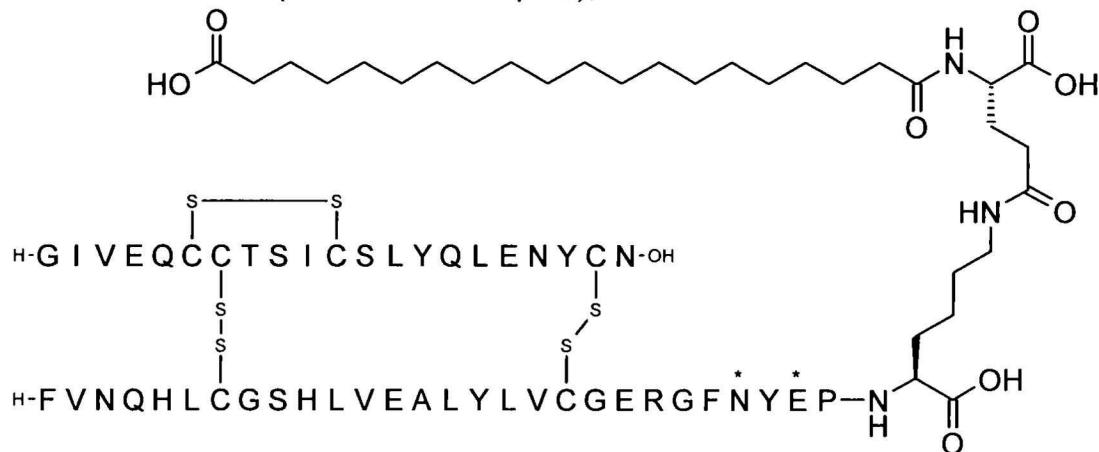
EXEMPLO 116. PROCEDIMENTO GERAL (A):

B25N, B27E, B29K(N^{f} hexadecanodioil- γ Glu-OEG-OEG), desB30



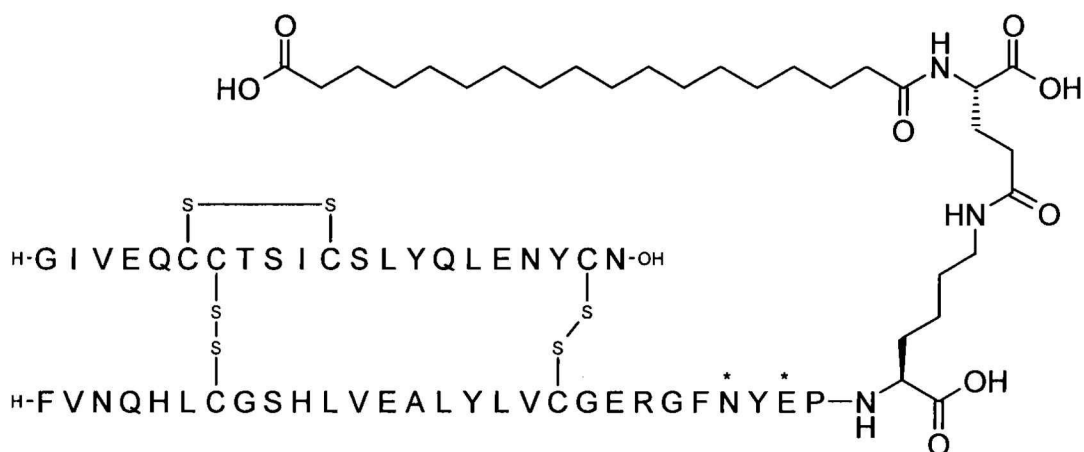
EXEMPLO 117. PROCEDIMENTO GERAL (A):

B25N, B27E, B29K(*N*^eeicosanodioil- γ Glu), desB30



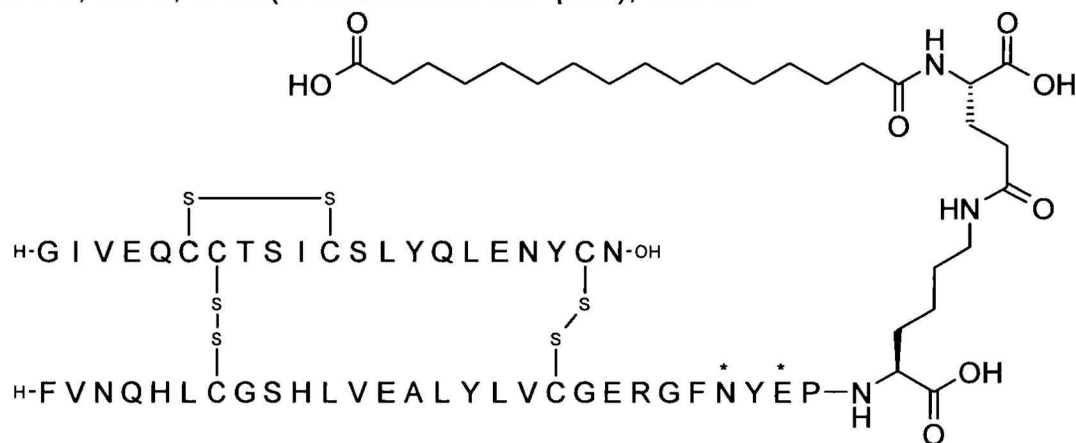
EXEMPLO 118. PROCEDIMENTO GERAL (A):

B25N, B27E, B29K(*N*^eoctadecanodioil- γ Glu), desB30



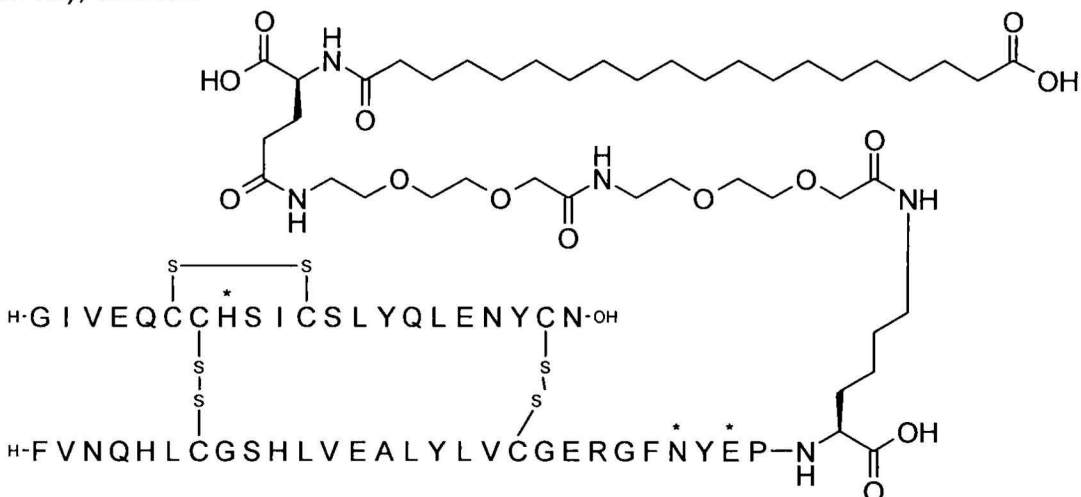
EXEMPLO 119. PROCEDIMENTO GERAL (A):

B25N, B27E, B29K(*N*^εhexadecanodioil-γGlu), desB30



EXEMPLO 120. PROCEDIMENTO GERAL (A):

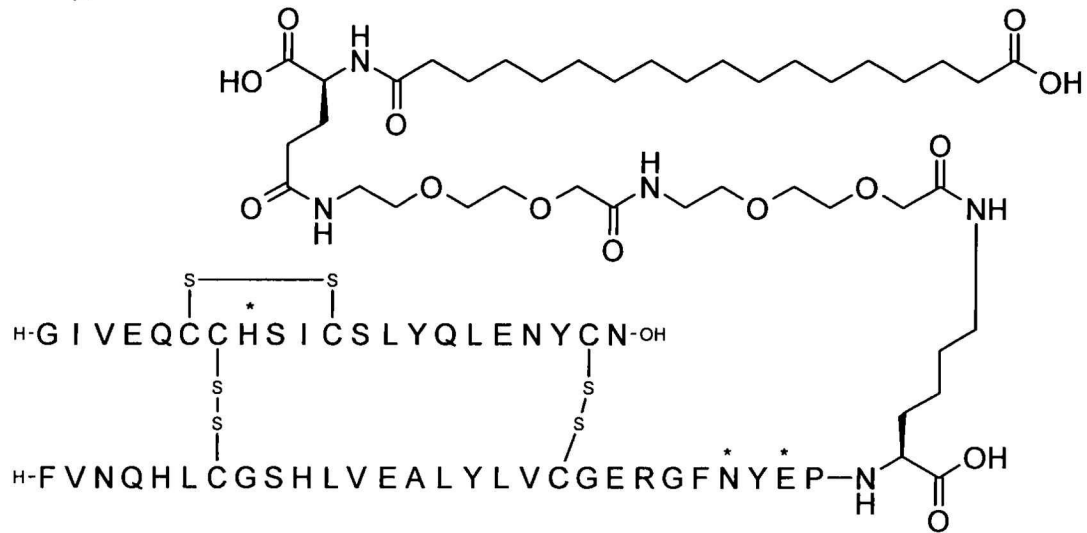
Insulina humana de A8H, B25N, B27E, B29K(*N*^εeicosanodioil-γGlu-OEG-
5 OEG), desB30



EXEMPLO 121. PROCEDIMENTO GERAL (A):

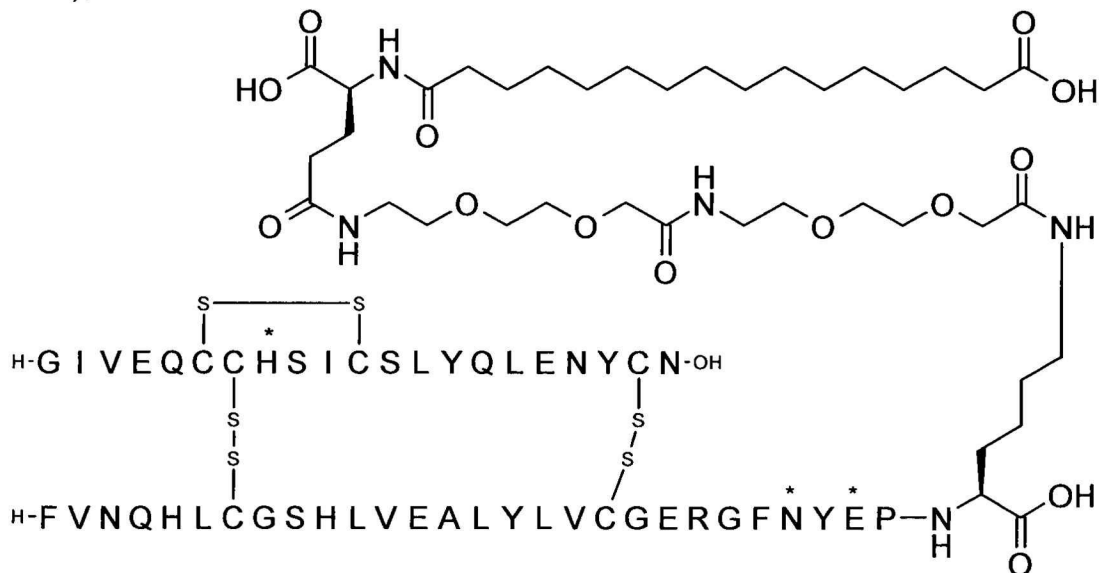
Insulina humana de A8H, B25N, B27E, B29K(*N*^εoctadecanodioil-γGlu-OEG-

OEG), desB30



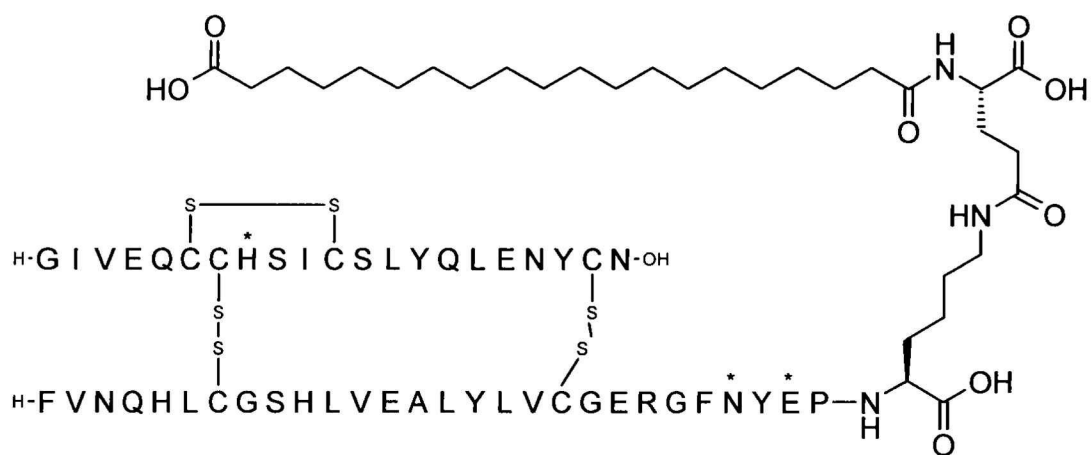
EXEMPLO 122. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A8H, B25N, B27E, B29K(N^εhexadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



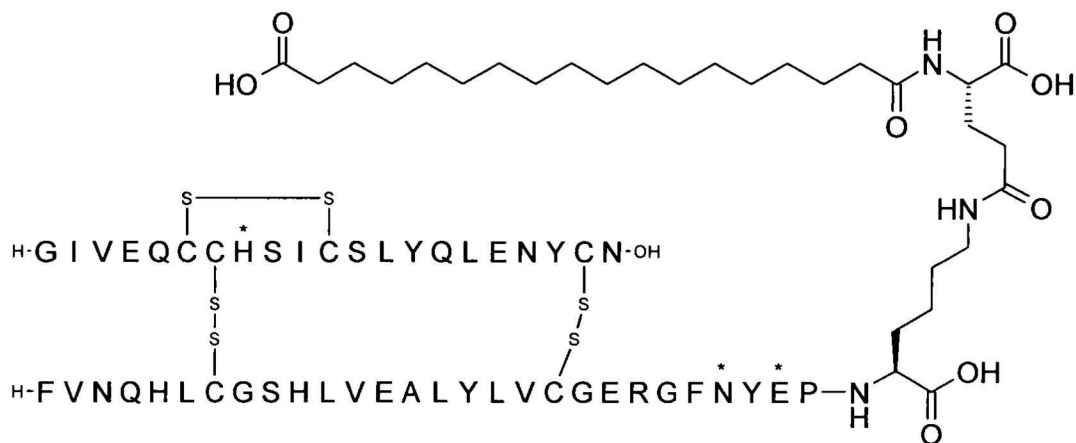
5 EXEMPLO 123. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A8H, B25N, B27E, B29K(N^εeicosanodioil-γGlu), desB30



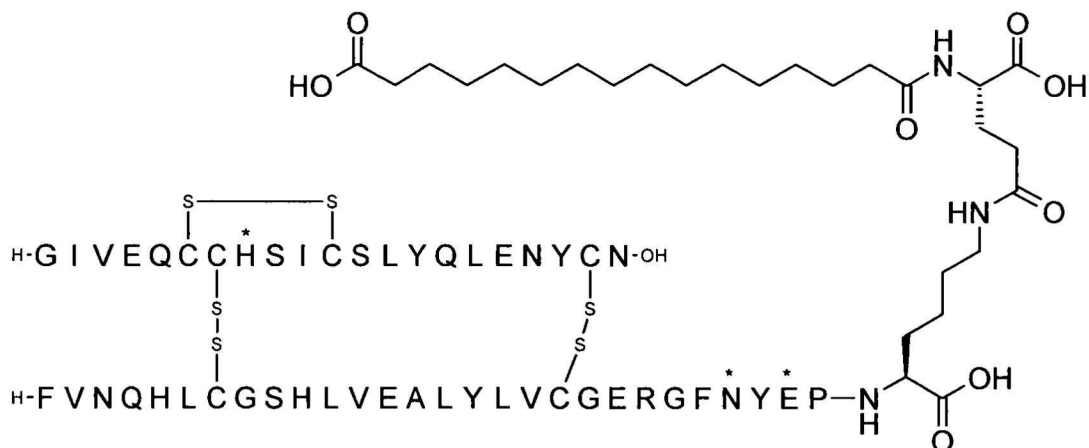
EXEMPLO 124. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A8H, B25N, B27E, B29K(*N*^ooctadecanodioil-γGlu), desB30



EXEMPLO 125. PROCEDIMENTO GERAL (A):

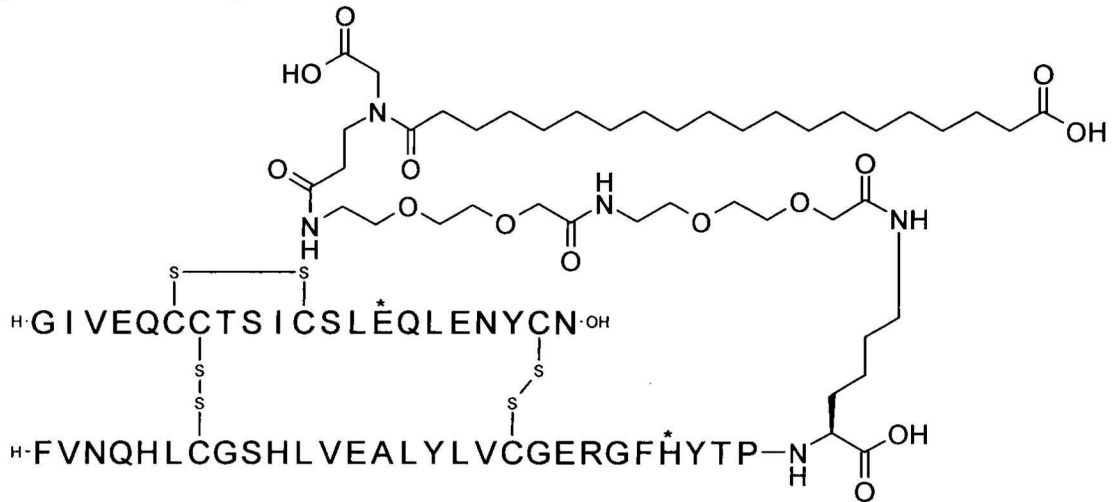
- 5 Insulina humana de A8H, B25N, B27E, B29K(*N*^ohexadecanodioil-γGlu), desB30



EXEMPLO 126. PROCEDIMENTO GERAL (A):

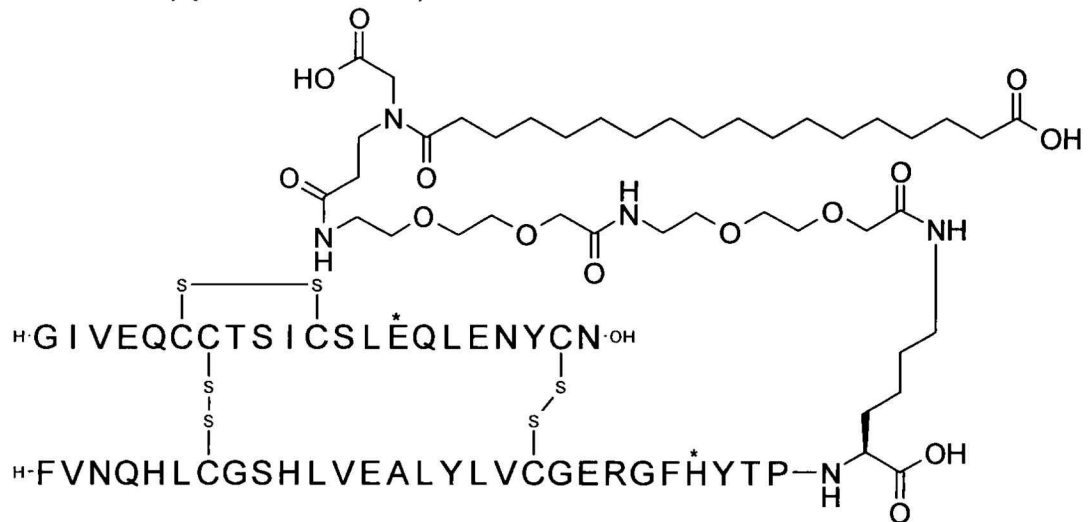
Insulina humana de A14E, B25H, B29K(*N*^o (N-icosanodioil-N-carboximetil)-

β Ala-OEG-OEG), desB30



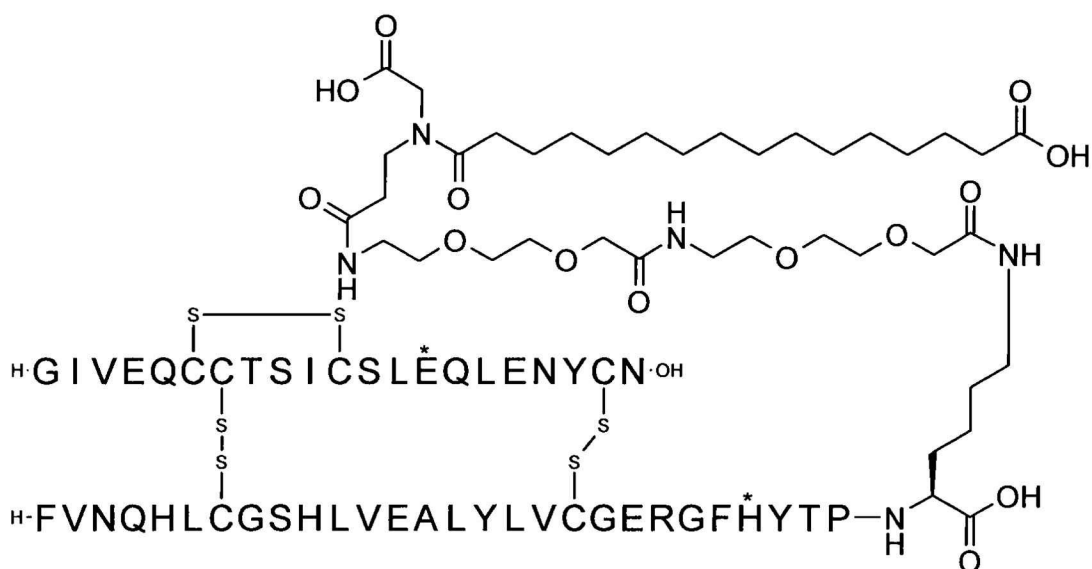
EXEMPLO 127. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^{ϵ} (N-octadecanodioil-N-carboximetil)- β Ala-OEG-OEG), desB30



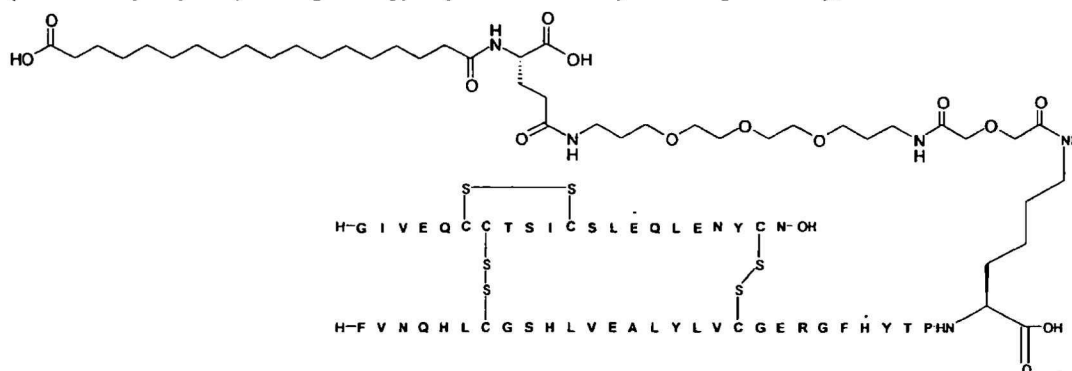
5 EXEMPLO 128. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^{ϵ} (N-hexadecanodioil-N-carboximetil)- β Ala-OEG-OEG), desB30



EXEMPLO 129. PROCEDIMENTO GERAL (A):

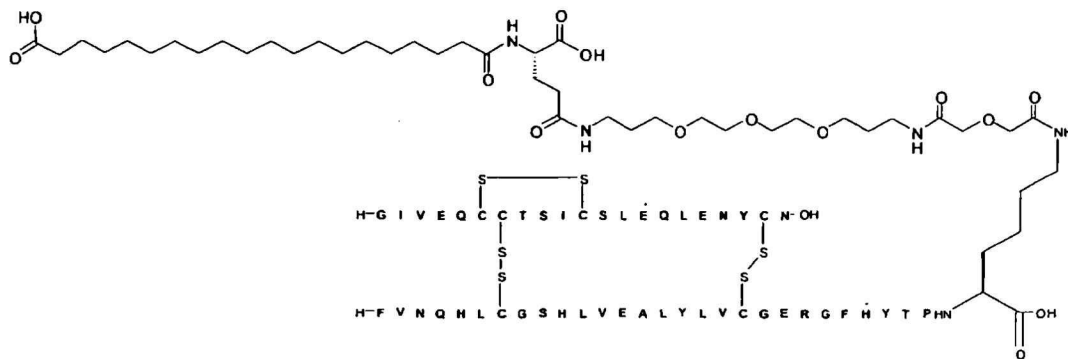
Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^{ϵ} octadecanodioil- γ Glu-2-[(3-{2-[2-(3-aminopropóxi)etóxi]etóxi}propilcarbamoil)metóxi]acetila), desB30



- 5 Ácido [(3-{2-[2-(3-aminopropóxi)etóxi]etóxi}propilcarbamoil) metóxi] acético pode ser preparado como descrito (*Eur. J. Med. Chem.* 2007, 42, 114) e reagido com ω -(terc-butil-carbóxi-heptadecanoil- γ -L-glutamil(OSu)-OtBu). O produto pode ser ativado usando TSTU e acoplado à insulina humana A14E, B25H, desB30 em 0,1 M de Na_2CO_3 em pH 10,5 para fornecer o produto.

10 EXEMPLO 130. PROCEDIMENTO GERAL (A):

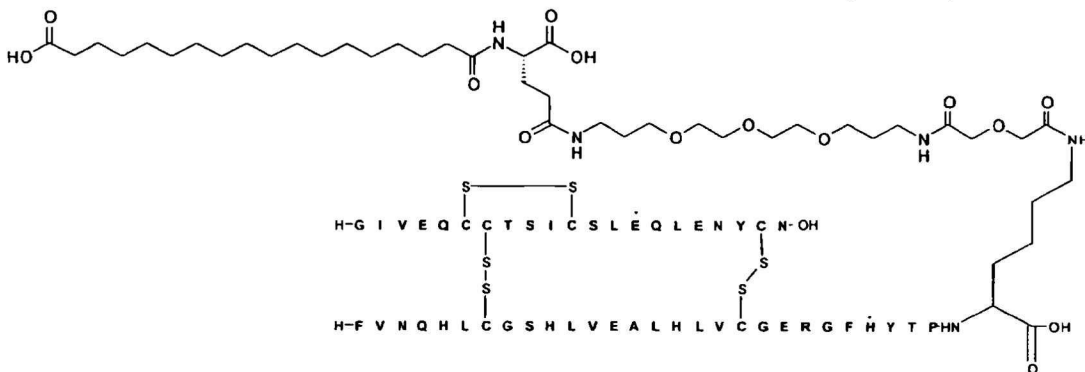
Insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^{ϵ} eicosanodioil- γ Glu-2-[(3-{2-[2-(3-aminopropóxi)etóxi]etóxi}propilcarbamoil)metóxi]acetila), desB30



- Ácido [(3-{2-[2-(3-aminopropóxi)etóxi]etóxi} propilcarbamoil) metóxi] acético pode ser preparado como descrito (*Eur. J. Med. Chem.* 2007, 42, 114) e reagido com ω -(terc-butil-carbóxi-nonadecanoil- γ -L-glutamil(OSu)-OtBu). O produto pode ser ativado usando TSTU e acoplado a A14E, B25H, desB30 em 0,1 M de Na_2CO_3 em pH 10,5 para fornecer o produto.

EXEMPLO 131. PROCEDIMENTO GERAL (A):

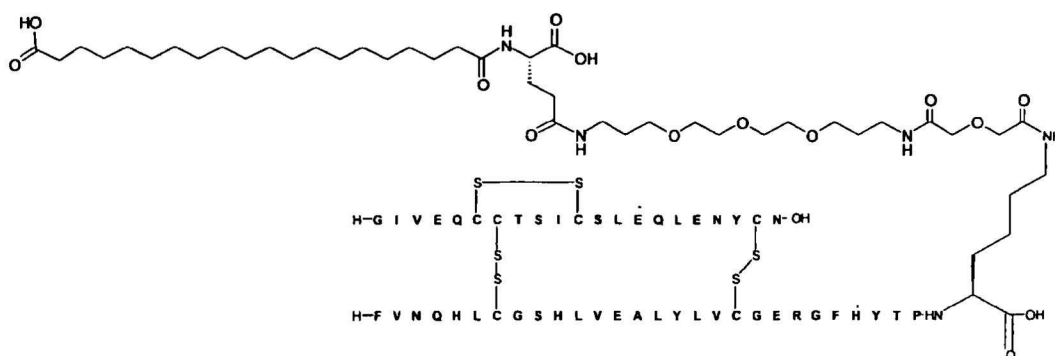
Insulina humana de A14E, B16H, B25H, B29K(N^{e} octadecanodioil - γ Glu-2-[(3-{2-[2-(3-aminopropóxi)etóxi]etóxi}propilcarbamoil)metóxi]acetila), desB30



- Ácido [(3-{2-[2-(3-aminopropóxi)etóxi]etóxi} propilcarbamoil) metóxi] acético pode ser preparado como descrito (*Eur. J. Med. Chem.* 2007, 42, 114) e reagido com ω -(terc-butil-carbóxi-heptadecanoil- γ -L-glutamil(OSu)-OtBu). O produto pode ser ativado usando TSTU e acoplado à insulina humana de A14E, B16H, B25H, desB30 em 0,1 M de Na_2CO_3 em pH 10,5 para fornecer o produto.

EXEMPLO 132. PROCEDIMENTO GERAL (A):

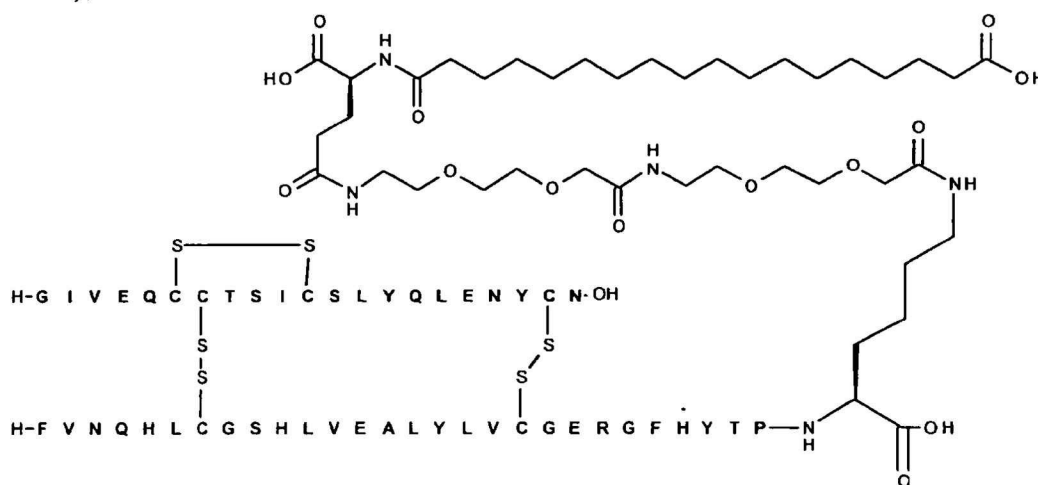
Insulina humana de A14E, B16H, B25H, B29K(N^{e} eicosanodioil - γ Glu-2-[(3-{2-[2-(3-aminopropóxi)etóxi]etóxi}propilcarbamoil)metóxi]acetila), desB30



- Ácido [(3-{2-[2-(3-aminopropóxi)etóxi]etóxi} propilcarbamoil) metóxi] cético pode ser preparado como descrito (*Eur. J. Med. Chem.* 2007, 42, 114) e reagido com ω -(terc-butil-carbóxi-nonadecanoil- γ -L-glutamil(OSu)-OtBu). O produto pode ser ativado usando TSTU e acoplado a insulina humana de A14E, B16H, B25H, desB30 em 0,1 M de Na_2CO_3 em pH 10,5 para fornecer o produto.

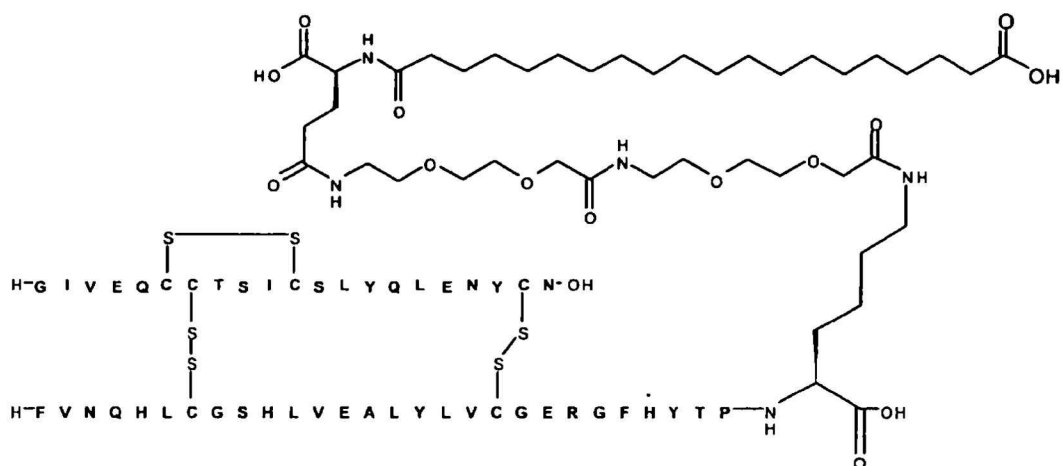
EXEMPLO 133. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de B25H, B29K(N^{ϵ} Octadecanodioil- γ Glu-OEG-OEG), desB30



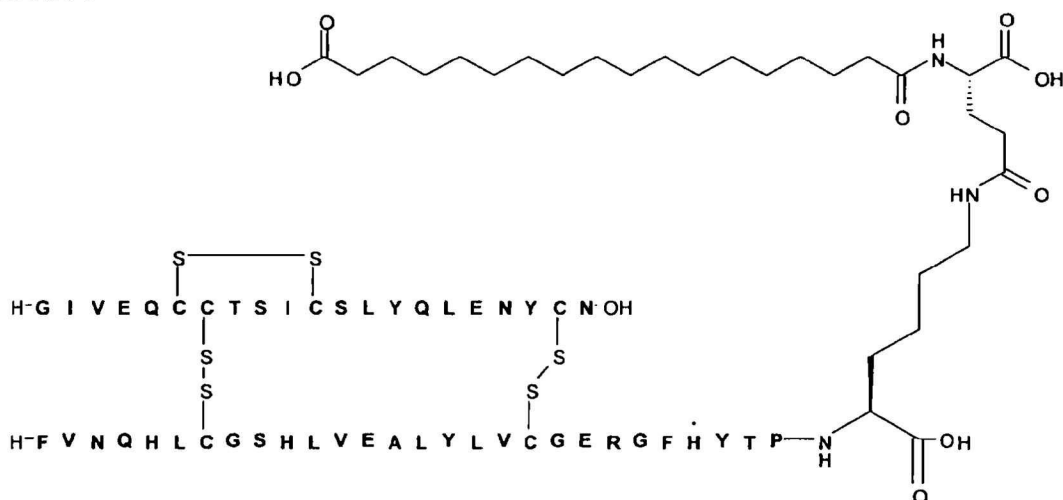
- 10 EXEMPLO 134. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de B25H, B29K(N^{ϵ} Eicosanodioil- γ Glu-OEG-OEG), desB30



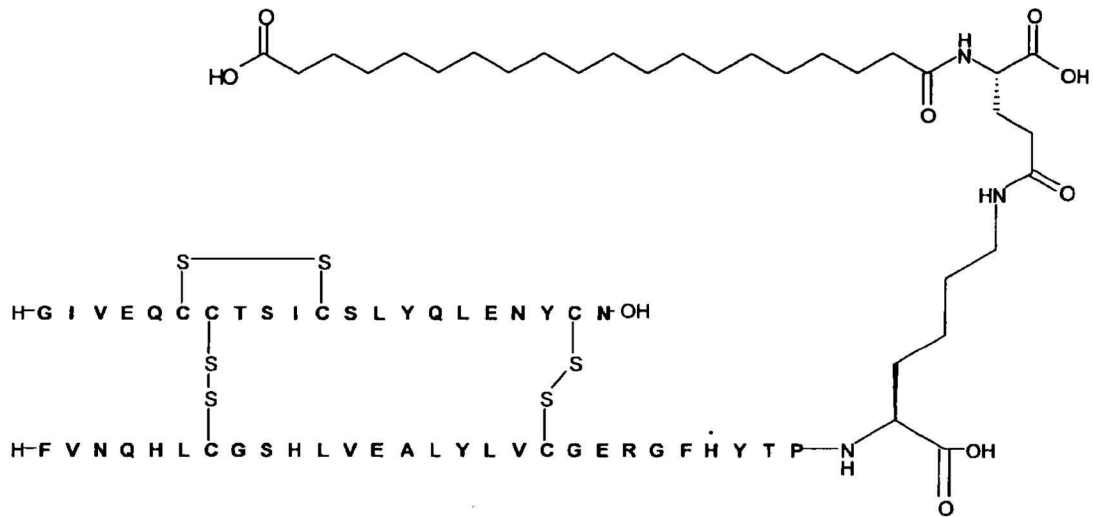
EXEMPLO 135. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de B25H, B29K(N^eOctadecanodioil-γGlu),
desB30



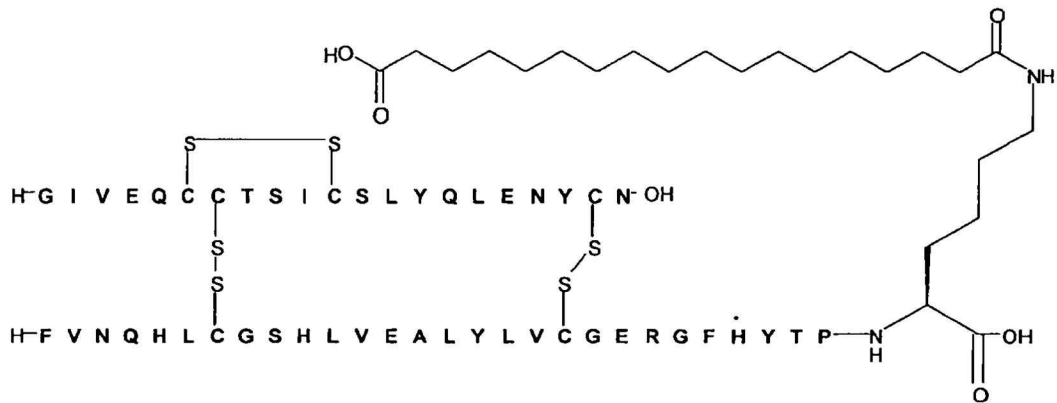
EXEMPLO 136. PROCEDIMENTO GERAL (A):

5 Insulina humana de B25H, B29K(N^eEicosanodioil-γGlu), desB30



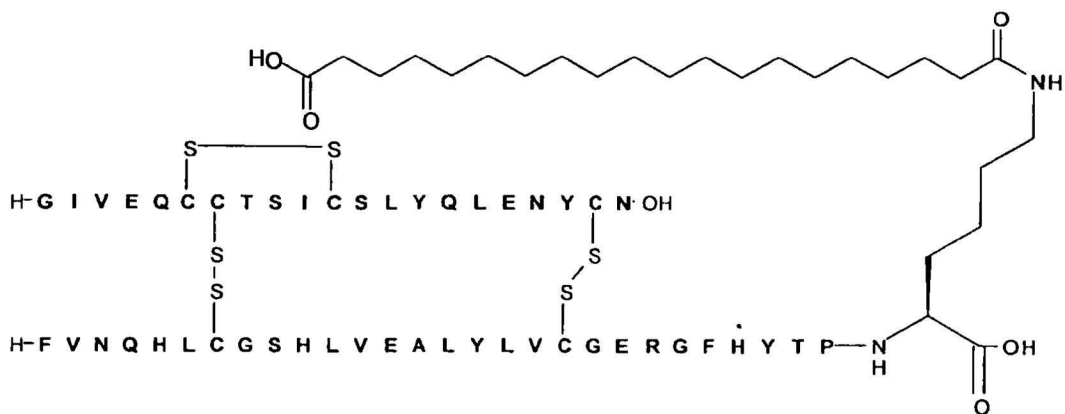
EXEMPLO 137. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de B25H, B29K(N^fOctadecanodioil), desB30



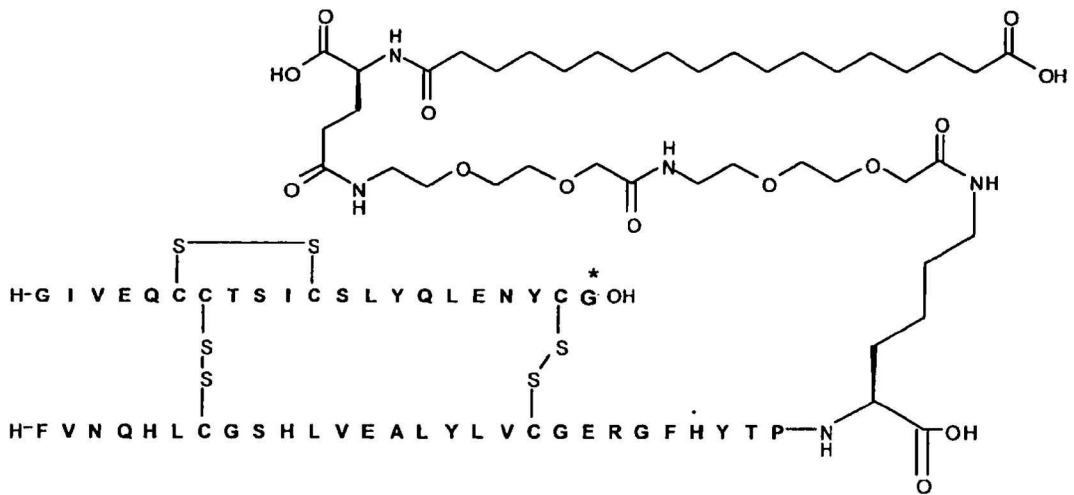
EXEMPLO 138. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de B25H, B29K(N^fEicosanodioila), desB30



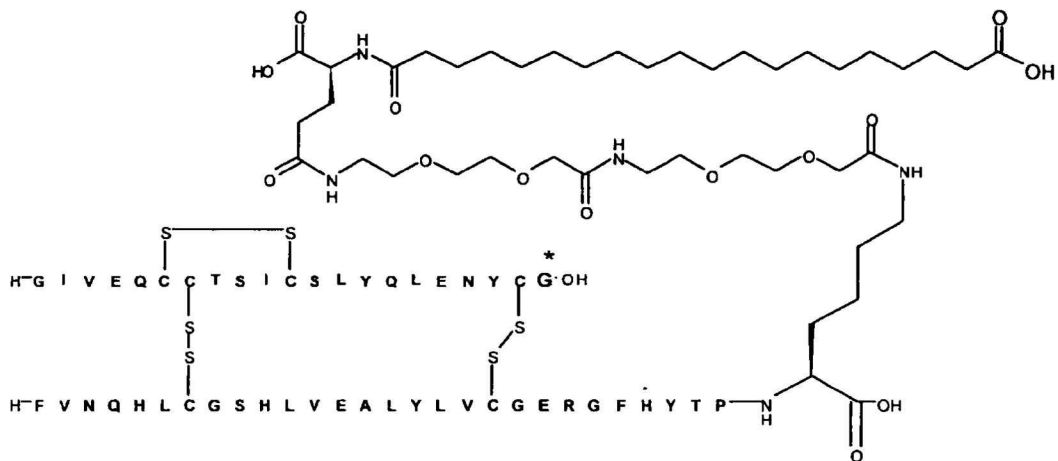
5 EXEMPLO 139. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de B25H, B29K(N^fOctadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



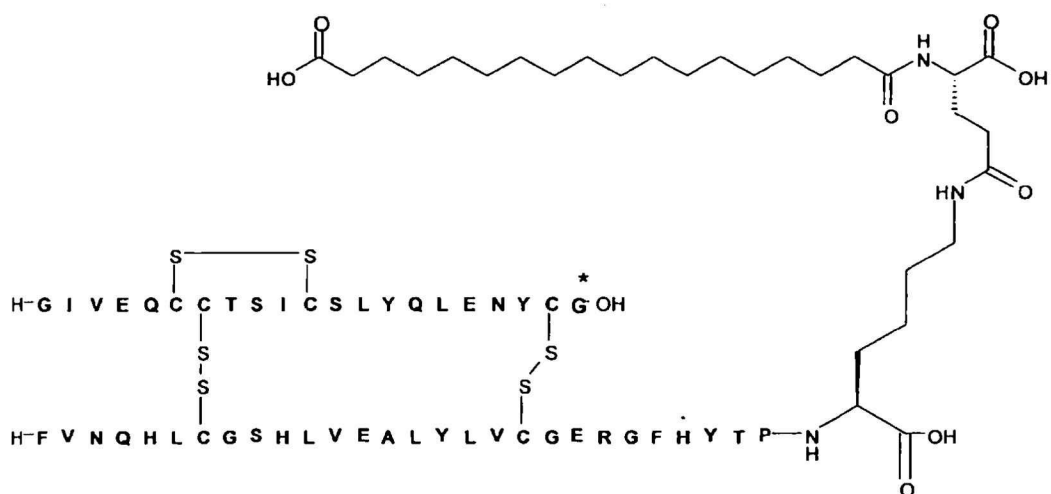
EXEMPLO 140. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de B25H, B29K(N^εEicosanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



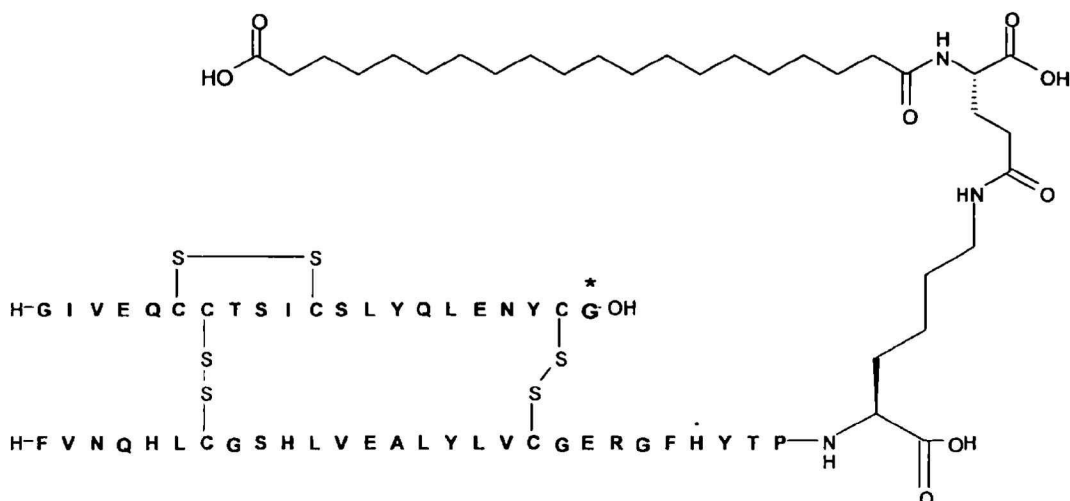
EXEMPLO 141. PROCEDIMENTO GERAL (A):

5 Insulina humana de B25H, B29K(N^εOctadecanodioil-γGlu), desB30



EXEMPLO 142. PROCEDIMENTO GERAL (A):

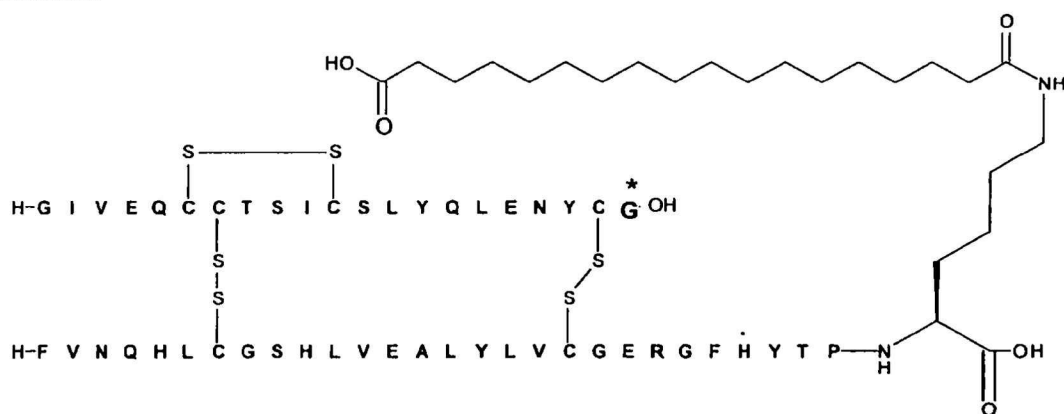
Insulina humana de B25H, B29K(N^EEicosanodioil-γGlu), desB30



EXEMPLO 143. PROCEDIMENTO GERAL (A):

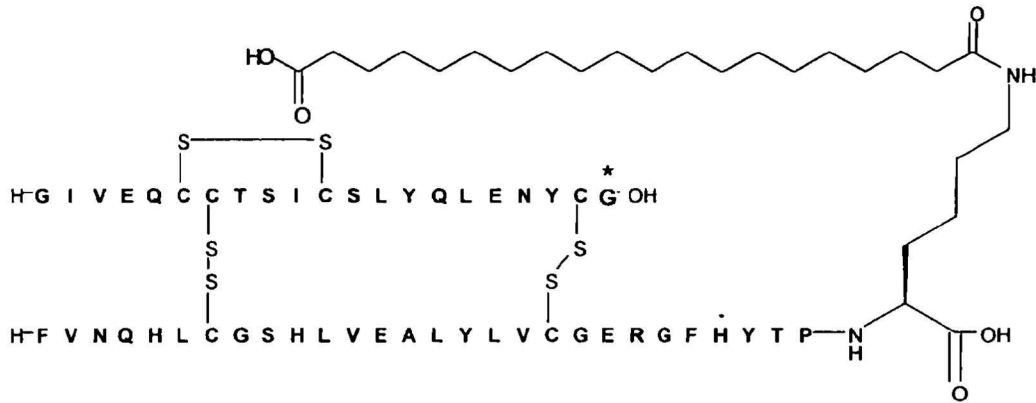
Insulina humana de A21G, B25H, B29K(N^EOctadecanodioila),

5 desB30



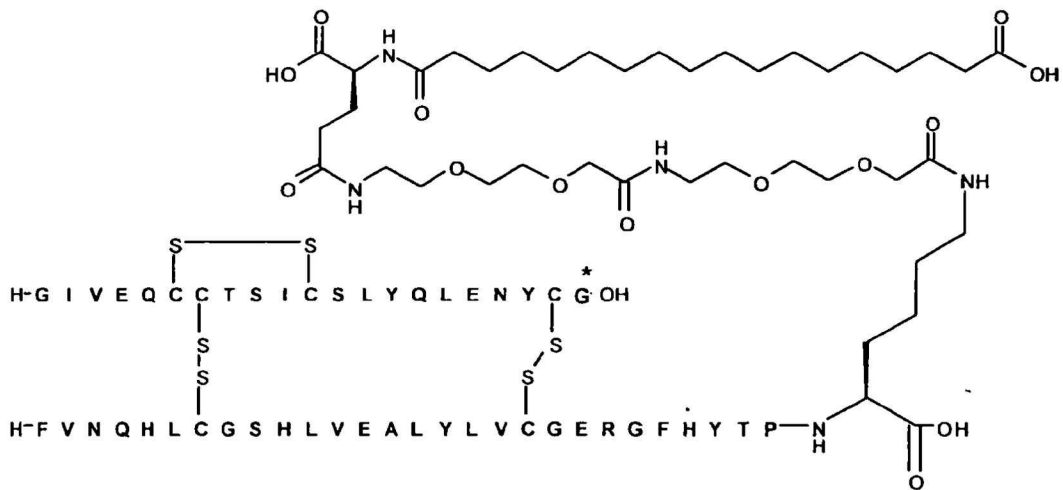
EXEMPLO 144. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A21G, B25H, B29K(N^eEicosanodioila),
desB30



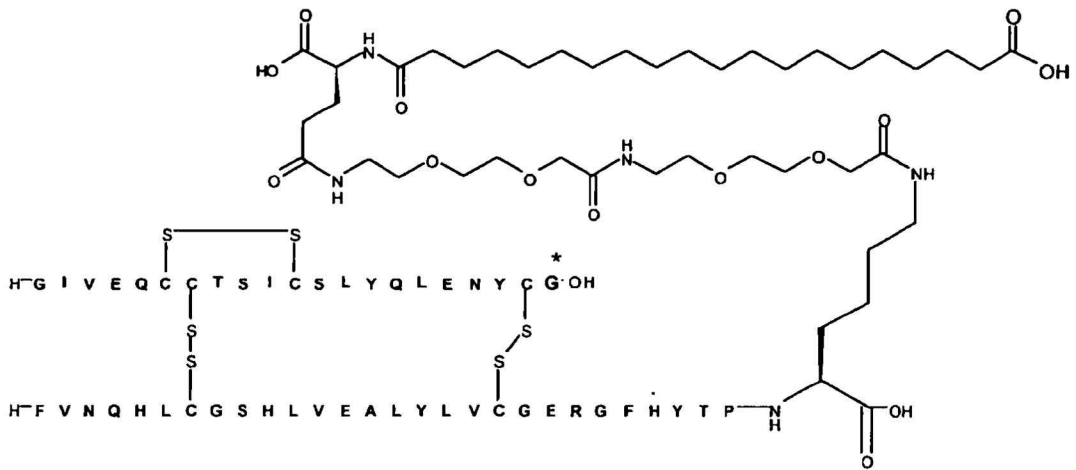
EXEMPLO 145. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A21G, B25H, B29K(N^eOctadecanodioil-γGlu-
5 OEG-OEG), desB30



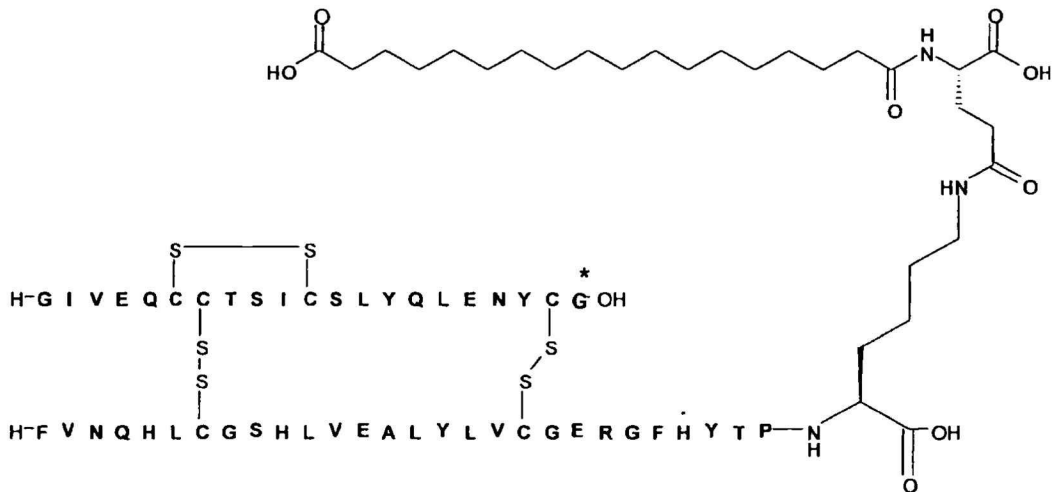
EXEMPLO 146. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A21G, B25H, B29K(N^eEicosanodioil-γGlu-
OEG-OEG), desB30



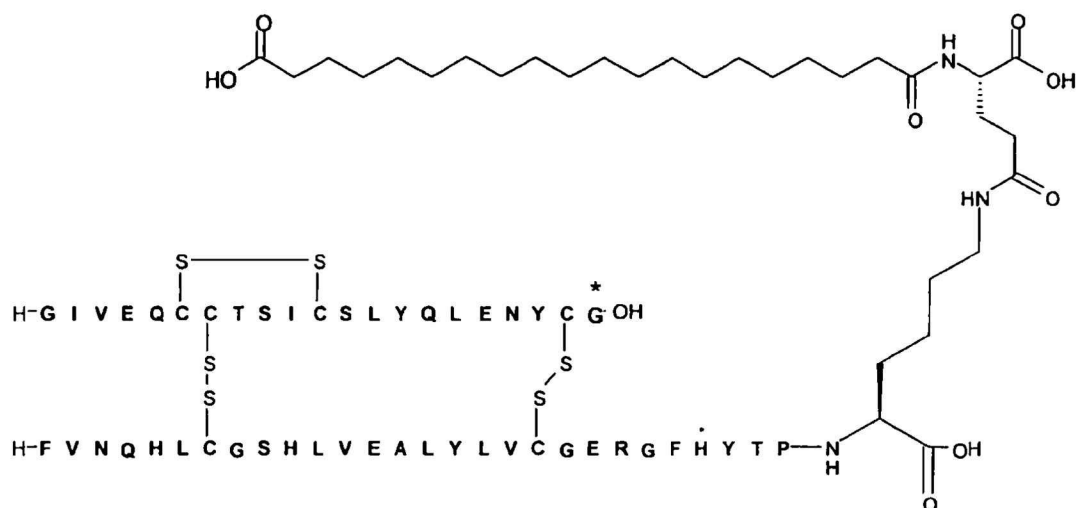
EXEMPLO 147. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A21G, B25H, B29K(N^fOctadecanodioil- γ Glu), desB30



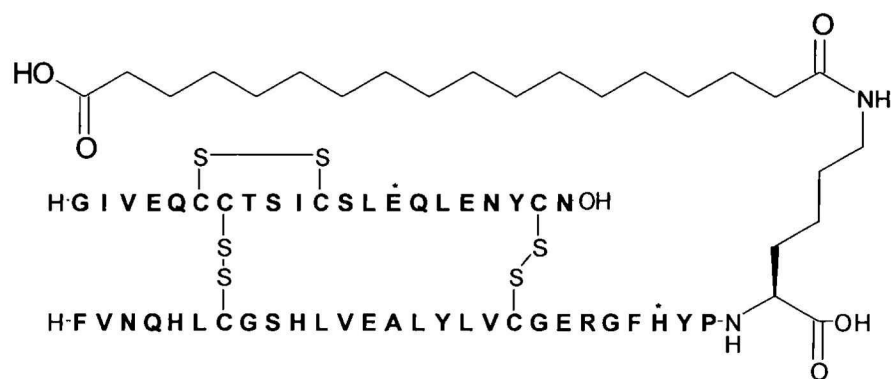
EXEMPLO 148. PROCEDIMENTO GERAL (A):

5 Insulina humana de A21G, B25H, B29K(N^fEicosanodioil- γ Glu), desB30



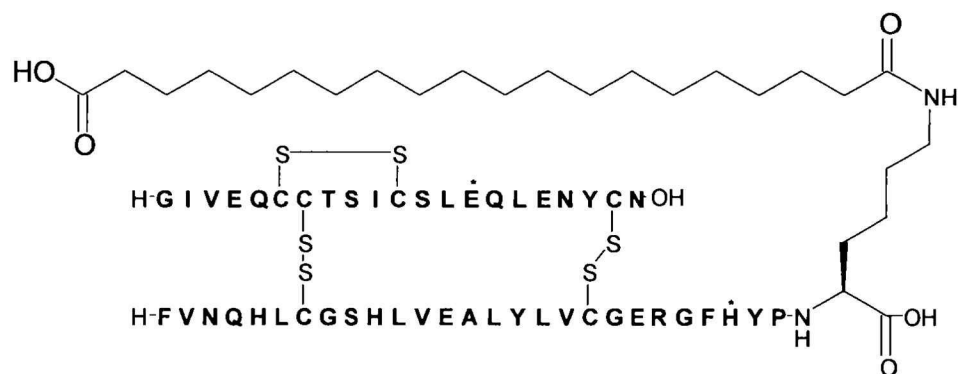
EXEMPLO 149. PROCEDIMIENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, desB27, B29K(N^oOctadecanodioila), desB30



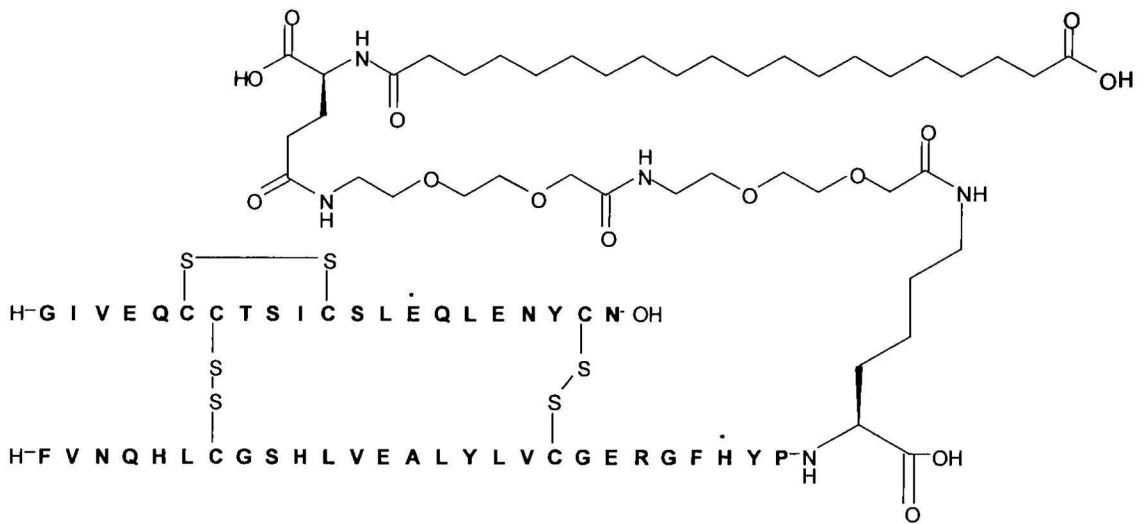
EXEMPLO 150. PROCEDIMIENTO GERAL (A):

5 Insulina humana de A14E, B25H, desB27, B29K (N^oEicosanodioila), desB30



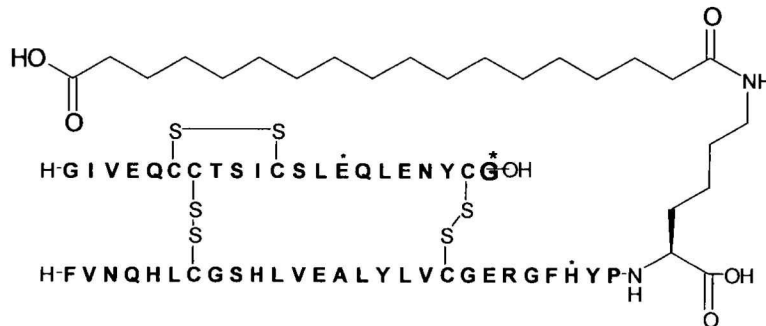
EXEMPLO 151. PROCEDIMIENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, desB27, B29K(N^oOctadeca-



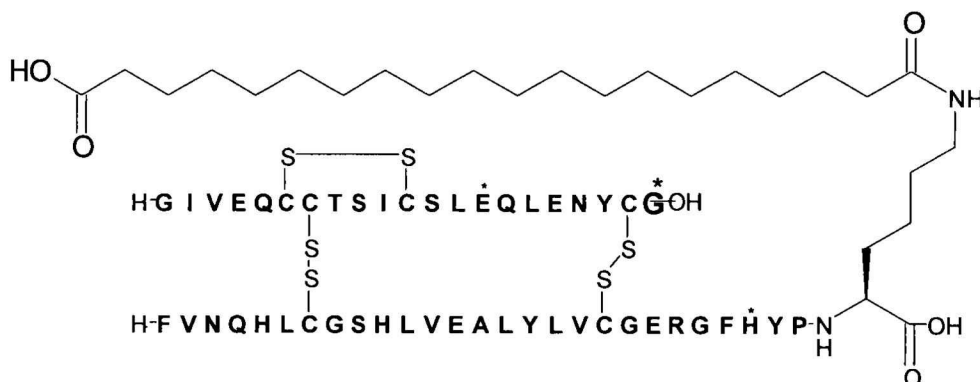
EXEMPLO 154. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, A21G, B25H, desB27, B29K(N^oOctadecanodioila), desB30



EXEMPLO 155. PROCEDIMENTO GERAL (A):

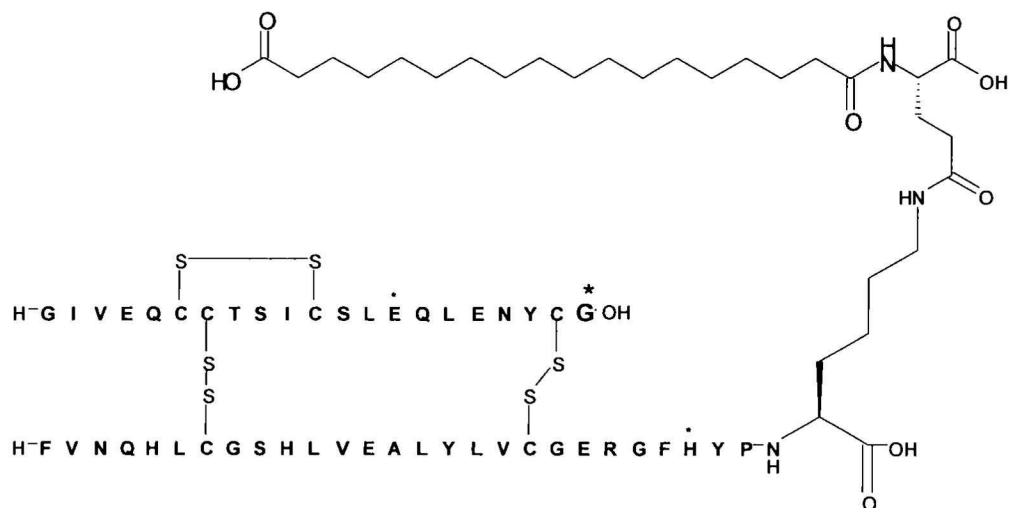
5 Insulina humana de A14E, A21G, B25H, desB27, B29K(N^oEicosanodioila), desB30



EXEMPLO 156. PROCEDIMENTO GERAL (A):

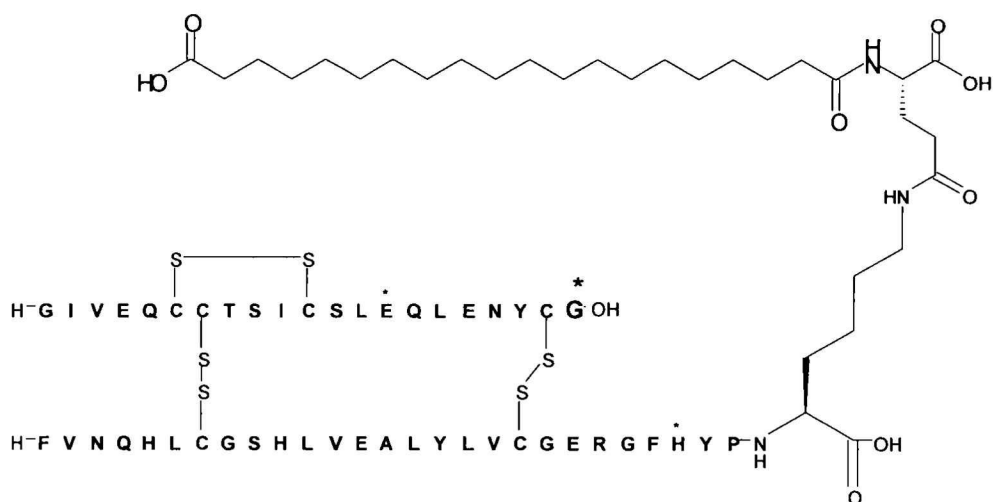
Insulina humana de A14E, A21G, B25H, desB27,

B29K(N^εOctadecanodioil-γGlu), desB30



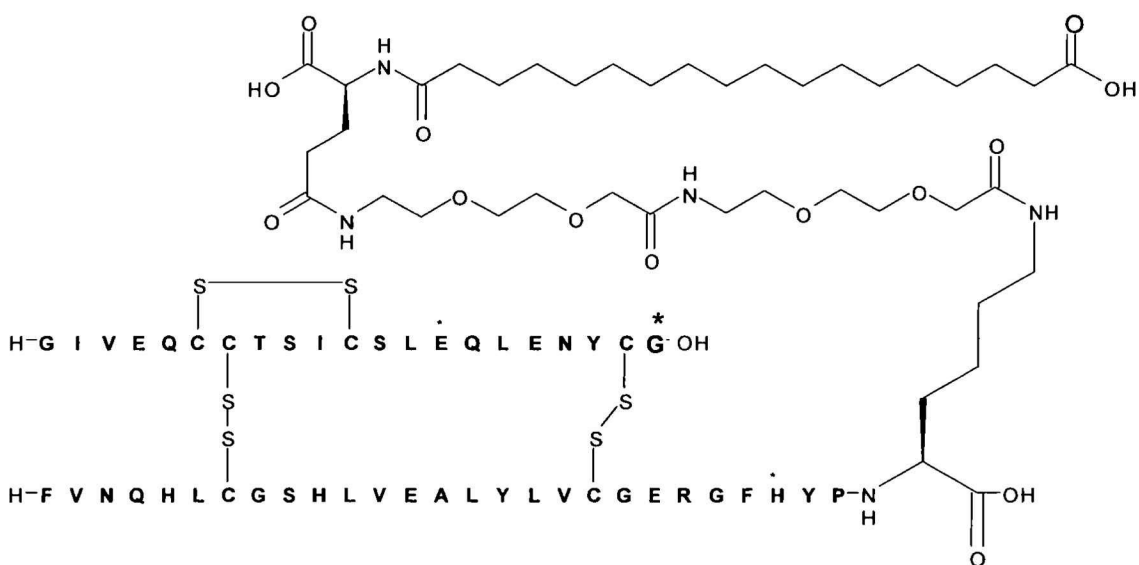
EXEMPLO 157. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, desB27,
B29K(N^εEicosanodioil-γGlu), desB30



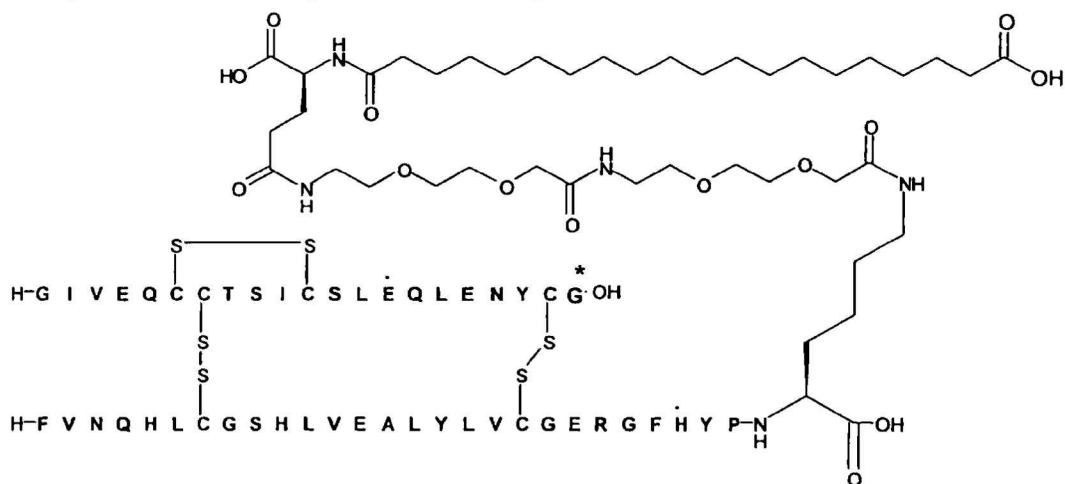
5 EXEMPLO 158. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, A21G, B25H, desB27,
B29K(N^εOctadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



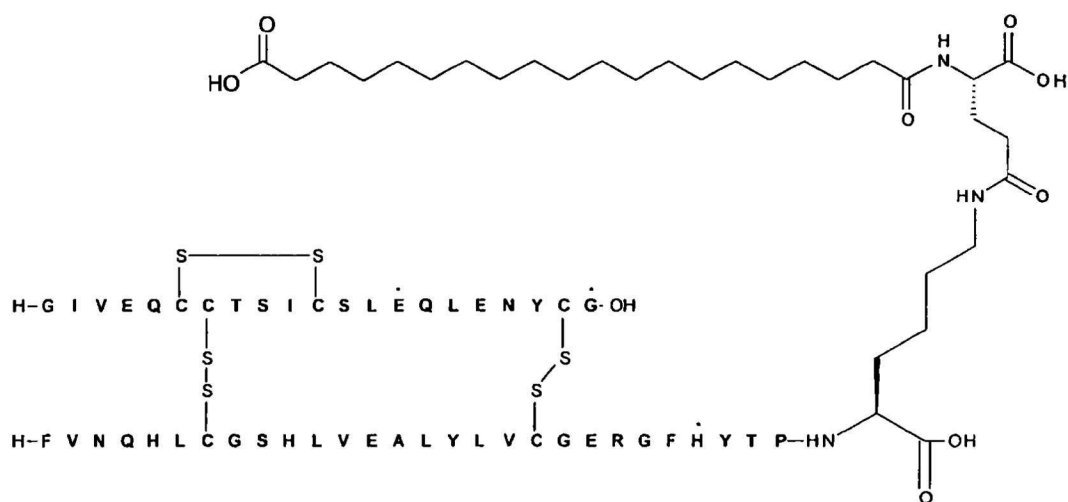
EXEMPLO 159. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, A21G, B25H, desB27, B29K (N^EEicosanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



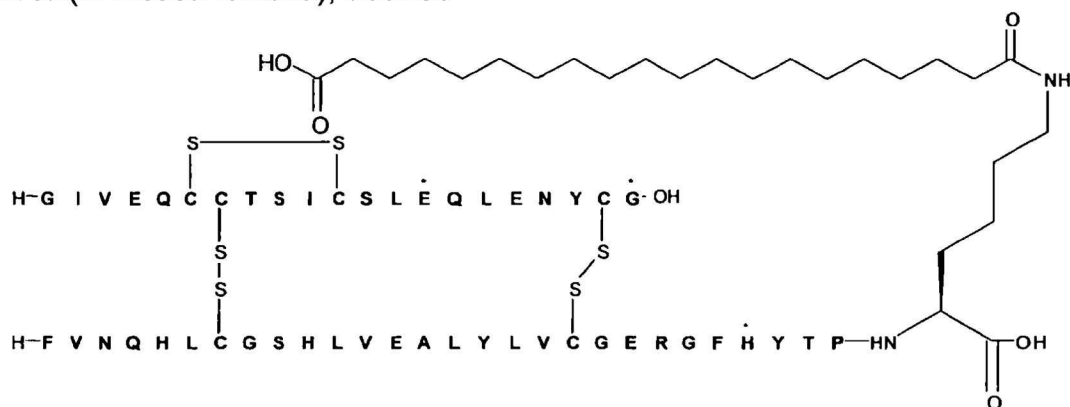
5 EXEMPLO 160. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, A21G, B25H, B29K (N^EOctadecano-dioil-γGlu-OEG-OEG), desB30



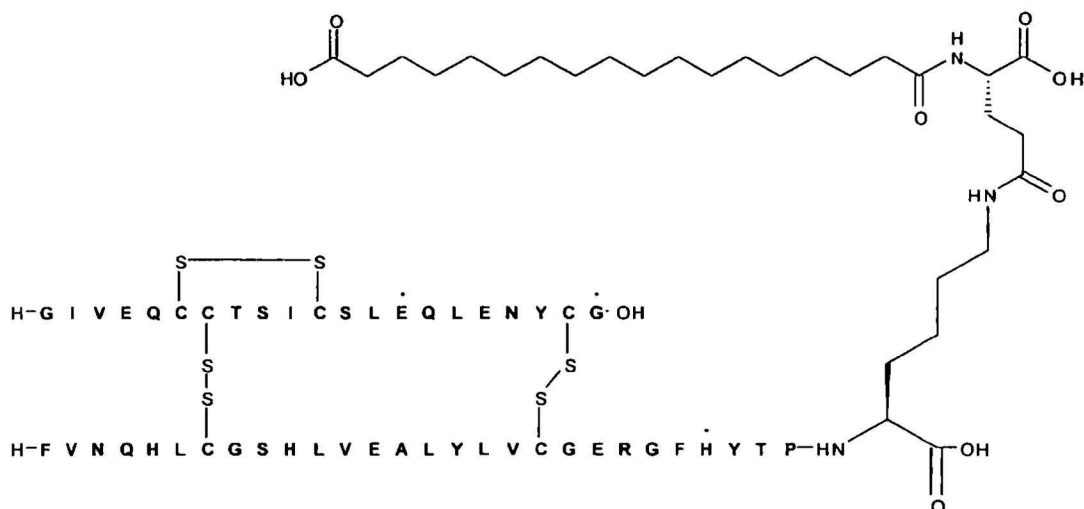
EXEMPLO 163. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, A21G, B25H,
B29K(*N*^εEicosanodioíla), desB30



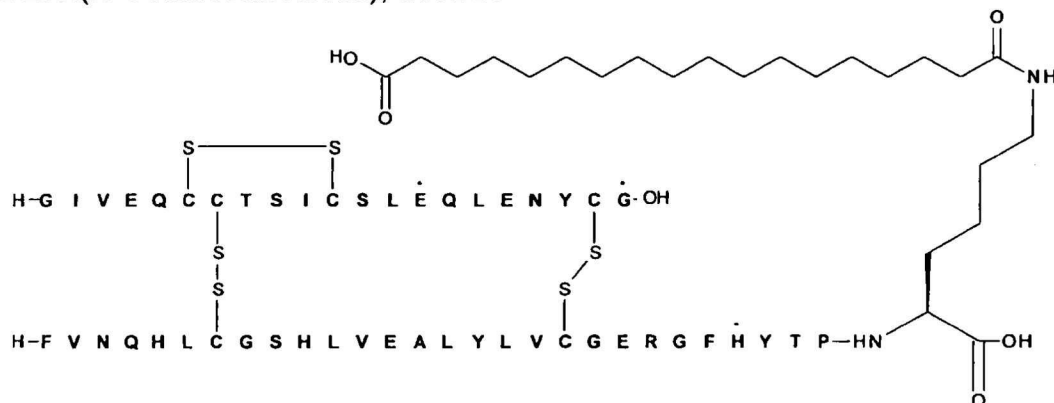
EXEMPLO 164. PROCEDIMENTO GERAL (A):

5 Insulina humana de A14E, A21G, B25H,
B29K(*N*^εOctadecanodioil-γGlu), desB30



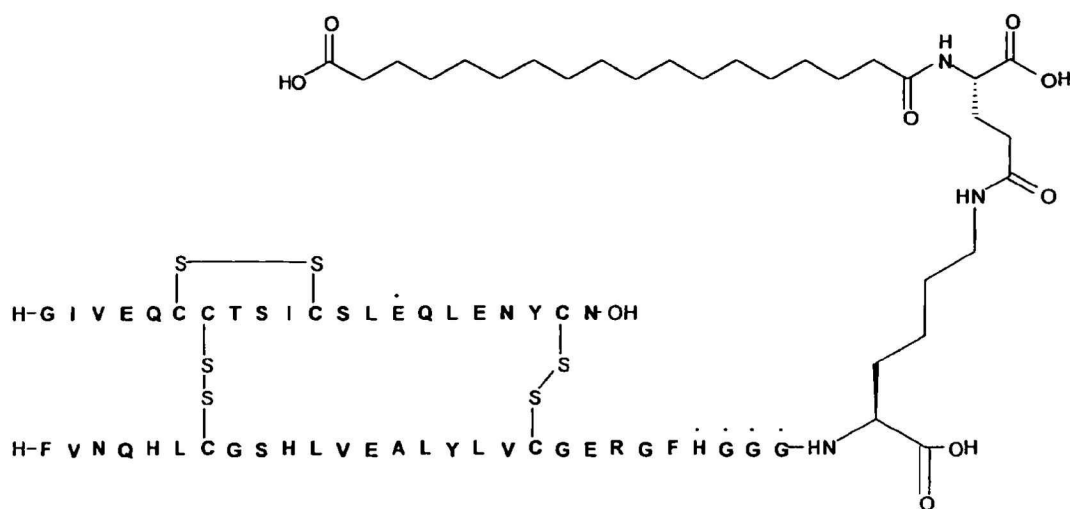
EXEMPLO 165. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, A21G, B25H,
B29K(N^εOctadecanodioila), desB30



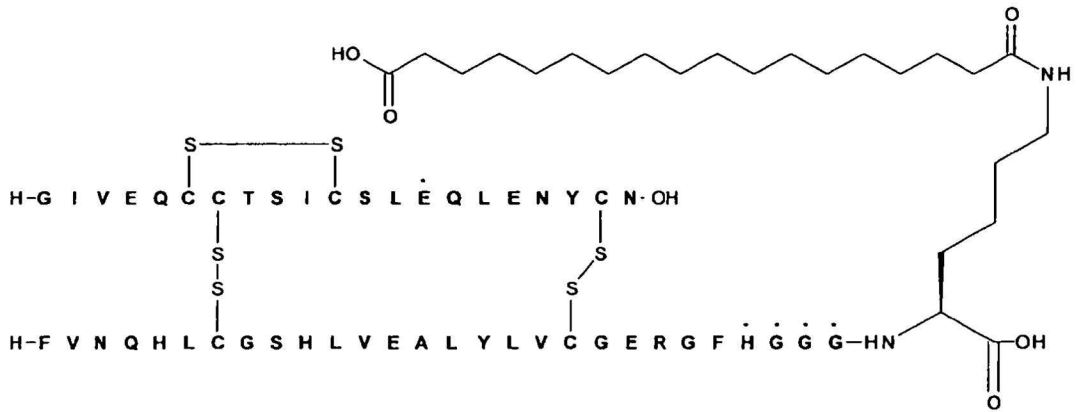
EXEMPLO 166. PROCEDIMENTO GERAL (A):

5 Insulina humana de A14E, B25H, B26G, B27G, B28G,
B29K(N^εOctadecanodioil-γGlu), desB30



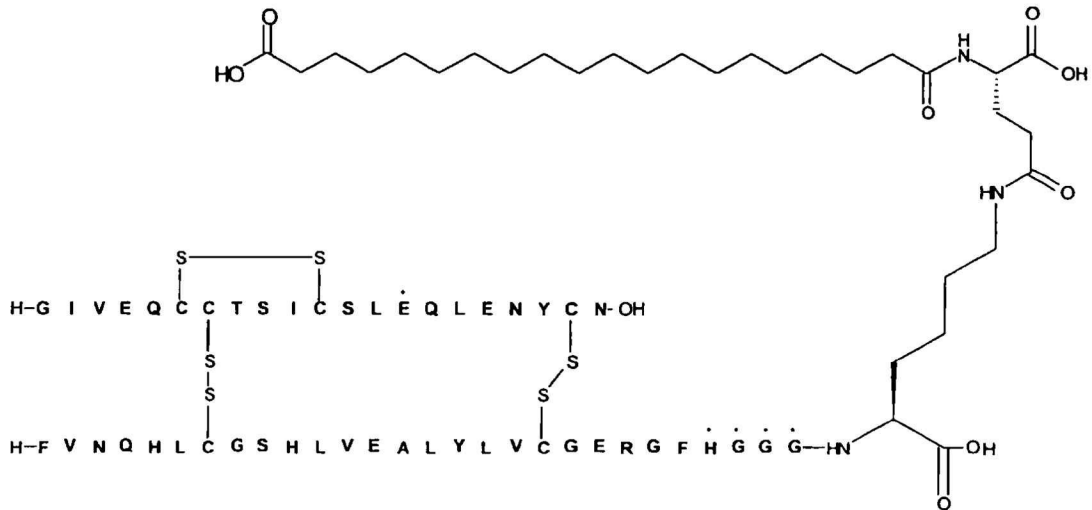
EXEMPLO 167. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, B26G, B27G, B28G,
B29K(N^εOctadecanodioila), desB30



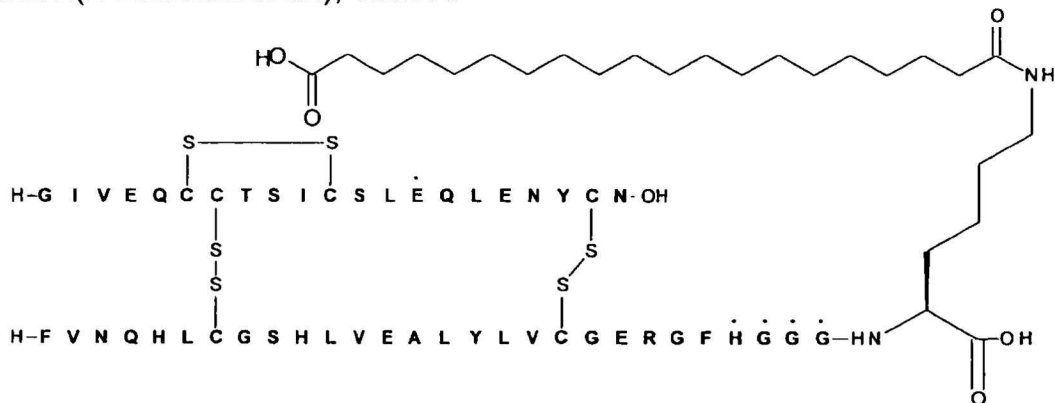
EXEMPLO 168. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29K(N⁶Eicosanodioil-γGlu), desB30



EXEMPLO 169. PROCEDIMENTO GERAL (A):

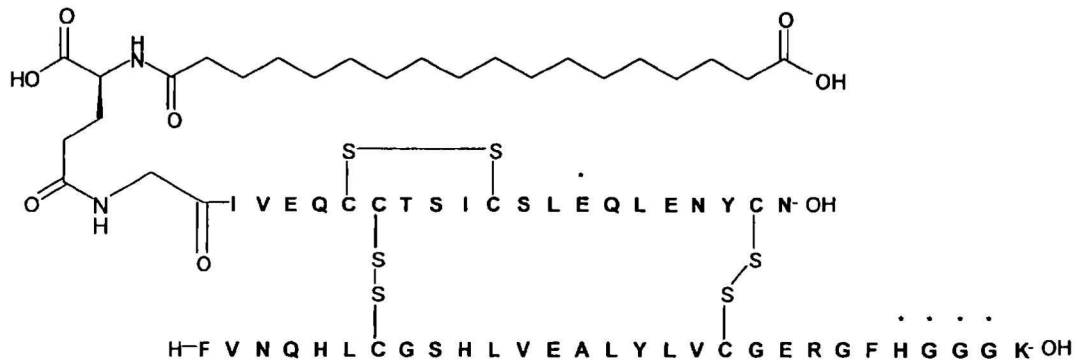
5 Insulina humana de A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29K(N⁶Eicosanodioila), desB30



EXEMPLO 170. PROCEDIMENTO GERAL (A):

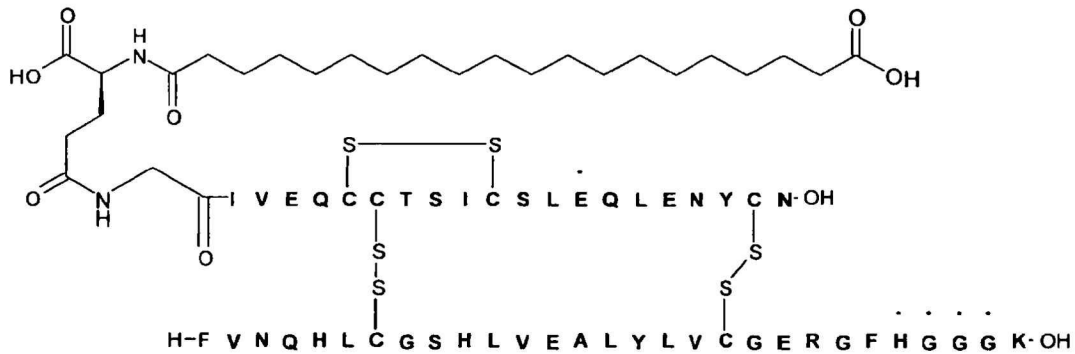
Insulina humana de A1G(N⁸Octadecandioil-γGlu), A14E, B25H,

B26G, B27G, B28G, desB30



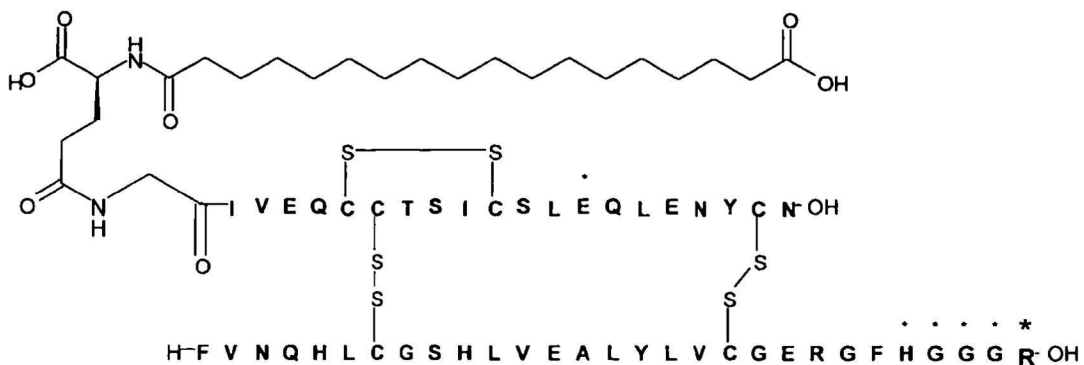
EXEMPLO 171. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A1G(N^oEicosanodioil-γGlu), A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30



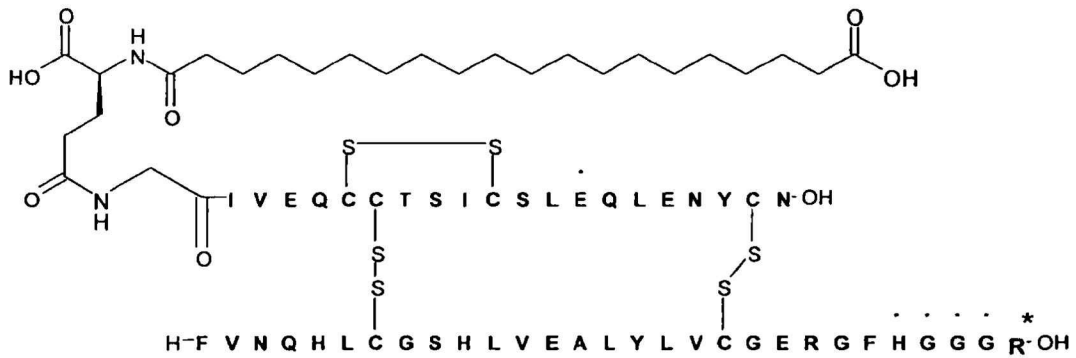
5 EXEMPLO 172. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A1G(N^oOctadecandioil-γGlu), A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30



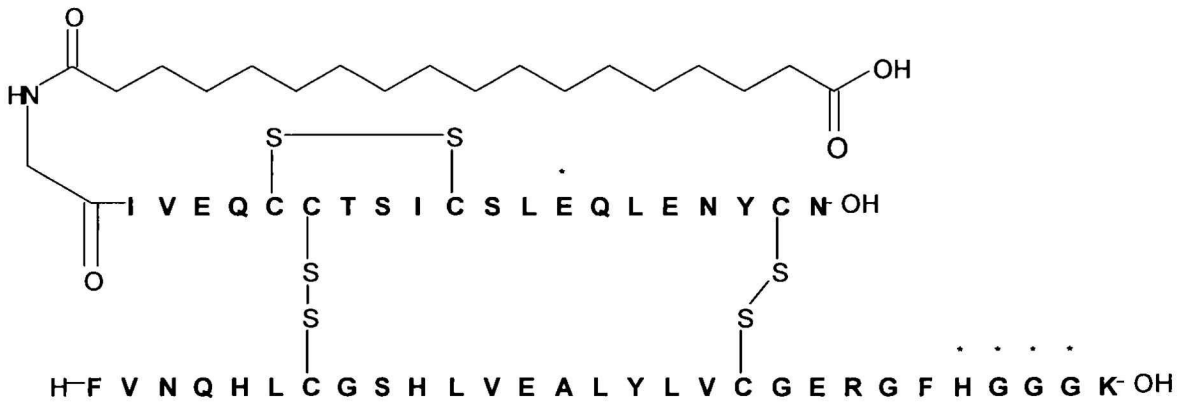
EXEMPLO 173. PROCEDIMENTO GERAL (A):

10 Insulina humana de A1G(N^oEicosanodioil-γGlu), A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30



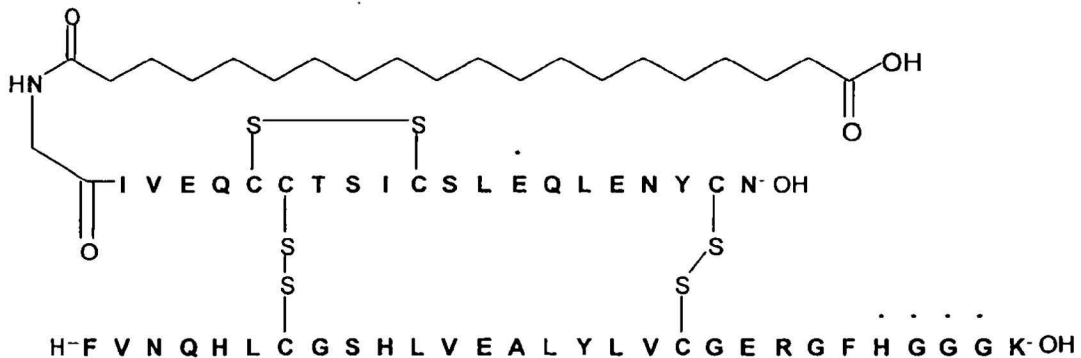
EXEMPLO 174. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A1G(N^OOctadecandioila), A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30



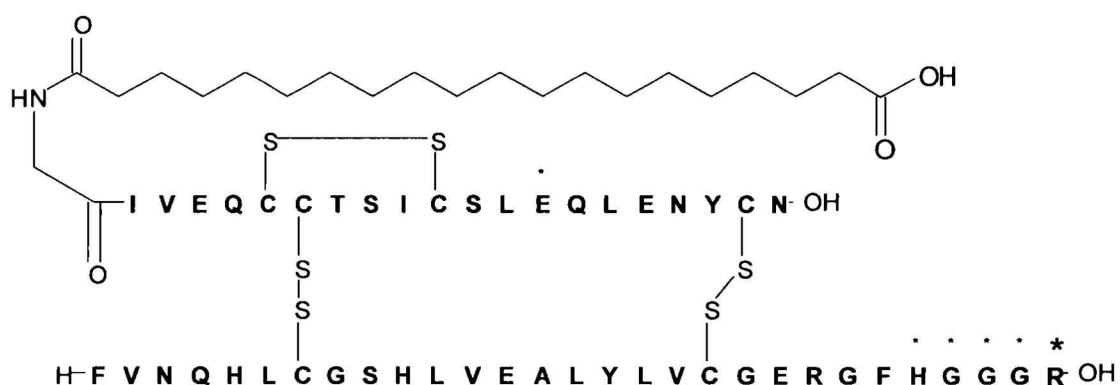
EXEMPLO 175. PROCEDIMENTO GERAL (A):

5 Insulina humana de A1G(N^OEicosanodioila), A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30



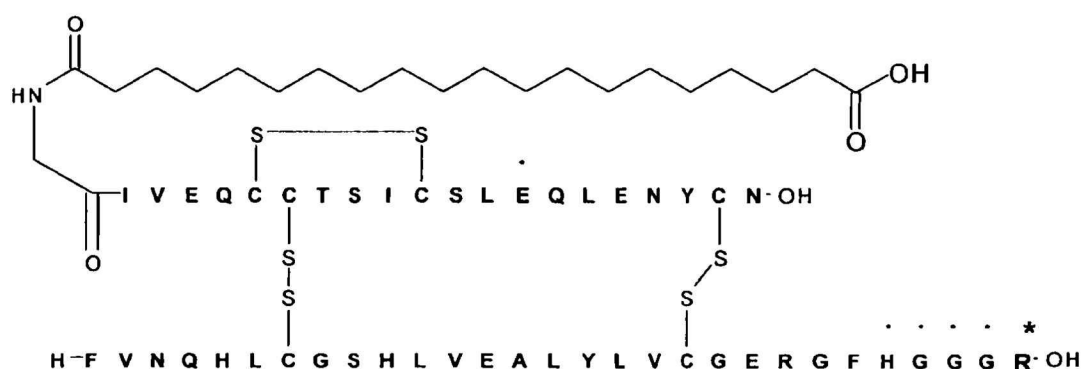
EXEMPLO 176. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A1G(N^OOctadecandioil), A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30



EXEMPLO 177. PROCEDIMENTO GERAL (A):

Insulina humana de A1G(N^oEicosanodioíla), A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30



EXEMPLO 178. Afinidade de receptor de insulina dos derivados de insulina selecionados da invenção:

5

A afinidade dos análogos de insulina acilada desta invenção para o receptor de insulina humana é determinada por um ensaio de SPA (Ensaio de Proximidade de Cintilação) ensaio de captura de anticorpo de placa de microtitulação. Contas de ligação de SPA-anticorpo de PVT, reagente anticamundongo (Amersham Biosciences, Cat No. PRNQ0017) são misturadas com 25 ml de tampão de ligação (100 mM de HEPES pH 7,8; 100 mM de cloreto de sódio, 10 mM de MgSO₄, 0,025% de Tween-20). Mistura de reagente para uma Packard Optiplate simples (Packard No. 6005190) é composta de 2,4 µl de um receptor 1:5000 de insulina humana recombinante purificado diluído (ou com ou sem éxon 11), uma quantidade de uma solução de matéria-prima de insulina de A14Tyr[¹²⁵I]-humano correspondendo a 5000 cpm por 100 µl da mistura de reagente, 12 µl de uma diluição de 1:1000 de

10

15

anticorpo de F12, 3 ml de SPA-contas e tampão de ligação para um total de 12 ml. Um total de 100 µl da mistura de reagente é depois adicionado a cada bem na Packard Optiplat e uma série de diluição do derivado de insulina é feita no Optiplat de amostras apropriadas. As amostras são depois incubadas por 16 horas enquanto suavemente agitadas. As fases são depois separadas através de centrifugação por 1 min e as placas contadas em um Top-counter. Os dados de ligação foram ajustados usando o algoritmo de regressão não linear no GraphPad Prism 2.01 (GraphPad Software, San Diego, CA) e afinidades relativas são expressadas (em porcentagem (%)) para a afinidade de insulina humana.

Um ensaio relacionado é também usado em que o tampão de ligação também contém 4,5% de HSA para imitar condições fisiológicas.

Afinidades de receptor de insulina das insulinas selecionadas da invenção:

15

Exemplo nº	Afinidade de IR-A relativa (@ 0% HSA) (%)	Afinidade de IR-A relativa (@ 40,5% HSA) (%)
19	3,8	0,30
10	9,5	
1	5,0	0,10
2	2,1	0,06
5	2,5	
4	3,4	
3	2,0	
9	1,7	0,20
6	2,6	0,04
7	2,1	
8	2,1	
12	1,7	
11	0,8	

Exemplo nº	Afinidade de IR-A relativa (@ 0% HSA) (%)	Afinidade de IR-A relativa (@ 40,5% HSA) (%)
17	0,9	
13	1,1	
15	1,9	
20	2,0	
22	0,7	
16	0,9	0,23
18	2,3	
23	1,4	
24	7,9	2,23
25	0,4	0,05
26	0,0	0,01
27	0,7	0,06
28	0,3	
29	0,2	0,01
30	0,3	0,02
31	16,2	1,11
32	0,3	
33	0,5	0,06
21	0,8	
34	1,3	
35	5,8	
36	9,3	
37	0,8	
40	0,3	
38	0,6	0,10
41	1,6	0,31

Exemplo nº	Afinidade de IR-A relativa (@ 0% HSA) (%)	Afinidade de IR-A relativa (@ 40,5% HSA) (%)
39	11,2	0,67
183 Técnica anterior	10	1,00
46	1,9	0,08
47	1,2	0,10
48	1,3	0,01
49	6,2	0,86
50	4,3	1,21
51	1,7	0,12
52	2,1	
53	2,3	0,03
54	3,9	0,91
55	0,3	0,03
56	4,4	0,03
57	2,5	
58	0,5	
59	0,3	

EXEMPLO 179. Hidrofobicidade dos derivados de insulina da invenção:

A hidrofobicidade de um derivado de insulina é encontrada por HPLC de fase reversa executada sob condições isocráticas. O tempo de eluição do derivado de insulina é comparado ao da insulina humana (aqui designada HI) ou outro derivado com uma hidrofobicidade conhecida sob as mesmas condições. A hidrofobicidade, k'_{rel} , é calculada como: $k'_{rel} = ((t_{deriv} - t_0)/(t_{ref} - t_0)) * k'_{ref}$. Usando HI como referência: $k'_{rel} = k'_{ref} = 1$. O tempo nulo do sistema de HPLC, t_0 , é determinado injetando 5 µl de 0,1 mM de NaNO₃.

Condições de Operação:

Tampão A: 0,1 M de fosfato de sódio pH 7,3, 10 vol% de CH₃CN

Tampão B: 50 % em vol de CH₃CN

Volume de injeção: 5 µl

Tempo de execução: max 60 minutos

- 5 Após passar um gradiente inicial, o nível isocrático para passar o derivado e referência (por exemplo, HI) é escolhido, e os tempos de eluição do derivado e referência sob condições isocráticas são usados na equação acima para calcular $k'_{rel_{deriv}}$.

Exemplo nº	Hidrofobicidade relativa, $k'_{rel_{deriv}}$
19	0,07
10	14,60
2	0,33
2	0,25
5	0,23
4	0,48
3	0,77
9	0,31
6	0,19
7	2,78
8	0,14
12	0,94
11	0,19
17	0,57
13	0,10
15	0,43
20	0,15
22	0,20
16	1,15

Exemplo nº	Hidrofobicidade relativa, $k'_{rel_{deriv}}$
18	0,10
23	0,16
24	0,26
25	0,22
26	0,21
27	0,05
28	0,42
29	0,05
30	0,05
31	
32	0,07
33	0,76
21	0,04
34	
35	0,84
36	0,24
37	0,56
40	0,09
38	
41	
46	0,44

EXEMPLO 180. Liberação pulmonar de derivados de insulina para ratos:

Protocolo:

A substância de teste será dosada pulmonarmente pelo método de instilação a gotas. Em suma, ratos Wistar machos (aproximadamente 250 g) são anestesiados em apl. 60 ml de fentanila/deidrodenzperidol/-dormicum dados como uma dose de reforço de 6,6 ml/kg sc e seguidos por 3 doses de manutenção de 3,3 ml/kg sc com um intervalo de 30 min. Dez minutos após

a indução de anestesia, amostras basais da veia de cauda são obtidas ($t = -20$ min) seguido imediatamente por uma amostra basal antes do doseamento da substância de teste ($t=0$). Em $t=0$, a substância de teste é de modo intratraqueal dosada em um pulmão. Uma cânula especial com terminação arredondada é montada em uma seringa contendo os 200 μ l de ar e substância de teste (1 ml/kg). Por meio do orifício, a cânula é introduzida na traqueia e é mandada para um dos brônquios principais - apenas passando a bifurcatura. Durante a inserção, o pescoço é apalpado do exterior para assegurar posicionamento intratraqueal. O conteúdo da seringa é injetado seguido por 2 s de pausa. Depois disso, a cânula é lentamente tirada de volta. Os ratos são mantidos anestesiados durante o teste (as amostras de sangue por até 4 ou 8 h) e foram eutanizados após o experimento.

As figuras 8 e 9 mostram os efeitos redutores da glicose do sangue e concentrações de insulina no plasma, respectivamente, da instilação em gotas intraqueal de uma insulina da invenção (exemplo 9), comparada com uma insulina similar, mas não resistente à protease da técnica anterior (exemplo 183).

EXEMPLO 181. Liberação pulmonar de derivados de insulina para miniporc

20 Protocolo:

Os porcos foram instrumentados com cateteres venosos centrais para injeções intravenosas e amostragem de sangue. Os porcos estavam em jejum antes do experimento pulmonar, isto é, o dia antes do doseamento, as sobras da alimentação da tarde são removidas cerca de uma hora após a alimentação e no dia do doseamento, os porcos não são alimentados. A permeabilidade dos cateteres é verificada antes do experimento com solução salina adicionada a 10 IU/ml de heparina.

Após doseamento pulmonar, uma solução de glicose deveria estar pronta para injeção i.v. para impedir **hipoglicemia**, isto é, 4-5 seringas (20 ml) são enchidas com 20% de glicose estéril, prontas para o uso. Diagnose de hipoglicemia é com base em sintomas clínicos e medições de glicose no sangue em um glucômetro (Glucocard X-metro). Tratamento consiste

em injeção i.v. lenta de 50-100 ml de 20% de glicose (10-20 g de glicose). A glicose é dada em frações por 5-10 minutos até efeito.

Os porcos são jejuados durante a primeira parte do experimento (até 24 h), mas com acesso livre à água. Após 16 h, os cateteres da amostra de sangue são fechados com 5000 IU/ml de heparina, colocados nos bolsos e os porcos são liberados. Após 24 h da amostra de sangue, os porcos são alimentados com ração dupla e maçãs. Os porcos não ficam em jejum de 24 h a 48 h.

Composto e doseamento pulmonar

10 Pó para doseamento pulmonar

Os pós de insulina são pesados em 8 câmaras de pó separadas do dispositivo de pó seco (Modelo PennCentury® DP-4, dispositivo porcino sob medida) no dia antes do experimento. Todas as câmaras são mantidas protegidas de luz e umidade as mantendo ao redor em um material de dessecagem em um recipiente com folha de alumínio em um laboratório com temperatura e umidade controladas até o doseamento.

Com base no peso do animal individual mais recente, o dispositivo de liberação foi pré-carregado com 25 nmol/kg visto que alguma retenção de pó foi esperada.

20
$$\text{Carga da dose} = (\text{Peso do pó} + (\text{peso do dispositivo e do pó} - \text{peso do dispositivo}))/2.$$

Anestesia

Por uma injeção i.v. de Domitor® Vet inj. (medetomidina 1 mg/ml), 0,15 ml/10 kg = 0,4 ml/porco, o porco é sedado.

25 Imediatamente após, Rapinivet Vet. inj. (propofol 10 mg/ml) é injetado i.v. lentamente até profundidade suficiente da anestesia ser obtida. Em geral, 2-3 ml/10 é suficiente, mas pode ser necessário suplementar com 1-2 ml de uma vez até que a intubação seja possível. Atropina (1 mg/ml) é injetada i.m. a 0,5 ml/porco e deixada trabalhar min. de 5 min antes da intubação.

30 Para intubação, o porco é colocado na posição ventral com a frente ligeiramente elevada, anestésico local Xylocaine® kutanspray (lidoca-

ina 10 mg/dose) é pulverizado sobre a epiglote, e os porcos são intubados usando um laringoscópio e um tubo descartável de tamanho 8,0 mm (ID). As duas partes do tubo são pressionadas firmemente.

Posição do dispositivo durante o doseamento pulmonar

- 5 A posição do dispositivo de PennCentury® durante doseamento apenas deveria ser externa à extremidade do tubo endotraqueal e deveria ser medida no dispositivo antes da intubação (lembra-se do pedaço em L conectado ao medir). Durante o doseamento, a ponta do dispositivo de PennCentury® apenas deve ser posicionada na traqueia abaixo dos brôn-
- 10 quios que vai para o dextro cranialis lobus que é confirmado com o broncoscópio durante o doseamento.

Respiração artificial

- A frequência da respiração é ajustada a 10/min e a profundidade da respiração a **250 ml/respiração**. O respirador é montado com saco "bebê" para otimizar a regulação do doseamento. O aparelho de anestesia é
- 15 conectado a um filtro que é conectado ao tubo endotraqueal por meio de um pedaço em L. O dispositivo de PennCentury® é introduzido através do pedaço em L que permitirá o controle na profundidade da respiração e frequência durante o doseamento.

- 20 Técnica de doseamento

- O dispositivo de PennCentury® deveria ser colocado como descrito acima. Os porcos são dosados (um de cada vez) com o dispositivo de PennCentury® por administração manual durante a inalação usando a bomba de ar ajustável PennCentury (AP-1 Modelo). A cada porco são dadas **8**
- 25 **pulverizações de ar** (bomba de ar ajustada em 4 ml) durante 8 inalações forçadas com respirador sucessivas para assegurar que a dose inteira seja dada. A câmara é batida suavemente entre as pulverizações para evitar aderência do pó ao dispositivo. Um tubo de liberação novo é usado para cada porco. A regulação em relação à inalação é muito importante, e as pulveriza-
- 30 ções de ar deveriam ser dadas bem no início da inalação (meta para início em 50 ml de inalação).

Para contrariar o efeito de Domitor, Antisedan® Vet inj. (atipa-

mezol 5 mg/ml) será injetado como uma injeção intramuscular (**0,4 mL/porco**) imediatamente após doseamento, e os porcos serão levados de volta a seus cercados e serão deixados acordar da anestesia.

Análise de retenção

- 5 A dose emitida deveria ser o conteúdo inteiro da câmara e após doseamento o dispositivo é pesado novamente com qualquer pó residual, e o pó retido é extraído com **9 mL** de 0,01 N de HCl med 0,05% (p/v) de tampão de extração Tween 80 e enviado para análise.

Amostragem de sangue

- 10 Após o doseamento, as amostras de sangue serão extraídas de um cateter venoso central nos pontos de tempo seguintes:
-10, 0, 10, 20, 40, 60, 90, 120, 150, 180, 240 (4 h), 300 (5 h), 360 (6 h), 8 h, 10 h, 12 h, 14 h, 16 h, 24 h, 32 h e 48 h.

- As amostras são tiradas com uma válvula reguladora de 3 mo-
15 dos; sangue residual é injetado de volta no animal. O **tamanho da amostra** é: 0,8 ml de sangue colhido em um tubo revestido com EDTA. Após cada amostra de sangue, o cateter é fluxado com 5 ml de 0,9% de NaCl estéril com 10 IU/ml de heparina. O tubo é inclinado um mínimo de 8 vezes suavemente para assegurar mistura suficiente de sangue e anticoagulante (EDTA)
20 e após um minuto é colocado em gelo molhado. Os tubos são girados por 10 min a 3000 rpm e 4°C dentro de 1 hora após amostragem. As amostras são armazenadas em gelo molhado até pipetação.

Fechamento dos cateteres após o experimento

- Um tratamento intravenoso simples com Ampicilina (10 mg/kg =
25 0,1 ml/kg de uma solução em 100 mg/ml) dissolvida em solução salina estéril (1 g de Ampicilina em 10 ml = 100 mg/ml) é dado por meio do cateter que foi usado para amostragem de sangue. Ambos os cateteres são fluxados com 4-5 ml de 0,9% de NaCl estéril adicionados à heparina com a uma concentração a 10 IU/ml. Os cateteres são fechados com uma nova trava do tipo
30 luer-lock com membrana de injeção de látex. 4-5 ml de 0,9% de NaCl estéril são injetados através da membrana. Por fim 0,8 ml de heparina, 5000 IU/ml, é injetado através do cateter como uma trava. Técnica asséptica é exigida

para evitar crescimento bacteriano no cateter com risco aumentado de coagulação.

Análise das amostras de sangue

10 μ l de plasma são pipetados em 500 μ l de solução de tampão de EBIO para medições de concentração de glicose em plasma no autoanalisador de Biosen.

Amostras de plasma são também ensaiadas para insulina exógena através de imunoenaios para calcular os parâmetros de PK.

10 Doseamento pulmonar da insulina do exemplo 9 para miniporcos de acordo com o protocolo acima:

15 As figuras 10 e 11 mostram o perfil farmacocinético da insulina do exemplo 9 comparado à mesma insulina, mas sem as mutações de estabilização de protease A14E e B25H (insulina da técnica anterior). Os dados são do mesmo experimento, figura 10 é mostrada com os dados dos primeiros 250 minutos, e figura 11 é mostrada com o curso de tempo total de 24 horas (1440 minutos).

20 Dados farmacocinéticos para a insulina do exemplo 9 comparada à mesma insulina, mas sem as mutações de estabilização de protease A14E e B25H (insulina da técnica anterior). Os dados são do mesmo experimento, meia-vida ($T_{1/2}$) e biodisponibilidade (F_{it}) com relação à administração intravenosa:

Insulina, exemplo No.	$T_{1/2}$ (minutos)	F_{it}
Técnica anterior (vide ex. 183)	211	4%
9	1127	13%

EXEMPLO 182. Degradação dos análogos de insulina usando enzimas do lúmen duodenal:

25 A degradação dos análogos de insulina usando enzimas do lúmen duodenal (preparado por filtração do conteúdo do lúmen duodenal) de ratos de SPD. O ensaio é executado por um robô em uma placa de 96 poços (2 ml) com 16 poços disponíveis para análogos de insulina e padrões. Aná-

logos de insulina são incubados ~15 μ M com enzimas do duodeno em 100 mM de Hepes, pH=7,4 a 37°C, cujas amostras são extraídas a 1, 15, 30, 60, 120 e 240 min e reação extinta por adição de TFA. Análogos de insulina intactos em cada ponto são determinados por RP-HPLC. Meio tempo de degradação é determinado ajustando o exponencial dos dados e normalizado para meio tempo determinado para as insulinas de referência, A14E, B25H, desB30 ou insulina humana em cada ensaio. A quantidade de enzimas adicionada para a degradação é de modo que o meio tempo para degradação da insulina de referência seja entre 60 min e 180 min. O resultado é dado como o meio tempo de degradação para o análogo de insulina em duodeno de rato dividido pelo meio tempo de degradação da insulina de referência do mesmo experimento (taxa de degradação relativa).

Exemplo N°	Degradação do duodeno. Estabilidade relativa versus A14E, B25H, desB30	Degradação do duodeno. Estabilidade relativa versus insulina humana
19	1,8	21,6
2	1,3	15,6
3	0,7	8,4
9	0,8	9,6
8	1,8	21,6
11	0,9	10,8
13	1,5	18
22	0,9	11
16	0,5	6
18	1,1	13,2
23	1,9	22,8
24	1,2	14,4
25	1,1	13,2
26	1,2	14,4
27	2,9	35

Exemplo Nº	Degradação do duodeno. Estabilidade relativa versus A14E, B25H, desB30	Degradação do duodeno. Estabilidade relativa ver- sus insulina humana
28	0,7	7,2
29	3,1	37
30	2,1	25,2
31	1,6	19,2
32	1,9	22,8
33	0,5	6
21	1,1	13,2
34	1,0	12
35	0,6	7,2
36	0,9	10,8
37	0,8	9,6
40	0,7	8,4
38	0,5	6
41	0,7	8,4
Técnica anterior 183	0,1	1,2
46	2,0	24
47	0,6	7
48	0,5	6
49	0,1	1,2
50	0,5	6
51	1,0	12

Farmacocinética do rato:

PK de Rato intravenosa:

Ratos anestesiados são intravenosamente dosados (i.v.) com análogos de insulina em várias doses e concentrações de plasma dos compostos empregados são medidas usando imunoenaios ou espectrometria

de massa em intervalos especificados por 4 horas ou mais pós-dose. Parâmetros farmacocinéticos são subsequentemente calculados usando WinNonLin Pro (Pharsight Inc., Mountain View, CA, EUA).

5 Ratos Wistar machos não jejuados (Taconic) pesando cerca de 200 gramas são usados.

Peso do corpo é medido e os ratos são subsequentemente anestesiados com Hypnorm/Dormicum (cada composto é diluído 1:1 separadamente em água estéril e depois misturados; preparados recentemente no dia experimental). Anestesia é iniciada por 2 ml/kg de mistura de Hypnorm/Doricum sc seguido por duas doses de manutenção de 1 ml/kg sc em intervalos de 30 min e duas doses de manutenção de 1 ml/kg sc com intervalos de 45 min. Se preciso for para manter os ratos ligeiramente anestesiados por todo tempo uma(s) outra(s) dose(s) 1-2 ml/kg sc é/são provida(s).
 10 Pesagem e anestesia inicial são executadas no quarto de contenção dos ratos para evitar estressar os animais movendo-os de um quarto para outro.
 15

PK de Rato Peroral:

Gavagem:

Ratos conscientes são dosados p.o. com análogos de insulina. Concentrações no plasma dos compostos empregados como também alterações em glicose do sangue são medidas em intervalos especificados por 4-6 horas pós-doseamento. Parâmetros farmacocinéticos são subsequentemente calculados usando WinNonLin Professional (Pharsight Inc., Mountain View, CA, EUA).
 20

Ratos Sprague-Dawley machos (Taconic), pesando 250-300 g são jejuados por ~18 h e dosados p.o. com composto de teste ou veículo.
 25

A composição da formulação usada para o doseamento de gavagem oral é a seguinte (% em peso):

45%	Propileno glicol	(Merck)
33%	Capmul MCM C10	(Abitec)
30 11%	Poloxâmero 407	(BASF)
11%	Polietilenoglicol 3350 Ultra	(Fluka)

A quantidade de insulina adicionada é subtraída igualmente de

Capmul MCM C10, Poloxâmero 407 e PEG 3350 e não de propileno glicol a fim de manter a quantidade de propileno glicol independente da carga de fármaco constante em 45%.

Insulina neutra (secada por congelamento de pH 7,4) é dissolvida em propileno glicol em TA sob agitação suave. Dependendo da insulina e da quantidade de insulina em si, pode levar algumas horas para dissolver-se em propileno glicol. A solução resultante deveria ser clara. Os outros aditivos, Capmul, poloxâmero e PEG3350 são misturados e fundidos a 58° C e deve também resultar em uma solução clara, ligeiramente amarelada. Depois a solução de propileno glicol de insulina é aquecida até 35°C e os aditivos fundidos são adicionados em partes sob agitação magnética. A mistura resultante deveria ser clara e homogênea a 35°C e resultar em um semisólido após armazenamento no congelador. Após preparação, a composição de SEDDS é esfriada até 5°C para solidificar-se.

As amostras de sangue são colhidas para a determinação das concentrações de glicose de sangue total em tubos capilares heparinizados de 10 µl por furo dos vasos capilares na ponta da cauda. Concentrações de glicose no sangue foram medidas após diluição em 500 µl de tampão de análise pelo método de glicose oxidase usando um autoanalisador de Biosen (EKF Diagnostic GmbH, Alemanha). Cursos médios da concentração de glicose no sangue (\pm SEM médio) são feitos para cada composto.

As amostras são colhidas para determinação da concentração de insulina no plasma. 100 µl de amostras de sangue são tirados em tubos esfriados contendo EDTA. As amostras são mantidas em gelo até centrifugadas (7000 rpm, 4°C, 5 min), o plasma é pipetado em tubos Micrônicos e depois congelado a 20°C até o ensaio. Concentrações no plasma dos análogos de insulina são medidas no departamento de Ensaio e Tecnologia usando um imunoenensaio que é considerado apropriado ou validado para o análogo individual.

Amostras de sangue são tiradas em t=-10 (para glicose de sangue apenas), em t=-1 (logo antes do doseamento) e em intervalos especificados por 4-6 horas pós-doseamento.

Injeção Intraintestinal:

Ratos anestesiados são intraintestinalmente dosados (no jejuno) com análogos de insulina. Concentrações no plasma dos compostos empregados como também alterações na glicose sanguínea são medidas em intervalos especificados por 4 horas ou mais pós-doseamento. Parâmetros farmacocinéticos são subsequentemente calculados usando WinNonLin Professional (Pharsight Inc., Mountain View, CA, EUA).

Ratos Sprague-Dawley machos (Taconic), pesando 250-300 g, jejuados por ~18 h são anestesiados usando Hypnorm-Dormicum s.c. (0,079 mg/ml de citrato de fentanila, 2,5 mg/ml de fluanisona e 1,25 mg/ml de midazolam) 2 ml/kg como uma dose preparatória (para ponto de tempo de -60 min antes do doseamento da substância de teste), 1 ml/kg após 20 min seguido por 1 ml/kg a cada 40 min.

As insulinas a serem testadas no modelo de injeção intraintestinal são formuladas como formuladas acima para o modelo de gavagem.

O rato anestesiado é colocado em uma manta homotérmica estabilizada a 37°C. Um cateter de 20 cm de polietileno montado em uma seringa de 1 ml é enchido com formulação de insulina ou veículo. Uma incisão de linha intermediária de 4-5 cm é feita na parede abdominal. O cateter é inserido suavemente no jejuno médio ~ 50 cm do ceco por penetração da parede intestinal. Se o conteúdo intestinal estiver presente, o sítio de aplicação é movido \pm 10 cm. A ponta do cateter é colocada aproximadamente 2 cm dentro do lúmen do segmento intestinal e fixado sem o uso de ligaduras. Os intestinos são substituídos cuidadosamente na cavidade abdominal e a parede abdominal e pele são fechadas com autogrampos em cada camada. No tempo 0, os ratos são dosados por meio do cateter, 0,4 ml/kg de composto de teste ou veículo.

As amostras de sangue são colhidas para a determinação das concentrações de glicose de sangue total em tubos capilares heparinizados de 10 μ l por furo dos vasos capilares na ponta da cauda. Concentrações de glicose no sangue são medidas após diluição em 500 μ l de tampão de análise pelo método de glicose oxidase usando um autoanalisador de Biosen

(EKF Diagnostic GmbH, Alemanha). Cursos médios de concentração de glicose no sangue (\pm SEM médio) são feitos para cada composto.

Amostras são colhidas para determinação da concentração de insulina no plasma. 100 μ l de amostras de sangue são tirados em tubos esfriados contendo EDTA. As amostras são mantidas em gelo até centrifugadas (7000 rpm, 4°C, 5 min), o plasma é pipetado em tubos Micrônicos e depois congelado a 20°C até o ensaio. Concentrações no plasma dos análogos de insulina são medidas em um imunoenensaio que é considerado apropriado ou validado para o análogo individual.

Amostras de sangue são tiradas em t=-10 (para glicose de sangue apenas), em t=-1 (logo antes do doseamento) e em intervalos especificados por 4 horas ou mais pós-doseamento.

Exemplo Nº	MRT (min) (Tempo de retenção médio, gavagem)	Fpo. Gavagem (%)	Fpo. Injeção de Intraintestinal (%)
183 (técnica anterior)	97 \pm 15	0,005 \pm 0,009	0,28 \pm 0,14
2	401 \pm 82	0,05 \pm 0,02	
9	345 \pm 111	0,10 \pm 0,09	1,9 \pm 1,0
13	251 \pm 47	0,12 \pm 0,08	
16	416 \pm 37	0,06 \pm 0,04	1,8 \pm 1,9
18	149 \pm 29	0,13 \pm 0,07	
24	194 \pm 54	0,06 \pm 0,05	1,4 \pm 1,1
25	481 \pm 108	0,20 \pm 0,05	3,3 \pm 1,2
26			
33			

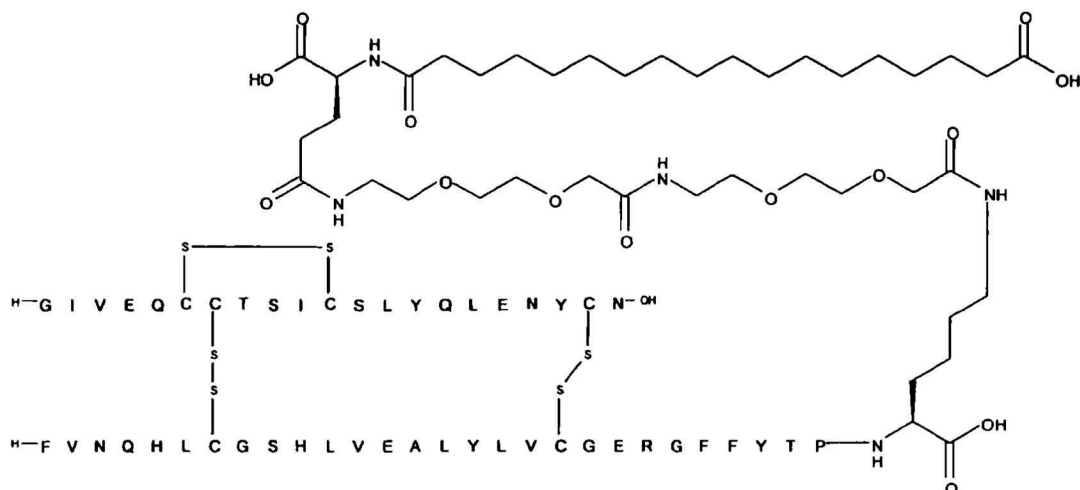
Farmacodinâmica dos ratos:

Perfis de glicose sanguínea versus tempo seguindo administração oral (como descrito acima) de insulinas aciladas selecionadas da invenção são mostrados abaixo:

Exemplo 183

O efeito oral de ratos Wistar machos de jejum à noite em uma

insulina da técnica anterior, isto é:



B29K(*N*^oOctadecanodioil- γ Glu-OEG-OEG), desB30 é dado na figura 1 abaixo.

EXEMPLO 184

- 5 Potência dos análogos de insulina acilada desta invenção com relação à insulina humana

Ratos Sprague Dawley machos pesando 238-383 g no dia experimental são usados para o experimento de grampo. Os ratos têm acesso livre à alimentação sob condições de ambiente controlado e são jejuados durante a noite (de 3 pm) antes do experimento de grampo.

Protocolo experimental:

- Os ratos são aclimatados nas instalações animais por pelo menos 1 semana antes do procedimento cirúrgico. Cerca de 1 semana antes do experimento de grampo, cateteres Tygon são inseridos sob anestesia de halotano na veia jugular (para infusão) e a artéria carótida (para amostragem de sangue) e exteriorizados e fixados na parte de trás do pescoço. Aos ratos é dado Streptocilin vet. (Boehringer Ingelheim; 0,15 ml/rato, i.m.) pós-surgicamente e colocados em uma unidade de cuidado animal (25°C) durante o período de restabelecimento. Para obter analgesia, Anorphin (0,06 mg/rato, s.c.) é administrada durante a anestesia e Rimadyl (1,5 mg/kg, s.c.) é administrado após restabelecimento total da anestesia (2-3 h) e novamente uma vez diariamente durante 2 dias.

Às 7 horas da manhã no dia experimental, ratos jejuados duran-

te a noite (de 3 pm do dia anterior) são pesados e conectados às seringas de amostragem e ao sistema de infusão (bombas Harvard 22 Basic, Harvard, e seringa de vidro Hipodérmica Perfectum, Aldrich) e depois colocados em gaiolas de grampo individuais onde eles descansam para cerca de 45 min antes do começo do experimento. Os ratos são capazes de moverem-se livremente em sua cama usual durante o experimento inteiro e ter acesso livre à água potável. Após um período basal de 30 min durante os quais os níveis de glicose no plasma foram medidos em intervalos de 10 min, o derivado de insulina a ser testado e insulina humana (um nível de dose por rato, n = 6–7 por nível de dose) é infuso (i.v.) a uma taxa constante por 300 min. Opcionalmente uma infusão de bolo preparatório do derivado de insulina a ser testado é administrada para alcançar níveis de estado fixo imediatos no plasma. A dose da infusão de bolo preparatório pode ser calculada com base nos dados de liberação obtidos de farmacocinética i.v. de bolo por um farmacocineticista versado na técnica. Níveis de glicose no plasma são medidos em intervalos de 10 min ao longo e infusão de 20% de glicose aquosa é ajustada conseqüentemente para manter a euglicemia. As amostras de eritrócitos ressuspensos são agrupadas de cada rato e retornadas para cerca de volumes de ½ ml por meio do cateter da carótida.

Em cada dia experimental, as amostras das soluções dos derivados de insulina individuais a serem testados e a solução de insulina humana são tiradas antes e ao terminal dos experimentos de grampo e as concentrações dos peptídeos são confirmadas por HPLC. Concentrações no plasma de insulina e C-peptídeo de rato como também do derivado de insulina ser testado e insulina humana são medidas em pontos de tempo relevantes antes e ao terminal dos estudos. Os ratos são mortos ao terminal de experimento usando uma overdose de pentobarbital.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

SEQ ID Nos. 5-11 são as sequências para as cadeias A presentes nos compostos desta invenção mostrados nos exemplos específicos acima e SEQ ID Nos. 12-29 são as sequências para as cadeias B presentes nos compostos desta invenção mostrados nos exemplos específicos acima.

As insulinas a ser testada no modelo de injeção intrainestinal são formuladas como formuladas acima para o modelo de gavagem.

O rato anestesiado é colocado em uma manta homotérmica estabilizada a 37°C. Um cateter de 20 cm de polietileno montado em uma seringa de 1 ml é enchido com formulação de insulina ou veículo. Uma incisão de linha intermediária de 4-5 cm é feita na parede abdominal. O cateter é inserido suavemente no jejuno médio ~ 50 cm do ceco por penetração da parede intestinal. Se o conteúdo intestinal estiver presente, o sítio de aplicação é movido \pm 10 cm. A ponta do cateter é colocada aprox. 2 cm dentro do lúmen do segmento intestinal e fixado sem o uso de ligaduras. Os intestinos são substituídos cuidadosamente na cavidade abdominal e a parede abdominal e pele são fechadas com autogrampos em cada camada. No tempo 0, os ratos são dosados por meio do cateter, 0,4 ml/kg de composto de teste ou veículo.

As amostras de sangue são colhidas para a determinação das concentrações de glicose de sangue total em tubos capilares heparinizados de 10 μ l por furo dos vasos capilares na ponta da cauda. Concentrações de glicose no sangue são medidas após diluição em 500 μ l de tampão de análise pelo método de glicose oxidase usando um autoanalisador de Biosen (EKF Diagnostic GmbH, Alemanha). Cursos médios de concentração de glicose no sangue (\pm SEM médio) são feitos para cada composto.

Amostras são colhidas para determinação da concentração de insulina no plasma. 100 μ l de amostras de sangue são tirados em tubos esfriados contendo EDTA. As amostras são mantidas em gelo até centrifugadas (7000 rpm, 4°C, 5 min), o plasma é pipetado em tubos Micrônicos e depois congelado a 20°C até o ensaio. Concentrações no plasma dos análogos de insulina são medidas em um imunensaio que é considerado apropriado ou validado para o análogo individual.

Amostras de sangue são tiradas em $t=-10$ (para glicose de sangue apenas), em $t=-1$ (logo antes do doseamento) e em intervalos especificados por 4 horas ou mais pós-doseamento.

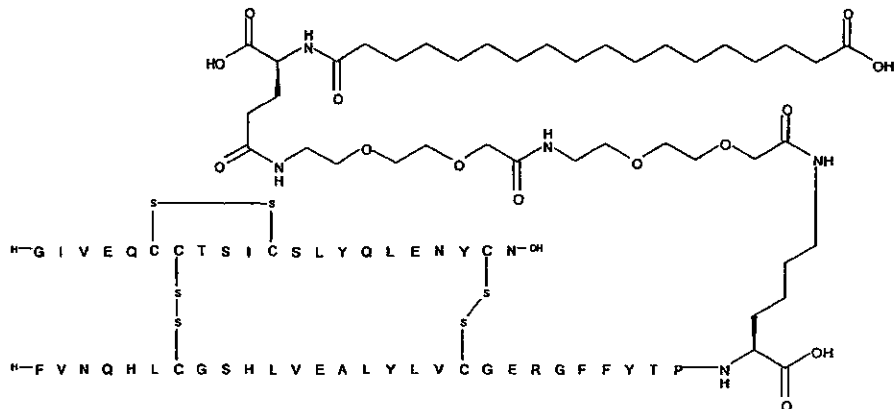
Exemplo No.	MRT (min) (Tempo de retenção médio, gavagem)	Fpo. Gavagem (%)	Fpo. Injeção de Intraintestinal (%)
183 (técnica anterior)	97 ± 15	0,005 ± 0,009	0,28 ± 0,14
2	401 ± 82	0,05 ± 0,02	
9	345 ± 111	0,10 ± 0,09	1,9 ± 1,0
13	251 ± 47	0,12 ± 0,08	
16	416 ± 37	0,06 ± 0,04	1,8 ± 1,9
18	149 ± 29	0,13 ± 0,07	
24	194 ± 54	0,06 ± 0,05	1,4 ± 1,1
25	481 ± 108	0,20 ± 0,05	3,3 ± 1,2
26			
33			

Farmacodinâmica dos ratos:

Perfis de glicose sanguínea vs. tempo seguindo administração oral (como descrito acima) de insulinas aciladas selecionadas da invenção são mostrados abaixo:

5 Exemplo 183

O efeito oral de ratos Wistar machos de jejum à noite em uma insulina da técnica anterior, isto é:



B29K(N^ε-Octadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30 é dado na figura 1 abai-

xo.

EXEMPLO 184

POTÊNCIA DOS ANÁLOGOS DE INSULINA ACILADA DESTA
INVENÇÃO COM RELAÇÃO À INSULINA HUMANA

5 Ratos Sprague Dawley machos pesando 238-383 g no dia experimental são usados para o experimento de grampo. Os ratos têm acesso livre à alimentação sob condições de ambiente controlado e são jejuados durante a noite (de 3 pm) antes do experimento de grampo.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL:

10 Os ratos são aclimados nas instalações animais por pelo menos 1 semana antes do procedimento cirúrgico. Cerca de 1 semana antes do experimento de grampo, cateteres Tygon são inseridos sob anestesia de halotano na veia jugular (para infusão) e a artéria carótida (para amostragem de sangue) e exteriorizados e fixados na parte de trás do pescoço. Aos ratos é
15 dado Streptocilin vet. (Boehringer Ingelheim; 0,15 ml/rato, i.m.) pós-cirurgicamente e colocados em uma unidade de cuidado animal (25°C) durante o período de restabelecimento. Para obter analgesia, Anorphin (0,06 mg/rato, s.c.) é administrada durante a anestesia e Rimadyl (1,5 mg/kg, s.c.) é administrado após restabelecimento total da anestesia (2-3 h) e novamente
20 uma vez diariamente durante 2 dias.

25 Às 7 horas da manhã no dia experimental ratos jejuados durante a noite (de 3 pm do dia anterior) são pesados e conectados às seringas de amostragem e ao sistema de infusão (bombas Harvard 22 Basic, Harvard, e seringa de vidro Hipodérmica Perfectum, Aldrich) e depois colocados em gaiolas de grampo individuais onde eles descansam para ca. 45 min antes do começo do experimento. Os ratos são capazes de moverem-se livremente em sua cama usual durante o experimento inteiro e ter acesso livre à água potável. Após um período basal de 30 min durante os quais os níveis de glicose no plasma foram medidos em intervalos de 10 min, o derivado de insulina a ser testado e insulina humana (um nível de dose por rato, n = 6-7 por
30 nível de dose) é infuso (i.v.) a uma taxa constante por 300 min. Opcionalmente uma infusão de bolo preparatório do derivado de insulina a ser testa-

do é administrada para alcançar níveis de estado fixo imediatos no plasma. A dose da infusão de bolo preparatório pode ser calculada com base nos dados de liberação obtidos de farmacocinética i.v. de bolo por um farmacocineticista versado na técnica. Níveis de glicose no plasma são medidos em intervalos de 10 min ao longo e infusão de 20% de glicose aquosa é ajustada consequentemente para manter a euglicemia. As amostras de eritrócitos ressuspensos são agrupadas de cada rato e retornadas para cerca de volumes de ½ ml por meio do cateter da carótida.

Em cada dia experimental, as amostras das soluções dos derivados de insulina individuais a ser testados e a solução de insulina humana são tiradas antes e ao término dos experimentos de grampo e as concentrações dos peptídeos são confirmadas por HPLC. Concentrações no plasma de insulina e C-peptídeo de rato como também do derivado de insulina ser testado e insulina humana são medidas em pontos de tempo relevantes antes e ao término dos estudos. Os ratos são mortos ao término de experimento usando uma overdose de pentobarbital.

LISTAS DE SEQUÊNCIA

SEQ ID Nos. 5-11 são as sequências para as cadeias A presentes nos compostos desta invenção mostrados nos exemplos específicos acima e SEQ ID Nos. 12-29 são as sequências para as cadeias B presentes nos compostos

5 desta invenção mostrados nos exemplos específicos acima.

REIVINDICAÇÕES

1. Insulina estabilizada em protease acilada, caracterizada pelo fato de que, formalmente, consiste em uma não insulina estabilizada em protease (insulina parental), em que pelo menos um aminoácido hidrofóbico foi substituído com aminoácidos hidrófilos, e em que a dita substituição é dentro ou em proximidade íntima a um ou mais sítios de clivagem de protease da insulina não estabilizada em protease (insulina parental) e em que tal insulina estabilizada em protease opcionalmente compreende ainda uma ou mais mutações adicionais com a condição que haja apenas um resíduo de lisina na insulina estabilizada, e em que a porção de acila seja ligada ao resíduo de lisina ou a uma posição N-terminal na insulina estabilizada em protease.

2. Insulina estabilizada em protease acilada, caracterizada pelo fato de que, formalmente, consiste em uma não insulina estabilizada em protease (insulina parental), em que pelo menos dois aminoácidos hidrofóbicos foram substituídos com aminoácidos hidrófilos, e em que as ditas substituições são dentro ou em proximidade íntima a dois ou mais sítios de clivagem de protease da não insulina estabilizada em protease (insulina parental) e em que tal insulina estabilizada em protease opcionalmente compreende ainda uma ou mais mutações adicionais com a condição que haja apenas um resíduo de lisina na insulina estabilizada, e em que a porção de acila seja ligada ao resíduo de lisina na insulina estabilizada em protease.

3. Insulina estabilizada em protease acilada, caracterizada pelo fato de que, formalmente, consiste em uma não insulina estabilizada em protease (insulina parental), em que pelo menos dois aminoácidos hidrofóbicos foram substituídos com aminoácidos hidrófilos, e em que as ditas substituições são dentro ou em proximidade íntima a dois ou mais sítios de clivagem de protease da não insulina estabilizada em protease (insulina parental) e em que tal insulina estabilizada em protease opcionalmente compreende ainda uma ou mais mutações adicionais com a condição que haja apenas um resíduo de lisina na insulina estabilizada, e em que a porção de acila seja ligada ao resíduo de lisina ou a uma posição N-terminal na insulina estabilizada em protease.

4. Insulina acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que possui solubilidade aumentada com relação à insulina parental acilada.

5 5. Insulina acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que a cadeia B da insulina compreende pelo menos uma mutação com relação à insulina parental.

6. Insulina acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que a cadeia B da insulina compreende uma, duas ou três, mas não mais mutações com relação à insulina parental.
10

7. Insulina acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que a cadeia A da insulina estabilizada em protease é idêntica à cadeia A da insulina humana.

8. Insulina acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que a cadeia A da insulina compreende pelo menos uma mutação e a cadeia B da insulina compreende pelo menos uma mutação com relação à insulina parental.
15

9. Insulina acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo fato de que a cadeia A da insulina compreende pelo menos duas mutações e a cadeia B da insulina compreende pelo menos uma mutação com relação à insulina parental.
20

10. Insulina acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que a insulina compreende ainda pelo menos uma substituição de aminoácido em um sítio de protease de uma primeira insulina estabilizada em protease modificada, em que a dita pelo menos uma substituição de aminoácido é de modo que pelo menos um aminoácido hidrofóbico foi substituído com pelo menos um aminoácido hidrófilo.
25

11. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo fato de que o aminoácido na posição A12 é Glu ou Asp; e/ou o aminoácido na posição A13 é His, Asn, Glu ou Asp; e/ou o aminoácido na posição A14 é Tyr, Asn, Gln, Glu, Arg, Asp, Gly ou His; e/ou o aminoácido na posição A15 é Glu ou Asp; e
30

o aminoácido na posição B24 é His; e/ou o aminoácido na posição B25 é His ou Asn; e/ou o aminoácido na posição B26 é His, Gly, Asp ou Thr; e/ou o aminoácido na posição B27 é His, Glu, Asp, Gly ou Arg; e/ou o aminoácido na posição B28 é His, Gly, Glu ou Asp; e que opcionalmente compreende
5 ainda uma ou mais mutações adicionais.

12. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizada pelo fato de que o aminoácido na posição A12 é Glu ou Asp; e/ou o aminoácido na posição A13 é His, Asn, Glu ou Asp; e/ou o aminoácido na posição A14 é Tyr, Asn, Gln,
10 Glu, Arg, Asp, Gly ou His; e/ou o aminoácido na posição A15 é Glu ou Asp; e/ou o aminoácido na posição B16 é Tyr, His ou Glu; e/ou o aminoácido na posição B24 é His; e/ou o aminoácido na posição B25 é His ou Asn; e/ou o aminoácido na posição B26 é His, Gly, Asp ou Thr; e/ou o aminoácido na posição B27 é His, Glu, Asp, Gly, Lys, Arg ou deletado; e/ou o aminoácido
15 na posição B28 é His, Gly, Glu, Asp, ou ausente (deletado); e/ou o aminoácido na posição B29 é Lys, Arg, ou ausente (deletado); e que opcionalmente compreende ainda uma ou mais mutações adicionais e, preferivelmente, insulina estabilizada em protease acilada em que o aminoácido na posição A12 é Glu ou Asp; e/ou o aminoácido na posição A13 é His, Asn, Glu ou
20 Asp; e/ou o aminoácido na posição A14 é Tyr, Asn, Gln, Glu, Arg, Asp, Gly ou His; e/ou o aminoácido na posição A15 é Glu ou Asp; e o aminoácido na posição B24 é His; e/ou o aminoácido na posição B25 é His ou Asn; e/ou o aminoácido na posição B26 é His, Gly, Asp ou Thr; e/ou o aminoácido na posição B27 é His, Glu, Asp, Gly ou Arg; e/ou o aminoácido na posição B28
25 é His, Gly, Glu, ou Asp; e que opcionalmente compreende ainda uma ou mais mutações adicionais.

13. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizada pelo fato de que o aminoácido na posição A14 é Glu, Asp ou His, o aminoácido na posição B25
30 é His ou Asn, e que opcionalmente compreende ainda uma ou mais mutações adicionais.

14. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com

qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizada pelo fato de que o aminoácido na posição A14 é Glu, Asp ou His, o aminoácido na posição B25 é His ou Asn, e o aminoácido na posição B30 é deletado.

5 15. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizada pelo fato de que o aminoácido na posição A14 é Glu, Asp ou His, o aminoácido na posição B16 é His ou Glu, o aminoácido na posição B25 é His e o aminoácido na posição B30 é deletado.

10 16. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizada pelo fato de que o aminoácido na posição A14 é Glu, Asp ou His e o aminoácido na posição B25 é His e o aminoácido na posição B30 é deletado.

15 17. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizada pelo fato de que o aminoácido na posição A14 é Glu ou Asp e o aminoácido na posição B28 é Glu ou Asp, e, opcionalmente, não há qualquer resíduo de aminoácido na posição B30.

20 18. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que uma ou mais mutações adicionais são selecionadas de um grupo que consiste em: A8His, A18Gln, A21Gln, A21Gly, B1Glu, B1Gln, B3Gln, B10Pro, B14Thr, B16Glu, B17Ser, B26Asp, B27Glu, B27Asp, B28Asp, B28Glu, e desB30.

25 19. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizada pelo fato de que a mutação adicional é desB30.

20. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizada pelo fato de que A14 é Glu.

30 21. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizada pelo fato de que B25 é Asn.

22. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com

qualquer uma das reivindicações 1 a 21, caracterizada pelo fato de que B25 é His.

23. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, caracterizada pelo fato de que B25
5 é Asn e B27 é Glu ou Asp.

24. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, caracterizada pelo fato de que B25 é Asn e B27 é Glu.

25. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com
10 qualquer uma das reivindicações 1 a 24, caracterizada pelo fato de que apresenta estabilidade aumentada para uma ou mais enzimas de protease com relação à proteína parental.

26. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, caracterizada pelo fato de que a-
15 apresenta estabilidade aumentada para duas ou mais enzimas de protease com relação à proteína parental.

27. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que a insulina parental é selecionada de um grupo que consiste em:

20 a) insulina humana;

b) um análogo de insulina de insulina humana em que o resíduo de aminoácido na posição B28 é Pro, Asp, Lys, Leu, Val ou Ala e o resíduo de aminoácido na posição B29 é Lys ou Pro e opcionalmente o resíduo de aminoácido na posição B30 é deletado;

25 c) des(B26-B30) insulina humana, des(B27-B30) insulina humana, insulina humana de des(B28-B30), des(B29-B30) insulina humana, insulina humana de des(B27) ou insulina humana de des(B30);

d) um análogo de insulina de insulina humana em que o resíduo de aminoácido na posição B3 é Lys e o resíduo de aminoácido na posição
30 B29 é Glu ou Asp;

e) um análogo de insulina de insulina humana em que o resíduo de aminoácido na posição A21 é Gly e em que o análogo de insulina é tam-

bém estendido no C-terminal com dois resíduos de Arg;

f) um derivado de insulina em que o resíduo de aminoácido na posição B30 é substituído com um éster de metila de treonina; e

5 g) um derivado de insulina em que à posição Nε da lisina na posição B29 de insulina humana de des(B30) uma cadeia de tetradecanoíla está ligada.

28. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 27, caracterizada pelo fato de que uma ou mais mutações adicionais são selecionadas para intensificar a estabilidade química da insulina.

29. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 28, caracterizada pelo fato de que uma ou mais mutações adicionais são selecionadas de um grupo que consiste em A18Gln, A21Gln, A21Gly e B3Gln.

15 30. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 29, caracterizada pelo fato de que compreende uma sequência de aminoácido de cadeia A da fórmula 1, isto é: Xaa_{A(-2)}-Xaa_{A(-1)}-Xaa_{A0}-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Xaa_{A8}-Ser-Ile-Cys-Xaa_{A12}-Xaa_{A13}-Xaa_{A14}-Xaa_{A15}-Leu-Glu-Xaa_{A18}-Tyr-Cys-Xaa_{A21} (SEQ ID No: 1), e uma sequência de aminoácido de cadeia B da fórmula 2, isto é: Xaa_{B(-2)}-Xaa_{B(-1)}-Xaa_{B0}-Xaa_{B1}-Xaa_{B2}-Xaa_{B3}-Xaa_{B4}-His-Leu-Cys-Gly-Ser-Xaa_{B10}-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Xaa_{B16}-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Xaa_{B24}-Xaa_{B25}-Xaa_{B26}-Xaa_{B27}-Xaa_{B28}-Xaa_{B29}-Xaa_{B30}-Xaa_{B31}-Xaa_{B32} (SEQ ID No: 2), em que Xaa_{A(-2)} está ausente ou Gly; Xaa_{A(-1)} está ausente ou Pro; Xaa_{A0} está ausente ou Pro; Xaa_{A8} é independentemente selecionado de Thr e His; Xaa_{A12} é independentemente selecionado de Ser, Asp e Glu; Xaa_{A13} é independentemente selecionado de Leu, Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser e Glu; Xaa_{A14} é independentemente selecionado de Tyr, Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser e Glu; Xaa_{A15} é independentemente selecionado de Gln, Asp e Glu; Xaa_{A18} é independentemente selecionado de Asn, Lys e Gln; Xaa_{A21} é independentemente selecionado de Asn e Gln; Xaa_{B(-2)} está ausente ou Gly; Xaa_{B(-1)} está ausente ou Pro; Xaa_{B0} está ausente ou Pro; Xaa_{B1}

20

25

30

está ausente ou independentemente selecionado de Phe e Glu; Xaa_{B2} está ausente ou Val; Xaa_{B3} está ausente ou independentemente selecionado de Asn e Gln; Xaa_{B4} é independentemente selecionado de Gln e Glu; Xaa_{B10} é independentemente selecionado de His, Asp, Pro e Glu; Xaa_{B16} é independentemente selecionado de Tyr, Asp, Gln, His, Arg, e Glu; Xaa_{B24} é independentemente selecionado de Phe e His; Xaa_{B25} é independentemente selecionado de Phe, Asn e His; Xaa_{B26} está ausente ou independentemente selecionado de Tyr, His, Thr, Gly e Asp; Xaa_{B27} está ausente ou independentemente selecionado de Thr, Asn, Asp, Gln, His, Gly, Arg, Pro, Ser e Glu; Xaa_{B28} está ausente ou independentemente selecionado de Pro, His, Gly e Asp; Xaa_{B29} está ausente ou independentemente selecionado de Lys e Gln; Xaa_{B30} está ausente ou Thr; Xaa_{B31} está ausente ou Leu; Xaa_{B32} está ausente ou Glu; o C-terminal pode ser opcionalmente derivatizado como uma amida; em que a sequência de aminoácido da cadeia A e a sequência de aminoácido da cadeia B são conectadas por ligações em ponte de dissulfeto entre as cisteínas na posição 7 da cadeia A e a cisteína na posição 7 da cadeia B, e entre a cisteína na posição 20 da cadeia A e a cisteína na posição 19 da cadeia B e em que as cisteínas na posição 6 e 11 da cadeia A são conectadas por uma ligação em ponte de dissulfeto; em que opcionalmente a sequência de aminoácido da cadeia A N-terminal é conectada à sequência de aminoácido da cadeia B C-terminal por uma sequência de aminoácido compreendendo 3-7 aminoácidos para formar uma molécula de insulina de cadeia simples, em que opcionalmente o N-terminal da cadeia B é estendido com 1-10 aminoácidos; em que se Xaa_{A8} for Thr e Xaa_{A12} for Ser e Xaa_{A13} for Leu e Xaa_{A14} for Tyr então Xaa_{A15} é Glu ou Asp; e em que se Xaa_{B24} for Phe e Xaa_{B25} for Phe e Xaa_{B26} for Tyr e Xaa_{B27} for Thr e Xaa_{B28} for Pro então Xaa_{B29} é Gln.

31. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 30, caracterizada pelo fato de que compreende uma sequência de aminoácido de cadeia A da fórmula 3, isto é: Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Xaa_{A8}-Ser-Ile-Cys-Xaa_{A12}-Xaa_{A13}-Xaa_{A14}-Xaa_{A15}-Leu-Glu-Xaa_{A18}-Tyr-Cys-Xaa_{A21} (SEQ ID No: 3), e uma sequência de

aminoácido de cadeia B da fórmula 4, isto é: Xaa_{B1}-Val-Xaa_{B3}-Xaa_{B4}-seu-Leu-Cys-Gly-Ser-Xaa_{B10}-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Xaa_{B16}-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Xaa_{B24}-seu-Xaa_{B26}-Xaa_{B27}-Xaa_{B28}-Xaa_{B29}-Xaa_{B30} (SEQ ID No: 4), em que Xaa_{A8} é independentemente selecionado de Thr e His; Xaa_{A12} é independentemente selecionado de Ser, Asp e Glu; Xaa_{A13} é independentemente selecionado de Leu, Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser e Glu; Xaa_{A14} é independentemente selecionado de Tyr, Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser e Glu; Xaa_{A15} é independentemente selecionado de Gln, Asp e Glu; Xaa_{A18} é independentemente selecionado de Asn, Lys e Gln; Xaa_{A21} é independentemente selecionado de Asn, e Gln; Xaa_{B1} é independentemente selecionado de Phe e Glu; Xaa_{B3} é independentemente selecionado de Asn e Gln; Xaa_{B4} é independentemente selecionado de Gln e Glu; Xaa_{B10} é independentemente selecionado de His, Asp, Pro e Glu; Xaa_{B16} é independentemente selecionado de Tyr, Asp, Gln, His, Arg, e Glu; Xaa_{B24} é independentemente selecionado de Phe e His; Xaa_{B25} é independentemente selecionado de Phe, Asn e His; Xaa_{B26} está ausente ou independentemente selecionado de Tyr, His, Thr, Gly e Asp; Xaa_{B27} está ausente ou independentemente selecionado de Thr, Asn, Asp, Gln, His, Gly, Arg, Pro, Ser e Glu; Xaa_{B28} está ausente ou independentemente selecionado de Pro, His, Gly e Asp; Xaa_{B29} está ausente ou independentemente selecionado de Lys e Gln; Xaa_{B30} está ausente ou Thr; o término C pode ser opcionalmente derivatizado como uma amida; em que a sequência de aminoácido de cadeia A e a sequência de aminoácido de cadeia B estão conectadas através de ligações em ponte de dissulfeto entre as cisteínas na posição 7 da cadeia A e a cisteína na posição 7 da cadeia B, e entre a cisteína na posição 20 da cadeia A e a cisteína na posição 19 da cadeia B e em que as cisteínas na posição 6 e 11 da cadeia A estão conectadas por uma ligação em ponte de dissulfeto.

32. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo a reivindicação 31, caracterizada pelo fato de que Xaa_{A8} é independentemente selecionado de Thr e His; Xaa_{A12} é independentemente selecionado de Ser e Glu; Xaa_{A13} é independentemente selecionado de Leu, Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, Pro, Ser e Glu; Xaa_{A14} é independentemente selecionado

de Tyr, Asp, His, e Glu; Xaa_{A15} é independentemente selecionado de Gln e Glu; Xaa_{A18} é independentemente selecionado de Asn, Lys e Gln; Xaa_{A21} é independentemente selecionado de Asn, e Gln; Xaa_{B1} é independentemente selecionado de Phe e Glu; Xaa_{B3} é independentemente selecionado de Asn e Gln; Xaa_{B4} é independentemente selecionado de Gln e Glu; Xaa_{B10} é independentemente selecionado de His, Asp, Pro e Glu; Xaa_{B16} é independentemente selecionado de Tyr, Asp, Gln, His, Arg, e Glu; Xaa_{B24} é independentemente selecionado de Phe e His; Xaa_{B25} é independentemente selecionado de Phe, Asn e His; Xaa_{B26} é independentemente selecionado de Tyr, Thr, Gly e Asp; Xaa_{B27} é independentemente selecionado de Thr, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Gly, Arg, e Glu; Xaa_{B28} é independentemente selecionado do Pro, Gly e Asp; Xaa_{B29} é independentemente selecionado de Lys e Gln; Xaa_{B30} está ausente ou Thr; o término C pode ser opcionalmente derivatizado como uma amida; em que a sequência de aminoácido de cadeia A e a sequência de aminoácido de cadeia B estão conectadas através de ligações em ponte de dissulfeto entre as cisteínas na posição 7 da cadeia A e a cisteína na posição 7 da cadeia B, e entre a cisteína na posição 20 da cadeia A e a cisteína na posição 19 da cadeia B e em que as cisteínas na posição 6 e 11 da cadeia A estão conectadas por uma ligação em ponte de dissulfeto.

20 33. Insulina estabilizada em protease acilada, caracterizada pelo fato de que, na insulina estabilizada em protease, o aminoácido na posição A14 é Glu ou His (isto é, E ou H, de acordo com o código de uma letra), o aminoácido na posição B25 é His e que opcionalmente compreende ainda uma ou mais mutações adicionais, e em que a porção de acila é ligada ao grupo ε amino no resíduo de lisina na posição B29.

30 34. Insulina estabilizada em protease acilada, caracterizada pelo fato de que, na insulina estabilizada em protease, o aminoácido na posição B25 é His ou Asn, o aminoácido na posição B27 é Glu ou Asp, e que opcionalmente compreende ainda uma ou mais das mutações adicionais seguintes: A8H, A14E/D, B1E/D, B28E/D, e desB30 e em que a porção de acila é ligada ao grupo ε amino no resíduo de lisina na posição B29.

35. Insulina estabilizada em protease acilada, caracterizada pelo

fato de que, na insulina estabilizada em protease, o aminoácido na posição A14 é Tyr, Glu ou His (isto é, Y, E ou H, de acordo com o código de uma letra), o aminoácido na posição B25 é Asn, o aminoácido na posição B27 é Glu ou Asp e que opcionalmente compreende ainda uma ou mais mutações
5 adicionais, e em que a porção de acila é ligada ao grupo ϵ amino no resíduo de lisina na posição B29.

36. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 35, caracterizada pelo fato de que a insulina estabilizada em protease compreende a mutação de A14E.

10 37. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 36, caracterizada pelo fato de que, na insulina estabilizada em protease, além da mutação na posição B25, há apenas a mutação na posição A14 mencionada na cláusula precedente.

15 38. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 37, caracterizada pelo fato de que a insulina estabilizada em protease compreende a mutação de A14H.

20 39. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 38, caracterizada pelo fato de que o análogo da insulina estabilizada em protease compreende a mutação de desB30.

40. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 39, caracterizada pelo fato de que a uma ou mais mutações adicionais dentro da insulina estabilizada em protease é selecionada de um grupo que consiste em: A(-1)P, A(0)P, A8H, A21G,
25 B(-1)P, B(0)P, B1E, B1Q, B16E, B26D, B27E, B28D, desB30, B31L e B32E.

41. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com a reivindicação 40, caracterizada pelo fato de que, além das mutações nas posições A14 e B25, apresenta apenas uma das mutações como definida na reivindicação 40.

30 42. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 40, caracterizada pelo fato de que, além das mutações nas posições A14 e B25, apresenta exatamente duas das

mutações mencionadas como definidas na reivindicação 40.

43. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 40, caracterizada pelo fato de que, além das mutações nas posições A14 e B25, apresenta exatamente três das mutações como definidas na reivindicação 40.

44. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 40 e 43, caracterizada pelo fato de que, além das mutações nas posições A14 e B25, a única mutação adicional é desB30.

45. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 44, caracterizada pelo fato de que o resíduo C do aminoácido terminal na cadeia A da insulina estabilizada em protease é o resíduo de aminoácido A21.

46. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 45, caracterizada pelo fato de que a insulina estabilizada em protease é selecionada do grupo que consiste em insulina humana de A8H, B25N, B27E, desB30; insulina humana de A14E, A18L, B25H, desB30; insulina humana de A14E, A21G, B25H, desB27, desB30; insulina humana de A14E, B1E, B25H, B27E, B28E, desB30; insulina humana de A14E, B1E, B25H, B28E, desB30; insulina humana de A14E, B1E, B27E, B28E, desB30; insulina humana de A14E, B1E, B28E, desB30; insulina humana de A14E, B16H, B25H, desB30; insulina humana de A14E, B25H, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B27E, desB30; insulina humana de A14E, B25H, desB27, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29R, desB30; insulina humana de A14E, B28D, desB30; insulina humana de A14E, B28E, desB30; B25N, B27E, desB30; B25H, desB30; A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29R, desB30; insulina humana de A14E, A21G, B25H, desB27, desB30; insulina humana de A14E, A21G, B25H, desB30; insulina humana de A14E, B16H, B25H, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B16H, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30; insulina humana de

A14E, B25H, desB27, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B27K, desB28, desB29, desB30; insulina humana de A14E, B25H, desB30; insulina humana de A14E, desB30 e A21G, B25H, desB30.

5 47. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 46, caracterizada pelo fato de que a porção de acila ligada à insulina estabilizada em protease apresenta a fórmula geral $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$ (I), em que Acy, AA1, AA2, AA3, n, m e p são como definidos acima.

10 48. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 47, caracterizada pelo fato de que Acy é um ácido graxo, preferivelmente ácido mirístico ou ácido estérico, mais preferido ácido mirístico.

15 49. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 48, caracterizada pelo fato de que Acy é um diácido graxo, preferivelmente um diácido graxo (α,ω), mais preferido ácido heptadecanodioico, ácido hexadecanodioico, ácido octadecanodioico, ácido nonadecanodioico, ácido docosanodioico, ácido eicosanodioico.

20 50. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 48, caracterizada pelo fato de que Acy é um ácido ω -(tetrazol-5-il)-graxo, preferivelmente ácido 15-(1H-tetrazol-5-il)pentadecanoico, ácido 16-(1H-tetrazol-5-il)hexadecanoico, ácido 17-(1H-tetrazol-5-il)heptadecanoico, ácido 18-(1H-tetrazol-5-il)octadecanoico, ou ácido 19-(1H-tetrazol-5-il)nonadecanoico.

25 51. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 50, caracterizada pelo fato de que AA1 é ácido tranexâmico ou glicina.

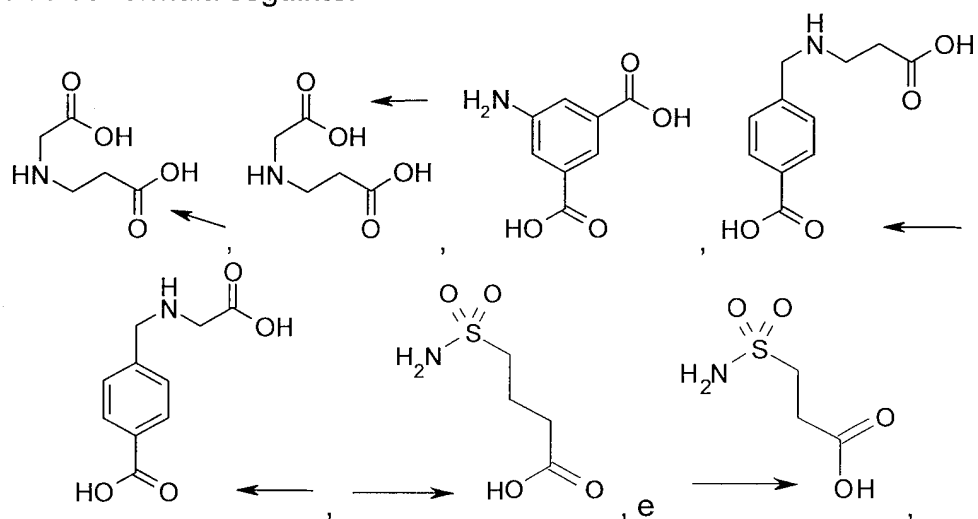
52. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 51, caracterizada pelo fato de que AA1 é ácido tranexâmico.

30 53. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 52, caracterizada pelo fato de que n é 0 ou 1.

54. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 53, caracterizada pelo fato de que n é 0.

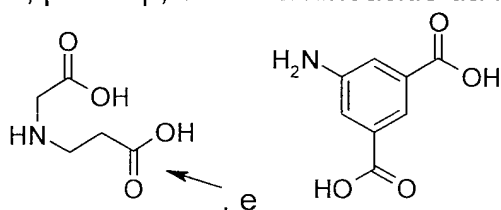
55. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 54, caracterizada pelo fato de que n é 1.

56. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 55, caracterizada pelo fato de que AA2 é γ Glu, α Glu, β Asp, α Asp, γ -D-Glu, α -D-Glu, β -D-Asp, α -D-Asp, ou um aminoácido da fórmula seguinte:



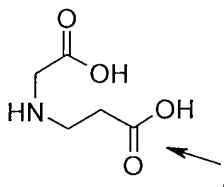
e em que as setas indicam o ponto de ligação ao grupo amino de AA1, AA2, AA3 ou ao grupo ϵ -amino do resíduo de lisina B29 ou a uma posição N-terminal da insulina estabilizada em protease.

57. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 56, caracterizada pelo fato de que AA2 é γ Glu, β Asp, γ -D-Glu, β -D-Asp, ou um aminoácido da fórmula seguinte:



e em que a seta indica o ponto de ligação ao grupo amino de AA1, AA2, AA3 ou ao grupo ϵ -amino do resíduo de lisina B29 ou a uma posição N-terminal da insulina estabilizada em protease.

58. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 57, caracterizada pelo fato de que AA2 é γ Glu, γ -D-Glu, ou um aminoácido da fórmula seguinte:



em que a seta indica o ponto de ligação ao grupo amino de AA1, AA2, AA3 ou ao grupo ϵ -amino do resíduo de lisina B29 ou a uma posição N-terminal da insulina estabilizada em protease.

59. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 58, caracterizada pelo fato de que m é 0, 1, 2, 3, 4, 5, ou 6.

10 60. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 59, caracterizada pelo fato de que m é 0, 1, 2, 3, ou 4.

15 61. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 60, caracterizada pelo fato de que m é 4.

62. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 61, caracterizada pelo fato de que m é 3.

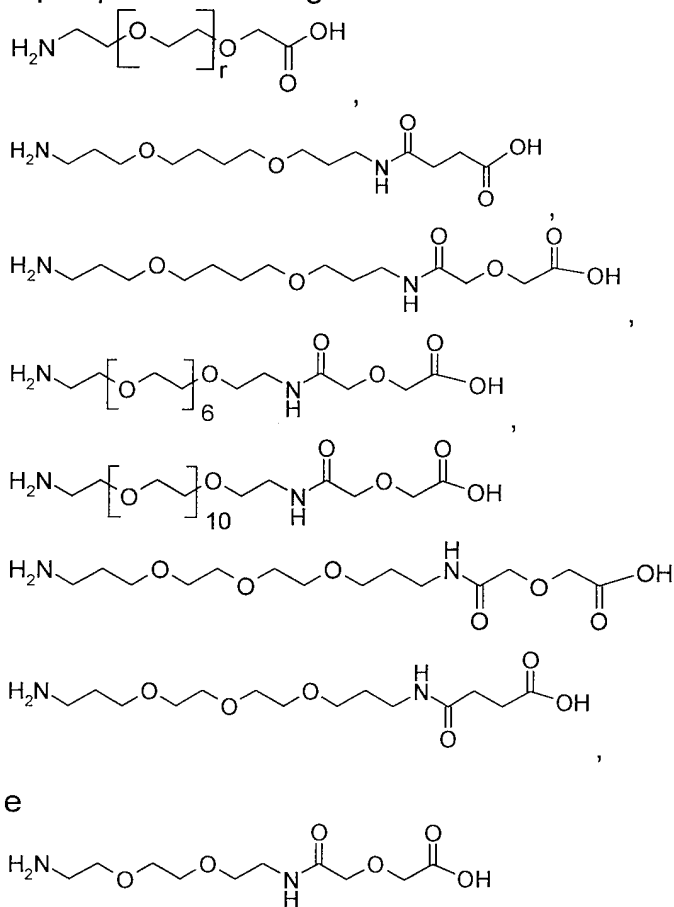
20 63. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 62, caracterizada pelo fato de que m é 2.

64. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 63, caracterizada pelo fato de que m é 1.

25 65. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 64, caracterizada pelo fato de que m é 0.

66. Insulina estabilizada em protease acilada, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 55, caracterizada pelo fato de que AA3

é selecionado de qualquer um dos seguintes:



em que r é 1, 2, 3, 5, 7, 11, 23 ou 27.

67. Insulina estabilizada em protease acilada, de acordo com a reivindicação 66, caracterizada pelo fato de que r é 1, 3, 5, ou 7.

5 68. Insulina estabilizada em protease acilada, de acordo com a reivindicação 67, caracterizada pelo fato de que r é 1.

69. Insulina estabilizada em protease acilada, de acordo com a reivindicação 67, caracterizada pelo fato de que r é 3.

10 70. Insulina estabilizada em protease acilada, de acordo com a reivindicação 67, caracterizada pelo fato de que r é 5.

71. Insulina estabilizada em protease acilada, de acordo com a reivindicação 67, caracterizada pelo fato de que r é 7.

15 72. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com a reivindicação 71, caracterizada pelo fato de que p é 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10.

73. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com a

reivindicação 72, caracterizada pelo fato de que p é 0, 1, 2, 3 ou 4.

74. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com a reivindicação 73, caracterizada pelo fato de que p é 0, 1 ou 2.

5 75. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com a reivindicação 74, caracterizada pelo fato de que p é 0 ou 2.

76. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com a reivindicação 75, caracterizada pelo fato de que p é 0.

77. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com a reivindicação 76, caracterizada pelo fato de que p é 1.

10 78. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com a reivindicação 77, caracterizada pelo fato de que p é 2.

79. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 78, caracterizada pelo fato de que pelo menos dois aminoácidos hidrofóbicos na não insulina estabilizada em protease foram substituídos com aminoácidos hidrófilos.

15 80. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 79, caracterizada pelo fato de que a porção de acila é ligada ao resíduo de lisina na insulina estabilizada em protease.

20 81. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 80, caracterizada pelo fato de que a porção de acila é ligada ao grupo amino da cadeia A do resíduo *N*-terminal na insulina estabilizada em protease.

25 82. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 81, caracterizada pelo fato de que a insulina estabilizada em protease é selecionada do grupo que consiste em insulina humana de A8H, B25N, B27E, desB30; insulina humana de A14E, A18L, B25H, desB30; insulina humana de A14E, A21G, B25H, desB27, desB30; insulina humana de A14E, B1E, B25H, B27E, B28E, desB30; insulina humana de A14E, B1E, B25H, B28E, desB30; insulina humana de A14E, B1E, B27E, B28E, desB30; insulina humana de A14E, B1E, B28E, desB30; insulina humana de A14E, B16H, B25H, desB30; insulina humana de A14E,

B25H, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B27E, desB30; insulina humana de A14E, B25H, desB27, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29R, desB30; insulina humana de A14E, B28D, desB30; insulina humana de A14E, B28E, desB30; B25N, B27E, desB30; insulina humana de A14E, A21G, B16H, B25H, desB30; insulina humana de A14E, A21G, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30; B25H, desB30; insulina humana de A21G, B25H, desB30; insulina humana de A14E, A21G, B25H, desB30 e A14E, A21G, B25H, desB27, desB30.

83. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 82, caracterizada pelo fato de que a porção de acila ligada à insulina estabilizada em protease apresenta a fórmula geral $\text{Acy-AA1}_n\text{-AA2}_m\text{-AA3}_p$ (I), em que n é 0 ou um número inteiro na faixa de 1 a 3; m é 0 ou um número inteiro na faixa de 1 a 10; p é 0 ou um número inteiro na faixa de 1 a 10; insulina humana de Acy é um ácido graxo ou um diácido graxo que compreende de cerca de 8 a cerca de 24 átomos de carbono; insulina humana de AA1 é um resíduo de aminoácido linear ou cíclico neutro; insulina humana de AA2 é um resíduo de aminoácido ácido; insulina humana de AA3 é um resíduo de aminoácido contendo alquilenoglicol, neutro; a ordem pela qual AA1, AA2 e AA3 aparecem na fórmula pode ser trocada independentemente; insulina humana de AA2 pode ocorrer várias vezes ao longo da fórmula (por exemplo, $\text{Acy-AA2-AA3}_2\text{-AA2-}$); insulina humana de AA2 pode ocorrer independentemente (= sendo diferente) várias vezes ao longo da fórmula (por exemplo, $\text{Acy-AA2-AA3}_2\text{-AA2-}$); as conexões entre Acy, AA1, AA2 e/ou AA3 são ligações de amida (peptídeo) que, formalmente, podem ser obtidas por remoção de um átomo de hidrogênio ou um grupo hidroxila (água) de cada um dentre Acy, AA1, AA2 e AA3; e ligação à insulina estabilizada em protease pode ser da extremidade C-terminal de um resíduo de AA1, AA2, ou AA3 na porção de acila da fórmula (I) ou de uma das cadeias laterais de um resíduo de AA2 presente na porção da fórmula (I).

84. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com

qualquer uma das reivindicações 1 a 83, caracterizada pelo fato de que é qualquer um dos compostos especificamente mencionados no relatório descritivo acima.

85. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com
 5 qualquer uma das reivindicações 1 a 84, caracterizada pelo fato de que é selecionada do grupo que consiste em insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^ε-hexadecandioil), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^εoctadecandioil-γGlu), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^εeicosanodioil-γGlu), desB30; insulina humana de A14E, B25H,
 10 B29K(N^ε3-carbóxi-5-octadecanodioilaminobenzoil), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^ε-N-octadecandioil-N-(2-carboxietil)glicil), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^ε (N-octadecandioil-N-carboximetil)-beta-alanila), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^ε4-([4-({19-carboxinonadecanoilamino}metil)trans-ciclo-hexanocarbonil]-γGlu), desB30;
 15 insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^εheptadecanodioil-γGlu), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^εoctadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^εmiristil), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^εeicosanodioil-γGlu-γGlu), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^ε4-([4-({19-carboxinonadecanoilamino}metil)trans-ciclo-hexanocarbonil]-γGlu-γGlu), desB30; insulina hu-
 20 mana de A14E, B25H, B29K(N^εoctadecanodioil-γGlu-γGlu), desB30; insulina humana de A14E, B28D, B29K(N^εoctadecandioil-γGlu), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^εoctadecandioil-γGlu-PEG7), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^εeicosanodioil-γGlu-OEG-OEG),
 25 desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^εeicosanodioil-γGlu-(3-(2-{2-[2-(2-aminoetóxi)etóxi]etóxi}etóxi)propionil-γGlu), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^εhexadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^εhexadecanodioil-γGlu), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^εheptadecanodioil-γGlu-OEG-OEG),
 30 desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^εoctadecanodioil-γGlu -yGlu -yGlu -yGlu), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^εeicosanodioil-γGlu-γGlu-γGlu), desB30; insulina humana de A14E,

B25H, B27E, B29K(N^εoctadecanodioil-yGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29K(N^εoctadecanodioil-yGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de A14E, B16H, B25H, B29K(N^εoctadecanodioil-yGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de A14E, B16E, B25H, B29K(N^εoctadecanodioil-yGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de A14E, B16H, B25H, B29K(N^εhexadecanodioil-yGlu), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^εeicosanodioil-yGlu-OEG-yGlu), desB30; insulina humana de A14E, B16E, B25H, B29K(N^εhexadecandioil-yGlu), desB30; insulina humana de A14E, B16H, B25H, B29K(N^εoctadecanodioil-yGlu -yGlu -yGlu), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29K(N^εhexadecandioil-yGlu), desB30; insulina humana de A14E, B16H, B25H, B29K(N^εoctadecanodioil-yGlu -yGlu), desB30; insulina humana de A14E, B16H, B25H, B29K(N^εeicosanodioil-yGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^εoctadecanodioil-OEG -yGlu -yGlu), desB30; insulina humana de A14E, A18L, B25H, B29K(N^εeicosanodioil-yGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de A14E, A18L, B25H, B29K(N^εoctadecanodioil-yGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B27E, B29K(N^εeicosanodioil-yGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^αoctadecandioil-yGlu-OEG-OEG), A14E, B25H, B29R, desB30; insulina humana de A14E, B1F(N^αoctadecandioil-yGlu-OEG-OEG), B25H, B29R, desB30; insulina humana de A1G(N^αhexadecandioil-yGlu), A14E, B25H, B29R, desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^εoctadecanodioil-yo Glu-Abu-Abu-Abu-Abu), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^αeicosanodioil), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^α4-[16-(1H-tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil]butanoil), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29K(N^εoctadecandioil-yGlu), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29K(N^εeicosanodioil-yGlu), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29K(N^εoctadecandioil), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29K(N^εeicosanodioil), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29K(N^εeicosanodioil-yGlu-

OEG-OEG), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^εdocosanedioil-γGlu), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^εdocosanedioil-γGlu-γGlu), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^εicosanodioil-γGlu-OEG-OEG-γGlu), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^εoctadecanodioil-γGlu-OEG-OEG-γGlu), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^ε(N-icosanodioil-N-carboximetil)-βAla), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^ε3-[2-(2-{2-[2-(17-carbóxi-heptadecanoilamino)etóxi]etóxi]etóxi]etóxi]propionil-γGlu), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^ε3-[2-(2-{2-[2-(19-carboxinonadecanoilamino)etóxi]etóxi]etóxi]etóxi]propionil-γGlu), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^εoctadecandioil-γGlu-(3-(2-{2-[2-(2-aminoetóxi)etóxi]etóxi]etóxi]propionil), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^εoctadecandioil-γGlu-(3-(2-{2-[2-(2-aminoetóxi)etóxi]etóxi]etóxi]etóxi]propionil-γGlu), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^εicosanodioil-γGlu-(3-(2-{2-[2-(2-aminoetóxi)etóxi]etóxi]etóxi]propionil), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^ε4-([4-({17-carboxinonadecanoilamino}metil)trans-ciclo-hexanocarbonil]-γGlu), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^ε4-([4-({17-carboxieptadecanoilamino}metil)trans-ciclo-hexanocarbonil]-γGlu-γGlu), desB30; insulina humana de A14E, B28D, hexadecandioil-γGlu de B29K(N^ε), desB30; insulina humana de A14E, B28D, eicosanodioil-γGlu de B29K(N^ε), desB30; insulina humana de A14E, B28D, octadecandioil-γGlu-OEG-OEG de B29K(N^ε), desB30; insulina humana de A14E, B28D, eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG de B29K(N^ε), desB30; insulina humana de A14E, B28E, hexadecandioil-γGlu de B29K(N^ε), desB30; insulina humana de A14E, B28E, octadecandioil-γGlu de B29K(N^ε), desB30; insulina humana de A14E, B28E, eicosanodioil-γGlu de B29K(N^ε), desB30; insulina humana de A14E, B28E, octadecandioil-γGlu-OEG-OEG de B29K(N^ε), desB30; insulina humana de A14E, B28E, eicosanodioil-γGlu-OEG-OEG de B29K(N^ε), desB30; insulina humana de A14E, B1E, B28E, B29K(N^εhexadecandioil-γGlu), desB30; insulina humana de A14E, B1E, B28E, B29K(N^εoctadecandioil-γGlu), desB30; insulina humana de A14E, B1E, B28E, B29K(N^εeicosanodioil-γGlu), desB30; insulina humana

de A14E, B1E, B28E, B29K(N^εhexadecandioil-γGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de A14E, B1E, B28E, B29K(N^εoctadecandioil-γGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de A14E, B1E, B28E, B29K(N^εeicosanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de A14E, B1E, B27E, B28E, B29K(N^εhexadecandioil-γGlu), desB30; insulina humana de A14E, B1E, B27E, B28E, B29K(N^εoctadecandioil-γGlu), desB30; insulina humana de A14E, B1E, B27E, B28E, B29K(N^εeicosanodioil-γGlu), desB30; insulina humana de A14E, B1E, B27E, B28E, B29K(N^εhexadecandioil-γGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de A14E, B1E, B27E, B28E, B29K(N^εoctadecandioil-γGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de A14E, B1E, B27E, B28E, B29K(N^εeicosanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de A14E, B1E, B25H, B28E, B29K(N^εhexadecandioil-γGlu), desB30; insulina humana de A14E, B1E, B25H, B28E, B29K(N^εoctadecandioil-γGlu), desB30; insulina humana de A14E, B1E, B25H, B28E, B29K(N^εeicosanodioil-γGlu), desB30; insulina humana de A14E, B1E, B25H, B28E, B29K(N^εhexadecandioil-γGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de A14E, B1E, B25H, B28E, B29K(N^εeicosanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de A14E, B1E, B25H, B28E, B29K(N^εeicosanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de A14E, B1E, B25H, B27E, B28E, B29K(N^εhexadecandioil-γGlu), desB30; insulina humana de A14E, B1E, B25H, B27E, B28E, B29K(N^εoctadecandioil-γGlu), desB30; insulina humana de A14E, B1E, B25H, B27E, B28E, B29K(N^εeicosanodioil-γGlu), desB30; insulina humana de A14E, B1E, B25H, B27E, B28E, B29K(N^εhexadecandioil-γGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de A14E, B1E, B25H, B27E, B28E, B29K(N^εoctadecandioil-γGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de A14E, B28D, B29K(N^εhexadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de A14E, B28E, B29K(N^εhexadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de B25N, B27E, B29K(N^εeicosanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de B25N, B27E, B29K(N^εoctadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de B25N, B27E, B29K(N^εhexadecanodioil-γGlu-

OEG-OEG), desB30; insulina humana de B25N, B27E, B29K(N^eeicosanodioil-γGlu), desB30; insulina humana de B25N, B27E, B29K(N^eoctadecanodioil-γGlu), desB30; insulina humana de B25N, B27E, B29K(N^ehexadecanodioil-γGlu), desB30; insulina humana de A8H, B25N, B27E, B29K(N^eeicosanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de A8H, B25N, B27E, B29K(N^eoctadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de A8H, B25N, B27E, B29K(N^ehexadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de A8H, B25N, B27E, B29K(N^eeicosanodioil-γGlu), desB30; insulina humana de A8H, B25N, B27E, B29K(N^eoctadecanodioil-γGlu), desB30; insulina humana de A8H, B25N, B27E, B29K(N^ehexadecanodioil-γGlu), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^e (N-icosanodioil-N-carboximetil)-βAla-OEG-OEG), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^e (N-octadecanodioil-N-carboximetil)-βAla-OEG-OEG), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^e (N-hexadecanodioil-N-carboximetil)-βAla-OEG-OEG), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^eoctadecanodioil-γGlu-2-[(3-{2-[2-(3-aminopropóxi)etóxi]etóxi}propilcarbamoil)metóxi]acetil), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^eeicosanodioil-γGlu-2-[(3-{2-[2-(3-aminopropóxi)etóxi]etóxi}propilcarbamoil)metóxi]acetil), desB30; insulina humana de A14E, B16H, B25H, B29K(N^eoctadecanodioil-γGlu-2-[(3-{2-[2-(3-aminopropóxi)etóxi]etóxi}propilcarbamoil)metóxi]acetil), desB30; insulina humana de A14E, B16H, B25H, B29K(N^eeicosanodioil-γGlu-2-[(3-{2-[2-(3-aminopropóxi)etóxi]etóxi}propilcarbamoil)metóxi]acetil), desB30; insulina humana de B25H, B29K(N^eoctadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de B25H, B29K(N^eeicosanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de B25H, B29K(N^eoctadecanodioil-γGlu), desB30; insulina humana de B25H, B29K(N^eoctadecanodioil), desB30; insulina humana de B25H, B29K(N^eeicosanodioil), desB30; insulina humana de B25H, B29K(N^eoctadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de B25H, B29K(N^eeicosanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de B25H, B29K(N^eoctadecanodioil-γGlu), desB30; insulina humana de B25H,

B29K(N^εeicosanodioil-γGlu), desB30; insulina humana de B25H,
 B29K(N^εoctadecanodioil), desB30; insulina humana de B25H,
 B29K(N^εeicosanodioil), desB30; insulina humana de B25H,
 B29K(N^εoctadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de
 5 B25H, B29K(N^εeicosanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de
 B25H, B29K(N^εoctadecanodioil-γGlu), desB30; insulina humana de B25H,
 B29K(N^εeicosanodioil-γGlu), desB30; insulina humana de A14E, B25H,
 desB27, B29K(N^εoctadecanodioil), desB30; insulina humana de A14E,
 B25H, desB27, B29K(N^εeicosanodioil), desB30; insulina humana de A14E,
 10 B25H, desB27, B29K(N^εoctadecanodioil-γGlu), desB30; insulina humana de
 A14E, B25H, desB27, B29K(N^εeicosanodioil-γGlu), desB30; insulina humana
 de A14E, B25H, desB27, B29K(N^εoctadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30;
 insulina humana de A14E, B25H, desB27, B29K(N^εeicosanodioil-γGlu-OEG-
 OEG), desB30; insulina humana de A14E, A21G, B25H, desB27,
 15 B29K(N^εoctadecanodioil), desB30; insulina humana de A14E, A21G, B25H,
 desB27, B29K(N^εeicosanodioil), desB30; insulina humana de A14E, A21G,
 B25H, desB27, B29K(N^εoctadecanodioil-γGlu), desB30; insulina humana de
 A14E, B25H, desB27, B29K(N^εeicosanodioil-γGlu), desB30; insulina humana
 de A14E, A21G, B25H, desB27, B29K(N^εoctadecanodioil-γGlu-OEG-OEG),
 20 desB30; insulina humana de A14E, B25H, desB27, B29K(N^εeicosanodioil-
 γGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de A1G(N^αoctadecandioil-γGlu-
 OEG-OEG), A14E, A21G, B25H, desB30; insulina humana de A14E, B25H,
 B29K(N^εeicosanodioil-OEG), desB30; insulina humana de A14E, B25H,
 B27K(N^εoctadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB28, desB29, desB30; insuli-
 25 na humana de A14E, B25H, ácido B29K(N^ε(5-eicosanodioilaminoisofáltico)),
 desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^εoctadecanodioil),
 desB30; insulina humana de A14E, B29K(N^εoctadecanodioil-γGlu-OEG-
 OEG), desB30; insulina humana de A14E, B25H, B26G, B27G, B28G,
 B29K(N^εeicosanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana de A14E,
 30 B25H, B29K(N^εoctadecanodioil-γGlu-OEG), desB30; insulina humana de
 A14E, B25H, B29K(N^εeicosanodioil-OEG-OEG), desB30; insulina humana
 de A14E, B25H, B29K(N^εeicosanodioil-Aoc), desB30; insulina humana de

A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29K(N^εeicosanodioil-yGlu -yGlu),
 desB30; insulina humana de A14E, B25H, B26G, B27G, B28G,
 B29K(N^εeicosanodioil-yGlu -yGlu), desB30; insulina humana de A14E, B25H,
 B29K(N^εoctadecanodioil-OEG), desB30; insulina humana de A14E, B25H,
 5 desB27, B29K(N^εoctadecanodioil-yGlu-OEG-OEG), desB30; insulina huma-
 na de A14E, B25H, B16H, B29K(N^εoctadecanodioil-yGlu), desB30; insulina
 humana de A1G(N^αoctadecanodioil), A14E, B25H, B29R, desB30; insulina
 humana de A14E, B16H, B25H, B29K(N^εeicosanodioil-yGlu), desB30; insuli-
 na humana de A14E, B25H, B27K(N^εeicosanodioil-yGlu), desB28, desB29,
 10 desB30; insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^εoctadecanodioil-yGlu -
 yGlu -yGlu), desB30; insulina humana de A21G, B25H,
 B29K(N^εoctadecanodioil), desB30; insulina humana de A14E, A21G, B25H,
 desB27, B29K(N^εeicosanodioil-yGlu-OEG-OEG), desB30; insulina humana
 de A14E, A21G, B25H, B29K(N^εoctadecanodioil-yGlu-OEG-OEG), desB30;
 15 insulina humana de A14E, A21G, B25H, B29K(N^εeicosanodioil-yGlu-OEG-
 OEG), desB30; insulina humana de A14E, A21G, B25H,
 B29K(N^εeicosanodioil-yGlu), desB30; insulina humana de A14E, A21G,
 B25H, B29K(N^εeicosanodioil), desB30; insulina humana de A14E, A21G,
 B25H, B29K(N^εoctadecanodioil-yGlu), desB30; insulina humana de A14E,
 20 A21G, B25H, B29K(N^εoctadecanodioil), desB30; insulina humana de A14E,
 B25H, B26G, B27G, B28G, B29K(N^εoctadecanodioil-yGlu), desB30; insulina
 humana de A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29K(N^εoctadecanodioil),
 desB30; insulina humana de A14E, B25H, B26G, B27G, B28G,
 B29K(N^εeicosanodioil-yGlu), desB30; insulina humana de A14E, B25H,
 25 B26G, B27G, B28G, B29K(N^εeicosanodioil), desB30; insulina humana de
 A1G(N^αoctadecandioil-yGlu), A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, desB30; in-
 sulina humana de A1G(N^αeicosanodioil-yGlu), A14E, B25H, B26G, B27G,
 B28G, desB30; insulina humana de A1G(N^αoctadecandioil-yGlu), A14E,
 B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30; insulina humana de
 30 A1G(N^αeicosanodioil-yGlu), A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R,
 desB30; insulina humana de A1G(N^αoctadecandioil), A14E, B25H, B26G,
 B27G, B28G, desB30; insulina humana de A1G(N^αeicosanodioil), A14E,

B25H, B26G, B27G, B28G, desB30; insulina humana de A1G(N^ooctadecandioil), A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30 e insulina humana de A1G(N^oeicosanodioil), A14E, B25H, B26G, B27G, B28G, B29R, desB30.

5 86. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com a reivindicação 85, caracterizada pelo fato de que é insulina humana de A14E, B16H, B25H, B29K(N^εoctadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30.

10 87. Uso do composto como definido na reivindicação 86, caracterizado pelo fato de ser na preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento, prevenção ou alívio de hiperglicemia, diabetes tipo 2, tolerância à glicose prejudicada, diabetes tipo 1, obesidade, síndrome X ou dislipidemia.

15 88. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com a reivindicação 85, caracterizada pelo fato de que de ser para uso no tratamento, prevenção ou alívio de hiperglicemia, diabetes tipo 2, tolerância à glicose prejudicada, diabetes tipo 1, obesidade, síndrome X ou dislipidemia.

20 89. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende uma quantidade biologicamente ativa da insulina estabilizada em protease, como definida na reivindicação 86, e um veículo farmacêuticamente aceitável.

 90. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com a reivindicação 85, caracterizada pelo fato de que é insulina humana de A14E, B25H, desB27H, B29K(N^εoctadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30.

25 91. Uso do composto como definido na reivindicação 90, caracterizado pelo fato de ser na preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento, prevenção ou alívio de hiperglicemia, diabetes tipo 2, tolerância à glicose prejudicada, diabetes tipo 1, obesidade, síndrome X ou dislipidemia.

30 92. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com a reivindicação 90, caracterizada pelo fato de que de ser para uso no tratamento, prevenção ou alívio de hiperglicemia, diabetes tipo 2, tolerância à glicose prejudicada, diabetes tipo 1, obesidade, síndrome X ou dislipidemia.

93. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende uma quantidade biologicamente ativa da insulina estabilizada em protease, como definida na reivindicação 90, e um veículo farmacêuticamente aceitável.

5 94. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com a reivindicação 85, caracterizada pelo fato de que é insulina humana de A14E, B16H, B25H, B29K(N^εeicosanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30.

10 95. Uso do composto como definido na reivindicação 94, caracterizado pelo fato de ser na preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento, prevenção ou alívio de hiperglicemia, diabetes tipo 2, tolerância à glicose prejudicada, diabetes tipo 1, obesidade, síndrome X ou dislipidemia.

15 96. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com a reivindicação 94, caracterizada pelo fato de que de ser para uso no tratamento, prevenção ou alívio de hiperglicemia, diabetes tipo 2, tolerância à glicose prejudicada, diabetes tipo 1, obesidade, síndrome X ou dislipidemia.

20 97. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende uma quantidade biologicamente ativa da insulina estabilizada em protease, como definida na reivindicação 94, e um veículo farmacêuticamente aceitável.

 98. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com a reivindicação 85, caracterizada pelo fato de que é insulina humana de A14E, B25H, B29K(N^εoctadecanodioil-γGlu-OEG-OEG), desB30.

25 99. Uso do composto como definido na reivindicação 98, caracterizado pelo fato de ser na preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento, prevenção ou alívio de hiperglicemia, diabetes tipo 2, tolerância à glicose prejudicada, diabetes tipo 1, obesidade, síndrome X ou dislipidemia.

30 100. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com a reivindicação 98, caracterizada pelo fato de que de ser para uso no tratamento, prevenção ou alívio de hiperglicemia, diabetes tipo 2, tolerância à glicose prejudicada, diabetes tipo 1, obesidade, síndrome X ou dislipidemia.

101. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende uma quantidade biologicamente ativa da insulina estabilizada em protease, como definida na reivindicação 98, e um veículo farmacêuticamente aceitável.

5 102. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com a reivindicação 85, caracterizada pelo fato de que é insulina humana de A14E, B25H, desB27H, B29K(N^εoctadecanodioil-γGlu), desB30.

103. Uso do composto como definido na reivindicação 102, caracterizado pelo fato de ser na preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento, prevenção ou alívio de hiperglicemia, diabetes tipo 2, tolerância à glicose prejudicada, diabetes tipo 1, obesidade, síndrome X ou dislipidemia.

104. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com a reivindicação 102, caracterizada pelo fato de que de ser para uso no tratamento, prevenção ou alívio de hiperglicemia, diabetes tipo 2, tolerância à glicose prejudicada, diabetes tipo 1, obesidade, síndrome X ou dislipidemia.

105. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende uma quantidade biologicamente ativa da insulina estabilizada em protease, como definida na reivindicação 102, e um veículo farmacêuticamente aceitável.

106. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 85, caracterizada pelo fato de ser usada como medicamento.

107. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com as reivindicações 86, 90, 94, 98 ou 102, caracterizada pelo fato de ser usada como medicamento.

108. Insulina estabilizada em protease acilada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 85, caracterizada pelo fato de ser para o uso no tratamento ou na prevenção de hiperglicemia, diabetes tipo 2, tolerância à glicose prejudicada, diabetes tipo 1, obesidade, síndrome X ou dislipidemia.

109. O uso de um composto como definido em qualquer uma

das reivindicações 1 a 85, caracterizada pelo fato de ser para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de diabetes.

5 110. O uso de um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 85, caracterizada pelo fato de ser para a preparação de uma composição farmacêutica que pode ser administrada pulmonarmente para o tratamento de diabetes.

10 111. O uso de um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 85, caracterizada pelo fato de ser para a preparação de uma composição farmacêutica que pode ser administrada pulmonarmente para o tratamento de diabetes e que dá um efeito de ação longa.

112. O uso de um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 85, caracterizada pelo fato de ser para a preparação de uma composição farmacêutica em pó que pode ser administrada pulmonarmente para o tratamento de diabetes.

15 113. O uso de um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 85, caracterizada pelo fato de ser para a preparação de uma composição farmacêutica líquida que pode ser administrada pulmonarmente para o tratamento de diabetes.

20 114. O uso de um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 85, caracterizada pelo fato de ser para a preparação de uma composição farmacêutica que pode ser administrada oralmente para o tratamento de diabetes.

25 115. Uso de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma insulina estabilizada em protease, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 85, caracterizada pelo fato de ser para preparação de uma formulação farmacêutica para o tratamento ou a prevenção de hiperglicemia, diabetes tipo 2, tolerância à glicose prejudicada, diabetes tipo 1, obesidade, síndrome X ou dislipidemia.

30 116. Composição, caracterizada pelo fato de que contém insulina humana como também uma insulina estabilizada em protease acilada como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 85.

117. Composição, caracterizada pelo fato de que contém insuli-

na aspart como também uma insulina estabilizada em protease acilada como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 85.

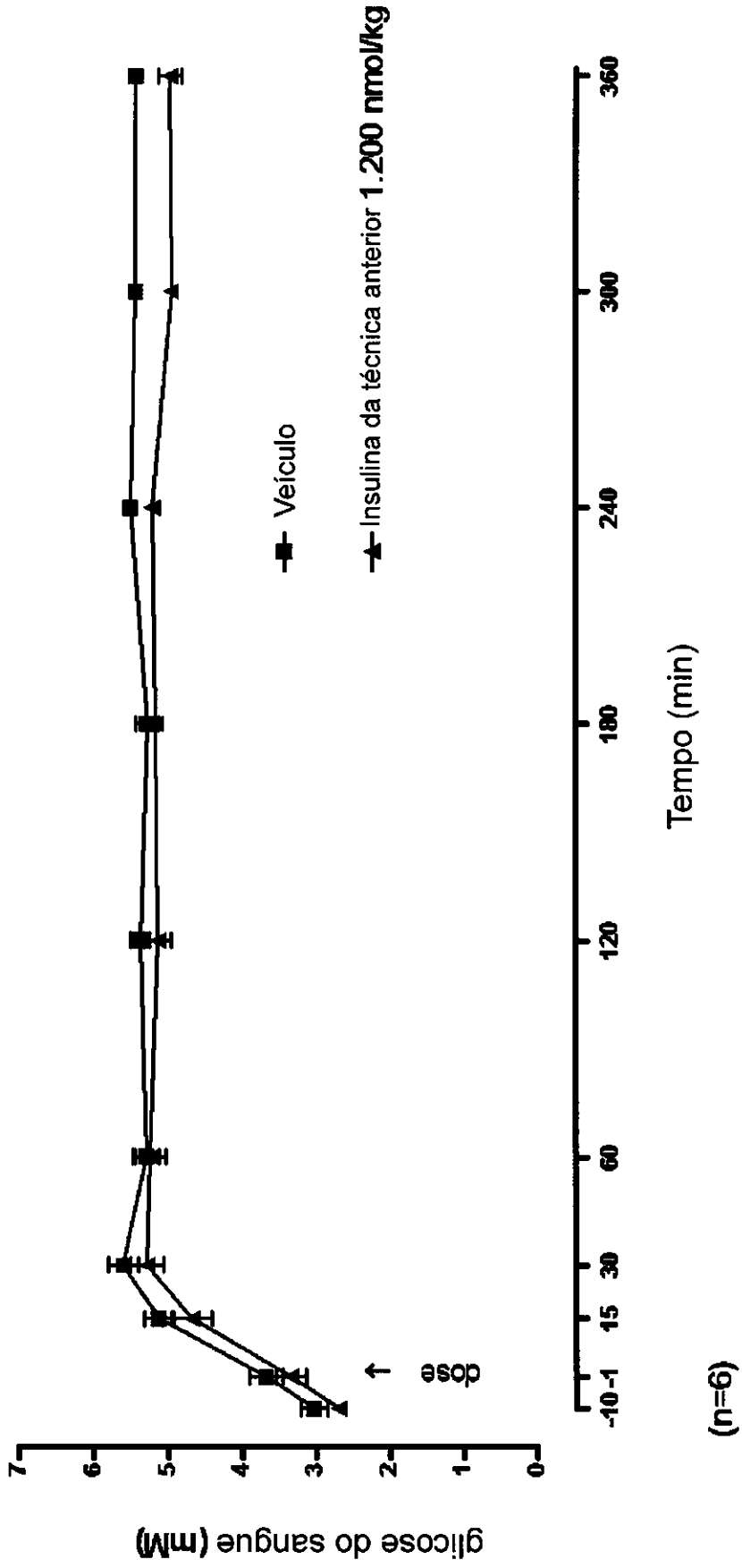
5 118. Composição, caracterizada pelo fato de que contém insulina Lispro como também uma insulina estabilizada em protease acilada, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 85.

119. Composição, caracterizada pelo fato de que contém insulina Glulisina como também uma insulina estabilizada em protease acilada, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 85.

10 120. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende uma quantidade biologicamente ativa da insulina estabilizada em protease, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 85, e um veículo farmacêuticamente aceitável.

15 121. Invenção, caracterizada por quaisquer de suas concretizações ou categorias de reivindicação englobadas pela matéria inicialmente revelada no pedido de patente ou em seus exemplos aqui apresentados.

FIG. 1



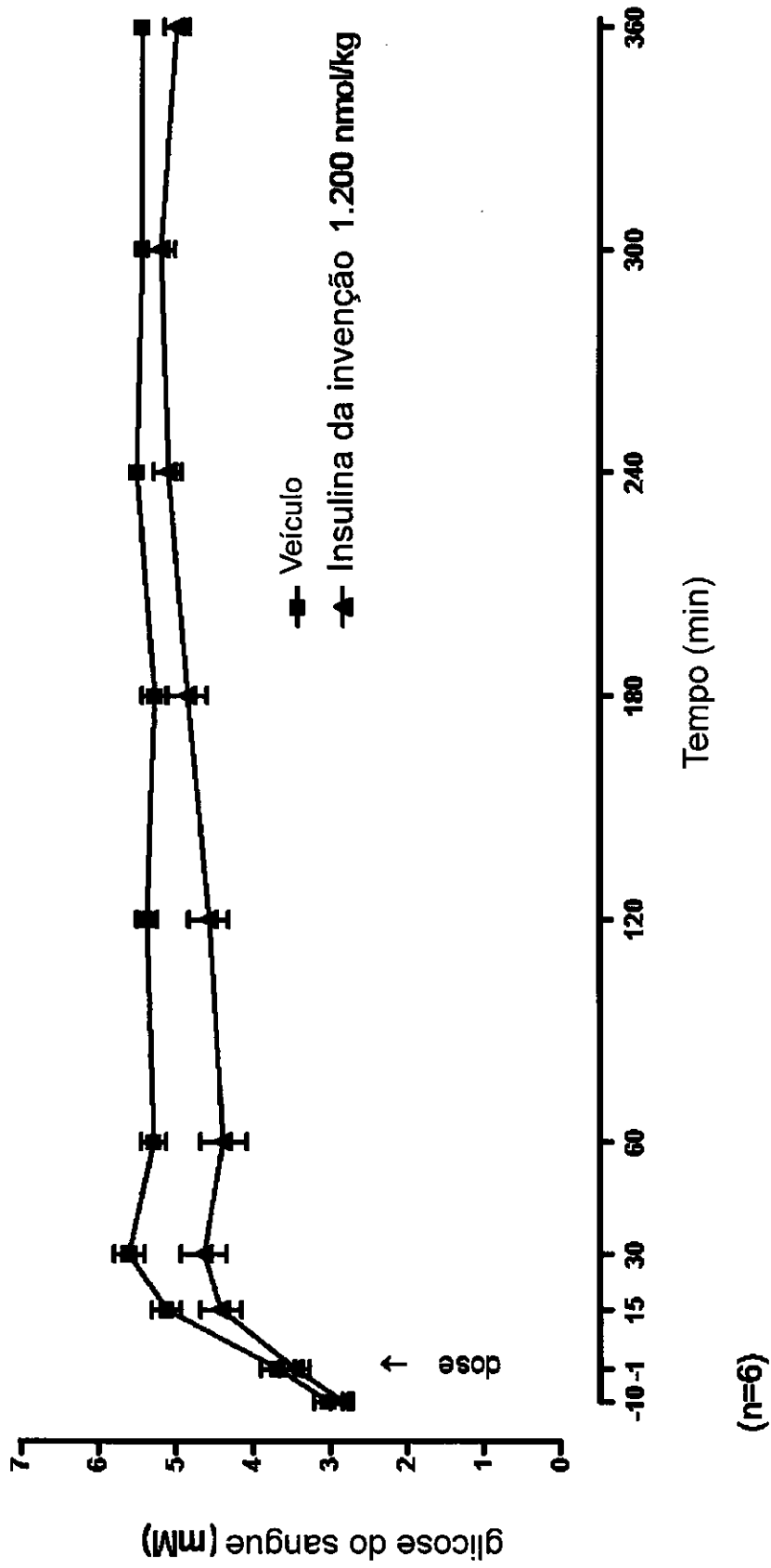


FIG. 2a

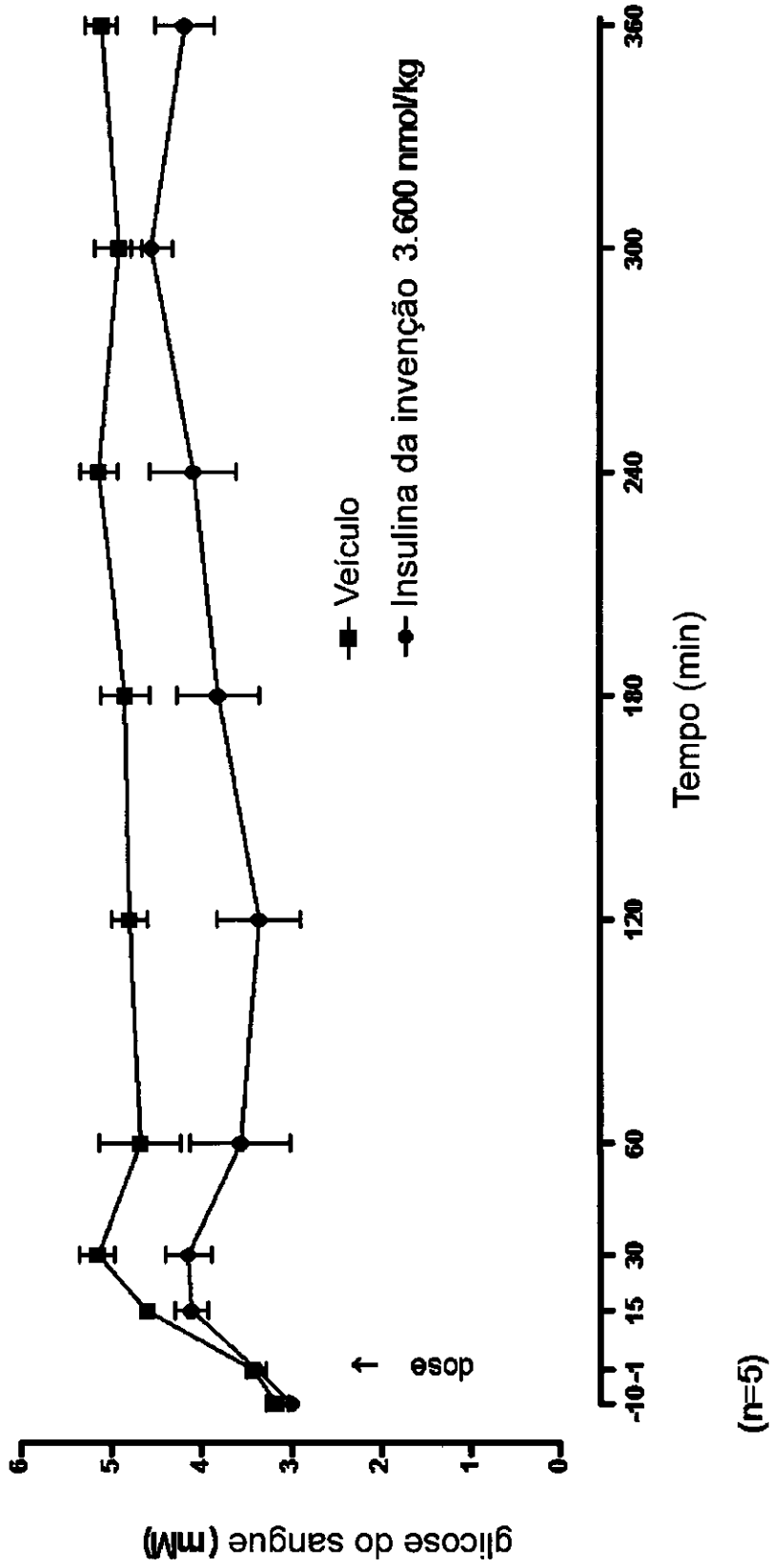


FIG. 2b

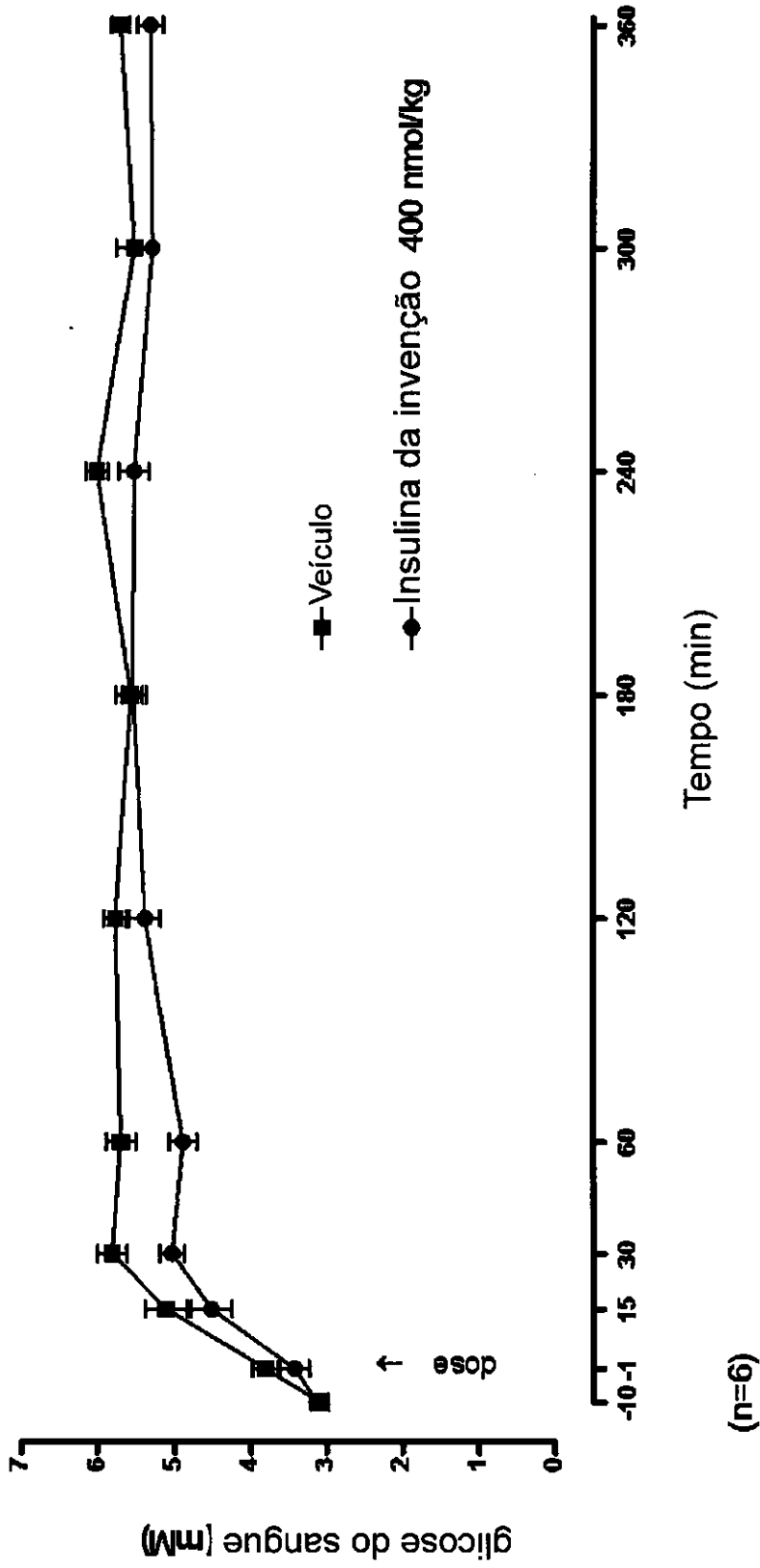
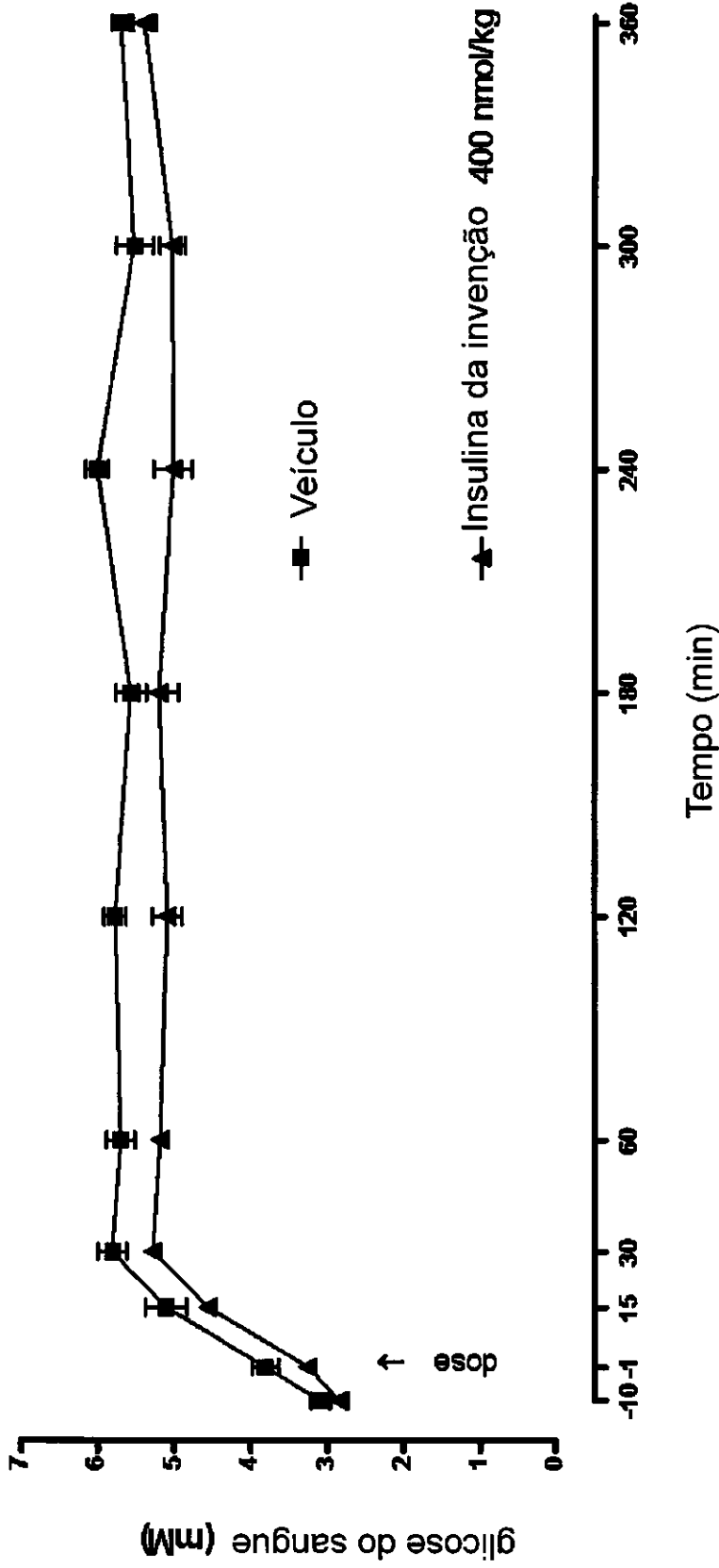


FIG. 3



(n=6)

FIG. 4

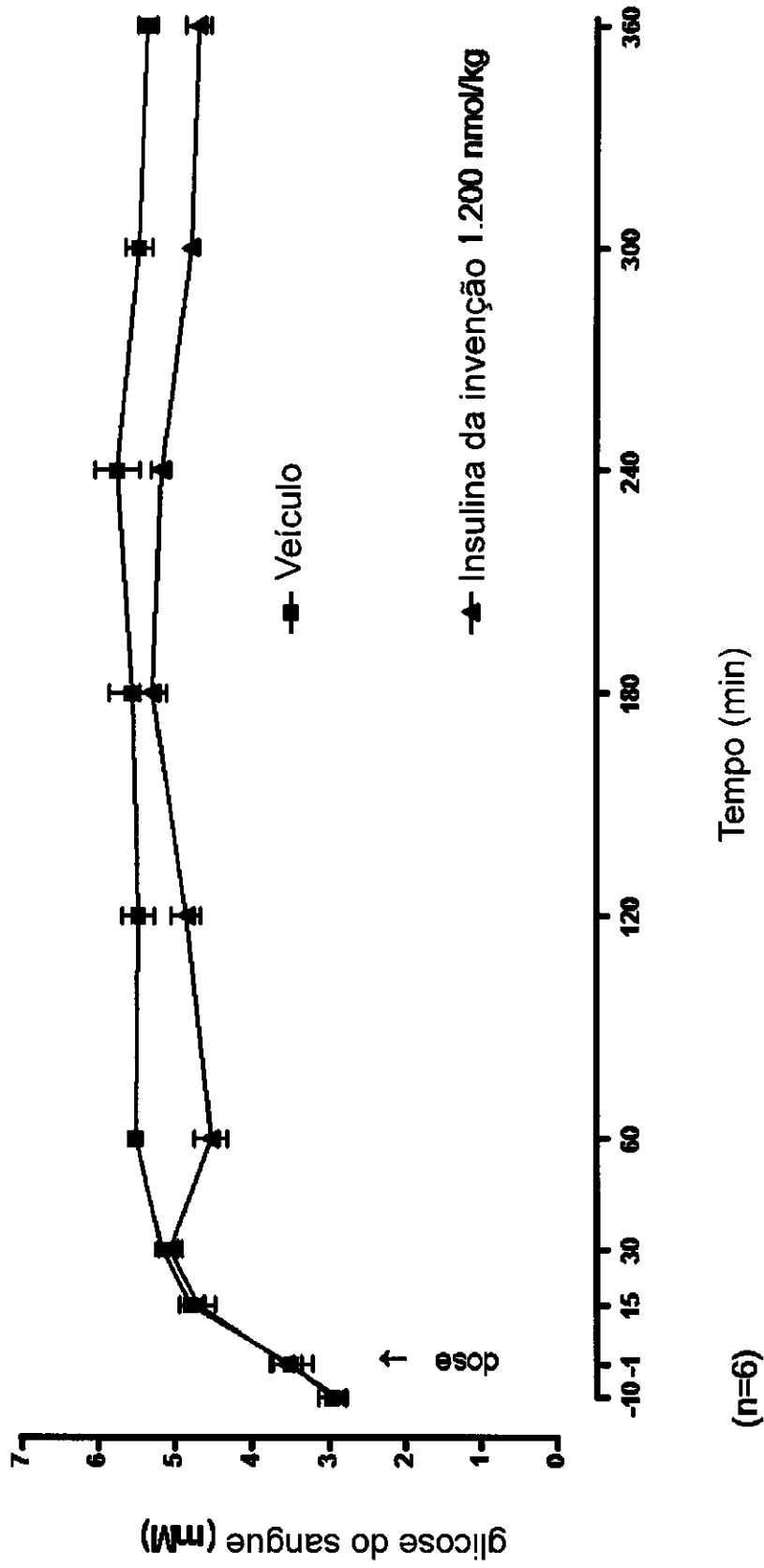
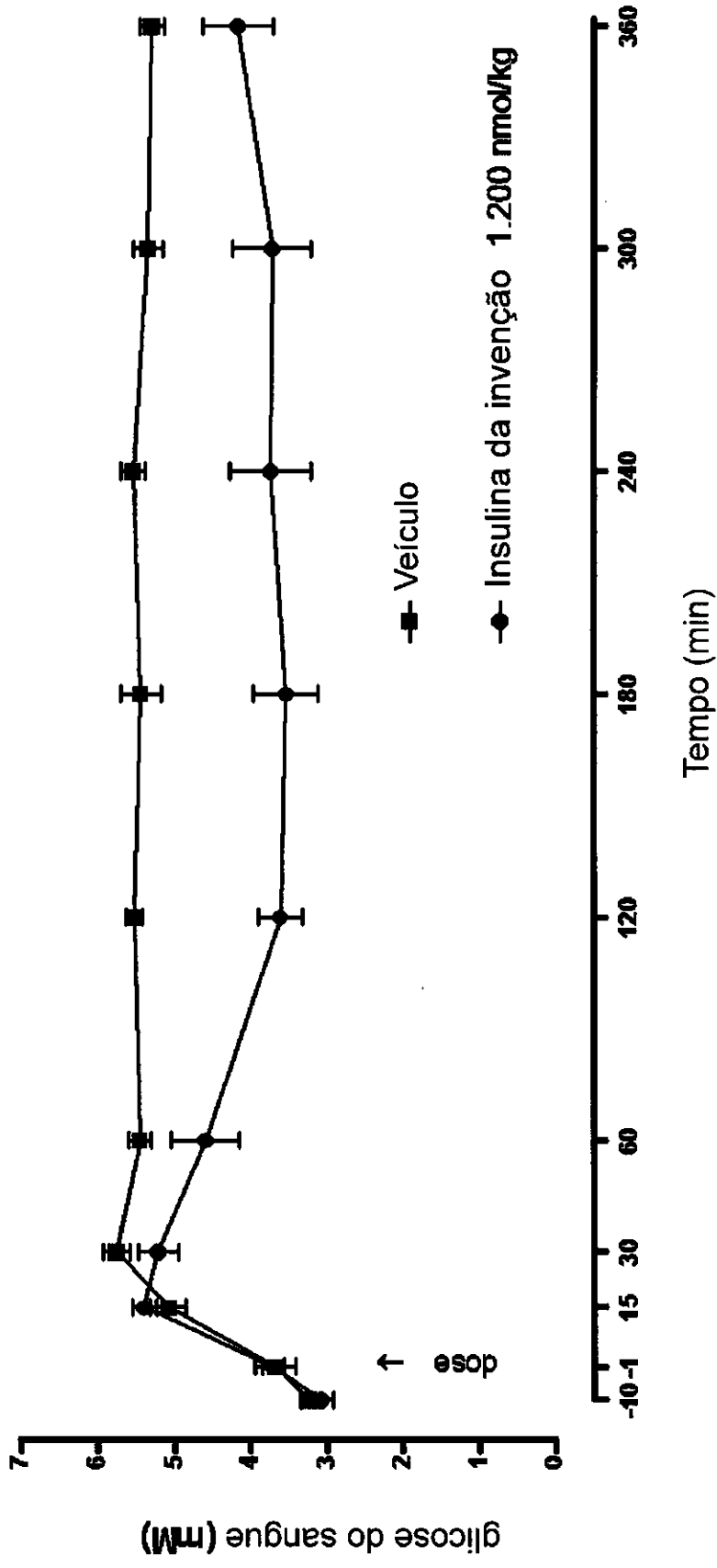


FIG. 5



(n=5)

FIG. 6

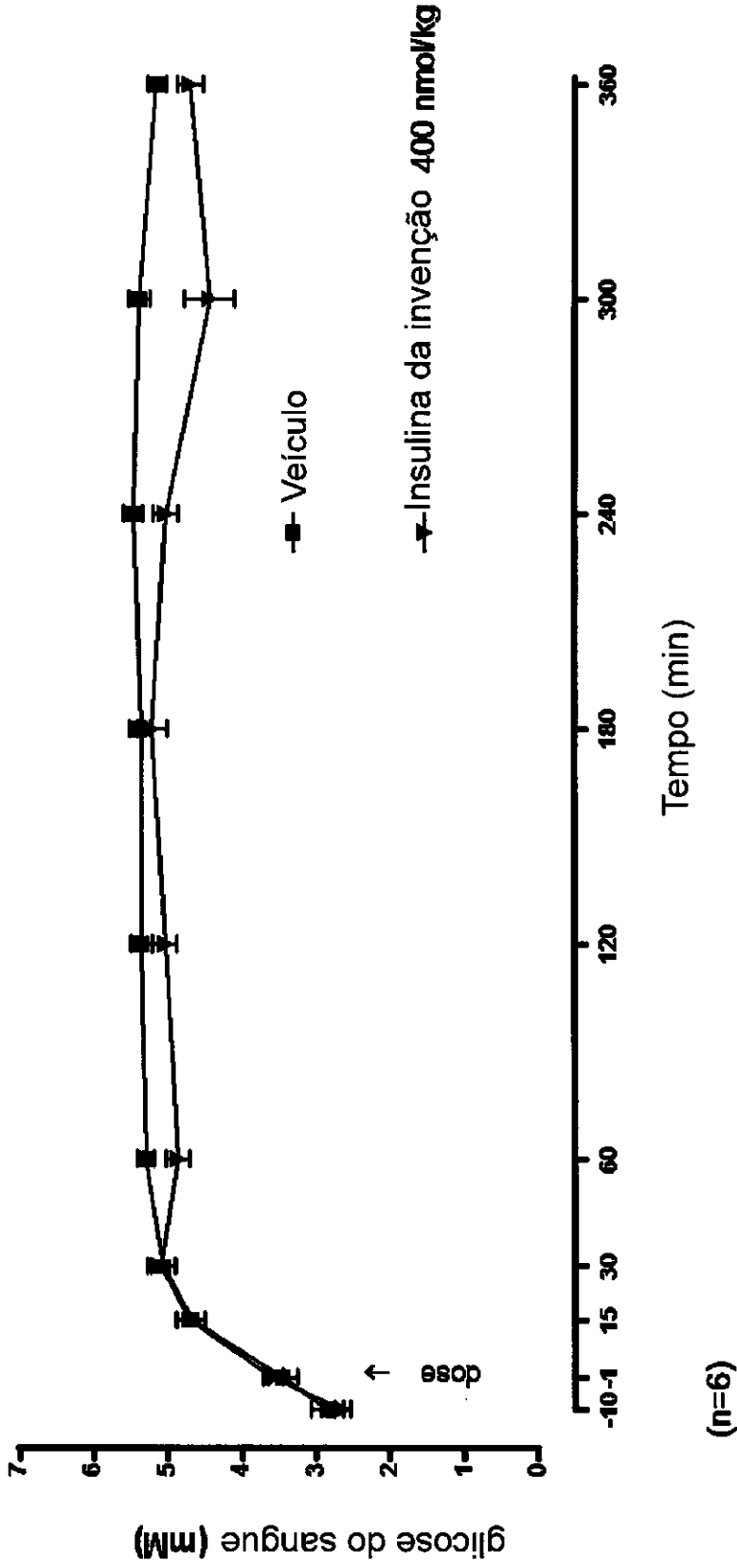


FIG. 7

FIG. 8

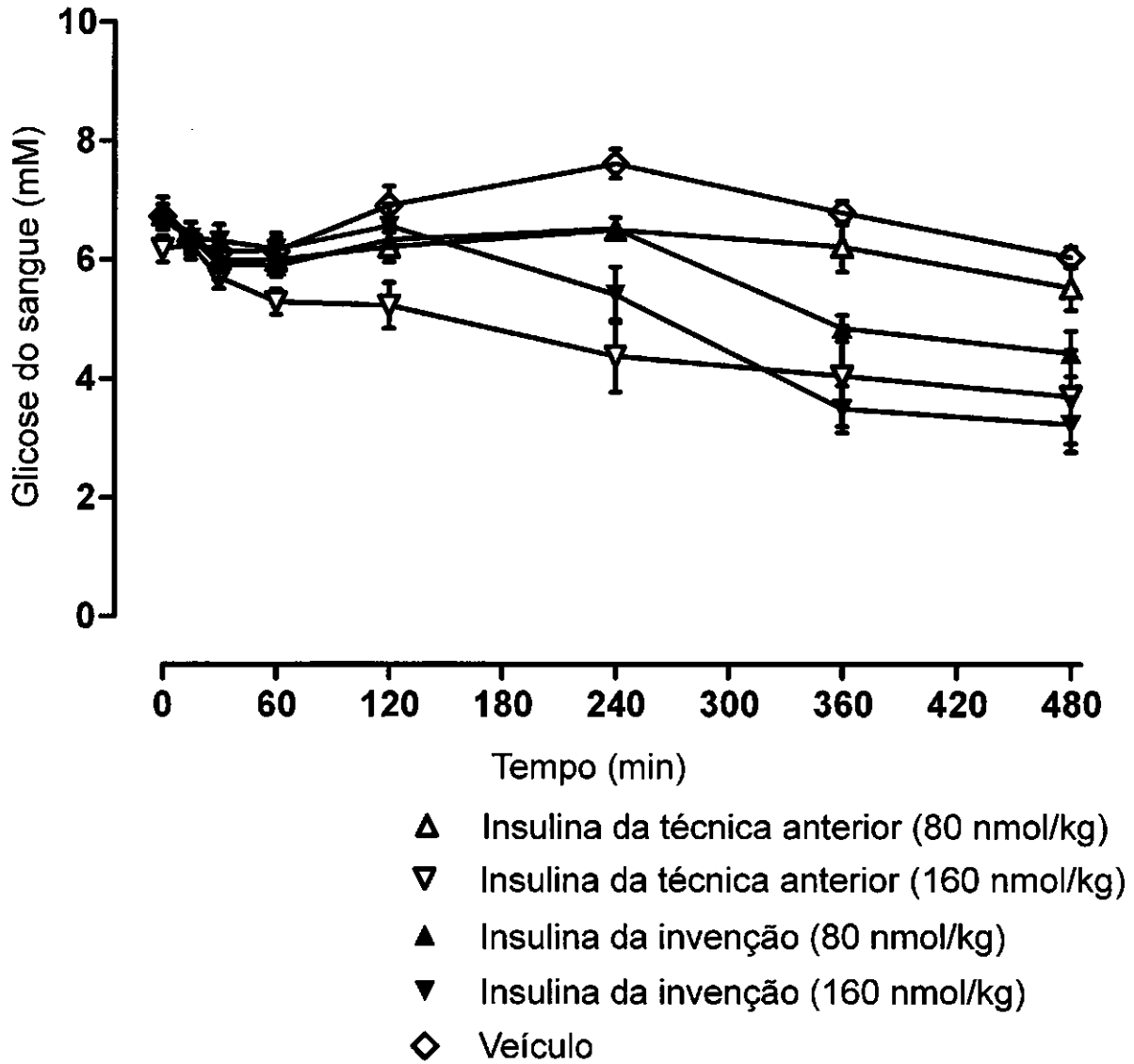
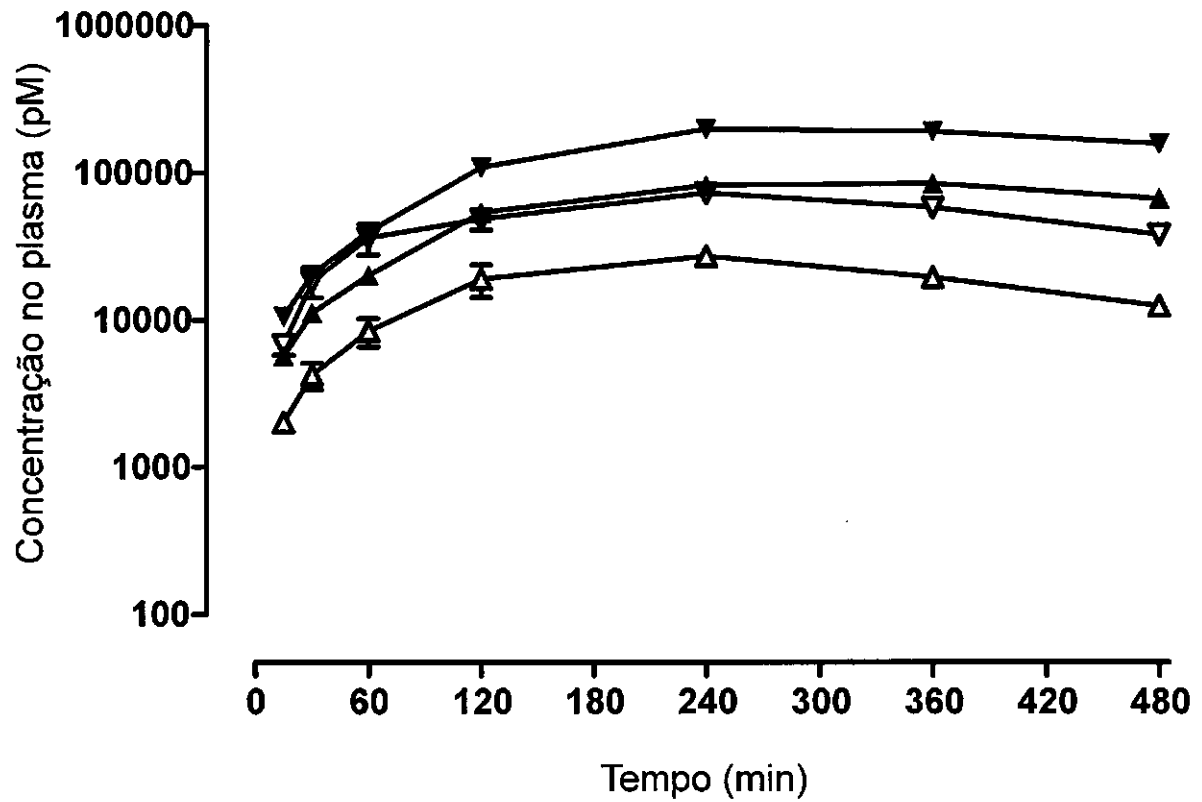


FIG. 9



- ▲ Insulina da técnica anterior (80 nmol/kg)
- ▼ Insulina da técnica anterior (160 nmol/kg)
- ▲ Insulina da invenção (80 nmol/kg)
- ▼ Insulina da invenção (160 nmol/kg)

FIG. 10

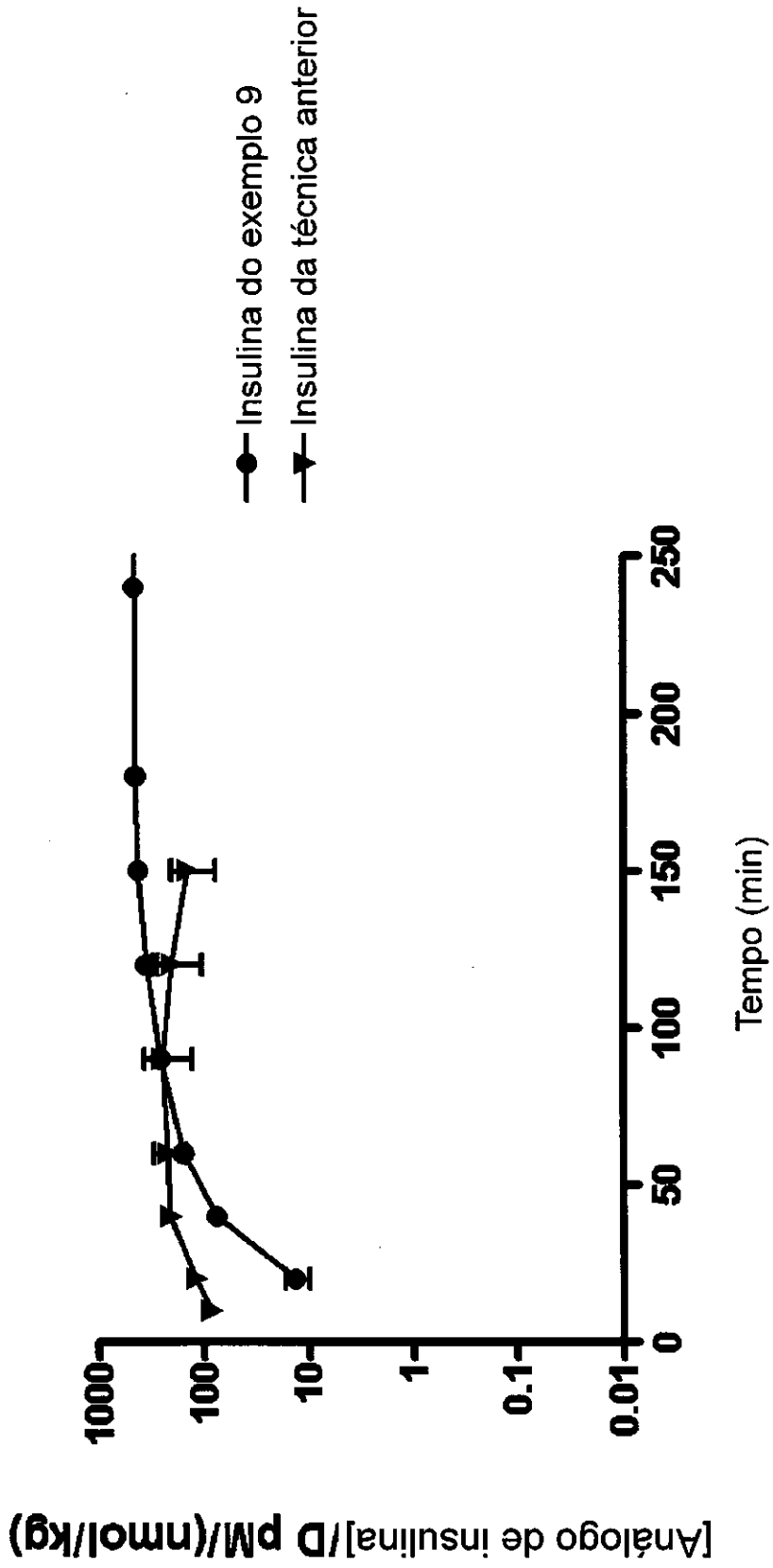
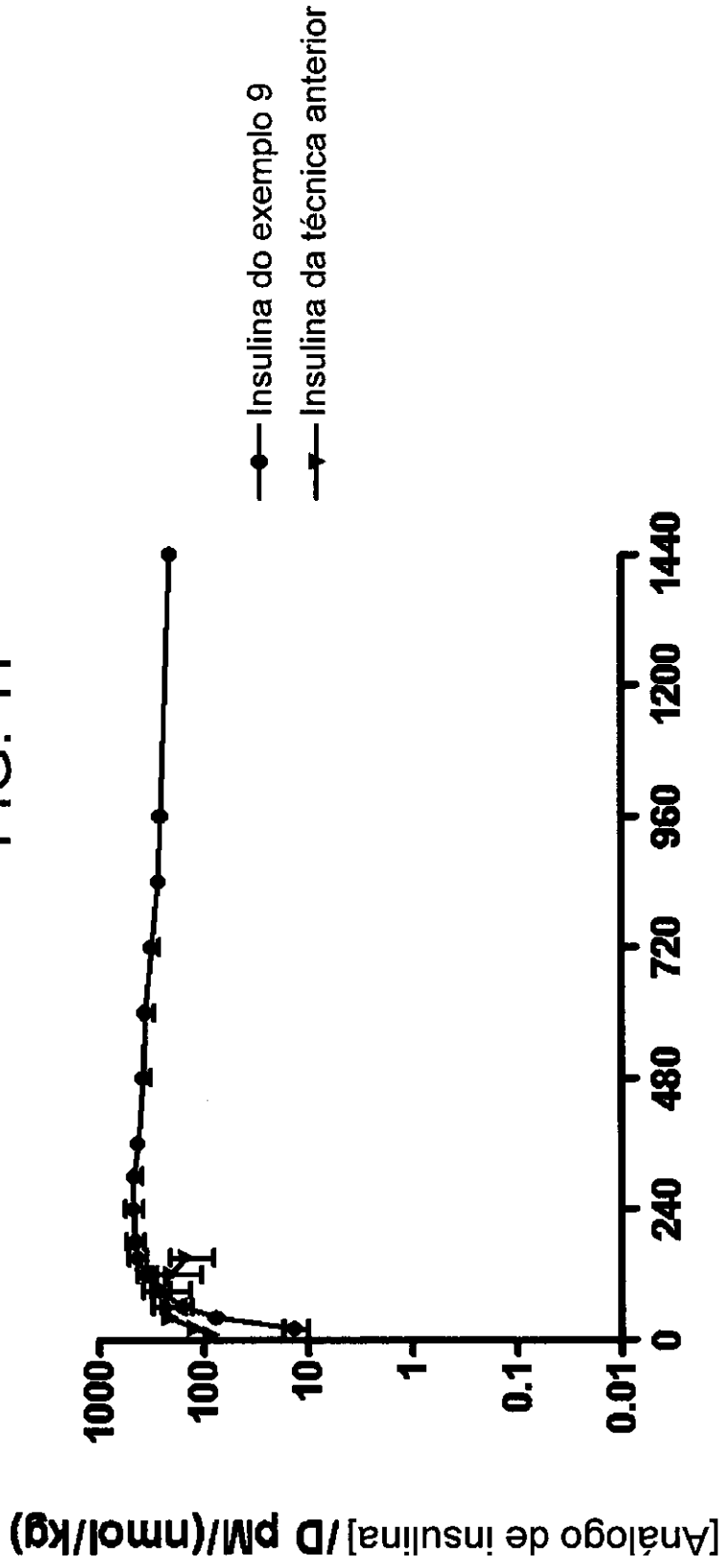


FIG. 11



RESUMO

Patente de Invenção: **"ANÁLOGOS DE INSULINA ACILADA ESTABILIZADA EM PROTEASE, SEUS USOS, E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS"**.

- 5 A presente invenção refere-se a novos análogos de insulina acilada exibindo resistência às proteases, que podem, efetivamente, ser administrados pulmonar ou oralmente. Os análogos de insulina contêm B25H e A14E ou A14H.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



96A264A8AE3E5B16

Campo 2



2849CBABC3F0FA69

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P169408-list.seq.txt
- Data de Geração do Código: 17-09-2010
- Hora de Geração do Código: 14:54:05
- Código de Controle:
 - Campo 1: 96A264A8AE3E5B16
 - Campo 2: 2849CBABC3F0FA69