

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 371 361**

⑯ Int. Cl.:
C07K 14/62 (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- ⑯ Número de solicitud europea: **06841562 .9**
⑯ Fecha de presentación: **21.12.2006**
⑯ Número de publicación de la solicitud: **1969004**
⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **17.09.2008**

⑭ Título: **COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN UNA INSULINA ACILADA Y ZINC Y MÉTODO DE PRODUCCIÓN DE DICHAS COMPOSICIONES.**

⑯ Prioridad:
28.12.2005 EP 05113021

⑯ Titular/es:
**NOVO NORDISK A/S
NOVO ALLÉ
2880 BAGSVÄRD, DK**

⑯ Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.12.2011

⑯ Inventor/es:
**HAVELUND, Svend;
HUBALEK, Frantisek;
OLSEN, Helle, Birk;
JONASSEN, Ib;
HOEG-JENSEN, Thomas;
PLUM, Anne y
RIBEL-MADSEN, Ulla**

⑯ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.12.2011

⑯ Agente: **Tomas Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 371 361 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones que comprenden una insulina acilada y zinc y método de producción de dichas composiciones

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas de insulina acilada con un perfil de acción prolongada y un alto contenido en zinc. Además, la invención se refiere a un método para la producción de una 10 composición con un perfil de acción prolongada y un alto contenido en zinc, y a un método para la fabricación de una composición para su uso en el tratamiento de la diabetes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] En la actualidad, el tratamiento de la diabetes, tanto para la diabetes tipo 1 como la diabetes tipo 2, se basa en un 15 aumento del grado del denominado tratamiento intensivo con insulina. Según este régimen, se trata a los pacientes con múltiples inyecciones de insulina diarias que incluyen una o dos inyecciones diarias de insulina de acción prolongada para cubrir la necesidad de insulina basal complementadas con inyecciones en bolo de insulina de acción rápida para cubrir la necesidad de insulina relacionada con las comidas.

[0003] Las composiciones de insulina de acción prolongada son conocidas en la técnica. Así, un tipo principal de 20 composiciones de insulina de acción prolongada incluye suspensiones inyectables acuosas de cristales de insulina o de insulina amorfada. En estas composiciones, los compuestos de insulina utilizados, por lo general, son insulina protamina, insulina zinc o insulina protamina zinc.

[0004] Se asocian determinados inconvenientes al uso de suspensiones de insulina. Por lo que, para obtener una 25 dosificación exacta, las partículas de insulina se deben suspender homogéneamente agitando suavemente antes de que un volumen definido de la suspensión se retire de un frasco o se expulse de un cartucho. Además, para almacenar suspensiones de insulina, la temperatura debe mantenerse dentro de unos límites más estrechos que para soluciones de insulina, para evitar la formación de grumos o coagulación.

[0005] Aunque antes se creía que las protaminas no eran inmunogénicas, ahora resulta que los cristales de insulina protamina pueden ser inmunogénicos en el hombre y que su uso con utilidades médicas puede llevar a la formación de 30 anticuerpos. Además, se han encontrado pruebas de que el cristal de protamina es inmunogénico en sí mismo. Por lo tanto, se debe evitar el uso de composiciones de insulina de acción prolongada con protaminas en algunos pacientes.

[0006] Otro tipo de composiciones de insulina de acción prolongada son soluciones con un valor de pH por debajo del pH fisiológico, de las que la insulina precipitará debido al incremento del valor de pH cuando se inyecta la solución. Un inconveniente con estas soluciones es que la distribución del tamaño de las partículas del precipitado formado en el 40 tejido en la inyección, y así el perfil de liberación de la medicación, depende del flujo sanguíneo en el lugar de la inyección y otros parámetros un tanto imprevisibles. Otro inconveniente es que las partículas sólidas de la insulina pueden actuar como irritante local que provoca la inflamación del tejido en el área de la inyección.

[0007] La insulina es una hormona peptídica que contiene 51 aminoácidos y se produce en los islotes de Langerhans en 45 el páncreas. Su función primaria, actuando como monómero, es la de facilitar el transporte de las moléculas de glucosa a través de las membranas celulares de los tejidos muscular y adiposo mediante la unión a un receptor transmembrana y la activación de éste.

[0008] Una propiedad distintiva de la insulina es su capacidad de asociarse para formar hexámeros; de esta forma, la 50 hormona se protege de la degradación física y química durante la biosíntesis y el almacenamiento. Estudios cristalográficos con rayos X en la muestra de insulina muestran que el hexámero se compone de tres dímeros relacionados por un eje de rotación de 3 pliegues. Estos dímeros se asocian cercanamente a través de la interacción de dos iones de zinc y su núcleo situado en el eje de 3 pliegues.

[0009] Cuando la insulina humana se inyecta en el tejido subcutáneo en forma de formulación farmacéutica de alta 55 concentración, esta se autoasocia, y aquí la disociación en monómeros se produce de manera relativamente lenta. Los hexámeros y los dímeros de insulina penetran más lentamente en la pared capilar que los monómeros.

[0010] El zinc y los aditivos fenólicos se usan con frecuencia en preparados terapéuticos de insulina para fomentar la 60 formación de hexámeros como precaución contra la degradación durante el almacenamiento. Sin embargo, de esta forma se retrasa la acción de la insulina inyectada mientras los hexámeros se difunden a través del tejido subcutáneo y

se disocian en dímeros y monómeros.

5 [0011] Las formulaciones de insulina normalmente se preparan disolviendo la insulina en un pequeño volumen de agua en condiciones ácidas. Entonces, se añade el zinc a la formulación, seguido de una neutralización y una adición de conservantes, como el fenol y m-cresol. La formulación farmacéutica de estas insulinas tiene alrededor de 2, 3 ó 4 átomos de zinc por hexámero de insulina.

10 [0012] El documento WO 2005/012347 divulga otro grupo de derivados de insulina acilada que contienen una carga negativa adicional en comparación con las insulinas aciladas descritas en el documento WO 95/07931. La formulación farmacéutica de estas insulinas aciladas tienen 2, 3 ó 4 átomos de zinc por hexámero de insulina.

15 [0013] El documento WO 2003/094956 describe formulaciones de insulina estables preparadas mediante la mezcla de una insulina monomérica y un análogo de insulina acilada soluble. Las formulaciones contienen aproximadamente de 2,3 a 4,5 Zn²⁺ por hexámero de insulina. El análogo de insulina acilada según esta invención es insulina detemir.

20 [0014] Del documento WO 2003/094951 se sabe cómo formular una formulación de insulina soluble estable que tenga una acción rápida y prolongada. La formulación tiene un contenido de zinc entre aproximadamente de 2,3 a 4,5 Zn²⁺ por hexámero de insulina. El análogo de insulina acilada según esta invención es insulina detemir.

25 [0015] El documento WO 99/21888 se refiere a agregados de derivados de insulina humana que contienen hasta 5 átomos de zinc por 6 moléculas de derivado de insulina.

30 [0016] La insulina humana tiene tres grupos amino primarios: el grupo N-terminal de la cadena A y de la cadena B y el grupo ε-amino de Lys^{B29}. Distintos derivados de insulina que se sustituyen en uno o más de estos grupos se conocen en la técnica anterior. Así, la patente estadounidense nº 3,528,960 (Eli Lilly) se refiere a insulinas N-carboxiaroil en las que uno, dos o tres grupos amino primarios de la molécula de insulina tienen un grupo carboxiaroil.

35 [0017] El documento EP 894095 describe derivados de insulina en los que el grupo N-terminal de la cadena B y/o el grupo ε-amino de Lys en la posición B28, B29 o B30 tiene un sustituyente de la fórmula -CO-W-COOH, donde W puede ser un grupo hidrocarburo de cadena larga. Estos derivados de la insulina tienen un perfil de acción prolongado y son solubles a valores de pH fisiológico.

40 [0018] El documento WO 95/07931 divulga derivados de insulina de efecto prolongado en los que una cadena lateral lipofílica se une al grupo α-amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B o al grupo ε-amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina inicial.

45 [0019] El mecanismo de absorción lenta de insulina detemir ha sido estudiado por Havelund *et al.* (*The mechanism of proaction of insulin detemir, a long-acting acylated analog of human insulin. Pharmaceutical Research.* 21(2004)1498-1504). Las formulaciones de insulina se preparan añadiendo 2 átomos de zinc por hexámero de insulina seguidos de glicerol, fenol, m-cresol y fosfato sódico.

50 [0020] En Whittingham *et al.* (*Crystallographic and solution studies of N-Lithocholy insulin: a new generation of prolonged-acting insulin. Biochemistry* 2004, 43, 5987-5995) se prepara una formulación de análogo de insulina acilada. La formulación de insulina se prepara añadiendo 2-2,5 átomos de zinc por hexámero de insulina seguida de glicerol y fenol. Las estructuras de la insulina se miden por cromatografía de exclusión por tamaño.

55 [0021] La presente invención se refiere a ciertas composiciones farmacéuticas de insulinas aciladas que solucionan los problemas de la técnica anterior.

50

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

55 [0022] La presente invención se refiere a una composición farmacéutica soluble que comprende una insulina acilada con más de 4 átomos de zinc por cada 6 moléculas de insulina acilada, en la que la insulina acilada comprende una molécula de insulina con una cadena lateral unida a un grupo ε-amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina inicial, la cadena lateral tiene la siguiente fórmula general:

-W-X-Y-Z₂

60 en donde W es:

- un residuo de α -aminoácido que tiene un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral que forma el residuo, con uno de sus grupos ácido carboxílico, un grupo amida junto con un grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina inicial;

- 5 • una cadena compuesta por dos, tres o cuatro residuos de α -aminoácido unidos por medio de enlace amida y carbonilo, esta cadena está unida por medio de un enlace amida a un grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina inicial. Los residuos de aminoácidos de W se seleccionan del grupo de residuos de aminoácidos que tienen una cadena lateral neutra y residuos de aminoácidos con un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral, de modo que W tiene al menos un residuo de aminoácido que tiene un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral; o
- 10 • un enlace covalente de X a un grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina inicial;

15 X es:

- $-\underline{CO}-$;
- $-\underline{CH(COOH)CO}-$;
- $-\underline{CO-N(CH_2COOH)CH_2CO}-$;
- $-\underline{CO-N(CH_2COOH)CH_2CON(CH_2COOH)CH_2CO}-$;
- $-\underline{CO-N(CH_2CH_2COOH)CH_2CH_2CO}-$;
- $-\underline{CO-N(CH_2CH_2COOH)CH_2CH_2CON(CH_2CH_2COOH)CH_2CH_2CO}-$;
- $-\underline{CO-NHCH(COOH)(CH_2)_4NHCO}-$;
- $-\underline{CO-N(CH_2CH_2COOH)CH_2CO}-$; o
- $-\underline{CO-N(CH_2COOH)CH_2CH_2CO}-$.

35 que

- a) cuando W es un residuo de aminoácido o una cadena de residuos de aminoácidos, unido por un enlace amida entre el carbono subrayado y un grupo amino en W, o
- b) cuando W es un enlace covalente, unido mediante un enlace amida entre el carbono carbonilo subrayado y un grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina inicial;

45 Y es:

- $-(CH_2)_m$ en donde m es un número entero en el intervalo de 6 y 32;
- una cadena de hidrocarburo bivalente que contiene 1, 2 ó 3 grupos $-CH=CH-$ y varios grupos $-CH_2-$ suficientes para sumar un número total de átomos de carbono en la cadena en el intervalo de 10 a 32 y

50 Z₂ es:

- $-COOH$;
- $-CO-Asp$;
- $-CO-Glu$;
- $-CO-Gly$;
- $-CO-Sar$;

- 5 • -CH(COOH)₂;

- -N(CH₂COOH)₂;

- -SO₃H; o

- -PO₃H

y cualquier complejo Zn²⁺ de estos, con la condición de que cuando W es un enlace covalente y X es de -CO, entonces Z es diferente de -COOH.

10 [0023] En un aspecto, el residuo de aminoácido B30 se ha eliminado y la insulina acilada es insulina desB30.

15 [0024] En un aspecto, W es un residuo de α -aminoácido que tiene de 4 a 10 átomos de carbono y, en otro aspecto, W se selecciona del grupo formado por α -Asp, β -Asp, α -Glu, γ -Glu, α -hGlu y δ -hGlu.

20 [0025] En un aspecto, X es -CO-.

25 [0026] En un aspecto, Z₂ es -COOH.

20 [0027] La subestructura Y de la cadena lateral -W-X-Y-Z₂ puede ser un grupo de la formulación -(CH₂)_m-, donde m es un número entero en el intervalo de 6 y 32, 8 y 20, 12 y 20, o 12 y 16.

25 [0028] En un aspecto, Y es una cadena de hidrocarburo bivalente que contiene 1, 2 ó 3 grupos -CH=CH- y varios grupos -CH₂- suficientes para que el número total de átomos de carbono de la cadena se encuentre en el intervalo de 6 a 32, de 10 a 32, de 12 a 20, o de 12-16.

30 [0029] En un aspecto, Y es una cadena de hidrocarburo bivalente de la formulación -(CH₂)_vC₆H₄(CH₂)_w-, en la que v y w son números enteros o uno de ellos es cero, de modo que la suma de v y w está en el intervalo de 6 a 30, de 10 a 20, o de 12-16. En otro aspecto, se selecciona W del grupo que formado por α -Asp, β -Asp, α -Glu, y γ -Glu; X es -CO- o -CH(COOH)CO; Y es -(CH₂)_m-, donde m es un número entero en el intervalo de 12-18 y Z₂ es -COOH o -CH(COOH)₂.

35 [0030] El contenido de zinc puede ser alrededor de 12 átomos de zinc por cada 6 moléculas de insulina acilada. El límite superior para el contenido de zinc es el contenido de zinc que causaría la precipitación de la insulina y convertiría la solución en una suspensión.

40 [0031] En un aspecto de la invención, la composición farmacéutica contiene aproximadamente entre 4,3 y 12 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada o aproximadamente entre 4,5 y 12 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada. En otro aspecto de la invención, la composición farmacéutica contiene aproximadamente entre 5 y 11,4 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada o entre 5,5 y 10 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada. En otro aspecto, la composición farmacéutica contiene aproximadamente entre 6 y 10,5 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada o la composición farmacéutica contiene aproximadamente entre 7 y 9 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada. En otro aspecto, la composición farmacéutica contiene citrato de entre aproximadamente un tercio a 3 veces la concentración de zinc.

45 [0032] Las moléculas de insulina de la presente invención se asocian entre sí para formar complejos que contienen zinc. Estos complejos de insulina-zinc pueden estar presentes en la formulación farmacéutica como hexámeros, dodecámeros o complejos con un peso molecular mayor que el de los dodecámeros. Todos los tipos de insulina forman complejos con el zinc, por ejemplo, la insulina humana, la insulina acilada (derivados de insulina) y análogos de insulina. En un aspecto de la invención, al menos el 85% de la insulina acilada está presente en forma de complejos de dodecámeros de insulina acilada o de complejos con un peso molecular mayor al del dodecámero de insulina acilada. En un aspecto de la invención, al menos el 90, 92, 95, 96, 97, 98, 99 ó 99,5% de la insulina acilada está presente como complejos de dodecámeros de insulina o como complejos con un peso molecular mayor al del dodecámero de insulina acilada. En un aspecto de la invención, la composición farmacéutica comprende un tensioactivo. El tensioactivo puede estar presente en una cantidad de 0,0005-0,01% basado en el peso de la composición farmacéutica. En un aspecto, el tensioactivo puede estar presente en una cantidad de 0,0005-0,007% basado en el peso de la composición. Un ejemplo de un tensioactivo podría ser el polisorbato 20, que puede estar presente en la composición en una cantidad de 0,001-0,003% basada en el peso de la composición. Otro ejemplo es el poloxámero 188, que puede estar presente en una cantidad de 0,002-0,006% basada en el peso de la composición.

- 5 [0033] La molécula de insulina puede ser acilada en varias posiciones de la molécula de insulina. En un aspecto, la insulina se acila en el grupo ϵ -amino de un residuo de Lys en una posición de la cadena B de la molécula de insulina inicial, en particular, en el grupo ϵ -amino del grupo de lisina B29 en la molécula de insulina humana. Sin embargo, según otros aspectos de la invención, la acilación puede ocurrir en otra posición de la molécula de insulina, por ejemplo, en el grupo α -amino en la posición B1 o en la posición donde el residuo de aminoácido natural de la molécula de insulina se ha sustituido por un residuo de lisina, con la condición de que B29 se cambia de una lisina a otro residuo de aminoácido.
- 10 [0034] Así, en un aspecto, la insulina acilada se acila en un grupo ϵ -amino libre de un residuo de lisina en la cadena B de la molécula de insulina.
- 15 [0035] En un aspecto, la insulina se acila en el grupo ϵ -amino libre del residuo de lisina en la posición B29 de la molécula de insulina.
- 20 [0036] El grupo de acilo será un grupo lipofílico y por lo general será un grupo de ácido graso de alrededor de 6 a 32 átomos de carbono que tienen al menos un grupo de ácido carboxílico libre o un grupo que se carga negativamente a pH neutro. El grupo de ácido graso por lo general tendrá de 6 a 24, de 8 a 20, de 12 a 20, de 12 a 6, de 10 a 16, de 10 a 20, de 14 a 18 o de 14 a 16 átomos de carbono.
- 25 [0037] En un aspecto, la composición farmacéutica contiene al menos un ácido carboxílico libre o un grupo que se carga negativamente a pH neutro. En un aspecto, la composición farmacéutica contiene un grupo acilo que deriva de un ácido graso dicarboxílico de entre 4 a 32 átomos de carbono.
- [0038] En otro aspecto, el grupo de ácido graso deriva de un ácido graso dicarboxílico con aproximadamente de 6 a 32, de 6 a 24, de 8 a 20, de 12 a 20, de 12 a 16, de 10 a 16, de 10 a 20, de 14 a 18 o de 14 a 16 átomos de carbono.
- 30 [0039] En un aspecto, la composición farmacéutica comprende un grupo acilo que se une a la insulina por medio de enlaces amida.
- 35 [0040] El grupo acilo se puede unir directamente al grupo amino libre en cuestión. No obstante, el grupo acilo también puede unirse por medio de enlaces amida que unen el grupo amino libre de la molécula de insulina y el grupo acilo en cuestión.
- 40 [0041] La insulina acilada general tiene al menos una o dos cargas negativas adicionales comparada con la insulina humana y de manera aún más general esta tendrá dos cargas negativas adicionales. La carga negativa adicional puede estar proporcionada por el grupo ácido carboxílico libre del ácido graso o por el grupo de enlace que puede contener uno o más residuos de aminoácidos, de los cuales al menos tiene un ácido carboxílico libre o un grupo que se carga negativamente a pH neutro. En otro aspecto, el grupo acilo deriva de un ácido graso dicarboxílico.
- 45 [0042] En un aspecto, la composición farmacéutica contiene una insulina en la que la insulina tiene una cadena lateral unida al grupo α -amino del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena B o a un grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la fracción de insulina inicial mediante un enlace amida. Esta cadena lateral contiene al menos un grupo de ácido carboxílico libre o un grupo que se carga negativamente a pH neutro, un grupo ácido graso con alrededor de 4 a 32 átomos de carbono en la cadena de carbono; y posiblemente uno o más enlaces que conectan los componentes individuales en la cadena lateral por medio de enlaces de amida.
- 50 [0043] Ejemplos no limitativos de compuestos de insulina acilada son insulina humana $N^{B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-\gamma$ -Glu) desB30; insulina humana $N^{B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{15}CO)-\gamma$ -Glu) desB30; insulina humana $N^{B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{16}CO)-\gamma$ -Glu) desB30; insulina humana $N^{B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{17}CO)-\gamma$ -Glu) desB30; insulina humana $N^{B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{18}CO)-\gamma$ -Glu) desB30; insulina humana $N^{B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{19}CO)-\gamma$ -Glu-N-(γ -Glu)) desB30; insulina humana $N^{B29}-(N^{\alpha}-(Asp-OC(CH_2)_{16}CO)-\gamma$ -Glu) desB30; insulina humana $N^{B29}-(N^{\alpha}-(Glu-OC(CH_2)_{14}CO)-\gamma$ -Glu) desB30; insulina humana $N^{B29}-(N^{\alpha}-(Glu-OC(CH_2)_{14}CO)-$ desB30; insulina humana $N^{B29}-(N^{\alpha}-(Asp-OC(CH_2)_{16}CO)-$ desB30; insulina humana $N^{B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{16}CO)-\alpha$ -Glu-N-(β -Asp)) desB30; insulina humana $N^{B29}-(N^{\alpha}-(Gly-OC(CH_2)_{13}CO)-\gamma$ -Glu) desB30; insulina humana $N^{B29}-(N^{\alpha}-(Sar-OC(CH_2)_{13}CO)-\gamma$ -Glu) desB30; insulina humana $N^{B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{13}CO)-\gamma$ -Glu) desB30; insulina humana $(N^{B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{13}CO)-\beta$ -Asp) desB30; insulina humana $N^{B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{13}CO)-\alpha$ -Glu) desB30; insulina humana $N^{B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{16}CO)-\gamma$ -D-Glu) desB30; insulina humana $N^{B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-\beta$ -D-Asp) desB30; insulina humana $N^{B29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-\beta$ -D-Asp) desB30; insulina humana $N^{B29}-(N-HOOC(CH_2)_{16}CO-\beta$ -D-Asp) desB30; insulina humana $N^{B29}-(N-HOOC(CH_2)_{14}CO-IDA)$ desB30; insulina humana $N^{B29}-(N-(HOOC(CH_2)_{6}CO)-N$ -(carboxietil)-Gly] DesB30; insulina humana $N^{B29}-(N-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-N$ -(carboxietil)-Gly] DesB30; e insulina humana $N^{B29}-(N-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-N$ -(carboximetil)- β -Ala] DesB30.

- 5 [0044] La molécula de insulina inicial es insulina humana o un análogo derivado. Análogos no limitativos de insulina humana son análogo desB30 ; análogos de insulina en los que el residuo de aminoácido en la posición B30 es Lys y el residuo de aminoácido en la posición B29 es cualquier aminoácido codificable excepto Cys, Met, Arg y Lys; análogos de insulina en los que el residuo de aminoácido en posición A21 es Asn u análogos de insulina en los que el residuo de aminoácido en posición B3 es Lys y el residuo de aminoácido en la posición B29 es Glu.
- 10 [0045] En otro grupo de análogos de insulina inicial, el residuo de aminoácido en la posición B28 es Asp. Un ejemplo específico de este grupo de análogos de insulina inicial es la insulina humana AspB28 descrita en el documento EP 214826.
- 15 [0046] En otro grupo de análogos de insulina inicial, el residuo de aminoácido en la posición B28 es Lys y el residuo de aminoácido en la posición B29 es Pro. Un ejemplo específico de este grupo de análogos de insulina inicial es la insulina humana Lys^{B28}Pro^{B29}.
- 20 [0047] En otro grupo de análogos de insulina inicial, el residuo de aminoácido en la posición B30 es Lys y el residuo de aminoácido en la posición B29 es cualquier aminoácido codificable excepto Cys, Met, Arg y Lys. Un ejemplo es un análogo de insulina en el que el residuo de aminoácido en la posición B29 es Thr y el residuo de aminoácido en la posición B30 es Lys. Un ejemplo específico de este grupo de análogos de insulina inicial es la insulina humana Tr^{B29}Lys^{B30}.
- 25 [0048] En otro grupo de análogos de insulina inicial, el residuo de aminoácido en la posición B3 es Lys y el residuo de aminoácido en la posición B29 es Glu. Un ejemplo específico de este grupo de análogos de insulina inicial es la insulina humana Lys^{B3}Glu^{B29}.
- 30 [0049] La composición farmacéutica según la presente invención contendrá una cantidad terapéuticamente eficaz de insulina acilada con un transportador farmacéuticamente aceptable para el uso en el tratamiento de la diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 y otros estados que causan hiperglucemia en pacientes que necesitan este tratamiento.
- 35 [0050] En otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento de la diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 y otros estados que provocan hiperglucemia en un paciente que necesita este tratamiento. Esta composición contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado de insulina acilada, tal como se ha definido anteriormente, mezclada con una insulina o un análogo de insulina de acción rápida, junto con transportadores farmacéuticamente aceptables y aditivos.
- 40 [0051] De este modo, la composición farmacéutica puede contener una mezcla de dos componentes de insulina: una insulina de acción prolongada, una insulina basal, y otra de acción rápida, una insulina en bolo. Un ejemplo de tal mezcla es la insulina asparta, insulina humana AspB28 mezclada con insulina humana N^{εB29}-(N^α-(HOOC(CH₂)₁₄CO)-γ-Glu) desB30 que corresponde a la insulina humana LysB29NE-hexadecandiol-γ-Glu desB30 descrita en el documento WO 2005/012347. Otro ejemplo de esta mezcla es la LysPro, la insulina humana Lys^{B28}Pro^{B29}, mezclada con insulina humana LysB29NE-hexadecandiol-γ-Glu desB30. Un tercer ejemplo de esta mezcla es la Glulisina, insulina humana Lys^{B3}Glu^{B29}, mezclada con insulina humana LysB29NE-hexadecandiol-γ-Glu desB30.
- 45 [0052] En un aspecto de la invención, al menos el 85% de la insulina de acción rápida está presente como hexámero de insulina de acción rápida o complejos con un peso molecular inferior al de los hexámeros de insulina de acción rápida.
- 50 [0053] El derivado de insulina acilada y el análogo de insulina de acción rápida pueden mezclarse en una proporción molar de aproximadamente un 90%/10%; aproximadamente un 75%/25%, aproximadamente un 70%/30%, aproximadamente un 50%/50%, aproximadamente un 25%/75%, aproximadamente un 30%/70% o aproximadamente un 10%/90%.
- 55 [0054] En un aspecto, la composición farmacéutica según la invención tendrá un pH de entre aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5. En otro aspecto, el pH es aproximadamente de 7,0 a 8,2, el pH es de aproximadamente 7,2 a 8,0 o de aproximadamente 7,4 a 8,0 o el pH es de aproximadamente 7,4 a 7,8. La invención comprende además un método para la producción de una composición farmacéutica que comprende una insulina acilada en la que más de 4 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada se agregan a la composición y en la que la insulina acilada tiene una cadena lateral unida al grupo ε-amino de un residuo de Lys presente en el cadena B de la insulina inicial, la cadena lateral tiene la siguiente formulación general:

-W-X-Y-Z₂

en donde W es:

- 5 • un residuo de α -aminoácido que tiene un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral que forma el residuo, con uno de sus grupos ácido carboxílico, un grupo amida con un grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina inicial;
- 10 • una cadena compuesta por dos, tres o cuatro residuos de α -aminoácido unidos por medio de enlace amida y carbonilo, esta cadena está unida por medio de un enlace amida a un grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina inicial. Los residuos de aminoácidos de W se seleccionan del grupo de residuos de aminoácidos que tienen una cadena lateral neutra y residuos de aminoácidos con un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral, de modo que W tiene al menos un residuo de aminoácido que tiene un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral; o
- 15 • un enlace covalente entre X y un grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina inicial;

X es:

- 20 • $-\underline{CO}-$;
- $-\underline{CH(COOH)CO}-$;
- 25 • $-\underline{CO-N(CH_2COOH)CH_2CO}-$;
- $-\underline{CO-N(CH_2COOH)CH_2CON(CH_2COOH)CH_2CO}-$;
- 30 • $-\underline{CO-N(CH_2CH_2COOH)CH_2CH_2CO}-$;
- $-\underline{CO-N(CH_2CH_2COOH)CH_2CH_2CON(CH_2CH_2COOH)CH_2CH_2CO}-$;
- 35 • $-\underline{CO-NHCH(COOH)(CH_2)_4NHCO}-$;
- $-\underline{CO-N(CH_2CH_2COOH)CH_2CO}-$; o
- $-\underline{CO-N(CH_2COOH)CH_2CH_2CO}-$.

que

- 40 c) cuando W es un residuo de aminoácido o una cadena de residuos de aminoácidos, unido por un enlace amida entre el carbono subrayado y un grupo amino de W, o
- 45 d) cuando W es un enlace covalente, unido mediante un enlace amida entre el carbono carbonilo subrayado y un grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina inicial;

Y es:

- 50 • $-(CH_2)_m$ en donde m es un número entero entre 6 y 32;
- una cadena de hidrocarburo bivalente que contiene 1, 2 o 3 grupos $-CH=CH-$ y varios grupos $-CH_2-$ suficientes para dar un número total de átomos de carbono en la cadena en el intervalo de 10 a 32 y

55 Z₂ es:

- 60 • -COOH;
- -CO-Asp;
- -CO-Glu;

- 5
- -CO-Gly;
 - -CO-Sar;
 - -CH(COOH)₂;
 - -N(CH₂COOH)₂;
- 10
- -SO₃H; o
 - -PO₃H

y cualquier complejo Zn²⁺ de estos, con la condición de que cuando W es un enlace covalente y X es -CO, entonces Z es diferente de -COOH.

15 [0055] En otro aspecto de la invención, más de aproximadamente 4,3 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada se agregan a la composición, o más de aproximadamente 4,5 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada se agregan a la composición, o alrededor de más de 5 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada se agregan a la composición. En otro aspecto, alrededor de más de 5,5 átomos de zinc, o más de 6,5 átomos de zinc, o más de 7,0 átomos de zinc, o más de 7,5 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada se agregan a la composición. En un aspecto de la invención, el método comprende la adición de hasta alrededor de 12 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada a la composición.

20 En un aspecto de la invención, el método comprende la adición entre alrededor de 4,3 y 12 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada a la composición

25 [0056] En otro aspecto de la invención, aproximadamente entre 4,5 y 12 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada se añaden a la composición, o aproximadamente entre 5 y 11,4 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada se añaden a la composición, o aproximadamente entre 5,5 y 10 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada se añaden a la composición.

30 [0057] En otro aspecto, entre aproximadamente 6 y 10,5 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada, o entre aproximadamente 6,5 y 10 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada, o entre aproximadamente 7 y 9 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada se añaden a la composición.

35 En un aspecto de la invención, el método comprende la adición de zinc a la composición antes de la adición de un conservante.

40 En otro aspecto de la invención, el número de átomos de zinc que se añade antes de la adición de un conservante es más de 1 átomo de zinc por 6 moléculas de insulina acilada, o el número de átomos de zinc que se añade antes de la adición de un conservante es más de 2 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada, o el número de átomos de zinc que se añade antes de la adición de un conservante es más de 3 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada, o el número de átomos de zinc que se añade antes de la adición de un conservante es más de 4 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada, o el número de átomos de zinc que se añade antes de la adición de un conservante es más de 5 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada.

45 [0058] En otro aspecto de la invención, aproximadamente entre 4,5 y 12 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada se agregan a la composición antes de la adición de un conservante, o aproximadamente entre 5 y 11,4 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada se agregan a la composición antes de la adición de un conservante, o incluso más preferiblemente entre alrededor de 5,5 y 10 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada se agregan a la composición antes de la adición de un conservante. En otro aspecto, aproximadamente entre 6 y 10,5 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada, o aproximadamente entre 6,5 y 10 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada o aproximadamente entre 7 y 9 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada se agregan a la composición antes de la adición de un conservante. En un aspecto de la invención, el método comprende la adición de zinc a la composición después de añadir un conservante. En un aspecto de la invención, al menos 0,5 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada se añaden a la composición después de la adición de un conservante o al menos 1 átomo de zinc por 6 moléculas de insulina acilada se añade a la composición después de la adición de un conservante.

55 [0059] En otro aspecto de la invención, alrededor de más de 2 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada se añaden a la composición después de la adición de un conservante, o alrededor de más de 3 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada se agregan a la composición después de la adición de un conservante, o alrededor de más de 4 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada se agregan a la composición después de la adición de un

conservante.

[0060] En otro aspecto de la invención, aproximadamente entre 0,5 y 12, aproximadamente entre 1 y 11,4, aproximadamente entre 1,5 y 11, aproximadamente entre 2 y 10,5, aproximadamente entre 3 y 10 o aproximadamente entre 4 y 9 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada se agregan a la composición después de la adición de un conservante.

[0061] En otro aspecto de la invención, aproximadamente entre 4,5 y 12 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada se agregan a la composición después de la adición de un conservante, o aproximadamente entre 5 y 11,4 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada se agregan a la composición después de la adición de un conservante, o aproximadamente entre 5,5 y 10 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada se agregan a la composición después de la adición de un conservante.

15 [0062] En otro aspecto, aproximadamente entre 6 y 10,5 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada, o aproximadamente entre 6,5 y 10 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada, o aproximadamente entre 7 y 9 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada se agregan a la composición después de la adición de un conservante.

En un aspecto de la invención, el método comprende la adición de parte del zinc antes de la adición de un conservante y la adición de parte del zinc después de la adición de un conservante.

20 [0063] En un aspecto, el método comprende la adición de al menos 0,5 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada antes de la adición de un conservante y la adición de al menos 1 átomo de zinc por 6 moléculas de insulina acilada después de la adición de un conservante. En un aspecto, el método comprende al menos 0,5 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada antes de la adición de un conservante y de la adición de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10
25 u 11 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada después de la adición de un conservante.

[0064] En un aspecto, el método comprende la adición de al menos 1 átomo de zinc por 6 moléculas de insulina acilada antes de la adición de un conservante y la adición de al menos 1 átomo de zinc por 6 moléculas de insulina acilada después de la adición de un conservante, o la adición de al menos 1 átomo de zinc por 6 moléculas de insulina acilada antes de la adición de un conservante y la adición de al menos 2 o 3 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada después de la adición de un conservante, o la adición de al menos 1 átomo de zinc por 6 moléculas de insulina acilada antes de la adición de un conservante y hasta alrededor de 11 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada después de la adición de un conservante. En un aspecto, el método comprende la adición de al menos 1 átomo de zinc por 6 moléculas de insulina acilada antes de la adición de un conservante y la adición al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada después de la adición de un conservante.

[0065] En un aspecto, el método comprende la adición de al menos 2 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada antes de la adición de un conservante y la adición al menos 1 átomo de zinc por 6 moléculas de insulina acilada después de la adición de un conservante, o la adición de al menos 2 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada antes de la adición de un conservante y la adición de al menos 2 o 3 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada después de la adición de un conservante, o la adición de al menos 2 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada antes de la adición de un conservante y hasta alrededor de 10 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada después de la adición de un conservante. En un aspecto, el método comprende la adición de al menos 2 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada antes de la adición de un conservante y la adición de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada después de la adición de un conservante.

[0066] En un aspecto, el método comprende la adición de al menos 3 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada antes de la adición de un conservante y la adición de al menos 1 átomo de zinc por 6 moléculas de insulina acilada después de la adición de un conservante, o la adición de al menos 3 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada antes de la adición de un conservante y la adición de al menos 2 o 3 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada después de la adición de un conservante, o la adición de al menos 3 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada antes de la adición de un conservante y hasta alrededor de 9 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada después de la adición de un conservante

55 [0067] En un aspecto de la invención, el número de átomos de zinc que se añade antes de la adición de un conservante es al menos 3 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada y el número de átomos de zinc que se añade después de la adición de un conservante es al menos 3 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada.

60 En un aspecto, el método comprende la adición de al menos 3 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada antes de la adición de un conservante y la adición de al menos 4, 5, 6, 7, 8 o 9 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada después de la adición de un conservante.

[0068] En un aspecto de la invención, el conservante que se añade es fenol y/o m-cresol.

[0069] En un aspecto de la invención, el método comprende añadir toda la cantidad de átomos de zinc a la composición farmacéutica en un sólo paso.

[0070] En un aspecto de la invención, el método comprende añadir los átomos de zinc a la composición farmacéutica en dos o más pasos. Por ejemplo, el zinc se puede añadir a la composición en un, dos, tres, cuatro o cinco pasos, donde cada paso incluye la adición de cantidades pequeñas de un máximo de 1 Zn/6ins. El zinc se puede añadir a la composición en un, dos, tres, cuatro o cinco pasos, donde cada paso incluye la adición de cantidades pequeñas de 2 Zn/6ins, 3 Zn/6ins, 4 Zn/6ins, 5 Zn/6ins o 6 Zn/6ins.

En un aspecto de la invención, el método comprende la adición de un tensioactivo a la composición farmacéutica. El tensioactivo puede mezclarse en la composición farmacéutica en una cantidad de 0,0005-0,01% basada en el peso de la composición farmacéutica. En un aspecto, el tensioactivo puede mezclarse en la composición farmacéutica en una cantidad de 0,0005-0,007% basada en el peso de la composición. Un ejemplo de un tensioactivo podría ser el polisorbato 20, que se puede mezclar en la composición farmacéutica en una cantidad de 0,001-0,003% dependiendo del peso de la composición. Otro ejemplo es el poloxámero 188, que se puede mezclar en la composición farmacéutica en una cantidad de 0,002-0,006% dependiendo del peso de la composición.

En un aspecto de la invención, la insulina acilada se selecciona del grupo formado por insulina humana N^{eB29} - $(N^{\alpha}-$
 $(HOOC(CH_2)_{14}CO)-\gamma$ -Glu) desB30; insulina humana N^{eB29} - $(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{15}CO)-\gamma$ -Glu) desB30; insulina humana N^{eB29} - $(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{16}CO)-\gamma$ -Glu) desB30; insulina humana N^{eB29} - $(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{17}CO)-\gamma$ -Glu) desB30; insulina humana N^{eB29} - $(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{18}CO)-\gamma$ -Glu) desB30; insulina humana N^{eB29} - $(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{19}CO)-\gamma$ -Glu-N-(γ -Glu)) desB30; insulina humana N^{eB29} - $(N^{\alpha}-(Asp-OC(CH_2)_{16}CO)-\gamma$ -Glu) desB30; insulina humana N^{eB29} - $(N^{\alpha}-(Glu-OC(CH_2)_{14}CO)-\gamma$ -Glu) desB30; insulina humana N^{eB29} - $(N^{\alpha}-(Glu-OC(CH_2)_{14}CO)-$ desB30; insulina humana N^{eB29} - $(N^{\alpha}-(Asp-OC(CH_2)_{16}CO)-$ desB30; insulina humana N^{eB29} - $(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{16}CO)-\alpha$ -Glu-N-(β -Asp)) desB30; insulina humana N^{eB29} - $(N^{\alpha}-(Gly-OC(CH_2)_{13}CO)-\gamma$ -Glu) desB30; insulina humana N^{eB29} - $(N^{\alpha}-(Sar-OC(CH_2)_{13}CO)-\gamma$ -Glu) desB30; insulina humana N^{eB29} - $(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{13}CO)-\gamma$ -Glu) desB30; insulina humana $(N^{eB29}-N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{13}CO)-\beta$ -Asp) desB30; insulina humana N^{eB29} - $(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{13}CO)-\alpha$ -Glu) desB30; insulina humana N^{eB29} - $(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{16}CO)-\gamma$ -D-Glu) desB30; insulina humana N^{eB29} - $(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-\beta$ -D-Asp) desB30; insulina humana N^{eB29} - $(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-\beta$ -D-Asp) desB30; insulina humana N^{eB29} - $(N-HOOC(CH_2)_{16}Co-\beta$ -D-Asp) desB30; insulina humana N^{eB29} - $(N-HOOC(CH_2)_{14}CO-IDA)$ desB30; insulina humana N^{eB29} - $[N-(HOOC(CH_2)_{16}CO)-N-(carboxietil)-Gly]$ DesB30; insulina humana N^{eB29} - $[N-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-N-(carboxietil)-Gly]$ DesB30; e insulina humana N^{eB29} - $[N-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-N-(carboximetil)-\beta$ -Ala] DesB30.

En un aspecto de la invención, el método comprende añadir una insulina de acción rápida a la composición. La insulina de acción rápida es insulina humana AspB28, insulina humana LysB28ProB29 e insulina humana Lys^{B3}Glu^{B29} o una mezcla de éstas.

[0071] En un aspecto de la invención, la composición farmacéutica comprende insulina acilada para su uso en el tratamiento de la diabetes.

[0072] En un aspecto de la invención, la composición farmacéutica comprende insulina acilada que se usa para la producción de un medicamento para el tratamiento de la diabetes.

[0073] En un aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica según la invención acompañada por un transportador farmacéuticamente aceptable y/o un aditivo farmacéuticamente aceptable. Esta composición se puede proporcionar para el tratamiento de la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 y otros estados que provocan hiperglucemia en pacientes que necesitan este tratamiento.

[0074] La composición farmacéutica de la invención está ideada como un método para el tratamiento de la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 y otros estados que provocan hiperglucemia en pacientes que necesitan este tratamiento, esta incluye la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica acompañada de un transportador farmacéuticamente aceptable y/o aditivos farmacéuticamente aceptables.

[0075] En un aspecto de la invención, se proporciona un método para la producción de una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 y otros estados que provocan hiperglucemía.

55 [0076] En un aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 y otros estados que provocan hiperglucemia en un paciente que necesita este tratamiento.

[0077] La composición farmacéutica de la invención es proporcionada para un método para el tratamiento de la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 y otros estados que provocan hiperglucemia en un paciente que necesita este tratamiento, comprendiendo la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica

según la invención.

[0078] En un aspecto de la invención, se proporciona un método para la producción de una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento de la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 y otros estados que provocan hiperglucemia.

5 [0079] La composición farmacéutica que contiene una insulina acilada tal y como se define en la presente especificación se puede administrar de manera simultánea o secuencial con OAD(s) o GLP-1. Los factores se pueden suministrar en forma de monodosis, donde la monodosis contiene ambos compuestos, o en forma de un *kit-of-parts* (combinación) que contiene una preparación de una composición farmacéutica que comprende una insulina acilada y una composición farmacéutica con un OAD como una segunda forma de unidad de dosis. Siempre que una primera o segunda o tercera, etc., dosis unitaria se menciona a lo largo de esta especificación, esto no indica el orden preferido de administración, sino que se hace simplemente por fines de conveniencia.

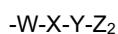
10 [0080] Por dosificación «simultánea» de una preparación de una composición farmacéutica que comprende una insulina acilada y una preparación de OAD(s) o GLP-1 se entiende la administración de los compuestos en forma de monodosis, o la administración de un primer agente seguido por la administración de un segundo agente con una separación en el tiempo de no más de 15, 10, 5 ó 2 minutos. Cualquier factor puede ser administrado primero.

15 [0081] Por dosificación «secuencial» se entiende la administración de un primer agente seguido por la administración de un segundo agente con una separación en el tiempo superior a 15 minutos. Cualquiera de las dos formas de unidad de dosificación puede ser administrada primero. Preferiblemente, ambos productos se inyectan a través del mismo acceso intravenoso.

20 [0082] En otro aspecto de la invención, la composición farmacéutica que contiene una insulina acilada se administra una vez al día de manera simultánea o secuencial con OAD(s) o GLP-1. En un aspecto más preferido, la composición farmacéutica que contiene una insulina acilada incluye además una insulina de acción rápida y se administra una vez al día junto con OAD(s) o GLP-1. En un aspecto de la invención, la composición farmacéutica que contiene una insulina acilada puede ser un tratamiento intensivo aislado administrado hasta 5 veces al día. En un aspecto incluso más preferido, la composición farmacéutica incluye además una insulina de acción rápida, donde el tratamiento intensivo puede ser un tratamiento independiente administrado hasta 5 veces al día.

25 [0083] La invención se resume en los siguientes párrafos:

30 1. Composición farmacéutica soluble que comprende una insulina acilada con más de 4 átomos de zinc por cada 6 moléculas de insulina acilada, en la que la insulina acilada comprende una molécula de insulina con una cadena lateral unida a un grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina inicial, la cadena lateral tiene la siguiente fórmula general:



40 en donde W es:

- 45 • un residuo de α -aminoácido que tiene un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral que forma el residuo, con uno de sus grupos ácido carboxílico, un grupo amida con un grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina inicial;
- 50 • una cadena compuesta por dos, tres o cuatro residuos de α -aminoácido unidos por medio de enlaces amida carbonilo, esta cadena está unida por medio de un enlace amida a un grupo ϵ -amino de un residuo Lys presente en la cadena B de la insulina inicial. Los residuos de aminoácidos de W se seleccionan del grupo de residuos de aminoácidos que tienen una cadena lateral neutra y residuos de aminoácidos con un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral, de modo que W tiene al menos un residuo de aminoácido que tiene un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral; o
- 55 • un enlace covalente desde X a un grupo ϵ -amino de un residuo Lys presente en la cadena B de la insulina inicial;

X es:

- 60 • -CO- ;
- -CH(COOH)CO- ;

- $\text{—CO-N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CO—}$;
- $\text{—CO-N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CO—}$;
- $\text{—CO-N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO—}$;
- $\text{—CO-N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO—}$;
- $\text{—CO-NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_4\text{NHCO—}$;
- $\text{—CO-N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CO—}$; o
- $\text{—CO-N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO—}$.

que

- a) cuando W es un residuo de aminoácido o una cadena de residuos de aminoácidos, mediante un enlace amida entre el carbono subrayado y un grupo amino en W, o
- b) cuando W es un enlace covalente, mediante un enlace amida entre el carbono carbonilo subrayado y un grupo ϵ -amino de un residuo Lys presente en la cadena B de la insulina inicial;

Y es:

- $-(\text{CH}_2)_m$ en donde m es un número entero en el intervalo de 6 y 32;
- una cadena de hidrocarburo bivalente que contiene 1, 2 o 3 grupos $-\text{CH}=\text{CH}-$ y varios grupos $-\text{CH}_2-$ suficientes para dar un número total de átomos de carbono en la cadena en el intervalo de 10 a 32 y

Z_2 es:

- $-\text{COOH}$;
- $-\text{CO-Asp}$;
- $-\text{CO-Glu}$;
- $-\text{CO-Gly}$;
- $-\text{CO-Sar}$;
- $-\text{CH}(\text{COOH})_2$;
- $-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$;
- $-\text{SO}_3\text{H}$; o
- $-\text{PO}_3\text{H}$

y cualquier complejo Zn^{2+} de estos, con la condición de que cuando W es un enlace covalente y X es $-\text{CO-}$, entonces Z es diferente de $-\text{COOH}$.

2. Composición farmacéutica según el párrafo 1 que comprende hasta alrededor de 12 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada.

3. Composición farmacéutica según los párrafos 1 ó 2 que contiene aproximadamente entre 4,3 y 12 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada.

4. Composición farmacéutica según cualquiera de los párrafos 1-3 que contiene aproximadamente entre 4,5 y 12 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada.
5. Composición farmacéutica según cualquiera de los párrafos anteriores, en la que al menos el 85% de la insulina acilada está presente como complejos que son dodecámeros de insulina acilada o complejos con un peso molecular mayor al del dodecámero de insulina acilada.
10. Composición farmacéutica según cualquiera de los párrafos anteriores, en la que al menos el 92% de la insulina acilada está presente como complejos que son dodecámeros de insulina acilada o complejos con un peso molecular mayor al del dodecámero de insulina acilada.
15. Composición farmacéutica según cualquiera de los párrafos anteriores, en la que al menos el 95% de la insulina acilada está presente como complejos de docámeros de insulina acilada o complejos con un peso molecular mayor al del dodecámero de insulina acilada.
20. Composición farmacéutica según cualquiera de los párrafos anteriores, en la que la composición comprende un tensioactivo.
25. 10. Composición farmacéutica según cualquiera de los párrafos 1-9, en la que Z_2 es -COOH.
11. Composición farmacéutica según los párrafos 1-9 ó 1-10, en la que la insulina acilada se selecciona del grupo formado por insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{15}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{16}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{17}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{18}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{19}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(Asp-OC(CH_2)_{16}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(Glu-OC(CH_2)_{14}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(Glu-OC(CH_2)_{15}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(Glu-OC(CH_2)_{16}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(Glu-OC(CH_2)_{17}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(Glu-OC(CH_2)_{18}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(Glu-OC(CH_2)_{19}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(Asp-OC(CH_2)_{17}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(Asp-OC(CH_2)_{18}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(Asp-OC(CH_2)_{19}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(Gly-OC(CH_2)_{13}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(Gly-OC(CH_2)_{14}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(Gly-OC(CH_2)_{15}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(Gly-OC(CH_2)_{16}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(Gly-OC(CH_2)_{17}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(Gly-OC(CH_2)_{18}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(Gly-OC(CH_2)_{19}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(Sar-OC(CH_2)_{13}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{13}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{15}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{16}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{17}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{18}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{19}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(Asp-OC(CH_2)_{17}CO)-\beta\text{-Asp})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(Asp-OC(CH_2)_{18}CO)-\beta\text{-Asp})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(Asp-OC(CH_2)_{19}CO)-\beta\text{-Asp})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{16}CO)-\beta\text{-D-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{17}CO)-\beta\text{-D-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{18}CO)-\beta\text{-D-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{19}CO)-\beta\text{-D-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{16}CO)-\beta\text{-D-Asp})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{17}CO)-\beta\text{-D-Asp})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{18}CO)-\beta\text{-D-Asp})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{19}CO)-\beta\text{-D-Asp})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(N-HOOC(CH_2)_{16}CO)-\beta\text{-D-Asp})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(N-HOOC(CH_2)_{17}CO)-\beta\text{-D-Asp})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(N-HOOC(CH_2)_{18}CO)-\beta\text{-D-Asp})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(N-HOOC(CH_2)_{19}CO)-\beta\text{-D-Asp})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(N-HOOC(CH_2)_{16}CO)-\beta\text{-D-Gly})$ DesB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(N-HOOC(CH_2)_{17}CO)-\beta\text{-D-Gly})$ DesB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(N-HOOC(CH_2)_{18}CO)-\beta\text{-D-Gly})$ DesB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(N-HOOC(CH_2)_{19}CO)-\beta\text{-D-Gly})$ DesB30; e insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(N-HOOC(CH_2)_{16}CO)-\beta\text{-Ala})$ DesB30.
45. 12. Composición farmacéutica según cualquiera de los párrafos anteriores, en la que la insulina inicial es un análogo de insulina humana desB30.
13. Composición farmacéutica según cualquiera de los párrafos anteriores, en la que la insulina inicial se selecciona del grupo formado por insulina humana; insulina humana desB1; insulina humana desB30; insulina humana GlyA21; insulina humana GlyA21 desB30; insulina humana AspB28; insulina porcina; insulina humana LysB28 ProB29; insulina humana GlyA21 ArgB31 ArgB32; y insulina humana LysB3 GluB29 o insulina humana AspB28 desB30.
50. 14. Composición farmacéutica según cualquiera de los párrafos anteriores, con un pH entre aproximadamente 6,5 y 8,5.
15. Composición farmacéutica según cualquiera de los párrafos anteriores que comprende además una insulina de acción rápida.
55. 16. Composición farmacéutica según los párrafos 1 y 15, en la que al menos el 85% de la insulina de acción rápida está presente como hexámero de insulina de acción rápida o complejos con un peso molecular menor al de los hexámeros de insulina de acción rápida.
60. 17. Composición farmacéutica según los párrafos 1 y 15-16, en la que al menos el 92% de la insulina de acción rápida está presente como hexámero de insulina de acción rápida o complejos con un peso molecular menor al de

los hexámeros de insulina de acción rápida.

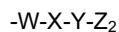
18. Composición farmacéutica según los párrafos 1 y 15-17, en la que al menos el 95% de la insulina de acción rápida está presente como hexámero de insulina de acción rápida o complejos con un peso molecular menor al de los hexámeros de insulina de acción rápida.

19. Composición farmacéutica según los párrafos 1 y 15-18, en la que al menos el 97% de la insulina de acción rápida está presente como hexámero de insulina de acción rápida o complejos con un peso molecular menor al de los hexámeros de insulina de acción rápida.

10 20. Composición farmacéutica según los párrafos 1 y 15-19, en la que al menos el 99% de la insulina de acción rápida está presente como hexámero de insulina de acción rápida o complejos con un peso molecular menor al de los hexámeros de insulina de acción rápida.

15 21. Composición farmacéutica según los párrafos 15-20, en la que la insulina de acción rápida es insulina humana AspB28, insulina humana LysB3 GluB29 y/o insulina humana LysB28 ProB29.

20 22. Método para la producción de una composición farmacéutica que comprende una insulina acilada donde más de 4 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada se añaden a la composición y donde la insulina acilada tiene una cadena lateral unida al grupo ϵ -amino de un residuo Lys presente en la cadena B de la insulina inicial, la cadena lateral tiene la siguiente fórmula general:



25 donde W es:

- un residuo de α -aminoácido que tiene un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral que forma el residuo, con uno de sus grupos ácido carboxílico, un grupo amida con un grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina inicial;
- una cadena compuesta por dos, tres o cuatro residuos de α -aminoácido unidos por medio de enlace amida carbonilo, dicha cadena está unida por medio de un enlace amida a un grupo ϵ -amino de un residuo de Lys presente en la cadena B de la insulina inicial, siendo los residuos de aminoácidos de W seleccionados del grupo de residuos de aminoácidos que tienen una cadena lateral neutra y residuos de aminoácidos con un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral, de modo que W tiene al menos un residuo de aminoácido que tiene un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral; o
- un enlace covalente desde X a un grupo ϵ -amino de un residuo Lys presente en la cadena B de la insulina inicial;

40 X es:

- $-\underline{CO}-$;
- $-\underline{CH(COOH)CO}-$;
- $-\underline{CO-N(CH_2COOH)CH_2CO}-$;
- $-\underline{CO-N(CH_2COOH)CH_2CON(CH_2COOH)CH_2CO}-$;
- $-\underline{CO-N(CH_2CH_2COOH)CH_2CH_2CO}-$;
- $-\underline{CO-N(CH_2CH_2COOH)CH_2CH_2CON(CH_2CH_2COOH)CH_2CH_2CO}-$;
- $-\underline{CO-NHCH(COOH)(CH_2)_4NHCO}-$;
- $-\underline{CO-N(CH_2CH_2COOH)CH_2CO}-$; o
- $-\underline{CO-N(CH_2COOH)CH_2CH_2CO}-$.

60 que

- 5 a) cuando W es un residuo de aminoácido o una cadena de residuos de aminoácidos, mediante un enlace desde el carbono subrayado forma un enlace amida con un grupo amino en W, o
b) cuando W es un enlace covalente, mediante un enlace desde el carbono carbonilo subrayado forma un enlace amida con un grupo ϵ -amino de un residuo Lys presente en la cadena B de la insulina inicial;

10 Y es:

- 10 • $-(CH_2)_m-$ donde m es un número entero en el intervalo de 6 a 32;
15 • una cadena de hidrocarburo bivalente que contiene 1, 2 o 3 grupos $-CH=CH-$ y varios grupos $-CH_2-$ suficientes para dar un número total de átomos de carbono en la cadena en el intervalo de 10 a 32 y

15 Z_2 es:

- 20 • $-COOH$;
20 • $-CO-Asp$;
25 • $-CO-Glu$;
25 • $-CO-Gly$;
30 • $-CO-Sar$;
30 • $-CH(COOH)_2$;
35 • $-N(CH_2COOH)_2$;
35 • $-SO_3H$; o
40 • $-PO_3H$

40 y cualquier complejo Zn^{2+} de estos, con la condición de que cuando W es un enlace covalente y X es $-CO-$, Z es diferente de $-COOH$.

45 23. Método según el párrafo 22 en el que se añaden hasta alrededor de 12 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada a la composición.

50 24. Método según cualquiera de los párrafos del 22-23, en el que se añaden entre aproximadamente 4,3 y aproximadamente 12 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada a la composición.

55 25. Método según los párrafos del 22-24, en el que el zinc se añade a la composición antes de la adición de un conservante.

26. Método según cualquiera de los párrafos del 22-25, en el que el número de átomos de zinc que se añade antes de la adición de un conservante es más de 1 átomo de zinc por 6 moléculas de insulina acilada.

27. Método según cualquiera de los párrafos del 22-26, en el que el número de átomos de zinc que se añade antes de la adición de un conservante es más de 2 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada.

28. Método según cualquiera de los párrafos del 22-27, en el que el número de átomos de zinc que se añade antes de la adición de un conservante es más de 3 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada.

29. Método según cualquiera de los párrafos del 22-28, en el que el número de átomos de zinc que se añade antes de la adición de un conservante es más de 4 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada.

30. Método según cualquiera de los párrafos del 22-29, en el que el número de átomos de zinc que se añade antes de la

adición de un conservante es más de 5 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada.

31. Método según cualquiera de los párrafos del 22-24, en el que el zinc se añade a la composición después de la adición de un conservante.

5 32. Método según los párrafos 22-24 y 31, en el que se añaden al menos 0,5 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada a la composición después de la adición de un conservante.

10 33. Método según cualquiera de los párrafos del 22-24 y del 31-32, en el que se añade al menos 1 átomo de zinc por 6 moléculas de insulina acilada a la composición después de la adición de un conservante.

15 34. Método según cualquiera de los párrafos precedentes del método, en el que se añade parte del zinc antes de la adición de un conservante y en el que se añade parte del zinc después adición de un conservante

15 35. Método según cualquiera de los párrafos precedentes del método, en el que el número de átomos de zinc que se añade antes de la adición de un conservante es al menos 3 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada y el número de átomos de zinc que se añade después de la adición de un conservante es al menos 3 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada.

20 36. Método según cualquiera de los párrafos precedentes del método, en el que el conservante es fenol y/o m-cresol.

37. Método según cualquiera de los párrafos precedentes del método, en el que se mezcla un tensioactivo con la composición farmacéutica.

25 38. Método según cualquiera de los párrafos precedentes del método, en el que la insulina acilada se selecciona el grupo formado por insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{15}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{16}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{17}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{18}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{19}CO)-\gamma\text{-Glu}-N-(\gamma\text{-Glu}))$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(Asp-OC(CH_2)_{16}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(Glu-OC(CH_2)_{14}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(Glu-OC(CH_2)_{14}CO)-)$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(Asp-OC(CH_2)_{16}CO)-)$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{16}CO)-\alpha\text{-Glu}-N-(\beta\text{-Asp}))$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(Gly-OC(CH_2)_{13}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(Sar-OC(CH_2)_{13}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{13}CO)-\gamma\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $(N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{13}CO)-\beta\text{-Asp})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{13}CO)-\alpha\text{-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{16}CO)-\gamma\text{-D-Glu})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-\beta\text{-D-Asp})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N^{\alpha}-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-\beta\text{-D-Asp})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N-HOOC(CH_2)_{16}Co-\beta\text{-D-Asp})$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N-HOOC(CH_2)_{14}CO-IDA)$ desB30; insulina humana $N^{eB29}-(N-(HOOC(CH_2)_{16}CO)-N-(carboxietil)-Gly)$ DesB30; insulina humana $N^{eB29}-(N-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-N-(carboxietil)-Gly)$ DesB30; e insulina humana $N^{eB29}-(N-(HOOC(CH_2)_{14}CO)-N-(carboximetil)-\beta\text{-Ala})$ DesB30.

40 7739. Método según cualquiera de los párrafos precedentes del método, en el que la insulina inicial es un análogo de insulina humana desB30.

45 40. Método según cualquiera de los párrafos precedentes del método, en el que la insulina inicial se selecciona del grupo formado por insulina humana; insulina humana desB1; insulina humana desB30; insulina humana GlyA21; insulina humana GlyA21 desB30; insulina humana AspB28; insulina porcina; insulina humana LysB28 ProB29; insulina humana GlyA21 ArgB31 ArgB32; y insulina humana LysB3 GluB29 o insulina humana AspB28 desB30.

50 41. Método según cualquiera de los párrafos precedentes del método, en el que una insulina de acción rápida se mezcla con la composición.

42. Método según los párrafos 22 y 41, en el que la insulina de acción rápida es insulina humana AspB28, insulina humana LysB3 GluB29 o insulina humana LysB28 ProB29.

55 43. Uso de una composición según cualesquiera de los párrafos del 1-21 para la producción de un medicamento para el tratamiento de la diabetes.

60 44. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la diabetes en un paciente con la necesidad de este tratamiento que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica según los párrafos 1-21 junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

45. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la diabetes en un paciente que necesita este tratamiento que incluye la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica según los párrafos del 1-21 junto con un transportador farmacéuticamente aceptable.
- 5 46. Composición según el párrafo 45 para el tratamiento pulmonar de la diabetes.
47. Uso de una composición farmacéutica según los párrafos 1-21 para la producción de una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 y otros estados que provocan hiperglucemia.
- 10 [0084] En un aspecto, el método incluye la adición de al menos 1 átomo de zinc por 6 moléculas de insulina acilada antes de la adición de un conservante y la adición al menos 1 átomo de zinc por 6 moléculas de insulina acilada después de la adición de un conservante, o la adición de al menos 1 átomo de zinc por 6 moléculas de insulina acilada antes de la adición de un conservante y de la adición de al menos 2-3 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada después de la adición de un conservante, o la adición de al menos 1 átomo de zinc por 6 moléculas de insulina acilada antes de la adición de un conservante y hasta 11 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada después la adición de un conservante.
- 15 [0085] En un aspecto, el método incluye la adición de al menos 2 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada antes de la adición de un conservante y la adición de al menos 1 átomo de zinc por 6 moléculas de insulina acilada después de la adición de un conservante, o la adición de al menos 2 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada antes de la adición de un conservante y de la adición de al menos 2-3 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada después de la adición de un conservante, o la adición de al menos 2 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada antes de la adición de un conservante y hasta 10 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada después de la adición de un conservante.
- 20 [0086] En un aspecto, el método incluye la adición de al menos 3 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada antes de la adición de un conservante y la adición de al menos 1 átomo de zinc por 6 moléculas de insulina acilada después de la adición de un conservante, o la adición de al menos 3 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada antes de la adición de un conservante y la adición de al menos 2-3 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada después de la adición de un conservante, o la adición de al menos 3 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada antes de la adición de un conservante y hasta 9 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada después de la adición de un conservante.
- 25
- 35 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**
- [0087] Todos las cifras son el resultado de una cromatografía de exclusión por tamaño de una formulación de insulina humana Lys²⁹N^ε-hexadecadioil-γ-Glu desB30 y/o insulina aspartato en Superose 6HR eluidas por solución salina isotónica a 37°C en los paneles superiores y el contenido respectivo de 14 fracciones que van desde las fracciones de peso molecular alto hasta las fracciones de peso molecular bajo o fracciones de monómero de insulina en el panel inferior.
- 40 [0088] En las figuras se usan las siguientes abreviaturas:
- 45 Aspart: insulina aspartato
 Zn/6Ins: átomos de zinc por 6 moléculas de insulina
 Zn/Acyl-ins: átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada
 Acyl-ins insulina acilada
- 50 Figura 1: 600 μM de insulina aspartato con 3 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina aspartato
- Figura 2: 600 μM de insulina aspartato con 6 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina aspartato
- 55 Figura 3: 600 μM de insulina humana LysB²⁹N^ε-hexadecadioil-γ-Glu desB30 con 3 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada
- Figura 4: 600 μM de insulina humana LysB²⁹N^ε-hexadecadioil-γ-Glu desB30 con 4 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada
- 60 Figura 5: 600 μM de insulina humana LysB²⁹N^ε-hexadecadioil-γ-Glu desB30 con 6 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada

Figura 6: 600 μM de insulina humana LysB²⁹N^ε-hexadecandoil- γ -Glu desB30 con 8 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada

5 Figura 7: 180 μM de mezcla de insulina aspartato y 840 μM de insulina humana LysB²⁹N^ε-hexadecandoil- γ -Glu desB30 con un contenido total de zinc de 3,6 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada

10 Figura 8: 180 μM de mezcla de insulina aspartato y 420 μM de insulina humana LysB²⁹N^ε-hexadecandoil- γ -Glu desB30 con un contenido total zinc de 4,3 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada

15 Figura 9: 300 μM de mezcla de insulina aspartato y 600 μM de insulina humana LysB²⁹N^ε-hexadecandoil- γ -Glu desB30 con un contenido total de zinc de 4,5 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada

20 Figura 10: 180 μM de mezcla de insulina aspartato y 420 μM de insulina humana LysB²⁹N^ε-hexadecandoil- γ -Glu desB30 con un contenido total de zinc de 8,6 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada

25 Figura 11: 180 μM de mezcla de insulina aspartato y 420 μM de insulina humana LysB²⁹N^ε-hexadecandoil- γ -Glu desB30 con un contenido total de zinc de 11,4 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada

30 Figura 12: 300 μM de mezcla de insulina aspartato y 300 μM de insulina humana LysB²⁹N^ε-hexadecandoil- γ -Glu desB30 con un contenido total de zinc de 12 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada

35 Fig. 13: Perfil de plasma de insulina aspartato dado por separado (IV, línea discontinua, N=8) y dado en la mezcla con insulina B²⁹N^ε-hexadecandoil- γ -Glu desB30 a una concentración de zinc baja (I, 3,38 Zn/6ins.deriv., línea completa, N=8) y a una concentración de zinc alta (II, 6 Zn/6ins.deriv., línea de puntos, N=7).

40 Fig 14. Perfil de plasma de insulina B²⁹N^ε-hexadecandoil- γ -Glu desB30 dada por separado (III, línea discontinua, N=8) y dado en la mezcla con insulina aspartato a una concentración de zinc baja (I, 3,38 Zn/6ins.deriv., línea completa, N=8) y a una concentración de zinc alta (II, 6 Zn/6ins.deriv., línea de puntos, N=7).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

45 [0089] La presente invención se basa en el sorprendente reconocimiento de que un aumento en el contenido de zinc sobre el nivel habitual (entre 2 y 4 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada) aumenta la proporción de ciertos complejos de derivados de insulina de peso molecular medio y alto, en particular de la insulina humana acilada LysB²⁹N^ε-hexadecandoil- γ -Glu desB30.

50 [0090] Según la presente invención es posible diseñar la formulación de la insulina que contiene la insulina con el grado de asociación deseado.

55 [0091] Además, cuando se mezcla la insulina acilada con análogos de insulina de perfil de acción rápida se obtiene un perfil de acción bifásica real y no ocurre ninguna reducción. De este modo, la invención proporciona composiciones solubles que son mezclas de un análogo de insulina de acción rápida y de una insulina acilada de acción prolongada en las que el índice de desaparición de la insulina de acción rápida y la insulina acilada del área de la inyección es el mismo que cuando se inyectan en composiciones separadas. Al administrar la insulina como una composición farmacéutica bifásica, se puede reducir el número de inyecciones, lo que resulta en una terapia más conveniente y segura.

60 [0092] La presente invención se basa además en el reconocimiento sorprendente de que, cuando se prepara formulación de insulina, se puede añadir zinc a la formulación después de la adición de conservantes. El zinc se proporciona por lo general mediante la adición de acetato de zinc, cloruro de zinc o citrato de zinc a la formulación de insulina.

65 [0093] Según la invención, una composición de insulina acilada de esta invención se puede administrar por inhalación para conseguir una absorción rápida de la misma. La administración por inhalación se puede comparar en farmacocinética con la administración subcutánea de insulinas. La inhalación de una composición de insulina acilada de esta invención provoca un aumento rápido del nivel de insulina circulante seguido de una caída rápida de los niveles de glucosa en la sangre. Distintos dispositivos de inhalación proporcionan por lo general una farmacocinética similar cuando se comparan tamaños de partícula similares y niveles similares de deposición pulmonar.

70 [0094] Según la invención, una composición de insulina acilada de esta invención se puede administrar por cualquier variedad de dispositivo de inhalación conocido en la técnica para la administración de un agente terapéutico por

5 inhalación. Estos dispositivos incluyen inhaladores dosificadores, nebulizadores, inhaladores de polvo seco, sprays y otros dispositivos similares. Preferiblemente, una composición de insulina acilada de esta invención se administra con un inhalador de polvo seco o un spray. Hay distintas características deseables en un dispositivo de inhalación para la administración de una composición de insulina acilada de esta invención. Por ejemplo, cuando la administración por el dispositivo de inhalación es ventajosamente fiable, reproducible y precisa. El dispositivo de inhalación debería administrar partículas pequeñas, por ejemplo, aproximadamente de menos de 10 µm de 1-5 µm, para no dificultar la respiración. Algunos ejemplos específicos de dispositivos comerciales de inhalación adecuados disponibles para la práctica de esta invención son Tur-bohaler™ (Astra), Rotahaler® (Glaxo), Diskus® (Glaxo), inhalador Spiros™ (Dura) 10 dispositivos comercializados por Inhale Therapeutics, AERx™ (Aradigm), nebulizador Ultravent® (Mallinckrodt), el nebulizador Acorn II® (MarquestMedicalProducts), el inhalador dosificador Ventolin® (Glaxo), inhalador de polvo Spinhaler® (Fisons), C-haler© (Microdrug), E-flex© (Microdrug) u otros productos similares.

15 [0095] Como reconocerán los expertos en la técnica, la formulación de una composición de insulina acilada de esta invención, la cantidad de la formulación administrada y la duración de la administración de una monodosis dependen del tipo de dispositivo de inhalación empleado. Para algunos sistemas en aerosol, como los nebulizadores, la frecuencia de administración y el tiempo que tarda en activarse el sistema dependerán principalmente de la concentración de la insulina conjugada en el aerosol. Por ejemplo, se pueden usar períodos de administración más cortos en 20 concentraciones más altas de insulina conjugada de la solución del nebulizador. Algunos dispositivos, como los inhaladores dosificadores, pueden producir concentraciones más altas del aerosol y se pueden utilizar en períodos más cortos para administrar la cantidad de insulina conjugada deseada. Algunos dispositivos, como los inhaladores de polvo, administran el agente activo hasta que una carga deseada del agente es expulsada del dispositivo. En este tipo de inhalador, la cantidad de derivado de insulina de esta invención en polvo determina la dosis que se administra en una única administración.

25 [0096] El tamaño de la partícula del derivado de insulina de esta invención en la formulación que se administra por medio de un dispositivo de inhalación es crucial con respecto a la capacidad de la insulina de hacerlo en los pulmones y preferiblemente en las vías respiratorias inferiores o alveolos. Preferiblemente, una composición de insulina acilada de esta invención se formula de manera que al menos un 10% de la insulina conjugada administrada se deposita en el pulmón, preferiblemente alrededor de un 10 a 20% o más. Se sabe que la máxima eficacia de la deposición pulmonar 30 por medio de la respiración por la boca en los humanos se obtiene con tamaños de partícula de aproximadamente 2 µm a 3 µm. Cuando el tamaño de la partícula está por encima de aproximadamente 5 µm, la deposición pulmonar se reduce considerablemente. Tamaños de partícula por debajo de 1 µm provocan que la deposición pulmonar se reduzca, y esto dificulta la entrega de partículas con una masa suficiente para ser terapéuticamente eficaz. Por lo tanto, las partículas de 35 una composición de insulina acilada administradas por inhalación tienen un tamaño preferiblemente menor de 10 µm, más preferiblemente en el intervalo entre 1 µm y 5 µm. La formulación del derivado de insulina se selecciona para producir el tamaño de partícula deseado en el dispositivo de inhalación elegido.

40 [0097] Ventajosamente para la administración como polvo seco, una composición de insulina acilada de esta invención se prepara en forma de partículas con un tamaño de partícula inferior a aproximadamente 10 µm, preferiblemente entre 1 y 5 µm. El tamaño de partícula preferido es eficaz para administrarlo a los alveolos del pulmón del paciente. Preferiblemente, el polvo seco está compuesto en gran medida por partículas producidas de modo que una mayoría de las partículas tienen un tamaño en el intervalo deseado. Ventajosamente, al menos un 50% del polvo seco está formado 45 por partículas con un diámetro de menos de 10 µm. Estas formulaciones se pueden conseguir por secado por pulverización, homogeneización o condensación en el punto crítico de una solución que contiene insulina conjugada y otras sustancias deseadas. Otros métodos también adecuados para generar partículas útiles en la presente invención se conocen en la técnica.

50 [0098] Las partículas se separan normalmente de una formulación de polvo seco en un recipiente y luego son transportadas al pulmón de un paciente por medio de transportador de flujo de aire. Por lo general, en los inhaladores de polvo seco actuales, la fuerza para deshacer el sólido la produce únicamente la inhalación del paciente. En otro tipo de inhalador, el flujo de aire generado por la inhalación del paciente activa un motor propulsor que desaglomera las partículas.

55 [0099] Las formulaciones de insulina acilada de esta invención para la administración desde un inhalador de polvo seco generalmente incluyen un polvo seco dividido finamente que contiene la insulina acilada, pero el polvo también puede incluir un agente de carga, un portador, un excipiente, otro aditivo, o sustancias similares. Se puede incluir aditivos a una formulación de polvo seco de insulina conjugada, por ejemplo, para diluir el polvo según se necesite para la administración del inhalador de polvo especial, para facilitar el procesamiento de la formulación, para proporcionar propiedades útiles al polvo de la formulación, para facilitar la dispersión del polvo del dispositivo de inhalación, para estabilizar la formulación (por ejemplo, antioxidantes o tampón), para proporcionar sabor a la formulación, entre otros. Ventajosamente, el aditivo no provoca reacciones adversas en las vías respiratorias del paciente. La insulina acilada 60

- 5 puede mezclarse con un aditivo a un nivel molecular o la formulación sólida puede incluir partículas de la insulina conjugada mezclada con partículas de los aditivos o puede estar recubierta con estas. Aditivos típicos incluyen mono, di y polisacáridos; alcoholes del azúcar y otros polialcoholes, como, por ejemplo, lactosa, glucosa, rafinosa, melecitosa, lactitol, maltitol, trehalosa, sacarosa, manitol, almidón, o combinaciones de estos; tensioactivos, como sorbitol, difosfatidilcolina, o lecitina; u otros similares. Por lo general, un aditivo, como un agente estabilizador, está presente en una cantidad eficaz para un propósito descrito anteriormente, con una frecuencia entre un 50% y un 90% por el peso de la formulación. Agentes adicionales conocidos en la técnica para la formulación de una proteína, como una proteína de análogo de insulina, pueden estar incluidos también en la formulación.
- 10 [0100] Un *spray* que incluye la composición de insulina acilada de esta invención puede producirse forzando una suspensión o solución de insulina conjugada a través de una boquilla a presión. El tamaño de la boquilla y la configuración, la presión aplicada y el índice del alimentación líquida se pueden elegir para conseguir la salida y el tamaño de salida deseados. Un *electrospray* puede producirse, por ejemplo, por un campo eléctrico en conexión con un capilar o boquilla de alimentación. Ventajosamente, las partículas de insulina conjugada administradas por un *spray* tienen un tamaño de partícula inferior a aproximadamente 10 µm, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1 µm a aproximadamente 5 µm.
- 15 [0101] Las formulaciones de insulina acilada de esta invención adecuadas para su uso con un *spray* generalmente incluyen el derivado de insulina en una solución acuosa en una concentración de alrededor 1 mg a 20 mg de insulina conjugada por ml de solución. La formulación puede incluir agentes, tales como un excipiente, un tampón, un agente isotónico, un conservante, un tensioactivo, y, preferiblemente, zinc. La formulación también puede incluir un excipiente o agente estabilizador del derivado de insulina, como un tampón, un agente reductor, proteínas brutas o un carbohidrato. Proteínas brutas útiles para formular conjugados de insulina incluyen albúmina, protamina, o similares. Carbohidratos típicos útiles para la formulación de los conjugados de insulina incluyen sacarosa, manitol, lactosa, trehalosa, glucosa, o similares. La formulación del derivado de insulina también puede incluir un tensioactivo, que puede reducir o prevenir la agregación de la superficie inducida del conjugado de insulina conjugado provocada por atomización de la solución en la formación de un aerosol. Se pueden utilizar varios tensioactivos convencionales, como ésteres de ácido graso de polioxietileno y alcoholes, y ésteres de ácido graso de sorbitán de polioxietileno. Las cantidades se encontrarán generalmente entre aproximadamente el 0,001 y el 4% por peso de la formulación.
- 20 [0102] Las composiciones farmacéuticas según la presente invención se pueden administrar parenteralmente a pacientes que necesitan este tratamiento. La administración parenteral se puede realizar por inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa mediante una jeringa, de manera opcional, una jeringa tipo pluma u otro equipo de dosificación conveniente. Alternativamente, la administración parenteral se puede realizar mediante una bomba de infusión.
- 25 [0103] Un aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica según la invención junto con un portador farmacéuticamente aceptable o un aditivo farmacéuticamente aceptable, que se pueden usar para el tratamiento pulmonar de la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 y otros estados que causan hiperglucemia en pacientes que necesitan este tratamiento.
- 30 [0104] En un aspecto de la invención, se proporciona un método para la producción de una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 y otros estados que causan hiperglucemia, la composición que se usa de manera pulmonar y que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica según la invención junto con un transportador farmacéuticamente aceptable y/o aditivos farmacéuticamente aceptables.
- 35 [0105] Composiciones inyectables de los derivados de insulina acilada se pueden preparar usando las técnicas convencionales de la industria farmacéutica que implican la disolución y la mezcla de los componentes de manera apropiada para proporcionar el producto final deseado. De este modo, según un procedimiento, el derivado de insulina se disuelve en una cantidad de agua que es un poco menos del volumen final de la composición que se prepara. Un agente isotónico, un conservante o una mezcla de conservantes, zinc como acetato, citrato o cloruro o una mezcla de estos, y un tampón se pueden añadir según se necesite; además, se puede añadir un tensioactivo y el valor del pH de la solución se ajusta, si es necesario, con un ácido, por ejemplo, ácido clorhídrico, o una base, por ejemplo, hidróxido de sodio acuoso, según se necesite. Finalmente, el volumen de la solución se ajusta con agua para dar la concentración deseada de los componentes.
- 40 [0106] El tampón se puede seleccionar del grupo formado por acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicina, lisina, arginina, dihidrógenofosfato de sodio, hidrógenofosfato de disodio, fosfato de sodio, adenosina-desaminasa (N-[2-acetamido]-2-ácido iminodiacético), ACES (N-[2-acetamido]-2-ácido aminoetanesulfónico), BES (N,N-bis[2-hidroxietil]-2-ácido aminoetanesulfónico), bicina (N,N-bis-[2-hidroxietil]glicina), BIS-TRIS (bis[2-hidroxietil]iminotris[hidroximetil]-

metano), DIPSO (3[N,N-bis(2-hidroxetil]amin]-2-ácido hidroxipropanosulfónico), dihidrocloruro de etilenodiamina, glicilglicina, HEPES (N-[2-hidroxietil]piperazine-N'-[2-ácido etanosulfónico]) HEPPSO (N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-ácido hidroxipropanesulfónico]) imidazol, MOBS (4-[N- morfolino] ácido butanesulfónico), MOPS (3-[N-morfólico]ácido propanesulfónico), PIPES (piperazina-N,N'-bis[2-ácido etanosulfónico]), TAPSO (3-[N-tris(hidroximetil)metilamino]-2-ácido hidroxipropanesulfónico, THAM (tris[hidroximetil]-aminometano), TES (N-tris[hidroximetil]metil-2-ácido aminoetanesulfónico, tricina (N- tris[hidroximetil]metilglicina), ácido adípico, ácido aspártico, ácido glutárico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, y/o sales derivadas y/o mezclas derivadas.

5 [0107] En otro aspecto de la invención, la formulación contiene además un conservante farmacéuticamente aceptable

10 que puede ser seleccionado del grupo formado por fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, metil p-hidroxibenzoato, propil p-hidroxibenzoato, 2-fenoxietanol, butil p-hidroxibenzoato, 2-feniletanol, alcohol bencílico, clorobutanol, y bronopol, ácido benzoico, imidurea, clorhexidina, dehidroacetato de sodio, clorocresol, etil p-hidroxibenzoato, cloruro de bencetonio, clofenesina (3-(4-clorofenoxy)propano-1,2-diol) o mezclas derivadas. En otro aspecto de la invención, el conservante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 20 mg/ml. En otro aspecto de la invención, el conservante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml. En otro aspecto de la invención, el conservante está presente en una concentración de 5 mg/ml a 10 mg/ml. En otro aspecto de la invención, el conservante está presente en una concentración de 10 mg/ml a 20 mg/ml. Cada uno de estos conservantes específicos constituye un aspecto alternativo de la invención. El uso de un conservante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por expertos en la materia. Por conveniencia se hace referencia a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19^a edición, 1995.

15 20 [0108] En otro aspecto de la invención, la formulación contiene además un agente isotónico que se puede seleccionar del grupo formado por una sal (p. ej. cloruro sódico), un azúcar o alcohol del azúcar, un aminoácido (p. ej. 1-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), 1,2-propanediol (propileneglicol), 1,3-propandiol, 1,3-butanediol) polietilenoglicol (p. ej. PEG400), o mezclas derivadas. Cualquier azúcar tal como mono, di o polisacáridos, o glucanos hidrosolubles, incluyendo, por ejemplo, fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, almidón de hidroxietilo y carboximetilcelulosa sódica se pueden utilizar. En un aspecto, el aditivo de azúcar es sacarosa. El alcohol del azúcar se define como un hidrocarburo C4-C8 con al menos un grupo -OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabinol. En un aspecto, el aditivo de alcohol del azúcar es manitol. Los azúcares o polialcoholes mencionados anteriormente se pueden utilizar de manera individual o combinada. No hay un límite fijo para la cantidad usada, puesto que el azúcar o alcohol del azúcar es soluble en la composición líquida y no afecta adversamente a los efectos estabilizantes conseguidos por medio de los métodos de la invención. En un aspecto, la concentración de azúcar o del alcohol del azúcar se encuentra entre 1 mg/ml y 150 mg/ml aproximadamente. En otro aspecto de la invención, el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/ml a 50 mg/ml. En otro aspecto de la invención, el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/ml a 7 mg/ml. En otro aspecto de la invención, el agente isotónico está presente en una concentración de 8 mg/ml a 24 mg/ml. En otro aspecto de la invención, el agente isotónico está presente en una concentración de 25 mg/ml a 50 mg/ml. Cada uno de estos agentes isotónicos específicos constituye un aspecto alternativo de la invención. El uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas es bien conocido por el experto en la materia. Por conveniencia se hace referencia a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19^a edición, 1995.

25 30 35 40 [0109] En otro aspecto de la invención, la formulación comprende un tensioactivo para prevenir la fibrilación, especialmente cuando se mezcla el derivado de insulina con una insulina de acción rápida como insulina aspartato. Varios tensioactivos convencionales se pueden emplear, como ésteres de ácido graso de polioxieteno y alcoholes, y ésteres de ácido graso de sorbitán de polioxieteno. Las cantidades se encuentran generalmente entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 0,1 % por peso de la formulación.

45 50 [0110] Ejemplos de agentes isotónicos típicos son el cloruro sódico, manitol, dimetilsulfona, 1,2 propanodiol, y glicerol y conservantes típicos son el fenol, m-cresol, metil p-hidroxibenzoato y alcohol bencílico.

55 [0111] Ejemplos de tampones adecuados son el acetato sódico, glicilglicina, HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacinaetanesulfónico), tris(hidroximetil) aminometano, diclorhidrato de etilenodiamina y fosfato sódico.

60 [0112] Las composiciones farmacéuticas según la presente invención se pueden usar en el tratamiento de estados que son sensibles a la insulina. Por lo tanto, se pueden usar en el tratamiento de la diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 e hiperglucemia, por ejemplo, como se ha visto a veces en personas con lesiones serias y personas que se han sometido a una cirugía mayor. El nivel óptimo de dosis para cualquier paciente dependerá de varios factores que incluyen la eficacia de la insulina acilada específica o la mezcla de la insulina acilada con una insulina de acción rápida empleada, la edad, la masa corporal, la actividad física y la dieta del paciente, en una posible combinación con otros fármacos, y en la gravedad del estado a tratar. Se recomienda que la dosificación diaria del derivado de insulina de esta invención se determine individualmente para cada paciente por expertos en la técnica de la misma manera que para composiciones

conocidas de insulina.

- 5 [0113] El producto inicial para la preparación de la insulina acilada o del análogo de insulina que contiene la composición según la invención se puede producir por la conocida síntesis peptídica o por la conocida producción recombinante en microorganismos transformados adecuados. De este modo, el producto inicial de insulina se puede producir por un método que incluye el cultivo de una célula huésped con una secuencia de ADN que codifica el polipéptido y es capaz de expresar el polipéptido en un medio nutritivo adecuado en condiciones que permiten la expresión del péptido, después se recupera al péptido resultante del cultivo.
- 10 [0114] El medio usado para el cultivo de las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para el desarrollo de las células huésped, como medios mínimos o complejos que contienen los suplementos apropiados. Medios adecuados están disponibles a través de proveedores comerciales o se pueden preparar de acuerdo con recetas publicadas (p. ej. en catálogos de la American Type Culture Collection). El péptido producido por las células se puede entonces recuperar del medio de cultivo por medio de procedimientos convencionales, entre los que se incluyen separar las células huésped del medio por centrifugado o filtración, precipitar los componentes proteicos del sobrenadante o filtrar mediante una sal, por ejemplo, sulfato de amonio, purificar por varios procedimientos cromatográficos, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración por gel, cromatografía de afinidad o similares, dependiendo del tipo de péptido en cuestión.
- 15 [0115] La secuencia de ADN que codifica el polipéptido de insulina puede ser adecuadamente de origen genómico o de origen de ADNc, por ejemplo, obtenido por medio de la preparación de un banco genómico o de ADNc y la selección de las secuencias de ADN que codifican la totalidad o parte del polipéptido mediante hibridación usando sondas sintéticas de oligonucleótidos de acuerdo con la técnicas estándar (ver, por ejemplo, Sambrook, J., Fritsch, EF y Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1989). La secuencia de ADN que codifica el polipéptido también se puede preparar sintéticamente mediante métodos estándar establecidos, por ejemplo, por el método de fosforamidita descrito por Beaucage y Caruters, *Tetrahedron Letters* 22 (1981), 1859 - 1869, o por el método descrito por Mattes *et al.*, *EMBO Journal* 3 (1984), 801 - 805. La secuencia de ADN también puede prepararse mediante reacción en cadena de la polimerasa por medio de cebadores específicos, por ejemplo, como los que se describen en el documento US 4,683,202 o por Saiki *et al.*, *Science* 239 (1988), 487 - 491.
- 20 [0116] La secuencia de ADN se puede insertar en cualquier vector que puede convenientemente someterse a procedimientos de ADN recombinante; y la elección del vector depende con frecuencia de la célula huésped en la que se introduce. De este modo, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, la replicación de éste es independiente a la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica con el cromosoma o los cromosomas en los que ha sido integrado.
- 25 [0117] El vector es preferiblemente un vector de expresión en el que la secuencia de ADN que codifica el péptido se une operativamente a segmentos adicionales requeridos para la transcripción del ADN, como un promotor. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestra actividad transcripcional en la célula huésped de elección y pueden ser derivados a partir de genes que codifican proteínas tanto homólogos como heterólogos a la célula huésped. Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción del ADN que codifica el péptido de la invención en una variedad de células huésped se conocen en la técnica, cf., por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular cloning – a laboratory manual*, segunda edición 1989.
- 30 [0118] La secuencia de ADN que codifica el péptido también puede, si es necesario, conectarse operativamente a un terminador adecuado, señales de poliadenilación, secuencias de control transcripcionales y secuencias de control traducionales. El vector recombinante de la invención puede contener además una secuencia de ADN que permite al vector replicarse en la célula huésped en cuestión.
- 35 [0119] El vector también puede contener un marcador seleccionable, por ejemplo, un gen cuyo productor complementa un defecto en la célula huésped o confiere resistencia a un fármaco, por ejemplo, ampicilina, kanamicina, tetraciclina, cloranfenicol, neomicina, higromicina o metotrexato.
- 40 [0120] Para dirigir al péptido de insulina en la vía secretora de las células huésped, una secuencia señal secretora (conocida también como secuencia guía, preprosecuencia o presecuencia) se puede proporcionar en el vector recombinante. La secuencia señal secretora se une a la secuencia de ADN que codifica el péptido en el marco de lectura correcto. Las secuencias señal secretoras se sitúan normalmente en la posición 5' de la secuencia de ADN que codifica el péptido. La secuencia señal secretora normalmente se puede asociar al péptido o puede proceder de un gen que codifica otra proteína segregada.
- 45
- 50
- 55
- 60

[0121] Los procedimientos que se usan para unir las secuencias de ADN que codifican el presente péptido, el promotor y opcionalmente el terminador y/o la secuencia señal secretora, respectivamente, y para insertarlos en vectores adecuados con la información necesaria para la replicación, son conocidos por los expertos en la técnica (cf., por ejemplo, Sambrook *et al.*, supra).

5 [0122] La célula huésped en la que se introduce la secuencia de ADN o el vector recombinante puede ser cualquier célula que sea capaz de producir el presente péptido e incluya bacterias, levadura, hongos y células eucariotas superiores. Ejemplos de células huésped adecuadas que se conocen y se usan en la técnica son, sin limitación, *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, o líneas celulares mamíferas BHK o CHO.

10

DEFINICIONES

15 [0123] El término «**cantidad eficaz**», tal como se utiliza en este caso, significa una dosificación que es suficiente para que el tratamiento del paciente sea eficaz en comparación a ningún tratamiento.

20 [0124] El término «**composición farmacéutica**», tal como se utiliza en este caso, significa un producto que contiene un compuesto activo o una sal derivada junto con excipientes farmacéuticos tales como tampón, conservante y modificador de tonicidad, dicha composición farmacéutica es útil para tratar, prevenir o reducir la gravedad de una enfermedad o trastorno por medio de la administración de dicha composición farmacéutica a una persona. Así, una composición farmacéutica también se conoce en la técnica como formulación farmacéutica. Debe entenderse que el pH de una composición farmacéutica que hay que reconstituir es el valor de pH que se mide en la composición reconstituida producida mediante reconstitución en el líquido de reconstitución prescrito a temperatura ambiente.

25 [0125] El término «**farmacéuticamente aceptable**», tal como se utiliza en este caso, significa adecuado para aplicaciones farmacéuticas normales, es decir, que no provocan reacciones adversas en pacientes, etc.

30 [0126] El término «**tampón**», tal como se utiliza en este caso, se refiere a un compuesto químico en una composición farmacéutica que reduce la tendencia del pH de la composición a cambiar con el tiempo como ocurriría de otra manera debido a reacciones químicas. Los tampones incluyen productos químicos como el fosfato de sodio, TRIS, glicilglicina y citrato de sodio.

35 [0127] El término «**conservante**», tal como se utiliza en este caso, se refiere a un compuesto químico que se añade a una composición farmacéutica para prevenir o retrasar la actividad microbiana (crecimiento y metabolismo). Ejemplos de conservantes farmacéuticamente aceptables son el fenol, m-cresol y una mezcla de fenol y m-cresol.

40 [0128] El término «**agente isotónico**», tal como se usa en este caso, se refiere a un compuesto químico en una composición farmacéutica que sirve para modificar la presión osmótica de la composición farmacéutica de modo que la presión osmótica se acerca a la de la del plasma humano. Entre los agentes isotónicos se incluyen el NaCl, glicerol, manitol, etc.

45 [0129] El término «**estabilizador**», tal como se utiliza en este caso, se refiere a productos químicos añadidos al péptido que se encuentran en las composiciones farmacéuticas para estabilizar el péptido, por ejemplo, para aumentar el tiempo de conservación y/o el tiempo de uso de estas composiciones. Ejemplos de estabilizadores usados en formulaciones farmacéuticas son L-glicina, L-histidina, arginina, polietilenglicol y carboximetilcelulosa. Además, fenoles, iones de zinc y cloruro sódico pueden actuar como estabilizadores.

50 [0130] El término «**tensioactivo**», tal como se utiliza en este caso, se refiere a un compuesto químico en una composición farmacéutica que sirve para modificar la interfaz aérea y la superficies hidrofóbicas de modo que esto desplaza, parcial o totalmente, la insulina, los análogos de insulina y los derivados de insulina de las paredes. Varios tensioactivos convencionales se pueden emplear, como ésteres de ácido graso de polioxietileno y alcoholes y ésteres de ácido graso de sorbitán de polioxietileno. Un ejemplo es el polisorbato 20.

55 [0131] El término «**tratamiento de la enfermedad**», tal como se utiliza en este caso, significa la gestión y el cuidado de un paciente que ha desarrollado la enfermedad, condición o trastorno. El propósito del tratamiento es combatir la enfermedad, condición o trastorno. El tratamiento incluye la administración de los compuestos activos para eliminar o controlar la enfermedad, condición o trastorno, al igual que para aliviar los síntomas o complicaciones asociados a la enfermedad, condición o trastorno.

60 [0132] El término «**prevención de la enfermedad**», tal como se utiliza en este caso se define como la gestión y el cuidado de un individuo con riesgo de desarrollar la enfermedad antes de la aparición clínica de la enfermedad. El

propósito de la prevención es combatir el desarrollo de la enfermedad, condición o trastorno, e incluye la administración de los compuestos activos para prevenir o retardar la aparición de los síntomas o complicaciones y para prevenir y retardar el desarrollo de enfermedades, condiciones o trastornos relacionados.

- 5 [0133] El término «**insulina humana**», tal como se utiliza en este caso, se refiere a la hormona humana cuya estructura y propiedades son ampliamente conocidas. La insulina humana tiene dos cadenas de polipéptidos que se conectan mediante puentes disulfuro entre residuos de cisteína, concretamente, la cadena A y la cadena B. La cadena A es un péptido de 21 aminoácidos y la cadena B es un péptido de 30 aminoácidos. Las dos cadenas están conectadas por tres puentes disulfuro: uno entre las cisteínas en las posiciones 6 y 11 de la cadena A, el segundo entre la cisteína en la posición 7 de la cadena A y la cisteína en la posición 7 de la cadena B, y el tercero entre la cisteína en la posición 20 de la cadena A y la cisteína en la posición 19 de la cadena B.
- 10 [0134] El término «**insulina basal**», tal como se utiliza en este caso, significa una formulación de péptido de insulina que tiene un tiempo de acción superior a 15 horas en modelos estándar de diabetes y se adecúa para cubrir la necesidad de insulina durante la noche y entre comidas. Preferiblemente, la insulina basal tiene un tiempo de acción de al menos 20 horas. Preferiblemente, la insulina basal tiene un tiempo de acción de al menos 10 horas. Preferiblemente, la insulina basal tiene un tiempo de acción en un intervalo que se sitúa entre 15 y 48 horas. Preferiblemente, la insulina basal tiene un tiempo de acción similar al observado en composiciones comerciales farmacéuticas de insulina NPH o insulina humana $\text{N}^{\text{E29}}\text{-tetradecanoil desB30}$.
- 15 [0135] Los términos, «**insulina en bolo**», «**insulina relacionada con las comidas**» o «**insulina de acción rápida**», tal como se utilizan en este caso, se refieren a un péptido de insulina que es de acción rápida y adecuado para cubrir la necesidad de insulina durante y después de la comida.
- 20 [0136] El término «**insulina bifásica**», tal como se utiliza en este caso, se refiere a una composición farmacéutica que contiene una mezcla de «**insulina basal**» e «**insulina en bolo**».
- 25 [0137] Por «**desB30**» o «**B(1-29)**» se entiende una cadena B de insulina o un análogo de ésta que no tiene el residuo de aminoácido B30. «**A(1-21)**» se refiere la cadena de una insulina natural o a un análogo de esta. El péptido C y su secuencia de aminoácidos se indican en el código de tres letras del aminoácido. La insulina humana DesB30, desB29 es una insulina humana carente de B29 y B30.
- 30 [0138] Por «**B1**», «**A1**», etc. se entiende el residuo de aminoácido en la posición 1 en la cadena B de la insulina (contado desde el extremo N-terminal) y el residuo de aminoácido en la posición 1 de la cadena A de la insulina (contado desde extremo N-terminal), respectivamente. El residuo de aminoácido en una posición específica también puede denominarse como, por ejemplo, Phe^{B1} , que significa que el residuo de aminoácido en la posición B1 es un residuo de fenilalanina.
- 35 [0139] Por «**análogo de insulina**», tal como se utiliza en este caso, se entiende un polipéptido que tiene una estructura molecular que formalmente puede derivarse de la estructura de una insulina de origen natural; por ejemplo, del que se elimine y/o cambie al menos un residuo de aminoácido en la insulina de origen natural y/o se añada al menos un residuo de aminoácido.
- 40 [0140] Los residuos de aminoácidos cambiados y/o añadidos pueden ser residuos de aminoácidos codificables u otros residuos de origen natural, o residuos de aminoácidos puramente sintéticos. Los análogos de insulina que se encuentran en la posición 28 de la cadena B pueden modificarse del residuo de Pro natural a uno de Asp, Lys, o Ile. En otro aspecto, el Lys en posición B29 se modifica a Pro. En un aspecto, B30 puede ser Lys y luego B29 puede ser cualquier aminoácido codificable excepto Cys, Met, Arg y Lys.
- 45 [0141] También, el Asn en la posición A21 se puede modificar a Ala, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, en particular a Gly, Ala, Ser, o Thr y preferiblemente a Gly. Además, el Asn en la posición B3 se puede modificar a Lys o Asp. Más ejemplos de análogos de insulina son insulina humana desB30; análogos de insulina humana desB30; análogos de insulina en los que PheB1 ha sido eliminado; análogos de insulina en los que la cadena A y/o la cadena B tienen una extensión N-terminal y análogos de insulina en los que la cadena A y/o la cadena B tienen una extensión C-terminal. De este modo, uno o dos Arg se puede añadir a la posición B1 o a la posición B30.
- 50 [0142] En un aspecto, un análogo de insulina contiene menos de 6 modificaciones (sustituciones, delecciones, adiciones) en relación al péptido nativo. En otro aspecto, un analógico comprende menos de 5 modificaciones (sustituciones, delecciones, adiciones) en relación al péptido nativo. En otro aspecto, un analógico contiene menos de 4 modificaciones (sustituciones, delecciones, adiciones) en relación al péptido nativo. En otro aspecto, un analógico contiene menos de 3 modificaciones (sustituciones, delecciones, adiciones) en relación al péptido nativo. En otro aspecto, un analógico contiene menos de 2 modificaciones (sustituciones, delecciones, adiciones) en relación al péptido nativo. En otro aspecto,

un analógico contiene sólo una única modificación (sustituciones, delecciones, adiciones) en relación al péptido nativo.

5 [0143] Por «**derivado de insulina**», tal como se utiliza en este caso, se entiende una insulina de origen natural o un análogo de insulina que ha sido modificado químicamente, por ejemplo, mediante la introducción de una cadena lateral en una o más posiciones de la estructura de la insulina o por oxidación o reducción de los grupos de residuos de aminoácidos en la insulina o por conversión de un grupo libre carboxílico a un grupo de éster o por acilación de un grupo amino libre o un grupo hidroxí.

10 [0144] Por «**insulina acilada**», tal como se utiliza en este caso, se entiende una insulina de origen natural, por ejemplo, de la que una insulina humana, una molécula de insulina, un derivado de insulina o un análogo de insulina han sido modificados químicamente por acilación de un grupo amino libre o de un grupo hidroxí.

15 [0145] El término “sin reducción” tal como se utiliza en este caso, se refiere a cuando una formulación de insulina de acción rápida y de insulina acilada tiene un perfil de acción que es idéntico o considerablemente idéntico al perfil de acción al de cuando se administra la insulina de acción rápida y la insulina acilada en formulaciones separadas.

20 [0146] Los términos «**OAD**» o «**OAD(s)**», tal como se utilizan en este caso, se refieren a un fármaco oral contra la diabetes o a fármacos orales contra la diabetes. Una lista ilimitada de OAD(s) puede ser sulfonilurea (SU), biguanidas, por ejemplo, metformina o tiazolidindionas (TZD).

25 [0147] Las expresiones «**un aminoácido codificable**» o «**residuo de aminoácido codificable**» se utilizan para indicar un aminoácido o un residuo de aminoácido que se puede codificar por un triplete («codón») de nucleótidos.

hGlu es ácido homoglutámico.

25 α-Asp es la forma L de —HNCH(CO—)CH₂COOH.

β-Asp es la forma L de —HNCH(COOH)CH₂CO—.

30 α-Glu es la forma L de —HNCH(CO—)CH₂CH₂COOH.

γ-Glu es la forma L de —HNCH(COOH)CH₂CH₂CO—.

35 α-hGlu es la forma L de —HNCH(CO—)CH₂CH₂CH₂COOH.

δ-hGlu es la forma L de —HNCH(COOH)CH₂CH₂CH₂CO—.

β-Ala es —NH-CH₂-CH₂COOH.

40 Sar es sarcosina (N-metilglicina).

45 [0148] La expresión «**un residuo de aminoácido con un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral**» designa residuos de aminoácidos como Asp, Glu y hGlu. Los aminoácidos pueden estar en la configuración L o D. Si no se especifica nada, se entiende que el residuo de aminoácido está en la configuración L.

50 [0149] La expresión «**un aminoácido con una cadena lateral neutra**» designa residuos de aminoácidos como Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro, Ser, Thr, Cys, Met, Tyr, Asn y Gln.

55 [0150] Cuando se afirma que un derivado de insulina según la invención es «**soluble a valores de pH fisiológico**», esto significa que el derivado de insulina se puede usar para preparar composiciones de insulina inyectables que se disuelven completamente a valores de pH fisiológico. Esta solubilidad favorable puede deberse a las propiedades inherentes del derivado de insulina solo o a un resultado de una interacción favorable entre el derivado de insulina y uno o más componentes contenidos en el medio.

[0151] La expresión «**insulina de peso molecular alto**» o «**hmw**» significa que el peso molecular de un complejo de insulina humana, de un análogo de insulina o de un derivado de insulina está por encima del suero de albúmina humana, por encima de un complejo dodecamérico de un análogo de insulina o de un derivado de insulina o más de 72 kilodalton.

60 [0152] La expresión «**insulina de peso molecular medio**» o «**mmw**» significa que el peso molecular de un complejo de insulina humana, de un análogo de insulina o de un derivado de insulina está por encima del de un hexámero de insulina

o por encima del de un dodecámero de insulina de entre 24 y 80 kilodalton.

[0153] La expresión «**insulina de peso molecular bajo**» o «**lmw**» significa que el peso molecular de una insulina humana, un análogo de insulina o un derivado de insulina está por debajo de 24 kilodalton. La expresión «**carga neta**» se refiere a la carga total de la molécula. A un pH de 7,4, la insulina humana tiene una carga de negativa de alrededor de -3 o cuando forma un hexámero de alrededor de -2,5 por monómero de insulina.

[0154] Las siguientes abreviaturas se han usado en la especificación. Estos son algunos ejemplos:

hGlu	ácido homoglutámico
Sar	sarcosina (N-metilglicina)
S.c.	subcutáneo
Acil ins	insulina acilada
Ins	insulina

10

[0155] Todos los encabezamientos y subencabezamientos se usan aquí sólo por conveniencia y no deberían interpretarse de modo que limite la invención de ninguna manera.

15 [0156] El uso de cualquier ejemplo o de todos, o el lenguaje de los ejemplos (p. ej., «como») de este documento, tiene como único objetivo aclarar mejor la invención y no plantea ninguna limitación en el ámbito de la invención a menos que se especifique lo contrario. Ningún lenguaje en la especificación debería ser interpretado para indicar cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

20 [0157] La citación e incorporación de los documentos de la patente se han hecho aquí sólo por conveniencia y no refleja ninguna vista de la validez, patentabilidad y/o ejecutabilidad de tales documentos de la patente.

[0158] Esta invención incluye todas modificaciones y equivalentes del objeto nombradas en las reivindicaciones anexas a este documento como permitidas por ley aplicable.

25

EJEMPLOS

30 Ejemplo 1

[0159]

35 **A:** 600 μ M de insulina aspartato, 3 Zn/6 insulina, 1,6% de glicerol, 16 mM de fenol y 16 mM de m-cresol, 7 mM de trishidroximetilaminometano, 10 mM de NaCl, pH 7,5 y volumen de 8 ml:

40 31 mg de insulina aspartato se suspendieron en 2 ml de agua y se añadió 30 μ L de 1 N HCl para obtener una solución. Despues, se añadió 240 μ L de 10 mM Zn(AcO)₂ seguido de 3200 μ L de glicerol al 4%, 400 μ L de 0,32 M fenol, 800 μ L de m-cresol, 560 μ L de 0,1 M trishidroximetilaminometano, 160 μ L de 0,5 M NaCl y se ajustó luego el pH a 7,5 con 1 N NaOH y finalmente el volumen se ajustó a 8 ml mediante agua. La solución se filtró a través de un filtro estéril de 0,22 μ m

45 **B:** 1200 μ M de insulina humana LysB29N ϵ -hexadecanedioil- γ -Glu desB30, 3 Zn/6ins, 1,6% de glicerol, 16 mM de fenol y 16 mM de m-cresol, 7 mM de trishidroximetilaminometano, 10 mM de NaCl, pH 7,5 y volumen de 7 ml:

50 58 mg de insulina humana LysB29N ϵ -hexadecanedioil- γ -Glu desB30 se suspendieron y disolvieron en 2 ml de agua y después se añadió 420 μ L de 10 mM Zn(AcO)₂, 2800 μ L de glicerol al 4%, 350 μ L de 0,32 M fenol, 700 μ L de m-cresol, 490 μ L de 0,1 M trishidroximetilaminometano, 140 μ L de 0,5 M NaCl y finalmente se añade 1 N NaOH ajustando al pH 7,5 y agua para obtener 7 ml. La solución se filtró a través de un filtro estéril de 0,22 μ m.

55 **C:** 600 μ M de insulina aspartato, 4 Zn/6ins, 1,6% de glicerol, 16 mM de fenol y 16 mM de m-cresol, 7 mM de trishidroximetilaminometano, 10 mM de NaCl, pH 7,5 y volumen de 15 ml:

La formulación se preparó de manera análoga a la formulación **A**.

55

D: 1200 μ M de insulina humana LysB29N ϵ -hexadecanediol- γ -Glu desB30, 4 Zn/6ins, 1,6% de glicerol, 16 mM de

fenol y 16 mM de m-cresol, 7 mM de trishidroximetilaminometano, 10 mM de NaCl, pH 7,5 y volumen de 20 ml: La formulación se preparó de manera análoga a la formulación B.

5 **E:** 600 μ M de insulina aspartato, 6 Zn/6ins, 1,6% de glicerol, 16 mM de fenol y 16 mM de m-cresol, 7 mM de trishidroximetilaminometano, 10 mM de NaCl, pH 7,5:

La formulación fue preparada como **C** y añadiendo al final 20 μ L de 10 mM Zn(AcO)₂ por ml y se ajustó el pH a 7,5.

10 **F:** 1200 μ M de insulina humana LysB29N ϵ -hexadecanediol- γ -Glu desB30, 6 Zn/6ins, 1,6% glicerol, 16 mM fenol y 16 mM m-cresol, 7 mM de trishidroximetilaminometano, 10 mM de NaCl, pH 7,5:

La formulación se preparó como **D** y añadiendo al final 40 μ L de Zn(AcO)₂ 10 mM por ml y se ajustó el pH a 7,5.

15 **G:** 600 μ M de insulina aspartato, 8 Zn/6ins, 1,6% de glicerol, 16 mM de fenol y 16 mM de m-cresol, 7 mM de trishidroximetilaminometano, 10 mM de NaCl, pH 7,5:

La formulación se preparó como **C** y añadiendo al final 40 μ L de 10 mM Zn(AcO)₂ por ml y se ajustó el pH a 7,5.

20 **H:** 1200 μ M de insulina aspartato, 8 Zn/6ins, 1,6% de glicerol, 16 mM de fenol y 16 mM de m-cresol, 7 mM de trishidroximetilaminometano, 10 mM de NaCl, pH 7,5:

La formulación se preparó como **D** y añadiendo al final 80 μ L de Zn(AcO)₂ 10 mM por ml y se ajustó el pH a 7,5.

25 [0160] Medio: 1,6% de glicerol, 16 mM de fenol y 16 mM de m-cresol, trishidroximetilaminometano 7 mM, NaCl 10 mM, pH 7,5:

30 [0161] Formulaciones de 600 μ M de insulina humana LysB29N ϵ -hexadecanediol- γ -Glu desB30 y Zn/6 acil-ins que varían en 3, 4, 6, y 8 se obtuvieron al diluir las formulaciones B, D, F, y H mencionadas anteriormente con la misma cantidad de medio. Las formulaciones se evaluaron por cromatografía de exclusión por tamaño para la capacidad de formar insulina de peso molecular alto en una columna de Superose 6HR eluido con NaCl 140 mM, trishidroximetilaminometano 10 mM, pH 7,4, y NaN₃ 0,01% a 37 °C y 0,25 ml/min. Se recogieron fracciones cada 4 minutos empezando en el límite de exclusión de peso molecular alto y terminando con el último valor máximo de monómero, en total 14 fracciones. La concentración de fracción de análogo de insulina se calculó específicamente por cromatografía de fase inversa y la concentración de zinc después de añadir el quelante de zinc cromofórico terpi con un exceso de pH de 2,5 (fig. 3,4,5 y 6). La cantidad relativa de insulina humana LysB29N ϵ -hexadecanediol- γ -Glu desB30 con un tamaño mayor que el de la albúmina (fracción [1-8]) fue medida a 3, 4, 6, y 8 Zn/6 insulina a 67,4, 88,9, 98,0, y 97,9 % respectivamente. Además, la concentración de zinc siguió a la de la insulina humana LysB29N ϵ -hexadecanediol- γ -Glu desB30, especialmente en las fracciones de tamaño molecular alto.

35 [0162] Formulación que consiste en 600 μ M de insulina aspartato (A y E) que varía entre 3 y 6 zinc/insulina eluido como monómero (fracción[12-13]) seguido únicamente por una parte menor del zinc añadido, ver figuras 1-2.

45 **Mezcla de un análogo de insulina y una insulina acilada**

50 [0163] Formulaciones que consisten en 180 μ M de insulina aspartato y 420 μ M de insulina humana LysB29N ϵ -hexadecanediol- γ -Glu desB30 y la concentración de zinc que varía entre 3, 6, y 8 Zn/6 insulina se obtuvieron mediante la mezcla de la solución madre anterior de A a H y el medio mencionado en una manera análoga. Un ejemplo de un cálculo de la concentración de zinc/6 insulina acilada es mezclar 180 μ M de aspartato con 3 Zn/6insulina y 420 μ M de insulina humana LysB29N ϵ -hexadecanediol- γ -Glu desB30 con 3 Zn/6acil-ins que da 4,3 Zn/6 insulina acilada [(180*3+420*3)/420= 4,3 Zn/acil-ins]. Las formulaciones fueron evaluadas por cromatografía de exclusión por tamaño para la insulina de peso molecular alto para la capacidad de formar insulina de peso molecular alto en una columna Superose 6HR. También se recogieron fracciones de forma similar para cuantificar los análogos de insulina y el zinc.

55 Como se ve en la figura 8, los análogos mezclados con 3 Zn/6insulina correspondiente a una formulación de 4,3 Zn/6 insulina acilada mostraron predominantemente insulina humana LysB29N ϵ -hexadecanediol- γ -Glu desB30 (72,5 % de insulina humana LysB29N ϵ -hexadecanediol- γ -Glu desB30) y zinc en las fracciones de peso molecular alto [1-8], pero también insulina aspartato, mientras que una cantidad igual de insulina aspartato e insulina humana LysB29N ϵ -hexadecanediol- γ -Glu desB30 se midió como media en el resto de las fracciones [9-14](fig.8). El ensayo de insulina aspartato e insulina humana LysB29N ϵ -hexadecanediol- γ -Glu desB30 que consiste en 6 Zn/6ins se muestra en las fig. 2 y fig.5 respectivamente. Al mezclar las dos formulaciones de 6 Zn/6ins (fig 2. y fig.5) a 180 μ M de aspartato + 420 μ M de

insulina humana LysB29Nε-hexadecanediol-γ-Glu desB30 correspondiente a 8,6 Zn/6acil-ins mostró una fracción completamente separada de insulina humana LysB29Nε-hexadecanediol-γ-Glu desB30 a un peso molecular alto e insulina aspartato a peso molecular bajo (fig. 10). Al mezclar a igual concentración de insulina aspartato e insulina humana LysB29Nε-hexadecanediol-γ-Glu desB30 a 12 Zn/6acil-ins mostró fracciones separadas también (fig.12).
 5 Además, concentraciones aumentadas de zinc a 8 Zn/6ins en las formulaciones individuales se muestra para insulina humana LysB29Nε-hexadecanediol-γ-Glu desB30 en la fig. 6 y la mezcla de 180 μM de aspartato + 420 μM de insulina humana LysB29Nε-hexadecanediol-γ-Glu desB30 en la fig.11.

10 [0164] Como queda claro a partir de las figuras, la cantidad aumentada de zinc sorprendentemente induce una separación de la insulina aspartato y de la insulina humana LysB29Nε-hexadecanediol-γ-Glu desB30 en la preparación farmacéutica, dando como resultado ninguna reducción significativa entre los análogos.
 Una cantidad aumentada de zinc induce una separación de insulina aspartato e insulina humana LysB29Nε-hexadecanediol-γ-Glu desB30 en la preparación farmacéutica de manera que los análogos mostrados en realidad no muestran ninguna reducción.
 15

EJEMPLO 2

2A: 3 Zn/6 insulina acilada añadida antes del fenol y del m-cresol

[0165] 600 μM de insulina humana LysB29Nε-hexadecanediol-γ-Glu desB30, 3 Zn/6insulina, 1,6% de glicerol, 16 mM de fenol y 16 mM de m-cresol, 20 mM de NaCl , 7 mM de fosfato, pH 7,5, 1,5 μCi de trazador de insulina humana ¹²⁵I-Tyr^{A14}-LysB29Nε-hexadecanediol-γ-Glu desB30 y volumen de 2 ml.

25 [0166] 8,2 mg de insulina humana LysB29Nε-hexadecanediol-γ-Glu desB30 se disolvieron en 400 μL de agua y se añadió 3 μCi de trazador de insulina humana ¹²⁵I-Tyr^{A14}-LysB29Nε-hexadecanediol-γ-Glu desB30, seguido de 800 μL de glicerol al 4% y se trató durante 10-15 min en un centrifugador de vacío para eliminar el etanol añadido incluido en la solución del trazador. Se añadieron 60 μL de 10 mM Zn(AcO)₂ y con 2 minutos de intervalo seguido de 100 μL de 0,32 M fenol, 200 μL de 0,16 M m-cresol, 80 μL de 0,5 M NaCl, y 140 μL de 0,1 M fosfato sódico y se ajustó el pH a 7,5 mM y un volumen total de 2 ml. La solución se filtró a través de un filtro estéril de 0,22 μm y se usó para un estudio de desaparición después inyección subcutánea en el cerdo. T_{50%} ±SEM(h) se determinó a 9,6 ± 0,7 h como se describió bajo un ensayo por medio del estudio de los ejemplos de formulación del 2A a 2D.

2B: 3 Zn/6 insulina acilada añadida antes y 3 Zn/6 insulina acilada añadida después del fenol y del m-cresol

[0167] 600 μM de insulina humana LysB29Nε-hexadecanediol-γ-Glu desB30, 3 Zn/6 insulina acilada añadida antes y 3 Zn/6 insulina acilada añadida después, 1,6% de glicerol, 16 mM de fenol y 16 mM de m-cresol, 20 mM de NaCl , 7 mM de fosfato, pH 7,5, 1,5 μCi de trazador de insulina humana Iodine-¹²⁵I-Tyr^{A14}-LysB29Nε-hexadecanediol-γ-Glu desB30 y volumen de 2 ml.

45 [0168] 8,2 mg de insulina humana LysB29Nε-hexadecanediol-γ-Glu desB30 se disolvió en 400 μL de agua y se añadió 3 μCi de trazador de insulina humana ¹²⁵I-Tyr^{A14}-LysB29Nε-hexadecanediol-γ-Glu desB30, seguido de 800 μL de glicerol 4 % y se trató durante 10-15 min en una centrifugadora de vacío para eliminar el etanol añadido incluido en la solución del trazador. 60 μL de Zn(AcO)₂ 10 mM se añadió y con 2 minutos intervalo seguido de 100 μL de 0,32 M fenol, 200 μL de 0,16 M m-cresol, 60 μL de 10 mM Zn(AcO)₂, 80 μL de 0,5 M NaCl y 140 μL de 0,1 M fosfato de sodio y se ajustó el pH a 7,5 mM y un volumen total de 2 ml. La solución se filtró a través de un filtro estéril 0,22 μm y se usó para un estudio de desaparición después de inyección subcutánea en el cerdo. T_{50%} ±SEM (h) se determinó a 11,9 ± 1,0 h como se describió bajo ensayo por medio del estudio los ejemplos de formulación del 2A a 2D.

2C: 3 Zn/6 insulina acilada añadida antes y 3 Zn/6 insulina acilada después del fenol y del m-cresol y no incluye tampón

55 [0169] 600 μM de insulina humana LysB29Nε-hexadecanediol-γ-Glu desB30, 3 Zn/6 insulina acilada añadida antes y 3 Zn/6 insulina acilada añadida después, 1,6% de glicerol, 16 mM de fenol y 16 mM de m-cresol, NaCl 20 mM, pH 7,5, 1,5 μCi de trazador de insulina humana ¹²⁵I-Tyr^{A14}-LysB29Nε-hexadecanediol-γ-Glu desB30 y volumen de 2 ml.
 60 [0170] 8,2 mg de insulina humana LysB29Nε-hexadecanediol-γ-Glu desB30 se disolvieron en 400 μL de agua y 3 μCi de trazador de insulina humana ¹²⁵I-Tyr^{A14}-LysB29Nε-hexadecanediol-γ-Glu desB30 se añadió, seguido de 800 μL de glicerol

4 % y se trató durante 10-15 min en un centrifugador de vacío para eliminar el etanol añadido incluido en la solución del trazador. 60 μ L de $Zn(AcO)_2$ 10 mM se añadió y con 2 minutos intervalo le siguió 100 μ L de fenol 0,32 M, 200 μ L de 0,16 M m-cresol, 60 μ L de 10 mM $Zn(AcO)^2$, 80 μ L de 0,5 M NaCl y se ajustó el pH a 7,5 mM. La solución se filtró a través de un filtro estéril 0,22 μ m y se usó para un estudio de desaparición después de inyección subcutánea en el cerdo. $T_{50\%} \pm SEM$ (h) se determinó a $14,4 \pm 2,4$ h como se describió bajo ensayo por medio del estudio los ejemplos de formulación del 2A a 2D.

2D: 6 Zn/6 insulina acilada añadida después del fenol y del m-cresol y no incluye tampón

[0171] 600 μ M de insulina humana LysB29N ϵ -hexadecanediol- γ -Glu desB30, 6 Zn/6 insulina acilada añadida después, 1,6% de glicerol, 16 mM de fenol y 16 mM de m-cresol, 20 mM de NaCl, 7 mM de fosfato, pH 7,5, 1,5 μ Ci de trazador de insulina humana $^{125}ITir^{A14}$ -LysB29N ϵ -hexadecanediol- γ -Glu desB30 y volumen de 2 ml.

[0172] 8,2 mg de insulina humana LysB29N ϵ -hexadecanediol- γ -Glu desB30 se disolvieron en 400 μ L de agua y 3 μ Ci de trazador de insulina humana $^{125}ITir^{A14}$ -LysB29N ϵ -hexadecanediol- γ -Glu desB30 se añadió, seguido de 800 μ L de glicerol 4 % y se trató durante 10-15 min en un centrifugador de vacío para eliminar del etanol añadido incluido en la solución del trazador. 100 μ L de fenol 0,32 M se añadió y con 2 minutos intervalo le siguió 200 μ L de 0,16 M m-cresol, 120 μ L de 10 mM $Zn(AcO)_2$, 80 μ L de 0,5 M NaCl y se ajustó el pH a 7,5 mM y un volumen total de 2 ml. La solución se filtró a través de un filtro estéril de 0,22 μ m y se usó para un estudio de desaparición después de inyección subcutánea en el cerdo. $T_{50\%} \pm SEM$ (h) se determinó a $13,5 \pm 1,7$ h como se describió bajo ensayo por medio del estudio los ejemplos de formulación del 2A a 2D.

EJEMPLO 3

Aislamiento de insulina humana LysB29N ϵ -hexadecanediol- γ -Glu desB30 por cristalización

[0173] La insulina humana LysB29N ϵ -hexadecanediol- γ -Glu desB30 se puede cristalizar como un hexámero con un contenido de zinc de 2-6 moles de zinc por 6 moles de insulina y un exceso de una molécula tipo fenol (preferiblemente fenol). Como precipitantes, las sales iónicas se usan preferiblemente con NaCl. Además, la cristalización se puede mejorar añadiendo cantidades pequeñas de solventes orgánicos (etanol).

Preparación de una solución de proteína (solución A):

[0174] 40,5 mg de insulina humana LysB29N ϵ -hexadecanediol- γ -Glu desB30 liofilizada se suspenden en 4 ml de tampón trishidroximetilaminometano de 0,02 mol/l (ajustada a pH 7,0 con HCl).

[0175] Para 1,8 ml de esta solución de insulina humana LysB29N ϵ -hexadecanediol- γ -Glu desB30 se añade 69,5 μ l de una solución que contiene 0,010 mol/l de $Zn(OAc)_2$ en el agua y 18 μ l de una solución con 2 mol/l de fenol en el etanol.

Preparación de la solución de precipitantes (solución B):

[0176] A 5 ml de una solución con trishidroximetilaminometano 0,1M (ajustada a pH 7,5 con HCl) se añaden 1,75 g de NaCl y 1 ml de etanol y el volumen final se ajusta a 10 ml.

Cristalización:

[0177] Cantidad iguales (normalmente 500 μ l) de solución A y solución B se mezclan en un vial de cristal. La cristalización se completa después de 12 h a temperatura ambiente y los cristales resultantes se pueden aislar por filtración o centrifugado.

EJEMPLO 4

Formulación:

5 [0178] Insulina humana LysB29Nε-hexadecanediol-γ-Glu desB30 (a 600 μM) se suspendió en el agua y se disolvió mediante la adición de hidróxido de sodio, y luego se añadió en el siguiente orden: glicerol al 1,6%, 16 mM de fenol y 16 mM de m-cresol, acetato de zinc de 0 a 6 Zn/6ins, cloruro sódico 10 mM, fosfato 7 mM, pH 7,5 y agua para ajustar el volumen.

Método CET:

10 [0179] Análisis por cromatografía de exclusión por tamaño (CET) en una columna de Superose 6 PC (0,32*30 cm) con solución salina tamponada con Tris isotónica 10 mM opcionalmente se añade fenol 2 mM a 37 °C y pH 7,3, volumen de inyección de 20 μL, flujo de 0,05 ml/min y tiempo total 130 min. Primera referencia de azul dextrano (» 5 MDa, K_{AV} 0,0), tiroglobulina (669 kDa, K_{AV} 0,28), ferritina.

15 [0180] (440 kDa, K_{AV} 0,39), ovoalbúmina (44,5 kDa, K_{AV} 0,56), ribonucleasa (13,7 kDa, K_{AV} 0,69) y una segunda referencia de albúmina (66 kDa, K_{AV} 0,53), Co(III)insulina-hexámero (35 kDa, K_{AV} 0,61), e insulina monomérica X2 (6 kDa, K_{AV} 0,73). El tiempo de retención del azul dextrano fue 17,9 min (a) y 0,74 min sin columna (t_d) y el tiempo de retención de la albúmina (HSA) fue aproximadamente 34,1 min,

20
$$K_{AV} = (t - t_0) / (V/f + t_d - t_0) \text{ con}$$

t: tiempo de retención (min)

t_0 : tiempo de retención del azul dextrano (límite de exclusión)

25 t_d : tiempo de retención del azul dextrano sin columna (volumen vacío)

V_t : volumen de columna total (ml)

30 f: flujo (ml/min)

[0181] Formato de los datos:

K_{AV} pico1	x,xx
Área pico1 (%)	xxx
K_{AV} pico2	x,xx
Área pico2 (%)	xxx

35

[0182] K_{AV} área del pico1 se mide de K_{AV} =0 a K_{AV} =0,46 (32 min) como % de área relativa del área total para $K_{AV} < 0,46$ correspondiendo a una autoasociación mayor que la albúmina. Para K_{AV} pico1 aproximadamente 0,56 (tamaño de albúmina) corte de integración entre tamaño de albúmina y tamaño de hexámero de insulina.

40

Método CET para mezclar un derivado de insulina aspartato de larga acción por medio de detección específica de picos fracciones:

45 [0183] Miscibilidad de insulina aspartato (3Zn/6ins) y derivado de insulina de acción prolongada 50:50, medido por fracciones colectoras de CET y cuantificado por HPLC la presencia de insulinas de acción rápida y de acción prolongada en la fracción de peso molecular alto (peak1) y en la fracción de peso molecular bajo (peak2). Al corte de fracción sigue el corte de integración mencionado anteriormente.

50 [0184] Para el método CET sin fenol en el pico1 del eluyente comprende formas asociadas mayores que la albúmina y el pico2 contiene formas de insulina dihexámericas, hexaméricas, diméricas y monoméricas.

[0185] Para el método CET que incluye fenol 2 mM en el pico1 del eluyente contiene formas dihexaméricas y otras formas más grandes de insulina y el pico2 contiene, formas hexaméricas, diméricas y monoméricas de insulina.

55

[0186] Detección específica de derivado de insulina e insulina aspartato por cromatografía de fase reversa de HPLC en un Zorbax Eclipse XDB-C18 2,1*15 mm (1,8 μm) gradiente eluido con A: 0,2 M de sulfato de sodio, 0,04 M de fosfato de

sodio, acetonitrilo al 10%, pH 7,2 y **B**: acetronitrilo al 70% a 30 °C, 19- 34 % B en 4,5 min., inesperada condición inicial a 5 min., tiempo total 7 min., flujo de 0,5 ml/min., volumen de inyección de 14 µL y detección UV a 276 nm usando material de referencia de insulina aspartato para ambos análogos.

5 [0187] Formato de los datos:

Área derivado de insulina pico1 (%)	xxx
Área insulina aspartato pico2 (%)	xxx

Resultados:

10 [0188]

Tabla 1

Formulación: disolución neutra de insulina, 1,6% de glicerol, 16 mM de fenol y 16 mM de m- cresol, con adición de zinc, 10 mM de cloruro sódico, 7 mM de fosfato, pH 7,5	Eluyente CET	Kav pico1	% Área pico1 relativo	Kav pico2	% Área pico2 relativa
600 µM de insulina B29Nε- hexadecanediol- γ-Glu desB30 0 Zn/6ins	Sin fenol	-	1	0,73	99
600 µM de insulina B29Nε- hexadecanediol- γ-Glu desB30 1 Zn/6ins	Sin fenol	0,11	25	0,73	75
600 µM de insulina B29Nε- hexadecanediol- γ-Glu desB30 2 Zn/6ins	Sin fenol	0,08	48	0,73	52
600 µM de insulina B29Nε- hexadecanediol- γ-Glu desB30 3 Zn/6ins	Sin fenol	0,07	69	0,73	31
600 µM de insulina B29Nε- hexadecanediol- γ-Glu desB30 4 Zn/6ins	Sin fenol	0,06	86	0,74	14
600 µM de insulina B29Nε- hexadecanediol- γ-Glu desB30 5 Zn/6ins	Sin fenol	0,01	93	0,74	7
600 µM de insulina B29Nε- hexadecanediol-	Sin fenol	0,00	96	0,74	4

γ -Glu desB30 6 Zn/6ins					
600 μ M de insulina B29N ϵ - hexadecanediol- γ -Glu desB30 0 Zn/6ins	Fenol 2 mM	0,54	17	0,72	83
600 μ M de insulina B29N ϵ - hexadecanediol- γ -Glu desB30 1 Zn/6ins	Fenol 2 mM	0,54	56	0,73	44
600 μ M de insulina B29N ϵ - hexadecanediol- γ -Glu desB30 2 Zn/6ins	Fenol 2 mM	0,54	85	0,73	15
600 μ M de insulina B29N ϵ - hexadecanediol- γ -Glu desB30 3 Zn/6ins	Fenol 2 mM	0,54	94	0,73	6
600 μ M de insulina B29N ϵ - hexadecanediol- γ -Glu desB30 4 Zn/6ins	Fenol 2 mM	0,54	97	-	3
600 μ M de insulina B29N ϵ - hexadecanediol- γ -Glu desB30 5 Zn/6ins	Fenol 2 mM	0,54	98	-	2
600 μ M de insulina B29N ϵ - hexadecanediol- γ -Glu desB30 6 Zn/6ins	Fenol 2 mM	0,54	98	-	2
600 μ M de insulina B29N ϵ - hexadecanediol- γ -Glu desB30 0 Zn/6ins mezclada con 600 μ M de insulina aspartato 3 Zn/6ins 1:1	Sin fenol	0,33	Deriv. 33	0,73	Aspartato 94
600 μ M de insulina B29N ϵ - hexadecanediol- γ -Glu desB30 1 Zn/6ins mezclada con 600 μ M de insulina aspartato 3 Zn/6ins 1:1	Sin fenol	0,41	Deriv. 34	0,74	Aspartato 89
600 μ M de insulina B29N ϵ - hexadecanediol-	Sin fenol	0,41	Deriv. 39	0,74	Aspartato 91

γ -Glu desB30 2 Zn/6ins mezclada con 600 μ M de insulina aspartato 3 Zn/6ins 1:1					
600 μ M de insulina B29N ϵ - hexadecanediol- γ -Glu desB30 3 Zn/6ins mezclada con 600 μ M de insulina aspartato 3 Zn/6ins 1:1	Sin fenol	0,01	Deriv. 89	0,74	Aspartato 98
600 μ M de insulina B29N ϵ - hexadecanediol- γ -Glu desB30 4 Zn/6ins mezclada con 600 μ M de insulina aspartato 3 Zn/6ins 1:1	Sin fenol	0,00	Deriv. 98	0,73	Aspartato 100
600 μ M de insulina B29N ϵ - hexadecanediol- γ -Glu desB30 5 Zn/6ins mezclada con 600 μ M de insulina aspartato 3 Zn/6ins 1:1	Sin fenol	0,00	Deriv. 98	0,73	Aspartato 100
600 μ M de insulina B29N ϵ - hexadecanediol- γ -Glu desB30 6 Zn/6ins mezclada con 600 μ M de insulina aspartato 3 Zn/6ins 1:1	Sin fenol	0,00	Deriv. 97	0,73	Aspartato 100
B29N ϵ - hexadecanediol- γ -Glu desB30	Fenol 2		Deriv.		Aspartato
600 μ M de insulina, 0 Zn/6ins mezclado con 600 μ M de insulina aspartato, 3 Zn/6ins 1:1	mM	0,55	71	0,73	77
600 μ M de insulina B29N ϵ - hexadecanediol-	Fenol 2 mM	0,55	Deriv. 80	0,73	Aspartato 69

γ -Glu desB30 1 Zn/6ins mezclada con 600 μ M de insulina aspartato 3 Zn/6ins 1:1					
600 μ M de insulina B29N ϵ - hexadecanediol- γ -Glu desB30 2 Zn/6ins mezclada con 600 μ M de insulina aspartato 3 Zn/6ins 1:1	Fenol 2 mM	0,55	Deriv. 88	0,73	Aspartato 57
600 μ M de insulina B29N ϵ - hexadecanediol- γ -Glu desB30 3 Zn/6ins mezclada con 600 μ M de insulina aspartato 3 Zn/6ins 1:1	Fenol 2mM	0,55 91	Deriv.	0,72	Aspartato 73
600 μ M de insulina B29N ϵ - hexadecanediol- γ -Glu desB30 4 Zn/6ins mezclada con 600 μ M de insulina aspartato 3 Zn/6ins 1:1	Fenol 2mM	0,54	Deriv. 98	0,67	Aspartato 99
600 μ M de insulina B29N ϵ - hexadecanediol- γ -Glu desB30 5 Zn/6ins mezclada con 600 μ M de insulina aspartato 3 Zn/6ins 1:1	Fenol 2 mM	0,54	Deriv. 98	0,66	Aspartato 99
600 μ M de insulina B29N ϵ - hexadecanediol- γ -Glu desB30 6 Zn/6ins mezclada con 600 μ M de insulina aspartato 3 Zn/6ins 1:1	Fenol 2 mM	0,54	Deriv. 98	0,66	Aspartato 99

[0189] **Conclusión:** CET (Cromatografía de exclusión de tamaño) usando eluyente de solución salina isotónica a temperatura corporal se usa como modelo para la autoasociación de la insulina después de la inyección en el tejido subcutáneo cuando los conservantes fenólicos han desaparecido. Al incluir fenol en el eluyente la CET valora el estado

de autoasociación de la insulina en la formulación farmacéutica y, en resumen, sobre la inyección.

[0190] 600 μ M de insulina B29N ϵ -hexadecanediol- γ -Glu desB30 se formuló con concentraciones de zinc en aumento gradual de 0 a 6 Zn/6ins, y el método CET mostró auto-asociación a peso molecular muy alto y más que en la albúmina humana en más de 90%, cuando la concentración de zinc era 5 Zn/6ins. Al incluir fenol en el eluyente, la CET se apreciaron dos picos destacados, a tamaño de dihexámero de insulina y a tamaño de monómero de insulina, y a 4 Zn/6ins más de un 95 % era a tamaño de dihexámero.

[0191] Todas las formulaciones se mezclaron con insulina aspartato (3 Zn/6ins) a igual concentración y volumen y el contenido de los picos recogidos se analizaron específicamente. A 4 Zn/6ins más del 95% de insulina B29N ϵ -hexadecanediol- γ -Glu desB30 se encontró a peso molecular muy alto y más del 95% de aspartato se encontró a tamaño de monómero. Al incluir el fenol en el eluyente mostró dos picos, a tamaño de dihexámero de insulina y a tamaño de monómero de insulina, y a 4 Zn/6ins más del 95 % de la insulina de acción prolongada era de tamaño de un dihexámero separado de más del 95% de insulina aspartato centrada entre tamaño de monómero y de hexámero.

[0192] Ninguna reducción de la mezcla de formulación equimolar se vio cuando la formulación del análogo de acción prolongada comprendía menos de un 5% de la forma monomérica.

20 Ejemplo 5

[0193] Miscibilidad de la insulina B29N ϵ -hexadecanediol- γ -Glu desB30 con insulina aspartato: Estudios de clamp euglicémico en cerdos

25

Formulación

[0194] Insulina humana LysB29N ϵ -hexadecanediol- γ -Glu desB30 (der.ins.)(a 1200 μ M) se suspendió en agua, se disolvió y se añadió 1,6% de glicerol, y 16 mM de fenol y 16 mM de m-cresol. Antes de añadir zinc se ajustó el pH a 7,5 con hidróxido de sodio, y se añadió acetato de zinc en partes más pequeñas de un máximo de 1 Zn/6ins hasta 3 Zn/6ins (ad I), para 5,62 Zn/6ins (ad II), y a 6 Zn/6ins (III). Luego se añadió cloruro de sodio 10 mM, después se ajustó el pH a 7,5 con hidróxido de sodio, y se ajustó el volumen por agua.

[0195] Insulina aspartato (a 600 μ M) se suspendió en agua y se añadió ácido clorhídrico sobre un pH de 2,5, acetato de zinc a 3 Zn/6ins, 1,6% de glicerol, 16 mM de fenol y 16 mM de m-cresol a cloruro de sodio 10 mM, pH 7,5 y agua a volumen final (IV).

[0196] Finalmente, la insulina aspartato (IV) se mezcló con insulina humana LysB29N ϵ -hexadecanediol- γ -Glu desB30 en la relación molar de 1:8 y concentración total de zinc de 3,38 Zn/6deriv.ins.(I)(mezclaZnbaja) y 6 Zn/6deriv.ins.(II)(mezclaZnalta).

Experimento animal

45

[0197] Cerdos hembra (N=8, significa masa corporal 80 kg) se mantuvieron en ayunas 18 horas antes de los estudios. Para investigar el efecto de la mezcla de insulina aspartato y la insulina humana LysB29N ϵ -hexadecanediol- γ -Glu desB30, cada cerdo recibió sc aleatoriamente bien una mezclaZnbaja (I) o una mezclaZnalta (II) o los dos análogos (III y IV) se administraron de manera al mismo cerdo. Las dosis fueron 0,9 nmol/kg de insulina aspartato y 7,2 nmol/kg de insulina humana LysB29N ϵ -hexadecanediol- γ -Glu desB30. Los cerdos se mantuvieron euglicémicos en su niveles de glucosa en ayunas individual por infusión de un 20% de solución de glucosa. Dependiendo de los cambios en la concentración de glucosa en sangre, se hicieron ajustes del índice de glucosa en la infusión empíricamente. Se recogieron muestras de sangre 0-24 h para análisis ELISA de plasma específico de insulina inmunoreactiva, y los perfiles farmacocinéticos se muestran en las fig. 13 y fig. 14.

55

Conclusión

[0198] El grado de reducción de ambos componentes de insulina en las dos preparaciones de la mezcla se examinó. Una reducción marcada de ambas, insulina aspartato e insulina 454, se vio con una concentración baja de zinc en la mezcla (3,38 Zn / 6deriv.ins.). No obstante, cuando la concentración de zinc se aumentó a 6 zinc/6deriv.ins. no se observó ninguna reducción de los perfiles farmacocinéticos. El índice de infusión de glucosa se comparó con la suma de

los perfiles farmacocinéticos de los análogos de insulina individuales.

Ejemplo 6. Citrato como tampón de zinc

[0199] Insulina humana LysB29Nε-hexadecanediol-γ-Glu desB30 (deriv.ins.) (a 600 μM) se suspendió en agua, se disolvió y añadió 1,6% de glicerol, 16 mM de fenol, y m-cresol 16 mM. El pH se ajustó a 7,5 con hidróxido de sodio, y se añadió citrato en tres formulaciones de 0,6, 1,8 y 6 mM respectivamente en relación con acetato de zinc a 6 zinc/6 deriv.ins. Se añadió luego cloruro sódico 10 mM y fosfato de sodio (pH 7,5) a 5 mM, después se ajustó el pH a 7,5 o 7,8 con hidróxido de sodio, y se ajustó el volumen con agua.

[0200] Las formulaciones se estudiaron después de 2 semanas de almacenamiento a 37C en comparación con almacenamiento a 5C por el método CET descrito en el ejemplo 4 en el que se usa un eluyente con 2 mM de fenol. Formulaciones de referencia sin citrato a 3, 5 y 6 Zn/6deriv.ins. se incluyeron.

[0201] Miscibilidad de insulina aspartato (3Zn/6ins) y derivado de insulina de acción prolongada 30:70, como se mide recopilando fracciones de CET y cuantificado mediante HPLC la presencia de insulinas de acción rápida y de acción prolongada en la fracción de peso molecular alto (pico1) y en la fracción de peso molecular bajo (pico2). El corte de fracción y la cantidad está en ejemplo siguiente 4.

Resultados:

[0202]

Tabla 2

Formulación:	Eluyente CET	Kav pico1	% Área pico1 relativo	Kav pico2	% Área pico2 relativo
600 μM de disolución neutra de derivado de insulina, 1,6% de glicerol, fenol 16 mM, m-cresol 16 mM, adición de citrato y zinc, cloruro de sodio 10 mM, fosfato 5 mM, pH 7,5					
Citrato 0,6 mM, 6 Zn/6deriv.ins., almacenamiento 5C	+ Fenol	0,54	97	0,73	3
Citrato 1,8 mM, 6 Zn/6deriv.ins., almacenamiento 5C	+ Fenol	0,54	96	0,73	4
Citrato 6,0 mM, 6 Zn/6deriv.ins., almacenamiento 5C	+ Fenol	0,54	96	0,73	4
Citrato 0 mM, 3 Zn/6deriv.ins., almacenamiento 5C	+ Fenol	0,54	94	0,73	6
Citrato 0 mM, 5 Zn/6deriv.ins., almacenamiento	+ Fenol	0,54	98	0,73	2

5C					
Citrato 0 mM, 6 Zn/6deriv.ins., almacenamiento 5C	+ Fenol	0,54	98	0,73	2
Citrato 0,6 mM, 6 Zn/6deriv.ins., almacenamiento 2 w 37C	+ Fenol	0,54	96	0,73	4
Citrato 1,8 mM, 6 Zn/6deriv.ins., almacenamiento 2 w 37C	+ Fenol	0,54	96	0,73	4
Citrato 6,0 mM, 6 Zn/6deriv.ins., almacenamiento 2 w 37C	+ Fenol	0,54	95	0,73	5
Citrato 0 mM, 3 Zn/6deriv.ins., almacenamiento 2 w 37C	+ Fenol	0,54	93	0,73	7
Citrato 0 mM, 5 Zn/6deriv.ins., almacenamiento 2 w 37C	+ Fenol	0,54	98	0,73	2
Citrato 0 mM, 6 Zn/6deriv.ins., almacenamiento 2 w 37C	+ Fenol	0,54	98	0,73	2
Citrato 0,6 mM, 6 Zn/6deriv.ins., pH 7,8, almacenamiento 2 w 37C	+ Fenol	0,54	96	0,73	4
Citrato 0,6 mM, 6 Zn/6deriv.ins., almacenamiento 5C	+ Fenol	0,54	Deriv. ins. 98	0,73	Ins. aspartato 97
Citrato 1,8 mM, 6 Zn/6deriv.ins., almacenamiento 5C	+ Fenol	0,54	Deriv. ins 97	0,73	Ins. aspartato 98
Citrato 6,0 mM, 6 Zn/6deriv.ins., almacenamiento 5C	+ Fenol	0,54	Deriv. ins 97	0,73	Ins. aspartato 98
Citrato 0 mM, 3 Zn/6deriv.ins., almacenamiento 5C	+ Fenol	0,54	Deriv. ins. 95	0,73	Ins. aspartato 96
Citrato 0 mM, 3 Zn/6deriv.ins., almacenamiento 5C	+ Fenol	0,54	Deriv. ins. 98	0,73	Ins. aspartato 99
Citrato 0 mM, 5 Zn/6deriv.ins., almacenamiento 5C	+ Fenol	0,54	Deriv. ins. 97	0,7	Ins. aspartato 97
Citrato 0,6 mM, 6 Zn/6deriv.ins.,	+ Fenol	0,54	Deriv. ins.	0,73	Ins. aspartato

almacenamiento 5C			97		96
Citrato 1,8 mM, 6 Zn/6deriv.ins., almacenamiento 2w 37C	+ Fenol	0,54	Deriv. ins. 97	0,73	Ins. aspartato 97
Citrato 6,0 mM, 6 Zn/6deriv.ins., almacenamiento 2w 37C	+ Fenol	0,54	Deriv. ins. 96	0,73	Ins. aspartato 97
Citrato 0 mM, 3 Zn/6deriv.ins., almacenamiento 2w 37C	+ Fenol	0,54	Deriv. ins. 93	0,73	Ins. aspartato 79
Citrato 0 mM, 5 Zn/6deriv.ins., almacenamiento 2w 37C	+ Fenol	0,54	Deriv. ins. 98	0,73	Ins. aspartato 97
Citrato 0 mM, 6 Zn/6deriv.ins., almacenamiento 2w 37C	+ Fenol	0,54	Deriv. ins. 98	0,73	Ins. aspartato 96

Conclusión:

[0203] Al usar un eluyente de solución salina isotónica CET que contiene fenol 2 mM, el derivado de insulina de acción prolongada se asocia predominantemente a un tamaño de albúmina correspondiente a una forma dihexamérica (y formas asociadas no mayores), y la cantidad de derivado de insulina en la forma monomérica disminuye a concentración de zinc aumentada de 3 a 5 y 6 Zn/6deriv.ins. La adición de 1, 3 o 10 equivalentes de citrato a la concentración de zinc a 6 Zn/6ins.deriv. mostró menos contenido del derivado de insulina monomérica en comparación con una referencia a 3 Zn/6deriv.ins. El modelo de auto-asociación no cambió después de 2 semanas de almacenamiento a 37 °C.

[0204] Miscibilidad de insulina aspartato (3Zn/6ins) formulada sin citrato y derivado de insulina de acción prolongada formulada como se muestra en la serie anterior a este ejemplo, en proporción molar de 30:70, se muestra en la tabla después de almacenarla a 5 C y 2 semanas a 37 C. Las formulaciones de derivado de insulina que contiene citrato a tres niveles y 6 Zn/6ins mostraron que podían mezclarse con insulina aspartato después de 2 semanas de almacenamiento a 37 C, mientras que la insulina aspartato se incluyó parcialmente en la fracción de peso molecular alto al nivel normal de zinc a 3 Zn/6ins.

20

Ejemplo 7. Se añade citrato de zinc

[0205] Insulina B29N-hexadecanedioil- γ -Glu desB30 (deriv.ins.)(a 600 μ M) se suspende en agua, se disuelve, (si es necesario por adición de hidróxido de sodio), y se añade 1,6% de glicerol, 16 mM de fenol, y 16 mM de m-cresol. El pH se ajusta a 7,5 con hidróxido de sodio, y se añade citrato de zinc a ión de zinc 0.6 mM. Luego se añade cloruro sódico a 10 mM y fosfato de sodio (pH 7,5) a 5 mM por el ajuste de pH a 7,5 y se ajusta el volumen con agua.

30

Ejemplo 8. Un tensioactivo se añade y se mezcla con análogos de acción rápida

[0206] Insulina B29N-hexadecanedioil- γ -Glu desB30 (deriv.ins.)(a 600 μ M) se suspende en agua, se disuelve y se añade 1,6% de glicerol, y 16 mM de fenol y 16 mM de m-cresol. El pH se ajusta a 7,5 con hidróxido de sodio, y acetato de zinc a 6 de zinc/6 deriv.ins. (opcionalmente zinc como citrato). Se añade luego cloruro sódico a 10 mM, un tensioactivo, por ejemplo. poloxámero 188 o polisorbato 20 a aproximadamente 0,002 % y fosfato de sodio (pH 7,5) a 5 mM seguido del ajuste del pH a 7,5 y se ajusta el volumen con agua.

[0207] Insulina aspartato (insulina humana AspB28) o insulina LysPro (insulina humana LysB28ProB29) o insulina glulisina (insulina humana LysB3 GluB29) (todos 600 μ M) se mezclan con Insulina B29N-hexadecanedioil- γ -Glu desB30 formulada según el ejemplo 7 o el ejemplo 8 en una relación molar aproximada entre 3/7 y 7/3.

Ejemplo 9

- 5 [0208] La tabla 3 muestra la CET, medida como se describe en el ejemplo 4 con 2 o 6 Zn(II) por 6 insulinas. Para la preparación de los compuestos mencionados en la tabla, ver los documentos WO2006/082204 y WO2006/082205.

Tabla 3

10

Formulación: disolución neutra de 600 μ M de insulina, 1,6% de glicerol, fenol 16 mM, m-cresol 16 mM, 2 o 6 zinc/hexámero, cloruro de sodio 10 mM, fosfato 7 mM, pH 7,5	Kav Zn pico 1	% Área relativa pico 1	Kav 6 Zn pico 1	% Área relativa pico 1
Insulina humana B29N ϵ -(4-[(2-carboxi-ethyl)-(15-carboxi-pentadecanoil)-amino]-metil)-benzoilo) desB30	0,01	84	0,00	98
Insulina humana B29N ϵ -hexadecandoil-gamma-Glu-(3-(2- { 2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-propionil desB30	0,09	79	0,06	89
Insulina humana B29N ϵ -(4-[(2-Carboxi-ethyl)-(14-carboxi-tetradecanoil)-amino]-methyl)-benzoilo) desB30	0,09	55	0,00	96
Insulina humana B29N ϵ -[(5-[(2-Carboxi-ethyl)-(15-carboxi-pentadecanoil)-amino]-metil)-furan-2-carbonilo) desB30	0,02	81	0,03	96
Insulina humana B29N ϵ -hexadecandoil-gamma-Glu-(4-aminometilo benzoilo) desB30	0,15	48	0,00	97
Insulina humana B29N ϵ -(2-[(2-carboxi-ethyl)-(carboxi-pentadecanoil)-amino]-metil)-benzoilo) desB30	0,16	54	0,03	93

Ejemplo 10

15

Preparación de ácido monobencil éster 1,16-hexadecanedioico

20

[0209] Ácido hexadecanodioico (20,0 g, 69,8 mmol), n-octano y Dowex^R se suspenden y se calienta a refluro. Se añade formiato de bencilo (22,0 g, 162 mmol). Después de 6 horas se añade formiato de bencilo adicional (22,0 g, 162 mmol). El calentamiento continúa durante 50 horas. La mezcla de la reacción se filtra a 80°C. El filtrado se enfría a 20°C, y el precipitado se recoge por filtración. El producto resultante (20,2 g) se suspende en diclorometano (220 ml) a 20 °C durante 4 horas. La suspensión se filtra, y el filtrado se evacúa a sequedad a 20-30°C. El sólido resultante (13,9 g) se recristaliza del 2-propanol (140 ml).

25

[0210] El producto se aísla por filtración, y se seca a un peso constante bajo presión reducida a 30-40°C. Rendimiento: 10,2 g (39%) de material blanco.

30

Preparación de L-2-(15-benzyloxycarbonil-pentadecanoilamino) ácido pentanodoico5-bencilo de éster 1-(2,5-dioxipirrolidin-1-yl) éster.

35

[0211] Se disuelve ácido monobencil de éster 1,16-hexadecanedioico (20,0 g, 53,1 mmol) en acetona a 35-40°C. Se añade N- hidroxisuccinimida (6,42 g/55,8 mmol). A la solución resultante se le añade dicitclohexilcarbodiimida (DCC) (12,1g/58,4 mmol). La mezcla de la reacción se agita durante 3-4 horas a 35°C. A la suspensión resultante se añade trietilamina (7,40 ml, 53,1 mmol) og ácido L-glutámico α -bencilo de éster (12,6 g/53,1 mmol). La mezcla se agita durante 8-16 horas a 35-40°C. La mezcla de la reacción se enfria a 20-25°C. Se añade ácido metanosulfónico (3,45 ml / 53,1

5 mmol) y DCC (12,1 g / 53,1 mmol). La mezcla de la reacción se agita durante 8-16 horas a 20-25°C. La mezcla de la reacción se filtra y el filtrado se evacúa a sequedad. El residuo se divide entre agua (100 ml) y tolueno (200 ml). La fase de tolueno se seca por destilando de agua. Gel de sílice (20 g) se añade al residuo. La suspensión se agita durante 30 minutos a 20-25°C, luego se filtra. El volumen del filtrado se reduce a aproximadamente 100-120 ml por evaporación bajo presión reducida. N-heptano (150 ml) se añade un periodo de alrededor 15-30 minutos. La suspensión resultante se agita durante 2 horas. El producto se aísla por filtración y se seca a peso constante bajo presión reducida a 20-25°C. Rendimiento 21 g (58%) de material blanco.

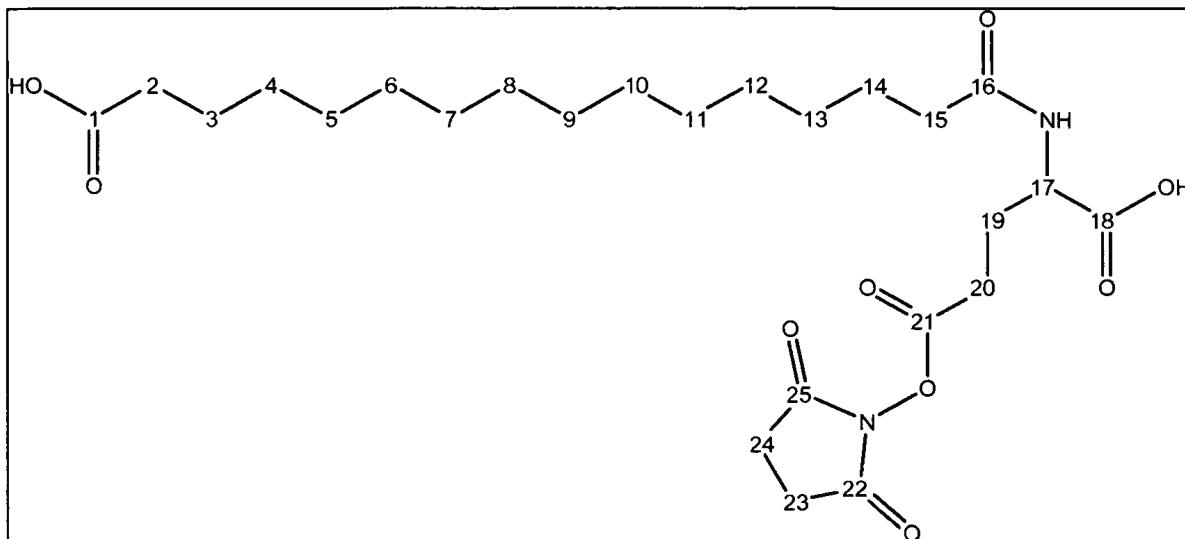
10 Preparación de L-2-(15-carboxi-pentadecanoilamino)-ácido pentanedioico 5-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-yl) éster (PC2414)

15 [0212] L-2-(15-benciloxicarbonil-pentadecanoilamino)-ácido pentanedioico 5-bencilo de éster (5,0 g, 7,3 mmol) se disuelve en la acetona (95 ml) que contiene ácido trifluoroacético (95 µl). Se añade paladio al carbono, 10% (0,50 g). Se añade hidrógeno bajo agitación a 30-35°C. Cuando el consumo de hidrógeno se detiene, la mezcla de la reacción se filtra. El filtrado se enfriá a 20°C y n-heptano (140 ml) se añade en un periodo de alrededor de 15-30 minutos. La suspensión resultante se enfriá a 0-5°C durante 2-3 horas. El producto se aísla por filtración y se seca a peso constante bajo presión reducida a 20-25°C. Rendimiento: 3g (84%) de material blanco.

20 [0213] El producto se analiza por RMN de protón (Bruker 600 MHz) usando acetona-d6 como solvente.

[0214] Las asignaciones de la RMN de protón del espectro 1D (la referencia interna es TMS a δ 0,0 ppm)

¹ H	Desvío químico δ (ppm)	Integral	Patrón de unión	Constantes de unión ⁿ J _{HH} (Hz)
H2	2,28	2H	t	³ J _{HH} = 7,5
H3/ H14	1,60	4H	m	ND
H4- H13	1,29	20H	m	ND
H1 5	2,26	2H	dt	² J _{HH} = 2,5, ³ J _{HH} = 7,5
H1 7	4,59	1H	d dd	³ J _{HH} = 8,0/7,5/5,2
H1 9	2,31/2,1 0	2H	m	ND
H2 0	2,82/2,7 5	2H	d dd	² J _{HH} = 16,5, ³ J _{HH} = 10,0/6,0
H2 3/H24	2,88	4H	s	-
NH	7,37	1H	d	³ J _{HH} = 7,5



Acilación del grupo ϵ -amino de la insulina humana desB30 en la lisina en posición B29 con PC2414

5 [0215] 4 g de insulina humana desB30 se suspenden en 64 g de agua purificada. 1,85 ml de trietilamina (TEA) se añade para disolver la insulina humana desB30 y para aumentar el pH a 11,4 – 12,0. La solución se enfria a 2-5°C.

10 [0216] 448 mg de PC2414 se disuelven en 3,5 g de NMP (n-metil-2-pirrolidona), se estabiliza con 10 μ l de ácido sulfúrico 5%.

15 [0217] La solución de insulina humana desB30 se agita y se añade la solución de PC2414 después de un periodo de 20 min, mientras la temperatura se mantiene baja.

20 [0218] Despues de añadir PC2414, la mezcla de la reacción se diluye con 2,5 peso de una solución que consiste en: tris-hidroximetilaminometano (20 mmol/kg), acetato amónico (30 mmol/kg), etanol 42,5 % p/p, el resto de agua purificada, pH 7,5.

25 [0219] Despues de la dilución, el pH se ajusta a 7,5 añadiendo lentamente ácido acético 1 M, mientras se agita. Un análisis por HPLC demuestra la formación de 72,11% de insulina humana Lys^{B29}(NE-hexadecanoil- γ -glutamil) des(B30) con 14,22% de los restos de insulina humana desB30.

[0220] Método HPLC analítico:

30 A 150 X 4,6 mm I.D. columna embalada con un octildimetsil sílice sustituido con un tamaño de poro de aproximadamente 100 Å y diámetro de partícula de aproximadamente 3,5 μ m y equilibrado a 40°C a una velocidad de flujo de 1 ml/min con una mezcla que consiste en 1: un tampón de 20mM de NaH₂PO₄.H₂O y 100mmol de Na₂SO₄ ajustada a pH 5,9 con NaOH en el tampón acuoso que contiene 7,8% (w/w) y 2: solvente de acetonitrilo con 42,8% p/p de acetonitrilo, para hacer 25 % (w/w) de acetonitrilo.

35 Insulina humana Lys^{B29}(NE-hexadecanoil- γ -glutamil) des(B30) emergida de la columna despues de aproximadamente 20 min. Insulina humana desB30 emergida de la columna despues de aproximadamente 6 min.

Ensayo (II)

35 **Potencia de los derivados de insulina de la invención en relación a la insulina humana**

[0221] Ratas Sprague Dawley macho con un peso entre 238-383 g en el día del experimento se usaron para el experimento clamp. Las ratas tenían libre acceso para alimentarse bajo condiciones de ambiente controladas y fueron se

mantuvieron en ayunas durante toda la noche (desde las 3 de la tarde) antes del experimento clamp.

Protocolo experimental

- 5 [0222] Las ratas fueron aclimatadas en las instalaciones para animales durante al menos 1 semana antes del procedimiento quirúrgico. Aproximadamente 1 semana antes del experimento clamp se insertaron catéteres de Tygon bajo anestesia de halotano en la vena yugular (para infusión) y en la arteria carótida (para muestras de sangre) y se exteriorizaron y fijaron en la parte posterior del cuello. Las ratas recibieron Streptocilin vet. (Boehringer Ingelheim; 0,15 ml/rata, i.m.) después de la cirugía y las ubicaron en una unidad de cuidado animal (25 °C) durante el periodo de recuperación. Para obtener analgesia, se administró Anorfin (0,06 mg/rata, s.c.) durante la anestesia y Rimadyl (1,5 mg/kg, s.c.) se administró después de la recuperación completa de la anestesia (2-3 h) y después una vez al día durante 2 días.
- 10 [0223] La técnica de clamp empleada se adaptó de (1). A las 7 de la mañana del día del experimento después de pasar la noche en ayunas (desde las 3 de la tarde del día anterior) se pesó a las ratas y se conectaron a las jeringas de muestreo y al sistema de infusión (22 bombas básicas de Harvard, Harvard, y jeringa de vidrio hipodérmica Perfectum, Aldrich) y luego las colocaron en jaulas clamp individuales en donde reposaron unos 45 min antes del inicio del experimento. Las ratas podían moverse libremente en su cama habitual durante el experimento entero y tuvieron libre acceso a agua potable. Después de que un periodo basal de 30 min en los que los niveles de glucosa en sangre se midieron en intervalos de 10 min, el derivado de insulina que se iba a probar e insulina humana (un nivel de dosis por rata, n= 6-7 por nivel de dosis) se infundieron (i.v.) a un índice constante durante 300 min. Los niveles de glucosa en sangre se midieron en intervalos de 10 min durante todo el proceso y una infusión de un 20% de glucosa acuosa se ajustó de acuerdo para mantener la euglucemia. Muestras de eritrocitos resuspendidos se recogieron de cada rata y se devolvieron en aproximadamente 1/2 ml volúmenes por medio del catéter carotídeo.
- 15 [0224] En cada día del experimento, muestras de las soluciones de los derivados de insulina individuales que se evaluaban y la solución de insulina humana se tomaron antes y al final de los experimentos de clamp y las concentraciones de los péptidos fueron confirmadas por HPLC. Concentraciones de plasma de insulina de rata y péptido C, así como el derivado de insulina que se evaluaba e insulina humana se midieron en puntos de tiempo pertinentes antes y al final de los estudios. Se mató a las ratas al final de experimento usando una sobredosis de pentobarbital.
- 20
- 25
- 30

Ensayo (III)

- 35
- Determinación en cerdos de $T_{50\%}$ de los derivados de insulina de la invención**
- 40 [0225] $T_{50\%}$ es el tiempo cuando el 50% de una cantidad inyectada del derivado de una insulina que iba a probarse marcada en A14 Tyr[¹²⁵I] ha desaparecido del lugar de la inyección tal como se midió con un contador tipo Y externo.
- 45 [0226] Los principios de cuidado de animal de laboratorio se siguieron, LYYD específico sin patógenos, cerdos hembra no diabéticos, crías cruzadas de danés Landrace, Yorkshire y Duroc, se usaron (Holmenlund, Haarloev, Dinamarca) para estudios farmacodinámicos y farmacocinéticos. Los cerdos estaban conscientes, tenían 4-5 meses de edad y pesaban entre 70-95 kg. Los animales fueron ayunados durante toda la noche durante 18 h antes el experimento.
- 50 [0227] Preparaciones formuladas de derivados de insulina marcadas en Tyr^{A14} con ¹²⁵I se inyectaron sc. en cerdos tal y como se describe anteriormente (Ribel, U., Jørgensen, K, Brange, J, y Henriksen, U. *The pig as a model for subcutaneous insulin absorption in man*. Serrano-Rios, M y Lefèvre, P. J. 891-896. 1985. Amsterdam; Nueva York; Oxford, Elsevier Science Publishers. 1985 (Conference Proceeding)).
- 55 [0228] Al principio de los experimentos una dosis de 60 nmol del derivado de insulina según la invención (compuesto de prueba) y una dosis de 60 nmol de insulina detemir (ambos marcadas ¹²⁵I en Tyr^{A14}) se inyectaron en dos sitios separados en el cuello de cada cerdo.
- 60 [0229] La desaparición del trazador radiactivo del sitio de la inyección sc se monitoreó usando una modificación del método tradicional externo de recuento de gama (Ribel, U. *Subcutaneous absorption of insulin analogues*. Berger, M. y Gries, F. A. 70-77 (1993). Stuttgart; Nueva York, Georg Time Verlag (Conference Proceeding)). Con este método modificado fue posible medir continuamente la desaparición de radioactividad de una acumulación subcutánea para distintos días usando un dispositivo inalámbrico portátil (Scancis Laboratorieteknik, Værløse it, DK-3500, Dinamarca). Las mediciones se realizaron en intervalos de 1 min y los valores contados fueron corregidos por la actividad de fondo.

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica soluble que comprende una insulina acilada y que además comprende más de 4 átomos de zinc por cada 6 moléculas de insulina acilada, donde la insulina acilada comprende una molécula de insulina con una cadena lateral unida a un grupo ϵ -amino de un residuo Lys presente en la cadena B de la insulina inicial, la cadena lateral tiene la siguiente fórmula general:



10 donde W es:

- un residuo de α -aminoácido que tiene un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral que forma el residuo, con uno de sus grupos ácido carboxílico, un grupo amida junto con un grupo ϵ -amino de un residuo Lys presente en la cadena B de la insulina inicial;
- una cadena compuesta por dos, tres o cuatro residuos de α -aminoácido unidos por medio de enlaces amida carbonilo, dicha cadena está unida —por medio de un enlace amida— a un grupo ϵ -amino de un residuo Lys presente en la cadena B de la insulina inicial, los residuos de aminoácidos de W siendo seleccionados del grupo de residuos de aminoácidos que tienen una cadena lateral neutra y residuos de aminoácidos con un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral, de modo que W tiene al menos un residuo de aminoácido que tiene un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral; o
- un enlace covalente desde X a un grupo ϵ -amino de un residuo Lys presente en la cadena B de la insulina inicial;

25 X es:

- $-\underline{CO}-$;
- $-\underline{CH(COOH)CO}-$;
- $-\underline{CO-N(CH_2COOH)CH_2CO}-$;
- $-\underline{CO-N(CH_2COOH)CH_2CON(CH_2COOH)CH_2CO}-$;
- $-\underline{CO-N(CH_2CH_2COOH)CH_2CH_2CO}-$;
- $-\underline{CO-N(CH_2CH_2COOH)CH_2CH_2CON(CH_2CH_2COOH)CH_2CH_2CO}-$;
- $-\underline{CO-NHCH(COOH)(CH_2)_4NHCO}-$;
- $-\underline{CO-N(CH_2CH_2COOH)CH_2CO}-$; o
- $-\underline{CO-N(CH_2COOH)CH_2CH_2CO}-$.

que

- a) cuando W es un residuo de aminoácido o una cadena de residuos de aminoácidos, por medio de un enlace desde el carbono subrayado forma un enlace amida con un grupo amino en W, o
- b) cuando W es un enlace covalente, por medio de un enlace amida desde el carbono carbonilo subrayado forma un enlace amida con un grupo ϵ -amino de un residuo Lys presente en la cadena B de la insulina inicial;

45 Y es:

- $-(CH_2)_m-$ donde m es un número entero en el intervalo de 6 a 32;
- una cadena de hidrocarburo bivalente que comprende 1, 2 ó 3 grupos $-CH=CH-$ y varios grupos $-CH_2-$ suficientes para dar un número total de átomos de carbono en la cadena en el intervalo de 10 a 32 y

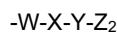
55 Z_2 es:

- $-COOH$;
- $-CO-Asp$;
- $-CO-Glu$;
- $-CO-Gly$;
- $-CO-Sar$;
- $-CH(COOH)_2$;

- $-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$;
- $-\text{SO}_3\text{H}$; o
- $-\text{PO}_3\text{H}$

5 y cualquier complejo Zn^{2+} de los mismos, con la condición de que cuando W es un enlace covalente y X es $-\text{CO}-$, entonces Z es diferente de $-\text{COOH}$.

2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 que comprende hasta aproximadamente 12 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada.
- 10 3. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2 que comprende entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 12 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada.
- 15 4. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la insulina inicial es un análogo de insulina humana desB30.
5. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además una insulina de acción rápida.
- 20 6. Método para producir una composición farmacéutica que comprende una insulina acilada donde más de 4 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada se añaden a la composición y donde la insulina acilada tiene una cadena lateral unida al grupo ϵ -amino de un residuo Lys presente en la cadena B de la insulina inicial, teniendo la cadena lateral la siguiente fórmula general:



donde W es:

- 30 • un residuo de α -aminoácido con un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral, dicho residuo forma, con uno de sus grupos ácido carboxílico, un grupo amida junto con el grupo ϵ -amino de un residuo Lys presente en la cadena B de la insulina inicial;
- 35 • una cadena compuesta por dos, tres o cuatro residuos de α -aminoácido unidos por medio de enlaces amida carbonilo, dicha cadena está unida —mediante un enlace amida— a un grupo ϵ -amino de un residuo Lys presente en la cadena B de la insulina inicial, siendo los residuos de aminoácidos de W seleccionados del grupo de residuos de aminoácidos que tienen una cadena lateral neutra y residuos de aminoácidos con un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral, de modo que W tiene al menos un residuo de aminoácido que tiene un grupo ácido carboxílico en la cadena lateral; o
- 40 • un enlace covalente desde X hasta un grupo ϵ -amino de un residuo Lys presente en la cadena B de la insulina inicial;

X es:

- 45 • $-\text{CO}-$;
- $-\text{CH}(\text{COOH})\underline{\text{CO}}-$;
- $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{\text{CO}}-$;
- $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{\text{CO}}-$;
- $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{CO}}-$;
- 50 • $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{CO}}-$;
- $-\text{CO}-\text{NHCH}(\text{COOH})(\text{CH}_2)_4\text{NH}\underline{\text{CO}}-$;
- $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\underline{\text{CO}}-$; o
- $-\text{CO}-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{CO}}-$.

55 que

- a) cuando W es un residuo de aminoácido o una cadena de residuos de aminoácidos, mediante un enlace desde el carbono subrayado forma un enlace amida con un grupo amino en W, o

- 5 b) cuando W es un enlace covalente, mediante un enlace desde el carbono carbonilo subrayado forma un enlace amida con un grupo ϵ -amino de un residuo Lys presente en la cadena B de la insulina inicial;

10 Y es:

- 15 • $-(CH_2)_m$ - donde m es un número entero en el intervalo de 6 a 32;
- 20 • una cadena de hidrocarburo bivalente que comprende 1, 2 ó 3 grupos $-CH=CH-$ y varios grupos $-CH_2-$ suficientes para dar un número total de átomos de carbono en la cadena en el intervalo de 10 a 32 y

25 Z_2 es:

- 30 • -COOH;
 35 • -CO-Asp;
 • -CO-Glu;
 • -CO-Gly;
 • -CO-Sar;
 • -CH(COOH)₂;
 • -N(CH₂COOH)₂;
 • -SO₃H; o
 • -PO₃H

40 y cualquier complejo Zn^{2+} de los mismos, con la condición de que cuando W es un enlace covalente y X es -CO-, entonces Z es diferente de -COOH.

- 45 7. Método según la reivindicación 6 donde hasta aproximadamente 12 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada se añaden a la composición.
- 50 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6-7 donde entre aproximadamente 4,3 y aproximadamente 12 átomos de zinc por 6 moléculas de insulina acilada se añaden a la composición.
9. Método según las reivindicaciones 6-8 donde el zinc se añade a la composición antes de añadir un conservante.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones de 6-9 donde el zinc se añade a la composición después de añadir un conservante.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones del método precedentes, donde parte del zinc se añade antes de añadir un conservante y parte del zinc se añade después de añadir un conservante.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones del método precedentes, donde la insulina inicial es un análogo de insulina humana desB30.
13. Método cualquiera de las reivindicaciones del método precedentes, donde una insulina de acción rápida se mezcla con la composición.
14. Uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para la producción de un medicamento para el tratamiento de la diabetes.
15. Composición farmacéutica según la reivindicación 1-5 para su uso en el tratamiento de la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 y otros estados que provocan hiperglucemia.

ES 2 371 361 T3

Figura 1

600 μM Aspart, 3 Zn/6ins

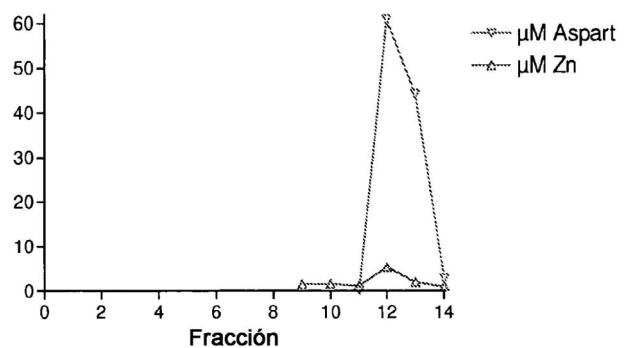


Figura 2

600 μM Aspart, 6 Zn/6ins

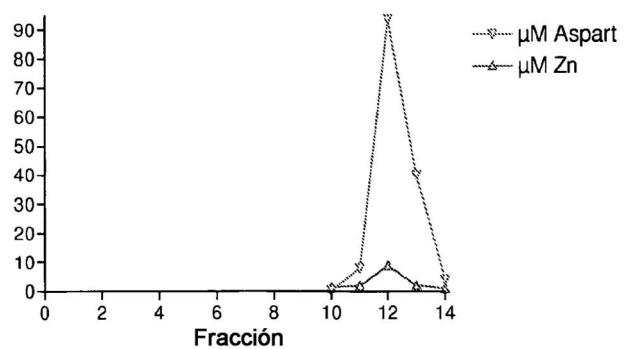


Figura 3

600 μ M insulina humana
LysB²⁹N^ε-hexadecanoil- γ -Glu
desB30, 3 Zn/6acyl-ins

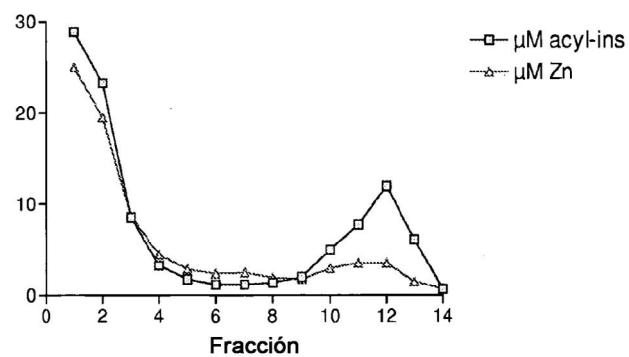


Figura 4

600 μ M insulina humana
LysB²⁹-N^ε-hexadecanoil- γ -Glu
desB30, 4 Zn/6acyl-ins

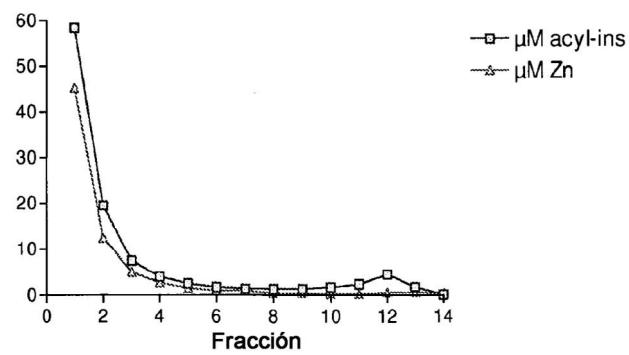


Figura 5

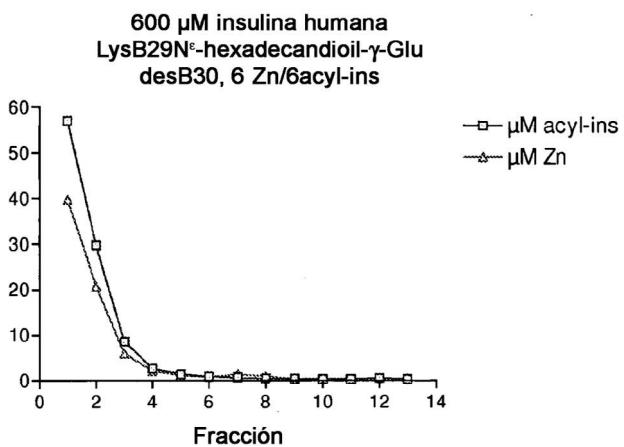


Figura 6

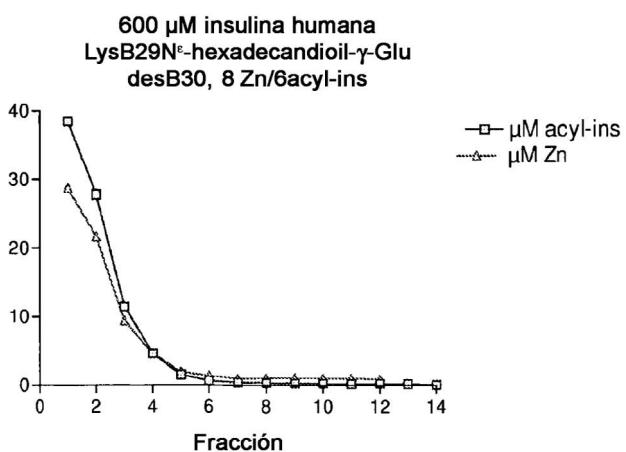


Figura 7

180 μM aspart / 840 μM insulina humana
 LysB²⁹-N^c-hexadecanoil- γ -Glu
 desB30, 3,6 Zn/6acyl-ins

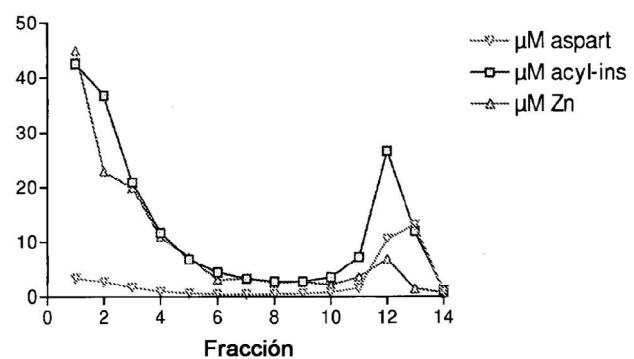


Figura 8

180 μM aspart / 420 μM insulina humana
 LysB²⁹-N^c-hexadecanoil- γ -Glu
 desB30, 4,3 Zn/6acyl-ins

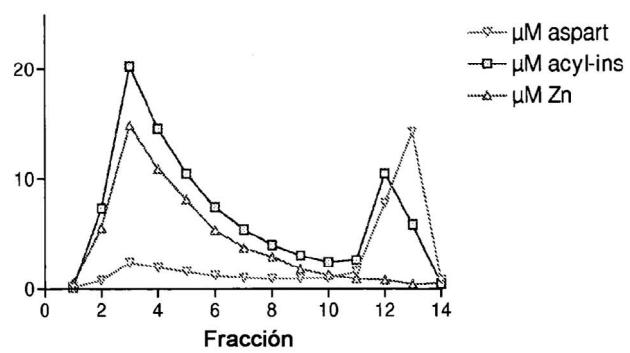


Figura 9

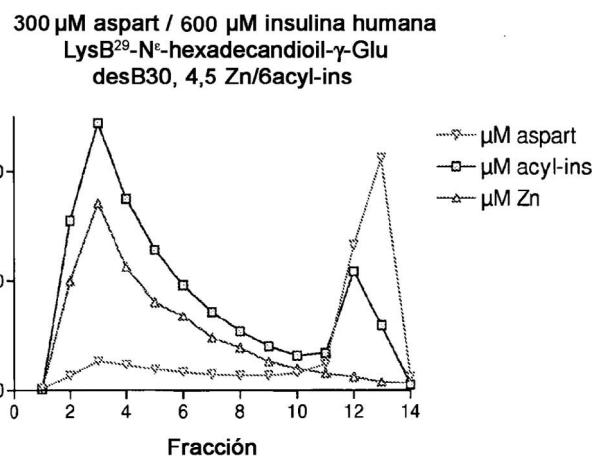


Figura 10

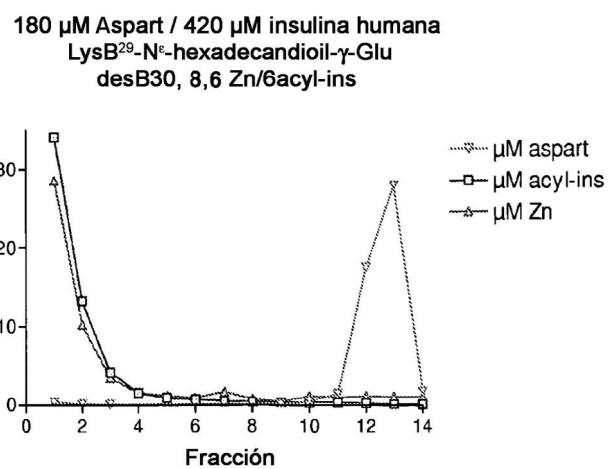


Figura 11

180 μ M aspart / 420 μ M insulina humana
 LysB²⁹-N^c-hexadecanoil- γ -Glu
 desB30,11,4 Zn/6acyl-ins

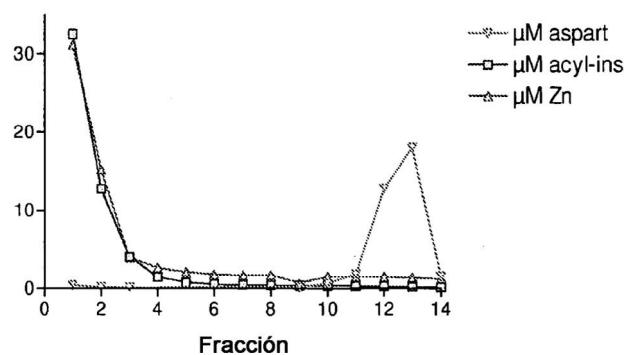


Figura 12

300 μ M aspart / 300 μ M insulina humana
 LysB²⁹-N^c-hexadecanoil- γ -Glu
 desB30, 12 Zn/6acyl-ins

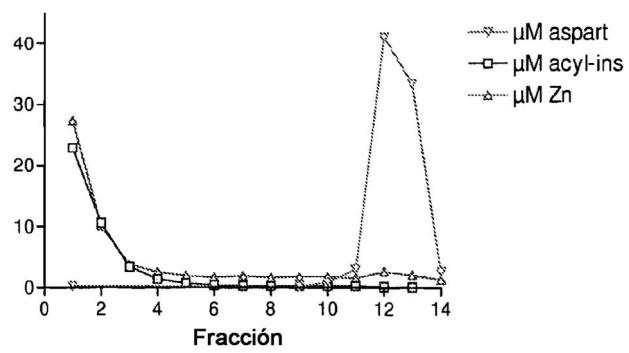


Figura 13

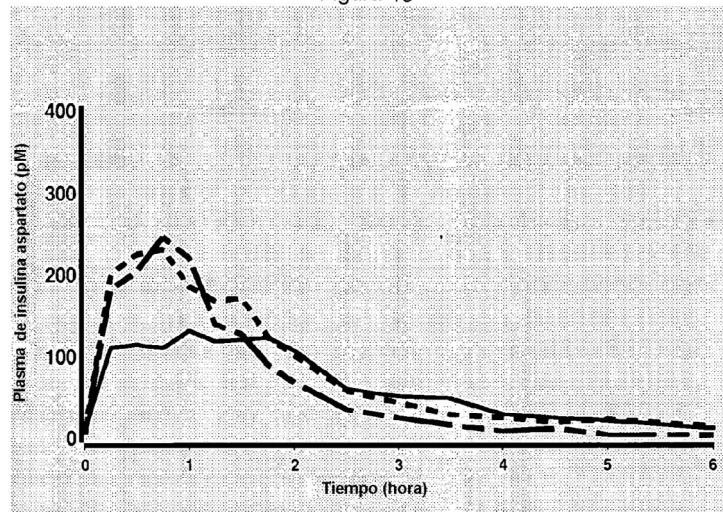


Figura 14

