

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 978 863**

51 Int. Cl.:

C07K 14/62 (2006.01)
C07K 1/12 (2006.01)
C07K 1/18 (2006.01)
C07K 1/36 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.08.2016** **PCT/KR2016/009606**
87 Fecha y número de publicación internacional: **09.03.2017** **WO17039267**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2016** **E 16842233 (5)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2024** **EP 3341404**

54 Título: **Nuevos análogos de insulina y su uso**

30 Prioridad:

28.08.2015 KR 20150121819

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.09.2024

73 Titular/es:

HANMI PHARM. CO., LTD. (100.0%)
214 Muha-ro Paltan-myeon
Hwaseong-si, Gyeonggi-do 18536, KR

72 Inventor/es:

KIM, JIN YOUNG;
OH, EUH LIM;
LEE, JONG SOO;
LIM, HYUNG KYU;
CHOI, IN YOUNG y
KWON, SE CHANG

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

Observaciones:

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

ES 2 978 863 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

Nuevos análogos de insulina y su uso

5 **[Sector técnico]**

La presente invención se refiere a un nuevo análogo de insulina, y más específicamente, a un análogo de insulina con un efecto *in vitro* mejorado en comparación con la insulina nativa, y a una composición farmacéutica que comprende dicho análogo de insulina para su uso en el tratamiento de la diabetes.

10

[Técnica anterior]

La insulina es una hormona secretada por el páncreas que controla el nivel de glucosa en sangre y sirve para transportar el exceso de glucosa en sangre a las células, proporcionando así una fuente de energía y manteniendo un nivel normal de glucosa. Sin embargo, los pacientes diabéticos no pueden mantener las funciones normales de la insulina debido a la deficiencia de insulina, la resistencia a la insulina y la pérdida de función de las células beta. Como resultado, los pacientes diabéticos no pueden utilizar la glucosa de la sangre como fuente de energía, sino que muestran síntomas de hiperglucemia con un alto nivel de glucosa y excretan la glucosa por la orina, lo que causa diversas complicaciones. En consecuencia, los pacientes diabéticos que presentan anomalías en la secreción de insulina (tipo I) o resistencia a la insulina (tipo II) requieren esencialmente tratamiento con insulina, y mediante la administración de insulina pueden mantener normales sus niveles de glucosa en sangre.

La insulina humana consta de dos cadenas polipeptídicas, la cadena A y la cadena B, que incluyen respectivamente 21 y 30 aminoácidos, unidos entre sí por dos enlaces disulfuro. Dado que la insulina tiene una semivida *in vivo* extremadamente corta, como ocurre con otras hormonas proteicas y peptídicas, es incapaz de mostrar un efecto terapéutico sostenido, por lo que presenta el problema de que debe administrarse de forma continua y repetida para ejercer su efecto. La administración frecuente de insulina causa dolor e incomodidad graves a los pacientes, por lo que es necesario mejorar la administración desde el punto de vista del cumplimiento del paciente, la seguridad y la comodidad.

En consecuencia, los estudios se han centrado en el desarrollo de diversas formulaciones proteicas, conjugados químicos, etc. para mejorar los efectos terapéuticos así como la calidad de vida de los pacientes reduciendo la frecuencia de administración mediante el aumento de la semivida *in vivo* de estos fármacos proteicos como la insulina.

Se sabe que la insulina elimina la glucosa en sangre uniéndose a los receptores de insulina y que el efecto de la insulina puede controlarse alterando la secuencia de la insulina nativa. El efecto *in vivo* de la insulina puede controlarse sustituyendo aminoácidos de la insulina por aminoácidos diferentes o suprimiendo aminoácidos específicos de la insulina. Dado que los derivados de insulina con alta actividad pueden ejercer efectos equivalentes o mejores que los de la insulina nativa, incluso en pequeña cantidad, pueden ser muy deseables desde el punto de vista terapéutico. En particular, las sustituciones de aminoácidos en la cadena A y/o la cadena B contenidas en la insulina se han estudiado ampliamente desde el aspecto de un efecto farmacocinético de la acción de la insulina tras la inyección subcutánea.

En estas circunstancias, los presentes inventores han estudiado intensamente para mejorar el efecto de la acción de la insulina, y como resultado, han descubierto que los análogos de insulina con modificación(es) en residuo(s) de aminoácido particular(es) en la cadena A y/o la cadena B de la insulina, como se define en la reivindicación 1, exhiben un efecto *in vitro* notablemente mejorado en comparación con el de la insulina nativa, y que por lo tanto pueden ser utilizados eficazmente para el tratamiento de la diabetes.

Los documentos WO 2015/108398 A1, WO 2014/133324 A1, DE 2536040 A1 y US 5716927 A divulgan análogos de insulina.

50 **[Divulgación]**

[Problema técnico]

55 Un objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo análogo de insulina, y específicamente un análogo de insulina con un efecto *in vitro* mejorado en comparación con el de la insulina nativa.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la diabetes que contenga el análogo de insulina como principio activo.

60

Se divulga en el presente documento, pero no se reivindica, un método para tratar la diabetes que incluye administrar el análogo de insulina o una composición farmacéutica que contiene el análogo de insulina como ingrediente activo a un sujeto que lo necesita.

65

[Solución técnica]

Para conseguir los objetos anteriores, en un aspecto, la presente invención proporciona un análogo de insulina como se define en la reivindicación 1, que incluye la cadena A de la SEQ ID NO: 3 representada por la siguiente Fórmula General 1 y la cadena B de la SEQ ID NO: 4 representada por la siguiente Fórmula General 2:

5 Fórmula general 1

Xaa1-Ile-Val-Glu-Xaa2-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Xaa3-Leu-Xaa4-Gln-Xaa5-Glu-Asn-Xaa6-Cys-Xaa7 (SEQ ID NO: 3);

Fórmula general 2

10 Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Xaa8-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Xaa9-Tyr-Xaa10-Xaa11-Lys-Thr (SEQ ID NO: 4);

15 (i) en donde: en la cadena A de la SEQ ID NO: 3, Xaa1 es glicina, Xaa2 es glutamina, Xaa3 es serina, Xaa4 es ácido glutámico, Xaa5 es leucina, Xaa6 es tirosina, y Xaa7 es asparagina, y

en la cadena B de la SEQ ID NO: 4, Xaa8 es tirosina, Xaa9 está ausente, Xaa10 es treonina, y Xaa11 es prolina,

20 opcionalmente en donde el péptido comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 20; o bien

(ii) en la cadena A de la SEQ ID NO: 3, Xaa1 es glicina, Xaa2 es glutamina, Xaa3 es serina, Xaa4 es ácido aspártico, Xaa5 es leucina, Xaa6 es tirosina y Xaa7 es asparagina, y

en la cadena B de la SEQ ID NO: 4, Xaa8 es tirosina, Xaa9 es fenilalanina, Xaa10 es treonina y Xaa11 es prolina.

25 Divulgado en el presente documento, pero no reivindicado, es un análogo de insulina caracterizado en que incluye una cadena A de Fórmula General 1 y una cadena B, en la que, en la cadena B de la SEQ ID NO: 4, Xaa8 es tirosina, Xaa9 está ausente, y Xaa10 es treonina.

30 Se divulga en el presente documento, pero no se reivindica, un análogo de insulina caracterizado porque incluye una cadena A de Fórmula General 1 y una cadena B, en la que, en la cadena B de la SEQ ID NO: 4, Xaa8 es tirosina, Xaa9 es fenilalanina y Xaa10 está ausente.

35 Se divulga en el presente documento, pero no se reivindica, un análogo de insulina caracterizado porque, en la cadena A de la SEQ ID NO: 3, Xaa1 es glicina, Xaa2 es glutamina, Xaa3 es serina, Xaa4 es ácido glutámico, Xaa5 es leucina, Xaa6 es tirosina, y Xaa7 es asparagina, y en la cadena B de la SEQ ID NO: 4, Xaa8 es tirosina, Xaa9 es fenilalanina, Xaa10 es treonina, y Xaa11 es prolina.

40 Se divulga en el presente documento, pero no se reivindica, un análogo de insulina caracterizado porque, en la cadena A de la SEQ ID NO: 3, Xaa1 es glicina, Xaa2 es glutamina, Xaa3 es serina, Xaa4 es asparagina, Xaa5 es leucina, Xaa6 es tirosina, y Xaa7 es asparagina, y en la cadena B de la SEQ ID NO: 4, Xaa8 es tirosina, Xaa9 es fenilalanina, Xaa10 es treonina, y Xaa11 es prolina.

45 En una realización de la invención reivindicada, el análogo de insulina se caracteriza porque, en la cadena A de la SEQ ID NO: 3, Xaa1 es glicina, Xaa2 es glutamina, Xaa3 es serina, Xaa4 es ácido glutámico, Xaa5 es leucina, Xaa6 es tirosina, y Xaa7 es asparagina, y en la cadena B de la SEQ ID NO: 4, Xaa8 es tirosina, Xaa9 está ausente, Xaa10 es treonina, y Xaa11 es prolina, como se define en la reivindicación 1 punto (i).

50 Se divulga en el presente documento, pero no se reivindica, un análogo de insulina caracterizado porque, en la cadena A de la SEQ ID NO: 3, Xaa1 es glicina, Xaa2 es glutamina, Xaa3 es serina, Xaa4 es alanina, Xaa5 es leucina, Xaa6 es tirosina, y Xaa7 es asparagina, y en la cadena B de la SEQ ID NO: 4, Xaa8 es ácido glutámico, Xaa9 está ausente, Xaa10 es treonina, y Xaa11 es prolina.

55 Se divulga en el presente documento, pero no se reivindica, un análogo de insulina caracterizado porque, en la cadena A de la SEQ ID NO: 3, Xaa4 es ácido glutámico, y, en la cadena B de la SEQ ID NO: 4, Xaa9 es fenilalanina; o bien

en la cadena A de la SEQ ID NO: 3, Xaa4 es asparagina, y, en la cadena B de la SEQ ID NO: 4, Xaa9 es fenilalanina; o bien

60 en la cadena A de la SEQ ID NO: 3, Xaa4 es ácido glutámico, y, en la cadena B de la SEQ ID NO: 4, Xaa9 está ausente; o bien

en la cadena A de la SEQ ID NO: 3, Xaa4 es alanina, y, en la cadena B de la SEQ ID NO: 4, Xaa8 es ácido glutámico y Xaa9 está ausente.

65 En una realización ejemplar, el análogo de insulina según la presente invención incluye una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 20.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica el análogo de insulina, como se define en la reivindicación 2.

5 En una realización ejemplar, el ácido nucleico según la presente invención incluye la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 19.

10 En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un vector de expresión recombinante que incluye el ácido nucleico, como se define en la reivindicación 4.

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un transformante que comprende el vector de expresión recombinante, como se define en la reivindicación 5.

15 En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar el análogo de insulina, como se define en la reivindicación 7, que incluye:

- a) preparar un vector de expresión recombinante que incluya un ácido nucleico que codifique el péptido análogo de insulina;
- 20 b) transformar el vector de expresión recombinante en una célula huésped y obtener de ella un transformante;
- c) cultivar el transformante y expresar el péptido análogo de insulina; y
- 25 d) aislar y purificar el péptido análogo de insulina expresado.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la diabetes que contiene el análogo de insulina como ingrediente activo y un portador farmacéuticamente aceptable, tal como se define en la reivindicación 10.

30 [Efectos ventajosos]

Los análogos de insulina de acuerdo con la presente invención exhiben un efecto *in vitro* significativamente mejorado en comparación con el de la insulina nativa, y por lo tanto se espera que la administración de los análogos de insulina proporcione un tratamiento suficiente incluso en una pequeña cantidad, y por lo tanto pueden ser utilizados eficazmente para el tratamiento de la diabetes.

[Descripción de los dibujos]

40 La FIG. 1 muestra un resultado de la pureza de los análogos de insulina analizados por electroforesis de proteínas, y representativamente, un resultado del análogo de insulina 1 (Carril 1: marcador de tamaño, y Carril 2: análogo de insulina 1).

45 La FIG. 2 muestra un resultado de la pureza de los análogos de insulina analizados por cromatografía de fase inversa y cromatografía de exclusión por tamaño, y representativamente, un resultado del análogo de insulina 1.

La FIG. 3 muestra un resultado del mapeo peptídico de los análogos, y representativamente, un resultado del análogo de insulina 1, donde USP-insulina indica la insulina nativa utilizada como control.

[Mejor Modo]

50 La presente invención se describirá con mayor detalle a continuación.

La presente invención se refiere a un análogo de insulina como se define en la reivindicación 1, con un efecto *in vitro* mejorado en comparación con el de la insulina nativa.

55 Tal como se utiliza en el presente documento, el término “análogo de insulina” se refiere a un análogo modificado de la insulina nativa preparado mediante la modificación de una parte de los aminoácidos de la insulina nativa en forma de inserción, supresión o sustitución, y en particular, incluye varios análogos de insulina de la insulina nativa con un efecto *in vitro* mejorado en comparación con el de la insulina nativa.

60 La insulina nativa es una hormona secretada por el páncreas y, por lo general, desempeña un papel en la promoción de la absorción intracelular de glucosa y la inhibición de la descomposición de las grasas, controlando así los niveles de glucosa en sangre *in vivo*. La insulina se genera a partir del procesamiento de su precursor, la proinsulina, que no tiene la función de controlar los niveles de glucosa en sangre. La insulina se compone de dos cadenas polipeptídicas, la cadena A y la cadena B, que incluyen 21 y 30 aminoácidos, respectivamente, y están entrelazadas por un puente

disulfuro. Cada una de la cadena A y la cadena B puede incluir las secuencias de aminoácidos representadas por la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 que se muestran a continuación.

Cadena A:

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn (SEQ ID NO: 1) Cadena B:

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr (SEQ ID NO: 2)

La insulina según la presente invención se refiere a los análogos de insulina como se define en la reivindicación 1. La insulina puede prepararse no sólo por un método recombinante sino también por una síntesis en fase sólida, y el método de preparación no está limitado a ello.

Estos análogos de insulina son péptidos que tienen una capacidad de control del nivel de glucosa en sangre *in vivo* equivalente o correspondiente a la de la insulina nativa.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “agonista de la insulina” se refiere a un material que puede unirse a un receptor *in vivo* de la insulina independientemente de la estructura de la insulina y, por lo tanto, mostrar una actividad biológica equivalente a la de la insulina.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “derivado de la insulina” puede referirse a un péptido que tiene una homología con cada una de las secuencias de aminoácidos de la cadena A y la cadena B de la insulina nativa y está en la forma que tiene una capacidad de control del nivel de glucosa en sangre *in vivo*, donde una parte de los grupos en un residuo de aminoácido se modifica por sustitución química (por ejemplo, alfa-metilación, alfa-hidroxilación), eliminación (por ejemplo, desaminación) o modificación (por ejemplo, N-metilación).

Además, tal como se utiliza en el presente documento, el término “derivado de insulina” puede referirse a un imitador peptídico y a un compuesto de bajo o alto peso molecular que puede controlar *in vivo* los niveles de glucosa en sangre uniéndose a un receptor de insulina, aunque no exista homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la insulina nativa.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “fragmento de insulina” se refiere a una forma de insulina en la que se inserta o elimina al menos un aminoácido, y el aminoácido insertado puede ser uno que no esté presente en la naturaleza (p. ej., aminoácido de tipo D), y el fragmento de insulina tiene una capacidad de control *in vivo* del nivel de glucosa en sangre.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “variante de insulina” se refiere a un péptido que tiene una diferencia en al menos una secuencia de aminoácidos con respecto a la insulina, y el péptido también tiene la capacidad de controlar el nivel de glucosa en sangre *in vivo*.

Los métodos utilizados en la preparación de agonistas de insulina, derivados, fragmentos y variantes pueden utilizarse independientemente o en combinación.

El análogo de insulina según la presente invención es como se define en la reivindicación 1. Se divulga en el presente documento, pero no se reivindica, cualquier péptido con un efecto *in vitro* mejorado en comparación con el de la insulina nativa mediante la introducción de sustitución, inserción o supresión de aminoácido(s), o una modificación postraducciona (por ejemplo, metilación, acilación, ubiquitinación y enlace covalente intermolecular) en las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NOS: 1 y 2) de la cadena A y la cadena B de la insulina nativa. Para la sustitución o inserción del aminoácido o aminoácidos, pueden utilizarse no sólo los 20 aminoácidos observados convencionalmente en las proteínas humanas, sino también aminoácidos atípicos o no naturales. Los aminoácidos atípicos pueden obtenerse comercialmente de Sigma-Aldrich, ChemPep, Genzyme pharmaceuticals, etc. Los péptidos que contienen estos aminoácidos y secuencias peptídicas típicas pueden sintetizarse o comprarse a empresas comerciales de síntesis peptídica, como American Peptide Company, Bachem (EE.UU.) y Anygen (Corea).

Los análogos de insulina según la presente invención, como se define en la reivindicación 1, incluyen una modificación o supresión en residuo(s) de aminoácido particular(es) de la cadena A y/o la cadena B de la insulina nativa. Específicamente, se modifica un residuo de aminoácido particular de la cadena A de la insulina nativa y, en una realización, también se elimina un residuo de aminoácido particular de la cadena B de la insulina nativa.

En una realización, como se define en la reivindicación 1 punto (i), el residuo de aminoácido 14º, tirosina, en la secuencia de aminoácidos de la cadena A representada por la SEQ ID NO: 1 se sustituye por ácido glutámico y el residuo de aminoácido 25º, fenilalanina, en la secuencia de aminoácidos de la cadena B representada por la SEQ ID NO: 2 se elimina.

Se divulgan en el presente documento, pero no se reivindican específicamente, análogos de insulina que incluyen la cadena A de la SEQ ID NO: 3 representada por la siguiente Fórmula General 1 y la cadena B de la SEQ ID NO: 4 representada por la siguiente Fórmula General 2. Los análogos de insulina de la presente invención se definen en la reivindicación 1.

5 Fórmula general 1

Xaa1-Ile-Val-Glu-Xaa2-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Xaa3-Leu-Xaa4-Gln-Xaa5-Glu-Asn-Xaa6-Cys-Xaa7 (SEQ ID NO: 3)

10 En la Fórmula General 1 anterior, Xaa1 es alanina, glicina, glutamina, histidina, ácido glutámico o asparagina;

Xaa2 es alanina, ácido glutámico, glutamina, histidina o asparagina;

Xaa3 es alanina, serina, glutamina, ácido glutámico, histidina o asparagina;

15 Xaa4 es alanina, tirosina, ácido glutámico, histidina, lisina, ácido aspártico o asparagina;

Xaa5 es alanina, leucina, tirosina, histidina, ácido glutámico o asparagina; Xaa6 es alanina, tirosina, serina, ácido glutámico, histidina o asparagina; y

20 Xaa7 es asparagina, glicina, histidina o alanina.

Fórmula general 2

25 Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Xaa8-Leu-Val- Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Xaa9-Tyr-Xaa10-Xaa11-Lys-Thr (SEQ ID NO: 4)

En la Fórmula General 2 anterior,

30 Xaa8 es tirosina, ácido glutámico o ácido aspártico, o está ausente;

Xaa9 es fenilalanina, o está ausente; Xaa10 es treonina, o está ausente; y

Xaa11 es prolina, ácido glutámico o ácido aspártico, o está ausente;

35 (en el que pueden excluirse los péptidos que incluyen la cadena A de la SEQ ID NO: 1 y la cadena B de la SEQ ID NO: 2).

En una divulgación ejemplar más específica, que no se reivindica específicamente, el análogo de insulina es un análogo de insulina, en el que, en la Fórmula General 1,

40 Xaa1 es glicina,

Xaa2 es glutamina,

Xaa3 es serina,

45 Xaa4 es alanina, ácido glutámico o asparagina,

Xaa5 es leucina, Xaa6 es tirosina, y

50 Xaa7 es asparagina; y

en la Fórmula General 2,

Xaa8 es tirosina o ácido glutámico,

55 Xaa9 es fenilalanina, o está ausente,

Xaa10 es treonina, y

60 Xaa11 es prolina, ácido glutámico o ácido aspártico, o está ausente.

En otra divulgación ejemplar específica más, que no se reivindica específicamente, el análogo de insulina es un análogo de insulina, en el que, en la Fórmula General 1,

65 Xaa1 es glicina,

Xaa2 es glutamina, Xaa3 es serina,

Xaa4 es ácido glutámico o asparagina,

5 Xaa5 es leucina,

Xaa6 es tirosina, y

Xaa7 es asparagina; y en la Fórmula General 2,

10 Xaa8 es tirosina,

Xaa9 es fenilalanina, o está ausente,

15 Xaa10 es treonina, y

Xaa11 es prolina, ácido glutámico o ácido aspártico, o está ausente.

20 En otra divulgación ejemplar específica más, que no se reivindica específicamente, el análogo de insulina incluye una cadena A de Fórmula General 1 y una cadena B, en la que, en la cadena B de la SEQ ID NO: 4, Xaa8 es tirosina, Xaa9 está ausente, Xaa10 es treonina, y Xaa11 es prolina, ácido glutámico, o ácido aspártico, o está ausente.

25 En otra divulgación ejemplar específica más, que no se reivindica específicamente, el análogo de insulina incluye una cadena A de Fórmula General 1 y una cadena B, donde, en la cadena B de la SEQ ID NO: 4, Xaa8 es tirosina, Xaa9 es fenilalanina, Xaa10 está ausente, y Xaa11 es prolina, ácido glutámico, o ácido aspártico, o está ausente.

30 En otra divulgación ejemplar específica más, que no se reivindica específicamente, el análogo de insulina se caracteriza porque, en la cadena A de la SEQ ID NO: 3, Xaa1 es glicina, Xaa2 es glutamina, Xaa3 es serina, Xaa4 es ácido glutámico, Xaa5 es leucina, Xaa6 es tirosina, y Xaa7 es asparagina, y en la cadena B de la SEQ ID NO: 4, Xaa8 es tirosina, Xaa9 es fenilalanina, Xaa10 es treonina, y Xaa11 es prolina, ácido glutámico, o ácido aspártico, o está ausente.

35 En otra divulgación ejemplar específica más, que no se reivindica específicamente, el análogo de insulina se caracteriza porque, en la cadena A de la SEQ ID NO: 3, Xaa1 es glicina, Xaa2 es glutamina, Xaa3 es serina, Xaa4 es asparagina, Xaa5 es leucina, Xaa6 es tirosina, y Xaa7 es asparagina, y en la cadena B de la SEQ ID NO: 4, Xaa8 es tirosina, Xaa9 es fenilalanina, Xaa10 es treonina, y Xaa11 es prolina, ácido glutámico, o ácido aspártico, o está ausente.

40 En otra divulgación ejemplar específica más, que no se reivindica específicamente, el análogo de insulina se caracteriza porque, en la cadena A de la SEQ ID NO: 3, Xaa1 es glicina, Xaa2 es glutamina, Xaa3 es serina, Xaa4 es ácido glutámico, Xaa5 es leucina, Xaa6 es tirosina, y Xaa7 es asparagina, y en la cadena B de la SEQ ID NO: 4, Xaa8 es tirosina, Xaa9 está ausente, Xaa10 es treonina, y Xaa11 es prolina, ácido glutámico, o ácido aspártico, o está ausente.

45 En otra divulgación ejemplar específica más, que no se reivindica específicamente, el análogo de insulina se caracteriza porque, en la cadena A de la SEQ ID NO: 3, Xaa1 es glicina, Xaa2 es glutamina, Xaa3 es serina, Xaa4 es alanina, Xaa5 es leucina, Xaa6 es tirosina, y Xaa7 es asparagina, y en la cadena B de la SEQ ID NO: 4, Xaa8 es ácido glutámico, Xaa9 está ausente, Xaa10 es treonina, y Xaa11 es prolina, ácido glutámico, o ácido aspártico, o ausente, pero no se limita a ello.

50 Se divulgan en el presente documento, pero no se reivindican, el análogo de insulina 1, el análogo de insulina 2 y el análogo de insulina 4. Se reivindica el análogo de insulina 3. Estos análogos de insulina son los siguientes:

i) Análogo de insulina 1: Un péptido en el que el residuo de aminoácido 14° de la secuencia de aminoácidos de la cadena A representada por la SEQ ID NO: 3 es ácido glutámico y el residuo de aminoácido 25° de la secuencia de aminoácidos de la cadena B representada por la SEQ ID NO: 4 es fenilalanina, que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 16 que está codificada por un ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 15.

ii) Análogo de insulina 2: Un péptido en el que el residuo de aminoácido 14° en la secuencia de aminoácidos de la cadena A representada por la SEQ ID NO: 3 es asparagina y el residuo de aminoácido 25° en la secuencia de aminoácidos de la cadena B representada por la SEQ ID NO: 4 es fenilalanina, que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 18 que está codificada por un ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 17.

iii) Análogo de insulina 3: Un péptido en el que el residuo de aminoácido 14° de la secuencia de aminoácidos de la cadena A representada por la SEQ ID NO: 3 es ácido glutámico y el residuo de aminoácido 25° de la secuencia de aminoácidos de la cadena B representada por la SEQ ID NO: 4 está suprimido, que tiene una secuencia de

aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 20 que está codificada por un ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 19.

iv) Análogo de insulina 4: Un péptido en el que el residuo de aminoácido 14° de la secuencia de aminoácidos de la cadena A representada por la SEQ ID NO: 3 es alanina y el residuo de aminoácido 16° de la secuencia de aminoácidos de la cadena B representada por la SEQ ID NO: 4 es ácido glutámico, y el residuo de aminoácido 25° está ausente, teniendo una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 22 que está codificada por un ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 21.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “efecto *in vitro*” se refiere a la captación de glucosa por un análogo de insulina, y se indica por el resultado de la medición de EC₅₀ sobre la captación de glucosa con respecto a las células 3T3-L1 derivadas de ratón diferenciadas en adipocitos.

Por ejemplo, cuando se midió el efecto *in vitro* de los análogos de insulina 1 a 3, el análogo de insulina 1 mostró un aumento del 238,4 % de la captación de glucosa, el análogo de insulina 2 mostró un aumento del 241,7 %, y el análogo de insulina 3 mostró un aumento del 705 % en comparación con el de la insulina nativa, respectivamente, confirmando así que los análogos de insulina divulgados en el presente documento exhiben un notable efecto *in vitro* de un aumento de 2 a 7 veces en comparación con el de la insulina nativa (Tabla 1).

En otro aspecto, la presente invención proporciona ácidos nucleicos que codifican los análogos de insulina anteriores, como se define en la reivindicación 2.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “ácido nucleico” se refiere a un desoxirribonucleótido (ADN) o ribonucleótido (ARN), incluidos el ADN genómico, el ADNc y el ARN transcrito a partir de ellos, y un nucleótido como unidad constitutiva básica no sólo incluye los nucleótidos naturales, sino también los análogos que presentan modificaciones en un azúcar o una base (Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, Nueva York, 1980; Uhlman y Peyman, Chemical Reviews, 90: 543-584, 1990). El ácido nucleico de la presente invención puede aislarse o prepararse utilizando tecnología estándar en biología molecular. Por ejemplo, el ácido nucleico de la presente invención puede prepararse mediante amplificación PCR utilizando secuencias de cebadores apropiadas basadas en la secuencia del gen de la insulina nativa (NM_000207.2, NCBI), y puede prepararse mediante tecnología de síntesis estándar utilizando un sintetizador de ADN automatizado.

En una realización, el ácido nucleico de la presente invención incluye la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 19. El ácido nucleico divulgado en el presente documento, pero no reivindicado, incluye las secuencias de nucleótidos representadas por la SEQ ID NOS: 15, 17 y 21. El ácido nucleico divulgado en el presente documento, pero no reivindicado específicamente, incluye todas las secuencias que tienen una homología de secuencia de al menos el 70 % con las secuencias representadas por la SEQ ID NOS: 15, 17, 19 y 21, preferiblemente al menos el 80 %, más preferiblemente al menos el 90 %, aún más preferiblemente al menos el 95 %, y lo más preferiblemente al menos el 98 %, y el péptido codificado por el ácido nucleico anterior puede unirse a receptores *in vivo* de insulina, exhibiendo así una actividad biológica sustancialmente igual a la de la insulina.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “homología” se refiere a un grado de similitud con una secuencia de aminoácidos dada de una proteína nativa de tipo salvaje o una secuencia polinucleotídica que codifica la misma, e incluye aquellas secuencias que tienen la identidad de los porcentajes descritos anteriormente o superiores a las secuencias de aminoácidos o secuencias polinucleotídicas de la presente invención. La homología puede determinarse comparando las dos secuencias dadas a simple vista o puede determinarse utilizando un algoritmo bioinformático que permita el análisis de una homología disponiendo las secuencias objeto de comparación. La homología entre las dos secuencias de aminoácidos dadas puede indicarse en forma de porcentaje. El algoritmo automatizado útil está disponible para su uso en los módulos de software informático GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA de Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group, Madison, WI, EE.UU.). El algoritmo de ordenación automatizado en los módulos mencionados incluye algoritmos de ordenación de secuencias de Needleman & Wunsch, Pearson & Lipman, y Smith & Waterman. Otros algoritmos útiles sobre ordenación de secuencias y determinación de homologías están automatizados en programas informáticos como FASTP, BLAST, BLAST2, PSIBLAST y CLUSTAL W.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un vector recombinante que incluye un ácido nucleico que codifica el análogo de insulina, como se define en la reivindicación 4. El vector recombinante según la presente invención puede construirse como un vector para clonación o expresión convencional, y puede construirse como un vector para utilizar una célula procariota o una célula eucariota como célula huésped.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “vector” se refiere a un vector recombinante capaz de expresar una proteína diana en una célula huésped apropiada, que es una construcción génica que incluye factores reguladores esenciales enlazados operablemente para permitir la expresión de un inserto de ácido nucleico. La presente invención incluye un vector recombinante que incluye un ácido nucleico que codifica un análogo de insulina, tal como se define en la reivindicación 4, y el análogo de insulina de la presente invención, tal como se define en la reivindicación 1, puede obtenerse mediante transformación o transfección del vector recombinante en una célula huésped.

En el vector recombinante según la presente invención, el ácido nucleico que codifica el análogo de insulina está enlazado operablemente a un promotor. Tal como se utiliza en el presente documento, el término “operativamente ligado” se refiere a una conexión funcional entre una secuencia reguladora para la expresión de ácido nucleico (por ejemplo, un promotor, una secuencia señal, un sitio de unión a ribosomas, una secuencia de terminación de la transcripción, etc.) y una secuencia de nucleótidos diferente, y la secuencia reguladora puede regular la transcripción y/o traducción de la secuencia de nucleótidos diferente por la misma.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “promotor” se refiere a una secuencia de ácido nucleico no traducida situada aguas arriba de una región codificante, que incluye un sitio de unión a la polimerasa y tiene la actividad de iniciar la transcripción de un gen situado aguas abajo de un promotor en ARNm, es decir, un dominio de ADN al que se une la polimerasa e inicia la transcripción de un gen, y está situado en el dominio 5' de inicio de la transcripción del ARNm.

Por ejemplo, cuando el vector de la presente invención es un vector recombinante y utiliza una célula procariota como célula huésped, en general, un promotor fuerte (por ejemplo, promotor *tac*, promotor *lac*, promotor *lacUV5*, promotor *lpp*, promotor *pL_A*, promotor *pR_A*, promotor *rac5*, promotor *amp*, promotor *recA*, promotor *SP6*, promotor *trp*, promotor *T7*, etc.) capaz de ejecutar la transcripción, un sitio de unión al ribosoma para el inicio de la traducción, y secuencias de terminación de la transcripción/traducción.

Además, el vector que se utilizará en la presente invención puede prepararse manipulando los plásmidos (p. ej, *pSC101*, *pGV1106*, *pACYC177*, *ColE1*, *pKT230*, *pME290*, *pBR322*, *pUC8/9*, *pUC6*, *pBD9*, *pHC79*, *pIJ61*, *pLAFR1*, *pHV14*, serie *pGEX*, serie *pET*, serie *pPICZα*, *pUC19*, etc.), fagos (por ejemplo, *λgt4-λB*, *λ-Charon*, *λΔz1*, *M13*, etc.), o virus (por ejemplo, SV40, etc.) que se utilizan habitualmente en la técnica.

Mientras tanto, cuando el vector de la presente invención es un vector recombinante y utiliza una célula eucariota como célula huésped, pueden utilizarse promotores derivados de los genomas de células de mamíferos (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o promotores derivados de los virus de mamíferos (por ejemplo, promotor tardío del adenovirus, promotor 7.5K del virus del papiloma, promotor del SV40, promotor del citomegalovirus y promotor tk del VHS) y, en general, el vector incluye una secuencia poliadenilada (por ejemplo, terminador de la hormona de crecimiento bovina y una secuencia poliadenilada derivada del SV40) como secuencia de terminación de la transcripción.

Además, el vector recombinante de la presente invención incluye un gen de resistencia a antibióticos comúnmente utilizado en la técnica como marcador selectivo, y puede incluir, por ejemplo, genes que tengan resistencia a ampicilina, gentamicina, carbenicilina, cloranfenicol, estreptomycin, kanamicina, geneticina, neomicina y tetraciclina.

El vector recombinante de la presente invención puede incluir adicionalmente una secuencia diferente para facilitar la purificación de las proteínas diana recogidas, es decir, un análogo de insulina de cadena simple, proinsulina o un análogo de la misma. La secuencia que se incluya adicionalmente puede ser una secuencia de etiqueta para la purificación de proteínas, por ejemplo, glutatión S-transferasa (Pharmacia, EE.UU.), una proteína de unión a maltosa (NEB, EE.UU.), FLAG (IBI, EE.UU.), 6-histidina, etc., pero los tipos de secuencia necesarios para la purificación de proteínas diana no están limitados a ello.

Las proteínas de fusión expresadas por el vector recombinante que incluye la secuencia de etiquetado anterior pueden purificarse mediante cromatografía de afinidad. Por ejemplo, cuando se fusiona la glutatión S-transferasa, puede utilizarse glutatión, que es el sustrato de la enzima, y cuando se utiliza la etiqueta 6-histidina, puede recogerse fácilmente una proteína diana deseada mediante una columna Ni-NTA.

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un transformante no humano que comprende el vector de expresión recombinante, como se define en la reivindicación 5.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “transformación” se refiere a un proceso de introducción de ADN en una célula huésped y de hacer que el ADN sea replicable en la misma como factor cromosómico o por finalización de la integración cromosómica, que es un fenómeno de causar artificialmente un cambio genético mediante la introducción de ADN exógeno en una célula.

El método de transformación utilizado puede ser cualquier método de transformación, y puede realizarse fácilmente según el método convencional utilizado en la técnica. Ejemplos del método de transformación comúnmente utilizado pueden incluir un método de precipitación CaCl_2 , el método Hanahan con eficacia mejorada utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como agente reductor en el método de precipitación CaCl_2 , electroporación, un método de precipitación CaPO_4 , un método de fusión de protoplastos, un método de agitación utilizando fibra de carburo de silicio, una transformación mediada por agrobacterias, una transformación utilizando PEG, sulfato de dextrano-, lipofectamina-, y transformaciones mediadas por secado/supresión, etc.

El método para transformar el vector recombinante que incluye un ácido nucleico que codifica un análogo de insulina puede no limitarse a estos métodos, sino que puede utilizarse sin limitación cualquier método de transformación o transfección comúnmente utilizado en la técnica.

El transformante de la presente invención puede obtenerse introduciendo un vector recombinante que incluye el ácido nucleico diana que codifica un análogo de insulina en una célula huésped. Ejemplos del hospedador apropiado pueden incluir una bacteria perteneciente al género *Escherichia* tal como *E. coli*, una bacteria perteneciente al género *Bacillus* como *Bacillus subtilis*, una bacteria perteneciente al género *Pseudomonas* como *Pseudomonas putida*, levaduras como *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, una célula de insecto como *Spodoptera frugiperda* (SF9) y células animales como CHO, COS y BSC. Preferiblemente, se utiliza *E. coli* como célula huésped.

Por ejemplo, la secuencia nucleotídica respectiva que codifica los análogos de insulina 1 a 3 se amplificó mediante PCR, y los fragmentos génicos amplificados se clonaron en el vector pET22b (Novagen). Para la expresión de los análogos de insulina en forma de un cuerpo de inclusión en una célula, el vector pET22b se trató con enzimas de restricción, *NdeI* y *BamHI*, para eliminar una secuencia de señal en el mismo, los productos amplificados por PCR de los análogos de insulina se trataron con las mismas enzimas de restricción, *NdeI* y *BamHI*, y el ADN aislado respectivo se insertó en el vector de clonación pET22b utilizando ADN ligasa T4. Los vectores de expresión así obtenidos se denominaron pET22b-análogos de insulina 1 a 4, respectivamente.

El vector de expresión pET22b-análogos de insulina 1 a 4 codifican respectivamente secuencias de aminoácidos representadas por la SEQ ID NOS: 16, 18, 20, y 22, bajo el control del promotor T7, y cada uno de los análogos de insulina se expresó en forma de un cuerpo de inclusión en una célula huésped, respectivamente.

El vector recombinante pET22b-análogos de insulina 1 a 4 que incluye ácidos nucleicos que codifican cada uno de los análogos de insulina de la SEQ ID NOS: 16, 18, 20 y 22 se transformaron en *E. coli*, respectivamente, y de este modo se obtuvieron transformantes que los expresaban en forma de cuerpo de inclusión.

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar un análogo de insulina usando los transformantes, como se define en la reivindicación 7.

Como se define en la reivindicación 7, este método para preparar un análogo de insulina incluye:

- a) preparar un vector de expresión recombinante que incluya un ácido nucleico que codifique el análogo de insulina;
- b) transformar el vector de expresión recombinante en una célula huésped y obtener de ella un transformante;
- c) cultivar el transformante y expresar el análogo de insulina; y
- d) aislar y purificar el péptido análogo de insulina expresado.

El medio utilizado en el cultivo de los transformantes debe cumplir los requisitos para el cultivo de la célula huésped de manera adecuada. Las fuentes de carbono que debe contener el medio para el crecimiento de una célula huésped pueden seleccionarse adecuadamente por decisión de un experto en la materia en función de los transformantes preparados con el mismo, y pueden seleccionarse condiciones de cultivo adecuadas para controlar el periodo y la cantidad de cultivo.

Ejemplos de la fuente de azúcar a utilizar pueden incluir azúcares e hidratos de carbono como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón y celulosa; aceites y grasas como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de ricino y aceite de coco; ácidos grasos como ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico; alcoholes como glicerol y etanol; y ácidos orgánicos como ácido acético. Estos materiales pueden utilizarse solos o combinados.

Ejemplos de la fuente de nitrógeno a utilizar pueden incluir peptona, extracto de levadura, salsa de carne, extracto de malta, licor de remojo de maíz, harina de soja y urea, o compuestos inorgánicos como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. La fuente de nitrógeno también puede utilizarse sola o combinada.

Ejemplos de la fuente de fósforo a utilizar pueden incluir dihidrogenofosfato de potasio o hidrogenofosfato de dipotasio o una sal correspondiente que contenga sodio. Además, el medio de cultivo puede contener una sal metálica, como sulfato de magnesio o sulfato de hierro, necesaria para el crecimiento del transformante. Además, pueden utilizarse materiales esenciales para el crecimiento, como aminoácidos y vitaminas. Además, también pueden utilizarse precursores apropiados para los medios de cultivo. Las fuentes mencionadas pueden añadirse adecuadamente a un cultivo durante el cultivo por lotes o continuo. El pH del cultivo puede ajustarse adecuadamente utilizando un compuesto básico, como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio y amoníaco, o un compuesto ácido, como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. Además, puede añadirse un agente antiespumante, como el éster poliglicólico de ácidos grasos, para evitar la formación de espuma. Además, para mantener el estado aeróbico del cultivo, puede inyectarse oxígeno o un gas que contenga oxígeno (por ejemplo, aire) en el cultivo. El transformante puede cultivarse entre 20 °C y 45 °C, y preferiblemente, entre 25 °C y 40 °C. Además, el cultivo se continúa hasta que se obtiene la cantidad máxima de producción de los análogos de insulina deseados, y a este respecto, el cultivo puede continuarse normalmente de 10 horas a 160 horas.

Como se ha descrito anteriormente, el transformante como se define en la reivindicación 5 puede producir análogos de insulina como se define en la reivindicación 1 cuando se proporcionan condiciones de cultivo apropiadas según las células huésped, y el péptido-N-glicosidasa producido por el mismo según la constitución del vector y las características de una célula huésped puede secretarse dentro del citoplasma o en el espacio periplásmico de la célula huésped o extracelularmente.

Las proteínas expresadas dentro o fuera de la célula huésped pueden purificarse por un método convencional.

Los ejemplos del método de purificación pueden incluir la eliminación de sales (por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, precipitación con fosfato de amonio, etc.), precipitación con disolventes (por ejemplo, precipitación de fracciones proteicas con acetona o etanol, etc.), diálisis, filtración en gel, intercambio iónico o cromatografía como cromatografía en columna reversa, ultrafiltración, etc., y estos métodos pueden utilizarse solos o combinados.

En una realización, el transformante de la presente invención se caracteriza en que los análogos de insulina se expresan a partir del vector recombinante pET22b-análogo de *insulina* 3 en forma de un cuerpo de inclusión bajo el control del promotor T7. En consecuencia, es preferible que el análogo de insulina 3, que se expresó en forma de un cuerpo de inclusión, se convierta en una forma soluble y luego se aísle y purifique.

Se divulga en el presente documento, pero no se reivindica, un transformante caracterizado porque los análogos de insulina 1 a 2 se expresan a partir del vector recombinante pET22b-análogos de *insulina* 1 a 2 en forma de un cuerpo de inclusión bajo el control del promotor T7. En la presente divulgación, es preferible que los análogos de insulina 1 a 2 que se expresaron en forma de un cuerpo de inclusión, se conviertan en una forma soluble y luego se aíslen y purifiquen.

En una realización ejemplar, la presente invención puede incluir además los siguientes pasos para aislar y purificar los análogos de insulina expresados en forma de cuerpo de inclusión a partir del transformante, como se define en la reivindicación 9:

d-1) obtención de las células transformantes del cultivo y pulverización de las mismas;

d-2) recuperar el péptido análogo de insulina expresado a partir del lisado celular pulverizado, seguido de un nuevo plegado del mismo;

d-3) purificación del péptido análogo de insulina replegado mediante cromatografía de intercambio catiónico;

d-4) tratar el péptido análogo de insulina purificado con tripsina y carboxipeptidasa B; y

d-5) purificar secuencialmente el péptido análogo de insulina tratado mediante cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de intercambio aniónico.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la diabetes como se define en la reivindicación 10.

La composición farmacéutica que contiene los análogos de insulina según la presente invención contiene un portador farmacéuticamente aceptable. Ejemplos del portador farmacéuticamente aceptable para administración oral pueden incluir un aglutinante, un deslizante, un agente desintegrador, un excipiente, un agente solubilizante, un agente dispersante, un agente estabilizante, un agente de suspensión, un agente colorante, un agente aromatizante, etc. Para formulaciones inyectables, se puede mezclar un agente tampón, un agente conservante, un analgésico, un agente isotónico, un agente estabilizador, etc.; y para formulaciones tópicas, se puede utilizar una base, un excipiente, un lubricante, un agente conservante, etc. El tipo de formulación de la composición farmacéutica para su uso según la presente invención puede prepararse de diversas maneras mediante la combinación con los portadores farmacéuticamente aceptables descritos anteriormente. Por ejemplo, para su uso en administración oral, la composición farmacéutica puede formularse en comprimidos, troqueles, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, etc. Para su uso en inyecciones, la composición farmacéutica puede formularse en ampollas monodosis o envases multidosis. Además, la composición farmacéutica también puede formularse en soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas y formulaciones de liberación sostenida.

Mientras tanto, ejemplos de portadores, excipientes y diluyentes adecuados pueden incluir lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma arábiga, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio, aceite mineral, etc. Además, la composición farmacéutica para uso según la presente invención puede contener además un relleno, un anticoagulante, un lubricante, un humectante, un agente aromatizante, un emulsionante, un conservante, etc.

Divulgado en el presente documento, pero no reivindicado, es un método para tratar la diabetes incluyendo la administración de una composición farmacéutica que contiene los análogos de insulina divulgados adjunto a un tema en necesidad de eso.

Los análogos de insulina divulgados en el presente documento exhiben un efecto *in vitro* significativamente mejorado en comparación con el de la insulina nativa, y por lo tanto se espera que la administración de una composición farmacéutica que contenga estos análogos de insulina pueda ser eficaz para tratar la diabetes.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “administración” se refiere a la introducción de un material particular a un paciente de una manera apropiada, y el conjugado de la presente invención puede administrarse a través de cualquiera de las rutas comunes siempre que el fármaco pueda llegar a un tejido diana. Por ejemplo, puede realizarse una administración intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, oral, tópica, intranasal, intrapulmonar e intrarrectal, pero la vía de administración no está limitada a ello. Sin embargo, dado que los péptidos se digieren en la administración oral, los principios activos de una composición para administración oral deben estar recubiertos o formulados para protegerlos contra la degradación en el estómago. Preferiblemente, la presente composición puede administrarse en forma inyectable. Además, la composición farmacéutica puede administrarse utilizando un determinado aparato capaz de transportar los principios activos a una célula diana.

Además, en el método de tratamiento de la diabetes divulgado pero no reivindicado en el presente documento, la composición farmacéutica puede estar determinada por los tipos de fármaco como componente activo, así como por varios factores relacionados, incluidos los tipos de enfermedades a tratar, las vías de administración, la edad, el sexo y el peso de un paciente, y la gravedad de la enfermedad. Dado que la composición farmacéutica divulgada en el presente documento tiene una duración y un título *in vivo* excelentes, puede reducir considerablemente la frecuencia de administración y la dosis de los fármacos divulgados en el presente documento.

[Modo para la invención]

En lo sucesivo, la presente invención se describirá en más detalle con referencia a los siguientes Ejemplos. Sin embargo, estos Ejemplos son sólo para fines ilustrativos, y la invención no pretende estar limitada por estos Ejemplos.

Ejemplo 1: Construcción de un vector de expresión para análogos de insulina

Para construir análogos de insulina en los que se modificaron aminoácidos de la cadena A y/o la cadena B de la insulina nativa, se sintetizaron pares de cebadores consistentes en un cebador directo y un cebador inverso para amplificar los análogos de insulina introducidos con la modificación correspondiente, y a continuación se realizó la PCR utilizando ADNc de proinsulina como plantilla. En particular, se utilizó como molde el ADNc de proinsulina (SC128255, OriGene) (véanse las secuencias: BC005255.1 y AAH05255) se clonó en el vector *pET22b* (Novagen), y para la expresión recombinante suave de la insulina, la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 23 (ATG GCA ACA ACA TCA ACA GCA ACT ACG CGT), que codifica la secuencia de aminoácidos de Met Ala Thr Thr Ser Thr Ala Thr Thr Arg (SEQ ID NO: 24), se insertó en el ADNc clonado de proinsulina como socio de fusión N-terminal.

Específicamente, en la presente invención, se sintetizaron los siguientes análogos de insulina incluyendo las modificaciones de aminoácidos mostradas en la Tabla 1.

[Tabla 1]

	Modificación de aminoácidos
Análogo de insulina 1	A ¹⁴ Tyr → Glu
Análogo de insulina 2	A ¹⁴ Tyr → Asn
Análogo de insulina 3	A ¹⁴ Tyr → Glu + delección B ²⁵
Análogo de insulina 4	A ¹⁴ Tyr → Ala + B ¹⁶ Tyr → Glu, delección B ²⁵

En la Tabla 1 anterior, el análogo de insulina 1 es un análogo que incluye una sustitución del aminoácido 14° en la secuencia de aminoácidos de la cadena A de la insulina nativa representada por la SEQ ID NO: 1, es decir, tirosina, por ácido glutámico;

el análogo de insulina 2 es un análogo que incluye una sustitución del aminoácido 14° en la secuencia de aminoácidos de la cadena A de la insulina nativa representada por la SEQ ID NO: 1, es decir, tirosina, por asparagina;

el análogo de insulina 3 es un análogo según la presente invención que incluye una sustitución del aminoácido

14° en la secuencia de aminoácidos de la cadena A de la insulina nativa representada por la SEQ ID NO: 1, es decir, tirosina, por ácido glutámico, y una supresión del aminoácido 25° en la secuencia de aminoácidos de la cadena B de la insulina nativa representada por la SEQ ID NO: 2, es decir, fenilalanina, y

el análogo de insulina 4 es un análogo que incluye una sustitución del aminoácido 14° en la secuencia de aminoácidos de la cadena A de la insulina nativa representada por la SEQ ID NO: 1, es decir, tirosina, por alanina, y una sustitución del aminoácido 16° en la secuencia de aminoácidos de la cadena B de la insulina nativa representada por la SEQ ID

NO: 2, es decir, tirosina, por ácido glutámico y una supresión del aminoácido 25° en la secuencia de aminoácidos de la cadena B de la insulina nativa representada por la SEQ ID NO: 2, es decir, fenilalanina.

Los respectivos pares de cebadores de avance y cebadores de retroceso diseñados para la amplificación de los análogos de insulina 1 a 3 se muestran en la Tabla 2 a continuación.

[Tabla 2]

	Secuencia	SEQ ID NO
10	Análogo de insulina 1 5'-ccagcatctgctccctcgaacagctggagaactactg-3'	5
	5'-cagtagttctccagctgttcgaggagcagatgctgg-3'	6
15	Análogo de insulina 2 5'-cagcatctgctccctcaaccagctggagaactac-3'	7
	5'-gtagtctccagctggttgaggagcagatgctg-3'	8
20	Análogo de insulina 3 5'-ccagcatctgctccctcgaacagctggagaactactg-3'	5
	5'-cagtagttctccagctgttcgaggagcagatgctgg-3'	6
	5'-gctgggaacgaggtcttacaccaagaccgc-3'	9
	5'-cggtcttggtgtgtagaagcctcgttcccg-3'	10
25	Análogo de insulina 4 5'-cagcatctgctccctcgccagctggagaactac-3'	11
	5'-gtagtctccagctggcgaggagcagatgctg-3'	12
	5'-ctggtggaagctcgagctagtgtcggggaac-3'	13
	5'-gttcccgacactagctcgagagctccaccag-3'	14
30	5'-gctgggaacgaggtcttacaccaagaccgc-3'	9
	5'-cggtcttggtgtgtagaagcctcgttcccg-3'	10

En la Tabla 2 anterior, el par de cebadores formado por la SEQ ID NOS: 5 y 6 se diseñó para la sustitución del aminoácido 14° en la secuencia de aminoácidos de la cadena A de la insulina nativa, es decir, tirosina, por ácido glutámico; el par de cebadores SEQ ID NOS: 7 y 8 se diseñó para la sustitución del aminoácido 14° de la secuencia de aminoácidos de la cadena A de la insulina nativa, es decir, tirosina, por asparagina; el par de cebadores SEQ ID

NOS: 9 y 10 se diseñó para la supresión del aminoácido 25° de la secuencia de aminoácidos de la cadena B de la insulina nativa, es decir, fenilalanina; el par de cebadores SEQ ID NOS: 11 y 12 se diseñó para sustituir el aminoácido 14° de la secuencia de aminoácidos de la cadena A de la insulina nativa, es decir, tirosina, por alanina; y el par de cebadores SEQ ID NOS: 13 y 14 se diseñó para sustituir el aminoácido 16° de la secuencia de aminoácidos de la cadena B de la insulina nativa, es decir, tirosina, por ácido glutámico.

A fin de realizar la PCR para la amplificación de los análogos de insulina que incluyen las modificaciones correspondientes, se preparó una solución de reacción mezclando 150 ng de ADN molde, 1 mL de cada uno de los cebadores 100 pM, 5 mL de dNTP 2.5 mM, 10 unidades de polimerasa pfx (Invitrogen, EE.UU.), y una solución tampón 10X. La solución de reacción se sometió a una desnaturalización inicial a 95 °C durante 30 segundos, seguida de 18 ciclos repetidos de recocido a 95 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 68 °C durante 6 minutos, y finalmente se dejó a 68 °C durante 5 minutos. Los productos amplificados por PCR así obtenidos se extrajeron utilizando un kit de extracción en gel (Qiagen, Alemania) y se trataron con enzimas de restricción, NdeI y BamHI, para preparar fragmentos de inserción. A continuación, el vector pET22b (Novagen, EE.UU.) se escindió con las mismas enzimas de restricción y los fragmentos se extrajeron utilizando el mismo kit de extracción en gel. Los fragmentos de inserción anteriores se ligaron en el vector así preparado utilizando ligasa T4 para preparar el vector de expresión pET22b-análogos de insulina 1 a 4. Los vectores de expresión incluyen ácidos nucleicos que codifican las secuencias de aminoácidos de los análogos de insulina 1 a 4 bajo el control del promotor T7, y los vectores pueden expresar las proteínas análogas a la insulina en forma de cuerpo de inclusión en una célula huésped.

El vector de expresión así obtenido pET22b-análogo de insulina 1 divulgado en el presente documento, pero no reivindicado, incluye un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 15, que codifica el análogo de insulina que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 16; el vector de expresión así obtenido pET22b-análogo de insulina 2 divulgado en el presente documento, pero no reivindicado, incluye un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 17, que codifica el análogo de insulina que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 18; el vector de expresión así obtenido pET22b-análogo de insulina 3 según la presente invención incluye un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 19, que codifica el análogo de insulina que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 20; y el vector de expresión obtenido de este modo pET22b-análogo de insulina 4 divulgado en el presente documento, pero no reivindicado, incluye un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 21, que codifica el análogo de insulina que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 22

Las secuencias de ADN y las secuencias de proteínas de cada uno de los análogos de insulina 1 a 4 se muestran en la Tabla 3 a continuación.

[Tabla 3]

		Secuencia	SEQ ID NO
5	Análogo de insulina 1	ADN	15
10		TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC GAA CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC TGA	
15		Proteína	16
20	Análogo de insulina 2	ADN	17
25		TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC AAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC TGA	
30		Proteína	18
35	Análogo de insulina 3	ADN	19
40		TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC GAA CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC TGA	
45		Proteína	20
50	Análogo de insulina 4	ADN	21
55		TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC GAG CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC GCC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC TGA	
60		Proteína	22
		Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Glu Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Ala Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	

Ejemplo 2: Expresión de análogos recombinantes de la insulina

65 La expresión recombinante de análogos de insulina según la presente invención bajo el control del promotor T7 se realizó como sigue. *E. coli* BL21-DE3 (*E. coli* B F-dcm ompT hsdS(rB mB⁻) gal λDE3) (Novagen, USA) se transformó con cada uno

de los vectores de expresión de análogos de insulina preparados en el Ejemplo 1. La transformación se realizó siguiendo un método recomendado por Novagen, el fabricante de *E. coli* BL21-DE3. Se recogió cada colonia transformada con los vectores de expresión de análogos de insulina, se inoculó en un medio 2X de caldo Luria (LB) que contenía 50 µg/mL de ampicilina y se cultivó a 37 °C durante 15 horas. El cultivo de *E. coli* recombinante y el medio LB 2X que contenía un 30 % de glicerol se mezclaron en una proporción 1:1 (v/v), se alicuotó 1 mL de la mezcla en cada criotubo, respectivamente, y se almacenó a -140 °C. El resultado se utilizó como reserva celular para producir análogos recombinantes de la insulina.

Para la expresión de análogos de insulina recombinantes, se disolvió un vial de cada caldo celular en 500 mL de LB 2X y se incubó en un baño de agua con agitación mantenido a 37 °C durante 14 horas a 16 horas. La incubación se detuvo cuando el valor de DO alcanzó 5,0 o más, y el cultivo se utilizó como cultivo semilla. El cultivo semilla se inoculó en 17 L de un medio de fermentación utilizando un fermentador de 50 L (MSJ-U2, B.E. MARUBISHI, Japón) y se inició la fermentación inicial por lotes. El cultivo se realizó a 37 °C a una velocidad de agitación de 500 rpm con 20 L/min (1 vvm) de suministro de aire mientras se mantenía el pH a 6,70 con agua amoniacada al 30 %. En cuanto al progreso de la fermentación, cuando los nutrientes del medio de cultivo eran limitados, la fermentación se llevó a cabo en un cultivo por lotes alimentado mediante la adición de una solución de alimentación. El crecimiento de las bacterias se controló en función de los valores de DO, y cuando el valor de DO alcanzó 100 o más, se introdujo en él IPTG a una concentración final de 500 µM. El cultivo continuó durante unas 23 a 25 horas después de la introducción. Una vez finalizado el cultivo, las bacterias recombinantes se recuperaron por centrifugación y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Ejemplo 3: Aislamiento y purificación de análogos recombinantes de insulina

Para el aislamiento y purificación de los análogos de insulina recombinantes expresados en el Ejemplo 2 a partir de los transformantes, se disgregaron las células como se muestra a continuación, seguido de un nuevo plegamiento con el fin de cambiar los análogos de insulina expresados en forma de un cuerpo de inclusión insoluble en agua a una forma soluble en agua.

<3-1> Recuperación y refolding de análogos recombinantes de insulina

Específicamente, cada pellet celular se resuspendió en una solución tampón solubilizante de 1 L (50 mM Tris-HCl (pH 9,0), 1 mM EDTA (pH 8,0), 0,2 M NaCl, y 0,5 % Triton X-100), y las células se disgregaron usando un microfluidizador M-110EH (AC Technology Corp. Modelo M1475C) a una presión de 15,000 psi. Los lisados celulares disgregados se centrifugaron a 7.000 rpm y 4 °C durante 20 minutos y se desechó el sobrenadante. El resultante se resuspendió en 3 L de un tampón de lavado (0,5 % Triton X-100, 50 mM Tris (pH 8,0), 0,2 M NaCl y 1 mM EDTA). Se centrifugó a 7.000 rpm y 4 °C durante 20 minutos, y el precipitado resultante se resuspendió en agua destilada, seguido de centrifugación de la misma manera. Cada uno de los pellets resultantes se resuspendió en 400 mL de una solución tampón (1 M de glicina, 3,78 g de cisteína-HCl, pH 10,6) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Para recuperar los análogos de insulina recombinantes resuspendidos, se añadieron 400 mL de urea 8 M y se agitó a 40 °C durante 1 hora. Para volver a plegar los análogos de insulina recombinantes solubilizados, se centrifugó el resultante a 7.000 rpm y 4 °C durante 20 minutos, y se recuperó el sobrenadante. El sobrenadante se agitó a 4 °C durante 16 horas mientras se añadían 7,2 L de agua destilada utilizando una bomba peristáltica a un caudal de 1000 mL/hora.

<3-2> Purificación por cromatografía de intercambio catiónico

Las muestras en las que se completó el refolding en el Ejemplo <3-1> se cargaron respectivamente en una columna de intercambio catiónico (Source S, GE Healthcare), que se equilibró con una solución tampón de citrato sódico 20 mM (pH 2,0) que contenía etanol al 45 % para conjugarlo con ella. A continuación, las proteínas análogas a la insulina se eluyeron de la columna con un gradiente de concentración lineal de 0 % a 100 % en 10 volúmenes de columna utilizando una solución tampón de citrato sódico 20 mM (pH 2,0) que contenía cloruro potásico 0,5 M y etanol al 45 %.

<3-3> Tratamiento con tripsina y carboxipeptidasa B

Se eliminaron las sales de las muestras eluidas en el Ejemplo <3-2> utilizando una columna de desalinización, seguida de la sustitución de una solución tampón (10 mM Tris-HCl, pH 8,0). Las muestras se trataron con tripsina, que corresponde a una relación molar de 1000 con respecto a la cantidad de proteína de la muestra, y carboxipeptidasa B, que corresponde a una relación molar de 2000 con respecto a la cantidad de proteína de la muestra, y se agitaron a 16 °C durante 16 horas. La reacción se detuvo bajando el pH a 3,5 utilizando citrato sódico 1 M (pH 2,0).

<3-4> Purificación por cromatografía de intercambio catiónico

Las muestras en las que se completó la reacción en el Ejemplo <3-3> se volvieron a cargar respectivamente en una columna de intercambio catiónico (Source S, GE Healthcare) que se equilibró con una solución tampón de citrato sódico 20 mM (pH 2,0) que contenía etanol al 45 % para conjugarlo con ella. A continuación, las proteínas análogas a la insulina se eluyeron de la columna con un gradiente de concentración lineal de 0 % a 100 % en 10 volúmenes de columna utilizando una solución tampón de citrato sódico 20 mM (pH 2,0) que contenía cloruro potásico 0,5 M y etanol al 45 %.

<3-5> Purificación de la cromatografía de intercambio aniónico

Las sales se eliminaron de las muestras eluidas en el Ejemplo <3-4> utilizando una columna de desalación, seguida de la sustitución de una solución tampón (10 mM Tris-HCl, pH 7,5). Para el aislamiento de análogos puros de insulina a partir de las muestras así obtenidas, los resultantes se cargaron respectivamente en una columna de intercambio aniónico (Source Q, GE Healthcare) equilibrada con una solución tampón Tris 10 mM (pH 7,5) para ser conjugados. A continuación, las proteínas análogas a la insulina se eluyeron de la columna con un gradiente de concentración lineal de 0 % a 100 % en 10 volúmenes de columna utilizando una solución tampón Tris 10 mM (pH 7,5) que contenía cloruro sódico 0,5 M.

La pureza de los análogos de insulina purificados se analizó mediante electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) y cromatografía de fase inversa y de exclusión por tamaño, y los resultados se muestran en las FIG. 1 y FIG. 2, respectivamente. Además, las modificaciones en aminoácidos se confirmaron mediante mapeo peptídico y el análisis del peso molecular de cada pico, y los resultados se muestran en la FIG. 3.

Como resultado, se confirmó que había una modificación en una secuencia de aminoácidos para cada uno de los análogos de insulina según sus fines deseados.

Ejemplo 4: Comparación del efecto *in vitro* entre la insulina nativa y los análogos de insulina

Para medir el efecto *in vitro* de los análogos de insulina aislados y purificados en el Ejemplo 3, se realizó un experimento sobre la capacidad de absorción de glucosa (capacidad de captación de glucosa o de síntesis de lípidos) utilizando una línea celular 3T3-L1 derivada de ratón, que se diferenció en adipocitos. La línea celular 3T3-L1 (ATCC, CL-173) se subcultivó utilizando Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, Cat. No. 12430) con un 10 % de suero de ternera bovina recién nacida (NBCS) dos o tres veces por semana. La línea celular 3T3-L1 se suspendió en un medio de diferenciación (DMEM con un 10 % de FBS), se inoculó en una placa de 48 pocillos a una concentración de 5×10^4 células/pocillo y se cultivó a 37 °C durante 48 horas. Para la diferenciación de la línea celular 3T3-L1 en adipocitos, se trató el medio de diferenciación con 1 µg/mL de insulina humana (Sigma, n.º de cat. I9278), 0,5 mM de IBMX (3-isobutil-1-metilxantina, Sigma, n.º de cat. I5879) y 1 µM de dexametasona (Sigma, n.º de cat. D4902), se retiró el medio existente y se alicuotó la mezcla en cada pocillo en una cantidad de 250 µL/pocillo. Cuarenta y ocho horas después, el medio se sustituyó por un medio de diferenciación al que sólo se añadió 1 µg/mL de insulina humana. A continuación, se confirmó la inducción de la diferenciación de la línea celular 3T3-L1 en adipocitos durante un periodo de 7 a 9 días mientras se sustituía el medio por el medio de diferenciación que contenía 1 µg/mL de insulina humana a intervalos de 48 horas.

Para el experimento sobre la capacidad de absorción de glucosa, las células que completaron su diferenciación en adipocitos se lavaron una vez con un medio DMEM libre de suero, y luego se trataron con 250 µL del medio DMEM libre de suero durante 4 horas para inducir el agotamiento de suero en el mismo.

La insulina humana y los análogos de insulina se sometieron respectivamente a una dilución en serie de 10 veces desde 5 µM hasta 0,005 nM utilizando medio DMEM libre de suero para ser utilizados como muestras. Las muestras de insulina así preparadas se añadieron respectivamente a las células en una cantidad de 250 µL, y se cultivaron a 37 °C durante 24 horas en una incubadora con 5 % de CO₂. Para medir la cantidad de glucosa restante en el medio en el que se había completado el cultivo, se recogió cada muestra de cultivo en una cantidad de 200 µL, se diluyó 5 veces con D-PBS y se sometió al análisis GOPOD (GOPOD Assay Kit, Megazyme, n.º de cat. K-GLUC). La concentración de la glucosa restante se calculó basándose en la absorbancia de una solución estándar de glucosa, los valores de EC₅₀ sobre la capacidad de absorción de glucosa de los análogos de insulina se calcularon respectivamente, y los resultados se muestran en la Tabla 4 a continuación.

[Tabla 4]

	Capacidad de captación de glucosa (en relación con la insulina nativa) (%)
Insulina humana nativa	100
Análogo de insulina 1	238.4
Análogo de insulina 2	241,7
Análogo de insulina 3	705

Como se muestra en la Tabla 4, el análogo de insulina 1 mostró un aumento del 238,4 % de la capacidad de captación de glucosa, el análogo de insulina 2 mostró un aumento del 241,7 %, y el análogo de insulina 3 mostró un aumento del 705 %, en comparación con el de la insulina nativa, respectivamente.

A partir de los resultados anteriores, se confirmó que los análogos de insulina exhiben un efecto *in vitro* notable de un aumento de 2 a 7 veces en comparación con el de la insulina nativa, y estos resultados indican que los análogos de insulina pueden aumentar significativamente su vida media en suero *in vivo* y, por lo tanto, pueden proporcionarse como formulaciones estables de insulina, siendo así utilizados eficazmente como agente terapéutico para tratar la diabetes.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido análogo de insulina que comprende una cadena A de la SEQ ID NO: 3 indicada en la siguiente Fórmula General 1 y una cadena B de la SEQ ID NO: 4 indicada en la siguiente Fórmula General 2:

(Fórmula general 1)

Xaa1-Ile-Val-Glu-**Xaa2**-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-**Xaa3**-Leu-**Xaa4**-Gln-**Xaa5**-Glu-Asn-**Xaa6**-Cys-**Xaa7**
(SEQ ID NO: 3); y

(Fórmula general 2)

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-**Xaa8**-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-**Xaa9**-Tyr-**Xaa10**-**Xaa11**-Lys-Thr(SEQ ID NO: 4)

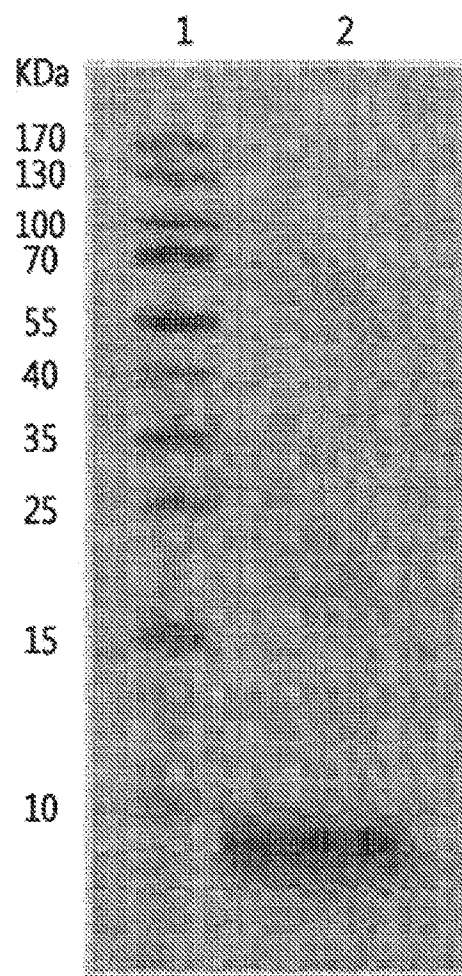
en donde:

(i) en la cadena A de la SEQ ID NO: 3, Xaa1 es glicina, Xaa2 es glutamina, Xaa3 es serina, Xaa4 es ácido glutámico, Xaa5 es leucina, Xaa6 es tirosina, y Xaa7 es asparagina, y en la cadena B de la SEQ ID NO: 4, Xaa8 es tirosina, Xaa9 está ausente, Xaa10 es treonina, y Xaa11 es prolina, opcionalmente en donde el péptido comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 20; o

(ii) en la cadena A de la SEQ ID NO: 3, Xaa1 es glicina, Xaa2 es glutamina, Xaa3 es serina, Xaa4 es ácido aspártico, Xaa5 es leucina, Xaa6 es tirosina y Xaa7 es asparagina, y en la cadena B de la SEQ ID NO: 4, Xaa8 es tirosina, Xaa9 es fenilalanina, Xaa10 es treonina y Xaa11 es prolina.

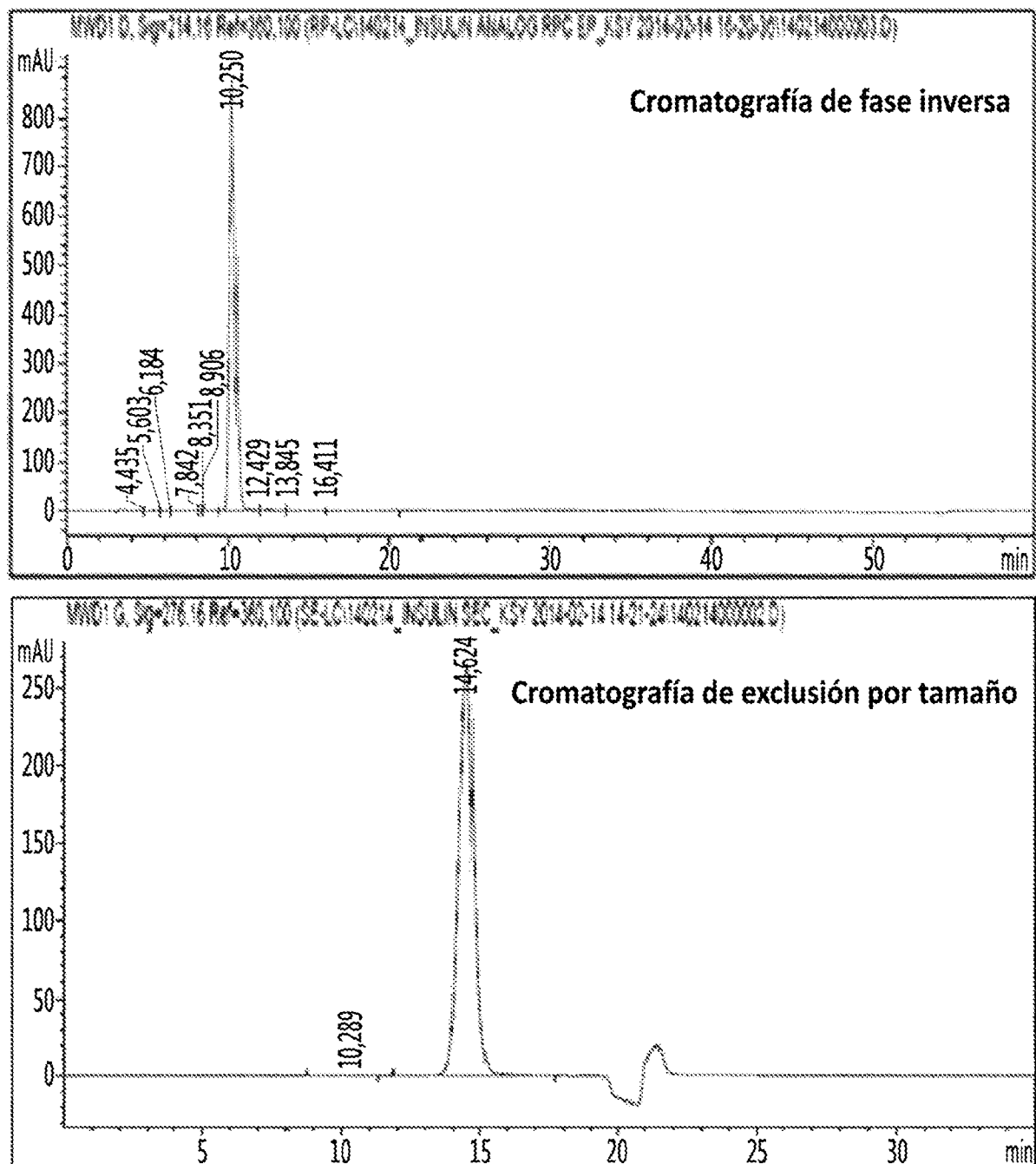
2. Un ácido nucleico que codifica el péptido análogo de insulina según la reivindicación 1.
3. El ácido nucleico de la reivindicación 2, en donde el ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 19.
4. Un vector de expresión recombinante que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 2.
5. Un transformante no humano que comprende el vector de expresión recombinante según la reivindicación 4.
6. El transformante de la reivindicación 5, en donde el transformante es *E. coli*.
7. Un método de preparación del péptido análogo de insulina según la reivindicación 1, que comprende:
- a) preparar un vector de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica el péptido análogo de insulina según la reivindicación 1;
- b) transformar el vector de expresión recombinante en una célula hospedadora y obtener un transformante a partir de ella, opcionalmente en donde el transformante es *E. coli*;
- c) cultivar el transformante y expresar el péptido análogo de insulina; y
- d) aislar y purificar el péptido análogo de insulina expresado.
8. El método de la reivindicación 7, en donde el ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 19.
9. El método de la reivindicación 7, en donde el aislamiento y la purificación comprenden:
- d-1) obtener las células transformantes del cultivo y pulverizar las mismas;
- d-2) recuperar el péptido análogo de insulina expresado a partir del lisado celular pulverizado, seguido de un replegado del mismo;
- d-3) purificar el péptido análogo de insulina replegado por cromatografía de intercambio catiónico;
- d-4) tratar el péptido análogo de insulina purificado con tripsina y carboxipeptidasa B; y
- d-5) purificar secuencialmente el péptido análogo de insulina tratado por cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de intercambio aniónico.
10. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la diabetes que comprende el péptido análogo de insulina según la reivindicación 1 y un portador farmacéuticamente aceptable.

[Figura 1]



1. Marcador de tamaño
2. Análogo de insulina

[Figura 2]



[Figura 3]

