

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 423 684**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/62 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2007 E 07785903 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2013 EP 2041170**

(54) Título: **Procedimiento para preparar análogos de insulina con extremo de cadena B dibásico**

(30) Prioridad:

11.07.2006 DE 102006031955

(73) Titular/es:

**SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH
(100.0%)
BRÜNINGSTRASSE 50
65929 FRANKFURT AM MAIN, DE**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.09.2013

(72) Inventor/es:

**HABERMANN, PAUL y
ZOCHER, FRANK**

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 423 684 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

Procedimiento para preparar análogos de insulina con extremo de cadena B dibásico.

La invención se refiere a un procedimiento para preparar una insulina con extremo de cadena dibásico, en el que se prepara de forma biotecnológica un precursor de la misma y, a continuación, en una reacción de ligadura catalizada enzimáticamente con lisinamida o argininamida, o lisina o arginina modificadas por grupos protectores y, opcionalmente, subsiguiente hidrólisis, se convierte en esta insulina.

Alrededor de 177 millones de personas en el mundo padecen diabetes mellitus. Esta cifra incluye aproximadamente 17 millones de diabéticos de tipo I, en los que el tratamiento de sustitución para la ausencia de secreción de insulina endocrina es actualmente la única terapia posible. Los afectados dependen de inyecciones de insulina, normalmente varias veces al día, durante toda la vida. Al contrario que en la diabetes de tipo I, en la diabetes de tipo II no existe en principio una deficiencia de insulina, si bien en un gran número de casos, especialmente en la fase avanzada, el tratamiento con insulina, combinado eventualmente con un antidiabético oral, se considera como la forma de terapia más favorable.

En personas sanas, la liberación de insulina está estrechamente vinculada a la concentración de glucosa en sangre.

Las concentraciones elevadas de glucosa en sangre tales como las que se producen después de las comidas se compensan rápidamente por un correspondiente aumento en la secreción de insulina. En ayunas, la concentración de insulina en plasma se reduce hasta un valor basal que es suficiente para asegurar un suministro continuo de glucosa a órganos y tejidos sensibles a la insulina, y para mantener baja la producción de glucosa hepática durante la noche. Por lo general, en la sustitución de la secreción de insulina endógena con administración de insulina exógena, a menudo por vía subcutánea, no se alcanza la calidad de la regulación fisiológica de la glucosa en sangre descrita anteriormente. Son frecuentes las restructuraciones ascendentes o descendentes de la concentración de glucosa en sangre que, en sus formas más graves, pueden ser potencialmente mortales. Además, las concentraciones elevadas de glucosa en sangre a lo largo de varios años representan, incluso en ausencia de síntomas iniciales, un considerable riesgo para la salud. El estudio DCCT a gran escala realizado en EE.UU. (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993) *N. Engl. J. Med.* 329, 977-986) demuestra inequívocamente que las concentraciones de glucosa en sangre crónicamente elevadas son esencialmente responsables del desarrollo de complicaciones diabéticas tardías. Las complicaciones diabéticas tardías son lesiones micro- y macrovasculares que, bajo determinadas circunstancias, se manifiestan, entre otras, como retinopatías, nefropatías o neuropatías y provocan ceguera, insuficiencia renal y pérdida de las extremidades,

asociándose además con un mayor riesgo de trastornos cardiovasculares. De todo esto se deduce que un tratamiento mejorado de la diabetes debe aspirar principalmente a mantener la glucosa en sangre dentro de un intervalo lo más fisiológico posible. El concepto de tratamiento intensivo con insulina pretende conseguirlo mediante múltiples inyecciones diarias de preparaciones de insulina de acción rápida y lenta. Las formulaciones de acción rápida se administran a las horas de las comidas para compensar el aumento postprandial en la glucosa en sangre.

Las insulinas basales de acción lenta deben asegurar el suministro básico de insulina, especialmente durante la noche, sin que se produzca una hipoglucemía.

La insulina es un polipéptido formado por 51 aminoácidos divididos en 2 cadenas de aminoácidos: la cadena A con 21 aminoácidos y la cadena B con 30 aminoácidos. Las cadenas se unen entre sí por 2 puentes disulfuro. Las preparaciones de insulina se han empleado desde hace muchos años para el tratamiento de la diabetes. Por otra parte, no sólo se usan insulinas disponibles en la naturaleza, sino que más recientemente se emplean también derivados y análogos de insulina.

Los análogos de insulina son análogos de insulinas de origen natural, a saber insulina humana o insulinas animales, que difieren por la sustitución de al menos un resto aminoácido de origen natural con otros restos aminoácidos y/o la adición/deletión de al menos un resto aminoácido de la insulina de origen natural correspondiente que, por lo demás, es idéntica. El documento US 5.656.722 describe, por ejemplo, derivados de insulina des-Phe^(B1). Los restos aminoácidos agregados y/o sustituidos pueden incluir también restos que no se encuentran presentes de forma natural.

Los derivados de insulina son derivados de insulinas de origen natural o análogos de insulina, en los que se sustituye uno o múltiples restos aminoácidos y/o los extremos N o C-terminales de las cadenas A y/o B con grupos funcionales. Los grupos funcionales se seleccionan de un grupo que contiene restos amida, restos amina, restos carboxilo, restos alquilo, restos alcohol y restos alcoxi.

Un tratamiento de insulina eficaz recurre al uso de las llamadas insulinas basales. Por esta expresión se entienden formulaciones que hacen posible una liberación lenta y continua de la insulina administrada de manera exógena. De esta manera, se consigue una concentración de insulina basal en el organismo durante un periodo prolongado, con efectos ventajosos sobre el estado fisiológico de la persona enferma de diabetes.

El análogo recombinante de la insulina humana Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32) (insulina glargina) se distingue por que sólo se debe administrar al organismo cada 24 horas, es decir, una vez al día para lograr un efecto basal. La administración una vez al día mejora la calidad de vida. La fisiología mejorada conduce, por ejemplo, a una

reducción del nivel de Hba1c y cabe esperar que, gracias a esta mejora, las consecuencias tardías de la diabetes se manifiesten - si lo hacen - considerablemente más tarde, lo que permite prolongar la esperanza de vida del diabético afectado.

- 5 La demanda de este análogo de la insulina es correspondientemente elevada. Puesto que el número de diabéticos aumenta de forma continua, la minimización de los costes de preparación de los correspondientes análogos reviste un gran interés económico. En el documento US 5.656.722 se describe la posible preparación de análogos de insulina mediante una proteína de fusión de preproinsulina que consiste en una porción de fusión ("porción pre") y una variante de proinsulina de mono. Uno de los análogos descritos comprende glicina en vez de asparagina en la posición A(21). La proteína de fusión correspondiente es una variante del precursor peptídico para la preparación de insulina glargina. El procedimiento prevé que, a partir de esta proteína de fusión, se separen la porción pre y el péptido C por reacción con tripsina. El documento EP-A 0 668 292 describe una proteína de fusión que sigue el mismo principio, pero permite preparar insulina glargina a través de un procedimiento mejorado con respecto al del documento US 5.656.722. En este sentido, para el experto resulta evidente que, en especial en el límite de las cadenas B y C de la insulina que se define por la estructura dibásica Arg-Arg, es posible llevar a cabo una escisión parcial que da lugar a un análogo de insulina humana mono-Arg B31. Este producto defectuoso se debe retirar del verdadero compuesto de interés. Esto conduce a una considerable disminución del rendimiento. El problema se puede eludir por la preparación por tecnología génica de proinsulinas y la reacción de estas con una endoproteasa específica tal como, por ejemplo, lisil endopeptidasa, haciendo reaccionar, en una estrategia de química semisintética de péptidos, la insulina humana des-B30 (análogo) resultante con el tripéptido Thr-Arg-Arg. Los documentos EP-A 0 132 769 y WO 2003/044210 describen que los grupos reactivos del tripéptido deben estar protegidos durante la reacción. Los grupos protectores se eliminan después de la reacción. Esta vía se asocia con los costes originados por la preparación del tripéptido por síntesis química y la introducción de grupos protectores. Igualmente, sería deseable disponer de un procedimiento que permita preparar análogos de insulina Arg(B31), Arg(B32) a partir del precursor de insulina humana Arg(B31).
- 10 25 La solicitud de patente alemana No. 10 2005 046 113.1 (no publicada) describe un procedimiento que incluye la ligadura catalizada con tripsina de aminoácidos con amidación C-terminal a péptidos cuyo aminoácido C-terminal está formado por lisina o arginina. Los rendimientos observados en este caso son sorprendentemente altos y, por otra parte, la reacción de acoplamiento se puede llevar a cabo sin enmascaramiento con grupos protectores. La reacción tiene lugar en un medio no acuoso. Ahora se ha encontrado sorprendentemente que es posible el acoplamiento de amida arginina o amida lisina a análogos de insulina B31, alcanzando altos rendimientos. De manera sorprendente, resulta posible, además, controlar la reacción con el fin de que se formen preferiblemente análogos de insulina de la forma amida de la insulina humana Arg(B31), Arg(B32) o de la forma amida de la insulina humana Arg(B31), Lys(B32). En este caso, el rendimiento es mayor que 60%. El grupo amido se puede eliminar por hidrólisis ácida al final de la reacción. Sorprendentemente, se ha encontrado asimismo que, como alternativa al uso 30 35 40 45 50 de lisinamida o argininamida, en la reacción se puede utilizar arginina o lisina que pueden ser portadoras de un grupo protector. Los grupos protectores que se pueden mencionar a modo de ejemplo son terc-butiloxicarbonilo (Boc) o dimetoxifenilpropiloxicarbonilo (DZZ). Puesto que en la bibliografía se describe que, en particular, los derivados de arginina protegidos pueden ser inestables en diferentes disolventes, para el experto resulta evidente que en la química de los péptidos existe un continuo desarrollo de nuevos grupos protectores que determinan una estabilidad mejorada. En función de los grupos protectores o de los grupos amido, es posible influir favorablemente sobre el rendimiento por la variación de las condiciones de reacción. Este hecho es conocido por el experto y también es objeto de la invención. De este modo, el producto de escisión parcial insulina humana B(31), que en la preparación de insulina glargina o análogos de insulina Arg(B31), Arg(B32) comparables, obtenidos a partir de precursores de preproinsulina (documento US 5.656.722), está disponible para preparar el producto de valor. En este caso, no es necesario preparar las proteínas de fusión correspondientes de manera intracelular. El experto sabe también que se pueden preparar análogos de proinsulina por expresión bacteriana, con la subsiguiente secreción en el periplasma y/o en el sobrenadante del cultivo. Por ejemplo, esto se describe en la solicitud de patente europea EP-A 1 364 029. Es objeto de la invención igualmente el uso de precursores de insulina humana Arg(B31), que se generan directamente después de la expresión, a partir de dichos procedimientos bacterianos.
- 55 Existe, además, un aspecto técnico adicional del procedimiento que también es objeto de la invención. La solicitud de patente europea EP-A 0 347 781 o las solicitudes de patente europea EP-A 1 364 030 y EP-A 1 364 032, describen procedimientos basados en levaduras para la preparación de miniproinsulinas con altos rendimientos. La ampliación de este procedimiento u otro similar para la preparación de miniproinsulinas con los restos aminoácidos descritos en la patente de EE.UU. 5.656.722, es decir Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asp o Glu en la posición A21, permite que estas miniproinsulinas se transformen en los análogos de insulina Arg(B31), Arg(B32) inmediatamente después de la escisión en la insulina bicatenaria.

60 Si, tal como se describe en el documento EP-A 1 364 032, la expresión se lleva a cabo mediante una proteína de fusión, es conveniente no separar la porción pre con tripsina o endoproteasas similares. En su lugar, se incorpora un sitio de escisión que puede ser reconocido por una endoproteasa específica que no escinde el derivado de insulina, para eliminar la porción pre o de fusión correspondientes. Por ejemplo, se mencionan enteroquinasas (DDDDK) o el factor Xa (IEGR). También esto constituye un objeto de la invención. En este caso, resulta evidente para el experto que las dos reacciones de escisión pueden transcurrir en una reacción de un único paso. Otra posibilidad consiste

en eliminar la porción de fusión sólo en una etapa posterior. Como porción de la proteína de fusión se pueden seleccionar, en este caso, derivados de un gran número de proteínas segregadas eficazmente. Para el caso de bacterias se pueden mencionar, por ejemplo, DHFR (dihidrofolato reductasa), glutatión S-transferasa e hirudina. Para la secreción de levaduras, se pueden usar, por ejemplo, albúmina o sus derivados, superóxido dismutasa o derivados, interleuquina 2 o derivados, e hirudina o derivados. En la presente solicitud, se usa, por ejemplo, un derivado de hirudina como porción de fusión tanto para la expresión bacteriana como para la expresión en levaduras. A este respecto, se ha encontrado de forma sorprendente que es posible modificar adicionalmente la secuencia de la hirudina mediante la introducción de una secuencia peptídica de histidinas consecutivas y/o una secuencia peptídica DDDDK, que representa el sitio de reconocimiento para la enteroquinasa, sin afectar desfavorablemente al plegado de la porción de miniproinsulina. Para ello, se pueden aplicar métodos de cromatografía de afinidad. También esto es objeto de la invención.

El experto además es consciente de que los sistemas de expresión descritos a modo de ejemplo sólo representan un pequeño segmento de los sistemas de hospedador/vector desarrollados para la preparación recombinante de proteínas. Los sistemas de hospedador/vector que permiten la preparación de péptidos diana también forman parte de la invención.

Objeto de la invención es también la preparación de análogos de insulina que se distinguen por la presencia de los restos aminoácidos Arg(B31), Arg(B32) o Arg(B31), Lys(B32), a partir de precursores de insulina humana Arg(B31) de los análogos mediante ligadura catalizada con tripsina con arginina o lisina. Para el experto resulta evidente, en este sentido que, debido a la sorprende selectividad de la reacción, la reacción de ligadura se puede repetir a lo largo de múltiples ciclos de reacción, de forma que se pueden obtener análogos de insulina portadores de aminoácidos básicos adicionales lisina o arginina más allá de las posiciones B31 y B32. Esto se consigue llevando a cabo una reacción de acoplamiento capaz de desamidar o desproteger los aminoácidos terminales, y empleando nuevamente el producto en un correspondiente ciclo de reacción posterior. Dichos productos se pueden obtener asimismo usando como precursor un análogo que tenga ya Arg(B31), Arg(B32) o Arg(B31), Lys(B32). Es posible, asimismo, preparar análogos que comprendan en la posición B31 y siguientes cualquier aminoácido genéticamente codificable que no necesita ser arginina o lisina en la secuencia, pero cuyo extremo C-terminal se distinga por la secuencia dibásica Arg-Arg, Arg-Lys, Lys-Lys o Lys-Arg.

Por lo tanto, la reacción no está limitada al uso de tripsina como catalizador. El experto sabe que, además de las tripsinas de rata, bovina, porcina o humana conocidas y disponibles en el comercio, u otras isoenzimas o derivados o variantes de las mismas, se pueden usar también las siguientes enzimas: catepsina, tripsina a partir de *Fusarium oxysporum* y a partir de *Streptomyces* (*S. griseus*, *S. exfoliatus*, *S. erythraeus*, *S. fradiae* y *S. albidoflavus*), triptasa, mastina, acrosina, calicreína, hepsina, prostasina I, lisil endopeptidasa (Lisina-C) y endoproteinasa Arg-C (clostripaína).

Por lo tanto, objeto de la invención es un procedimiento para preparar un análogo de insulina o un derivado del mismo, en el que:

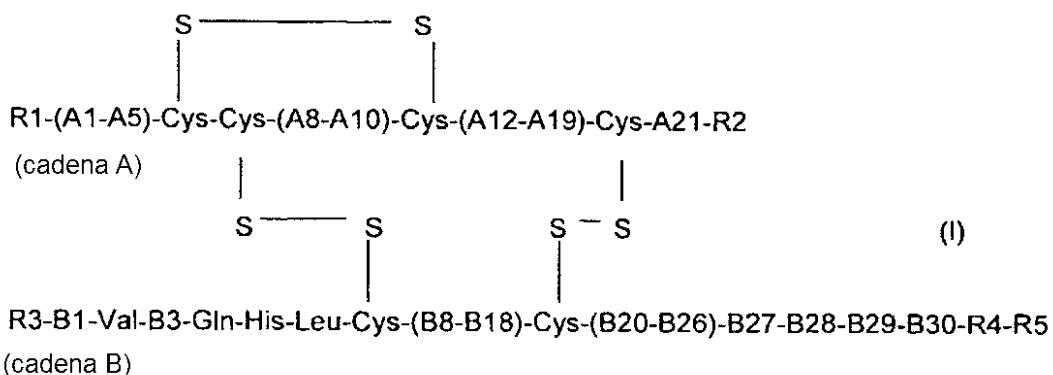
a un análogo de insulina inicial o un derivado del mismo, cuyo aminoácido C-terminal de la cadena A y/o B se selecciona de un grupo que comprende aminoácidos básicos, de origen natural o sus análogos o derivados, en uno de dichos aminoácidos C-terminales

y en presencia de una enzima con la actividad biológica de tripsina

40 se agrega un aminoácido básico, de origen natural, amidado o protegido con un grupo protector en el extremo C terminal, seleccionado del grupo que contiene Lys y Arg,

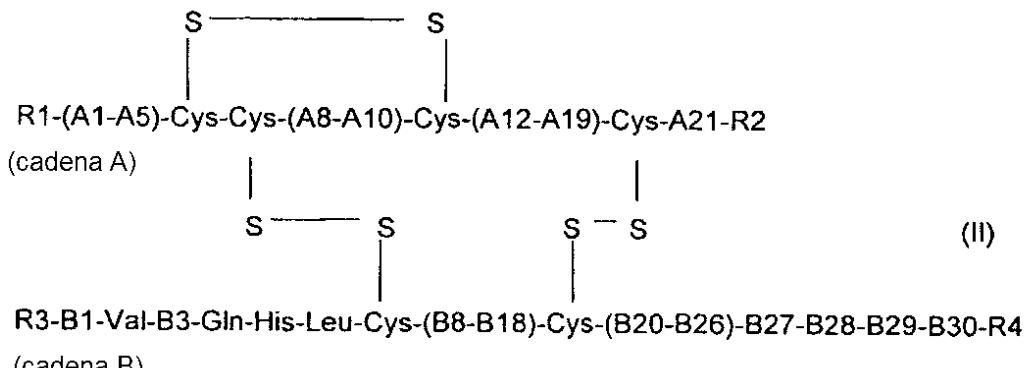
y el análogo de insulina modificado que se obtiene se purifica y, opcionalmente, se escinde el grupo amido o el grupo protector C-terminal del aminoácido agregado o del péptido agregado,

en donde el análogo de insulina se distingue por la fórmula general I



en la que significan:

- (A1-A5) los restos aminoácidos en las posiciones A1 a A5 de la cadena A de insulina humana o insulina animal,
 - 5 (A12-A19) los restos aminoácidos en las posiciones A12 a A19 de la cadena A de insulina humana o insulina animal,
 - A21 un resto aminoácido de origen natural,
 - (B8-B18) los restos aminoácidos en las posiciones B8 a B18 de la cadena B de insulina humana o insulina animal,
 - 10 (B20-B26) los restos aminoácidos en las posiciones B20 a B26 de la cadena B de insulina humana o insulina animal,
 - (A8-A10) los restos aminoácidos en las posiciones A8 a A10 de la cadena A de insulina humana o insulina animal,
 - B30 un enlace químico o un resto aminoácido de origen natural,
 - B1 un enlace químico o un resto aminoácido de origen natural,
 - 15 B3 un resto aminoácido de origen natural,
 - B27, B28 y B29 un resto aminoácido de origen natural,
 - R1 un grupo amino o uno a tres restos aminoácidos de origen natural,
 - R2 un grupo carboxi o uno a tres restos aminoácidos de origen natural,
 - 20 R3 un grupo amino o uno a tres restos aminoácidos de origen natural,
 - R4 un aminoácido básico,
 - R5 un resto aminoácido básico, cuyo extremo C-terminal está libre o amidado,
- en donde el resto aminoácido cuyo extremo C-terminal está unido al extremo N terminal de R5, se selecciona de un grupo que comprende Arg y Lys; y
- 25 en donde el análogo de insulina inicial se distingue por la fórmula general II



en donde R1, (A1-A5), (A8-A10), (A12-A19), A21, R2, R3, B1, B3, (B8-B18), (B20-B26), B27, B28, B29, B30 y R4 se definen como en la reivindicación 1, y el resto aminoácido C-terminal de la cadena B se selecciona de un grupo que comprende Arg y Lys.

- 5 Un objeto adicional de la invención es un procedimiento como el que se ha descrito anteriormente, en el que el aminoácido básico de origen natural, amidado o protegido en su extremo C-terminal con un grupo protector, es una arginina protegida en su extremo C-terminal con un grupo protector Boc C-terminal.

10 Un objeto adicional de la invención es un procedimiento como el que se ha descrito anteriormente, en el que el análogo de insulina modificado es insulina humana Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32), cuyo extremo C-terminal de la cadena B está amidado, en donde el análogo de insulina inicial es, en particular, insulina humana Gly(A21), Arg(B31).

15 Un objeto adicional de la invención es un procedimiento como el que se ha descrito anteriormente, en el que el análogo de insulina inicial se prepara por expresión recombinante de una proteína precursora que comprende la cadena A y la cadena B del análogo de insulina inicial, en particular un procedimiento en el que se expresa un gen que es parte de un replicón.

20 Un objeto adicional de la invención es un procedimiento como el que se ha descrito anteriormente, en el que como célula hospedadora se usa una bacteria o una levadura.

25 Un objeto adicional de la invención es un procedimiento como el que se ha descrito anteriormente, en el que de la proteína precursora se separa después de la expresión, en particular en el que se aisla la proteína precursora del sobrenadante celular de bacterias o levaduras.

30 Un objeto adicional de la invención es un procedimiento como el que se ha descrito anteriormente, en el que la proteína precursora se aisla del periplasma de una bacteria.

35 Un objeto adicional de la invención es un procedimiento como el que se ha descrito anteriormente, en el que la proteína precursora obtenida según cualquiera de las reivindicaciones citadas, se somete a un proceso de plegado y escisión enzimática.

40 Un objeto adicional de la invención es un procedimiento como el que se ha descrito anteriormente, en el que el análogo de insulina inicial se prepara por expresión directa recombinante.

45 Un objeto adicional de la invención es un procedimiento como el que se ha descrito anteriormente, en el que la enzima con la actividad biológica de tripsina se selecciona de un grupo que comprende tripsina humana, tripsina porcina, tripsina bovina y una variante de tripsina humana, tripsina porcina y tripsina bovina.

50 Un objeto adicional de la invención es un procedimiento como el que se ha descrito anteriormente, en el que el extremo C-terminal de la cadena B del análogo de insulina modificado queda desprotegido por medio de una reacción de hidrólisis.

55 Un objeto adicional de la invención es un procedimiento como el que se ha descrito anteriormente, en que el análogo de insulina obtenido es insulina humana Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32).

60 A continuación, la invención se explica con más detalle por medio de algunos ejemplos de realización. Estos ejemplos de realización no limitan la invención.

Ejemplo 1: Preparación de insulina Arg(B31), Gly(A21) a partir de una proteína de fusión después de plegado *in vitro*.

La patente US 5.663.291 describe en su Ejemplo 1 la obtención de una proteína de fusión de insulina correctamente plegada de la estructura:

**MATTSTGNSA RFVNQHLCGS HLVEALYLVC GERGFFYTPK TRREAEDPQV
GQVELGGPG AGSLQPLALE GSLQKRGIVE QCCTSICSLY QLENYCG (SEC ID NO.:1)**

Este material se convierte de acuerdo con el ejemplo V de la patente US 5.227.293 por reacción con tripsina en insulina de doble cadena, y se aíslan insulina Arg(B31), Arg(B32), Gly(A21) e insulina Arg(B31), Gly(A21).

5 De este modo, es posible obtener el análogo de insulina Arg(B31), Arg(B32), Gly(A21) directamente, en tanto que se puede emplear el producto secundario Arg(B31), Gly(A21) como precursor para la ligadura catalizada con tripsina con arginina o lisina modificadas.

Ejemplo 2: Preparación de insulina Arg(B31), Gly(A21) a partir de una proteína de fusión obtenida por secreción y que contiene proinsulina correctamente plegada.

10 De manera alternativa al Ejemplo 1, también se pueden preparar proteínas de fusión por secreción en sistemas bacterianos. En este caso, la estructura de la proinsulina como parte de la proteína de fusión está correctamente plegada y se puede renunciar a la etapa de replegado *in vitro*. La solicitud de patente WO 02/068660 propone un sistema de este tipo. Por ejemplo, cuando en el plásmido pBpfuHir_Ins que se describe en el Ejemplo 1 de esta solicitud de patente internacional se sustituye el codón para Asn(A21) con un codón para Gly(A21), se obtiene una proteína de fusión a partir de la cual se puede obtener, por ejemplo, insulina glargina y se puede aislar como producto secundario insulina humana Arg(B31), Gly(A21), tal como se describe en el Ejemplo 1.

Para preparar la secuencia, se requiere un nuevo cebador insu_a21_gly_rev que tiene la siguiente estructura:

5'- TTTTTAACGCTTGTCACTCATTAGCC GCAGTAGTTCTCCAGCTG-3' (SEC ID NO.: 2)

20 De manera análoga a la solicitud de patente WO 02/068660, este cebador se utiliza con el cebador pfu1 sobre el ADN del plásmido pBpfuHir_ins en una PCR. A partir del producto de PCR se aísla un fragmento BamH1/Hind3 que, según el ejemplo de la solicitud de patente WO 02/068660, se puede clonar. Despues de la expresión, se aísla una proteína de fusión, que se continúa tratando de acuerdo con el Ejemplo 1 de la presente solicitud.

Para el experto resultará evidente que el precursor de insulina humana Arg(B31), Gly(A21) también se puede obtener directamente por secreción bacteriana de una proteína de fusión. Esto es también objeto de la invención.

25 **Ejemplo 3:** Preparación de insulina Arg(B31), Arg(B32), Gly(A21) a partir de un precursor de Arg(B31), Gly(A21) por acoplamiento con argininamida

Se disuelven 100 mg de insulina L-Arg 21A-Gly-30B en 0,95 ml de solución de argininamida (446 g/l), 0,13 ml de tampón de acetato de Na M (pH 5,8), y se añaden 2 ml de DMF. La mezcla de reacción se enfria a 12°C y se inicia con la adición de 0,094 ml de tripsina (0,075 mg, Roche Diagnostics).

30 Después de 8 h, la reacción se detiene añadiendo TFA hasta pH 2,5 y se analiza por HPLC. Se forma >60% de insulina humana Arg(B31), Arg(B32), Gly(A21). Tras la adición de solución inhibidora de tripsina, se lleva a cabo la purificación del análogo amidado, en analogía con el documento US 5.656.722. A continuación, el análogo de insulina amidado se hidroliza en presencia de ácido durante varias horas para dar insulina humana Arg(B31), Arg(B32), -Gly(A21).

35 **Ejemplo 4:** Preparación de insulina humana Arg(B31), Lys(B32), Gly(A21) a partir de un precursor de insulina humana Arg(B31), Gly(A21) por acoplamiento con lisinamida

Se disuelven 100 mg de insulina L-Arg 21A-Gly-30B en 0,93 ml de solución de lisinamida (400 g/l), 0,13 ml de tampón de acetato de Na M (pH 5,8), y se añaden 2 ml de DMF. La mezcla de reacción se enfria a 12°C y se inicia con la adición de 0,094 ml de tripsina (0,075 mg, Roche Diagnostics).

40 Después de 8 h, la reacción se detiene añadiendo TFA hasta pH 2,5 y se analiza por HPLC. Se forma insulina humana Arg(B31), Lys(B32)-NH₂, Gly(A21) que, tras la adición de solución inhibidora de tripsina, se purifica, en analogía con el documento US 5.656.722. A continuación, el análogo de insulina amidado se hidroliza en presencia de ácido durante varias horas, para dar insulina humana Arg(B31), Lys(B32), Gly(A21).

45 **Ejemplo 5:** Preparación de insulina Arg(B31), Arg(B32), Gly(A21) a partir de un precursor de Arg(B31), Gly(A21) por acoplamiento con H-Arg (Boc)2-OH

En un recipiente Eppendorf, se mezclan 0,25 mg de insulina humana Arg(B31), Gly(A21) con 11 µl de tampón de acetato de piridina 0,1 M (pH 5,6), 60 µl de una solución de 130 g/l de H-Arg(Boc)2-OH x HCl en tampón de acetato de piridina 0,1 M (pH 5,6) y 119 µl de DMF, y se incuba con tripsina (Roche Diagnostics) a 12°C, durante algunas

horas.

La reacción se detiene agregando una mezcla de 25% de agua, 25% de acetonitrilo y 50% de ácido trifluoroacético. La mezcla se liofiliza y para separar el grupo protector, se disuelve en 1 ml de TFA y se deja reposar a temperatura ambiente durante aproximadamente 3 horas. La purificación de la insulina humana Arg(B31), Arg(B32)-NH₂, Gly(A21) se lleva a cabo, por ejemplo, de forma análoga al documento US 5.656.722.

Ejemplo 6: Preparación de insulina Arg(B31), Lys(B32), Gly(A21) a partir de un precursor de Arg(B31), Gly(A21) por acoplamiento con H - Lys (Boc)-OtBu

Se disuelven 50 mg de insulina humana Arg(B31), -Gly(A21) en 0,62 ml de solución de H-Lys (Boc)-OtBu (0,5 g/ml, pH 5) y se agrega 1 ml de N,N-dimetilformamida (DMF). La mezcla se enfria a 12°C y se agregan 2 mg de tripsina (Roche Diagnostics).

Después de más de 10 horas, la reacción se detiene por adición de 2 ml de una mezcla de acetonitrilo/agua al 50% y 1 ml de TFA (100%). La mezcla se liofiliza y para separar el grupo protector Boc, se disuelve en 1 ml de TFA y se deja reposar a temperatura ambiente durante aproximadamente 3 horas. La purificación de Arg(B31), Lys(B32), OH tiene lugar, por ejemplo, de forma análoga al documento US 5.656.722.

Ejemplo 7: Secuencia de genes para la secreción de una proteína de fusión de hirudina e insulina Arg(B31), Gly(A21) por levadura de panadería.

La solicitud de patente EP-A 1 364 032 propone el uso de hirudina como miembro de fusión para la expresión y secreción de otras proteínas de valor, farmacéuticamente interesantes, en levaduras.

El Ejemplo 1 de la solicitud de patente EP-A 1 364 032 describe un sistema de hospedador-vector para preparar una proteína de fusión, que se compone de un derivado de hirudina y miniproinsulina. Este sistema se puede usar, por ejemplo, para preparar miniproinsulinas que en la posición A21 el aminoácido asparagina por aminoácidos tal como se describe en el documento US 5.656.722.

El vector de expresión se puede construir de manera análoga al ejemplo de la solicitud de patente EP-A 1 364 032, sustituyendo el cebador insnco1rev y se diseña de manera que se modifica el codón en la posición A21.

Para preparar la secuencia codificadora de insulina humana Arg(B31), Gly A(21) se sintetiza, por ejemplo, el cebador siguiente:

ins_gly_a21_rev

5'-TTTTTCCATGGGTCGACTATCAGCCACAGTAGTTTCCAGCTGG-3' (SEC ID NO.: 3)

En este caso, el cebador cubre por completo el segmento génico que codifica los aminoácidos A15-A21 del análogo de insulina. Si se combina este cebador con el cebador SEC ID NO:4 del Ejemplo 1 de la solicitud y se utiliza el plásmido pADH2Hir_ins como molde, se puede generar por PCR un fragmento de ADN que, después de la digestión con las enzimas de restricción KpnI y Ncol, se inserta en el correspondiente vector de expresión abierto y que contiene la proteína de fusión deseada.

El vector recibe la designación pADH2Hir_ins_glyA21. La proteína de fusión se expresa y se procesa de acuerdo con la solicitud de patente EP-A 1 364 032 para dar miniproinsulina Gly(A21) que, de acuerdo con el Ejemplo 2, se transforma en insulina humana Arg(B31), Lys(B32), Gly(A21).

Ejemplo 8: Secuencia de genes para la secreción directa del precursor Arg(B31), Gly(A21) por levadura de panadería.

Se usa ADN del plásmido pADH2Hir_ins_glyA21 descrito en el Ejemplo 7, para preparar una construcción de vector para la secreción directa de insulina humana Arg(B31), Gly A(21).

Se sintetizan los siguientes cebadores.

alfa_insf1

5'-TTTTTGGATCCTTCCAATAAAAGATTGTTAACCAACACTGTGTG-3'(SEC ID NO.: 4)

Este cubre la secuencia del extremo C-terminal del factor-alfa, codones para Lys-Arg y del extremo N-terminal de la secuencia de miniproinsulina.

ins_gly_rev2

5'-TTTTTCCATGGTCGCTATCAGCCACAGTAGTTTCCAGCTGG-3' (SEC ID NO.: 5)

El cebador hibrida con el extremo 3' de la secuencia del análogo de insulina clonada en el plásmido pADH2Hir_ins_glyA21. Por medio de una PCR (condiciones estándar) se genera un fragmento de ADN que, después de digestión con las enzimas de restricción KpnI y NcoI, se inserta en el correspondiente vector de expresión abierto y que contiene la proteína de fusión deseada. Las células competentes de la cepa de levadura se transforman. Las transformantes se expresan a continuación del modo descrito en el Ejemplo 7. La miniproinsulina Arg(B31), Gly(A21) se aísla por métodos conocidos (documento EP-A 0 229 998) y se transforma en insulina humana Arg(B31), Lys(B32), Gly(A21) según el Ejemplo 2.

Ejemplo 9: Secuencia de genes para la secreción de una proteína de fusión de hirudina e insulina humana Arg(B31), Gly(A21) por *Pichia pastoris*

10 La clonación del vector de expresión tiene lugar de manera análoga al Ejemplo 4 de la solicitud de patente EP-A 1 364 032. En vez del cebador de la secuencia pichia_H_Irev2 se emplea, en este caso, el cebador ins_gly_rev2 que permite posteriormente la posibilidad de expresión de insulina humana Gly(A21) con el producto de PCR:

5'-TTTTGGCGCCGAATTCACTACTATTAGCCACAGTAGTTTCCAGCTGG-3' (SEC ID NO.:6)

15 El plásmido resultante se designa pPich_Hir_ins-GlyA21. La purificación de miniproinsulina Arg(B31), Gly(A21) como material de partida para generar un análogo con extremo de cadena dibásico se lleva a cabo de la forma que se ha descrito.

Ejemplo 10: Secuencia de genes para la secreción directa del precursor Arg(B31), Gly(A21) por *Pichia pastoris*

20 El vector de expresión correspondiente se construye de manera análoga al Ejemplo 7. Se requieren el ADN del plásmido pPich_Hir_ins-GlyA21 y dos cebadores pich_insgly_dirf y pich_insgly_dirrev

pich_insgly_dirf

5'-TTTTTTCTCGAGAAAAGATTGTTAACCAACACTTGTGTG-3' (SEC ID NO.:7)

pich_insgly_dirrev

5'-TTTTTT GGCGCCGAATTCACTACTATTAGCCAC-3' (SEC ID NO.:8)

25 **Ejemplo 11:** Preparación de insulina Arg(B31), Gly(A21) a partir de una proteína de fusión que se obtiene por secreción de levaduras, y que contiene la proinsulina correctamente plegada y cuya porción de fusión comprende una secuencia de aminoácidos His₆

El ADN del plásmido pADH2Hir_ins_glyA21 sirve como molde. Se sintetizan dos cebadores:
alfa_LT_H6_hirf y alfa_LT_H6_hirrev

30 alfa_LT_H6_hirt1 :

5'- GCACCATCATCACCATCACTATACTGACTGCACTGAATC -3' (SEC ID NO.:9)

El cebador contiene los codones para 6 histidinas en serie y los aminoácidos 3-8 y 9 (parcialmente) de la secuencia de Refludan®.

alfa_LT_H6_hirf2 :

35 5'- GAAGGGGTACTTGGATAAAAGACTTACGCACCATCATCAC -3' (SEC ID NO.:10)

El cebador contiene los codones para 6 histidinas en serie, los codones para los aminoácidos 1 y 2 de la secuencia de la lepirudina y las secuencias del factor-alfa que incluyen el sitio de procesamiento de Lys-Arg, y cubren el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción Kpn 1. El ADN del plásmido pADH2Hir_ins_glyA21 sirve como molde en una PCR estándar con cebadores alfa_LT_H6_hirf1 e ins_gly_a21_rev del Ejemplo 7 de la presente solicitud. El

40 producto de la reacción se aísla y se emplea una parte alícuota como molde para una segunda PCR con los cebadores alfa_LT_H6_hirf2 e ins_gly_a21_rev. El producto de reacción se procesa con KPN1 y Nco1 de la forma descrita, y entonces se clona. Se forma el plásmido pADH2_LT_H6_Hir_ins_glyA21: después de la transformación de Y79 con ADN del plásmido, se expresa la proteína de fusión. Las células se separan del sobrenadante por centrifugación, y el sobrenadante se concentra mediante filtros de membrana, por ejemplo de la Cía. Sartorius, y

45 después por cromatografía de afinidad de Ni²⁺, siguiendo el protocolo para el sistema de purificación ProBond® de la Cía. Invitrogen . Después de retirar el tampón de elución por diálisis y/o filtración, o filtración sobre gel como alternativa, se puede procesar la proteína de fusión de manera conocida para dar insulina humana Arg (B31), Gly (A21) y transformarla después en insulina glargina.

Ejemplo 12: Preparación de insulina humana Arg (B31), Gly (A21) a partir de una proteína de fusión que se obtiene por secreción de levaduras, que comprende la proinsulina correctamente plegada y cuya proteína de fusión se elimina con la enzima enterokinasa

El ADN del plásmido pADH2Hir_ins_glyA21 sirve como material de partida. Se usan los cebadores ins_gly_a21_rev del Ejemplo 7 de la presente solicitud, e hirf1 del Ejemplo 1 de la solicitud WO 02/070722 A1. Para este fin, se preparan dos nuevos cebadores:

Hir_entero_insf

5 5'- CTTCAG GACGATGACGATAAATTGTTAACCAACACTTGTGTGG-3' (SEC ID NO.:11)

El cebador cubre los aminoácidos B1-B7 y B8 (parcialmente) de la secuencia de miniproinsulina, y contiene los codones para la secuencia de aminoácidos Asp-Asp-Asp-Asp-Lys, que representan el sitio de reconocimiento para la enteroquinasa.

Hir_entero_insrev

10 5'- TTTATCGTCATCGCCTGAAGGCTGAAGGTATTCCCTCAGGG-3' (SEC ID NO.:12)

El cebador inverso cubre los aminoácidos 60-65 de la secuencia de la lepirudina y contiene los codones para la secuencia de aminoácidos Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (SEC ID NO.:13), que representan el sitio de reconocimiento para la enteroquinasa. En primer lugar, se llevan a cabo dos PCR con los pares de cebadores hirf1/Hir_entero_insrev e Hir_entero_insf/ins_gly_a21_rev. Se aíslan los productos de reacción. Se mezclan partes alícuotas del material y la mezcla se emplea en una tercera PCR como molde para el par de cebadores hirf1/ins_gly_a21_rev. El producto de reacción se clona de la forma descrita. Se forma el vector pADH2Hir_ins_glyA21. La proteína de fusión se prepara de la forma descrita.

La escisión de la proteína de fusión se lleva a cabo con enteroquinasa. La enzima está disponible en el comercio.

20 La reacción de escisión se llevó a cabo en tampón de enteroquinasa (Tris/HCl 20 mM, NaCl 50 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 7,4), empleando una cantidad de enzima correspondiente a las instrucciones del fabricante. Por lo general, la escisión tiene lugar después de la separación de las células hospedadoras y la siguiente etapa de procesamiento. Sin embargo, también puede producirse directamente en el sobrenadante tras la fermentación, después de que se hayan ajustado las condiciones de reacción óptimas.

Ejemplo 13: Preparación de insulina humana Arg (B31), Gly (A21) a partir de una proteína de fusión obtenida por secreción de levaduras, que contiene proinsulina correctamente plegada y cuya porción de fusión se separa con la enzima enteroquinasa y comprende una secuencia de polihistidina.

Se usa ADN del plásmido pADH2_LT_H6_Hir_ins_glyA21 y los cebadores Hir_entero_insrev, Hir_entero_insf e ins_gly_a21_rev, sustituyendo el cebador hirf1 con el cebador alfa_lt_enterof con la secuencia siguiente:

5'- GAAGGGGTACTTGGATAAAAG - 3' (SEC ID NO.:13)

30 Seguidamente, de manera análoga al Ejemplo 12, se construye un vector pADH2_LT_H6_Hir_etero_ins_glyA21 que codifica una proteína de fusión cuya porción de fusión de hirudina se ha ampliado en seis histidinas, comenzando con la posición 3 N-terminal y a partir de la posición 72 C-terminal, en torno a la secuencia DDDDK (SEC ID NO.:14). La preparación de la insulina humana Arg(B31), Gly(A21) se lleva a cabo, entonces, combinando los métodos descritos en los Ejemplos 11 y 12.

35 **Ejemplo 14:** Secuencia de genes para la secreción de una proteína de fusión de hirudina insulina des-Phe (B1), Arg(B31), Gly(A21) por levadura de panadería.

La transformación y la expresión tienen lugar de manera análoga al Ejemplo 7.

Se sintetizan dos secuencias de cebadores:

Desphef1:

40 5'-CTTCAGGGAAATTCCGGCACGAGTTAACCAACACTTGTGTGGTTC-3' (SEC ID NO.:15)

y Desphe_rev1:

5'-GAACCACACA AGTGTGGT AACTCGTGCC GAATTTCCCT GAAG-3' (SEC ID NO.:16)

El ADN del plásmido pADH2Hir_ins_glyA21 del Ejemplo 7 sirve como molde. Se llevan a cabo dos reacciones en cadena de la polimerasa independientes entre sí. En la reacción 1, se emplean los cebadores Desphe_rev1 y el cebador de la SEC ID NO:4 del Ejemplo 1 de la solicitud EP-A 1 364 032, y en la reacción 2 se emplean el cebador ins_gly_a21_rev del Ejemplo 7 de la presente solicitud y el cebador Desphef1. Se aíslan los productos de reacción de las dos reacciones y se combinan partes alícuotas del rendimiento en una tercera reacción, que se emplea como molde para el par de cebadores compuesto por los cebadores de la SEC ID NO:4 del Ejemplo 1 de la solicitud EP-A 1 364 032 e ins_gly_a21_rev. El producto de reacción de la tercera reacción se clona, se transforma y se expresa de la forma descrita en el Ejemplo 7. La proteína de fusión resultante sirve como material de partida para preparar los correspondientes análogos de insulina con extremos de cadena dibásicos.

Ejemplo 15: Secuencia de genes para la secreción de una proteína de fusión de hirudina insulina Ala (B31), Arg(B32), Gly(A21) por levadura de panadería.

Se sintetizan dos secuencias de cebadores:

Ala_b31f1:

5' -CTTCTACACTCCAAAGACGgctCGTGGTATCGTTGAACAATGTTG-3' (SEC ID NO.:17)

y Ala_b31 rev1:

5'-CAACATTGTT CAACGATAACC ACGagcCGTC TTTGGAGTGT AGAAG-3' (SEC ID NO.:18)

El ADN del plásmido pADH2Hir_ins_glyA21 del Ejemplo 7 sirve como molde. Se llevan a cabo dos reacciones en cadena de la polimerasa independientes entre sí. En la reacción 1, se emplean los cebadores Ala_b31rev1 y el cebador de la SEC ID NO:4 del Ejemplo 1 de la solicitud EP-A 1 364 032, y en la reacción 2 se emplean el cebador ins_gly_a21_rev del Ejemplo 7 de la presente solicitud y el cebador Ala_b31f1. Se aislan los productos de reacción de las dos reacciones y se combinan partes alícuotas del rendimiento en una tercera reacción, que se emplea como molde para el par de cebadores, compuesto por los cebadores de la SEC ID NO:4 del Ejemplo 1 de la solicitud EP-A 1 364 032 e ins_gly_a21_rev. El producto de reacción de la tercera reacción se clona, se transforma y se expresa de la forma descrita en el Ejemplo 7. La proteína de fusión resultante sirve como material de partida para preparar los correspondientes análogos de insulina con extremos de cadena dibásicos.

Ejemplo 16: Secuencia de genes para la secreción directa de un precursor Lys(B31) por levadura de panadería.

Se sintetizan dos cebadores:

Lys_b31f

20 5'-CTTCTACACTCCAAAGACGAAAGGTATCGTTGAACAATGTTG-3' (SEC ID NO.:19)

y Lys_b31 rev

5'-CAACATTGTT CAACGATAACC TTTCGTCTTT GGAGTGTAGA AG -3 (SEC ID NO.:20)

El ADN del plásmido pADH2Hir_ins del Ejemplo 1 de la solicitud WO 02/070722A1 sirve como molde para dos reacciones en cadena de la polimerasa. En la reacción 1, se emplean los cebadores Lys_b31f1 e insnco1rev (Sec ID NO:6 del documento WO 02/070722A1), y en la reacción 2 se emplean los cebadores Lys_b31rev y alfa_insf1 del Ejemplo 7 de la presente solicitud. Se llevan a cabo las reacciones convencionales y se aislan los fragmentos PCR resultantes. Se combinan partes alícuotas de ambos rendimientos, que sirven como molde para una tercera reacción con los cebadores insnco1rev y Sec ID NO:6 del documento WO 02/070722A1. El fragmento PCR resultante se clona y se expresa de la forma descrita en el Ejemplo 8. Se obtiene miniproinsulina Lys(B31), que se puede transformar con lisil endopeptidasa en insulina escindida B(1-29) – A(1-21) y como compuesto intermedio para preparar insulina argininamida B30 o insulina lisinamida B30, que a continuación se puede transformar en el respectivo análogo dibásico.

Ejemplo 17: Escisión con lisil endopeptidasa:

El precursor de insulina se hace reaccionar con lisil endopeptidasa (LEP) tal como se describe en el documento DE3844211 (Ejemplo 1). Para ello, se disuelven 10 mg de miniproinsulina Lys(B31) en tampón Tris (pH 8,0) y se agrega LEP a partir de *Lysobacter enzymogenes* (0,01 ml de una solución concentrada de 1 mg/ml en agua, Merckbiosciences). La incubación se lleva a cabo a temperatura ambiente durante 2 h y se purifica por medio de HPLC de fase inversa (RP) (columna Nucleosil 120-5). El resultado es insulina escindida B(1-29) – A(1-21).

Ejemplo 18: Preparación de insulina Arg(B30) a partir de un precursor de insulina escindida B(1-29)-A(1-21) por acoplamiento con argininamida

Se disuelven 100 mg de insulina escindida B(1-29) - A(1-21) en 0,95 ml de solución de argininamida (446 g/l), 0,13 ml de tampón de acetato de Na M (pH 5,8), y se agregan 2 ml de DMF. La mezcla de reacción se enfriá a 12°C y se inicia con la adición de 0,094 ml de tripsina (0,075 mg, Roche Diagnostics).

Después de 8 h, la reacción se detiene agregando TFA hasta pH 2,5 y se analiza por HPLC. Se forma >60% de insulinamida Arg(B30). Tras la adición de solución inhibidora de tripsina se produce la purificación del análogo amidado de manera análoga al documento US 5.656.722. A continuación, el análogo de insulina amidado se puede hidrolizar en presencia de ácido durante varias horas para dar insulina Arg(B30), o la amida se puede usar directamente como medicamento.

Ejemplo 19: Preparación de insulina Lys(B30) a partir de un precursor de insulina escindida B(1-29)-A(1-21) por acoplamiento con lisinamida

- Se disuelven 100 mg de insulina escindida B(1-29) - A(1-21) en 0,93 ml de solución de lisinamida (400 g/l), 0,13 ml de tampón de acetato de Na M (pH 5,8), y se agregan 2 ml de DMF. La mezcla de reacción se enfriá a 12°C y se inicia con la adición de 0,094 ml de tripsina (0,075 mg, Roche Diagnostics). Después de 8 h, la reacción se detiene agregando TFA hasta pH 2,5 y se analiza por HPLC. Se forma insulinamida Lys(B30), que se purifica después por la adición de solución inhibidora de tripsina de manera análoga al documento 5.656.722. A continuación, el análogo de insulina amidado se puede hidrolizar en presencia de ácido durante varias horas para dar insulina Lys(B30), o se puede emplear directamente como medicamento.
- 5

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Sanofi-Aventis Deutschland GmbH

<120> Procedimiento para preparar análogos de insulina con extremo de cadena B dibásico

<130> DE2006/025

<140> 10 2006 031 955.9

<141> 2006-07-11

<160> 20

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Proteína de fusión de insulina

<400> 1

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Asn Gln His		
1	5	10
		15

Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu		
20	25	30

Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro		
35	40	45

Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu		
50	55	60

Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu		
65	70	75
		80

Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys		
85	90	95

Gly

<210> 2

<211> 45

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador insu_a21_gly_rev

<400> 2

tttttaagc ttgtcgactc attagccgca gtagttctcc agctg	45
--	----

<210> 3

ES 2 423 684 T3

<211> 45

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador ins_gly_a21_rev

<400> 3

tttttccat gggtcgacta tcagccacag tagtttcca gctgg 45

<210> 4

<211> 48

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador alfa_insf1

<400> 4

tttttggat ccttggaaat aaaagatttg ttaaccaaca ctgtgtg 48

<210> 5

<211> 44

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador ins_gly_rev2

<400> 5

tttttccat gggtcgctat cagccacagt agtttccag ctgg 44

<210> 6

<211> 49

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador ins_gly_rev2

<400> 6

ttttggcgc cgaattcact actattagcc acagtagttt tccagctgg 49

<210> 7

<211> 40

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador pitch_insgly_dirf

ES 2 423 684 T3

<400> 7

tttttctcg agaaaagatt tgtaaccaa cacttgtgtg 40

<210> 8

<211> 33

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador pich_insgly_dirrev

<400> 8

tttttggcg ccgaattcac tactattgc cac 33

<210> 9

<211> 39

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador alfa_LT_H6_hirf1

<400> 9

gcaccatcat caccatcaat atactgactg cactgaatc 39

<210> 10

<211> 48

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador alfa_LT_H6_hirf2

<400> 10

gaagggtac ctttgataa aagacttacg caccatcatc accatcac 48

<210> 11

<211> 44

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador Hir_entero_insf

<400> 11

cttcaggacg atgacgataa atttgttaac caacacttgt gtgg 44

<210> 12

<211> 41

<212> ADN

<213> Artificial

ES 2 423 684 T3

<220>
<223> Cebador Hir_entero_insrev
<400> 12
ttatcgta tcgtcctgaa ggctgaagg attcctcagg g 41
<210> 13
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador alfa_lt_enterof
<400> 13
gaaggggtac ctttgataa aag 23
<210> 14
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Secuencia de reconocimiento
<400> 14
Asp Asp Asp Asp Lys 15

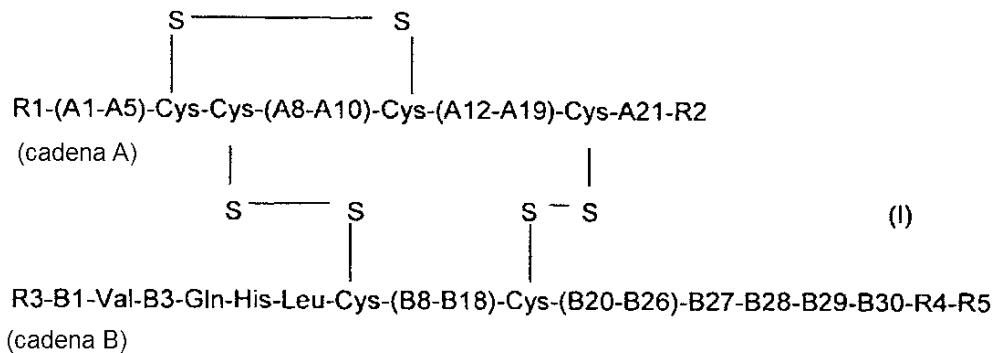
<210> 15
<211> 44
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador Desphef1
<400> 15
cttcaggaa attcggcacg agttaaccaa cacttgttg gttc 44
<210> 16
<211> 44
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador Desphe_rev1
<400> 16
gaaccacaca agtgtggtt aactcgtgcc gaattccct gaag 44
<210> 17

ES 2 423 684 T3

<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador Ala_b31f1
<400> 17
cttctacact ccaaagacgg ctgcgttat cgttgaacaa tggta 45
<210> 18
<211> 45
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Primer Ala_b31rev1
<400> 18
caacattgtt caacgatacc acgagccgtc ttggagatgt agaag 45
<210> 19
<211> 42
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador Lys_b31f
<400> 19
cttctacact ccaaagacga aaggatcggt gaaacaatgt tg 42
<210> 20
<211> 42
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador Lys_b31rev
<400> 20
caacattgtt caacgatacc ttgcgttt ggagtgtaga ag 42

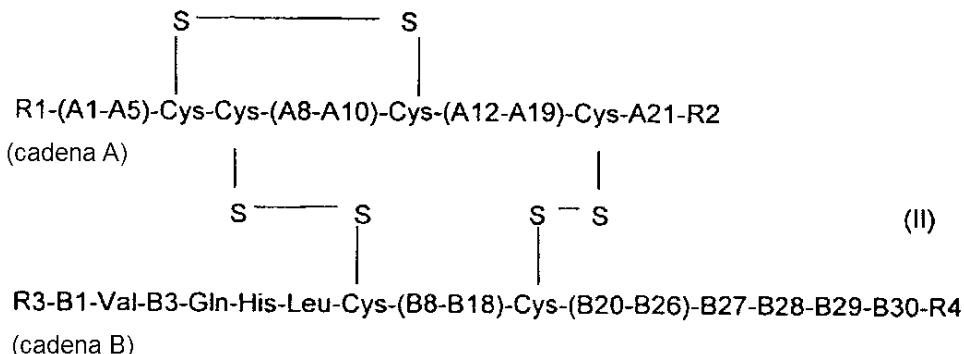
REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para preparar un análogo de insulina o un derivado del mismo, en el que el análogo de insulina se caracteriza por la fórmula general I



- 5 en donde significan
- (A1-A5) los restos aminoácidos en las posiciones A1 hasta A5 de la cadena A de la insulina humana o animal,
- (A12-A19) los restos aminoácidos en las posiciones A12 hasta A19 de la cadena A de la insulina humana o animal,
- 10 A21 un resto aminoácido de origen natural,
- (B8-B18) los restos aminoácidos en las posiciones B8 hasta B18 de la cadena B de la insulina humana o animal,
- (B20-B26) los restos aminoácidos en las posiciones B20 hasta B26 de la cadena B de la insulina humana o animal,
- 15 (A8-A10) los restos aminoácidos en las posiciones A8 hasta A10 de la cadena A de la insulina humana o animal,
- B30 un enlace químico o un resto aminoácido de origen natural,
- B1 un enlace químico o un resto aminoácido de origen natural,
- B3 un resto aminoácido de origen natural,
- 20 B27, B28 un resto aminoácido de origen natural,
- y B29 un grupo amino o uno hasta tres restos aminoácidos de origen natural,
- R1 un grupo carboxi o uno hasta tres restos aminoácidos de origen natural,
- R2 un grupo amino o uno hasta tres restos aminoácidos de origen natural,
- R3 significa un aminoácido básico,
- 25 R4 un resto aminoácido básico, cuyo extremo C-terminal se encuentra libre o amidado,
- R5 en donde el resto aminoácido cuyo extremo C-terminal está conectado con el extremo N-terminal de R5 se selecciona de un grupo que comprende Arg y Lys;
- en donde

a un análogo de insulina inicial o un derivado del mismo, en donde el análogo de insulina inicial se caracteriza por la fórmula general II



- 5 en la que R1, (A1-A5), (A8-A10), (A12-A19), A21, R2, R3, B1, B3, (B8-B18), (B20-B26), B27, B28, B29, B30 y R4 se definen como en la Fórmula I y el resto aminoácido C-terminal de la cadena B se selecciona a partir de un grupo que contiene Arg y Lys,
- 10 a uno de los citados aminoácidos C-terminales se agrega, en presencia de una enzima con la actividad biológica de tripsina, un aminoácido básico de origen natural, amidado o protegido en su extremo C-terminal con un grupo protector, seleccionado del grupo de Arg y Lys,
- 15 y se purifica el análogo de insulina modificado que se obtiene y, opcionalmente, se separa el grupo amida o el grupo protector C-terminal del aminoácido agregado.
- 20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el análogo de insulina modificado es insulina humana Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32), cuyo extremo C-terminal de la cadena B está amidado.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el análogo de insulina inicial es insulina humana Gly(A21), Arg(B31).
- 25 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el análogo de insulina inicial se prepara por expresión recombinante de una proteína precursora que contiene las cadenas A y B del análogo de insulina inicial.
- 20 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que se expresa un gen que es parte de un replicón.
- 25 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4 o 5, en el que como célula hospedadora se utiliza una bacteria o una levadura.
- 30 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4 a 6, en el que la proteína precursora se segregá después de la expresión.
- 25 8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que la proteína precursora se aisla a partir del sobrenadante celular de bacterias o levaduras.
- 30 9. Procedimiento para preparar análogos de insulina modificados según la reivindicación 6, en el que la proteína precursora se aisla a partir del periplasma de una bacteria.
- 35 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4 a 7, en el que la proteína precursora obtenida según una de las reivindicaciones citadas se somete a un proceso de plegado y a escisión enzimática.
- 30 11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el análogo de insulina inicial se prepara por expresión directa recombinante.
- 35 12. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la enzima con actividad biológica de tripsina se selecciona de un grupo que contiene tripsina humana, tripsina porcina, tripsina bovina y una variante de tripsina humana, tripsina porcina y tripsina bovina.
- 35 13. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la enzima posee actividad de lisil endopeptidasa.
- 35 14. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el extremo C-terminal de la cadena B

del análogo de insulina modificado se desprotege posteriormente en una reacción de hidrólisis.

15. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el análogo de insulina obtenido es insulina humana Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32).