



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 295 054**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/62 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **00960664 .1**

(86) Fecha de presentación : **15.09.2000**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1222207**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **17.07.2002**

(54) Título: **Péptido C para la producción mejorada de insulina y análogos de insulina.**

(30) Prioridad: **02.10.1999 DE 199 47 456**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2008

(73) Titular/es: **Sanofi-Aventis Deutschland GmbH**
Brüningstrasse 50
65929 Frankfurt am Main, DE

(72) Inventor/es: **Habermann, Paul;**
Ertl, Johann;
Meiwes, Johannes y
Seipke, Gerhard

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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).

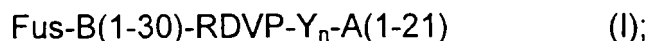
DESCRIPCIÓN

Péptido C para la producción mejorada de insulina y análogos de insulina.

5 La presente invención se refiere a un derivado sintético del péptido C de proinsulina. Proinsulina, que contiene este derivado, tiene, de una forma distinta, mejores propiedades que la proinsulina de mono habitual, en particular mejora el rendimiento final del respectivo derivado de insulina en su preparación por tecnología genética.

10 El número de enfermedades de diabetes aumenta constantemente en todo el mundo. De manera proporcional a ello aumenta la demanda de insulina o derivados de la insulina. Con ello, existe la misión de optimizar los procedimientos existentes en relación con el rendimiento de principio activo. En la patente europea EP-B1 0 489 780 se propone un procedimiento para la preparación de insulina o derivados de la misma. Los vectores allí descritos sirven para la preparación de insulina humana con el plásmido pINT90d o como plásmidos de partida para la construcción del plásmido pINT302d descrito en la solicitud de patente europea EP-A 0 821 006, que sirve para la preparación
15 de un derivado de His(B31) His(B32) Gly(A21)-insulina, o para la construcción del vector pINT329d descrito en la solicitud de patente europea EP-A 0 885 961, que sirve para la preparación del derivado de Lys(B3) Glu(B29)-insulina.

20 Se ha encontrado ahora, que derivados de proinsulina particularmente ventajosos son los de la fórmula 1,



25 en donde

Fus es una parte de fusión, opcionalmente presente, de secuencia arbitraria;
30 B(1-30) es la cadena B de insulina humana,
Y representa una cadena de aminoácidos que termina con un aminoácido de carácter básico C-terminal;
n es igual a 2 hasta 50 e indica la longitud de la cadena de aminoácidos Y; y
35 A(1-21) es la cadena A de insulina humana,
y la cadena A y/o la cadena B pueden estar modificadas por intercambios, deleciones y/o adiciones de aminoácidos. Sorprendentemente, en este caso se observan, en función de la composición de la cadena A o B de la insulina, ventajas iguales o distintas entre sí.
40

Si se une la cadena B humana con la cadena A humana a través del péptido C ventajoso, entonces resulta una proinsulina, que se comporta, respecto al rendimiento de expresión, como proinsulina de tipo salvaje, cuyo procesamiento enzimático para dar insulina se puede controlar, sin embargo, más fácilmente, de manera que no se forman
45 trazas perturbadoras de la cadena B prolongada en arginina, que deben separarse en la preparación de medicamentos, con lo que aparecen pérdidas de rendimiento.

Si se une una cadena B, prolongada en di - histidina en posición C-terminal con la cadena A de insulina humana, que en la posición A21 contiene glicina, con el péptido C de acuerdo con la invención, entonces se observa un rendimiento de expresión aprox. un 20% más elevado en comparación con los rendimientos que se pueden alcanzar con el plásmido pINT90d y un rendimiento casi cinco veces más elevado que el observado con el plásmido pINT302d. Además, se simplifica asimismo el control del procesamiento enzimático, tal como se describió antes.
50

Si se une una cadena B, modificada con Lys(B3)Glu(B29), con la cadena A de insulina humana a través del péptido C modificado, entonces se observan propiedades de plegamiento mejoradas del derivado de proinsulina en comparación con la proinsulina codificada por pINT329d. El rendimiento en proteína de fusión bruta está incrementado y alcanza un mismo nivel que el que se observa con el plásmido pINT90d. Además, se simplifica el control del procesamiento enzimático.
55

60

65

ES 2 295 054 T3

Una forma de realización particularmente ventajosa del nuevo péptido C se caracteriza por la secuencia de aminoácidos siguiente:

5
CGCGATGTTCTCAGGTGGAGCTGGGCGGGGGCCCTGGCGCAGGCAGCCTGCAGCCCTTG
R D V P Q V E L G G G P G A G S L Q P L
10 GCGCTGGAGGGGTCCCTGCAGAAGCGC (SEQ ID NO.: 1)
A L E G S L Q K R (SEQ ID NO.: 2)

15 Asimismo se indica una de muchas secuencias de ADN posibles, que codifica el péptido C indicado.

Un objeto de la invención es un precursor de insulina humana o de un análogo de insulina de la fórmula 1

20 Fus-B(1-30)-RDVP-Y_n-A(1-21) (I);

en donde

25 Fus es una parte de fusión, opcionalmente presente, de secuencia arbitraria;

B(1-30) es la cadena B de insulina humana,

Y representa una cadena de aminoácidos que termina con un aminoácido de carácter básico C-terminal;

30 n es igual a 2 hasta 50 e indica la longitud de la cadena de aminoácidos Y; y

A(1-21) es la cadena A de insulina humana,

35 y la cadena A y/o la cadena B pueden estar modificadas por intercambios, deleciones y/o adiciones de aminoácidos, en particular en donde Y_n representa los aminoácidos 5 a 35 del péptido C de insulina humana o de mono, de preferencia en donde Y_n representa los aminoácidos 11 a 35 de insulina humana.

40 Otro objeto de la invención son precursores tal como se han descrito antes, en donde la cadena B de insulina humana contiene las modificaciones Lys(B3) Glu(B29), o en donde las cadenas B y A de insulina humana contienen las modificaciones His(B31) His(B32) Gly(A21).

Además de ello, objeto de la invención es un ADN que codifica un precursor tal como se describe arriba.

45 Es asimismo objeto de la invención un vector, que contiene un ADN que codifica un precursor tal como se describe antes, preferiblemente caracterizado porque el vector es un vector de expresión adecuado para la expresión en *E. coli*.

Otro objeto de la invención es una célula de *E. coli*, que contiene un vector tal como se describe antes.

50 Otro objeto de la invención es un procedimiento para la preparación de un precursor tal como se ha descrito antes, en el que

(a) un ADN tal como se ha descrito antes se incorpora en un vector tal como se ha descrito antes;

55 (b) el vector de (a) se introduce en una célula de *E. coli*;

(c) la célula de *E. coli* de (b) que contiene el vector de (a) se utiliza para la expresión; y

(d) el precursor se aísla del sobrenadante del cultivo.

60 Además de ello, es objeto de la invención un procedimiento para la preparación de un ADN tal como se ha descrito antes, en el que

(a) partiendo del ADNc de la insulina humana o de mono, mediante PCR y otras técnicas de biología molecular se genera este ADN y

65 (b) se aísla.

ES 2 295 054 T3

Otro objeto de la invención es un procedimiento para la preparación de insulina humana o de un análogo de insulina, en el que

- (a) se produce un precursor tal como se describe antes conforme al procedimiento tal como se describe antes;
- (b) el precursor conforme a (a) se pliega en condiciones adecuadas, de tal manera que se pueden formar puentes disulfuro como en la insulina humana, y se separan enzimáticamente la parte RDVP- Y_n y, eventualmente, la parte de fusión Fus; y
- (c) se purifica la insulina humana o el análogo de insulina.

Otro objeto de la invención es el uso de un precursor tal como se ha descrito antes para la preparación de insulina o de un análogo de insulina, preferiblemente en donde la preparación de insulina o de un análogo de insulina se realiza conforme al procedimiento tal como se describe antes.

Además, es objeto de la invención el uso de un ADN tal como se ha descrito antes para la preparación de un precursor tal como se describe antes.

También es objeto de la invención el uso de un vector tal como se ha descrito antes para la preparación de un precursor tal como se describe antes.

Otro objeto de la invención es el uso de una célula de *E. coli* tal como se ha descrito antes para la preparación de un precursor tal como se describe antes.

La invención se explica ahora más detalladamente con ayuda de los Ejemplos, pero sin limitarla a ellos.

Ejemplo 1

Expresión de derivados de proinsulina

La expresión se efectúa como se describe en el documento EP-B1 0 489 780. Con ello, en el caso de la fermentación en gran volumen se pueden introducir modificaciones. Al comparar las tasas de expresión se mantienen, sin embargo, siempre las mismas condiciones.

Para trabajar a mayores escalas sirve la siguiente receta de fermentación general, la cual se describe a título de ejemplo para un volumen de 7,5 litros:

Volumen de fermentación	: 7,5 l
Condiciones de esterilización	: 121°C, 20 minutos, a pH 3,5, tras esterilización ajustado a 7,0 con NH_3 .
Temperatura de la fermentación	: 37°C
Regulación del pH	: pH 7,0, ajuste con agua amoniacal al 25%
Número de revoluciones del agitador	: 1500 rpm
Ventilación	: 15 NI/min (2 vvm)
Duración	: aprox. 24 h
Alimentación	: glucosa al 65% se aportó dosificadamente a partir de un valor OTR de $200 \text{ mmol l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ con una velocidad constante de $12 \text{ gl}^{-1} \text{ h}^{-1}$
Cultivo previo	: un cultivo de sacudimiento se inoculó con una ampolla de siembra y se incubó durante 3 - 4 h a 37°C, 250 rpm hasta una $DO_{A_{540}} \sim 1$.
Inoculación	: los fermentadores se inocularon con aproximadamente 40 ml de cultivo previo.
Inducción	: a una A_{540} de ≥ 40 con 40 mg/l (300 mg/fermentador) de ácido indol-propiónico disueltos en aprox. 10 ml de una solución acuosa de Na_2CO_3 (con 0,17 g de Na_2CO_3).

En este caso, significan NI = litros normales, vvm = volumen/volumen/minuto y OTR = Oxygen Transfer Rate (velocidad de transferencia de oxígeno).

ES 2 295 054 T3

Medios de fermentación

		Cantidad g/l
5	Número de receta GAI 100/95-000:	
	Glucosa-1-hidrato, D(+) min. 80%	44
10	Ácido cítrico-1-hidrato	3,48
	Sulfato de amonio min. 95%	6,0
15	Ácido fosfórico, orto, 85%	2,99
	Di-hidrógeno-fosfato de potasio	1,18
	Sulfato de sodio	3,0
20	Sulfato de magnesio-7-hidrato, mínimo 98%	2,0
	Sulfato de hierro(III) x H ₂ O	0,5
25	Solución de elementos traza: RL 1/85-000	1,0 ml
	Tiamina-HCl	0,005
	Desmophen 3600	0,5

30 Solución de elementos traza

	RL 1/85-000	Cantidad g/l
35	Sulfato de cobre(II)-5-hidrato	1,6
	Yoduro de potasio	4,0
40	Molibdato de amonio-4-hidrato	8,0
	Sulfato de manganeso(II)-1-hidrato	12,3
45	Sulfato de zinc-7-hidrato	16
	Ácido bórico	20

50 Medio en el matraz de sacudimiento

		Cantidad g/l
55	Extracto de levadura	8,0
	Glucosa	1,0
60	NaCl	3,5
	KH ₂ PO ₄	1,32
65	K ₂ HPO ₄	3,68

Ejemplo 2

Preparación de insulinas

La preparación de insulinas se efectúa conforme a métodos conocidos, tales como se describe o discuten, p. ej., en el documento EP-B1 0 489 780 o EP-A 0 885 961. Para el plegamiento y el tratamiento de la respectiva proteína de fusión se prefiere en este caso el método descrito en el documento EP-B1 0 668 282 (véase el Ejemplo 2). En este caso, tras el plegamiento de manera correspondiente al documento EP 0 288 809, la tanda se puede filtrar antes del tratamiento ulterior.

Ejemplo 3

Construcción del plásmido pINT358d que codifica la proinsulina B - RDVP C₁₁₋₃₅- A humana derivatizada en relación con la cadena C

Para la preparación del plásmido se utilizaron los cebadores Tir e Insu11 descritos en el documento EP-B1 0 489 780. Adicionalmente se sintetizaron dos nuevas secuencias de cebadores.

El cebador PINT358fIII tiene la siguiente secuencia:

5'- CCC AAG ACC CGC GAT GTT CCT CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT - 3' (SEQ ID NO.:3)
B28 B29 B30 Arg Asp Val Pro C11 C12 C13 C14 C15 C16 C17 C18 (SEQ ID NO.: 4)

El cebador PINT358revII tiene la secuencia:

5'- CAGCTCCACCTGAGGAACATCGCGGGTCTTGGGTGTGTAG - 3' (SEQ ID NO.: 5)

Con ADN del plásmido pINT90d como matriz se lleva a cabo en cada caso una PCR con los pares de cebadores Tir/PINT358revII e Insu11/PINT358fIII de manera correspondiente al documento EP-B1 0 489 780. Se combinan partes alícuotas de los productos de las dos reacciones y se emplean junto con el par de cebadores Tir/Insu11 en una tercera PCR. El producto de esta reacción se digiere doblemente con las enzimas SalI/NcoI y el producto de esta digestión de restricción se inserta, después de la purificación, en el ADN del vector abierto con NcoI/SalI del plásmido pINT91d descrito asimismo en el documento EP-B1 0 489 780. El plásmido, así construido, recibe la denominación pINT358d. La estructura se confirma mediante análisis de la secuencia de ADN. Células de *E. coli* competentes se transforman con ADN del plásmido. La expresión de la proinsulina en bacterias se efectúa conforme al Ejemplo 1. Después del plegamiento conforme al Ejemplo 2 se efectúa la reacción enzimática de la proinsulina para dar insulina y purificación ulterior conforme al documento EP-B1 0 347 781. En este caso, en comparación con el procedimiento derivado de pINT90d, en la etapa de cromatografía de intercambio de iones se puede recoger adicionalmente una fracción de borde, ya que ésta no está contaminada con Arg(B31) - insulina.

Ejemplo 4

Construcción del plásmido pINT362d para la preparación de Lys(B3)Glu(B29) - RDVP - C₁₁₋₃₅-proinsulina

Para la construcción del plásmido se necesitan ADN de los plásmidos pINT329d y pINT358d como matriz y los cebadores Tir e Insu11. Adicionalmente se sintetizan dos nuevos cebadores Salforward y 329rev.

El cebador Salforward tiene la secuencia:

5' - TACACACCCGAGACCCGCGATGTTCTCAGG - 3' (SEQ ID NO.: 6)

En este caso, el tramo de secuencia en negrillas se hibrida con el plásmido pINT358d, mientras que la parte restante es homóloga a secuencias del tramo del plásmido pINT329d que codifica la cadena B.

El cebador 329rev tiene la siguiente secuencia:

5' - CCTGAGGAACATCGCGGGTCTCGGGTGTGTAG - 3' (SEQ ID NO.: 7)

En este caso, el tramo en negrillas marca la región que es homóloga a la cadena antisentido, que forma el extremo de la cadena B y describe el triplete para arginina en el plásmido pINT329d. La secuencia restante se hibrida con el plásmido pINT358d. Se llevan a cabo dos tandas de PCR. En este caso, el ADN del plásmido pINT329d sirve como matriz para el par de cebadores Tir/329rev y el ADN de pINT358d sirve como matriz para el par Salforward/Insu11.

ES 2 295 054 T3

Las dos reacciones resultan en fragmentos, que se solapan en torno a la secuencia del cebador Salfoward. Con ello, los dos fragmentos se pueden reunir en una tercera PCR y se combinan, con ayuda de los cebadores Tir e Insu11, para formar una secuencia de ADN que codifica el análogo de insulina. Este producto de reacción se disocia con las enzimas de restricción NcoI/SalI y, a continuación, se inserta en el fragmento de vector de pINT91d abierto con SalI/NcoI. Células competentes de la cepa K12 MM294 de *E. coli* se transforman con la tanda de ligamiento correspondiente. El ADN del plásmido se aísla de transformantes y se caracteriza. El plásmido correcto recibe la denominación pINT362d.

Después de la expresión se observa un rendimiento bruto de proteína de fusión equiparable a pINT90d. Sin embargo, el rendimiento de plegamiento observado es aproximadamente 40% mejor en comparación con pINT329d.

La estructura de la proteína de fusión, codificada por pINT362d, es como sigue:

15	MATTSTGNSAR	FVKQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPET	RDVPQVELGGGPG
	Parte de	Cadena B	Cadena C
	fusión		
20			
25	AGSLQPLALEGSLQKR	GIVEQCCTSIICSLYQLENYCN	(SEQ ID NO.: 8)
	Cadena C (Cont.)	Cadena A	

Ejemplo 5

Construcción del plásmido pINT349d para la preparación de His(B31) His(B32) Gly(A21)- RDVP -C₁₁₋₃₅-proinsulina

Primeramente se prepara el plásmido pINT140d, cuyo ADN codifica el análogo de insulina Gly (A21)-insulina.

Para ello, se necesitan como cebador dos oligonucleótidos para uso en una PCR:

El oligonucleótido Tir se utiliza como cebador “sentido” y el oligonucleótido 140drev se utiliza como cebador “antisentido”:

40	140drev	5' - AAAGGTCGACTATTAGCCGCAGTA -3' (SEQ ID NO.: 9)
		Stop Stop Gly Cys Tyr
		A21A20 A19

Los dos cebadores se emplean en una PCR estándar con ADN del plásmido pINT90d. El producto de la reacción se hace reaccionar, de manera correspondiente al documento EP-B1 0 489 780, con las enzimas de restricción NcoI y SalI y, a continuación, se emplean en el vector pINT69d abierto de manera correspondiente. Se forma el plásmido pINT140d, el cual, tras la transformación en K12 MM294 de *E. coli*, se vuelve a aislar y se caracteriza mediante análisis de restricción y análisis de la secuencia.

Partiendo del ADN del plásmido pINT140d se llevan a cabo dos tandas por PCR. La primera reacción utiliza el cebador Tir y como cebador inverso PINT349a con la segunda secuencia:

55	Val Gln Pro Val Asp Arg His His Thr Lys Pro Thr Tyr (SEQ ID NO.: 10)
	5'- CACCTGAGGAACATCGCGGTGGTGGGTCTTGGGTGTGTAG - 3'
	(SEQ ID NO. 11)
60	C12 C11 * * * * B30 B29 B28 B27 B26

En este caso, las secuencias marcadas con un asterisco designan los codones para los aminoácidos recién introducidos.

ES 2 295 054 T3

La segunda PCR se lleva a cabo con los cebadores Inu11 y PINT349b. El cebador PINT349b tiene la secuencia:

Pro Lys Thr His His Arg Asp Val Pro Gln Val Glu Leu (SEQ ID NO.: 12)
5' - ACCCAAGACCCACCAACCGCGATGTTCTCAGGTGGAGCTG - 3'

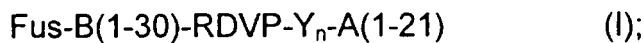
(SEQ ID NO.: 13)
B28 B29 B30 * * * * * C11 C12 C13 C14

Desde la posición 34 a la posición 1 de la secuencia de ADN el cebador es complementario a PINT349a. Por lo tanto, los productos de reacción de las dos PCRs se reúnen, en una tercera PCR, con los cebadores Tir e Insu11, para dar el fragmento de ADN, que codifica el derivado de proinsulina deseado. El producto de esta reacción se hace reaccionar, como se describe, con las enzimas NcoI y SalI y se emplea en el fragmento de vector pINT91d abierto con estas enzimas y se transforma según K12 de *E. coli*. Después de la caracterización de los plásmidos a partir de transformantes las construcciones de plásmidos correctos reciben la denominación pINT349d.

La proteína de fusión se expresa de modo que se manifiesta un claro aumento del rendimiento en proteína de fusión. El rendimiento es, sorprendentemente, aprox. un 20% más alto que el que se puede obtener con pINT90d y es aprox. 5 veces mayor que con el plásmido pINT30d. La tasa de plegamiento es en este caso equiparable a la tasa alcanzada por pre-propinsulina de mono, codificada por pINT90d.

REIVINDICACIONES

1. Precursor de insulina humana o de un análogo de insulina de la fórmula I



en donde

Fus es una parte de fusión opcionalmente presente de secuencia arbitraria;

B(1-30) es la cadena B de insulina humana,

Y representa una cadena de aminoácidos que termina con un aminoácido de carácter básico C-terminal;

n es igual a 2 hasta 50 e indica la longitud de la cadena de aminoácidos Y; y

A(1-21) es la cadena A de insulina humana,

y la cadena A y/o la cadena B pueden estar modificadas por intercambios, deleciones y/o adiciones de aminoácidos.

2. Precursor conforme a la reivindicación 1, en donde Y_n representa los aminoácidos 5 a 35 del péptido C de insulina humana o de mono.

3. Precursor conforme a la reivindicación 1, en donde Y_n representa los aminoácidos 11 a 35 del péptido C de insulina humana.

4. Precursor conforme a una de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la cadena B de insulina humana contiene las modificaciones Lys(B3)Glu(B29).

5. Precursor conforme a una de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las cadenas B y A de insulina humana contienen la modificación His(B31)His(B32)Gly(A21).

6. ADN, que codifica un precursor conforme a una de las reivindicaciones 1 a 5.

7. Vector, que contiene un ADN conforme a la reivindicación 6.

8. Vector conforme a la reivindicación 7, **caracterizado** porque el vector es un vector de expresión adecuado para la expresión en *E. coli*.

9. Célula de *E. coli*, que contiene un vector conforme a la reivindicación 8.

10. Procedimiento para la preparación de un precursor conforme a una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que

a) un ADN conforme a la reivindicación 6 se incorpora en un vector conforme a la reivindicación 7;

b) el vector de (a) se introduce en una célula de *E. coli*;

c) la célula de *E. coli* de (b) que contiene el vector de (a) se utiliza para la expresión; y

d) el precursor se aísla del sobrenadante del cultivo.

11. Procedimiento para la preparación de un ADN conforme a la reivindicación 6, en el que

a) partiendo del ADNc de la insulina humana o de mono, mediante PCR y otras técnicas de biología molecular, se genera el ADN conforma a la reivindicación 6 y

b) se aísla.

12. Procedimiento para la preparación de insulina humana o de un análogo de insulina, en el que

a) se genera un precursor conforme al procedimiento según la reivindicación 10;

b) el precursor conforme a (a) se pliega en condiciones adecuadas de tal manera que se pueden formar puentes disulfuro como en la insulina humana, y se separan enzimáticamente la parte RDVP-Y_n y, eventualmente, la parte de fusión Fus; y

ES 2 295 054 T3

c) se purifica la insulina humana o el análogo de insulina.

13. Uso de un precursor conforme a una de las reivindicaciones 1 a 5 para la preparación de insulina o de un análogo de insulina.

14. Uso conforme a la reivindicación 13, en donde la preparación de insulina o de un análogo de insulina se efectúa conforme al procedimiento de la reivindicación 12.

15. Uso de un ADN conforme a la reivindicación 6 para la preparación de un precursor conforme a una de las reivindicaciones 1 a 5.

16. Uso de un vector conforme a la reivindicación 8 para la preparación de un precursor conforme a una de las reivindicaciones 1 a 5.

17. Uso de una célula de *E. coli* conforme a la reivindicación 9 para la preparación de un precursor conforme a una de las reivindicaciones 1 a 5.

18. Uso conforme a una de las reivindicaciones 15, 16 ó 17, en donde la preparación del precursor se efectúa conforme al procedimiento de la reivindicación 10.

ES 2 295 054 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Aventis Pharma Deutschland GmbH

5 <120> Péptido C para la preparación mejorada de insulina y análogos de insulina

<130> 1999/L059

10 <140> 19947456.7

<141> 1999-10-02

<160> 13

15

<170> PatentIn Ver.2.1

<210> 1

20 <211> 87

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN que codifica la variante de péptido C

<400> 1

30

```
cgcgatgttc ctcaggtgga gctgggcggg ggccctggcg caggcagcct gcagcccttg 60
gcgctggagg ggtccctgca gaagcgc 87
```

35

<210> 2

<211> 29

<212> PRT

40

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: variante de C-Pep-insulina

45

<400> 2

50

```
Arg Asp Val Pro Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser
      1              5              10              15
```

55

```
Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg
      20              25
```

<210> 3

<211> 45

60

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

65

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador PINT 358fIII

ES 2 295 054 T3

	<400> 3	
	cccaagaccc gcgatgttcc tcaggtggag ctgggcgggg gccct	45
5	<210> 4	
	<211> 4	
	<212> PRT	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia parcial de la proteína de PINT 358fIII	
15	<400> 4	
	Arg Asp Val Pro	
20	1	
	<210> 5	
	<211> 40	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador PINT 358revII	
	<400> 5	
35	cagctccacc tgaggaacat cgcgggtctt ggggtgtgtag	40
	<210> 6	
	<211> 31	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador Salfoward	
	<400> 6	
50	tacacaccg agaccgcga tgttcctcag g	31
	<210> 7	
	<211> 32	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador 329rev	
	<400> 7	
65	cctgaggaac atcgcggtc tcgggtgtgt ag	32
	<210> 8	

ES 2 295 054 T3

<211> 91

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: variante precursor de insulina

10 <400> 8

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

15

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

20

Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Glu Thr Arg Asp Val Pro Gln Val Glu
35 40 45

25

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

30

Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile
65 70 75 80

35

Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
85 90

<210> 9

40 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador 140drev

<400> 9

50

aaaggtcgac tattagccgc agta

24

<210> 10

55 <211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia parcial de la proteína de PINT 349a

<400> 10

65

Val Gln Pro Val Asp Arg His His Thr Lys Pro Thr Tyr
1 5 10

ES 2 295 054 T3

<210> 11
 <211> 40
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador 329a
 10
 <400> 11

 cacctgagga acatcgcggt ggtgggtctt ggggtgtgtag 40
 15
 <210> 12
 <211> 13
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia parcial de la proteína de PINT 349b
 25
 <400> 12

 Pro Lys Thr His His Arg Asp Val Pro Gln Val Glu Leu 1 5 10
 30 1 5 10

 <210> 13
 <211> 40
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador PINT 349b

 <400> 13

 45 acccaagacc caccacgcg atgttcctca ggtggagctg 40

 50

 55

 60

 65