



①9

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 N.º de publicación: **ES 2 059 676**

⑤1 Int. Cl.⁵: C07K 15/00

A61K 37/02

①2

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **89120462.0**

⑧6 Fecha de presentación : **06.11.89**

⑧7 Número de publicación de la solicitud: **0 368 187**

⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **16.05.90**

⑤4 Título: **Nuevos derivados de insulina, su empleo y un preparado farmacéutico que los contiene.**

③0 Prioridad: **08.11.88 DE 38 37 825**

⑦3 Titular/es: **Hoechst Aktiengesellschaft
D-65926 Frankfurt, DE**

④5 Fecha de la publicación de la mención BOPI:
16.11.94

⑦2 Inventor/es: **Dörschug, Michael**

④5 Fecha de la publicación del folleto de patente:
16.11.94

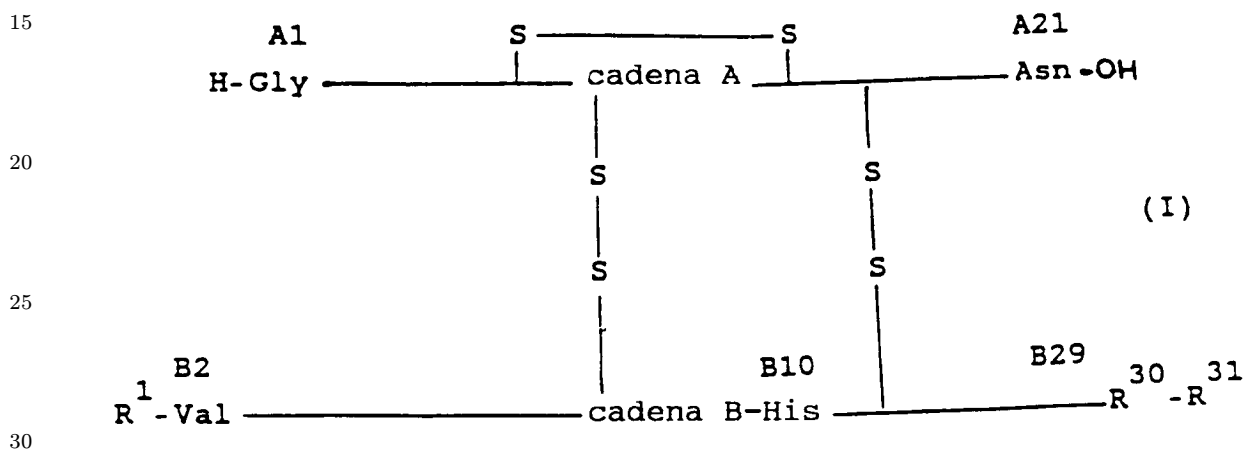
⑦4 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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 (artº 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCION

La insulina y sus derivados se necesitan, como es bien sabido, en considerables cantidades para el tratamiento de la enfermedad Diabetes mellitus y, en parte, se produce también a gran escala técnica. A pesar del considerable número de los preparados y de las modificaciones de insulina que ya existen, con diversos perfiles de efecto, a causa de la diversidad de los organismos con sus fluctuaciones inter- e intra-individuales, sigue existiendo todavía una necesidad de otros productos de insulina con nuevamente otras propiedades y características de efecto diferentes.

Se han descrito derivados de insulina con un efecto retardado, por ejemplo, en los documentos de patente europea EP-B-132.769 y EP-B-132.770. Se trata de derivados especialmente modificados con radicales básicos en la posición B31 de la cadena B de insulina, que tienen la siguiente fórmula I:



en la cual

R¹ significa H ó H-Phe,

R³⁰ representa el radical de un L-aminoácido neutro, codificable genéticamente, y

R³¹ representa un grupo orgánico fisiológicamente inocuo, que tiene un carácter básico, con hasta 50 átomos de C, en cuya constitución participan de 0 hasta 3 α-amino-ácidos y cuya función carboxilo situada en un extremo, eventualmente presente, se puede presentar libre, como función de éster, como función de amida, como lactona o reducida a CH₂OH.

Es característico de estos derivados de insulina un punto isoelectrico comprendido entre 5,8 y 8,5 (medido en el enfoque isoelectrico). El punto isoelectrico - que se ha desplazado a la región neutra con respecto al punto isoelectrico de la insulina o proinsulina natural no modificada (a pH = 5,4) - está condicionado por la(s) carga(s) positiva(s) adicional(es) que se encuentra(n) en la superficie de la molécula, como consecuencia de la modificación de carácter básico. Con ello, estos derivados de insulina modificados con radicales básicos son menos solubles en la región neutra que, por ejemplo, la insulina o proinsulina natural, que en el margen neutro se presentan normalmente disueltas.

El efecto de retardo o de depósito de los derivados de insulina modificados con radicales básicos de fórmula I se debe a su difícil solubilidad en el punto isoelectrico. Según los dos documentos mencionados anteriormente, la renovada disolución de los derivados de insulina bajo condiciones fisiológicas se debe conseguir mediante separación de los grupos básicos adicionales, lo cual, dependiendo del derivado, se produce mediante una actividad trípica o semejante a la de tripsina y/o de carboxipeptidasa B o semejante a la de carboxipeptidasa B y/o de esterasa. Los grupos separados en cada caso son o bien metabolitos puramente fisiológicos o por el contrario sustancias fácilmente metabolizables, fisiológicamente inocuas.

El principio de depósito mencionado anteriormente, como consecuencia de una modificación básica de la insulina, se aprovechó todavía más mediante la puesta a punto y la correspondiente utilización de otros derivados de insulina modificados con radicales básicos -principalmente dentro de las cadenas A y B-; véanse, por ejemplo, los documentos EP-A-0.194.864 y EP-A-0.254.516.

En los derivados de insulina de acuerdo con el documento EP-A-0.194.516 un aminoácido básico está incorporado en la posición B27 y/o un aminoácido neutro está situado en las posiciones A4, A17, B13 y/o B21; además, el grupo carboxilo C-terminal de la cadena B está bloqueado por un radical de amida o éster.

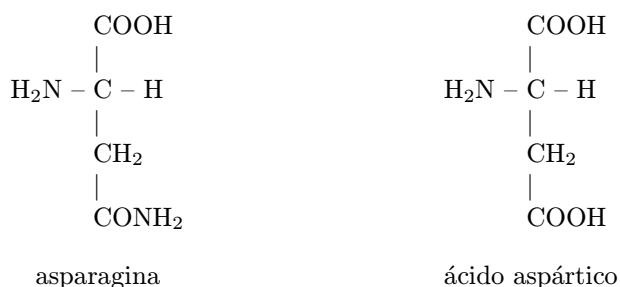
5

Los derivados de insulina de acuerdo con el documento EP-A-0.254.516 son muy parecidos a los del documento EP-A mencionado anteriormente; sin embargo, para aumentar la estabilidad a los valores de pH débilmente ácidos de los correspondientes preparados farmacéuticos, el aminoácido Asn puede estar reemplazado o reemplazarse posteriormente, en este caso, en la posición A21 además por otros aminoácidos más estables en un medio ácido, tales como, por ejemplo, Asp. La Asn (= asparagina) se diferencia del Asp (= ácido aspártico), tal como es sabido, por el bloqueo de uno de los dos grupos carboxilo por un grupo amido:

10

15

20



25

Mediante todavía otra modificación de la molécula de insulina en las cadenas A y B, especialmente mediante el intercambio del aminoácido His en la posición B10, que es responsable de la formación de un complejo con zinc - y, por tanto, de un cierto efecto de retardo - por otros aminoácidos correspondientes, deberán resultar unos derivados de insulina que actúen rápidamente; véase el documento EP-A-0.214.826.

30

Todos los derivados de insulina de acuerdo con los 3 documentos que se han mencionado en último término están modificados principalmente dentro de las cadenas A y B; su preparación se realiza por vía de tecnología genética.

35

En el empeño de aumentar la estabilidad en el medio ácido de los derivados de insulina modificados con radicales básicos en el extremo C-terminal de la cadena B, de acuerdo con los documentos de patente europea EP-B-0.132.769 y EP-B-0.132.770 mencionados al principio, y eventualmente de modificar además su perfil de efecto, se ha encontrado, por fin, que este objetivo se alcanza de manera ventajosa mediante reemplazo de Asn^{A21} por otros aminoácidos codificables genéticamente, que no contienen ningún grupo de amida, y eventualmente mediante reemplazo de His^{B10} por otros amino-ácidos codificables genéticamente.

40

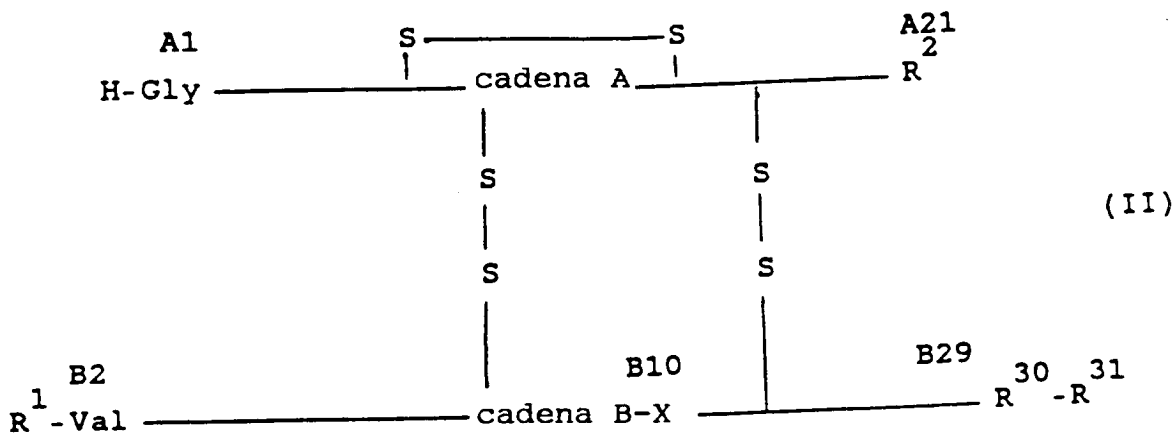
Por tanto, son objeto del invento derivados de insulina de fórmula II

45

50

55

60



en la cual

ES 2 059 676 T3

R¹ significa H ó H-Phe,

R² significa un L-aminoácido codificable genéticamente y que no contiene ningún grupo amido,

5 R³⁰ representa el radical de un L-aminoácido neutro, codificable genéticamente,

R³¹ representa un grupo orgánico fisiológicamente inocuo que tiene un carácter básico, con hasta 50 átomos de C, en cuya constitución participan de 0 hasta 3 α -aminoácidos y cuya función carboxilo situada en un extremo, eventualmente presente, se puede presentar como función de éster, como

10 función de amida, como lactona o reducida a CH₂OH, y

X representa un L-aminoácido codificable genéticamente con un punto isoelectrónico entre 5 y 8,5,

y sus sales fisiológicamente compatibles.

15 Los nuevos derivados de insulina y sus sales fisiológicamente compatibles son estables también durante períodos de tiempo prolongados a los valores de pH débilmente ácidos de los correspondientes preparados farmacéuticos y - especialmente cuando también se ha intercambiado el His^{B10} además por otros aminoácidos - poseen un perfil de efecto modificado (más corto) frente al de los conocidos derivados de insulina modificados con radicales básicos - inalterados - de la fórmula I indicada al principio.

20

En la fórmula II R¹ es preferiblemente H-Phe.

Los L-aminoácidos - para R² - codificables genéticamente, que no contienen ningún grupo amido, son

25

Gly, Ala, Ser, Thr, Val, Leu, Ile, Asp, Glu, Cys, Met, Arg,
Lys, His, Tyr, Phe, Trp, Pro;

se prefieren Gly, Ala, Ser, Thr, Asp y Glu, especialmente Asp.

30

Los L-aminoácidos neutros -para R³⁰- codificables genéticamente, son Gly, Ala, Ser, Thr, Val, Leu, Ile, Asn, Gln, Cys, Met, Tyr, Phe y Pro; se prefieren Ala, Thr y Ser.

35

R³¹ es un grupo orgánico fisiológicamente inocuo, de carácter básico, con hasta 50 átomos de C, en cuya constitución participan 0 - 3 α -aminoácidos. Cuando en la constitución de R³¹ no participa ningún α -aminoácido, para este radical entran en consideración, por ejemplo, los siguientes grupos básicos:

40

amino-alcoxi (C₂-C₆), alquil (C₁-C₄)-amino-alcoxi (C₂-C₆), di-alquil (C₁-C₄)-amino-alcoxi (C₂-C₆), tri-alquil (C₁-C₄)-amino-alcoxi (C₂-C₆), amino-alquil (C₂-C₆)-amino, [alquil (C₁-C₄)-amino]-alquil (C₂-C₆)-amino, di-alquil (C₁-C₄)-amino-alquil-(C₂-C₆)-amino o [tri-alquil (C₁-C₄)-amino]-alquil (C₂-C₆)-amino, especialmente -O-[CH₂]_p-NR₂, -O-[CH₂]_p-N[⊕]R₃, -NH-[CH₂]_p-NR₂ ó -NH-[CH₂]_p-N[⊕]R₃, en donde p = de 2 hasta 6, y los R son iguales o diferentes y representan hidrógeno o alquilo (C₁-C₄).

45

Cuando en la constitución de R³¹ participan hasta 3 α -aminoácidos, éstos son en primer término L-aminoácidos neutros o básicos que se presentan en la naturaleza y/o los D-aminoácidos correspondientes a éstos. Los aminoácidos neutros, que se presentan en la naturaleza, son especialmente Gly, Ala, Ser, Thr, Val, Leu, Ile, Asn, Gln, Cys, Met, Tyr, Phe, Pro y Hyp. Los aminoácidos básicos, que se presentan en la naturaleza, son especialmente Arg, Lys, Hyl, Orn, Cit y His. En caso de que sólo participen α -aminoácidos neutros, su función carboxilo situada en un extremo no puede estar libre -para que R³¹ tenga un carácter básico-; en este caso, la función carboxilo debe de estar en lugar de ello esterificada o amidada con un grupo básico, entrando en consideración como tales grupos básicos, por ejemplo, los grupos básicos mencionados anteriormente- para el caso de que en la constitución de R³¹ no participen α -aminoácidos-. Naturalmente, estos grupos de éster o de amida básicos pueden bloquear también a la función carboxilo de α -aminoácidos básicos. Para el bloqueo de la función carboxilo de los α -aminoácidos básicos pueden entrar en consideración -en caso de se desee el bloqueo- también grupos de éster o de amida neutros, tales como alcoxi (C₁-C₆), cicloalcoxi (C₃-C₆), NH₂, alquil (C₁-C₆)-amino o di-alquil (C₁-C₆)-amino.

50

55

Como lactona, la función carboxilo situada en un extremo sólo se puede presentar naturalmente sólo cuando el aminoácido situado en un extremo es un hidroxiaminoácido.

60

Además, la función carboxilo situada en un extremo puede ser reducida también a CH₂OH.

ES 2 059 676 T3

Preferiblemente, R³¹ se compone de 1, 2 ó 3 de los aminoácidos básicos que se presentan en la naturaleza y que se han mencionado anteriormente; R³¹, de manera muy especialmente preferida, es = Arg-OH ó Arg-Arg-OH.

5 Como L-aminoácidos -para X- codificables genéticamente, entran en consideración los mismos aminoácidos que para R², siendo posibles en este caso, sin embargo, también los L-aminoácidos codificables genéticamente, que contienen un grupo de amida -éstos son Asn y Gln-; estos últimos -Asn y Gln- son incluso preferidos en este caso. Cuando Asn y Gln se encuentran en la posición B10, el grupo de amida es en cualquier caso estable en un medio débilmente ácido (al contrario que Asn y Gln en la
10 posición A21).

Las secuencias (A1 - A20) y (B1 - B9, B11 - B29) son preferiblemente las secuencias de la insulina de ser humano, de porcino o de bovino, especialmente las secuencias de la insulina de ser humano.

15 Derivados de insulina de fórmula II, dados como ejemplo, son:

Asp^{A21}-insulina humana-Arg^{B31}-OH
Glu^{A21}-insulina humana-Arg^{B31}-OH
Gly^{A21}-insulina humana-Arg^{B31}-OH
20 Ser^{A21}-insulina humana-Arg^{B31}-OH
Thr^{A21}-insulina humana-Arg^{B31}-OH
Ala^{A21}-insulina humana-Arg^{B31}-OH

25 Asp^{A21}-insulina humana-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH
Glu^{A21}-insulina humana-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH
Gly^{A21}-insulina humana-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH
Ser^{A21}-insulina humana-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH
30 Thr^{A21}-insulina humana-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH
Ala^{A21}-insulina humana-Arg^{B32}-OH

35 Asp^{A21}-Asn^{B10}-insulina humana-Arg^{B31}-OH
Glu^{A21}-Asn^{B10}-insulina humana-Arg^{B31}-OH
Gly^{A21}-Asn^{B10}-insulina humana-Arg^{B31}-OH
Ser^{A21}-Asn^{B10}-insulina humana-Arg^{B31}-OH
Thr^{A21}-Asn^{B10}-insulina humana-Arg^{B31}-OH
40 Ala^{A21}-Asn^{B10}-insulina humana-Arg^{B31}-OH

45 Asp^{A21}-Asn^{B10}-insulina humana-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH
Glu^{A21}-Asn^{B10}-insulina humana-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH
Gly^{A21}-Asn^{B10}-insulina humana-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH
Ser^{A21}-Asn^{B10}-insulina humana-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH
Thr^{A21}-Asn^{B10}-insulina humana-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH
Ala^{A21}-Asn^{B10}-insulina humana-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH

50 La preparación de los derivados de insulina de fórmula II se realiza principalmente por tecnología genética mediante mutagénesis dirigida a un sitio, según métodos clásicos.

Para ello, se construye una estructura de gen que codifica el derivado de insulina deseado de fórmula II y se lleva a expresión en una célula hospedante -preferiblemente en una bacteria, tal como *E. coli*, o en una levadura, especialmente *Saccharomyces cerevisiae*- y -en caso de que la estructura de gen codifique una proteína de fusión- se pone en libertad el derivado de insulina de fórmula II a partir de la
55 proteína de fusión; métodos análogos se han descrito, por ejemplo, en los documentos EP-A-0.211.299, EP-A-0.227.938, EP-A-0.229.998, EP-A-0.286.956 y en la solicitud de patente alemana DE P 38.21.159.9 del 23.6.1988 (HOE 88/F 158).

60 La separación de la porción de proteína de fusión se realiza después de la disgregación de la célula, o bien químicamente mediante un halocianógeno -véase el documento EP-A-0.180.920- o bien enzimáticamente mediante lisostafina -véase el documento DE-A-37.39.347.

ES 2 059 676 T3

El precursor de insulina se somete luego a la sulfitolisis oxidante según el método descrito, por ejemplo, por R.C. Marshall y A.S. Inglis en "Practical Protein Chemistry - A Handbook" (editor A. Darbre) 1986, páginas 49 - 53 y, a continuación, se renaturaliza en presencia de un tiol, formándose los puentes de disulfuro correctos, por ejemplo según el método descrito por G.H. Dixon y A.C. Wardlow en Nature (1960), páginas 721 - 724.

El C-péptido se elimina mediante disociación con tripsina (tríptica) - por ejemplo según el método de Kemmler et al., J.B.C. (1971), páginas 6.786 - 6.791 y el derivado de insulina de fórmula II se purifica mediante técnicas conocidas, tales como cromatografía -véase, por ejemplo, el documento EP-A-0.305.760- y cristalización.

La preparación de los derivados de insulina de fórmula II con $R^2 = Asp$ y $X = His$ se realiza convenientemente mediante hidrólisis de los conocidos derivados de insulina modificados con radicales básicos de fórmula I en un medio acuoso-ácido (porque en este caso sólo se debe hidrolizar el grupo amida de la asparagina en posición A21), preferiblemente a valores de pH entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4, en especial de aproximadamente 2,5, y a temperaturas de aproximadamente 0 hasta aproximadamente 40°C, preferiblemente a temperatura ambiente.

Los derivados de insulina de fórmula II de acuerdo con el invento y/o sus sales fisiológicamente compatibles (tales como, por ejemplo, las sales de metales alcalinos o de amonio) se utilizan principalmente como sustancias activas para un preparado farmacéutico destinado al tratamiento de la Diabetes mellitus.

El preparado farmacéutico es preferiblemente una solución o suspensión para fines de inyección; está caracterizado por un cierto contenido de por lo menos un derivado de insulina de fórmula II y/o por lo menos una de sus sales fisiológicamente compatibles en una forma disuelta, amorfa y/o cristalina -preferiblemente en una forma disuelta-.

El preparado tiene preferiblemente un valor de pH entre 2,5 y 8,5, especialmente entre 4,0 y 8,5, contiene un agente de isotonía adecuado, un agente conservante adecuado y eventualmente un tampón adecuado, así como preferiblemente también una determinada concentración de iones de zinc, todo ello naturalmente en una solución acuosa estéril. La totalidad de los componentes del preparado, aparte de la sustancia activa, constituye el vehículo del preparado.

Agentes de isotonía adecuados son, por ejemplo, glicerol, glucosa, manita, NaCl, compuestos de calcio o magnesio tales como $CaCl_2$, $MgCl_2$, etc..

Mediante la elección del agente de isotonía y/o del agente conservante se influye sobre la solubilidad del derivado de insulina o de su sal fisiológicamente compatible a los valores de pH débilmente ácidos.

Agentes conservantes adecuados son, por ejemplo, fenol, m-cresol, alcohol bencílico y/o ésteres de ácido p-hidroxibenzoico.

Como sustancias tampón, especialmente para el ajuste de un valor de pH entre aproximadamente 4,0 y 8,5 se pueden utilizar, por ejemplo, acetato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio, etc.. Por lo demás, para el ajuste del valor del pH se adecuan también ácidos diluidos fisiológicamente inocuos (típicamente HCl) o lejías (típicamente NaOH).

Cuando el preparado posee un cierto contenido de zinc, se prefiere uno de 1 μg hasta 2 mg, especialmente de 5 μg hasta 200 μg de zinc/ml.

Para variar el perfil de efecto del preparado de acuerdo con el invento se puede añadir a la mezcla también insulina no modificada, preferiblemente insulina de bovino, de porcino o de ser humano, especialmente insulina de ser humano.

Las concentraciones preferidas de sustancia activa son las que corresponden a aproximadamente 1 - 1.500, más preferiblemente de 5 - 1.000 y muy especialmente de aproximadamente 40 - 400 unidades internacionales/ml.

El invento se explica más detalladamente, a continuación, mediante los siguientes Ejemplos.

ES 2 059 676 T3

A) Preparación por tecnología genética

Ejemplo 1

5 Construcción de un plásmido para la preparación de Gly(A21)-insulina humana-Arg(B31-OH)

En la solicitud de patente alemana P 38.21.159.9 (HOE 88/F 158) se describió el plásmido pSW3.

10 El ADN plasmídico se hace reaccionar con las enzimas de restricción Pvu2 y Sal1 y, a continuación, se trata con la fosfatasa alcalina de bovino. Los dos fragmentos resultantes se separan por electroforesis en gel y se aísla el fragmento grande. Este fragmento se une, en una reacción de ligasa de ADN de T4, con la siguiente secuencia sintética de ADN.

15 5' - CTG GAA AAC TAC TGT GGT TGA TAG
GAC CTT TTG ATG ACA CCA ACT ATC AGCT - 5'

20 Células competentes de *E. coli W3110* se transforman con la tanda de ligación. La mezcla de transformación se extiende sobre planchas NA, que contienen 20 µg de Ap (= ampicilina)/ml, y se incuba durante una noche a 37°C. De colonias individuales se obtiene un cultivo durante una noche y, a partir de éste, se obtiene el ADN plasmídico. Este ADN es caracterizado mediante análisis por restricción y análisis de secuencias de ADN. Los plásmidos correctos, que codifican la cadena A modificada, reciben la denominación pIK100. La expresión se realiza de manera análoga al Ejemplo 3 de la solicitud de patente alemana P 38.21.159.9 que se ha mencionado anteriormente. La preparación de la mono-Arg-insulina modificada se lleva a cabo igualmente de manera análoga a la preparación, descrita en esta solicitud de
25 patente alemana, de la mono-Arg-insulina no modificada.

Ejemplo 2

30 Construcción de un plásmido para la preparación de Ser(A21)-insulina humana-(Arg B31-OH)

La construcción corresponde a la vía descrita en el Ejemplo anterior. La secuencia sintética de ADN se ha modificado, sin embargo, de la siguiente manera:

35 5' - CTG CAA AAC TAC TGT TCA TGA TAG
GAC CTT TTG ATG ACA AGT ACT ATC AGCT - 5'

Se obtiene el plásmido pIK110, que es caracterizado por una secuencia adicional de reconocimiento de BspH1.

40 Ejemplo 3

Construcción de un plásmido para la preparación de Gly(A21)-Asn(B10)-insulina humana-Arg(B31-OH)

45 El ADN del plásmido pIK100 se disocia con las enzimas de restricción Hpa1 y Dra3 y se trata con la fosfatasa alcalina de bovino. Los dos fragmentos resultantes se separan por electroforesis en gel y se aísla el mayor de los dos fragmentos. El fragmento se liga con la secuencia sintética de ADN

50 5' - AAC CAA CAC TTG TGT GGT TCT AAC TTG
TTG GTT GTG AAC ACA CCA AGA TTG - 5'

y se transforman células competentes de *E. coli W3110* con la mezcla de ligación. La caracterización adicional del plásmido resultante se lleva a cabo tal como se ha descrito en el Ejemplo 1.

Ejemplo 4

55 Construcción de un plásmido para la preparación de Ser(A21)-Asn(B10)-insulina humana

La construcción corresponde a la clonación descrita en el Ejemplo 3, pero se parte de ADN del plásmido pIK110.

60 El plásmido que se acaba de construir recibe la denominación pIK111.

ES 2 059 676 T3

Ejemplo 5

Construcción de un plásmido de expresión para proinsulina de mono

5 La proinsulina de mono se diferencia de la proinsulina de ser humano sólo por el intercambio de un único aminoácido en el C-péptido (B37-Pro en lugar de Leu en esta posición de la proinsulina de ser humano).

10 El plásmido pSW3 se abre con Hpa1 y Sal1 y se aísla el ADN plasmídico restante. A partir del plásmido pK50 descrito en el documento EP-A-0.229.998 se aísla el fragmento Dra3-Sal1 de proinsulina de mono. Los dos fragmentos se unen con el fragmento sintético de ADN

5' - AAC CAG CAC CTG TGC GGT TCT CAC CTA
TTG GTC GTG GAC ACG CCA AGA GTG - 5'

15 en una reacción de ligasa de ADN de T4. Se obtiene el plásmido pSW2, cuyo ADN se utiliza en adelante como material de partida para las construcciones de los plásmidos de expresión que codifican los derivados de di-Arg-insulina humana.

20 Ejemplo 6

Construcción de un plásmido para la preparación de Gly(A21)-insulina humana-Arg(B31)-Arg(B32)-OH

25 El ADN del plásmido pSW2 se disocia de manera correspondiente al Ejemplo 1 con Pvu2 y Sal1 y se liga con el ADN sintético del Ejemplo 1; se forma el plásmido pSW21.

Ejemplo 7

Construcción de un plásmido para la preparación de Ser(A21)-insulina humana-Arg(B31)-Arg(B32)-OH

30 A partir del ADN de pSW2 se construye el plásmido pSW22 de manera análoga al Ejemplo 2.

Ejemplo 8

35 *Construcción de un plásmido para la preparación de Gly(A21)-Asn(B10)-insulina humana-Arg(B31)-Arg(B32)-OH*

A partir del ADN de pSW21 se construye el plásmido pSW23 de manera análoga al Ejemplo 3.

40 Como secuencia sintética de ADN se utiliza en este caso la siguiente secuencia:

5' - AAC CAA CAC TTG TGT GGT TCT AAC CTA
TTG GTT GTG AAC ACA CAA AGA TTG - 5'

45 Ejemplo 9

Construcción de un plásmido para la preparación de Ser(A21)-Asn(B10)-insulina humana-B31(Arg)-B32(Arg)-OH

50 A partir del ADN de pSW22 se construye el plásmido pSW24 de manera análoga al Ejemplo 4, utilizando la secuencia sintética de ADN descrita en el Ejemplo 8.

B) *Preparación de Asp^{A21}-insulina humana-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH a partir de insulina humana-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH mediante hidrólisis*

55 1 g de insulina humana-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH se suspende en 100 ml de H₂O. Mediante adición de HCl se ajusta el valor de pH a 2,5 y la solución se deja a 37°C. Después de una semana, ha reaccionado aproximadamente la mitad del material para dar Asp^{A21}-insulina humana-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH. El producto se separa del material de partida de manera en sí conocida a través de un intercambiador de aniones, se precipita desde el material eluido y se cristaliza en un tampón que contiene, por cada litro, 10,5 g de ácido cítrico, 1 g de fenol y 5 ml de una solución de cloruro de zinc al 1 % con una concentración de proteína de 5 g/l a pH 6,0. El rendimiento es de 390 mg de Asp^{A21}-insulina humana-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH.

60

ES 2 059 676 T3

C) Preparación de una solución de inyección

El derivado de insulina de acuerdo con B se disuelve con una concentración de 1,4 mg/ml en una solución de vehículo estéril de la siguiente composición (por ml):

5 18 mg de glicerol, 10 mg de alcohol bencílico, 80 μg de Zn^{2+} , pH 4,0.

D) Perfil de efecto de un preparado de Asp^{A21}-insulina humana- Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH sobre perros en comparación con la insulina humana-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH y con H-insulina basal de Hoechst^(R) = un
10 preparado NPH (protamina neutra según Hagedorn) con aproximadamente 10 μg de Zn^{2+} .

Preparado	Azúcar en sangre en porcentaje del valor inicial en horas (h)					
	1 h	2 h	3 h	5 h	7 h	
de acuerdo con el invento	Asp ^{A21} -insulina humana-Arg ^{B31} -Arg ^{B32} -OH	99	62	51	75	98
comparación	insulina humana-Arg ^{B31} -Arg ^{B32} -OH	77	52	64	85	98
	H-insulina basal de Hoechst ^(R)	71	49	59	83	100

Este Ejemplo manifiesta que la Asp^{A21}-insulina humana-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH tiene el mismo perfil basal ventajoso que la insulina humana-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH. Adicionalmente, la Asp^{A21}-insulina humana-Arg^{B31}-Arg^{B32}-OH tiene la propiedad ventajosa de que el compuesto es estable a largo plazo bajo las
30 condiciones seleccionadas.

35

40

45

50

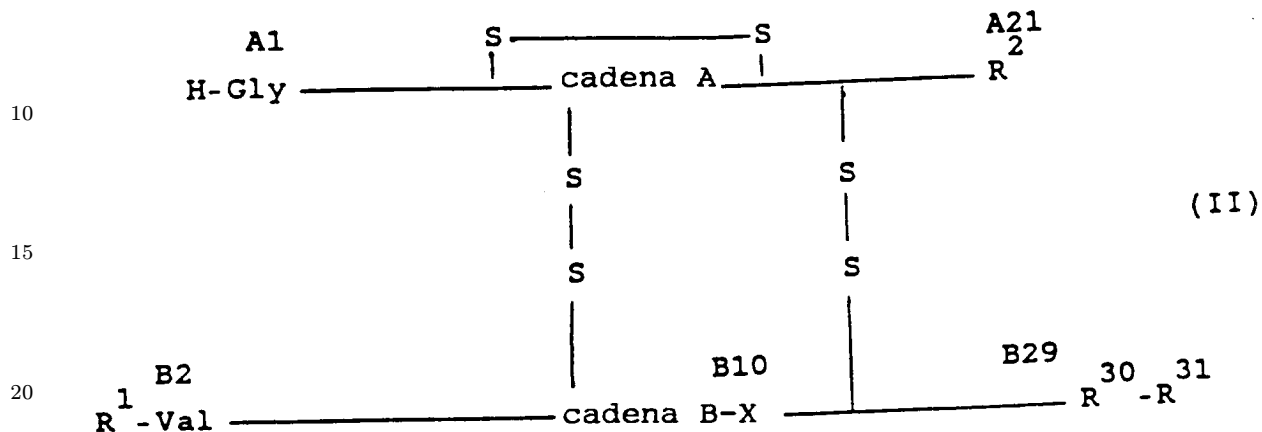
55

60

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de derivados de insulina de fórmula II,

5



en la cual

25

R¹ significa H ó H-Phe,

R² significa un L-aminoácido codificable genéticamente y que no contiene ningún grupo amido,

30

R³⁰ representa el radical de un L-aminoácido neutro, codificable genéticamente,

35

R³¹ representa un grupo orgánico fisiológicamente inocuo del grupo formado por:

amino-alcoxi (C₂-C₆), alquil (C₁-C₄)-amino-alcoxi (C₂-C₆), di-alquil (C₁-C₄)-amino-alcoxi (C₂-C₆), tri-alquil (C₁-C₄)-amino-alcoxi-(C₂-C₆), amino-alquil (C₂-C₆)-amino, [alquil (C₁-C₄)-amino]-alquil (C₂-C₆)-amino, di-alquil (C₁-C₄)-amino-alquil (C₂-C₆)-amino o [tri-alquil (C₁-C₄)-amino]-alquil (C₂-C₆)-amino, especialmente -O-[CH₂]_p-NR₂, -O-[CH₂]_p-N⁺R₃, -NH-[CH₂]_p-NR₂ ó -NH-[CH₂]_p-N⁺R₃, en donde p es = 2 hasta 6, y los R son iguales o diferentes y representan hidrógeno o alquilo (C₁-C₄), o representa de 1 hasta 3 α-aminoácidos, cuya función carboxi eventualmente presente, situada en un extremo, puede presentarse libre, como función de éster, como función de amida, como lactona o reducida a CH₂OH, y

40

X representa un L-aminoácido codificable genéticamente con un punto isoeléctrico entre 5 y 8,5,

y las sales fisiológicamente compatibles de estos derivados de insulina,

45

caracterizado porque se llevan a expresión las estructuras de gen que codifican estos derivados de insulina en una célula hospedante, preferiblemente en una bacteria o en una levadura y -en caso de que las estructuras de gen codifiquen una proteína de fusión- se pone en libertad el correspondiente derivado de insulina de fórmula II a partir de la proteína de fusión que se ha obtenido y eventualmente se transforma en una sal fisiológicamente compatible.

50

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque se preparan derivados de insulina de fórmula II, en donde R¹ representa H-Phe.

55

3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque se preparan derivados de insulina de fórmula II, en donde R² representa Gly, Ala, Ser, Thr, Asp ó Glu, especialmente sólo Asp.

4. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 hasta 3, **caracterizado** porque se preparan derivados de insulina de fórmula II, en donde R³⁰ representa Ala, Thr ó Ser.

60

5. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 hasta 4, **caracterizado** porque se preparan derivados de insulina de fórmula II, en donde R³¹ representa Arg-OH ó Arg-Arg-OH.

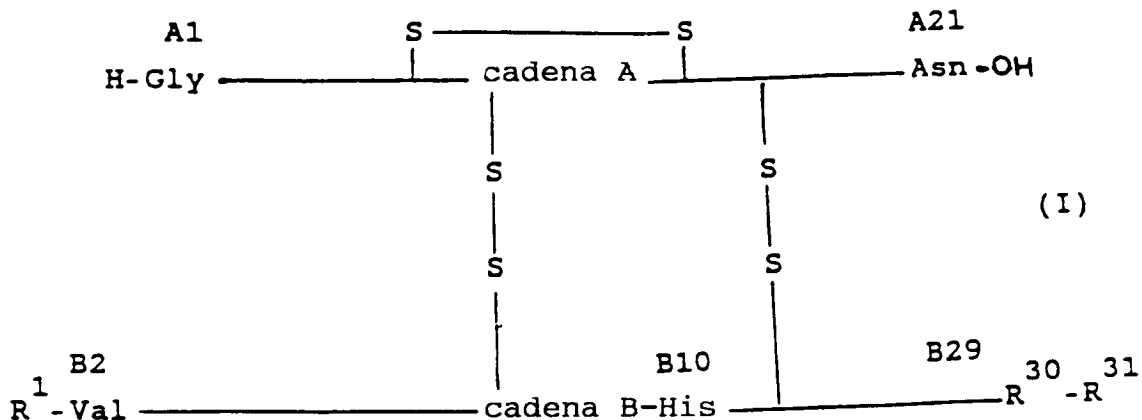
6. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 hasta 5, **caracterizado** porque se preparan derivados de insulina de fórmula II, en donde X significa Asn ó Gln.

7. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 hasta 6, **caracterizado** porque se preparan derivados de insulina de fórmula II, en donde las secuencias (A1 hasta A20) y (B1 hasta B9, B11 hasta B29) son las secuencias de la insulina de ser humano, de porcino o de bovino especialmente las secuencias de la insulina de ser humano.

8. Procedimiento para la preparación de derivados de insulina de fórmula II de acuerdo con la definición en la reivindicación 1, siendo, sin embargo,

R² sólo = Asp y
X = His,

y las sales fisiológicamente compatibles de estos derivados de insulina, **caracterizado** porque derivados de insulina de fórmula I



en donde R¹, R³⁰ y R³¹ tienen el mismo significado que en la fórmula II (según la definición dada en la reivindicación 1), se someten en un medio acuoso-ácido a una hidrólisis y los derivados de insulina de fórmula II que se forman en este caso se transforman en sus sales fisiológicamente compatibles.

9. Utilización de los derivados de insulina de fórmula II de acuerdo con la definición dada en la reivindicación 1, y de las sales fisiológicamente compatibles de estos derivados de insulina, como sustancias activas para preparados farmacéuticos para el tratamiento de la Diabetes mellitus.

10. Procedimiento para la producción de un preparado farmacéutico, **caracterizado** porque se lleva una cantidad eficaz de por lo menos un derivado de insulina de fórmula II y/o de por lo menos una de sus sales fisiológicamente compatibles, junto con un vehículo fisiológicamente aceptable, así como eventualmente con otras sustancias aditivas y/o coadyuvantes, a una forma apropiada de administración farmacéutica.

11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado** porque al preparado farmacéutico se le añade además por lo menos un compuesto de zinc en una cantidad que corresponde a un contenido de 1 µg hasta 2 mg, preferiblemente de 5 µg hasta 200 µg de zinc/ml.

12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10 ó 11, **caracterizado** porque al preparado farmacéutico se le añade además una insulina no modificada, preferiblemente insulina de ser humano no modificada.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

55

60

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.
