

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 500**

51 Int. Cl.:
C12P 21/02 (2006.01)
C07K 14/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06778234 .2**
96 Fecha de presentación: **15.08.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1917363**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.05.2008**

54 Título: **MÉTODO PARA PRODUCIR POLIPÉPTIDOS DE INSULINA MADUROS.**

30 Prioridad:
16.08.2005 EP 05107513

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.11.2011

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

72 Inventor/es:
ANDERSEN, Asser Sloth y
CHRISTENSEN, Lars Højlund

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

ES 2 368 500 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

Método para producir polipéptidos de insulina maduros

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención se refiere a un proceso de producción de análogos de insulina humana en levadura.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] La insulina es una hormona polipéptida producida en las células beta de los islotes de Langerhans. La molécula de insulina activa es una molécula bicatenaria que consiste en una cadena B y una cadena A conectadas por dos puentes disulfuros. La insulina se sintetiza como una molécula precursora de proinsulina con estructura B-C-A, donde la cadena de péptido C conecta el residuo de aminoácido C-terminal de la cadena B con el residuo de aminoácido N-terminal de la cadena A. La insulina madura bicatenaria se forma por escisión del péptido C en el par de residuos de aminoácidos básicos situados en las uniones con las cadenas A y B. Las cadenas A y B se mantienen unidas por dos puentes disulfuros entre los residuos Cys A7 y B7, y A20 y B19 respectivamente. Además, la molécula de insulina biológicamente activa tiene un puente disulfuro interno entre los residuos Cys en las posiciones A6 y A11.

[0003] Después del desarrollo de tecnología del ADN recombinante, se han descrito numerosos métodos para producir insulina y precursores de los mismos en células huésped genéticamente modificadas. Así, los métodos para producir insulina a partir de *E.coli*, se describen en, por ejemplo, Frank, B.H., Pettee, J.M., Zimmerman, R.E. & Burck, P.J. En: Peptides. Synthesis-Structure-Function. Proceedings of the Seventh American Symposium (D.H.Rich y E.Gross, eds). Pierce Chemical Company, p. 729 (1981). Como la *E.coli* no tiene la maquinaria celular para el pliegue del polipéptido expresado y para establecer los puentes disulfuros que conectan las cadenas A y B en la insulina madura, esta estrategia incluye varios pasos de tratamiento in vitro, tales como el establecimiento in vitro de los puentes disulfuros durante el repliegado y la escisión posterior del péptido C.

[0004] A diferencia de la *E.coli*, las eucariotas contienen la maquinaria necesaria para el pliegue y el establecimiento de los puentes disulfuros y por consiguiente parecen ser buenas candidatas para la producción de insulina madura en organismos genéticamente modificados. La patente estadounidense 4.914.026 describe un proceso para producir insulina madura en levadura por inserción del gen de la proinsulina humana, enlazado a la secuencia guía de factor- α en una célula huésped de levadura y el cultivo de la célula de levadura transformada en un medio nutritivo bajo unas condiciones por las cuales la proinsulina se expresa y secreta de forma madura.

[0005] Thim et al, Proc Natl. Acad. Sci. EEUU, volumen 83, 6766-6770, describe la expresión de la proinsulina humana y varios precursores de insulina con un péptido C modificado, tal como RREAENLQKR (SEC ID NO:1), RREAPLQKR (SEC ID NO:2), RREALQKR (SEC IDNO:3), KREALQKR (SEC ID NO:4) y RRLQKR (SEC ID NO:5). SEC ID NO:5 es también descrito por Thim et al, in FEBS Letters, volumen 212, número 2, 307-312.

[0006] Además, en WO 97/03089 se divulgaba la expresión de los precursores de la insulina con la fórmula BZA donde B y A son las cadenas de péptidos de la insulina humana A y B que están unidas por al menos un enlace de disulfuro y Z es un polipéptido que comprende al menos un zona de escisión proteolítica, por ejemplo KREQKLISEEALVDKR (SEC ID NO:6).

[0007] No obstante, los precursores de insulina descritos sólo dan lugar a pequeñas cantidades de insulina madura secretada en el medio de cultivo.

[0008] La solicitud de patente europea, 0163529A, las solicitudes de patente PCT Nos. WO 95/02059 y WO 90/10075 divulgan procesos para hacer insulina y análogos de insulina basados en la expresión de un precursor de la insulina o análogo de la insulina en levadura, que siguiendo la recuperación inicial del caldo de fermentación son enzimáticamente convertidos en insulina madura o análogo de insulina. Las moléculas precursoras comprenden ciertos péptidos C modificados y pueden comprender además una extensión N-terminal de la cadena B de la insulina. El péptido C modificado y la posible extensión N-terminal del péptido B están diseñados no para ser escindidos en la célula de levadura y que así los precursores se secreten como péptidos monocatenarios donde las cadenas A y B se conectan con el péptido C modificado, sino con puentes disulfuros correctamente dispuestos. La insulina madura o el producto análogo de insulina se obtiene entonces mediante varios pasos enzimáticos in vitro posteriores para disociar el péptido C y posibilitar la extensión N-terminal. Estos pasos enzimáticos conllevan mucho tiempo, son frecuentemente costosos, e introducen impurezas adicionales que posteriormente se deben eliminar en pasos adicionales de un proceso posterior, como los costosos pasos de la cromatografía y similares.

[0009] En la patente estadounidense nº 6.348.327 se divulga un proceso para producir insulina madura en células animales genéticamente modificadas que no son capaces de generar gránulos secretores de forma natural.

[0010] El propósito de la presente invención es desarrollar una cepa de hongos capaz de secretar análogos de insulina humana madura completamente procesada, de modo que se puedan evitar los pasos costosos y de larga duración del

proceso de purificación posterior.

RESUMEN DE LA INVENCION

- 5 [0011] En un aspecto, la invención se refiere a un método para producir un análogo de insulina humana madura mediante cultivo de una célula fúngica que comprende un vector de ADN que codifica un precursor para el análogo de insulina humana, donde dicho precursor comprende un péptido conector flanqueado con un zona de escisión Kex2 en ambas uniones de las cadenas A y B del péptido de la insulina, respectivamente, siendo dichos sitios de escisión escindidos dentro de la célula fúngica, permitiendo de esta forma a la célula secretar el análogo de insulina humana bicateriano, maduro y correctamente procesado a los medios de cultivo, y donde el análogo de insulina tiene una mutación en al menos una de las posiciones A8; B10; A18 y A14 en la cadena A y/o B de insulina humana.
- 10 [0012] Los análogos de insulina humana según la presente invención serán expresados como precursores monocatenarios en la célula fúngica y serán escindidos en la célula y secretados como análogos maduros bicatenarios de insulina humana sin la necesidad de otro tratamiento in vitro.
- [0013] El péptido conector tendrá una composición de aminoácidos que sea óptima para asegurar la escisión dentro de la célula del hongo para secretar el polipéptido análogo de insulina madurado correctamente.
- 15 [0014] En una forma de realización de la invención, el residuo de aminoácido en la penúltima posición de la zona de escisión adyacente a la cadena A, es seleccionado del grupo consistente en Phe, Leu, Ile, Tyr, Trp, Val, Met y Ala.
- [0015] En otra forma de realización de la invención, el péptido conector comprenderá un residuo de aminoácido Leu, Ile, Tyr, Arg, Lys, His, Pro, Phe, Trp, Met, Val o Ala, en la penúltima posición de la zona de escisión adyacente a la cadena A.
- 20 [0016] En otra forma de realización de la invención, el péptido conector comprenderá un residuo de aminoácido Leu o Ile en esta posición.
- [0017] También se ha descubierto que el residuo de aminoácido en la misma posición no debería ser Asp, Glu o Gly.
- [0018] El tamaño del péptido C en la insulina humana es de 35 residuos de aminoácidos. Así, en un aspecto de la presente invención, el péptido conector será aproximadamente de la misma longitud del péptido C natural.
- 25 [0019] En una forma de realización el péptido conector será de 2-35, 2-34, 2-33, 2-31, 2-30, 2-29, 2-28, 2-27, 2-26, 2-25, 2-24, 2-23, 2-22, 2-21, 2-20, 2-19, 2-18, 2-17, 2-16, 2-15, 2-14, 2-13, 2-12, 2-11, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4 ó 2-3 residuos de aminoácidos.
- [0020] En otra forma de realización el péptido conector será de 3-35,3-34, 3-33, 3-32, 3-31, 3-30, 3-29, 3-28, 3-27, 3-26, 3-25, 3-24, 3-23, 3-22, 3-21, 3-20, 3-19, 3-18, 3-17, 3-16, 3-15, 3-14, 3-13, 3-12, 3-11, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4
- 30 [0021] En otra forma de realización el péptido conector consistirá en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 31, 32, 33, 34 ó 35 residuos de aminoácidos.
- [0022] La célula fúngica secretará cantidades altas de análogos de insulina humana correctamente procesados y en una forma de realización la célula fúngica es capaz de secretar al menos aproximadamente de 20 a 50 mg/litro de análogo maduro bicatenario de insulina humana correctamente procesado a los medios de cultivo.
- 35 [0023] La célula fúngica es típicamente capaz de secretar al menos aproximadamente de 20 a 80 mg/litro o al menos aproximadamente 100 mg/litro de análogo maduro bicatenario de insulina humana correctamente procesado a los medios de cultivo.
- [0024] Cuanto más eficaz sea la escisión del péptido conector de la molécula precursora del análogo de insulina, mayor será el rendimiento final de la proteína objetivo. Así, es deseable que la composición de aminoácidos del péptido conector permita una escisión eficaz de las zonas de escisión en las uniones con las cadenas A y B, respectivamente.
- 40 [0025] En una forma de realización de la invención, al menos el 50% de la molécula precursora de insulina monocatenaria expresada se escinde de la molécula madura bicatenaria.
- [0026] En otra forma de realización al menos el 60 % de la molécula precursora de insulina monocatenaria expresada se escinde de la molécula madura bicatenaria.
- 45 [0027] En otra forma de realización al menos el 70% de la molécula precursora de insulina monocatenaria se escinde de la molécula madura bicatenaria.
- [0028] En otra forma de realización al menos el 75% de la molécula precursora de insulina monocatenaria expresada se escinde de la molécula madura bicatenaria.

[0029] En otra forma de realización al menos el 85% o al menos el 95% de la molécula precursora de insulina monocatenaria expresada se escinde de la molécula madura bicatenaria.

[0030] La célula fúngica puede ser cualquier célula fúngica capaz de expresar y secretar los análogos de insulina madurados. No obstante, la levadura ha resultado ser adecuada para el presente fin, en particular *S. cerevisiae*.

5 [0031] La molécula de insulina humana tiene tres estructuras de hélice, una en la cadena B y dos en la cadena A. La cadena A comprende dos segmentos helicoidales A2-A8 y A13-A19 unidos por un bucle en posición A9-A11 y en la conformación del estado T de residuos de insulina B9-B19 forman la hélice- α central de la cadena B. Se ha demostrado que determinadas mutaciones en la molécula de la insulina aumentarán la estabilidad de estas estructuras de hélice, conduciendo a una alta actividad biológica (ver N: Kaarsholm et. Al., Biochemistry 1993, 32, 10773-10778). Los análogos
10 de insulina preparados por el presente método, comprenden típicamente mutaciones que pueden tener un efecto estabilizante de la estructura de hélice de la molécula análoga de insulina humana, conllevando una secreción de mayores rendimientos.

[0032] Así, en una forma de realización, los análogos de insulina producidos por el método según la invención comprenderán mutaciones en la molécula de insulina en una o más de las posiciones A8, B10 y A14 y en otra forma de
15 realización, los residuos de aminoácidos naturales en estas posiciones se mutarán con residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Asp, Glu, His, Gln y Arg.

[0033] Otras mutaciones de la molécula de insulina incluyen mutaciones en las posiciones B28 y B29, mutaciones en la posición A18, supresiones de los residuos de aminoácidos B30 o B1 y mutación del residuo de aminoácido A21.

[0034] En una forma de realización de la invención, el residuo de aminoácido en la posición B28 es Asp y el residuo de
20 aminoácido en la posición B29 es Lys.

[0035] En otra forma de realización de la invención, el residuo de aminoácido en la posición B28 es Lys, el residuo de aminoácido en la posición B29 es Pro y el residuo de aminoácido en la posición B30 es Thr.

[0036] En otra forma de realización de la invención el aminoácido en la posición A18 es Gln.

[0037] En otra forma de realización de la invención el residuo de aminoácido en la posición A21 es Gly.

25 [0038] En otra forma de realización de la invención el residuo de aminoácido en la posición B10 es Glu.

[0039] En otra forma de realización de la invención el residuo de aminoácido en la posición A8 es His.

[0040] En otra forma de realización de la invención el residuo de aminoácido en la posición A14 es Glu.

[0041] En otra forma de realización de la invención el residuo de aminoácido en la posición B10 es Glu, el residuo de aminoácido en la posición A8 es His y el residuo de aminoácido en la posición A14 es Glu.

30 [0042] En otra forma de realización de la invención el residuo de aminoácido en la posición B30 es eliminado.

[0043] En una forma de realización el análogo de precursor de insulina humana tiene la secuencia de aminoácidos
B(1-30)-X-X-Z-Y-Y-A(1-21)

35 donde B(1-30) es la cadena B de la insulina humana, A(1-21) es la cadena A de la insulina humana, cada X, y cada Y independientemente uno del otro son Lys o Arg o un sitio Yps1 y Z es una secuencia peptídica que tiene aproximadamente de 1 a 35 residuos de aminoácidos, con la condición de que al menos uno de los residuos de aminoácidos naturales en las cadenas de insulina humana A y/o B mute en otro residuo de aminoácido.

[0044] En otra forma de realización las secuencias X-X e Y-Y son ambas Lys-Arg.

[0045] En otra forma de realización las secuencias X-X e Y-Y son ambas Arg-Arg, Lys-Lys o Arg-Lys.

[0046] En otra forma de realización X-X es Lys-Arg e Y-Y es Arg-Arg o X-X es Arg-Arg e Y-Y es Lys-Arg.

40 [0047] En una forma de realización Z es del tamaño de 2-35, 2-34, 2-33, 2-31, 2-30, 2-29, 2-28, 2-27, 2-26, 2-25, 2-24, 2-23, 2-22, 2-21, 2-20, 2-19, 2-18, 2-17, 2-16, 2-15, 2-14, 2-13, 2-12, 2-11, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4 o 2-3 residuos de aminoácidos.

[0048] En otra forma de realización Z es del tamaño de 3-35, 3-34, 3-33, 3-31, 3-30, 3-29, 3-28, 3-27, 3-26, 3-25, 3-24, 3-23, 3-22, 3-21, 3-20, 3-19, 3-18, 3-17, 3-16, 3-15, 3-14, 3-13, 3-12, 3-11, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5 o 3-4 residuos de
45 aminoácidos.

[0049] En una forma de realización de la invención Z puede ser del tamaño de 2, 3, 4, 5, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 31, 32, 33, 34 y 35 residuos de aminoácidos.

[0050] En otra forma de realización de la invención Z es una secuencia de aminoácidos de 3-20 residuos de

aminoácidos.

- [0051] En otra forma de realización de la invención Z es una secuencia de aminoácidos de 3-19 residuos de aminoácidos.
- 5 [0052] En otra forma de realización de la invención Z es una secuencia de aminoácidos de 3-18 residuos de aminoácidos.
- [0053] En otra forma de realización de la invención Z es una secuencia de aminoácidos de 3-15 residuos de aminoácidos.
- [0054] En otra forma de realización de la invención Z es una secuencia de aminoácidos de 3-14 residuos de aminoácidos.
- 10 [0055] En otra forma de realización de la invención Z es una secuencia de aminoácidos de 3-13 residuos de aminoácidos.
- [0056] En otra forma de realización de la invención Z es una secuencia de aminoácidos de 3-12 residuos de aminoácidos.
- 15 [0057] En otra forma de realización de la invención Z es una secuencia de aminoácidos de 3-11 residuos de aminoácidos.
- [0058] En otra forma de realización de la invención Z es una secuencia de aminoácidos de 3-10 residuos de aminoácidos.
- [0059] En otra forma de realización de la invención Z es una secuencia de aminoácidos de 3-9 residuos de aminoácidos.
- [0060] En otra forma de realización de la invención Z es una secuencia de aminoácidos de 3-8 residuos de aminoácidos.
- 20 [0061] En otra forma de realización de la invención Z es una secuencia de aminoácidos de 3-7 residuos de aminoácidos.
- [0062] En otra forma de realización de la invención Z es una secuencia de aminoácidos de 3-6 residuos de aminoácidos.
- [0063] En otra forma de realización de la invención Z es una secuencia de aminoácidos de 3-5 residuos de aminoácidos.
- [0064] En otra forma de realización de la invención Z es una secuencia de aminoácidos de 3-4 residuos de aminoácidos.
- 25 [0065] En una forma de realización de la invención el residuo de aminoácido en la penúltima posición de la zona de escisión Y-Y se selecciona del grupo que consiste en Leu, Ile, Tyr, Arg, Lys, His, Pro, Phe, Trp, Val, Met y Ala
- [0066] En una forma de realización de la invención el residuo de aminoácido en la penúltima posición de la zona de escisión Y-Y es Leu.
- [0067] En una forma de realización de la invención el residuo de aminoácido en la penúltima posición de la zona de escisión Y-Y es Ile.
- 30 [0068] En una forma de realización de la invención el residuo de aminoácido en la penúltima posición de la zona de escisión Y-Y es Tyr.
- [0069] En una forma de realización de la invención el residuo de aminoácido en la penúltima posición de la zona de escisión Y-Y es Arg.
- 35 [0070] En una forma de realización de la invención el residuo de aminoácido en la penúltima posición de la zona de escisión Y-Y es Lys.
- [0071] En una forma de realización de la invención el residuo de aminoácido en la penúltima posición de la zona de escisión Y-Y es His.
- [0072] En una forma de realización de la invención el residuo de aminoácido en la penúltima posición de la zona de escisión Y-Y es Pro.
- 40 [0073] En una forma de realización de la invención el residuo de aminoácido en la penúltima posición de la zona de escisión Y-Y es Phe.
- [0074] En una forma de realización de la invención el residuo de aminoácido en la penúltima posición de la zona de escisión Y-Y es Trp.
- 45 [0075] En una forma de realización de la invención el residuo de aminoácido en la penúltima posición de la zona de escisión Y-Y es Met.
- [0076] En una forma de realización de la invención el residuo de aminoácido en la penúltima posición de la zona de

escisión Y-Y es Val.

[0077] En una forma de realización de la invención el residuo de aminoácido en la penúltima posición de la zona de escisión Y-Y es Ala.

[0078] En una forma de realización de la invención, Z tiene la secuencia AspGlyLeuGly (SEC ID No:7).

5 [0079] El resto de Z puede ser cualquier residuo de aminoácido codificable, que pueden ser iguales o diferentes. No obstante, en una forma de realización el residuo de aminoácido en Z en la penúltima posición de la zona de escisión Y-Y no es ni Asp, ni Glu ni Gly.

10 [0080] En otro aspecto, la invención se refiere a una secuencia de ADN que codifica un precursor análogo de insulina humana que comprende un péptido conector que está diseñado para permitir una escisión eficaz de las zonas de escisión dentro de una célula fúngica permitiendo a la célula secretar un análogo de insulina maduro bicatenario correctamente procesado a los medios de cultivo.

15 [0081] En otro aspecto, la invención se refiere a un vector de expresión que comprende una secuencia de ADN que codifica un precursor análogo de insulina humana que comprende un péptido conector que está diseñado para permitir una escisión eficaz de las zonas de escisión dentro de una célula fúngica, que permite a la célula secretar un análogo de insulina humana maduro bicatenario correctamente procesado a los medios de cultivo.

20 [0082] En otro aspecto, la presente invención se refiere a una célula fúngica transformada que comprende un vector de expresión que comprende una secuencia de ADN que codifica un precursor análogo de insulina humana que a su vez comprende un péptido conector que está diseñado para permitir una escisión eficaz de las zonas de escisión dentro de una célula fúngica, permitiendo a la célula a secretar un análogo de insulina humana maduro bicatenario correctamente procesado a los medios de cultivo.

[0083] Los análogos de insulina humana producidos por el método según la presente invención, se pueden utilizar en el tratamiento de estados que son sensibles a la insulina. Así, pueden ser usados en el tratamiento de la diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 e hiperglucemia, por ejemplo, como se ha observado a veces en personas seriamente heridas y personas que se han sometido a cirugía mayor.

25 [0084] En caso de ser necesario, los análogos de insulina se pueden utilizar mezclados con otros tipos de insulina, p. ej. análogos de insulina con un comienzo más rápido de la acción. Ejemplos de tales análogos de insulina se describen p. ej. en las solicitudes de patente europea con los números de publicación EP 214826, EP 375437 y EP 383472.

30 [0085] En otro aspecto, la presente invención se refiere a formulaciones farmacéuticas que comprenden los análogos de insulina humana en combinación con adyuvantes adecuados farmacéuticamente aceptables y aditivos tales como uno o más agentes adecuados para la estabilización, conservación o isotonicidad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0086]

35 La Figura 1 muestra un ejemplo de un plásmido de levadura llamado pSA50. El plásmido contiene un casete de expresión que comprende un fragmento EcoRI - XbaI insertado en el plásmido entre el promotor de transcripción y el terminador de transcripción del gen TPI de *S. cerevisiae*.

La Figura 2 muestra el fragmento de ADN NcoI-XbaI que contiene el precursor de insulina B(1-30)-KRDGLGKR-(A1-21), A18Q (SEC ID NO:8) y la secuencia de aminoácidos correspondiente (SEC ID NO. 10) descrita en el ejemplo 3.

40 La Figura 3 muestra perfiles de tiempo para el índice de adición de alimento (g de alimento/min) en un fermentador utilizando un volumen de inicio de 1,25L. También se muestra la concentración de dióxido de carbono en el gas de escape del fermentador como una función de tiempo y

La Figura 4 muestra perfiles de tiempo para la densidad óptica medida a 600 nm y la concentración calculada de insulina por L de caldo de fermentación (incluyendo insulina desB30).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

45 [0087] La producción de insulina mediante secreción del producto maduro directamente al caldo de fermentación requiere el tratamiento intracelular de los precursores de insulina que comprenden un péptido conector flanqueado por una zona de escisión en cada uno de los extremos. Tal péptido conector puede ser del tipo B-KR(W)_n KR-A donde B es la cadena B de insulina humana y W es una cadena peptídica de longitud variable. El tratamiento intracelular se facilita con las proteasas de Golgi Kex1 y Kex2. La escisión es un proceso de múltiples pasos donde en el primer paso Kex2 se unirá a la secuencia KR fijada a la cadena A y convertirá la molécula monocatenaria en una molécula bicatenaria. Luego, Kex2 disociará el péptido conector W para dar una molécula de insulina intermedia bicatenaria donde el dipéptido KR sigue conectado al aminoácido C-terminal en la cadena B.

50

Finalmente Kex1 eliminará la última secuencia péptida KR dando la molécula madura bicatenaria.

[0088] Experimentos han mostrado que la escisión eficaz del zona de escisión en la coyuntura de la cadena A es importante para el progreso del proceso de escisión, y el péptido conector según la presente invención se diseña para permitir una escisión eficaz in vivo de la zona de escisión en la cadena A Kex2 conduciendo a rendimientos altos de una molécula de insulina bicatenaria secretada sin la necesidad de pasos adicionales de tratamiento in vitro.

[0089] La secreción de altas cantidades de análogo activo bicatenario maduro de insulina humana a partir de la levadura, reducirá significativamente el número de pasos de purificación necesarios para producir un análogo de insulina humana de una pureza suficientemente alta para objetivos farmacéuticos. Así, en el método para producir insulina en levadura divulgado en la patente estadounidense n°. 4916212, un precursor de insulina se convierte en insulina humana en dos pasos, es decir, una transpeptidación para convertir el precursor de insulina monocatenario B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21) en un éster de insulina humana y luego una hidrólisis del éster de insulina en insulina humana. Cada paso de conversión requerirá un paso de separación inicial y al menos un paso de purificación posterior. Así, al menos seis pasos adicionales son necesarios para producir la insulina bicatenaria madura, incluyendo al menos una conversión enzimática.

[0090] Es bien conocido que ninguna escisión enzimática se ejecuta con una escisión del 100%, dejando impurezas de impurezas no escindidas o parcialmente escindidas que tienen que ser eficazmente eliminadas en el caso de productos farmacéuticos. Así, cada paso de escisión, será seguido de al menos un paso de aislamiento o de purificación, típicamente una purificación cromatográfica por medios de cromatografía de intercambio, cromatografía por filtración en gel, cromatografía de afinidad, o similar. El material de columna cromatográfica para su uso a escala comercial es muy caro y por lo tanto la reducción del número de tales pasos cromatográficos tiene un impacto significativo en la economía de la producción. Una reducción de la conversión posterior y del paso de purificación, reducirá además la cantidad de trabajo y las horas dedicadas al proceso y, por tanto, mejorará aún más la economía de la producción.

[0091] En el presente proceso donde el análogo bicatenario maduro de insulina se puede aislar en altos rendimientos directamente del caldo de cultivo, son necesarios muchos menos pasos posteriores para producir un producto de pureza suficiente para uso farmacéutico.

[0092] Los análogos de insulina producidos por el método según la presente invención se pueden modificar en determinadas posiciones en las cadenas A y/o B además de las modificaciones que estabilizan las estructuras de hélice en la molécula de insulina. Así, el residuo de aminoácido en la posición B28 puede ser Asp. En otro grupo de análogos de insulina, el residuo de aminoácido en la posición B1 se ha eliminado. Un ejemplo específico de este grupo de análogos de insulina es la insulina humana desB1.

[0093] En otro grupo de análogos de insulina, el residuo de aminoácido en la posición B30 se ha eliminado. En otro grupo de análogos de insulina, el residuo de aminoácido en la posición B28 es Lys y el residuo de aminoácido en la posición B29 es Pro.

[0094] En otro grupo de análogos de insulina, el aminoácido en posición A18 puede ser Gln y en otra forma de realización el residuo de aminoácido en la posición A21 puede ser Gly.

[0095] La secuencia de ADN que codifica los precursores análogos de insulina puede ser de origen genómico o ADNc, por ejemplo, puede ser obtenida preparando un banco genómico o de ADNc y detectando secuencias de ADN que codifican todos o parte de los polipéptidos mediante hibridación utilizando sondas de oligonucleótidos sintéticas conforme a técnicas estándar (ver por ejemplo, Sambrook, J, Fritsch, EF y Maniatis, T, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1989). La secuencia de ADN que codifica los precursores de insulina también puede ser preparada sintéticamente por métodos estándar establecidos, p. ej. el método de fosfoamidita descrito por Beaucage y Caruters, Tetrahedron Letters 22 (1981), 1859 - 1869, o el método descrito por Mattes et al., EMBO Journal 3 (1984), 801 - 805. La secuencia de ADN también puede ser preparada mediante reacción en cadena de polimerasa utilizando cebadores específicos, por ejemplo, como se describe en el documento US 4.683.202 or Saiki et al., Science 239 (1988), 487 - 491.

[0096] La secuencia de ADN se puede insertar en cualquier vector que se pueda someter a procedimientos de ADN recombinante y la elección del vector frecuentemente dependerá de la célula huésped en que éste ha de ser introducido. Así, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, la replicación del cual es independiente de la replicación cromosómica, p. ej. un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno, que al ser introducido en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped, y es replicado junto con el cromosoma(s) en el que ha sido integrado.

[0097] El vector es preferiblemente un vector de expresión en el cual la secuencia de ADN que codifica el precursor de insulina está unido operativamente a segmentos adicionales requeridos para la transcripción del ADN, tal como un promotor. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestre actividad transcripcional en la célula huésped elegida, y se pueda derivar a partir de genes que codifican proteínas bien homólogas o bien heterólogas a la célula huésped.

- 5 [0098] Ejemplos de promotores adecuados para su uso en células huésped de levadura incluyen promotores de genes glucolíticos de levadura (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255 (1980), 12073 - 12080; Alber and Kawasaki, J. Mol. Appl. Gen. 1 (1982), 419 - 434) o genes de alcohol deshidrogenasa (Young et al., in Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals (Hollaender et al, eds.) Plenum Press, Nueva York, 1982), o los promotores TP11 (US 4,599,311) o ADH2-4c (Russell et al., Nature 304 (1983), 652 - 654).
- [0099] La secuencia de ADN que codifica el precursor de insulina puede también, si es necesario, estar operativamente unido a un terminador adecuado, a señales de poliadenilación, a secuencias potenciadoras transcripcionales, y a secuencias potenciadoras traslacionales. El vector recombinante de la invención puede comprender además una secuencia de ADN permitiendo al vector replicar en la célula huésped en cuestión.
- 10 [0100] Para dirigir la insulina a la vía secretora de las células huéspedes, una secuencia de señal secretora (también conocida como una secuencia líder, una secuencia pre-pro o una secuencia pre) se puede proporcionar en el vector recombinante. La secuencia de señal secretora se une a la secuencia de ADN que codifica el precursor de insulina en el marco de lectura correcto. Las secuencias de señal secretora se sitúan comúnmente en el extremo 5' de la secuencia de ADN que codifica el péptido. El péptido señal puede ser un péptido señal producido de forma natural, o una parte
- 15 funcional de la misma, o puede ser un péptido sintético.
- [0101] Para una secreción eficaz en levadura, una secuencia que codifica un péptido líder puede también ser insertada después de la secuencia de señal y antes de la secuencia de ADN que codifica el precursor de insulina.
- [0102] La célula huésped de levadura en la que se introduce la secuencia de ADN o el vector recombinante, puede ser cualquier célula de levadura capaz de expresar el precursor de insulina e incluye *Saccharomyces spp.* o *Schizosaccharomyces spp.*, en cepas particulares de *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces Kluyveri*. Más ejemplos de células de levadura adecuadas, son cepas de *Kluyveromyces*, tales como *K. Lactis*, *Hansenula*, por ejemplo *H. Polimorfa*, o *Pichia*, por ejemplo *P. Pastoris* (véase Gleeson et al., J. Gen. Microbiol. 132, 1986, págs. 3459-3465; US 4,882,279).
- 20 [0103] Métodos para transformar células de levadura con ADN heterólogo y producir polipéptidos heterólogos de los que se han descrito, p. ej. en US 4.599.311, US 4.931.373, US 4.870.008, 5.037.743, y US 4.845.075. Las células transformadas se seleccionan por un fenotipo determinado por un marcador de selección, resistencia común al fármaco o capacidad para crecer en ausencia de un nutriente particular, p. ej. leucina. Un vector preferido para uso en levadura es el vector POT1 descrito en US 4.931.373.
- 25 [0104] El proceso según la presente invención es un proceso llamado de fermentación. La fermentación es preferiblemente realizada en tanques asépticos agitados con líneas de suministro para la adición de gases comprimidos estériles que consisten en, pero no se limitan a, aire, oxígeno y amoníaco. Un tanque de fermentación puede contener dispositivos/sensores para monitorizar el pH, la temperatura, la presión, el índice de agitación, el nivel de oxígeno disuelto, el contenido líquido, el nivel de espuma, los índices de adición de alimento y los índices de adición de ácido y base.
- 30 [0105] La temperatura puede estar dentro del intervalo aproximadamente de 25 a 35, aproximadamente de 26 a 31, o aproximadamente de 26 a 29°C. El pH estará en el intervalo aproximadamente de 4.0 a 6.8 o aproximadamente de 5.0 a 6.5.
- [0106] La agitación se controla para asegurar una concentración mínima de oxígeno disuelto de como mínimo un 5% de saturación.
- 35 [0107] Además, el tanque de fermentación puede estar equipado con dispositivos ópticos para monitorizar niveles de densidad celular, concentraciones de metabolitos y productos independientemente de su forma fisicoquímica. La formación y el consumo de compuestos volátiles se monitorizan mediante el análisis de gas en las entradas de gas y salidas de gas del tanque de fermentación. Todas las señales de las variables monitorizadas se pueden usar para objetivos de control que permiten que la variables se mantengan dentro registros predefinidos o cambien continuamente según el perfil predefinido respecto al tiempo. Alternativamente, las variables se controlan en respuesta a cambios de señales de otras variables monitorizadas.
- 40 [0108] El producto deseado producido durante la fermentación se presenta como material soluble extracelular o como material intracelular, bien en forma de material soluble o como material insoluble que incluye material agregado. La formación del producto es bien constitutivo o bien inducido, y es dependiente o independiente del cultivo microbiano. El proceso de fermentación se realiza en tanques con un volumen de trabajo que va desde los 100 mL a los 200,000 L. Un proceso de fermentación se puede llevar a cabo como un proceso por lotes, como un proceso de alimentación por lotes, como un proceso repetido de alimentación por lotes o como un proceso continuo.
- 45 [0109] El medio usado para el cultivo de las células en el proceso de fermentación puede ser cualquier medio convencional adecuado para el crecimiento de las células huésped, tales como medios mínimos o complejos que contengan suplementos apropiados. Los medios adecuados están disponibles por parte de proveedores comerciales o
- 50
- 55

se pueden preparar siguiendo recetas publicadas (p. ej. en catálogos de la American Type Culture Collection). Así, el medio contendrá al menos una fuente de carbono, una o más fuentes de nitrógeno, sales esenciales que incluyen sales de potasio, sodio, magnesio, fosfato, nitrato y sulfato, trazas de metales, vitaminas solubles en agua, soportes del proceso que incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de proteasa, estabilizadores, ligandos, agentes antiespumantes e inductores. El medio puede contener componentes que son parcialmente precipitados o dispersados en el medio líquido en algunas condiciones de funcionamiento, incluyendo la esterilización por calor. El medio puede estar compuesto por la mezcla de diferentes líquidos y soluciones gaseosas. Estas soluciones se pueden mezclar antes de entrar en el tanque de fermentación, o se pueden suministrar al tanque de fermentación como corrientes de líquido separadas, añadidas en una proporción predefinida. La proporción entre las diferentes soluciones de líquido de los componentes del medio, puede variar durante las diferentes etapas del proceso de fermentación, lo que significa que la composición global del medio puede variar durante el curso de la fermentación.

[0110] Un medio de fermentación adecuado puede contener entre 20 y 60 mM de sales de PO_4^{3-} , entre 50 y 70 mM K^+ , entre 20 y 35 mM SO_4^{2-} , entre 4 y 6 mM Na^+ , entre 6 y 13 mM Mg^{2+} , entre 0,5 y 1,5 mM Mn^{2+} , entre 0,02 y 0,04 mM Cu^{2+} , entre 0,1 y 0,3 mM Fe^{2+} , entre 0,01 y 0,05 mM Zn^{2+} , pequeñas cantidades de Co, Mo y Ni añadidas como parte de una fuente de aminoácido compleja, entre 1 y 40 g/L de extracto de levadura, vitaminas seleccionadas de m-inositol (entre 100 y 250 mg/L), pantotenato de calcio (entre 2 y 20 mg/L), tiamina, HCl (entre 0,5 y 20 mg/L), piridoxina (entre 0,2 y 20 mg/L), nicotinamida de niacina (entre 2 y 7 mg/L), biotina (entre 0,03 y 0,8 mg/L), y dihydrogencitrato de la colina (entre 0,1 y 0,2 mg/L), un ligando tal como ácido cítrico, H_2O (entre 0,5 y 7 g/L) y glucosa como fuente de carbono (entre 50 y 200 g/L). Se añade continuamente nitrógeno, bien gaseoso NH_3 o bien líquido $\text{NH}_4 \text{OH}$ en una cantidad de entre 400 y 1800 mM. Se usa agua potable como fuente natural de calcio y Cl^- .

[0111] El péptido producido por las células puede luego ser recuperado del medio de cultivo por procedimientos convencionales que incluyen la separación de las células huésped del medio mediante centrifugado o filtración, la precipitación de los componentes proteínicos del sobrenadante o el filtrado mediante una sal, p. ej. sulfato de amonio, la purificación por una variedad de procedimientos cromatográficos, p. ej. cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración por gel, cromatografía de afinidad, o similares, dependiendo del tipo de péptido en cuestión.

[0112] Después del aislamiento del caldo de cultivo, la insulina o análogo de insulina se puede convertir p. ej. en formas aciladas mediante acilación de, en particular, el grupo amino- ϵ del residuo B29Lys. Los métodos para la acilación de insulinas se conocen bien en la técnica y se describen p. ej. en las patentes EP 792.290 y 894.095 y en las patentes estadounidenses Nos. 5.693.609, 5.646.242, 5.922.675, 5.750.497 y 6.011.007.

[0113] Ejemplo de insulinas aciladas son insulina humana $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}$ -Tetradecanoilo des(B30), insulina humana $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}$ -litocoloilo-Y-glutamil des(B30), insulina humana $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}$ -(N^{α} -($\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}$ CO)-Y-Glu) des(B30) o insulina humana $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}$ -(N^{α} -($\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}$ CO)-y- Glu) des(B30).

[0114] Por "B(1-29)" o "desB30" se entiende una cadena B de insulina natural que carece del residuo de aminoácido B30, B(1-30) se refiere a la cadena natural B de la insulina humana y "A(1-21)" a la cadena natural A de la insulina. La insulina humana A18Q es un análogo de insulina con un Gln en posición A18 de la cadena A de la insulina humana. B10E, A8H, A14E es un análogo de insulina con un Glu en posición B10, un His en posición A8 y un Glu en posición A14 respectivamente.

[0115] Por "B1", "A1" etc, se entiende el residuo de aminoácido en posición 1 en la cadena B de la insulina (contado desde el extremo N-terminal) y el residuo de aminoácido en posición 1 en la cadena A de la insulina (contado desde el extremo N-terminal), respectivamente. El residuo de aminoácido en una posición específica puede también ser denominado p. ej. $\text{Phe}^{\text{B}1}$, que significa que el residuo de aminoácido en la posición B1 es un residuo de fenilalanina.

[0116] Por "péptido C" se entiende la secuencia peptídica que une las cadenas de péptidos A y B de la molécula de insulina incluyendo las zonas de escisión de cada extremo.

[0117] Por "péptido conector" se entiende la secuencia peptídica entre las dos zonas de escisión en cada unión con las cadenas A y B respectivamente.

[0118] Por "análogo de insulina humana maduro" se entiende un análogo de insulina bicatenario activo con la misma conformación estructural que la molécula de insulina humana natural, p. ej. con puentes disulfuros entre $\text{Cys}^{\text{A}7}$ y $\text{Cys}^{\text{B}7}$ y entre $\text{Cys}^{\text{A}20}$ y $\text{Cys}^{\text{B}19}$ y un puente disulfuro interno entre $\text{Cys}^{\text{A}6}$ y $\text{Cys}^{\text{A}11}$, pero con determinadas mutaciones en una o más posiciones en la cadenas A y/o B en comparación con el residuo de aminoácido natural en la posición correspondiente.

[0119] Por "análogo de insulina", como se utiliza en este caso, se entiende un polipéptido que tiene una estructura molecular que formalmente se puede derivar de la estructura de una insulina de origen natural, por ejemplo, la de la insulina humana, eliminando y/o sustituyendo al menos un residuo de aminoácido en la insulina natural y/o añadiendo al menos un residuo de aminoácido. Los residuos de aminoácidos sustituidos y/o añadidos pueden ser residuos de aminoácidos codificables u otros residuos de aminoácidos de origen natural o residuos de aminoácidos puramente

sintéticos. Los análogos de insulina típicamente no comprenderán más de aproximadamente 7 mutaciones, más típicamente no más de 5, e incluso más típicamente aún como máximo 3 mutaciones, en comparación con la insulina humana.

5 [0120] En los análogos de insulina la posición 28 de la cadena B puede ser modificada a partir del residuo Pro natural a Asp, Lys, o Ile. Lys en posición B29 puede también ser modificada a Pro.

[0121] También Asn en la posición A21 se puede modificar a Ala, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, en particular a Gly, Ala, Ser, o Thr y en particular a Gly. Además, Asn en la posición B3 se puede modificar a Lys o Asp. Más ejemplos de análogos de insulina son la insulina humana des(B30), análogos de insulina donde uno o ambos B1 y B2 han sido eliminados; análogos de insulina donde la cadena A y/o la cadena B tienen una extensión N-terminal y análogos de insulina donde la cadena A y/o la cadena B tienen una extensión C-terminal. Más análogos de insulina son aquellos donde uno o más de B26-B30 han sido eliminados.

10 [0122] Por "derivado de insulina" como se utiliza en este caso, se entiende una insulina de origen natural o un análogo de insulina que ha sido químicamente modificado, p. ej. introduciendo una cadena lateral en una o más posiciones de la estructura de la insulina, u oxidando o reduciendo grupos de residuos de aminoácidos en la insulina, o por acilación de un grupo amino libre o un grupo hidroxilo.

[0123] Por "Kex2" se entiende una endoproteasa subtilisina que cataliza preferentemente la escisión después de una secuencia de dos residuos básicos (lisina o arginina) (Rockwell, NC, Krisan, DJ, Komiyama, T & Fuller, Rs 2002 Precursor Processing By Kex2/Furin Proteases. Chem. Rev. 102: 4525-4548).

20 [0124] Por "Kex1" se entiende una carboxipeptidasa de serina que cataliza preferentemente la eliminación de lisilo C-terminal y /o residuos de arginilo (Shilton BH, Thomas DY, Cygler M 1997 Crystal Structure of Kex1deltap, a prohormone-processing carboxypeptidase from *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemistry 36: 9002-9012).

[0125] Por "Yps1" se entiende una aspartil proteasa que suprime parcialmente el factor de acoplamiento pro-alfa, procesando defectos en mutantes de levadura que carecen por naturaleza del factor de acoplamiento pro-alfa procesando enzimas Kex2 (Egel-Mitani et al., Yeast 6, 1990, págs. 127-137).

25 [0126] Por "correctamente procesado" se entiende una escisión enzimática en el punto de escisión deseado que da el producto deseado con una secuencia de residuo de aminoácido correcta.

[0127] "POT" es el gen de triosa fosfato isomerasa de *Schizosaccharomices pombe*, y "TPI1" es el gen de triosa fosfato isomerasa de *S. cerevisiae*.

30 [0128] El término "péptido señal" se entiende que significa un prepéptido que está presente como una secuencia N-terminal en la forma precursora de una proteína. La función del péptido señal es la de permitir la proteína heteróloga para facilitar la translocación en el retículo endoplásmico. El péptido señal es normalmente seccionado en el curso de este proceso. El péptido señal puede ser heterólogo u homólogo al organismo huésped que produce la proteína.

35 [0129] Una región de codificación del péptido señal eficaz para células huésped fúngicas filamentosas es la región de codificación del péptido señal obtenida del gen de TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, del gen de amilasa neutral *Aspergillus niger*, del gen de proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, del gen de celulasa o lipasa de *Humicola lanuginosa*, o del gen de proteasa o lipasa de *Rhizomucor miehei*, amilasa de o glucoamilasa de especies de *Aspergillus*, un gen que codifica una lipasa o proteasa de *Rhizomucor miehei*. El péptido señal está preferiblemente derivado de un gen que codifica TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, α -amilasa neutral de *Aspergillus niger*, amilasa ácido estable en ácido de *Aspergillus niger*, o glucoamilasa de *Aspergillus niger*.

40 [0130] Péptidos señal útiles para células huésped de levadura se obtienen de los genes para el factor- α de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Varios péptidos señal que se pueden usar con el constructo de ADN de la invención, que incluyen proteasa aspártica de levadura 3 (Yps1) péptido señal o cualquier análogo funcional (Egel-Mitani et al. (1990) YEAST 6:127-137 y US 5,726,038) y la señal factor- α del gen *MF α 1* (Torner (1981) en The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Stratern et al., eds., págs 143-180, Cold Spring Harbor Laboratory, NY y US 4,870,008 „el péptido señal de amilasa salival del ratón (cf. O. Hagenbuchle et al., Nature 289, 1981, págs. 643 646), un péptido señal de carboxipeptidasa modificada (cf. L.A. Valls et al., Cell 48, 1987, págs. 887-897) y el péptido señal de levadura BAR1(cf. WO 87/02670).

45 [0131] El término "pro-péptido" se refiere a una secuencia polipeptídica cuya función es permitir que el polipéptido expresado sea dirigido desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi y adicionalmente a una vesícula secretora para la secreción en el medio de cultivo (es decir, la exportación del polipéptido a través de la pared celular o al menos a través de la membrana celular en el espacio periplásmico de la célula de levadura). El pro-péptido puede ser el pro-péptido factor- α de levadura, véase US 4.546.082 y 4.870.008. Alternativamente, el pro-péptido puede ser un pro-péptido sintético, que es por así decirlo un pro-péptido no encontrado en la naturaleza. Pro-péptidos sintéticos adecuados son aquellos descritos en US 5.395.922, 5.795.746, 5.162.498. WO 89/02463, WO 92/11378 y WO 98/32867.

50

- 5 [0132] La secuencia polinucleótida de la invención puede también ser de origen de mezcla genómica, de ADNc y sintético. Por ejemplo, una secuencia genómica o de ADNc que codifica un péptido líder, se puede unir a una secuencia genómica o de ADNc que codifica las cadenas A y B, después de lo cual, la secuencia de ADN se puede modificar en un sitio mediante inserción de oligonucleótidos sintéticos que codifican la secuencia de aminoácidos deseada para la recombinación homóloga, conforme a procedimientos bien conocidos o preferiblemente generando la secuencia deseada por PCR usando oligonucleótidos adecuados.
- 10 [0133] La invención comprende un vector que es capaz de replicarse en el microorganismo seleccionado o célula huésped, y que lleva una secuencia polinucleótida que codifica los precursores de insulina de la invención. El vector recombinante puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, p. ej., un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma, o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. De forma alternativa, el vector puede ser uno que, introducido en la célula huésped, es integrado en el genoma y replicado junto con el cromosoma(s) en que ha sido integrado. Además, un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total a ser introducidos en el genoma de la célula huésped, o un transposón pueden ser utilizados. El vector puede ser plásmidos lineales o circulares cerrados y preferiblemente contiene un elemento(s) que permite la integración estable del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.
- 20 [0134] En una forma de realización, el vector de expresión recombinante es capaz de replicarse en levadura. Ejemplos de secuencias que permiten al vector replicarse en levadura, son los genes de replicación REP 1-3 del plásmido de levadura 2 μ m y el origen de replicación.
- [0135] El vector puede comprender también un marcador seleccionable, p. ej. un gen cuyo producto complementa un defecto en la célula huésped o uno que confiere resistencia a un fármaco, p. ej. ampicilina, kanamicina, tetraciclina, cloranfenicol, neomicina, higromicina o metotrexato.
- 25 [0136] Los marcadores seleccionables para su uso en una célula huésped filamentosa fúngica, incluyen *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina carbamil transferasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato Descarboxilasa) y *trpC* (antranilato sintasa).
- [0137] Marcadores adecuados para células huésped de levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1, y URA3. Un marcador seleccionable preferido para levadura es el gen TPI de *Schizosaccharomyces pombe* (Russell (1985) gen 40:125-130).
- 30 [0138] En el vector, la secuencia polinucleótida está operativamente conectada a una secuencia del promotor adecuada. El promotor puede ser cualquier secuencia de ácidos nucleicos que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección, incluyendo promotores mutantes, truncados e híbridos, y se pueden obtener de genes que codifican polipéptidos intracelulares o extracelulares, bien homólogos o bien heterólogos a la célula huésped.
- [0139] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción en una célula huésped filamentosa fúngica son promotores obtenidos de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, y alfa-amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*.
- 35 [0140] En un huésped de levadura, son promotores útiles los promotores MF α 1, TPI, ADH o PGK de *Saccharomyces cerevisiae*.
- [0141] El constructo polinucleótido de la invención también será normalmente conectado operativamente a un terminador adecuado. En levadura un terminador adecuado es el terminador TPI (Alber et al. (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:419-434).
- 40 [0142] Los procedimientos usados para enlazar las secuencias de ADN que codifican el precursor de insulina, el promotor y opcionalmente el terminador y/o la secuencia de señal secretora, respectivamente, y para insertarlos en vectores adecuados que contienen la información necesaria para la replicación, son bien conocidos por personas expertas en la técnica (cf., por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989).
- 45 [0143] Se entenderá que el vector puede ser construido bien preparando primero un constructo de ADN que contenga la secuencia de ADN entera que codifica los precursores de insulina de la invención, y posteriormente insertando este fragmento en un vector de expresión adecuado, o insertando consecutivamente fragmentos de ADN que contienen información genética para los elementos individuales (tal como la señal, el pro-péptido, el péptido C modificado, las cadenas A y B) seguido de ligamiento.
- 50 [0144] La presente invención también se refiere a células fúngicas recombinantes, que comprenden una secuencia polinucleótida que codifica los precursores de insulina de la invención. Un vector que comprende tal secuencia polinucleótida se introduce en la célula huésped de modo que el vector es mantenido como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autoreplicante como se ha descrito anteriormente. El término "célula huésped" abarca cualquier progenie de una célula madre que no es idéntica a la célula madre debido a mutaciones que ocurren durante la

replicación.

[0145] La célula huésped usada en la presente invención es una célula fúngica. "Hongo" como se utiliza en este caso incluye el *Ascomycota*, el *Basidiomycota*, el *Chytridiomycota*, y *Zygomycota* (como es definido por Hawkswort et al., en, Ainswort and Bisby's Dictionary of the Fungi, 8th edition, 1995, CAB, International, University Press, Cambridge, UK) al igual que el *Oomycota* (como citado en Hawkswort et al., 1995, supra, página 171) y todos los hongos mitospóricos (Hawkswort et al., 1995, supra).

[0146] En una forma de realización la célula huésped fúngica es una célula de levadura. "Levadura" como se utiliza en este caso incluye levadura ascoesporógena (Endomicetales), levadura de basidiosporogenous, y levadura de *Fungi Imperfecti* (Blastomicetes). Las levaduras ascoesporógenas se dividen en las familias *Spermopthoraceae* y *Saccharomycetaceae*. Ésta última está compuesta de cuatro subfamilias, *Schizosaccharomycetaceae* (p. ej., género *Schizosaccharomycetaceae*), *Nadsonioideae*, *Lipomicoideae*, y *Saccharomycetaceae* (p. ej., géneros *Pichia*, *Kluyveromyces* y *Saccharomyces*). Las levaduras basidiosporogenous incluyen los géneros *Leucosporidium*, *Rhodospodium*, *Sporidiobolus*, *Filobasidium*, y *Filobasidiella*. La levadura perteneciente a los *Fungi Imperfecti* se divide en dos familias, *Sporobolomycetaceae* (p. ej., géneros *Sorobolomyces* y *Bullera*) y *Criptococcaceae* (p. ej., género *Candida*). Puesto que la clasificación de la levadura puede cambiar en el futuro, para los objetivos de esta invención, la levadura debe ser definida como se describe en *Biology and Activities of Yeast* (Skinner, F.A., Passmore, S.M., y Davenport R.R., eds, Soc. app. Bacteriol. Symposium Series nº. 9, 1980. La biología de la levadura y la manipulación de genética de levadura se conocen bien en la técnica (ver, p. ej., *Biochemistry and Genetics of Yeast*, Bacil, M., Horecker, B.J., and Stopani, A.O.M., editors, 2nd edition, 1987; *The Yeasts*, Rose, A.H., y and, J.S., editors, 2nd edition, 1987; and *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, Stratern et al., editors, 1981).

[0147] La célula huésped de levadura se selecciona de una célula de una especie de *Candida*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomycetaceae*, *Pichia*, *Hansenula*, *Yarrowia*. En una forma de realización, la célula huésped de levadura es un *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oviformis*" *Schizosaccharomycetaceae pombe*, *Saccharomycetaceae uvarum*" *Pichia kluyveri*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida utilis*, *Candida cacaoui*, y *Geotrichum fermentans*. Otras células huéspedes de levadura útiles son un *Kluyveromyces lacti*, *Kluyveromyces fragilis*, *Hansenula polymorfa*, *Pichia pastoris yarrowia lipolytica*, *Schizosaccharomycetaceae pombe*, *Ustilgo mailis*, *Candida maltose*, *Pichia guillermondii* y *Pichia metanoliol* (cf. Gleeson et al., J. Gen. Microbiol. 132, 1986, págs. 3459-3465; US 4.882.279 y US 4.879.231).

[0148] En una forma de realización la célula huésped fúngica es una célula micótica filamentosa. Los "hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión *Eumycota* y *Oomycota* (como definido por Hawkswort et al., 1995, supra). Los hongos filamentosos se caracterizan por un micelio vegetativo compuesto por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano, y otros polisacáridos complejos. La célula huésped fúngica filamentosa puede ser elegida del grupo que consiste en *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Thielavia*, *Tolipocladium*, y *Trichoderma*.

[0149] La expresión "un aminoácido codificable" o "un residuo de aminoácido codificable" se utiliza para indicar un aminoácido o residuo de aminoácido que puede ser codificado por un triplete ("codón") de nucleótidos.

[0150] En el presente contexto las indicaciones de tres letras o una letra de los aminoácidos han sido usados en sus significado convencional como se indica en la siguiente tabla. A menos que se indique explícitamente, los aminoácidos aquí mencionados son L-aminoácidos. Además, los extremos derecho e izquierdo de una secuencia de aminoácidos de un péptido son, respectivamente, los terminales N y C, a menos que se especifique de otra forma.

[0151] Abreviaturas para aminoácidos:

Aminoácido	Código de tres letras	Código de una letra
Glicina	Gly	G
Prolina	Pro	P
Alanina	Ala	A
Valina	Val	V
Leucina	Leu	L
Isoleucina	Ile	I

Metionina	Met	M
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Tirosina	Tyr	Y
Triptófano	Trp	W
Histidina	His	H
Lisina	Lys	K
Arginina	Arg	R
Glutamina	Gln	Q
Asparagina	Asn	N
Ácido glutámico	Glu	E
Ácido aspártico	Asp	D
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T

[0152] Por fermentación se entiende un proceso aséptico usado para propagar microorganismos sumergidos en un medio líquido. La fermentación es preferiblemente realizada en tanques asépticos agitados con líneas de suministro para la adición de gases estériles comprimidos, que consisten en, pero no se limitan a, aire, oxígeno y amoníaco. Un tanque de fermentación puede contener dispositivos/sensores para monitorizar el pH, la temperatura, la presión, el índice de agitación, el nivel de oxígeno disuelto, el contenido líquido, el nivel de espuma, los índices de adición de alimento y los índices de adición de ácido y base. Además, el tanque de fermentación se puede equipar con dispositivos ópticos para monitorizar niveles de densidad celular, concentraciones de metabolitos y productos independientemente de su forma fisicoquímica. La formación y el consumo de compuestos volátiles son monitorizados utilizando un análisis de gas en las entradas de gas y salidas de gas del tanque de fermentación. Todas las señales de las variables monitorizadas se pueden usar para objetivos de control que permiten a las variables ser mantenidas dentro de intervalos predefinidos o cambiadas continuamente según el perfil predefinido respecto al tiempo. Alternativamente, las variables se controlan en respuesta a cambios de señales de otra variable monitorizada.

[0153] El producto deseado producido durante la fermentación se presenta como material soluble extracelular o como material intracelular bien en forma de material soluble, o como material insoluble que incluye material agregado. La formación de producto es bien constitutiva o bien inducida, y es dependiente o independiente del crecimiento microbiano. El proceso de fermentación se realiza en tanques con un volumen de trabajo que varía de 100 mL a 200,000 L. Un proceso de fermentación puede llevarse a cabo como un proceso por lotes, un proceso de alimentación por lotes, un proceso de alimentación por lotes repetido o un proceso continuo.

[0154] Por un proceso por lotes se entiende una fermentación en la que el medio estéril es contenido dentro del tanque de fermentación antes de que los microorganismos se agreguen al tanque. Durante el proceso, el ácido, la base, el agente antiespumante, los inhibidores, los estabilizadores y los inductores son agregados bien automáticamente o bien manualmente. El ácido y la base son agregados bien como soluciones líquidas o como componentes gaseosos. Estos componentes pueden ser añadidos vía un conducto de alimentación, o se pueden suministrar al tanque de fermentación en conductos separados. El contenido del tanque de fermentación sólo se vacía con objetivos de análisis durante el proceso de fermentación. El contenido completo del tanque de fermentación se recoge al final del proceso de fermentación. No obstante, para procesos por lotes consecutivos, el contenido del tanque de fermentación sólo se recoge parcialmente y el tanque de fermentación se rellena con un medio estéril fresco que permite que tenga lugar otra fermentación por lotes.

[0155] Un proceso de alimentación por lotes es una fermentación en la que sólo una parte del medio se vierte en el tanque de fermentación antes de agregar los microorganismos. Los componentes restantes del medio o cantidades restantes de los componentes del medio en parte ya añadidos, se añaden al tanque de fermentación bien como un impulso, como una serie de impulsos o como un flujo continuo añadido en cantidad constante o variable. Un proceso de

5 alimentación por lotes puede estar precedido por un proceso por lotes seguido por el modo operativo de alimentación por lotes. Los componentes del medio añadidos al tanque de fermentación durante el proceso, consisten en, pero no están limitados, a componentes que limitan el crecimiento, componentes poco solubles, componentes volátiles o componentes con estabilidad limitada en entorno líquido. El índice de crecimiento de los microorganismos se puede controlar a través de ajustes del índice por el que los componentes del medio se agregan al tanque de fermentación. Ácido, base, antiespumante, inhibidores, estabilizadores e inductor se agregan durante el proceso bien automáticamente o bien manualmente. El ácido y la base son agregados bien como parte de soluciones líquidas o como componentes gaseosos. Todos los componentes añadidos durante el proceso de alimentación por lotes son suministrados vía una línea de alimentación o se pueden añadir al tanque de fermentación en líneas de suministro separadas. Durante un proceso de alimentación por lotes el contenido del tanque de fermentación sólo se elimina para los objetivos de análisis. El contenido completo del tanque de fermentación se recoge al final del proceso.

10 [0156] Una variante del proceso de alimentación por lotes es el proceso de alimentación por lotes repetido. Una fermentación de alimentación por lotes repetida se realiza de forma similar a un proceso de alimentación por lotes, pero parte del contenido del tanque de fermentación se elimina una o varias veces durante el proceso. La eliminación parcial del contenido de tanque de fermentación puede ir seguida de la adición de medio fresco. La adición de medio fresco puede ir seguida de un proceso por lotes antes de reanudar la operación del proceso de alimentación por lotes. La composición del medio fresco y el medio añadido durante el proceso de alimentación por lotes no es necesariamente idéntica.

15 [0157] Por un proceso continuo se entiende una fermentación en la que parte del medio se añade al tanque antes de añadir los microorganismos y antes de que empiece la fermentación. El medio fresco que contiene todos los componentes del medio necesarios para crecer conjuntamente con inhibidores, inductores, antiespumante, ácido, base y componentes estabilizantes del producto, se añaden continuamente. Estos componentes se pueden añadir vía un conducto de alimentación o se pueden suministrar al tanque de fermentación en conductos de suministro separados para aumentar la estabilidad del medio usado o mejorar su calidad. El ácido y la base son agregados bien como parte de soluciones líquidas o como componentes gaseosos. Todos los componentes se agregan al tanque de fermentación como una serie de impulsos separados o como un flujo añadido constante o variable. La recogida del contenido del tanque de fermentación se realiza continuamente para mantener el contenido del tanque de fermentación dentro de un intervalo predefinido. El crecimiento del microorganismo se puede controlar mediante el índice de adición del medio al tanque de fermentación al igual que mediante el ajuste del contenido del tanque de fermentación.

20 [0158] Por medio se entiende una solución líquida que contiene al menos una fuente de carbono, una o varias fuentes de nitrógeno, sales esenciales que incluyen sales de potasio, sodio, magnesio, fosfato, nitrato y sulfato, trazas de metales, vitaminas solubles en agua, ayudas de proceso que incluyen, pero no están limitadas a, inhibidores de proteasa, estabilizadores, ligandos, agentes antiespumantes e inductores. El medio puede contener componentes que son parcialmente precipitados o dispersados en el medio líquido en algunas condiciones operativas que incluyen la esterilización por calor. El medio puede estar compuesto por la mezcla de diferentes líquidos y soluciones gaseosas. Estas soluciones pueden mezclarse antes de entrar en el tanque de fermentación o se añaden al tanque de fermentación como corrientes de líquido separadas añadidas en una proporción predefinida. La proporción entre soluciones de líquido diferentes de componentes del medio puede variar durante las diferentes fases del proceso de fermentación, esto significa que la composición global del medio puede variar durante el curso de la fermentación. La tabla de abajo contiene una lista de rangos de concentración para diferentes componentes de medio. Estas concentraciones se calculan como la cantidad total de un componente de medio añadido, dividido por el volumen inicial del medio en el tanque de fermentación. Las concentraciones de medios para cultivos continuos se incluyen cuando las concentraciones en el medio entran en el tanque de fermentación.

25 [0159] La siguiente tabla es una revisión de los componentes típicos de un medio de fermentación.

45

Objetivo principal	Componente	Nivel bajo	Nivel alto
Fuentes C	Glucosa	0	500 g/L
	Sacarosa	0	500 g/L
	Maltosa	0	500 g/L
	Lactosa	0	300 g/L
	Ácido L-Málico	0	200 g/L

ES 2 368 500 T3

	Maltodextrinas	0	600 g/L
	Etanol	0	500 g/L
	Metanol	0	500 g/L
	Pectinas	0	40 g/L
	Ácidos grasos	0	50 g/L
	Emulsiones PIT de aceites	0	20 g/L
	Triglicéridos	0	60 g/L
Fuente inorgánica P	Sales de ortofosfato	4 mM	100 mM
Minerales esenciales para el crecimiento	Sales de sulfato	1 mM	60 mM
	Sales de amonio	0	1800 mM
	Sales de magnesio	0,5 mM	20 mM
	Sales de potasio	3 mM	100 mM
	Sales de sodio	0,2	500 mM
	Sales de calcio	1 mM	50 mM
Otras fuentes N	Amoniaco	0	1800 mM
	Urea	0	900 mM
	Aminoácidos	0	25 g/L
	Licor de maceración de maíz	0	100 g/L
	Extracto de levadura	0	75 g/L
	Proteínas de planta	0	50 g/L
	Proteínas de planta hidrolizadas	0	30 g/L
Trazas de metales	Fe	10	350 µM
	Zn	10	300 µM
	Mn	5	1500 µM
	Cu	3	75 µM
	Mo	0	1 µM
	H ₃ BO ₃	0	60 µM
Vitaminas	Biotina	0,01 mg/L	10 mg/L

	Pantotenato, Ca	1 mg/L	1000 mg/L
	Niacina	1 mg/L	200 mg/L
	Tiamina, HCl	0.2 mg/L	200 mg/L
	Ácido P-aminobenzoico	0	100 mg/L
	Dihidrógeno-citrato de colina	10 mg/L	200 mg/L
	m-Inositol	10 mg/L	2000 mg/L
	Piridoxina, HCl	0,2 mg/L	100 mg/L
	Ácido fólico	0	50 µg/L
	Riboflavina	0	200 mg/L
	Ácido ascórbico	0	1000 mg/L
Auxotrofia	Uridina/Uracilo	0	1000 mg/L
Ayudas del proceso y ligandos.	PPO	0	1000 ppm
	Copolímetro en bloque PPO-PEO	0	5000 ppm
	Antiespumante (a base de silicona)	0	1000 ppm
	Antiespumante (a base de aceite)	0	1000 ppm
	Ácido cítrico	0	1000 mg/L
	Trimetilglicina	0	10.000 mg/L
	Imidazol	0	10 mM
	EDTA	0	100 µM
	L-histidina	0	1000 mg/L
	Análogos de fuentes de carbono no metabolizables	0	200 mg/L

- 5 [0160] Composiciones farmacéuticas que contienen los análogos de insulina de esta invención se pueden usar en el tratamiento de estados que son sensibles a la insulina. Así, se pueden usar en el tratamiento de diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 e hiperglucemia por ejemplo, como se ve a veces en personas seriamente heridas y personas que se han sometido a cirugía mayor. El nivel de dosis óptimo para cualquier paciente, dependerá de una variedad de factores que incluyen la eficacia del derivado insulínico específico empleado, la edad, la masa corporal, la actividad física y dieta del paciente, de una posible combinación con otros fármacos, y de la gravedad del estado a tratar. Se recomienda que la dosificación diaria del derivado insulínico de esta invención sea determinada para cada paciente individual por expertos en la técnica, de forma similar a las composiciones de insulina conocidas.
- 10 [0161] Las composiciones farmacéuticas de los análogos de insulina contendrán adyuvantes y aditivos usuales, y son preferiblemente formuladas como una solución acuosa. El medio acuoso se hace isotónico, por ejemplo, con cloruro sódico, acetato sódico o glicerol. Además, el medio acuoso puede contener iones de zinc, tampones y conservantes. El valor de pH de la composición se ajusta al valor deseado y puede estar entre aproximadamente 4 y 8.5.
- [0162] En una forma de realización de la invención el pH de la formulación se selecciona de la lista que consiste en 2.0,

2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9.0, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, y 10.0.

5 [0163] La composición farmacéutica comprenderá adyuvantes usuales tales como uno o más agentes adecuados para la estabilización, conservación o isotonicidad, por ejemplo, iones de zinc, fenol, cresol, un parabeno, cloruro sódico, glicerol o manitol.

10 [0164] El tampón usado en la industria farmacéutica puede ser seleccionado del grupo que consiste en acetato sódico, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrógeno fosfato de sodio, hidrógeno fosfato de disodio, fosfato sódico, y tris(hidroximetil)-aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas derivadas.

15 [0165] El conservante farmacéuticamente aceptable puede ser seleccionado del grupo que consiste en fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, metilo p-hidroxibenzoato, propilo p-hidroxibenzoato, 2-fenoxietanol, butilo p-hidroxibenzoato, 2-feniletanol, alcohol benzílico, clorobutanol, y tiomerosal, bronopol, ácido benzoico, imidurea, clorhexidina, deshidroacetato de sodio, clorocresol, etilo p-hidroxibenzoato, cloruro de bencetonio, clorfenesina (3p-clorofenoxipropano-1,2-diol) o mezclas derivadas. En otra forma de realización de la invención el conservante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 20 mg/ml. En otra forma de realización de la invención el conservante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml. En otra forma de realización de la invención el conservante está presente en una concentración de 5 mg/ml a 10 mg/ml. En otra forma de realización de la invención el conservante está presente en una concentración de 10 mg/ml a 20 mg/ml. Cada uno de estos conservantes específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención. El uso de un conservante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por el experto en la materia. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995.

25 [0166] El agente de isotonicidad puede ser seleccionado del grupo que consiste en una sal (p. ej. cloruro sódico), un azúcar o alcohol de azúcar, un aminoácido (p. ej. L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (p. ej. glicerol (glicerina), 1,2-propanediol (propilenglicol), 1,3-propanediol, 1,3-butanediol) polietilenglicol (p. ej. PEG400), o mezclas derivadas. Cualquier azúcar, tal como mono, di o polisacáridos, o glucanos hidrosolubles, incluyendo por ejemplo fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, almidón de hidroxietilo y carboximetilcelulosa-Na puede ser utilizado. En una forma de realización el aditivo de azúcar es sacarosa. El alcohol de azúcar se define como un hidrocarburo C4-C8 con al menos un grupo --OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol, y arabitol. En una forma de realización el aditivo de alcohol de azúcar es manitol. Los azúcares o azúcares de alcohol mencionados arriba, pueden ser utilizados de forma individual o en combinación. No hay un límite fijado para la cantidad usada, puesto que el azúcar o alcohol de azúcar es soluble en la preparación líquida y no influye negativamente en los efectos estabilizadores logrados usando los métodos de la invención. En una forma de realización, la concentración de azúcar o de azúcar de alcohol es de entre aproximadamente 1 mg/ml y 150 mg/ml. En otra forma de realización de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/ml a 50 mg/ml. En otra forma de realización de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/ml a 7 mg/ml. En otra forma de realización de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de 8 mg/ml a 24 mg/ml. En otra forma de realización de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de 25 mg/ml a 50 mg/ml. El uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas es bien conocido por el experto en la materia. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995.

45 [0167] Todas las referencias, incluyendo las publicaciones, solicitudes de patentes y patentes aquí citadas, se incorporan por referencia en su totalidad y en la misma medida como si cada referencia estuviera individual y específicamente indicada para ser incorporada por referencia y se estableciera en su totalidad en este documento (con la extensión máxima permitida por ley).

[0168] Todos los encabezamientos y subencabezamientos son usados aquí solo por conveniencia y no deberían ser interpretados como limitadores de la invención en ningún caso.

50 [0169] El uso de algunos y todos los ejemplos, o el lenguaje ejemplar (p. ej., "tal como") proporcionado aquí, se destina meramente a esclarecer la invención y no plantea ninguna limitación en el ámbito de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ningún lenguaje en la especificación debería ser interpretado como indicador de cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

[0170] La cita e incorporación de documentos de patente, se hace aquí solamente por conveniencia, y no refleja ningún punto de vista de la validez, patentabilidad y/o ejecutabilidad de tales documentos de patente.

55 [0171] Esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes de la materia nombrados en las reivindicaciones anexas permitidas por las leyes aplicables.

EJEMPLOS**Procedimientos Generales**

[0172] Todos plásmidos de expresión son del tipo C-POT, similares a los descritos en la EP 171, 142. Estos son vectores de expresión con base 2 μ caracterizados por contener el gen de triosa isomerasa fosfato de *Schizosaccharomyces pombe* (POT) para el objetivo de la selección del plásmido y la estabilización en *S. Cerevisiae*. Los plásmidos también contienen las secuencias promotoras y terminadoras de triosa isomerasa fosfato de *S.cerevisiae*. Estas secuencias son similares a las secuencias correspondientes en el plásmido pKFN1003 (descritas en WO 9010075).

[0173] Los transformantes de levadura se preparan mediante la transformación de las cepas huésped, cepas de *S. cerevisiae* MT663 o ME1719. La cepa de levadura MT663 (MATa/MAT α pep4-3/pep4-3 HIS4/his4 Δ tpi::LEU2/ Δ tpi::LEU2 Cir⁻) fue depositada en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares) en relación con la presentación de WO 9211378 y le fue dado el número de depósito DSM 6278. La cepa de *S. cerevisiae* ME1719 (MATa/ α leu2/leu2 pep4-3/pep4-3 Δ tpi::LEU2/ Δ tpi::LEU2 Δ ura3/ Δ ura3 Δ ps1::URA3 / Δ ips1::ura3 Cir⁺) se describe en WO 98/01535.

[0174] MT663 o ME1719 se cultivan en YPGaL (1% extracto de bacto-levadura, 2% Bacto-peptona, 2% galactosa, 1% lactato) a un O.D. a 600 nm de 0,6. 100 ml de cultivo fueron recogidos por centrifugado, lavados con 10 ml de agua, recentrifugados y resuspendidos en 10 ml de una solución que contenía 1,2 M de sorbitol, 25 mM de Na₂ EDTA pH = 8.0 y 6.7 mg/ml de ditioneitol. La suspensión se incubaba a 30°C durante 15 minutos, es centrifugada y las células resuspendidas en 10 ml de una solución que contiene 1,2 M de sorbitol, 10 mM de Na₂EDTA, 0,1 M de citrato sódico, pH 0 5.8, y 2 mg de NovozimC3234. La suspensión se incubaba a 30°C durante 30 minutos, las células se recogen por centrifugado, se lavan en 10 ml de 1,2 M sorbitol y 10 ml de CAS (1,2 M sorbitol, 10 mM CaCl₂, 10 mM Tris HCl (Tris = Tris(hidroximetil)1-aminometano) pH = 7.5) Y se resuspende en 2 ml de CAS. Para la transformación, 1 ml de células CAS suspendidas se mezcla con aprox. 0,1 mg de ADN plásmido y se deja a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añade 1 ml de (20% glicol de polietileno 4000, 10 mM CaCl₂, 10 mM Tris HCl, pH = 7.5) y se deja la mezcla otros 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se centrifuga y el granulado se resuspende en 0,1 ml de SOS (1,2 M sorbitol, 33% vlv YPD, 6.7 mM CaCl₂) e incubado a 30°C durante 2 horas. La suspensión es entonces centrifugada y el granulado resuspendido en 0,5 ml de 1,2 M de sorbitol. Luego, 6 ml de agar superior (el SC medio de Sherman et al. (1982) Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory) que contiene 1,2 M de sorbitol más 2,5% de agar) a 52°C se añade y la suspensión se vierte en la parte superior de placas que contienen el mismo medio de agar solidificada con contenido de sorbitol.

EJEMPLO 1

[0175] Construcción de un sistema de expresión de levadura para insulina A18Q

[0176] La Figura 1 muestra un plásmido de levadura llamado pSA50. El plásmido contiene un casete de expresión que comprende un fragmento EcoRI - XbaI insertado en el plásmido entre el promotor de transcripción y el terminador de transcripción del gen TPI de *S. Cerevisiae*. En el plásmido pSA50 el fragmento EcoRI - XbaI codifica un producto de fusión compuesto por el líder pre-pro MF α 1*, un zona de escisión Lys-Arg para la endopeptidasa dibásica de procesamiento KEX2, y el precursor de insulina B(1-30)-KRDGLGKR-(A1-21), A18Q.

[0177] Un fragmento de ADN que contiene secuencias que codifican el precursor de insulina B(1-30)-KRDGLGKR-(A1-21), A18Q fue construido de la siguiente manera. 2,5 pmol de oligonucleótidos ASA-SCI-2 (correspondiente a la secuencia 1279-1358 en la Figura 2) y SCI-kex2-3 (correspondiente a la secuencia 1425-1337 en la Figura 2 - cebador inverso) se mezclaron en una reacción PCR que contenía 10 μ l de tampón de alta fidelidad 10X, 2,5 mM de dNTP, 1 μ l de polimerasa de alta fidelidad y 76 μ l de H₂O. Después de un ciclo (94°C durante 30 seg., 50°C durante 30 seg., 72°C durante 1 minuto) 100 pmol de oligonucleótidos ASA-SCI1 (correspondiente a 1252-1301 en la Figura 2) y ASA-SCI-7 (correspondiente a la secuencia 1464-1407- cebador inverso) fue añadida seguida de 9 ciclos como el anterior. El fragmento de PCR resultante fue purificado usando un kit de purificación PCR de Roche, digerido con NcoI y XbaI y finalmente ejecutado en geles de agarosa y purificado usando un kit de purificación de banda de gel GFX-PCR (Amersham Biosciences #27-9602-01). El fragmento fue ligado al fragmento de vector NcoI - XbaI del vector de expresión tipo C-POT anteriormente descrito ("General Procedures").

[0178] El plásmido de expresión fue propagado en *E. Coli*, cultivado en presencia de ampicilina y aislado usando técnicas estándar (Sambrook et al., 1989). El ADN plásmido se verificó para la inserción por nucleasas de restricción apropiadas (p. ej. EcoRI, NcoI, XbaI) y se demostró mediante análisis de secuencias que contenía la secuencia apropiada del precursor de insulina B(1-30)-KRDGLGKR-(A1-21), A18Q (Figura 2).

[0179] El plásmido pSA50 fue transformado en cepa de *S. cerevisiae* MT663. Transformantes de levadura que albergan plásmido pSA50 fueron seleccionados mediante la utilización de glucosa como fuente de carbono en placas de agar (2%) YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa) y la cepa resultante fue denominada ySA63.

EJEMPLO 2

[0180] Producción de análogos de insulina humana.

5 [0181] Plásmidos que comprenden ADN que codifica ciertos análogos de insulina humana fueron preparados por un método correspondiente al método descrito en el ejemplo 1. Una cepa de *S.cerevisiae* fue transformada con los plásmidos, y los transformantes fueron aislados como se describe en el ejemplo 1.

[0182] Todos los precursores para los análogos de insulina tenían el péptido C KRDGLGKR (SEC ID NO:9).

10 [0183] La cepa *S.cerevisiae* MT663 transformada con un plásmido para la expresión de análogo de insulina fue inoculada en 5 ml de un medio consistente en 5 g/L de (NH₄)₂ SO₄; 184 mg/L de (NH₄)₂ HPO₄; 2,88 g/L de KH₂ PO₄; 1,42 g/L de MgSO₄·7H₂O; 1,28 g/L, de K₂ SO₂; 10,00 g/L de ácido succínico; 10,00 g/L de ácidos de casamino; 0,0112 g/L de FeSO₄·7H₂O; 0,0086 g/L de MnSO₄·H₂O; 0,0014 g/L de CuSO₄·5 H₂O; 0,00185 g/L de ZnSO₄·7H₂O; 0,0129 g/L de CaCl₂·2H₂O; 0,071 g/L de ácido cítrico; 28,0 mg/L de m-inositol; 14,0 mg/L de colina cloruro; 2,8 mg/L de tiamina; 2,8 mg/L de nicotinamida; 2,1 mg/L de ácido Ca-Pantoténico; 0,14 mg/L de biotina; 0,14 mg/L de ácido fólico; 40 g/L de glucosa. El cultivo se efectuó a 30°C durante 3 días. Después del centrifugado, el sobrenadante fue eliminado para el análisis cuantitativo de HPLC por cuyo método fue medida la concentración de análogo de insulina secretado. La identidad de los análogos de insulina fue confirmada por el análisis LC/MS.

15 [0184] Los rendimientos (mg/l) aparecen de la siguiente tabla

Péptido C	Mutaciones de insulina	Insulina humana o análogo de insulina humana + producto desB30
KRDGLGKR (SEQ ID NO:9)	A18Q	2,0
KRDGLGKR (SEQ ID NO:9)	none	<1
KRDGLGKR (SEQ ID NO:9)	B10E, ABH, A14E	25,0
KRDGLGKR (SEQ ID NO:9)	B10E	4,0
KRDGLGKR (SEQ ID NO:9)	A8H	2,0
KRDGLGKR (SEQ ID NO:9)	A14E	22,0

EJEMPLO 3

20 Fermentación por lote alimentado

[0185] La cepa de *S.cerevisiae* ySA63 que expresa B(1-30)-KRDGLGKR-(A1-21), A18Q inoculada en un medio que consiste en extracto de levadura (Difco): 20 g/L y peptona (bacto): 10 g/L y 60 g/L de glucosa y 0,1 mL de un agente antiespumante (un PEO/PPO copolímero de bloque). El pH del medio se ajusta a 6.5-6.6 antes de la esterilización por calor. La glucosa se esteriliza por separado y se añade a los componentes estériles restantes.

25 [0186] 200 mL de cultivo (en un matraz de Erlenmeyer de 500 mL) se incuban en un agitador orbital a 30°C y 250 r.p.m. durante 16-30 horas.

30 [0187] 50 mL de cultivo de matraz vibrante se transfieren a un fermentador que contiene 1,2 L de medio de cultivo que consiste en: 50 g/L de extracto de levadura líquido (50% de sustancia seca); 3,6 g/L de KH₂ PO₄; 2,3 g/L de K₂ SO₄; 1,5 g/L de MgSO₄·7H₂O; 0,064 g/L de FeSO₄·7H₂O; 0,016 g/L de MnSO₄·H₂O; 0,011 g/L de CuSO₄·5 H₂O; 0,016 g/L de ZnSO₄·7H₂O; 0,8 g/L de ácido cítrico, 2 g/L m-inositol; 0,2 g/L de colina cloruro; 0,2 g/L de tiamina HCl; 0,1 g/L de

piridoxina, HCl; 0,2 g/L de nicotinamida; 1 g/L de ácido Ca-Pantoténico; 0,005 g/L de biotina; 0,05 g/L de ácido p-aminobenzoico; 0,66 mUL de agente antiespumante (un PEO/PPO copolímero en bloque) y 21 g/L glucosa. Todos los componentes excepto la glucosa se esterilizan con calor. La glucosa se esteriliza separadamente y se añade al fermentador.

5 [0188] El cultivo se realiza a 30°C usando un valor pH consignado de 5.9 y un índice de aireación de 1vvm. El pH del medio se mantiene en el punto consignado a través de la adición de NH₄OH. El oxígeno disuelto se monitoriza junto con la composición de gas de escape (oxígeno, dióxido de carbono y etanol). El proceso de fermentación se inicia con una fase de crecimiento por lotes de 23 horas durante la cual la glucosa es consumida de forma fermentativa, seguida de crecimiento por lotes aeróbico en el etanol previamente formado. Posteriormente, cuando el nivel de etanol en el gas de escape comienza a reducirse, se inicia la adición de una solución de alimento que consiste en 50% (porcentaje en peso) de glucosa. El nivel de adición del alimento sigue el perfil mostrado en la Figura 3, incluyendo ajustes manuales para mantener el nivel de etanol en el gas de escape por debajo de 250 ppm.

10 [0189] Durante el proceso, el cultivo se monitoriza mediante mediciones de la densidad óptica a 600 nm en muestras de fermentación diluidas. La concentración de insulina es cuantificado por HPLC en muestras diluidas 1:1 en una base de volumen con etanol ácido (552 g de etanol, 340 g de agua desionizada y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado) y se centrifuga a 3000-5000x g. Cuando se calcula la concentración de insulina por L de caldo de fermentación, las correcciones del volumen ocupado por las células de levadura se incluyen asumiendo un envase rómbico de las células en el precipitado. La concentración proporcionada de insulina incluye insulina intacta e insulina desB30.

15 [0190] La adición de solución de glucosa se detiene después de 69 horas mientras que la fermentación se continúa durante otras 4 horas antes de recoger del producto.

20 [0191] La densidad óptica y la concentración de insulina vs. tiempo se fijan en la Figura 4 mostrando una concentración de insulina final de 37 mg/L de caldo de fermentación.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0192]

25 <110> Novo Nordisk A/S
Sloth Andersen, Asser

<120> Método para producir polipéptidos de insulina maduros

30 <130> 7210.204-WO

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.3

35 <210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

40 <220>

<223> Artificial

<400> 1

<212> PRO

<213> Artificial

<220>

5 <223> Artificial

<400> 5

Arg Arg Leu Gln Lys Arg
1 5

<210> 6

10 <211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Artificial

<400> 6

Lys Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Ala Leu Val Asp Lys Arg
1 5 10 15

<210> 7

20 <211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Artificial

Asp Gly Leu Gly
1

<400> 7

<210> 8

30 <211> 204

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

ES 2 368 500 T3

<22.1> codificación

<222> (1)..(193)

<220>

5 <221> codificación

<222> (2)..(193)

<400> 8

```
atccatggct aagagattcg ttaaccaaca ctgtgctggg tccacttgg ttgaagcttt    60
gtacttgggt tgcggtgaaa gaggtttctt ctacactcct aagactaaga gagacggttt    120
gggtaagaga ggtattgtcg agcaatgctg tacatccatc tgctccttgt accaattgga    180
acaatactgc aactagactc taga                                     204
```

10 <210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Artificial

<400> 9

```
Lys Arg Asp Gly Leu Gly Lys Arg
1           5
```

20 <210> 10

<211> 65

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 10

ES 2 368 500 T3

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

Val Gly Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr
20 25 30

Pro Lys Thr Lys Arg Asp Gly Leu Gly Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln
35 40 45

Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Gln Tyr Tyr Cys
50 55 60

Asn
65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para producir un análogo de insulina humana maduro mediante el cultivo de una célula fúngica que comprende un vector de ADN que codifica un precursor para el análogo de insulina humana, donde dicho precursor comprende un péptido conector flanqueado con un zona de escisión Kex2 en ambas uniones de las cadenas A y B del péptido de insulina, respectivamente, estando dichas zonas de escisión divididas en la célula fúngica permiten a la célula a secretar el análogo de insulina humana bicatenario maduro correctamente procesado a los medios de cultivo y donde el análogo de insulina tiene una mutación en al menos una de las posiciones A8, B10, A18 y A14 de las cadenas A y/o B de la insulina humana.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, donde el residuo de aminoácido en el péptido conector en la penúltima posición del zona de escisión junto a la cadena A es seleccionado del grupo que consiste en Leu, Ile, Tyr, Arg, Lys, His, Pro, Met, Val, Ala y Phe.
3. Método según la reivindicación 2, donde el residuo de aminoácido es seleccionado del grupo que consiste en Leu e Ile,
- 15 4. Método según las reivindicaciones 1-2, donde el péptido conector tiene un tamaño de 3-35, 3-34, 3-33, 3-31, 3-30, 3-29, 3-28, 3-27, 3-26, 3-25, 3-24, 3-23, 3-22, 3-21, 3-20, 3-19, 3-18, 3-17, 3-16, 3-15, 3-14, 3-13, 3-12, 3-11, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5 o 3-4 residuos de aminoácidos.
5. Método según la reivindicación 1, donde las mutaciones son seleccionadas del grupo que consiste en Asp, Glu, His, Gln y Arg.
- 20 6. Método según la reivindicación 5, donde los análogos de insulina B10Glu, A8His, A14Glu insulina humana.
7. Método según la reivindicación 1-6, donde la célula fúngica es una célula de levadura.
8. Método según la reivindicación 1, donde el análogo de precursor de insulina humana tiene la secuencia de aminoácidos B(1-30)- X-X-Z-Y-Y-A(1-21)
 donde B(1-30) es la cadena B de la insulina humana, A(1-21) es la cadena A de la insulina humana, X-X e Y-Y son ambos un sitio Kex2 y Z es una secuencia peptídica con de 1 a 35 residuos de aminoácidos, con la condición de que al menos uno de los residuos de aminoácidos naturales en una de las posiciones A8, B10, A18 y A14 de las cadenas A y/o B de la insulina humana mute en otro residuo de aminoácido.
- 25 9. Secuencia de ADN que codifica un precursor de insulina con la secuencia de aminoácidos B(1-30)- X-X-Z-Y-Y-A(1-21)
 donde B(1-30) es la cadena B de la insulina humana, A(1-21) es la cadena A de la insulina humana, cada X-X e YY son ambos un sitio Kex2 y Z es una secuencia peptídica con de 1 a 35 residuos de aminoácidos, con la condición de que al menos uno de los residuos de aminoácidos naturales en al menos una de las posiciones A8, B10, A18 y A14 en las cadenas A y/o B de la insulina humana mute en otro residuo de aminoácido.
- 30 10. Vector de expresión que comprende una secuencia de ADN según la reivindicación 9.
11. Célula de levadura transformada con el vector según la reivindicación 10.

35

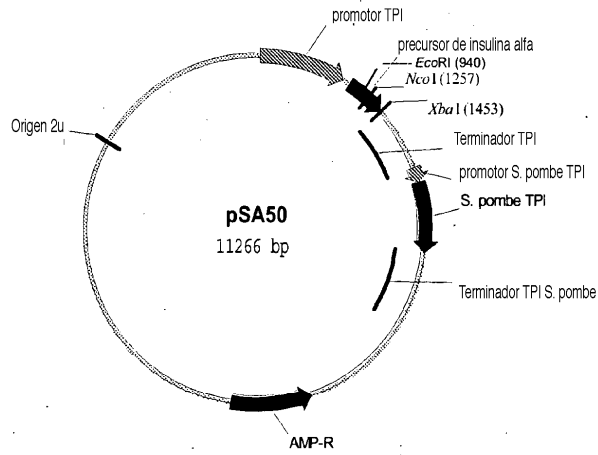


Fig. 1

```

NcoI
-----
SerMetAla LysArgPheVal AsnGlnHis LeuCysGly SerHisLeuVal GluAlaLeu
1254 ATCCATGGCT AAGAGATTCG TTAACCAACA CTTGTGCGGT TCCCACTGG TTGAAGCTTT
TAGGTACCGA TTCTCTAAGC AATTGGTTGT GAACACGCCA AGGGTGAACC AACTTCGAAA

TyrLeuVal CysGlyGluArg GlyPhePhe TyrThrPro LysThrLysArg AspGlyLeu
1314 G TACTTGGTT T GCGGTGAAA GAGGTTTCTT CTACACTCCT AAGACTAAGA GAGACGGTTT
CATGAACCAA ACGCCACTTT CTCCAAGAA GATGTGAGGA TTCTGATTCT CTCTGCCAAA

GlyLysArg GlyIleValGlu GlnCysCys ThrSerIle CysSerLeuTyr GlnLeuGlu
1374 GGGTAAGAGA GGTATTGTCG AGCAATGCTG TACATCCATC TGCTCCTTGT ACCAATGGA
CCCATTCTCT CCATAACAGC TCGTTACGAC ATGTAGGTAG ACGAGGAACA TGGTTAACCT

XbaI
-----
GlnTyrCys Asn***
1434 ACAATACTGC AACTAGACTC TAGAACTAA G
TGTTATGACG TTGATCTGAG ATCTTTGATT C
    
```

Fig. 2

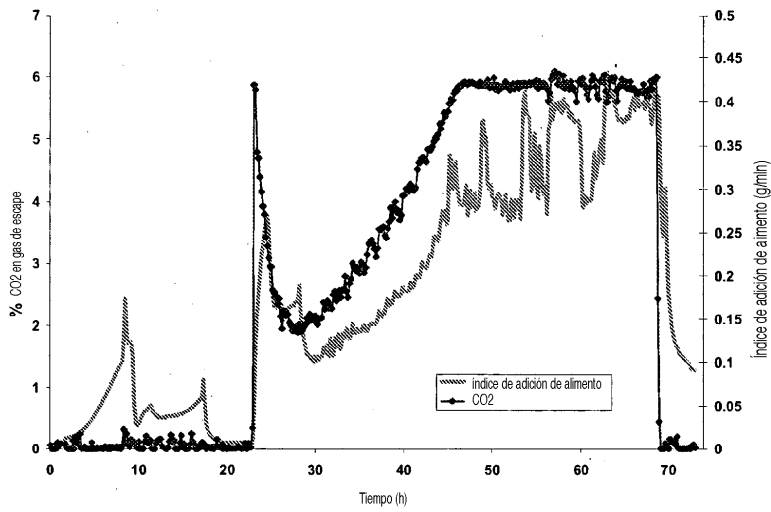


Fig. 3

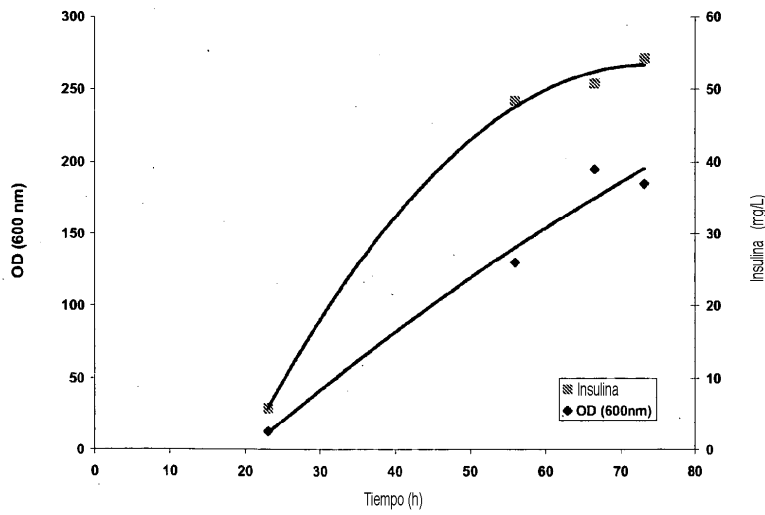


Fig. 4