

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 895**

51 Int. Cl.:
C07K 14/62 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04801167 .0**
96 Fecha de presentación: **03.12.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1692168**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.08.2006**

54 Título: **INSULINA MONOCATENARIA.**

30 Prioridad:
03.12.2003 DK 200301786

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.12.2011

73 Titular/es:
NOVO NORDISK A/S
Novo Allé
2880 Bagsvård, DK

72 Inventor/es:
KJELDSEN, Thomas, Børglum;
ANDERSEN, Asser, Sloth;
SCHLEIN, Morten;
SØRENSEN, Anders, Robert y
MADSEN, Peter

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

ES 2 369 895 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

Insulina monocatenaria

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se refiere a insulinas monocatenarias que tienen actividad insulínica y pueden ser usadas para el tratamiento de la diabetes. Las insulinas monocatenarias tienen una alta estabilidad física y una baja tendencia a la fibrilación y serán solubles en pH neutro. La presente invención también se relaciona con una secuencia de ADN que codifica las insulinas monocatenarias, un método para su producción y composiciones farmacéuticas que contienen las insulinas monocatenarias.

15 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

[0002] La insulina es una hormona polipeptídica segregada por células β del páncreas y que consiste en dos cadenas polipeptídicas, A y B, que están enlazadas por dos puentes de disulfuro. Además, la cadena A muestra un puente de disulfuro intracatenario.

[0003] La hormona se sintetiza como una proinsulina monocatenaria precursora (preproinsulina) que consiste en un prepéptido de 24 aminoácidos seguido de una proinsulina que contiene 86 aminoácidos en la configuración: prepéptido - B - Arg Arg - C - Lys Arg -A, en el que C es un péptido conector de 31 aminoácidos. Arg-Arg y Lys-Arg son sitios de escisión para la escisión del péptido conector de las cadenas A y B para formar la molécula de insulina bicatenaria. La insulina es esencial para mantener una regulación metabólica normal.

[0004] La estructura de dos cadenas de la insulina permite a la insulina asumir múltiples conformaciones, y varios hallazgos han indicado que la insulina tiene propensión a cambios conformacionales considerables y que las restricciones en el potencial para tales cambios reducen considerablemente la afinidad del receptor de insulina para ligandos. La proinsulina tiene una afinidad 100 veces inferior para el receptor de insulina que la insulina nativa. El bloqueo del residuo de aminoácido A1 en insulina también resulta en una unión pobre al receptor, consistente con el dogma que un extremo N-terminal libre de la cadena A y un extremo C-terminal libre de la cadena B de insulina son importantes para la unión al receptor de insulina.

[0005] La estabilidad química y física heredada de la molécula de insulina es una condición básica para la terapia de insulina para la diabetes mellitus. Estas propiedades básicas son fundamentales para la formulación de insulina y para los métodos aplicables de administración de insulina, al igual que para la fecha de caducidad y condiciones de almacenamiento de preparaciones farmacéuticas. El uso de soluciones en la administración de insulina expone la molécula a una combinación de factores, por ejemplo, temperaturas elevadas, interfases variables aéreas-líquidas-sólidas al igual que fuerzas cortantes, que pueden suponer cambios irreversibles en la conformación, por ejemplo, fibrilación. Esto es particularmente relevante para soluciones de insulina en bombas de infusión, bien se lleven externamente o estén implantadas, que exponen la molécula a una combinación de estos factores al igual que las fuerzas cortantes del movimiento de la bomba durante períodos extendidos de tiempo. Por consiguiente, la fibrilación es especialmente preocupante cuando se usan bombas de infusión como sistema de administración de insulina. Por otra parte, múltiples factores influyen en la solubilidad de la insulina y muestra una clara reducción en el rango de pH de 4.2 a 6.6. La zona de precipitación de pH impone generalmente limitaciones para la formulación, pero también ha sido usado deliberadamente en el desarrollo y formulación de análogos determinados.

[0006] Así, las propiedades de estabilidad y solubilidad de la insulina son aspectos importantes y esenciales para la terapia corriente de insulina. La presente invención se dirige a estos problemas proporcionando análogos de insulina monocatenaria estables por introducción de un péptido C entre la cadena B y A para reducir la flexibilidad molecular y reducir concomitantemente la propensión a la fibrilación y limitar o modificar la zona de precipitación de pH.

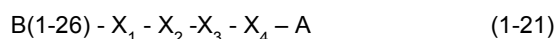
[0007] Se muestran las insulinas monocatenarias con actividad insulínica en la EP 1,193,272. Estas insulinas monocatenarias tienen un péptido C modificado de 5-18 aminoácidos y se informa que tienen hasta un 42% de actividad insulínica. El documento EP 1,193,272 muestra los siguientes péptidos C modificados que conectan B30 con A21: Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Lys-Arg(SEC ID NO:1), Arg-Arg-Gly-Pro-Gly- Gly-Gly(SEC ID NO:2), Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Lys-Arg(SEC ID NO:3), Arg-Arg-Gly-Gly-Gly-Gly(SEC ID NO:4), Gly-Gly-Ala- Pro-Gly-Asp-Val-Lys-Arg(SEC ID NO:5), Arg-Arg-Ala-Pro-Gly-Asp-Val-Gly-Gly(SEC ID NO:6), Gly-Gly-Tyr-Pro-Gly-Asp-Val- Lys-Arg(SEC ID NO:7), Arg-Arg-Tyr-Pro-Gly-Asp-Val-Gly-Gly(SEC ID NO:8), Gly-Gly-His-Pro-Gly-Asp-Val-Lys-Arg(SEC ID NO:9), y Arg-Arg-His-Pro-Gly-Asp-Val-Gly-Gly(SEC ID NO:10). El documento EP 741,188 muestra insulinas monocatenarias con un péptido C modificado que tiene 10-14 residuos de aminoácido y una actividad insulínica de un 14 a 34% y con los siguientes péptidos conectores Gln-Pro-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-Gln-Lys-Arg(SEC ID NO:11) y Gly-Tyr-Gly-Ser-Ser- Ser-Arg-Arg-Ala-Pro-Gln-Thr(SEC ID NO:12). El documento WO 95/16708 muestra insulinas monocatenarias con un péptido conector de 1-15 residuos de aminoácido y sin Lys o Arg como el residuo de aminoácido C-terminal en el péptido conector. El documento WO 95/16708 muestra las siguientes secuencias de péptido C Gly- Gly-Tyr-Gly-Ser-Ser-Ser-Arg-Arg-Ala-Pro-Gln-Thr(SEC ID NO:13) y Gly-Tyr-Gly-Ser-Ser-Ser-Ala-Ala-

Ala-Pro-Gln-Thr(SEC ID NO:14). Se dice que estas insulinas monocatenarias tienen actividad insulínica, pero también una afinidad bastante alta al receptor de IGF-1.

[0008] Es el objetivo de la presente invención proporcionar insulinas monocatenarias que tienen propiedades mejoradas frente a los compuestos conocidos con respecto tanto a la actividad insulínica, estabilidad física y solubilidad, como a la farmacocinética, por ejemplo, un perfil de acción prolongado o rápido. Otro objetivo de esta invención es proporcionar un método para fabricar las insulinas monocatenarias y composiciones farmacéuticas que contengan tales compuestos.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0009] La presente invención se refiere a la insulina monocatenaria para el tratamiento de la diabetes de tipo 1 y la diabetes de tipo 2 con la fórmula



donde X_1 es Thr, Lys o Arg, X_2 es Pro, Lys o Asp, X_3 es Lys, Pro o Glu, X_4 es una secuencia peptídica con la siguiente fórmula $X_a - X_b - X_c - X_d - X_e - X_f - X_g$ (SEC ID NO:129) donde

X_a es seleccionada del grupo que consiste en L, R, T, A, H, Q, G, S y V;

X_b es seleccionado del grupo que consiste en W, G, S, A, H, R, y T;

X_c es seleccionado del grupo que consiste en L, Y, M, H, R, T, Q, K, V, S, A, G y P;

X_d es seleccionado del grupo que consiste en R, A, Y, M, S, N, H, y G;

X_e es seleccionado del grupo que consiste en S, R, A, T, K, P, N, M, H, Q, V, y G;

X_f es seleccionado del grupo que consiste en G y A; y

X_g es seleccionado del grupo que consiste en K, R, P, H, F, T, I, Q, W, y A,

B(1-26) es una cadena peptídica que consiste en los primeros 26 residuos de aminoácido de la cadena B de insulina humana contadas desde el extremo N-terminal de la cadena B o un análogo de la cadena B con una adición o eliminación de uno de los residuos de aminoácido en la cadena B o derivado de la cadena B modificada químicamente mediante la introducción de un grupo en la cadena lateral en una o más posiciones de la cadena B o por oxidación o reducción de las cadenas laterales de los residuos de aminoácido en la cadena B, y A(1-21) es la cadena de insulina natural o un derivado análogo con una adición o una eliminación de uno de los residuos de aminoácido en la cadena A o derivado de la cadena A modificada químicamente mediante la introducción de un grupo en la cadena lateral en una o más posiciones de la cadena A o por oxidación o reducción de las cadenas laterales de los residuos de aminoácido en la cadena A, donde X_4 no contiene dos residuos de aminoácido adyacentes básicos y donde la insulina monocatenaria tiene una afinidad por el receptor de insulina humana de al menos aproximadamente un 20% de la de la insulina humana si la molécula de insulina monocatenaria no está modificada químicamente mediante acilación.

[0010] También se muestra que la insulina monocatenaria se puede acilar en al menos un grupo de lisina en la molécula de insulina monocatenaria. En una parte de la divulgación el B29Lys está acilada. Más adelante en esa divulgación se acila una lisina insertada en la molécula de insulina monocatenaria o se acila el residuo de aminoácido N-terminal B1.

[0011] En otra parte se acila la insulina monocatenaria con un ácido graso de 6 a 24 C, 6-20, 6-18 o 6-14 átomos-C.

[0012] En otro aspecto la presente divulgación se refiere a una insulina monocatenaria siendo soluble en pH neutro y con un pI debajo aproximadamente de 6.5.

[0013] En aún otra parte de la presente divulgación la insulina monocatenaria tiene un pI de aproximadamente de 4.5 hasta aproximadamente debajo de 6.5.

[0014] En otra parte la presente divulgación se refiere a una insulina monocatenaria donde al menos un residuo de lisina ha sido modificada por acilación.

[0015] En otro aspecto de la presente divulgación la insulina monocatenaria contiene al menos un aminoácido adicional básico en la cadena A o B en comparación con las cadenas A y B de naturales humanas. El residuo de aminoácido básico es preferiblemente introducido sustituyendo uno de los residuos de aminoácido natural en el extremo C-terminal de la cadena B o en el extremo N-terminal de la cadena A y en una realización de la presente divulgación el residuo en posición B27 se sustituyó por un Arg.

[0016] En otro aspecto de la presente divulgación la insulina monocatenaria tendrá un residuo de aminoácido en posición A21 de la cadena A que es diferente del residuo de aminoácido natural Asn. Así, Asn en la posición A21 se

puede sustituir por cualquier otro residuo de aminoácido codificable excepto Cys. En una parte el residuo de aminoácido en posición A21 puede ser seleccionado del grupo que consiste en Ala, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, en particular Gly, Ala, Ser, y Thr. En una otra parte A21 es Gly.

5 [0017] En otra parte el péptido conector tiene un Gly en el péptido conector en la penúltima posición al primer residuo de aminoácido (A1) en la cadena A.

10 [0018] En otra forma de realización el péptido conector comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en AGRGSGK (SEC ID NO:15); AGLGSGK (SEC ID NO:33); AGMGSGK (SEC ID NO:45); ASWGSGK (SEC ID NO:48); TGLGSGQ (SEC ID NO:22); TGLGRGK (SEC ID NO:23); TGLGSGK (SEC ID NO:21); HGLYSGK (SEC ID NO:50); KGLGSGQ (SEC ID NO:51); VGLMSGK (SEC ID NO:56); VGLSSGQ (SEC ID NO:27); VGLYSGK (SEC ID NO:28); VGLSSGK (SEC ID NO:30); VGMSSGK (SEC ID NO:65); VWSSSGK (SEC ID NO:76); VGSSSGK (SEC ID NO:16) y VGMSSGK (SEC ID NO:106)

15 [0019] En un aspecto X_1 es Thr, X_2 es Pro, y X_3 es Lys.

[0020] En una parte uno de los residuos de aminoácido natural en la posición B1, B3; B10; B22; B27; B28; B29, A8; A15; A18, y A21 se sustituye por otro residuo de aminoácido.

20 [0021] En otra parte la insulina monocatenaria es un análogo de insulina desB1, desB25, desB27, desB28 o desB29.

[0022] La presente divulgación está relacionada con secuencias polinucleótidas que codifican para las insulinas monocatenarias reivindicadas. En otro aspecto la presente invención se refiere a vectores que contienen tales secuencias polinucleótidas y células huésped que contienen tales secuencias polinucleótidas o vectores.

25 [0023] En otro aspecto, la divulgación se refiere a un proceso para producir las insulinas monocatenarias en una célula huésped, comprendiendo dicho método (i) el cultivo de una célula huésped que comprende una secuencia polinucleótida que codifica las insulinas monocatenarias bajo condiciones adecuadas para la expresión de dichas insulinas monocatenarias; y (ii) el aislamiento de las insulinas monocatenarias del medio de cultivo.

30 [0024] En una forma de realización de la presente divulgación la célula huésped es una célula huésped de levadura y en otra parte más la célula huésped de levadura se selecciona del género *Saccharomyces*. En otra parte más la célula huésped de levadura se selecciona de las especie *Saccharomyces cerevisiae*.

35 [0025] En otra forma de realización la divulgación se refiere a un método donde al menos un residuo de lisina en la molécula de insulina monocatenaria es acilado.

[0026] En otra forma de realización la presente invención se refiere al uso de una insulina monocatenaria como un producto farmacéutico para el tratamiento de la diabetes.

40 [0027] En otro aspecto más la presente invención se refiere a preparaciones farmacéuticas que comprenden la insulina monocatenaria de la invención y adyuvantes y aditivos adecuados tales como uno o más agentes adecuados para la estabilización, conservación o isotonización, por ejemplo, iones de zinc, fenol, cresol, un parabeno, cloruro sódico, glicerol o manitol. El contenido de zinc de las presentes formulaciones puede ser aproximadamente de entre 0 y 6 átomos de zinc por hexámero de insulina. El pH de la preparación farmacéutica puede estar aproximadamente entre 4 y 8.5, aproximadamente entre 4 y 5 o aproximadamente entre 6.5 y 7.5.

45 [0028] En otro aspecto más la presente divulgación se refiere a preparaciones farmacéuticas que comprenden la insulina monocatenaria y al menos otro producto farmacéutico tal como análogos de insulina de acción prolongada o de acción rápida, y GLP-1, GLP 2 y exendina y análogos y derivados de las mismas. Las insulinas monocatenarias según la presente invención también pueden ser usadas en tratamiento combinado junto con análogos de insulina de acción prolongada o de acción rápida, y GLP-1, GLP-2 y exendina y análogos y derivados de las mismas o un antidiabético oral tal como un tiazolidindiona, metformina y otras preparaciones farmacéuticas para diabetes de tipo 2 para tratamiento oral.

50 [0029] En otro aspecto la presente invención se refiere al uso de la insulina monocatenaria para la preparación de una preparación farmacéutica para la reducción de nivel de glucosa en sangre en mamíferos, en particular para el tratamiento de la diabetes.

55 [0030] En otra forma de realización la presente invención se refiere a un método de reducción del nivel de glucosa en sangre en mamíferos mediante la administración de una dosis terapéuticamente activa de una insulina monocatenaria según la invención a un paciente en necesidad de tal tratamiento.

65

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0031]

5 Fig. 1 muestra la reducción de glucosa en sangre en ratas Wistar normales mediante una insulina monocatenaria según la presente invención en comparación con el efecto de la insulina humana. HI es insulina humana y SCI es insulina monocatenaria,

10 Fig. 2 muestra la desaparición de una insulina monocatenaria después de la administración subcutánea en un cerdo y

Fig. 3 muestra la desaparición de otra insulina monocatenaria después de la administración subcutánea en un cerdo.

15

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0032] Las insulinas monocatenarias según la presente invención tendrán actividad biológica de insulina. Además tendrán una afinidad por el receptor de insulina de al mínimo 20% de esta de insulina humana si la molécula de insulina monocatenaria no está químicamente modificada por acilación. Además, tendrán una afinidad receptora IGF-1 similar o inferior a la de la insulina humana. Las insulinas monocatenarias que no están modificadas químicamente por acilación tendrán una afinidad por el receptor de insulina de al menos un 20 por ciento de la de la insulina humana. Las insulinas monocatenarias según la presente invención también se caracterizan por tener una alta estabilidad física.

25

[0033] Las insulinas monocatenarias con una carga positiva adicional en comparación con la insulina humana y un pI aproximadamente debajo de 6.5 será soluble en pH neutro y tendrán un perfil de acción como insulina humana pero tendrán una estabilidad física mejorada. Si la carga positiva adicional en comparación con la insulina humana se introduce en la molécula de insulina, el pI se moverá en sentido ascendente con una para cada carga positiva adicional. Teniendo dos cargas adicionales positivas en comparación con la insulina humana la insulina monocatenaria adquirirá un perfil prolongado. La insulina monocatenaria también puede hacerse prolongada mediante la introducción de un grupo de acilo en uno o más residuos Lys o en el residuo de aminoácido N-terminal B1. Las insulinas aciladas monocatenarias serán solubles en pH neutro y pueden además ser mezclables con insulinas bicatenarias de acción rápida tal como NovoRapid. Las insulinas monocatenarias pueden ser selectivamente aciladas en eq. B29. Alternativamente uno o más de los residuos naturales de aminoácido en el extremo C-terminal de la cadena B, en la secuencia peptídica conectora o en el extremo N-terminal de la cadena A se puede sustituir con un residuo de Lys que luego a su vez pueden ser acilados de una manera bien conocida como descrita en patente US No.6500645

40 [0034] Las insulinas monocatenarias de la invención que tienen estabilidad mejorada pueden también ser mezcladas con insulinas solubles de acción prolongada descritas en las patentes US n°. 6500645 y 5,750,497. La combinación resultante retiene un perfil farmacocinético bifásico. Además las insulinas monocatenarias pueden mostrar sustituciones de aminoácido en posición B10 y/o B28 disminuyendo la auto asociación de insulina.

45 [0035] La insulina monocatenaria se puede acilar con un grupo acilo que puede ser un ácido carboxílico lineal o ramificado teniendo al menos 2 átomos de carbono y siendo saturados o insaturados.

[0036] Ejemplos de ácidos grasos son el ácido cáprico, ácido láurico, ácido tetradecanoico (ácido mirístico), ácido pentadecanoico, ácido palmítico, heptadecanoico ácido, ácido esteárico, ácido dodecanoico, ácido tridecanoico, y ácido tetradecanoico.

[0037] El grupo acilo puede también ser un sustituyente lipofílico seleccionado del grupo que comprende $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CO}-$, donde n es 4 a 24, tales como $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{CO}-$ y $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{CO}-$.

55 [0038] En una forma de realización de la divulgación el grupo acilo es una cadena lineal o ramificada de ácido dicarboxílico alcano α , ω . En otra forma de realización de la invención el grupo acilo tiene la fórmula $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_t\text{CO}-$ donde t es un número entero de 2 a 24.

60 [0039] En otra forma de realización de la descripción el grupo acilo es seleccionado del grupo que comprende $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_m\text{CO}-$, donde m es 2 a 24, tales como $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$, $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$, $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}-$, $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{20}\text{CO}-$ y $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{22}\text{CO}-$.

[0040] El grupo acilo se puede unir a la insulina monocatenaria por una molécula separadora, por ejemplo un residuo

de aminoácido adecuado. El separador y el grupo acilo puede así tener la fórmula $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CONH-CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_p\text{CO-}$, donde n es un número entero de 4-24, 10-24 o 8-24 y p es un número entero de 1-3. En otra forma de realización el separador y el grupo acilo tienen la fórmula $\text{HOOC}_3(\text{CH}_2)_n\text{CONH-CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_p\text{CO-}$, donde n es un número entero de 4-24 y p es un número entero de 1-3. En otra forma de realización la combinación del separador y el grupo acilo tiene la fórmula $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CONH-CH}(\text{CH}_2)_p(\text{COOH})\text{CO-}$ donde n es un número entero de 4-24 y p es un número entero de 1-3 o $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{CONH-CH}((\text{CH}_2)_p\text{COOH})\text{CO-}$, donde n es un número entero de 4-24 y p es un número entero de 1-3.

[0041] Finalmente, el grupo acilo puede ser un ácido litocólico como litocoloil o coloil.

[0042] Si la insulina monocatenaria se acila en otra posición distinta a B29 entonces el residuo natural de lisina en B29 se sustituye con otro residuo de aminoácido por ejemplo Arg y Ala.

[0043] La acilación de las insulinas monocatenarias según la presente invención puede ser hecha mediante métodos análogos a los métodos descritos en las patentes US N^{os}. 5,750,497 y 5,905,140.

[0044] Las insulinas monocatenarias se producen expresando una secuencia de ADN que codifica la insulina monocatenaria en cuestión en una célula huésped adecuada mediante una técnica conocida como la descrita por ejemplo en la patente US N^o. 6500645. La insulina monocatenaria se expresa bien directamente o como una molécula precursora que tiene una extensión N-terminal en la cadena B. Esta extensión N-terminal puede tener la función de aumentar el rendimiento del producto directamente expresado y puede ser de hasta 15 residuos de aminoácidos de longitud. La extensión N-terminal será dividida in vitro después de su aislamiento del caldo de cultivo y por lo tanto tendrá un sitio de escisión junto a B1. Las extensiones N-terminal del tipo adecuado en la presente invención son divulgadas en la patente US n^o. 5,395,922, y en la patente europea n^o. 765,395A.

[0045] La secuencia polinucleótida que codifica la insulina monocatenaria de la invención puede ser preparada sintéticamente mediante métodos estándar establecidos, por ejemplo el método de fosforamidita descrito por Beaucage et al. (1981) Tetrahedron Letters 22:1859-1869, o el método descrito por Matthes et al. (1984) EMBO Journal 3:801-805. Según el método de fosfoamidita, los oligonucleótidos son sintetizados, por ejemplo, en un sintetizador de ADN automático, purificados, duplicados y ligados para formar el constructo de ADN sintético. Una forma de preparación del constructo de ADN habitualmente preferida es por reacción en cadena de polimerasa (PCR).

[0046] Las secuencia de polinucleótidos puede también ser de origen genómico mezclado, de ADNc y sintético. Por ejemplo, una secuencia genómica o de ADNc que codifica un péptido líder puede ser unida a una secuencia genómica o de ADNc que codifica las cadenas A y B, después del cual la secuencia de ADN puede ser modificada en un sitio insertando oligonucleótidos sintéticos que codifican la secuencia de aminoácidos deseada para una recombinación homóloga conforme a procedimientos bien conocidos o preferiblemente generando la secuencia deseada por PCR usando los oligonucleótidos adecuados.

[0047] En otro aspecto la descripción se refiere a un vector que es capaz de replicación en el microorganismo seleccionado o célula huésped y que lleva una secuencia polinucleótida que codifica la insulina monocatenaria 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, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un mini-cromosoma, o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. De forma alternativa, el vector puede ser uno que, cuando introducido en la célula huésped, es integrado en el genoma y replicado con el (los) cromosoma(s) donde ha sido integrado. Además, un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total para ser introducido en el genoma de la célula huésped, o un transposón pueden ser utilizados. El vector puede ser de plásmidos lineales o circulares cerrados y preferiblemente contener un(os) elemento(s) que permite(n) la integración estable del vector en el genoma de la célula huésped o replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

[0048] En una parte, el vector de expresión recombinante es capaz de replicarse en levadura. Ejemplos de secuencias que permiten que el vector se replique en levadura son el plásmido de levadura son los genes de replicación REP 1-3 del plásmido de levadura de 2 μm y el origen de la replicación.

[0049] Los vectores de la presente divulgación puede contener uno o más marcadores seleccionables que permiten una selección fácil de células transformadas. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia biocida o vírica, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos, y similares. Ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son los genes *dal* de *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*, o marcadores que confieren resistencia antibiótica tal como resistencia a la ampicilina, canamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Marcadores seleccionables para uso en una célula huésped filamentosa fúngica incluyen *amdS* (acetamidasa), *argB* (transferasa de carbamoil de ornitina), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato Descarboxilasa) y *trpC* (sintasa de antranilato). Marcadores adecuados para células huéspedes de levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1, y URA3.

Un marcador seleccionable muy adecuado para levadura es el gen TPI de *Schizosaccharomyces pombe* (Russell (1985) Gene 40:125-130).

[0050] En el vector, la secuencia polinucleótida es operativamente conectada a una secuencia adecuada del promotor. 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 extracelulares o intracelulares bien homólogos o bien heterólogos a la célula huésped.

[0051] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción en una célula huésped bacteriana, son los promotores obtenidos del operón *lac* de *E. coli*, el gen de agarasa (*dagA*) de *Streptomyces coelicolor*, el gen de levansucrasa (*sacB*) de *Bacillus subtilis*, el gen de alfa-amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, el gen de amilasa maltogénica (*amyM*) de *Bacillus stearothermophilus*, el gen de alfa-amilasa (*amyQ*) de *Bacillus amylo-liquefaciens*, y el gen de penicilinas (*penP*) de *Bacillus licheniformis*. Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción en una célula huésped fúngica filamentosa son los promotores obtenidos de los genes para la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, la proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, la alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, y la alfa-amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*. En un huésped de levadura, promotores útiles son los promotores Ma1, TPI, ADH o PGK de *Saccharomyces cerevisiae*.

[0052] El constructo polinucleótido de la divulgación también será normalmente conectado operativamente a un terminador adecuado. En la levadura un terminador adecuado es el terminador TPI (Alber et al. (1982) J.Mol. Appl. Genet. 1:419-434).

[0053] Los procedimientos usados para enlazar la secuencia polinucleótida de la invención, el promotor y el terminador, respectivamente, y para insertarlos en un vector adecuado conteniendo la información necesaria para la replicación en el huésped seleccionado, son conocidos por expertos en la técnica. Se entiende que el vector puede ser construido bien por la preparación primero de un constructo de ADN que contiene la secuencia entera de ADN que codifica las insulinas monocatenarias de la invención, y posteriormente la inserción de este fragmento en un vector de expresión adecuado, o la inserción consecutiva de fragmentos de ADN que contienen información genética para los elementos individuales (tal como la señal, propéptido, péptido conector, cadenas A y B) seguidas de ligamiento.

[0054] La presente divulgación también se refiere a células huéspedes recombinantes, que comprenden una secuencia polinucleótida que codifica las insulinas monocatenarias de la invención. Un vector que comprende tal secuencia polinucleótida se introduce en la célula huésped de modo que el vector se mantiene como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico que se duplica como se ha descrito antes. El término "célula huésped" comprende cualquier descendiente de una célula madre que no es idéntico a la célula madre debido a mutaciones que ocurren durante la replicación. La célula huésped puede ser un microorganismo unicelular, por ejemplo, una procarionta, o un microorganismo no unicelular, por ejemplo, una eucariota. Las células unicelulares útiles son células bacterianas tal como bacterias gram positivas incluyendo, pero no limitadas a, una célula de *Bacillus*, una célula de *Streptomyces*, o bacterias gram negativas tal como *E. coli* y *Pseudomonas* sp. Las células eucariotas pueden ser células de mamífero, insecto, planta, o fúngicas. En una forma de realización preferida, la célula huésped es una célula de levadura. El organismo de levadura usado en el proceso de la divulgación puede ser cualquier organismo de levadura adecuado que, en cultivo, produce cantidades grandes de insulina monocatenaria de la invención. Ejemplos de organismos de levadura adecuados son cepas seleccionadas de la especie de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomices uvarum*, *Kluyveromices lactis*, *Hansenula polimorfa*, *Pichia pastoris*, *Pichia metanolica*, *Pichia kluyveri*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida*, sp., *Candida utilis*, *Candida cacaoi*, *Geotrichum* sp., y *Geotrichum fermentans*.

[0055] La transformación de las células de levadura puede por ejemplo ser efectuada por formación de protoplasto seguido de una transformación de una manera conocida per se. El medio usado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para el cultivo de organismos de levadura. El precursor de insulina segregado de la divulgación, del cual una proporción significativa estará presente en el medio en forma correctamente procesada, puede ser recuperado del medio por procedimientos convencionales incluyendo separación de las células de levadura mediante centrifugado, filtración o atrapando el precursor de insulina por una matriz de intercambio iónico o por una matriz de absorción de fase inversa, precipitación de los componentes proteínicos del sobrenadante o filtrados mediante una sal, por ejemplo, sulfato de amonio, seguido de purificación por una variedad de procedimientos cromatográficos, por ejemplo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, o similar.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

[0056] Las composiciones que contienen monoinsulinas de esta invención se pueden usar 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 a veces se ha visto en personas con heridas graves y personas que se han sometido a cirugía mayor. El nivel óptimo de dosis para cualquier paciente dependerá de una variedad de

factores que incluyen la eficacia del derivado específico de insulina empleado, la edad, masa corporal, actividad física, y dieta del paciente, de una posible combinación con otros fármacos, y en la gravedad del estado a ser tratado. Se recomienda que la dosificación diaria del derivado de insulina de esta invención sea determinada para cada paciente individual por expertos en la técnica de una manera similar en cuanto a composiciones de insulina conocidas.

[0057] Normalmente, las preparaciones farmacéuticas de esta invención se administran subcutáneamente. Sin embargo, las insulinas monocatenarias de la invención también pueden ser usadas en bombas de insulina y se pueden formular para administración pulmonar.

[0058] Se espera que las insulinas monocatenarias según la presente invención con al menos un residuo de aminoácido básico en la conexión de secuencia de péptidos B30 o B29 con A1 tengan una actividad de insulina de efecto prolongado. Debido a la carga positiva adicional el punto isoeléctrico será aumentado en comparación con insulina humana y el pH de la fórmula farmacéutica puede por lo tanto preferiblemente estar por debajo del pH neutro por ejemplo debajo aproximadamente de 6. Cuando se inyectan tales preparaciones de insulina monocatenarias éstas se precipitan a los sitios de inyección donde existe pH neutro y luego lentamente se disuelven y se liberan del sitio de inyección. La liberación lenta del sitio de inyección llevará a una acción extendida que puede ser requerido para ciertas aplicaciones. Las preparaciones farmacéuticas de las insulinas monocatenarias reivindicadas contendrán adyuvantes y aditivos usuales y preferiblemente son formulados 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, preferiblemente entre 7 y 7.5 dependiendo del punto isoeléctrico, pI, de la insulina monocatenaria en cuestión.

[0059] Por consiguiente, esta invención también se refiere a una composición farmacéutica con una insulina monocatenaria de la invención y opcionalmente 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. El contenido de zinc de las presentes formulaciones puede estar aproximadamente entre 0 y 6 átomos de zinc por hexámero de insulina. Las insulinas monocatenarias también pueden ser formuladas con ligandos IFD como divulgado en WO 2003027081.

[0060] El tampón usado en la preparación farmacéutica según la presente invención puede ser seleccionado del grupo que consiste en acetato sódico, carbonato de sodio, citrato, glicil-glicina, histidina, glicina, lisina, arginina, fosfato dihidrógeno de sodio, fosfato hidrógeno de disodio, fosfato sódico, y tris(hidroximetil)aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas de las mismas. Cada uno de estos tampones específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención.

[0061] El conservante farmacéuticamente aceptable puede ser seleccionado del grupo que consiste en fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, metil p-hidroxibenzoato, propil p-hidroxibenzoato, 2-fenoxietanol, butil p-hidroxibenzoato, 2-feniletanol, alcohol benzílico, clorobutanol, y tiomerosal, bronopol, ácido benzoico, imidurea, clorhexidina, deshidroacetato de sodio, clorocresol, etil p-hidroxibenzoato, cloruro de bencetonio, clorfenesina (3p-clorfenoxipropano-1,2-diol) o mezclas de las mismas. 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 constituyen una forma de realización alternativa de la invención. El uso de un conservante en composiciones farmacéuticas es bien conocido al experto en la materia. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995.

[0062] 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. glicerina) de glicerol, 1,2-propanodiol (propilenoglicol), 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol) polietilenoglicol (p. ej. PEG400), o mezclas de las mismas. Cualquier azúcar tal como mono, di o polisacáridos, o glucanos solubles en agua, incluso 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 utilizada. En una forma de realización el aditivo de azúcar es sacarosa. Un alcohol de azúcar se define como un hidrocarburo C4-C8 con al menos un grupo -OH e incluye, por ejemplo, el manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol, y arabitol. En una forma de realización el aditivo de alcohol de azúcar es manitol. Los azúcares o polialcoholes mencionados arriba pueden ser utilizados individualmente o en combinación. No hay un límite fijo a la cantidad usada, puesto que el azúcar o alcohol de azúcar es soluble en la preparación líquida y no afecta adversamente los efectos estabilizantes conseguidos usando los métodos de la invención. En una forma de realización, la concentración de azúcar o de azúcar alcohólica está aproximadamente entre 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. Cada uno de estos agentes isotónicos específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención. El uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas es bien conocido al experto en la materia. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, 1995.

[0063] Las insulinas monocatenarias de esta invención también pueden ser mezcladas con otras insulinas monocatenarias, insulina humana o análogos de insulina humana o derivados con una actividad de insulina de acción rápida o prolongado para preparar composiciones de insulina que consisten en una mezcla de insulina de acción rápida y de efecto prolongado.

Ejemplos de tales análogos de insulina son descritos por ejemplo en las solicitudes de patente europea con la publicación Nos. EP 214826, EP 375437 y EP 383472.

[0064] Las insulinas monocatenarias según la presente invención también pueden ser mezcladas con otros compuestos farmacéuticamente activos tales como GLP-1, GLP-2 y exendina o análogos o derivados de la misma.

Las insulinas monocatenarias según la presente invención también pueden ser usadas en tratamiento combinatorio junto con un antidiabético oral tal como un tiazolidindiona, metformina y otra preparación farmacéutica para tratamiento oral de la diabetes de tipo 2.

Abreviaturas y nomenclatura.

[0065] Por una **insulina monocatenaria** se entiende una secuencia polipeptídica de la estructura general B-C-A donde B es la cadena B de insulina humana o un análogo o derivado de la misma, A es la cadena A de insulina humana o un análogo o derivado y C es una cadena de péptidos de 5-11 residuos de aminoácidos que conectan el residuo de aminoácido C-terminal en la cadena B (normalmente B30) con A1. Si la cadena B es una cadena desB30 el péptido conector conectará B29 con A1. La insulina monocatenaria puede ser derivatizada siendo acilado en un residuo de Lys. La insulina monocatenaria contendrá puentes de disulfuro correctamente situados (tres) como en la insulina humana, esto es entre CysA7 y CysB7 y entre CysA20 y CysB19 y un puente disulfuro interno entre CysA6 y CysA11.

[0066] Los **análogos las cadenas B y A** de las cadenas B y A de insulina humana son unas cadenas B y A con una mutación, eliminación y/o adiciones de las cadenas de aminoácidos A y/o B en relación a aquel de la molécula de insulina humana. En una forma de realización, la presente invención comprende moléculas análogas con una o más de la posiciones B1, B3; B10; B22; B27; B28; B29, A8; A15 o A22 relativas a la molécula de insulina natural humana como explicada en detalles adicionales más adelante.

[0067] Por **desB30** o **B(1-29)** se entiende una cadena B de insulina natural o un análogo del mismo que carece del residuo de aminoácido B30, **B(1-26)** es una cadena peptídica que consiste en los primeros 26 residuos de aminoácido de la cadena B de insulina humana contadas desde el extremo N-terminal de la cadena B o un análogo o derivados de las mismas. **A(1-21)** significa la cadena A de insulina natural o un análogo o derivada de la misma y **A(1-20)** significa los primeros 20 residuos naturales de aminoácido de la cadena A de insulina humana o un análogo o derivada de la misma. Los residuos de aminoácidos se indican en el código de aminoácido de tres letras o el código de aminoácido de una letra.

[0068] Con **B1**, **A1** etc. se entiende el residuo de aminoácido en la posición 1 en la cadena B de insulina (contado desde el extremo N-terminal) y el residuo de aminoácido en la posición 1 en la cadena A de insulina (contado desde el extremo N-terminal), respectivamente.

[0069] Por **análogo de insulina** tal y como se utiliza en este caso se entiende un polipéptido con una estructura molecular que formalmente se puede derivar de la estructura de la insulina humana. La insulina de otros animales así pues se vuelve análoga de la insulina humana. La estructura de un análogo se puede derivar por ejemplo por eliminación y/o sustitución al menos un residuo de aminoácido que ocurre en la insulina natural y/o añadiendo al menos un residuo de aminoácido. Los residuos de aminoácidos sustituidos y/o añadidos pueden ser bien unos residuos de aminoácidos codificables, definido como una mutación, u otros residuos de aminoácidos de origen natural, incluso aminoácidos D, o residuos de aminoácidos puramente sintéticos tales como los aminoácidos N-metilo, definidos como una sustitución. La estructura también puede derivar de una insulina ocurriendo naturalmente por inserción/sustitución de una fracción no-peptídica, por ejemplo un fragmento de retroinverso, o la incorporación de enlaces no-peptídicos tales como un enlace azapéptido (CO sustituido por NH) o enlace pseudo peptídico (p. ej. NH sustituido con CH₂).

[0070] La mutación o sustitución de residuos de Asn mejora la estabilidad química de la insulina y las preparaciones farmacéuticas de las mismas. La incorporación de aminoácidos D e intercambio de enlaces de péptido naturales con enlaces no peptídicos pueden crear resistencia hacia enzimas proteolíticas.

[0071] Cuando ocurren residuos de Asp y Glu en la secuencia la cadena peptídica puede continuar mediante

enlaces de iso-péptidos, es decir mediante los grupos carboxilo β - o γ - enlazados de las cadenas laterales, respectivamente.

[0072] Ejemplos de análogos de insulina son tales donde Pro en la posición 28 de la cadena B se pueden mutar con Asp, Lys, o Ile. En otra forma de realización Lys en la posición B29 se muta con Pro. Además B27 Thr se puede mutar con Lys, Arg o Glu. También, Asn en la posición A21 se puede mutar con Ala, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, en particular con Gly, Ala, Ser, o Thr y preferiblemente con Gly. Además, Asn en la posición B3 se puede mutar con Thr, Lys, Gln, Glu o Asp, y Asn en posición A18 se puede mutar con Gln. Más ejemplos de análogos de insulina son los análogos de eliminación des insulina (B1 Phe); análogos de insulina donde la cadena B tiene una extensión N-terminal y análogos de insulina donde la cadena A tiene una extensión C-terminal, por ejemplo un Lys.

[0073] Por **derivado de insulina** tal y como se usa en este caso se entiende una insulina de origen natural o un análogo de insulina que ha sido químicamente modificado in vitro, por ejemplo mediante introducción de un grupo en una cadena lateral en uno o más posiciones de la insulina, por ejemplo un grupo nitro en un residuo de tirosina, o yodo en un residuo de tirosina, o mediante conversión de un grupo carboxílico libre a un grupo éster o a un grupo amida, o por conversión de un grupo amino a una amida por acilación, o por acetilar un grupo hidroxilo que representa un éster, o por alquilación de una amina primaria que representa una amina secundaria. Otros derivados se obtienen por oxidación o reducción de las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos en la insulina.

[0074] Las insulinas monocatenarias se nombran según la siguiente regla: la secuencia comienza con la cadena B, continúa con el péptido C y termina con la cadena A. Los residuos de aminoácidos son nombrados después sus equivalentes respectivos en la insulina humana y las mutaciones y acilaciones son explícitamente descritos mientras que residuos de aminoácidos inalterados en las cadenas A y B no son mencionados. Por ejemplo, una insulina con las siguientes mutaciones en comparación con insulina humana A21G, B3Q, B29R, desB30 y el péptido C TGLGKGQ (SEC ID NO:19) que conecta la cadena B de C-terminal y la cadena A de N-terminal es nombrada insulina humana B(1-29)-B3Q-B29R-TGLGKGQ(SEC ID NO:19)-A(1-21)-A18Q-A21G.

[0075] Por **grupo acilo** se entiende el radical derivado de un ácido orgánico por eliminación del grupo hidróxilo, es decir el radical R- CO-, donde R puede ser bien hidrógeno, un grupo alquilo o bien un grupo O-alquilo.

[0076] Por **acilación** se entiende la reacción química por la cual un hidrógeno de un grupo amino o grupo hidroxilo se intercambia por un grupo de acilo.

[0077] Por **acilación selectiva o preferencial** se entiende una acilación que ocurre en una posición deseada a un grado más alto, preferiblemente al menos a dos o tres grados más alto que en una posición no deseada. En una forma de realización de la presente invención la acilación preferiblemente sólo debería ocurrir en el grupo ϵ -amino en el LisB29 o en un residuo de Lys insertado en otra posición o en el residuo de aminoácido N-terminal B1.

[0078] Por **ácido activado** se entiende un ácido carboxílico en el que un grupo de salida activado ha sido fijado al carbono de acilo permitiendo la reacción con un grupo amino bajo formación de un enlace amida y la liberación del grupo de salida. Ácidos grasos activados pueden ser ésteres activado de ácidos grasos, amidas activadas de ácidos grasos y anhídridos o cloruros. Ácidos grasos activados incluyen derivados de los mismos tal como ésteres con 1-hidroxibenzotriazol a y N-hidroxisuccinimida.

[0079] Por **ácido graso o grupo acilo** se entiende un ácido lineal o ramificado carboxílico que tiene al menos 2 átomos de carbono y siendo saturado o insaturado. En una forma de realización de la presente invención el grupo acilo es un ácido graso que tiene de 6 a 24 átomos C.

[0080] Cuando se acila una insulina, se da el punto de fijación y el nombre del grupo acilo y en la estructura/secuencia correspondiente y se expanden el residuo y grupo acilo en cuestión. Por ejemplo:

se asigna el nombre: insulina humana B(1-29)-B3Q-B29R-TGLGK((ϵ)miristoyl)GQ-A(1-21)-A18Q-A21G (SEC ID NO: 133).

[0081] Por insulina monocatenaria con **actividad de insulina** se entiende una insulina monocatenaria con la capacidad para reducir la glucosa en sangre de mamíferos tal y como se mide en un modelo de animal adecuado, que puede ser un modelo de rata, conejo, o de cerdo, tras la administración adecuada, por ejemplo por administración subcutánea o intravenosa.

[0082] **pl** es el pH en el que un péptido tiene una carga de red cero. El pl de un péptido se puede calcular mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Carga}(pH) = \frac{N_{N\text{Term}=H}}{1+10^{pH-8.2}} - \frac{N_{C\text{Term}=OH}}{1+10^{3.2-pH}} - \frac{N_{Asp}}{1+10^{4.0-pH}} - \frac{N_{Glu}}{1+10^{4.5-pH}} + \frac{N_{Lys}}{1+10^{pH-10.4}} + \frac{N_{Arg}}{1+10^{pH-10.4}} - \frac{N_{FreeCys}}{1+10^{9-pH}} - \frac{N_{Tyr}}{1+10^{10-pH}} + \frac{N_{His}}{1+10^{pH-6.4}}$$

$$\text{Carga}(pI) = 0$$

donde N es el número de incidencia.

- 5
- [0083] Por **soluble en pH neutro** se entiende que una insulina monocatenaria de 0,6mM es soluble en pH neutro.
- [0084] Por **alta estabilidad física** se entiende una tendencia a fibrilación que sea menor de un 50% de la de la insulina humana. La fibrilación puede ser descrita como el tiempo de lapso antes de que se inicie la formación de fibrilla a unas condiciones dadas.
- 10
- [0085] Por fibrilación se entiende un proceso físico por el que las moléculas de insulina parcialmente desplegadas interactúan entre sí para formar agregados lineales.
- [0086] Un polipéptido con **receptor de insulina y afinidad por el receptor de IGF-1** es un polipéptido que es capaz de interactuar con un receptor de insulina y un humano receptor de IGF-1 en un ensayo de enlace adecuado. Tales ensayos receptores son bien conocidos en el campo y otros son descritos en los ejemplos. Las insulinas monocatenarias presentes no enlazarán con el receptor de IGF-1 o tendrán una afinidad más bien baja a dicho receptor. Con una mayor precisión las presentes insulinas monocatenarias tendrán una afinidad hacia el receptor de IGF-1 sustancialmente de la misma magnitud o menos que la de la insulina humana cuando medido como se describe en los ejemplos.
- 15
- [0087] La afinidad de las presentes insulinas monocatenarias hacia el receptor de insulina se mide como descrito en los ejemplos y normalmente está entre un 20 y 200 por ciento de la de la insulina humana.
- 20
- [0088] "**POT**" es el gen de triosa fosfato isomerasa de *Schizosacaromyces pombe*, y "**TPI1**" es el gen de triosa fosfato isomerasa de *S. cerevisiae*.
- [0089] Por un "**líder**" se entiende una secuencia de aminoácidos que consiste en un prepéptido (el péptido señal) y un propéptido.
- 25
- [0090] El término "**péptido señal**" se entiende que es 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 que la proteína heteróloga facilite la translocación en el retículo endoplásmico. El péptido señal normalmente se corta en el curso de este proceso. El péptido señal puede ser heterólogo u homólogo al organismo de levadura que produce la proteína. Varios péptidos señal que pueden ser usados con el constructo de ADN de la invención incluyendo péptido señal de proteasa aspártica de levadura 3 (YAP3) o cualquier análogo funcional (Egel-Mitani et al. (1990) YEAST 6:127-137 y US 5,726,038) y la señal α -factor del gen *MF α 1* (Thorner (1981) en The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Strathern et al., eds., pp 143-180, Cold Spring Harbor Laboratory, NY y US 4,870,00).
- 30
- [0091] El término "**propéptido**" significa una secuencia polipeptídica cuya función es la de permitir que el polipéptido expresado sea dirigido del retículo endoplásmico al aparato de Golgi y adicionalmente a una vesícula secretora para la secreción en el medio de cultivo (es decir, 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 propéptido puede ser el propéptido α -factor de levadura, véase US 4,546,082 y 4,870,008. Alternativamente, el propéptido puede ser un propéptido sintético, es decir un propéptido no encontrado en la naturaleza. Propéptidos sintéticos adecuados son aquellos descritos en US 5,395,922, 5,795,746, 5,162,498 y WO 98/32867. El propéptido preferiblemente contendrá un sitio de procesamiento de endopeptidasa en el extremo C-terminal, tal como un secuencia de Lys-Arg o cualquier análogo funcional de la misma.
- 35
- [0092] En el presente contexto las indicaciones de tres letras o de una sola letra de los aminoácidos han sido usados en sus significados convencionales como indicado a continuación. A menos que se indique explícitamente, los aminoácidos mencionado aquí son L-aminoácidos. Además, los extremos izquierda y derecha de la secuencia de aminoácidos de un péptido son, respectivamente los N- y C-terminales a menos que se especifique de otra manera.
- 40
- 45
- 50
- 55

Abreviaturas para aminoácidos

[0093]

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
Asparigina	Asn	N
Ácido Glutámico	Glu	E
Ácido Aspártico	Asp	D
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T

5

[0094] Las siguientes abreviaturas han sido usadas en la especificación y los ejemplos:

- Bzl = Bn: bencilo
 10 DIEA: N,N-diisopropiletilamina
 DMF: N,N-dimetilformamida
 tBu: *terc*-butilo
 Glu: Acido glutámico
 TSTU: O-(N-succinimidil)-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato
 15 THF: tetrahidrofurano
 EtOAc: acetato de etilo
 DIPEA: diisopropiletilamina
 HOAt: 1-Hidroxi-7-azabenzotriazola
 NMP: N-metilpirrolidona-2
 20 TEA: amina de trietilo
 Su: succinimidil= 2,5-dioxopirrolidin-1-yl
 TFA: ácido trifluoroacético
 DCM: diclorometano
 DMSO: sulfóxido de dimetilo
 25 RT: temperatura ambiente

[0095] Se describe la presente invención con más detalle en los siguientes ejemplos que de ninguna manera pretenden limitar el ámbito de la invención como se reivindica.

30

EJEMPLOS**Procedimientos Generales**

[0096] Todos plásmidos de expresión son del tipo C-POT, similares a aquellos descritos en EP 171, 142, que se caracterizan por el hecho de que contienen el gen de triosa fosfato isomerasa (POT) del *Schizosaccharomyces pombe* para la selección de plásmidos y estabilización en *S. cerevisiae*. Los plásmidos también contienen promotor y terminador de triosa de fosfata isomerasa de *S. cerevisiae*. Estas secuencias son similares a las secuencias correspondientes en el plásmido pKFN1003 (descritas en WO 90/100075) como son todas las secuencias excepto la secuencia del fragmento *EcoRI-XbaI* que codifica la proteína de fusión del líder y el producto de insulina. Para expresar diferentes proteínas de fusión, el fragmento *EcoRI-XbaI* de pKFN1003 es simplemente sustituido por un fragmento *EcoRI-XbaI* que codifica la fusión de insulina-líder de interés. Tales fragmentos *EcoRI-XbaI* pueden ser sintetizados usando oligonucleótidos sintéticos y PCR según técnicas estándar.

[0097] Los transformantes de levadura fueron preparados por transformación de la cepa huésped cepa de *S. cerevisiae* MT663 (*MATaMAT α pep4-3/pep4-3 HIS4/his4 tpi::LEU2/tpi::LEU2 Cir⁺*). La cepa de levadura MT663 fue depositada en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares) en relación con la solicitud WO 92/11378 y se le dio el número de depósito DSM 6278.

[0098] MT663 fue cultivado en YPGaL (1% extracto de bacto-levadura, 2% Bacto-peptona, 2% galactosa, 1% lactato) para un O.D. a 600 nm de 0,6. 100 ml de cultivo fueron recogidos por centrifugado, lavado con 10 ml de agua, recentrifugado y resuspendido en 10 ml de una solución conteniendo 1,2 M sorbitol, 25 mM Na₂ EDTA pH = 8,0 y 6,7 mg/ml ditiotreitól. La suspensión fue incubada a 30°C durante 15 minutos, centrifugado y las células resuspendidas en 10 ml de una solución conteniendo 1,2 M sorbitol, 10 mM Na₂ EDTA, 0,1 M citrato sódico, pH 0 5,8 y 2 mg de Novozim®234. La suspensión fue incubada a 30°C durante 30 minutos, las células recogidas por centrifugado, lavado 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)aminometano) pH = 7,5) y resuspendido en 2 ml de CAS. Para la transformación, se mezclaron 1 ml de células suspendidas de CAS con aprox. 0.1 mg de ADN plásmido y se dejó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió 1 ml de (20% glicol de polietileno 4000, 10 mM CaCl₂, 10 mM Tris HCl, pH = 7.5) y se dejó la mezcla otros 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla fue centrifugada y el granulado resuspendido en 0,1 ml de SOS (1,2 M sorbitol, 33% v/v YPD, 6.7 mM CaCl₂) e incubado a 30°C durante 2 horas. La suspensión luego fue centrifugada y el granulado resuspendido en 0,5 ml de 1,2 M sorbitol. Luego se añadió 6 ml de agar blando (the SC medium of Sherman et al. (1982) Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory) conteniendo 1,2 M sorbitol más 2,5% agar) a 52°C y la suspensión vertida encima de placas con el mismo medio conteniendo sorbitol solidificado con agar.

[0099] La cepa de *S. cerevisiae* MT663 transformada con plásmidos de expresión fue cultivada en YPD durante 72 h a 30°C.

Ejemplo 1

[0100] Varias insulinas monocatenarias fueron producidas como se describe anteriormente y aisladas del medio de cultivo y purificadas para más pruebas.

Las insulinas monocatenarias fueron analizadas para determinar si tenían actividad biológica de insulina como medida por afinidad de enlace al receptor de insulina humana en relación a la de la insulina humana como se describe abajo.

[0101] Además, la afinidad por el IGF-1 fue analizada como se describe abajo.

Los resultados se muestran en la tabla 1 donde IR es la unión al receptor de insulina humana en relación a la de la insulina humana.

TABLA 1

Insulina monocatenaria (PAK)	Péptido conector	Sustituciones de aminoácidos	IR	Unión del receptor de UGF-1 humano en relación a la insulina humana
1664	TGSSRGK (SEC ID NO:36)		43%	
1735	VGRSSGK (SEC ID NO:31)	[A21G]	143%	
1754	AGRGSGP (SEQ ID		53%	

ES 2 369 895 T3

1767	AGRGSGP (SEC ID NO:18)	[A18Q_A21G]	28%	
1801	AGRGSGK (SEC ID NO:15)		129%	
1817	AGRGSGK (SEC ID NO:15)	[A21G]	63%	
1800	AGRGSGK (SEC ID NO:15)	[A18Q_A21G]	175%	
1805	AGRGSGK (SEC ID NO:15)	[B3Q_A18Q_A21G]	83%	
1808	AGRGSGK (SEC ID NO:15)	[B1G_B3Q_A18Q_A 21G]	86%	
1786001	AGLGDGK (SEC ID NO: 37)		50%	
1786017	AGLGVGK (SEC ID NO:38)		47%	
1786026	AGLGMGK (SEC ID NO:39)		35%	
1786030	AGLGSGK (SEC ID NO:33)		197%	
1786036	AGLGYGK (SEC ID NO:40)		35%	
1786044	AGLGQGK (SEC ID NO:41)		22%	
1786046	AGLGGGK (SEC ID NO:42)		68%	
1786053	AGLGRGK (SEC ID NO:43)		54%	
1764	AGLGSGK (SEC ID NO:33)	[A18Q_A21G]	120%	
1816	AGLGSGQ (SEC ID NO:44)	[B3Q_A18Q]	37%	
1757	AGLGSGK (SEC ID NO:24)		116%	
1755	AGMGSGK (SEC ID NO:45)		137%	
1762	AGMGSGP (SEC ID NO:25)	[A18Q_A21G]	20%	
1672	AGSSSGK (SEC ID NO:46)		31%	
1784	WASGSGK (SEC ID NO:47)	[A18a_A21G]	23%	
1785	ASWGSGK (SEC ID NO:48)	[A18a_A21G]	136%	
1796	AWSGSGK (SEC ID NO:49)	[A18Q_A21G]	102%	
1781	TGLGSGQ (SEC ID NO:22)		122%	
1782	TGLGSGK (SEC ID NO:21)		130%	

ES 2 369 895 T3

1783	TGLGRGK (SEC ID NO:23)		86%	
1810	TGLGSGQ (SEC ID NO:22)	[A18a_A21G]	73%	
1811	TGLGSGK (SEC ID NO:21)	[A18Q_A21G]	136%	
1812	TGLGRGK (SEC ID NO:23)	[A18Q_A21G]	118%	
1820	TGLGKGQ (SEC ID NO:19)	[B3Q_B29R_A18Q_A21G]	55%	
1821	TGLGSGK (SEC ID NO:21)	[B3Q_B29R_A18Q_A21G]	128%	
1835	TGLGKGQ (SEC ID NO:19)	[B29E_A18Q]	50%	
1837	TGLGKGQ (SEC ID NO:19)	[B29A_A18Q]	71%	
1838	TGLGKGR (SEC ID NO:19)	[B29R_A18Q]	113%	
1845	TGLGKGQ (SEC ID NO:19)	[B27E_B29A_A18Q]	20%	
1846	TGLGKGR (SEC ID NO:20)	[B29A_A18Q]	92%	
1847	TGLGKGR (SEQ ID	[B27E_B29A_A18Q] NO: 20	82%	
1848	TGLGKGR (SEC ID NO:20)	[B27E_B29E_A18Q]	40%	
1849	TGLGKGR (SEC ID NO:20)	[B29E_A18Q]	60%	
1850	TGLGSGQ (SEC ID NO:22)	[B10R]	31%	
1864	TGLGSGK (SEC ID NO:21)	[B3K_A18Q_A21G]	301%	
1877	TGLGSGK (SEC ID NO:21)	[B28D_A18Q]	140%	
1881	TGLGSGK (SEC ID NO:21)	[A18K_A21 G]		
1891	TGLGSGQ (SEC ID NO:22)	[B10A_A18Q]	34%	
1892	TGLGSGQ (SEC ID NO:22)	[desB1_B3Q_B10A_A18Q]	38%	
1893	TGLGSGQ (SEC ID NO:22)	[B10Q_A18Q]	51%	
1894	TGLGSGQ (SEC ID NO:22)	[desB1_B3Q_B10Q-A18Q]	38%	
1791	HGLYSGK (SEC ID NO:50)	[A18Q_A21G]	226%	
1818	KGLGSGQ (SEC ID NO:51)	[B3Q_B29R_A18Q_A21G]	125%	
1727	VGLSSGD (SEC ID NO:53)		54%	

ES 2 369 895 T3

1728	VGLSSGQ (SEC ID NO:54)		151%	
1730	VGLRSGK (SEC ID NO:55)		306%	
1731	VGLMSGK (SEC ID NO:56)		247%	
1787	VGLSSGQ (SEC ID NO:27)	[A18Q_A21G]	123%	
1788	VGLYSGK (SEC ID NO:28)	[A18Q_A21G]	323%	
1789	VGLRSGK (SEC ID NO:55)	[A18Q_A21G]	248%	
1790	VGLMSGK (SEC ID NO:56)	[A18Q_A21G]	261%	
1734	VGLSSGK (SEC ID NO:30)	[A21G]	211%	
1866	VGLSSGQ (SEC ID NO:27)	[A18Q]	196%	
1869	VGLSSGQ (SEC ID NO:27)	[B22K_B29A_A18Q]	69%	
1870	VGLSSGQ (SEC ID NO:27)	[B29A_A15K_A18Q]		
1871	VGLSSGQ (SEC ID NO:27)	[B29A_A18K]	82%	
1872	VGLSSGQ (SEC ID NO:27)	[B3K_B29A_A18Q]		
1854	HGLYSGK (SEC ID NO:28)	[B29E_A18Q]	40%	
1875	VGLSSGQ (SEC ID NO:27)	[B28K_B29A_A18Q]	35%	
1876	VGLSSGQ (SEC ID NO:27)	[B27K_B29A_A18Q]	38%	
1878	VGLSSGQ (SEC ID NO:27)	[B3K_A18K_A21G]	172%	
1879	VGLSSGQ (SEC ID NO:27)	[B29A_A18Q]	92%	
1880	VGLSSGQ (SEC ID NO:27)	[B1G_B3Q_A18Q_A 21G]	54%	
1855	VGLYSGK (SEC ID NO:28)	[B28D_A18Q]	221%	
1884	VGLSSGQ (SEC ID NO:27)	[B29A_A8K_A18Q]	89%	
1896	VGLSSGQ (SEC ID NO:27)	[B29A_A18Q_A22K]	38%	
1863	HGRGSGK (SEC ID NO:62)	[A18Q_A21G]	122%	
1873	KGLSSGQ (SEC ID NO:63)	[B29A_A18Q]	60%	
1874	VKLSSGQ (SEC ID NO:64)	[B29A_A18Q]	835	

ES 2 369 895 T3

1688023	VGRSSGK (SEC ID NO:31)		97%	
1688059	VMSSGK (SEC ID NO:65)		112%	
1655	TGSSGK (SEC ID NO:66)		43%	
1656	TVGSSGK (SEC ID NO:67)		57%	
1689007	LGSSGK (SEC ID NO:68)		49%	
1689008	RGSSGK (SEC ID NO:69)		54%	
1689012	QGSSGK (SEC ID NO:70)		34%	
1689021	GGSSGK (SEC ID NO:71)		23%	
1689037	SGSSGK (SEC ID NO:72)		49%	
1724005	VDSSGK (SEC ID NO:73)		32%	
1724012	VPSSGK (SEC ID NO:74)		80%	
1724014	VESSGK (SEC ID NO:75)		40%	
1724015	VWSSGK (SEC ID NO:76)		298%	
1724016	VTSSGK (SEC ID NO:77)		51%	
1724029	VASSGK (SEC ID NO:78)		81%	
1724040	VSSSGK (SEC ID NO:79)		73%	
1724042	VRSSGK (SEC ID NO:80)		76%	
1711	RGSSGK (SEC ID NO:120)		65%	
1674	VGASSGK (SEC ID NO:86)		49%	
	VGSSNGK (SEC ID NO:87)		48%	
1638077	VGSSRGK (SEC ID NO:17)		61%	0,10%
1676	VGSSAGK (SEC ID NO:119)		22%	
1723	VGSSRGK (SEC ID NO:17)	[A21G]	33%	
1617	VGSSNGK (SEC ID NO:118)		48%	

ES 2 369 895 T3

1677	VGSSSAK (SEC ID NO:89)		22%	
1766	VGSSSGK (SEC ID NO:16)		62%	0,05%
1724004	VGSSSGK (SEC ID NO:16)		72%	
1760016	VGSSSGK (SEC ID NO:16)	[B10D]	135%	
1760023	VGSSSGK (SEC ID NO:16)	[B10E]	77%	
1760043	VGSSSGK (SEC ID NO:16)	[B10Q]	67%	
1760056	VGSSSGK (SEC ID NO:16)	[B10E]	83%	
1760059	VGSSSGK (SEC ID NO:16)	[B10N]	48%	
1738	VGSSSGK (SEC ID NO:16)	[A18Q]	89%	
1740	VGSSSGK (SEC ID NO:16)	[B1G_B3Q_A18Q_A 21G]	90%	
1741	VGSSSGK (SEC ID NO:16)	[B1G]	112%	
1744	VGSSSGK (SEC ID NO:16)	[A18Q_A21G]	80%	
1860	VGSSSGK (SEC ID NO:16)	[B3K_A18Q_A21G]	83%	
1733	VGSSSGK (SEC ID NO:16)	[A21G]	42%	
1712	VGSSSGK (SEC ID NO:16)	B27R	85%	
1719	VGHSRGK (SEC ID NO:90)		103%	
1721	HGSSRGK (SEC ID NO:91)		118%	
	VGSASGK (SEC ID NO:92)		80%	
1687009	VGSNSGK (SEC ID NO:93)		48%	
1708	VGSRSGK (SEC ID NO:94)		128%	0,20%
1718	VGSHRGK (SEC ID NO:95)		69%	
1687030	VGSGSGK (SEC ID NO:96)		55%	
1687033	VGSYSKG (SEC ID NO:97)		80%	0,20%
1687046	VGMSGK (SEC ID NO:98)		82%	0,10%
1688001	VGPSSGK (SEC ID NO:99)		48%	

ES 2 369 895 T3

1688005	VGTSSGK (SEC ID NO:100)		75%	
1688006	VGQSSGK (SEC ID NO:101)		56%	
1688007	VGYSGK (SEC ID NO:102)		95%	0,20%
1688011	VGLSSGK (SEC ID NO:30)		132%	0,10%
1688012	VGKSSGK (SEC ID NO: 103)		93%	
1688014	VGSSGK (SEC ID NO:104)		51%	
1709	VGRSSGK (SEC ID NO:105)		97%	0,50%
1688028	VMSSGK (SEC ID NO:106)		127%	0,20%
1688056	GVSSGK (SEC ID NO:107)		59%	
	VGHSSGK (SEC ID NO:108)		112%	0,15%

- 5 [0102] Unión de insulinas monocatenarias al receptor de insulina con el motivo del péptido conector de TRXXXGR (SEC ID NO:112) en porcentaje de la de la insulina humana

Cadena B	XXX	Cadena A	IR de Unión al receptor de insulina	Unión al IGF-1 humano
B(1-29)	YGS	A(1-21)		
B((1-29)	SSN	A(1-21)	61%	0,1%
B(1-29)	LSQ	A(1-21)	62%	0,05%
B(1-29)	PKS	A(1-21)	18%	
B(1-29)	LGG	A(1-21)	43%	
B(1-29)	VTG	A(1-21)	57%	
B(1-29)	STN	A(1-21)	46%	
B(1-29)	LES	A(1-21)	43%	
B(1-29)	IDS	A(1-21)	31%	
B(1-29)	NSQ	A(1-21)	38%	
B(1-29)	PSY	A(1-21)	49%	
B(1-29)	ENT	A(1-21)	34%	
B(1-29)	TPQ	A(1-21)	22%	
B(1-29)	NRT	A(1-21)	22%	

Ejemplo 2

[0103] B(1-29)-B3Q-B29R-TGLGK((eps)miristoil)GQ-A(1-21)-A18Q-A21G insulina humana (SEC ID NO:133) (PAK1820)

5 [0104] B(1-29)-B3Q-B29R-TGLGKGQ-A(1-21)-A18Q-A21G insulin humana(SEQ identidad NO:133) (150 mg, 24 μ mol) fue disuelto en carbonato de sodio acuoso (100 mM, 2,8 mL) y se le añadió una solución de éster de n-hidroxisuccinimida de ácido mirístico (7,7 mg, 24 μ mol, se puede preparar según B. Faroux-Corlay et al., J. Med. Chem. 2001, 44, 2188-2203) en N-metil-2-pirrolidona (0,5 mL). A la mezcla resultante se le añadió más N-metil-2-pirrolidona (3 mL) y carbonato de sodio acuoso (100 mM, 0,8 mL), a pH 10-11. La mezcla resultante fue agitada a temperatura ambiente durante 50 minutos. EL pH fue ajustado a 5.5 con 1 N ácido clorhídrico. El sólido formado fue aislado mediante centrifugado y decantación. El residuo fue purificado por HPLC preparatorio en dos veces en un Jones Kromasil RP18 5 μ m, columna de 15x225 mm, usando un flujo de 8 mL/min con el siguiente gradiente:

0.00 - 5.00 min: 10% CH₃CN + 0,1 % TFA,
5.00 - 35.0 min: 10% - 50% CH₃ CN + 0,1% TFA,
35.0 - 45.0 min: 50% - 90% CH₃ CN + 0,1% TFA.

15 [0105] Las fracciones puras fueron agrupadas y liofilizadas para proporcionar 12 mg del compuesto del título.

[0106] Nano-Flow Electrospray MS: m/Z = 6541 (M+1).

20 HPLC: Rt = 15.44 min.
Columna: C4, 5 μ , 150x4 60mm "phenomenex, Jupiter".
Inyección 20 μ l.
Flujo: 1,5 ml/min

25 [0107] Solventes:

A: 80% 0,0125 M Tris, 0,0187 M (NH₄)₂SO₄ pH = 7, 20% CH₃CN.
B: 80% CH₃CN, 20% agua.

30 [0108] Gradiente:

0.00 - 20.00 min: 5% - 55% B,
20.0 - 22.0 min: 55% - 80% B,
22.0 - 24.0 min: 80% B,
24.0 - 25.0 min: 80% - 5% B,
25.0 - 32.0 min: 5% B.

Ejemplo 3

[0109] La insulina humana B(1-29)-B3Q-B29R-TGLGK((eps)octadecandioil)GQ-A(1-21)-A18Q-A21G (SEC ID NO:133) (PAK1820)

40 [0110] La insulina humana B(1-29)-B3Q-B29R-TGLGKGQ-A(1-21)-A18Q-A21G (SEC ID NO:133) (150 mg, 24 μ mol) fue disuelta en carbonato de sodio acuoso (100 mM, 2,8 mL) y se le añadió una solución de octadecanoato de terc-butil succinimidilo (preparada en analogía con el método descrito en el ejemplo 4 (11 mg, 24 μ mol) en acetonitrilo (2 mL). A la mezcla resultante se le añadió más acetonitrilo (2 mL). El pH de la mezcla fue de 10-11.
45 La mezcla resultante fue agitada a temperatura ambiente durante 1 hora. El pH fue ajustado a 5.86 con 1 N ácido clorhídrico. El sólido formado fue aislado mediante centrifugado y decantación. El residuo fue purificado mediante HPLC preparativo en dos veces en un Jones Kromasil RP18 5 μ m, columna de 15x225 mm, usando un flujo de 8 mL/min con el siguiente gradiente:

0.00 - 5.00 min: 10% CH₃ CN,
5.00 - 35.0 min: 10% - 50% CH₃CN,
35.0 - 45.0 min: 50% - 90% CH₃CN.

[0111] Las fracciones puras fueron agrupadas y liofilizadas a proporcionar 48 mg de intermediario de insulina humana B(1-29)-B3Q-B29R-TGLGK((eps) octadecanediol de terc-butilo)Ga-A(1-21)-A18a-A21G (SEC ID NO:133).

5 [0112] A la insulina humana B(1-29)-B3Q-B29R-TGLGK((eps) octadecanediol de terc-butilo)GQ-A(1-21)-A18Q-A21G (SEQ identidad NO:133) (48 mg) anterior se le añadió ácido trifluoroacético (1,8 ml) y la mezcla fue suavemente agitada a temperatura ambiente durante 35 minutos. La mezcla fue concentrada al vacío y deshecho dos veces con diclorometano.

10 El residuo fue purificado mediante preparativo HPLC en dos veces en un Macherey-Nagel SP 250/21 Nucleosil 300-7 columna C4, usando un flujo de 8 mL/min con el siguiente gradiente:

0.00 - 5.00 min: 10% CH₃ CN,
 5.00 - 30.0 min: 10% - 50% CH₃ CN,
 30.0 - 35.0 min: 50% - 90% CH₃ CN.
 35.0 - 40.0 min: 100% CH₃ CN.

15 [0113] Esto proporcionó 19 mg de insulina humana B(1-29)-B3Q-B29R- TGLGK ((eps) octadecanediol) GQ-A (1-21) -A18Q -A21G (SEQ identidad NO:133)

NanoFlow Electrospray MS: m/Z = 6626 (calculado: 6626)

HPLC: Rt = 12,62 min.

Columna: C4, 5µ, 150x4 60mm "phenomenex, Jupiter".

Flujo: 1,5 ml/min

20 [0114] Solventes:

A: 80% 0,0125 M Tris, 0,0187 M (NH₄)₂SO₄ pH = 7, 20% CH₃ CN.

B: 80% CH₃CN, 20% agua.

25 [0115] Gradiente:

0.00 - 20.00 min: 5% - 55% B,

20.0 - 22.0 min: 55% - 80% B,

30 22.0 - 24.0 min: 80% B,

24.0 - 25.0 min: 80% - 5% B,

25.0 - 32.0 min: 5% B.

Ejemplo 4

35 [0116] La insulina humana B(1-29)-B3a-B29R-TGLGK((eps)hexadecandioyl-γ-L-Glu)GQ-A(1-21)-A18Q-A21G (SEC ID NO:133)(PAK1820)

40 [0117] Este compuesto fue preparado de manera similar a como se describe en el ejemplo 2 la acilación de la insulina humana B(1-29)-B3Q-B29R- TGLGKGQ-A(1-21)-A18Q-A21G (SEC ID NO:133) con terc-butil hexadecandioyl-γ-L-Glu(OSu)-OtBu de, seguido una desprotección de los ésteres del tBu mediada por TFA.

[0118] Datos para el compuesto del título:

MALDI-TOF: m/z= 6727 (calculado: 6727)

45 HPLC: Rt = 10.15 min.

Columna: C4, 5µ, 150x4 60mm "phenomenex, Jupiter".

50 Flujo: 1,5 ml/min

[0119] Solventes:

- 5 A: 80% 0,0125 M Tris, 0,0187 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH = 7, 20% CH_3CN .
 B: 80% CH_3CN , 20% agua.

[0120] Gradiente:

0.00 - 20.00 min: 5% - 55% B,
 20.0 - 22.0 min: 55% - 80% B,
 22.0 - 24.0 min: 80% B,
 24.0 - 25.0 min: 80% - 5% B,
 25.0 - 32.0 min: 5% B.

10

Preparación de terc-butil hexadecandioil- γ -L-Glu(OSu)-OtBu

- 15 [0121] Se suspendió ácido hexadecandioico (40,0 g, 140 mmol) en tolueno (250 ml) y la mezcla fue calentada a reflujo. Se añadió N,N-dimetilformamida acetálico (76,3 g, 375 mmol) fue añadido gota a gota durante 4 horas. Se reflujo la mezcla durante toda la noche. El solvente fue quitado al vacío a 50°C , y el material bruto fue suspendido en DCM/AcOEt (500 ml, 1:1) y agitado durante 15 mins. Los sólidos fueron recogidos por filtración y triturados con DCM (200 ml). Los filtrados fueron evaporados al vacío para dar mono-terc-butilo hexadecanoato crudo, 30 gramos. Este material fue suspendido en DCM (50 ml), enfriado con hielo durante 10 min, y filtrado. El solvente fue quitado al vacío para dejar 25 gramos de mono-terc-butilo hexadecanoato crudo, que fue recristalizado desde heptano (200 ml) para dar mono-terc-butilo hexadecanoato, 15,9 g (33 %). Alternativamente a la recristalización, el monoéster se puede purificar por elución de cromatografía de gel de sílice con AcOEt/heptano.

- 25 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ : 2.35 (t, 2H), 2.20 (t, 2H), 1.65-1.55 (m, 4H), 1.44 (s, 9H), 1.34-1.20 (m, 20 H).

- [0122] El éster mono-terc-butil (2 g, 5.8 mmol) fue disuelto en THF (20 ml) y tratado con TSTU (2,1 g, 7,0 mmol) y DIEA (1,2 ml, 7,0 mmol) y agitado durante toda la noche. La mezcla fue filtrada, y el filtrado fue evaporado al vacío. El residuo fue disuelto en AcOEt y lavado dos veces con 0,1 M HCl y agua fría. El secado sobre MgSO₄ y evaporación al vacío dio terc-buti succinimidil hexadecanoato, 2,02 g (79%).

- 30 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ : 2.84 (s, 4H), 2.60 (t, 2H), 2.20 (t, 2H), 1.74 (p, 2H), 1.56 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.40 (m, 2H), de 1.30 1.20 (m, 18H).

- 35 [0123] Terc-butilo succinimidil hexadecanoato (1 g, 2,27 mmol) fue disuelto DMF (15 ml) y tratado con L-Glu- OtBu (0,51 g, 2,5 mmol) y DIEA (0.58 ml, 3,41 mmol) y la mezcla fue agitada durante toda la noche. El solvente fue evaporado al vacío, y el producto crudo fue disuelto en AcOEt, y lavado dos veces con 0,2M HCl, con agua y solución salina. El secado sobre MgSO₄ y la evaporación al vacío dio terc-butil de hexadecandioyl- γ -L-Glu-OtBu, 1,2 g (100%).

- 40 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ : 6.25 (d, 1H), 4.53 (m, 1H), 2.42 (m, 2H), 2.21 (m, 4H), 1.92 (m, 1H), 1.58 (m, 4H), 1.47 (s, 9H), 1.43 (s, 9H), 1.43-1.22 (m, 18H).

- 45 [0124] Terc-butil hexadecandioyl- γ -L-Glu-OtBu (1.2 g, 2.27 mmol) fue disuelto en THF (15 ml) y tratado con TSTU (0.82 g, 2.72 mmol) y DIEA (0.47 ml, 2.72 mmol) y agitado durante toda la noche. La mezcla fue filtrada, y el filtrado fue evaporado al vacío. El residuo fue disuelto en AcOEt y lavado dos veces con 0,1 M HCl y agua fría. El secado sobre MgSO₄ y la evaporación al vacío dio terc-butilo hexadecandioyl- γ -L-Glu(OSu)-OtBu, 1,30 g (92%).

- 50 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃) δ : 6.17 (d, 1H), 4.60 (m, 1H), 2.84 (s, 4H), 2.72 (m, 1H), 2.64 (m, 1H), 2.32 (m, 1H), 2.20 (m, 4H), 2.08 (m, 1H), 1.6 (m, 4H), 1.47 (s, 9H), 1.43 (s, 9H), 1.33-1.21 (m, 20 H).

Ejemplo 5

- 55 [0125] La insulina humana B(1-29)-B27E-B29A-TGLGK((eps)miristoyl)GQ-A(1-21)-A18Q (SEC ID NO:134) (PAK1845)

5 [0126] La insulina humana B(1-29)-B27E-B29A-TGLGKQ-A(1-21)-A18Q (SEC ID NO:134) (117 mg, 20 μ mol) fue disuelto en carbonato de sodio acuoso (100 mM, 2.5 mL) y se le añadió una solución de éster de N-hidroxisuccinimida de ácido mirístico (9 mg, se puede preparar según B. Faroux-Corlay et al., J. Med. Chem. 2001, 44, 2188-2203) en acetonitrilo (1.8 mL). La mezcla resultante fue agitada a temperatura ambiente durante 65 minutos. El pH fue ajustado a 5.5 con 1 N ácido clorhídrico. El sólido formado fue aislado mediante centrifugado y decantación. El residuo fue purificado mediante preparativo de HPLC en un Macherey-Nagel SP 250/21 Nucleusil 300-7, columna C4, usando un flujo de 10 mL/min con el siguiente gradiente:

0 - 10 min: 20% CH₃CN + 0,1 % TFA,
 10 - 80 min: 20% - 90% CH₃CN + 0,1% TFA,
 35.0 - 45.0 min: 50% - 90% CH₃CN + 0,1% TFA.

10 [0127] Las fracciones puras fueron agrupadas y liofilizadas para proporcionar 20 mg del compuesto del título.

15 [0128] MALDI-TOF MS: m/Z = 6509. Calculado: 6518
 HPLC: Rt = 11.64 min. columna: "Phenomenex, Jupiter", C4 5 μ , 150x4 60mm, inyección: 20 μ l. Solventes: A: 80 % 0,0125 M Tris, 0,0187 M (NH₄)₂ SO₄ pH = 7, 20% CH₃ CN; B: 80 % CH₃ CN, 20% agua, flujo 1,5 ml/min con el siguiente gradiente:

0 - 20 min: 5 - 55% B,
 20 - 22 min: 55 - 80% B,
 22 - 24 min: 80% B,
 24 - 25 min: 80 - 5% B,
 25 - 32 min: 5% B.

20 [0129] HPLC: Rt = 12.95 min. Columna: "Phenomenex, Jupiter", C4 5 μ , 150x4 60mm, inyección: 20 μ l. Solventes: A: 0,1% TFA, 10%CH₃ CN, 89,9 % agua; B: 0.1% TFA, 80 % CH₃CN, 19,9% agua, flujo: 1,5 ml/min con el siguiente gradiente:

0 - 17 min: 20 - 90% B,
 17 - 21 min: 90% B,
 21 - 23 min: 90 - 20% B,
 23 - 30 min: 20% B.

25 Ejemplo 6

[0130] Insulina humana B(1-29)-B29A-TGLGK((eps)miristoyl)GQ-A(1-21)-A18Q (SEC ID NO:135) (PAK1837)

30 [0131] La insulina humana B(1-29)-B29A-TGLGKGO-A(1-21)-A18Q (SEC ID NO:135) (151 mg, 24 μ mol) fue disuelto en carbonato de sodio acuoso (100 mM, 5 mL) y se le añadió una solución de éster N-hidroxisuccinimida de ácido mirístico (8 mg) (se puede preparar según B. Faroux-Corlay et al., J. Med. Chem. 2001, 44, 2188-2203) en N-metilpirrolidin-2-ona (2,5 mL). La mezcla resultante fue agitada a temperatura ambiente durante 45 minutos. El pH fue ajustado a 5.6 con 1 N ácido clorhídrico. El sólido formado fue aislado mediante centrifugado y decantación. El residuo fue purificado por preparativo HPLC en un Macherey-Nagel SP 250/21 Nucleusil 300-7, columna C4, usando un flujo de 8 mL/min con el siguiente gradiente:

0 - 5 min: 10% CH₃ CN + 0,1% TFA,
 5 - 35 min: 10% - 90% CH₃CN + 0,1 % TFA,
 35 - 40 min: 90% CH₃CN + 0,1 % TFA,
 40 - 45 min: 100% CH₃CN.

40 [0132] Las fracciones puras fueron agrupadas y liofilizadas para proporcionar 24 mg del compuesto del título.

MALDI-TOF MS: m/Z = 6489.
Calculado: 6498

5 [0133] HPLC: Rt = 10.97 min. Columna: proteína Vydac, C4 25 cm, cat # 214TP54, inyección: 5 µl. Solventes: A: 80 % 0,01 M Tris, 0,015 M (NH₄)₂ SO₄ pH = 7,3, 20% CH₃ CN; B: 80 % CH₃ CN, 20% agua, flujo 1,5 ml/min con el siguiente gradiente:

0 - 20 min: 10 - 80% B,
20 - 20.1 min: 80 - 90% B,
20.1 - 21 min: 90 - 10% B,
21 - 25 min: 10% B.

10

[0134] HPLC: Rt = 13.09 min. Columna: "Phenomenex, Jupiter", C4 5µ, 150x4 60mm, inyección: 25 µl. Solventes: A: 0.1% TFA, 10%CH₃CN, 89.9 % agua; B: 0.1% TFA, 80 % CH₃CN, 19.9 % agua, flujo: 1.5 ml/min con el siguiente gradiente:

15

0 - 17 min: 20 - 90% B,
17 - 21 min: 90% B,
21 - 23 min: 90 - 20% B,
23 - 30 min: 20% B.

20 [0135] Afinidad por el receptor de insulina humana

Ejemplo	IC ₅₀ en relación a la insulina humana in %.
2	2%
3	0,1 %
4	0,7%

MÉTODOS FARMACOLÓGICOS

25

Ensayo (I)

30

[0136] Unión al receptor de insulina de las insulinas monocatenarias de la invención.

35

[0137] La afinidad de las insulinas monocatenarias de la invención con el receptor de insulina humana fue determinada mediante un ensayo SPA (Análisis de centelleo por proximidad) en una placa microtituladora con anticuerpos de captura. Los gránulos de unión a anticuerpo de ratón SPA PVT (Amersham Biosciences, Cat n°. PRNQ0017) fueron mezclados con 25 ml de tampón de unión (100 mM HEPES pH 7.8, 100 mM cloruro sódico, 10 mM MgSO₄, 0,025% Tween-20). La mezcla de reagentes para una única placa microtituladora Packard Optiplat (Packard n°. 6005190) se compone de 2.4 µl de un receptor de insulina humana recombinante - exon 11 purificado diluido a 1:5000 -, una cantidad de una solución madre de human insulina A14 Tyr[1251] que corresponde a 5000 cpm por 100 µl de mezcla reactiva, 12 µl de un dilución del 1:1000 de anticuerpo F12, 3 ml de perlas de SPA y tampón de unión para un total de 12 ml. Un total de 100 µl fue añadido después y se hicieron una serie de diluciones a partir de muestras apropiadas. A la serie de diluciones se les añadió luego 100 µl de mezcla reactiva y las muestras fueron incubadas durante 16 horas mientras fueron suavemente agitados. Las fases luego fueron separadas mediante centrifugado durante 1 min y las placas contadas en un Topcounter. Los datos de unión fueron ajustados usando el algoritmo de regresión no lineal en el Prisma GraphPad 2.01 (GraphPad Software, San Diego, CA).

45

Preparación de anticuerpos mIR monoclonales

[0138] Anticuerpos específicos (F12) fueron producidos por técnica monoclonal: Ratones RBF fueron inmunizados mediante inyección subcutánea de 50 µg de mIR purificado en FCA seguido de dos inyecciones con 20 µg de mIR en FIA. Ratones de alta respuesta fueron estimulados con 25 µg de mIR por vía intravenosa y los bazo fueron cosechados 3 días después. Las células de bazo se fusionaron con la línea celular de mieloma de zorro (Köhler, G & Milstein C. (1976), *European J. Immunology*, 6:511-19 ; Taggart RT et al (1983), *Science* 219:1228-30). Los sobrenadantes fueron sometidos a revisión para la producción de anticuerpos en un mIR de ELISA específica. Los pocillos positivos fueron clonados y evaluados según transferencia de Western.

10

Ensayo (II)

[0139] Alternativamente la unión al receptor de insulina fue evaluada en un ensayo de membrana HLRB de la siguiente manera:

15

Unión de [¹²⁵I] de insulina humana a un receptor de insulina humana isoforma(hIR-A) recombinante asociada a la membrana.

20

[0140] Reactivos:

¹²⁵I-insulina: Novo Nordisk A/S, mono ¹²⁵I-(Tyr A14) insulina humana

Insulina humana: Novo Nordisk A/S,

25

Albúmina de suero humana: Dade Behring, ORHA 194 C30, lot 455077

Artículos plásticos: Packard OptiPlate™-96; #6,005,290

30

Centelleante: Amersham Biosciencias, microesferas de PVT revestidos con WGA, #RPNQ0001

Células: Células BHK tk⁻ ts13 expresando la isoforma recombinante de receptor de insulina humana A (hIR12-14).

35

[0141] Extracción de receptores de insulina asociados a la membrana: se cosecharon BHK células en una fábrica celular de diez capas y homogenizadas en 25 ml de tampón muy frío (25 mM HEPES pH 7.4, 2.5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 250 mg/l bacitracina, 0,1 mM Pefablock). El homogeneizado fue cuidadosamente puesto en capas sobre almohadones de un 41% de sacarosa, centrifugado en la ultracentrifugadora a 95,000 x g durante 75 minutos en un rotor Beckman SW28 a 4°C. Las membranas de plasma fueron recogidas de la parte superior de la almohadilla de sacarosa, diluido a 1:4 con tampón y centrifugado a 40,000 x g durante 45min en un rotor Beckman SW28. Los gránulos fueron suspendidos en tampón (25 mM HEPES pH 7.4, 2.5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 250 mg/l bacitracina, 0.1 mM Pefablock) y almacenado a -80°C. Se realizó una unión de radioligando a receptores de insulina asociados a la membrana por duplicado en placas microtituladoras OptiPlates de 96 pocillos. La proteína de membrana fue incubada durante 150 minutos a 25°C con 50 pM [¹²⁵I-TyrA¹⁴] de insulina humana en un volumen total de 200 µl de tampón de ensayo (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM MgSO₄, 0.01% Tritón X-100, 0,1% HSA, inhibidores de proteasa sin EDTA de Complete™) y aumentando las concentraciones de insulina humana o análogos de insulina (típicamente entre 0,01 y 300 nM). Se terminó el ensayo mediante la adición de 50 µl de una suspensión de microesferas PVT revestidos con WGA (20 mg/ml). Tras 5 minutos de agitación ligera, la placa fue centrifugada a 1500 r.p.m. durante 6 minutos, y radioactividad unida cuantificado mediante un Packard TopCount NXT después de un retraso de 60 minutos.

40

45

50

[0142] Los resultados se dan como IC₅₀ en relación en % a la insulina humana.

55

Ensayo (III)

[0143] La potencia de los derivados insulínicos monocatenarios de la invención en relación a insulina humana.

[0144] Se usaron ratas Wistar para examinar la eficacia inferior de glucosa en sangre de SCI af I.V administración de bolo. Tras la administración de bien SCI o insulina humana la concentración de glucosa en sangre es monitoreada

60

Ensayo (IV)

[0145] Determinación en cerdos de T50% de las insulinas monocatenarias de la invención.

65

[0146] T50% es el tiempo que ha desaparecido del sitio de inyección un 50% de una cantidad inyectada del derivativo marcado como A14 Tyr[125I] insulina debe ser evaluada y medido con un contador γ externo.

5 [0147] Los principios de cuidados de animales de laboratorio fueron seguidos. Se usaron cerdas no diabéticas específicamente libres de patógenos LYYD, cruce de Landrace Danés, Yorkshire y Duroc (Homenlund, Haarlov, Dinamarca) para estudios fármacoquinéticos y farmacodinámicos. Los cerdos están conscientes, tienen 4-5 meses de edad y pesan 70-95 kg. Los animales ayunan 18 horas antes del experimento.

10 [0148] Las preparaciones formuladas de derivados de insulina marcados en TirA14 con 125I son inyectadas subcutáneamente en cerdos tal y como se describe anteriormente (Ribel, U., Jørgensen, K, Brange, J, and Henriksen, U. The pig as a model for subcutaneous insulin absorption in man. Serrano-Rios, M and Lefèbvre, P. J. 891-896. 1985. Amsterdam; New York; Oxford, Elsevier Science Publishers. 1985 (Conference Proceeding)).

15 [0149] A principios de los experimentos una dosis de 60 nmol del derivado de insulina según la invención (compuesto de prueba) y una dosis de 60 nmol de insulina (ambos 125I marcados en Tyr A14) se inyectan en dos sitios separados en el cuello de cada cerdo.

20 [0150] La desaparición del marcador radiactivo del sitio de inyección subcutánea es monitoreada usando una modificación del tradicional método de contado de gamma (Ribel, U. Subcutaneous absorption of insulin analogues. Berger, M. and Gries, F. A. 70-77 (1993). Stuttgart; New York, Georg Thime Verlag (Conference Proceeding)). Con este método modificado es posible medir continuamente la desaparición de radioactividad de un depósito subcutáneo durante varios días usando un dispositivo inalámbrico portátil (Scancis Laboratorieteknik, Værløse, DK-3500, Dinamarca). Las mediciones se realizan a intervalos de 1-min, y los valores contados se corrigen para actividad de fondo.

25

Unión del receptor IGF-1

30 [0151] La unión del receptor IGF-1 de la insulina monocatenaria fue determinada usando un análisis SPA (análisis de proximidad de centelleo) en una placa microtituladora con captura de anticuerpos similar al usado para determinar la unión al receptor de insulina de los derivados de insulina de la invención, con la excepción que fue usado el receptor de IGF-1 en lugar del receptor de insulina, IGF humano [125I] en lugar de insulina humana [125I] y un anticuerpo con especificidad para el receptor de IGF-1

35

LISTADO DE SECUENCIAS

[0152]

40 <110> Novo Nordisk A/S Kjeldsen, Thomas

<120> Cadena monocatenaria

45 <130> 6807.204-WO

<160> 135

<170> PatentIn version 3.2

50 <210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

55 <220>

<223> artificial

<400> 1

Gly Gly Gly Pro Gly Lys Arg
1 5

60

<210> 2

<211> 7

ES 2 369 895 T3

<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> artificial

<400> 2

Arg Arg Gly Pro Gly Gly Gly
1 5

10 <210> 3
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> artificial

20 <400> 3

Gly Gly Gly Gly Gly Lys Arg
1 5

25 <210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> artificial

<400> 4

Arg Arg Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

35 <210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> artificial

45 <400> 5

Gly Gly Ala Pro Gly Asp Val Lys Arg
1 5

50 <210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

ES 2 369 895 T3

<223> artificial

<400> 6

Arg Arg Ala Pro Gly Asp Val Gly Gly
1 5

5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> artificial

15 <400> 7

Gly Gly Tyr Pro Gly Asp Val Lys Arg
1 5

20 <210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> artificial

<400> 8

Arg Arg Tyr Pro Gly Asp Val Gly Gly
1 5

30

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223> artificial

<400> 9

40

Gly Gly His Pro Gly Asp Val Lys Arg
1 5

45 <210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

50 <220>

<223> artificial

<400> 10

ES 2 369 895 T3

Arg Arg His Pro Gly Asp Val Gly Gly
1 5

5 <210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> artificial
<400> 11

Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg
1 5 10

15 <210> 12
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> artificial
<400> 12

Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr
1 5 10

25 <210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> artificial
<400> 13

Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln
1 5 10

35 <210> 14
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> artificial
<400> 14

Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Thr
1 5 10

ES 2 369 895 T3

5 <210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> artificial

10 <400> 15

Ala Gly Arg Gly Ser Gly Lys
1 5

15 <210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> artificial

<400> 16

Val Gly Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

25 <210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> artificial

<400> 17

35

Val Gly Ser Ser Arg Gly Lys
1 5

40 <210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> artificial

<400> 18

Ala Gly Arg Gly Ser Gly Pro
1 5

50 <210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

ES 2 369 895 T3

<220>
<223> artificial

5 <400> 19

Thr Gly Leu Gly Lys Gly Gln
1 5

10 <210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> artificial

<400> 20

Thr Gly Leu Gly Lys Gly Arg
1 5

20 <210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> artificial

<400> 21

30

Thr Gly Leu Gly Ser Gly Lys
1 5

<210> 22

35 <211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

40

<220>
<223> artificial

<400> 22

45

Thr Gly Leu Gly Ser Gly Gln
1 5

50 <210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

55 <220>
<223> artificial

<400> 23

Thr Gly Leu Gly Arg Gly Lys
1 5

5 <210> 24
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> artificial

<400> 24

Ala Gly Leu Gly Ser Gly Lys
1 5

15 <210> 25
<211> 7
<212> PRT
20 <213> Artificial

<220>
<223> artificial

25 <400> 25

Ala Gly Met Gly Ser Gly Pro
1 5

30 <210> 26
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> artificial

<400> 26

Val Ala Gly Met Gly Ser Gly Pro
1 5

40 <210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> artificial

<400> 27

50 Val Gly Leu Ser Ser Gly Gln
1 5

ES 2 369 895 T3

5 <210> 28
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> artificial
10 <400> 28

Val Gly Leu Tyr Ser Gly Lys
1 5

15 <210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> artificial
20 <400> 29

Val Gly Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Lys
1 5 10

25 <210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> artificial
<400> 30

35 Val Gly Leu Ser Ser Gly Lys
1 5

40 <210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> artificial
45 <400> 31

Val Gly Arg Ser Ser Gly Lys
1 5

50 <210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

ES 2 369 895 T3

<220>
<223> artificial

<400> 32

5

Ala Gly Arg Gly Lys
1 5

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> artificial

15

<400> 33

Ala Gly Leu Gly Ser Gly Lys

1 5

20

<210> 34
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

25

<220>
<223> artificial

30

<400> 34

Arg Ser Phe Asp Gly Lys
1 5

<210> 35
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

35

<220>
<223> artificial

40

<400> 35

Thr Val Gly Ser Ser Arg Gly Lys
1 5

45

<210> 36
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

50

<220>

ES 2 369 895 T3

<223> artificial

<400> 36

Thr Gly Ser Ser Arg Gly Lys
1 5

5

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> artificial

15

<400> 37

Ala Gly Leu Gly Asp Gly Lys
1 5

20

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> artificial

<400> 38

Ala Gly Leu Gly Val Gly Lys
1 5

30

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223> artificial

<400> 39

40

Ala Gly leu Gly Met Gly Lys
1 5

45

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

50

<220>

<223> artificial

<400> 40

ES 2 369 895 T3

Ala Gly Leu Gly Tyr Gly Lys
1 5

5 <210> 41
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> artificial
<400> 41

Ala Gly Leu Gly Gln Gly Lys
1 5

15 <210> 42
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> artificial
<400> 42

Ala Gly Leu Gly Gly Gly Lys
1 5

25 <210> 43
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> artificial
<400> 43

Ala Gly Leu Gly Arg Gly Lys
1 5

40 <210> 44
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> artificial
<400> 44

Ala Gly Leu Gly Ser Gly Gln
1 5

50 <210> 45
<211> 7

<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> artificial

<400> 45

Ala Gly Met Gly Ser Gly Lys
1 5

10 <210> 46
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> artificial

20 <400> 46

Ala Gly Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

25 <210> 47
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> artificial

<400> 47

Trp Ala Ser Gly Ser Gly Lys
1 5

35 <210> 48
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> artificial

<400> 48

Ala Ser Trp Gly Ser Gly Lys
1 5

45 <210> 49
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<223> artificial

ES 2 369 895 T3

<400> 49

Ala Trp Ser Gly Ser Gly Lys
1 5

5 <210> 50
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> artificial

<400> 50

His Gly Leu Tyr Ser Gly Lys
1 5

15 <210> 51
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> artificial

25 <400> 51

Lys Gly Leu Gly Ser Gly Gln
1 5

30 <210> 52
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> artificial

<400> 52

Gly Arg Gly Ser Gly Lys
1 5

40 <210> 53
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> artificial

<400> 53

50

Val Gly Leu Ser Ser Gly Asp
1 5

ES 2 369 895 T3

5 <210> 54
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> artificial

10 <400> 54

Val Gly Leu Ser Ser Gly Gln
1 5

15 <210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> artificial

<400> 55

Val Gly Leu Arg Ser Gly Lys
1 5

25 <210> 56
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> artificial

<400> 56

Val Gly Leu Met Ser Gly Lys
1 5

35

40 <210> 57
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> artificial

45 <400> 57

Gly Ser Gly Lys
1

50 <210> 58
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

ES 2 369 895 T3

<223> artificial

<400> 58

Val Gly Leu Gly Pro Gly Ala Gly Lys
1 5

5

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> artificial

15

<400> 59

Val Gly Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly
1 5 10

20

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> artificial

<400> 60

Val Gly Leu Gly Gly Pro Gly Ala Gly Lys
1 5 10

30

<210> 61

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223> artificial

<400> 61

40

Val Gly Leu Gly Lys Gly Pro Gly Ala Gly Lys
1 5 10

45

<210> 62

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

50 <223> artificial

<400> 62

His Gly Arg Gly Ser Gly Lys
1 5

5 <210> 63
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> artificial

<400> 63

Lys Gly Leu Ser Ser Gly Gln
1 5

15 <210> 64
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> artificial

<400> 64

Val Lys Leu Ser Ser Gly Gln
1 5

25 <210> 65
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> artificial

35 <400> 65

Val Gly Met Ser Ser Gly Lys
1 5

40 <210> 66
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> artificial

<400> 66

Thr Gly Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

50

ES 2 369 895 T3

5 <210> 67
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> artificial

10 <400> 67

Thr Val Gly Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

15 <210> 68
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> artificial

<400> 68

Leu Gly Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

25 <210> 69
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> artificial

<400> 69

Arg Gly Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

35

<210> 70
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> artificial

45 <400> 70

Gln Gly Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

50 <210> 71
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

ES 2 369 895 T3

<223> artificial

<400> 71

5

Gly Gly Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 72

<211> 7

<212> PRT

10

<213> Artificial

<220>

<223> artificial

15

<400> 72

Ser Gly Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 73

20

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25

<223> artificial

<400> 73

Val Asp Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

30

<210> 74

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223> artificial

<400> 74

40

Val Pro Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 75

45

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

50

<223> artificial

<400> 75

ES 2 369 895 T3

Val Glu Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

5 <210> 76
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> artificial
<400> 76

Val Trp Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

15 <210> 77
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> artificial
<400> 77

Val Thr Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

25
30 <210> 78
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> artificial
<400> 78

Val Ala Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

40 <210> 79
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> artificial
<400> 79

Val Ser Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

50 <210> 80

<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> artificial

<400> 80

Val Arg Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

10

15 <210> 81
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> artificial

20 <400> 81

Gln Val Gly Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

25 <210> 82
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> artificial

<400> 82

Glu Val Gly Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

35 <210> 83
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> artificial

45 <400> 83

Ser Val Gly Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

50 <210> 84
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> artificial

ES 2 369 895 T3

<400> 84

Leu Val Gly Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

5

<210> 85
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> artificial

15

<400> 85

Pro Val Gly Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

20

<210> 86
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

25

<220>
<223> artificial

<400> 86

Val Val Gly Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

30

<210> 87
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

35

<220>
<223> artificial

<400> 87

Gly Val Gly Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

40

<210> 88
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

45

<220>
<223> artificial

50

<400> 88

Val Gly Ser Ser Gly Lys
1 5

5 <210> 89
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> artificial
<400> 89

Val Gly Ser Ser Ser Ala Lys
1 5

15 <210> 90
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> artificial
<400> 90

Val Gly His Ser Arg Gly Lys
1 5

25
30 <210> 91
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> artificial
35 <400> 91

His Gly Ser Ser Arg Gly Lys
1 5

40 <210> 92
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> artificial
<400> 92

Val Gly Ser Ala Ser Gly Lys

1 5

ES 2 369 895 T3

5
<210> 93
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> artificial

<400> 93

10
Val Gly Ser Asn Ser Gly Lys
1 5

<210> 94
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

15
<220>
<223> artificial

<400> 94

20
Val Gly Ser Arg Ser Gly Lys
1 5

<210> 95
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

25
<220>
<223> artificial

<400> 95

30
Val Gly Ser His Arg Gly Lys
1 5

<210> 96
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

35
<220>
<223> artificial

<400> 96

40
Val Gly Ser Gly Ser Gly Lys
1 5

<210> 97
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

45
<220>
<223> artificial

<400> 97

50
Val Gly Ser Tyr Ser Gly Lys
1 5

ES 2 369 895 T3

5
<210> 98
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> artificial

<400> 98

Val Gly Ser Met Ser Gly Lys
1 5

10
<210> 99
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

15
<220>
<223> artificial

<400> 99

Val Gly Pro Ser Ser Gly Lys
1 5

20
<210> 100
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

25
<220>
<223> artificial

<400> 100

Val Gly Thr Ser Ser Gly Lys
1 5

30
<210> 101
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

35
<220>
<223> artificial

<400> 101

Val Gly Gln Ser Ser Gly Lys
1 5

40
<210> 102
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

45
<220>
<223> artificial

<400> 102

Val Gly Tyr Ser Ser Gly Lys
1 5

50
<210> 103

ES 2 369 895 T3

<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> artificial

<400> 103

Val Gly Lys Ser Ser Gly Lys
1 5

10 <210> 104
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> artificial

<400> 104

Val Gly Gly Ser Ser Gly Lys
1 5

20 <210> 105
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> artificial

<400> 105

Val Gly Arg Ser Ser Gly Lys
1 5

30 <210> 106
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> artificial

<400> 106

Val Gly Met Ser Ser Gly Lys
1 5

40 <210> 107
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> artificial

<400> 107

Val Gly Val Ser Ser Gly Lys
1 5

<220>
 <221> misc feature
 <222> (3)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 5
 <220>
 <221> aminoácido variable
 <222> (4)..(4)
 <223> X puede ser cualquier residuo de aminoácido codificable
 10
 <220>
 <221> aminoácido variable
 <222> (5)..(5)
 <223> X puede ser cualquier residuo de aminoácido codificable
 15
 <400> 112

 Thr Arg Xaa Xaa Xaa Gly Arg
 1 5

 <210> 113
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> artificial
 25
 <400> 113

 Leu Gly Ser Ser Gly Lys
 1 5

 <210> 114
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> artificial
 35
 <400> 114

 Arg Gly Ser Ser Gly Lys
 1 5

 <210> 115
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> artificial
 45
 <400> 115

 Gln Gly Ser Ser Gly Lys
 1 5

 <210> 116
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50
 <220>

<223> artificial

<400> 116

Gly Gly Ser Ser Gly Lys
1 5

5 <210> 117
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> artificial

<400> 117

Ser Gly Ser Ser Gly Lys
1 5

15 <210> 118
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> artificial

<400> 118

Val Gly Ser Ser Asn Gly Lys
1 5

25 <210> 119
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> artificial

<400> 119

Val Gly Ser Ser Ala Gly Lys
1 5

35 <210> 120
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> articial

<400> 120

Arg Gly Ser Ser Ser Gly Lys

45 1 5

<210> 121
<211> 11
<212> PRT

<213> Artificial
 <220>
 <223> artificial
 5
 <400> 121
 Val Gly Leu Gly Gly Gly Pro Gly Lys Gly Arg
 1 5 10
 <210> 122
 <211> 7
 10 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> artificial
 15
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> X puede ser K, R, P, H, F, T, I, Q, W, A
 20
 <400> 122
 Val Gly Ser Ser Ser Gly Xaa
 1 5
 <210> 123
 <211> 7
 25 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> artificial
 30
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> G y A
 35
 <400> 123
 Val Gly Ser Ser Ser Xaa Lys
 1 5
 <210> 124
 <211> 7
 40 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> artificial
 45
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> X puede ser S, R, A, T, K, P, N, M, H, Q, V, G
 50
 <400> 124
 Val Gly Ser Ser Xaa Gly Lys
 1 5
 <210> 125
 <211> 7

ES 2 369 895 T3

<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> artificial

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
10 <223> R, A, Y, M, S, N, H, G

<400> 125

Val Gly Ser Xaa Ser Gly Lys
1 5

<210> 126
15 <211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
20 <223> artificial

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
25 <223> X puede ser L,Y,M,H,R,T,Q,K,V,S,A,G,P

<400> 126

Val Gly Xaa Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 127
30 <211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
35 <223> artificial

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
40 <223> X puede ser W, G, S, A, H, R, T, P

<400> 127

Val Xaa Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

<210> 128
45 <211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
50 <223> artificial

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
55 <223> X puede ser L, R, T, A, H, V, Q, G, S

<400> 128

ES 2 369 895 T3

Xaa Gly Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

- 5 <210> 129
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> artificial
- 10 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X puede ser L, R, T, A, H, Q, G, S, V.
- 15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X puede ser W, G, S, A, H, R, y T
- 20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X puede ser L, Y, M, H, R, T, Q, K, V, S, A, G y P
- 25 <220>
<221> MTSC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X puede ser R, A, Y, M, S, N, H, y G
- 30 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X puede ser S, R, A, T, K P, NM, H, Q, V, y G
- 35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X puede ser G y A
- 40 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X puede ser K, R, P, H, F, T, I, Q, W, y A
- 45 <400> 129

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

- 50 <210> 130
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> artificial
- 55 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
- 60 <220>
<221> misc feature

<222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

 <220>
 5 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)

 <220>
 10 <221> misc feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

 <220>
 15 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)

 <220>
 20 <221> misc feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

 <220>
 25 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)

 <220>
 30 <221> misc feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

 <400> 130

Xaa Gly Xaa Gly Xaa Gly Xaa
1 5

 <210> 131
 35 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 40 <223> artificial

 <400> 131

Gly Ser Gly Lys
1

 <210> 132
 45 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 50 <223> artificial

 <400> 132

Ser Ser Ser Gly Lys
1 5

 <210> 133
 55 <211> 57
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 369 895 T3

<220>
<223> artificial

5 <400>133

Phe Val Gln Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

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

Gly Lys Gly Gln Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser
35 40 45

Leu Tyr Gln Leu Glu Gln Tyr Cys Gly
50 55

<210> 134

10 <211> 56
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> artificial

15 <400>134

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

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

Gly Lys Gln Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu
35 40 45

Tyr Gln Leu Glu Gln Tyr Cys Asn
50 55

20 <210> 135
<211> 57
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> artificial

<400> 135

ES 2 369 895 T3

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15

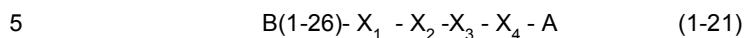
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Ala Thr Gly Leu
 20 25 30

Gly Lys Gly Gln Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser
 35 40 45

Leu Tyr Gln Leu Glu Gln Tyr Cys Asn
 50 55

REIVINDICACIONES

1. Insulina monocatenaria para el tratamiento de la diabetes de tipo 1 y la diabetes de tipo 2 con la fórmula



donde X_1 es Thr, Lys o Arg, X_2 es Pro, Lys o Asp, X_3 es Lys, Pro o Glu, X_4 es una secuencia de péptidos con la siguiente de fórmula $X_a-X_b-X_c-X_d-X_e-X_f-X_g$ (SEC ID NO:129) donde

10 X_a es seleccionado del grupo que consiste en L, R, T, A, H, Q, G, S y V;
 X_b es seleccionado del grupo que consiste en W, G, S, A, H, R, y T;
 X_c es seleccionado del grupo que consiste en L, Y, M, H, R, T, Q, K, V, S, A, G y P;
 X_d es seleccionado del grupo que consiste en R, A, Y, M, S, N, H, y G;
 15 X_e es seleccionado del grupo que consiste en S, R, A, T, K, P, N, M, H, Q, V, y G;
 X_f es seleccionado del grupo que consiste en G y A; y
 X_g es seleccionado del grupo que consiste en K, R, P, H, F, T, I, Q, W, y A,
 B(1-26) es una cadena de péptidos que consiste en los primeros 26 residuos de aminoácidos de la cadena B de insulina humana contadas desde el extremo N-terminal de la cadena B o un análogo de la cadena B con una adición o una eliminación de uno de los residuos de aminoácidos en la cadena B o derivado de la cadena B modificada químicamente introduciendo un grupo en la cadena lateral en una o más posiciones de la cadena B o por oxidación o reducción de las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos en la cadena B, y A(1-21) es la cadena A de insulina natural o un análogo de la misma con una adición o una eliminación de uno de los residuos de aminoácidos en la cadena A o derivado de la cadena A modificada químicamente introduciendo un grupo en la cadena lateral en una o más posiciones de la cadena A o por oxidación o reducción de las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos en la cadena A, donde X_4 no contiene dos residuos de aminoácidos básicos adyacentes y donde la insulina monocatenaria tiene una afinidad por el receptor de insulina humana de al menos aproximadamente un 20% de la de la insulina humana si la molécula de insulina monocatenaria no está modificada químicamente por acilación.

2. Insulina monocatenaria según la reivindicación 1, donde

30 X_a es seleccionado del grupo que consiste en L, R, T, A, H y V;
 X_b es seleccionado del grupo que consiste en W, G, S, A, H, R, y T;
 X_c es seleccionado del grupo que consiste en L, Y, M, H, R, T, Q, K, V, S, A, G y P;
 35 X_d es seleccionado del grupo que consiste en R, A, Y, M, S, N, H, y G;
 X_e es seleccionado del grupo que consiste en S, R, A, T, K, P, y N;
 X_f es G; y
 X_g es seleccionado del grupo que consiste en K, R, Q, y P;

3. Insulina monocatenaria según la reivindicación 1, donde

40 X_a es seleccionado del grupo que consiste en T, A, V;
 X_b es G;
 X_c es seleccionado del grupo que consiste en L, Y, M, H, R, K;
 X_d es G;
 45 X_e es seleccionado del grupo que consiste en S, K;
 X_f es G, y
 X_g es seleccionado del grupo que consiste en K, R, Q.

4. Insulina monocatenaria según la reivindicación 1, donde X_4 tiene la secuencia seleccionada del grupo que consiste en AGRGSGK (SEC ID NO:15); AGLGSGK (SEC ID NO:33); AGMGSGK (SEC ID NO:45); ASWGSGK (SEC ID NO:48); TGLGSGQ (SEC ID NO:22); TGLGRGK (SEC ID NO:23); TGLGSGK (SEC ID NO:21); HGLYSGK (SEC ID NO:50); KGLGSGQ (SEC ID NO:51); VGLMSGK (SEC ID NO:56); VGLSSGQ (SEC ID NO:27); VGLYSGK (SEC ID NO:28); VGLSSGK (SEC ID NO:30); VGMSSGK (SEC ID NO:65); VWSSSGK (SEC ID NO:76), VGSSSGK (SEC ID NO:16) y VGMSSGK (SEC ID NO:106)

5. Preparación farmacéutica que comprende una cantidad biológicamente activa de una insulina monocatenaria según cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

6. Uso de insulina monocatenaria según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para la preparación de una preparación farmacéutica para el tratamiento de la diabetes.

Figura 1
Glucosa en sangre en ratas Wistar normales
HI: 6 nmol/kg IV
SCI: nmol/kg IV

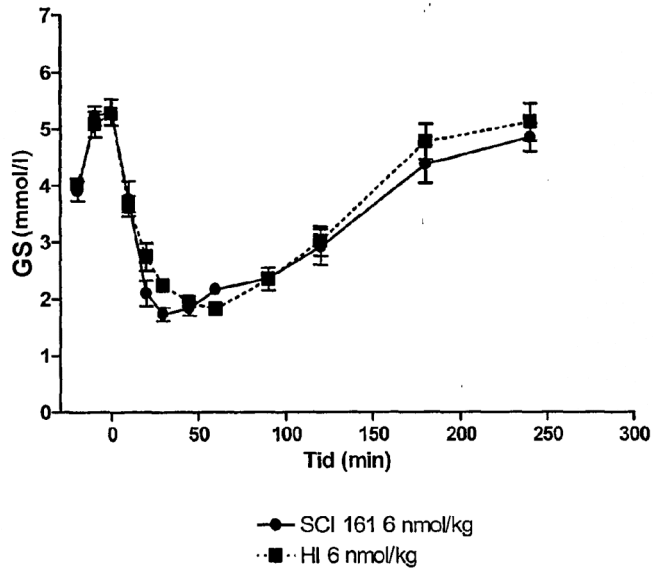
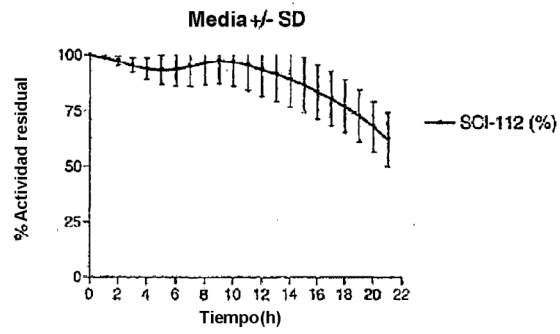


Figura 2
Desaparición de SCI-112 después de la administración S.C. en cerdo AnP



N= 6 cerdos

NNC 0100-0000	conc	Zn/ác x	isotonic	Phe/Cr e	albumi n	fosfato	inj.vo l
SCI-112	600 µM	3	Clitonal 1.6%	16 mM	0	0 pH 5.0	100 µL

Figura 3
Desaparición de SCI después de la administración S.C. en cerdo
Media +/- SEM

