

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 464 282**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2007** **E 07820604 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2014** **EP 2069502**

54 Título: **Método para preparar polipéptidos de insulina madura**

30 Prioridad:

27.09.2006 EP 06121346

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

02.06.2014

73 Titular/es:

**NOVO NORDISK A/S (100.0%)
Novo Allé
2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es:

**NØRGAARD, PER y
SLOTH ANDERSEN, ASSER**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 464 282 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para preparar polipéptidos de insulina madura

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se refiere a un procedimiento para hacer insulina madura o análogos de insulina en la levadura.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

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

[0003] Después del desarrollo de ADN recombinante numerosos métodos de tecnología han sido descritos para producir insulina y precursores de los mismos en células huésped genéticamente modificadas. Como *E.coli* no tiene la maquinaria celular para el pliegue del polipéptido expresado y establecen el puente de disulfuro que conecta la cadena A y B en la insulina madura esta estrategia incluye unos pasos de procesamiento in vitro tal como establecimiento in vitro de los puentes de disulfuro durante el plegado y la posterior escisión del péptido C.

[0004] A diferencia de *E.coli* eucariotas contienen la maquinaria necesaria para el pliegue y el establecimiento de los puentes de disulfuro y así parecerán ser buenos candidatos para la producción de insulina madura en organismos genéticamente modificados. Numerosos procesos de levadura han sido desarrollados para producir insulina. En la mayor parte de estos procesos un precursor de insulina con el péptido natural C o con un péptido C modificado se expresan y se secretan de la célula de levadura. WO 9535384 describe tales métodos. Las moléculas precursoras pueden comprender una extensión de N-terminal de la cadena B de insulina. El péptido C modificado y la posible extensión del N-terminal del péptido B son diseñados para no ser escindidos en la célula de levadura y así los precursores se segregan como péptidos monocatenarios donde las cadenas A y B se conectan todavía por el péptido C modificado pero con puentes de disulfuro correctamente situados. La insulina madura o el producto análogo de insulina es luego obtenido en un número de pasos enzimáticos posteriores in vitro por escisión del péptido C y posiblemente la extensión del N-terminal. Estos pasos enzimáticos son de larga duración, frecuentemente costosos e introducen impurezas adicionales que posteriormente se deben quitar en otros pasos de proceso secuencia abajo como pasos de cromatografía costosa y similares.

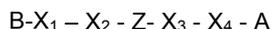
[0005] Thim et al, Proc Natl. Acad. Sci. USA, volume 83,6766-6770 y Thim et al, en FEBS Letters, volume 212, number 2,307-312 revelan expresión de la proinsulina humana y varios precursores de insulina con ciertos péptidos C modificados. WO 97/03089 divulga la expresión de precursores de insulina con la fórmula BZA donde B y A son las cadenas de péptido A y B de insulina humana que están enlazadas por al menos un enlace de disulfuro y Z es un polipéptido que comprende al menos un sitio de escisión proteolítica. US 6337194 describe la expresión en la levadura de un precursor de insulina humana que comprende una cadena B, un primer sitio de escisión Kex2, un epítipo 9E10, un segundo sitio de escisión Kex2 y una cadena A. No obstante, los precursores de insulina descritos sólo dan lugar a cantidades mínimas de insulina madura secretada en el medio de cultivo.

[0006] Un proceso para hacer la insulina madura en las células de animal genéticamente modificadas que no son naturalmente capaces de formar gránulos secretores está descrito en la Patente EE.UU. nº 6,348,327.

[0007] El propósito de la presente invención es desarrollar una cepa fúngica capaz de producir insulina madura completamente procesada o análogos de insulina en altos rendimientos de modo que son evitados pasos de proceso de purificación finales costosos y de larga duración.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0008] En un aspecto la presente invención se refiere a un método para hacer insulina humana madura o un derivado análogo por cultivo de una célula fúngica que comprende una secuencia de ADN que codifica un precursor para la insulina humana o un análogo de insulina humana con la secuencia



65 donde B es la cadena B de insulina humana o un derivado análogo, A es la cadena A de insulina humana o un derivado análogo, X₁ es una secuencia peptídica de 2 residuos de aminoácidos que pueden ser iguales o diferentes y que son

seleccionadas del grupo que consiste en Phe, Leu, Ile, Val y Ala, y que facilitarán una escisión de Kex2 más eficaz en la célula fúngica, X₂ es un sitio de escisión Kex2, Z es una secuencia peptídica con de 1 a aproximadamente 35 residuos de aminoácidos o un enlace peptídico, X₃ es un sitio de escisión Kex2 y X₄ es un enlace peptídico.

5 [0009] En un segundo aspecto la presente invención se refiere a un precursor para la insulina humana o un análogo de insulina humana con la secuencia

B- X₁ - X₂- Z- X₃ - X₄ - A

10 donde B es la cadena B de insulina humana o un derivado análogo, A es la cadena A de insulina humana o un derivado análogo, X₁ es una secuencia peptídica de 2 residuos de aminoácidos que pueden ser los mismos o diferentes y que son seleccionados del grupo consistiendo en Phe, Leu, Ile, Val y Ala, y que facilitarán una escisión de Kex2 más eficaz en la célula fúngica, X₂ es un sitio de escisión Kex2, Z es una secuencia peptídica con 1 a 35 residuos de aminoácidos o un enlace peptídico, X₃ es un sitio de escisión Kex2 y X₄ es un enlace peptídico.

15 [0010] En un tercer aspecto la presente invención se refiere a una secuencia de ADN que codifica el precursor para la insulina humana o un análogo de insulina humana con la secuencia

B- X₁ X₂ - Z- X₃ - X₄ - A

20 donde B es la cadena B de insulina humana o un derivado análogo, A es la cadena A de insulina humana o un derivado análogo, X₁ es una secuencia peptídica de 2 residuos de aminoácidos que pueden ser los mismos o diferentes y que son seleccionados del grupo consistiendo en Phe, Leu, Ile, Val y Ala, y que facilitarán una escisión de Kex2 más eficaz en la célula fúngica, X₂ es un sitio de escisión Kex2, Z es una secuencia peptídica con 1 a 35 residuos de aminoácidos o un enlace peptídico, X₃ es un sitio de escisión Kex2 y X₄ es un enlace peptídico.

[0011] En otra forma de realización del residuo de aminoácido el terminal-N de X₁ es Leu. En una forma de realización X₁ la cadena B se escinde mediante una carboxipeptidasa dando insulina humana madura o un derivado análogo. En una forma de realización la escisión de X₁ de la cadena B es mediante una actividad de carboxipeptidasa bien en la célula fúngica o en el medio de cultivo.

30 Así una forma de realización de la invención es un método para hacer insulina humana madura o un derivado análogo por 1) cultivo de una célula fúngica que comprende una secuencia de ADN que codifica un precursor para insulina humana o un análogo de insulina humana con la secuencia

35 B- X₁ - X₂ - Z- X₃ - X₄ - A

donde B es la cadena B de insulina humana o un derivado análogo, A es la cadena A de insulina humana o un derivado análogo, X₁ es una secuencia peptídica de 2 residuos de aminoácidos que pueden ser los mismos o diferentes y que son seleccionados del grupo que consiste en Phe, Leu, Ile, Val y Ala, y que facilitarán una escisión de Kex2 más eficaz en la célula fúngica, X₂ es un sitio de escisión Kex2, Z es una secuencia peptídica con de 1 a aproximadamente 35 residuos de aminoácidos o un enlace peptídico, X₃ es un sitio de escisión Kex2 y X₄ es un enlace peptídico, 2) escisión de X₁ de la cadena B bien añadiendo una carboxipeptidasa al medio de cultivo o por medios de una carboxipeptidasa endógena y 3) aislando el producto de insulina madura del medio de cultivo.

45 [0012] La enzima carboxipeptidasa puede ser cualquier enzima carboxipeptidasa capaz de eliminar de forma eficaz la extensión del terminal-C de la cadena B. Una enzima bien adecuada es la enzima de carboxipeptidasa Y (CPY).

[0013] Si la CPY es una CPY endógena la codificación de gen endógeno CPY está sobre expresada y se secreta al medio de cultivo.

50 [0014] En una forma de realización el péptido C comprende dos sitios de escisión Kex2 enlazados por al menos un residuo de aminoácido.

[0015] En otra forma de realización los dos sitios Kex2 se enlazan por una cadena peptídica con de 1 a aproximadamente 35 residuos de aminoácidos.

[0016] En otra forma de realización los sitios Kex2 se enlazan por una cadena peptídica con de 1 a 10 residuos de aminoácidos.

60 [0017] En otra forma de realización los sitios Kex2 se enlazan por una cadena peptídica con de 1 a 5 residuos de aminoácidos.

[0018] En otra forma de realización los sitios Kex2 se enlazan por una cadena peptídica con de 2-10, de 2-8, de 2-7, de 2 a 6, de 2-5 o de 2-4 residuos de aminoácidos.

65

- [0019] En otra forma de realización los sitios Kex2 se enlazan por una cadena peptídica con 3-5 residuos de aminoácidos.
- 5 [0020] En una forma de realización la cadena peptídica que conecta los dos sitios Kex2 tiene la secuencia DLG, DDLG (SEC ID n°: 1) o DDDLG (SEC ID NO:2).
- [0021] En una forma de realización de la invención X₁ es Leu-Ala.
- [0022] En otra forma de realización de la invención X₁ es Phe-Leu.
- 10 [0023] En otra forma de realización de la invención X₁ es Leu-Leu.
- [0024] En otra forma de realización de la invención X₁ es Leu-Ile.
- 15 [0025] Z puede ser del tamaño de 1, 2, 3, 4, 5, 7, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 31, 32, 33, 34 y 35 residuos de aminoácidos.
- [0026] En una forma de realización Z es del tamaño 1-35,1-34,1-33, 1-31,1-30,1-29,1-28,1-27,1-26,1-25,1-24,1-23,1-22,1-21,1-20,1-19,1-18,1-17,1-16,1-15,1-14,1-13,1-12,1-11,1-10,1-9,1-8,1-7,1-6,1-5,1-4,1-3 o 1-2 residuos de aminoácidos.
- 20 [0027] En otra forma de realización Z es del tamaño 2-35, 2-34, 2-33, 2-31, 2-30, 2-29, 2-28, 2-27, 2-26, 2-25, 2-24, 2-23, 2-22, 2-21, 2-20, 2-19, 2-18, 2-17, 2-16, 2-15, 2-14, 2-13, 2-12, 2-11, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4 o 2-3 residuos de aminoácidos.
- 25 [0028] En otra forma de realización Z es del tamaño 3-35,3-34,3-33,3-31,3-30,3-29,3-28,3-27,3-26,3-25,3-24,3-23,3-22,3-21,3-20,3-19,3-18,3-17,3-16,3-15,3-14,3-13,3-12,3-11,3-10,3-9,3-8,3-7,3-6,3-5 o 3-4 residuos de aminoácidos.
- [0029] En otra forma de realización Z es del tamaño 4-35,4-34,4-33,4-31,4-30,4-29,4-28,4-27,4-26,4-25,4-24,4-23,4-22,4-21,4-20,4-19,4-18,4-17,4-16,4-15,4-14,4-13,4-12,4-11,4-10,4-9,4-8,4-7,4-6 y 4-5 residuos de aminoácidos.
- 30 [0030] En otra forma de realización Z es del tamaño 1 a 10 residuos de aminoácidos.
- [0031] En otra forma de realización Z es del tamaño 1 a 5 residuos de aminoácidos.
- 35 [0032] En otra forma de realización Z es del tamaño 2-10,2-8,2-7,2 a 6,2-5 o 2-4 residuos de aminoácidos.
- [0033] En otra forma de realización Z es de los residuos de aminoácidos de tamaño 3-5.
- 40 [0034] En otra forma de realización del residuo de aminoácido en la posición penúltimo al sitio de escisión X₃ es seleccionado del grupo consistiendo en Leu, Ile, Tyr, Arg, Lys, His, Phe, Met, Val y Pro.
- [0035] En una forma de realización del residuo de aminoácido en Z en la penúltima posición al sitio de escisión X₃ es Leu.
- 45 [0036] En una forma de realización del residuo de aminoácido en Z en la penúltima posición al sitio de escisión X₃ es Ile.
- [0037] En una forma de realización del residuo de aminoácido en Z en la penúltima posición al sitio de escisión X₃ es Tyr.
- 50 [0038] En una forma de realización del residuo de aminoácido en Z en la penúltima posición al sitio de escisión X₃ es Arg.
- [0039] En una forma de realización del residuo de aminoácido en Z en la penúltima posición al sitio de escisión X₃ es Lys.
- 55 [0040] En una forma de realización del residuo de aminoácido en Z en la penúltima posición al sitio de escisión X₃ es His.
- [0041] En una forma de realización del residuo de aminoácido en Z en la penúltima posición al sitio de escisión X₃ es Pro.
- 60 [0042] En una forma de realización del residuo de aminoácido en Z en la penúltima posición al sitio de escisión X₃ es Phe.
- 65

ES 2 464 282 T3

- [0043] En una forma de realización del residuo de aminoácido en Z en la penúltima posición al sitio de escisión X_3 es Met.
- 5 [0044] En una forma de realización del residuo de aminoácido en Z en la penúltima posición al sitio de escisión X_3 es Val.
- [0045] Los residuos de aminoácidos restantes en Z pueden ser cualquier residuo de aminoácido codificable, que puede ser el mismo o diferente. No obstante, en una forma de realización del residuo de aminoácido en la penúltima posición al sitio de escisión X_3 no es Asp, Glu, Gly o Ala.
- 10 [0046] En una forma de realización Z tiene la secuencia DLG, DDLG(SEQ ID NO:1) o DDDLG(SEQ ID NO:2).
- [0047] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DLG.
- 15 [0048] En una forma de realización Z tiene la secuencia D- X_5 -DLG (SEC ID NO:4) donde X_5 es seleccionado del grupo que consiste en A, R, N, D, N, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y y V.
- [0049] En otra forma de realización X_5 es seleccionado del grupo que consiste en A, R, N, D, Q, H, I, L, P, S, T y Y.
- 20 [0050] En una forma de realización Z tiene la secuencia DDDLG (SEC ID NO:2).
- [0051] En una forma de realización Z tiene la secuencia DADLG (SEC ID NO:5).
- [0052] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DRDLG(SEQ ID NO:6).
- 25 [0053] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DNDLG(SEQ ID NO:7).
- [0054] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DQDLG(SEQ ID NO:9).
- 30 [0055] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DEDLG(SEQ ID NO:10).
- [0056] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DGDLG(SEQ ID NO:11).
- 35 [0057] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DHDLG(SEQ ID NO:12).
- [0058] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DIDLG(SEQ ID NO:13).
- [0059] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DLDLG(SEQ ID NO:14).
- 40 [0060] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DKDLG(SEQ ID NO:15).
- [0061] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DMDLG(SEQ ID NO:16).
- 45 [0062] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DFDLG(SEQ ID NO:17).
- [0063] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DPDLG(SEQ ID NO:18).
- [0064] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DSDLG(SEQ ID NO:19).
- 50 [0065] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DTDLG(SEQ ID NO:20).
- [0066] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DWDLG(SEQ ID NO:21).
- 55 [0067] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DYDLG(SEQ ID NO:22).
- [0068] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DVDLG(SEQ ID NO:23).
- [0069] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DDX₆ LG(SEQ ID NO:24) donde X_6 es seleccionada del grupo que consiste en A, R, N, D, N, Q, e, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y y V.
- 60 [0070] En otra forma de realización X_6 es seleccionado del grupo que consiste en R, N, D, N, e, H, K y S.
- [0071] En una forma de realización Z tiene la secuencia DDALG(SEQ ID NO:25).
- 65 [0072] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DDRLG(SEQ ID NO:26).

- [0073] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DDNLG(SEQ ID NO:27).
- [0074] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DDQLG(SEQ ID NO:29).
- 5 [0075] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DDELG(SEQ ID NO:30).
- [0076] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DDGLG(SEQ ID NO:31).
- 10 [0077] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DDHLG(SEQ ID NO:32).
- [0078] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DDILG(SEQ ID NO:33).
- [0079] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DDLLG(SEQ ID NO:34).
- 15 [0080] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DDKLG(SEQ ID NO:35).
- [0081] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DDMLG(SEQ ID NO:36).
- 20 [0082] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DDFLG(SEQ ID NO:37).
- [0083] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DDPLG(SEQ ID NO:38).
- [0084] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DDSLG(SEQ ID NO:39).
- 25 [0085] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DDTLG(SEQ ID NO:40).
- [0086] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DDWLG(SEQ ID NO:41).
- 30 [0087] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DDYLG(SEQ ID NO:42).
- [0088] En otra forma de realización Z tiene la secuencia DDVLG(SEQ ID NO:43).
- [0089] La molécula de insulina objetivo puede ser un análogo de insulina que ha sido además modificada en la cadena A y/o B en tanto que tales modificaciones no tienen un efecto adverso en la actividad insulínica de la molécula de insulina objetivo.
- [0090] Por "análogo de insulina" como se usa en este caso se entiende un polipéptido con actividad insulínica que tiene una estructura molecular que formalmente se puede derivar de la estructura de una insulina de origen natural, por ejemplo aquella de la insulina humana, eliminando y/o sustituyendo al menos un residuo de aminoácido que existe en la insulina natural y/o añadiendo al menos un residuo de aminoácido. Los residuos de aminoácidos adicionales y/o sustituidos pueden bien ser residuos de aminoácidos codificables u otros residuos de aminoácidos de origen natural o residuos de aminoácidos puramente sintéticos.
- 40 [0091] Los análogos de insulina típicamente no comprenderán más que aproximadamente 7 mutaciones, más típicamente no más que 5 e incluso más típicamente a lo sumo 3 mutaciones en comparación con insulina humana.
- [0092] Durante estos últimos años un suficiente gran número de modificación de la cadena A y/o B de insulina se ha descrito. Así la posición 28 de la cadena B se puede modificar del residuo natural Pro a Asp, Lys, o Ile y Lys en la posición B29 también se puede modificar a Pro.
- 50 [0093] También, Asn en la posición A21 se puede modificar a Ala, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, en particular a Gly, Ala, Ser, o Thr y en particular a Gly. Además, Asn en la posición B3 se puede modificar a Lys o Asp. Otros ejemplos de análogos de insulina son des(B30) insulina humana, análogos de insulina donde uno o ambos de B1 y B2 han sido eliminados; análogos de insulina donde la cadena A y/o la cadena B tienen una extensión de N-terminal y análogos de insulina donde la cadena A y/o la cadena B tienen una extensión de C-terminal. También, el residuo de aminoácido natural en la posición A18 se puede cambiar a un residuo Gln o uno o varios del residuo de aminoácido en posiciones B26-B30 o posiciones B27-30 han sido eliminados.
- 55 [0094] Ejemplos de análogos de insulina que se pueden producir por el presente método son Gly^{A21} insulina humana, Gly^{A21} des(B30) insulina humana, desB1 insulina humana, des B30 insulina humana, Asp^{B28} insulina humana y Lys^{B28} Pro^{B29} insulina humana.
- 60 [0095] Otros ejemplos de análogos de insulina son análogos de insulina humana que contienen mutaciones en una o varias de las posiciones A21, B10, A8, A14, B25, B27 y B1.
- 65

[0096] La molécula de insulina objetivo puede también ser una molécula de insulina donde la extensión de C-terminal de la cadena B no se escinde en el paso de escisión posterior.

5 [0097] Tales análogos de insulina tendrán la estructura B- X₁.....A, donde B, A y X₁ tienen los significados anteriores y donde la cadena A y B se conectan por dos puentes de disulfuro como en la insulina humana.

10 [0098] La célula fúngica puede por cualquier célula fúngica como todos hongos tener la actividad proteolítica necesaria para disociar moléculas precursoras de insulina del presente tipo para disociar el péptido de conexión y liberan una molécula de cadena doble. No obstante, durante estos últimos años la levadura ha demostrado ser un tipo de célula eficaz para expresar y secretar péptidos pequeños del tamaño de la insulina. En particular la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha demostrado ser útil.

15 [0099] Así en una forma de realización de la invención la célula fúngica es una célula de levadura y en otra forma de realización la célula de levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.

[0100] En otro aspecto la presente invención se refiere a análogos de insulina con una extensión de C-terminal de la cadena B de insulina humana. Esta extensión tendrá de 1-5 residuos de aminoácidos típicamente seleccionados del grupo que consiste en Phe, Leu, Ile, Tyr, Trp, Val, Met, Asp, Gly y Ala.

20 [0101] Ejemplos no limitativos de análogos de insulina con una extensión de C-terminal son B31Leu, B32Ala insulina humana; B31Leu, B32Ala, desB30 insulina humana, B31Phe, B32Leu insulina humana y B31Phe, B32Leu, desB30 insulina humana.

25 [0102] Los análogos de insulina humana según la presente invención se pueden utilizar en el tratamiento de estados que son sensibles a insulina. Así, se pueden usar en el tratamiento de diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 e hiperglicemia por ejemplo como a veces se ha visto en personas seriamente perjudicadas y personas que han sido sometidas a cirugía mayor.

30 [0103] En otro aspecto la presente invención se refiere a formulaciones farmacéuticas que comprenden los análogos de insulina humana en combinación con adyuvantes y aditivos farmacéuticamente aceptables adecuados tal como uno o varios agentes adecuados para estabilización, conservación o isotonicidad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

35 [0104]

La Figura 1 muestra un ejemplo de un plásmido de levadura llamado ESI42-33. El plásmido contiene un casete de expresión que incluye un fragmento *EcoRI* - *XbaI* insertado en el plásmido entre el promotor de transcripción y el terminador de transcripción del gen TPI de *S. cerevisiae*;

40 La Figura 2 muestra el Fragmento de ADN de *NcoI*-*XbaI* (SEC ID NO:44) codificando el precursor de insulina A14E,B25H,B(1-30)- LARRDLGKR(SEQ ID NO:45)-(A1-21) insulina humana y la secuencia de aminoácidos del precursor de insulina que incluye una secuencia corta secuencia arriba (SEC ID NO:46);

La Figura 3 muestra una secuencia de escisión de un precursor de insulina;

45 La Figura 4 muestra otra secuencia de escisión de un precursor de insulina; y

La Figura 5 muestra la secuencia de escisión de un precursor de insulina según la invención.

50 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0105] La producción de insulina por secreción del producto maduro directamente al caldo de fermentación requiere un procesamiento intracelular de precursores de insulina que comprende una conexión peptídica flanqueada por un sitio de escisión a cada una de los extremos. Tal péptido de enlace puede ser del tipo B-KR(W)_n KR-A donde B es la cadena B de insulina humana, A es la cadena A de insulina humana y W es una cadena peptídica de longitud variable. El procesamiento intracelular se facilita por las proteasas de Golgi Kex1 y Kex2. En este proceso dos problemas significativos han sido encontrados: 1) la capacidad de Kex2 de asimilar el sitio Kex2 enlazado a la cadena B está fuertemente influenciada por los residuos 29 y 30 de la cadena B y 2) el producto secretado por la célula es una mezcla de insulina madura e insulina que carece de la treonina B30. La actividad proteolítica responsable de la eliminación de B30Thr es mas verosímil a Kex1. No obstante, las dos formas de insulina no pueden ser separadas en procesos finales, por lo que es de suma importancia para asegurar una formación de producto más homogéneo.

65 [0106] El péptido-C modificado según la presente invención se diseña para facilitar una escisión eficaz del péptido-C modificado de la cadena A y B de la molécula de insulina para formar una molécula de insulina madura. Un nuevo tipo de péptidos-C han sido desarrollados, que direcciona los problemas anteriormente descritos. Según la invención la cadena B se extiende en su extremo terminal-C con una secuencia peptídica corta unida en su otro extremo a un sitio

Kex2 en el péptido C. La inserción de una secuencia de aminoácidos corta en esta posición permitirá la optimización del N-terminal del sitio Kex2, haciendo lo más eficaz posible la escisión de Kex2. El procesamiento completo por Kex1 y Kex2 produce una molécula de precursor de insulina de dos cadenas con una extensión del extremo C-terminal de la cadena B de la forma B-(X)_n.....A, donde X es la extensión de terminal-C a la cadena B y la cadena A y la B se conectan por los dos puentes de disulfuro.

[0107] Una proteasa de levadura vacuolar, carboxipeptidasa Y (CPY), se ha demostrado que es ineficiente en la eliminación del residuo de aminoácido B30 si este es Thr (el residuo de aminoácido natural en esta posición en la molécula de insulina humana). Además, los residuos de aminoácidos extra terminal-N del sitio Kex2p en el péptido de conexión y terminal-C de residuo de aminoácido de B30 se pueden diseñar para ser óptimos sustratos para CPY en última instancia conduciendo a una formación de producto más homogéneo.

[0108] El paso proteolítico catalizado por CPY puede tener lugar en tres maneras:

1) por adición de CPY directamente al caldo de fermentación para proceso del terminal-C extendido, producto de dos cadenas, B-(X)_n.....A, que se secreta por la célula;

2) Mediante el procesamiento del terminal-C extendido, producto de dos cadenas, B-(X)_n.....A, por una CPY endógena en su paso en la vía secretora o

3) mediante el procesamiento del producto de dos cadenas, B-(X)_n.....A, por CPY bien por sobreexpresión de *PRC1*, el gen que codifica CPY, o por mutaciones que conducen a la localización errónea de CPY a los medios de cultivo.

[0109] En una cepa de levadura de tipo salvaje, CPY se localiza en la vacuola. El transporte del precursor inactivo, proCPY, del Golgi a la vacuola se media por la maquinaria de selección de proteína vacuolar. La sobreexpresión de *PRC1* conduce a la saturación de la selección de proteína vacuolar, por la cual CPY se secreta al exterior (Stevens et al., J. Cell Biol. 102 (1986), 1551-1557). La secreción al medio de cultivo puede también ser conseguida por ciertas mutaciones en genes que codifican proteínas implicadas en la selección de proteína vacuolar (Rotman y Stevens, Cell, 47 (1986), 1041-1051). Por ejemplo, una delección de *VPS1* produce en secreción eficaz de CPY (Nielsen et al, App. Microbiol. Biotech. 33 (1990) 307-312). Además, mutaciones en el propéptido de CPY suponen un fenotipo de secreción (Valls et al., J. Cell Biol. 111 (1990), 361-368).

[0110] El paso proteolítico para eliminación de posibles extensiones del terminal-N de la cadena A se puede catalizar por una aminopeptidasa. Dipeptidil aminopeptidasas catalizan la eliminación secuencial de dipéptidos del término-N de polipéptidos. El paso proteolítico puede, similar al procesamiento de CPY, tener lugar por dipeptidil aminopeptidasas que residen dentro de la célula, secretadas al medio de cultivo, o adicionadas directamente al caldo de fermentación. La levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, alberga dos dipeptidil aminopeptidasas endógenas, la proteína vacuolar Dap2p y la proteína de membrana de integral de Golgi Ste13p (Roberts et al., (1989), J. Cell Biol. 108:1363-1373; Julius et al., (1983), Cell 32:839-852). Ste13p escinde en el lado de carboxilo de las secuencias X-Ala- o X-Pro- (donde X es un aminoácido), y podrían participar en el procesamiento de atravesado de moléculas precursoras de insulina a través de la vía secretora.

[0111] Los diferentes modelos de procesamiento se ilustran esquemáticamente en las figuras 3-5.

[0112] En la figura 3 el constructo precursor de insulina tiene un sitio de Kex2 único, KR, y una extensión de terminal-C de la cadena B se ilustra por la secuencia XX en el péptido de conexión. La primera escisión es una escisión del sitio Kex2 por Kex2 para abrir la estructura monocatenaria a una estructura bicatenaria que tiene la secuencia XXKR unida a la cadena B. A continuación la enzima Kex1 escindiría la secuencia-KR y finalmente la carboxipeptidasa escindiría la extensión XX de la cadena B para dar un producto de insulina bicatenaria madura.

[0113] En la figura 4 se ilustra una alternativa . Aquí el precursor de insulina tiene un sitio de Kex2 único y un sitio de escisión de aminopeptidasa, YY, en el péptido de conexión. Como en la figura 3 Kex2, Kex1 y la carboxipeptidasa eliminarán la secuencia XX-KR. No obstante, aquí una escisión de aminopeptidasa final eliminará la secuencia-YY para dar el producto de insulina madura bicatenaria.

[0114] En la forma de realización de la invención ilustrada en la figura 5 el precursor de insulina tiene dos sitios de escisión Kex2 conectados por una cadena peptídica Z. La primera escisión con Kex2 elimina la secuencia Z-KR, el Kex1 quita la secuencia-KR y finalmente la carboxipeptidasa elimina la secuencia-XX.

[0115] Debe observarse que ambas escisiones Kex2 y Kex1 tienen lugar en la célula fúngica mientras que la escisión con carboxipeptidasa como se explica anteriormente puede tener lugar bien en la célula fúngica o en el medio de cultivo. Además, la carboxipeptidasa puede bien por una enzima endógena o se puede adicionar al medio de cultivo. Lo mismo se aplica a la escisión de aminopeptidasa ilustrada en la figura 4.

[0116] El producto de insulina objetivo del proceso puede bien ser una insulina humana bicatenaria o un análogo de insulina humana bicatenaria que tiene una extensión de terminal-C corta de la cadena-B. Si el producto de insulina

objetivo no tiene extensión de terminal-C de la cadena-B, luego la extensión de terminal-C de la cadena-B debería ser capaz de posteriormente ser cortada de la cadena-B antes de otros pasos de purificación. Dependiendo del residuo de aminoácido en la posición B30 la carboxipeptidasa también puede quitar del residuo de aminoácido B30 dando como resultado un desB30 análogo de insulina.

5

[0117] La eliminación de la extensión de terminal-C de la cadena-B (X_1) tendrá típicamente lugar mediante una actividad de carboxi-peptidasa. El paso proteolítico catalizado por tal actividad de carboxipeptidasa se puede efectuar bien por adición de la enzima apropiada directamente al caldo de fermentación para procesar la extensión de terminal-C de proceso de la cadena-B en la molécula precursora secretada por la célula.

10

[0118] La carboxipeptidasa puede ser cualquier carboxipeptidasa natural adecuada tal como CPY o una variante mutada de la misma.

15

[0119] Alternativamente la extensión se puede procesar por una carboxipeptidasa (endógena o expresada de un plásmido) de la molécula precursora en la célula en su paso la vía secretora.

20

[0120] Así en una forma de realización la extensión de terminal-C de la cadena-B (X_1) se escinde en la célula fúngica y en otra forma de realización se escinde posteriormente en el medio de cultivo dando lugar a la formación de insulina humana madura o un derivado análogo.

25

[0121] El péptido-C según la invención comprende dos sitios de escisión Kex2 con una secuencia peptídica interpuesta entre los dos sitios Kex2. La longitud y la composición de aminoácido de la secuencia peptídica entre los dos sitios Kex2 puede variar siempre que permita el doblamiento del precursor de insulina monocatenario expresado y el establecimiento de los puentes de disulfuro situados correctamente en la molécula precursor.

30

[0122] El tamaño del péptido-C natural es de 35 residuos de aminoácidos. Así en un aspecto de la presente invención la secuencia peptídica entre los dos sitios Kex2 será de aproximadamente de la misma longitud que el péptido-C natural.

[0123] La escisión del sitio Kex2 unido a la cadena-A se puede mejorar si la secuencia peptídica interpuesta entre los dos sitios Kex2 comprende un residuo de aminoácido Leu, Ile, Tyr, Arg, Lys, His, Pro, Phe, Met o Val en la penúltima posición al sitio Kex2 adyacente a la cadena-A. También hemos descubierto que el residuo de aminoácido en la misma posición no debería ser Asp, Glu, Gly o Ala.

35

[0124] La producción de altas cantidades de insulina madura o análogo de insulina de la célula fúngica reducirá significativamente el número de pasos de purificación del proceso final necesarios para producir un producto de insulina de una pureza suficientemente alta para fines farmacéuticos. Así, en el método para producir insulina en la levadura descrito en la patente EE.UU n° 4916212 un precursor de insulina se convierte en la insulina humana en dos pasos es decir una transpeptidación para convertir el precursor de insulina de cadena única B(1-29)-Ala-Ala-Lys-A(1-21) en un éster de insulina humana y luego una hidrólisis del éster de insulina en insulina humana. Cada paso de conversión requerirá un paso de separación inicial y al menos un paso de purificación posterior. Así al menos seis pasos adicionales son necesarios para producir la insulina madura incluyendo al menos una conversión enzimática.

40

[0125] Es bien sabido que ninguna escisión enzimática se lleva a cabo en una escisión de 100% dejando impurezas de no escindidas o impurezas parcialmente escindidas que tienen que ser eliminadas de manera eficaz en el caso de productos farmacéuticos. Así, cada paso de escisión estará seguido por al menos un aislamiento o paso de purificación, típicamente una purificación cromatográfica mediante cromatografía de intercambio, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad, o similar.

45

[0126] El material de la columna cromatográfica para usar en la escala comercial es muy caro y por lo tanto la reducción del número de tales pasos cromatográficos tiene un impacto significativo en la economía de producción. Una reducción de la conversión descendiente y paso de purificación además reducirá la cantidad de trabajo y horas pasadas en el proceso y así mejorar aún más la economía de producción.

50

[0127] En el presente proceso donde la insulina madura o un derivado análogo se puede aislar en altos rendimientos directamente del caldo del cultivo son necesarios muchos menos pasos del proceso de flujo descendiente para producir un producto de pureza suficiente para uso farmacéutico.

55

[0128] La secuencia de ADN que codifica el precursor de insulina puede ser de origen genómico o de origen ADNc, por ejemplo ser obtenido preparando un genómico o una biblioteca genómica ADNc y la detección para secuencias de ADN codificante para todos o parte del polipéptido por hibridación usando sondas de oligonucleótidos sintéticas conforme a técnicas estándar (ver, por ejemplo, Sambrook, J, Fritsch, EF y Maniatis, T, Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1989). La secuencia de ADN que codifica el precursor de insulina también se puede preparar sintéticamente por métodos estándar establecidos, por ejemplo el método de fosfoamidita descrito por Beaucage y Caruthers, Tetrahedron Letters 22 (1981), 1859 -1869, o el método descrito por Matthes et al., EMBO Journal 3 (1984), 801 - 805. La secuencia de ADN puede también ser preparada por reacción en cadena de

60

65

polimerasa usando cebadores específicos, por ejemplo como se describe en US 4,683,202 o Saiki et al., Science 239 (1988), 487 - 491.

[0129] La secuencia de ADN se puede insertar en cualquier vector que se pueda someter a procedimientos de ADN recombinante, y la elección de vector frecuentemente dependerá de la célula huésped en la que se va a introducir. Así, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir un vector que existe como una entidad extracromosómica, la replicación del cual es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica junto con el(los) cromosoma(s) en que ha sido integrado.

[0130] El vector es preferiblemente un vector de expresión donde la secuencia de ADN que codifica el precursor de insulina está operativamente enlazada a segmentos adicionales requeridos para la transcripción del ADN, tal como un promotor. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección y se puede derivar de genes que codifican proteínas bien homólogas o heterólogas a la célula huésped.

[0131] Ejemplos de promotores adecuados para usar en las células huésped de levadura incluyen promotores de genes glicolíticos de levadura (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255 (1980), 12073 - 12080; Alber y Kawasaki, J. Mol. Appl. Gen. 1 (1982), 419 - 434) o genes de alcohol deshidrogenasa (Young et al., en Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals (Hollaender et al, eds.) Plenum Press, Nueva York, 1982), o el TPI1 (US 4,599,311) o promotores ADH2-4c (Russell et al., Nature 304 (1983), 652 - 654).

[0132] La secuencia de ADN que codifica el precursor de insulina puede también, si es necesario, ser operativamente conectado a un terminador adecuado, señales de poliadenilación, secuencias potenciadoras transcripcionales, y secuencias potenciadoras traslacionales. El vector recombinante de la invención puede comprender además una secuencia de ADN que permite al vector replicarse en la célula huésped en cuestión.

[0133] Para dirigir la insulina en la vía secretora de las células huésped, una secuencia señal secretora (también conocida como una secuencia líder, secuencia prepro o secuencia pre) se puede proporcionar en el vector recombinante. La secuencia señal secretora se une a la secuencia de ADN que codifica el precursor de insulina en el marco de lectura correcto. Las secuencias señal secretoras están comúnmente situadas a 5' de la secuencia de ADN que codifica el péptido. El péptido señal puede ser un péptido señal producido de forma natural, o una parte funcional del mismo, o puede ser un péptido sintético.

[0134] Para la secreción eficaz en la levadura, una secuencia que codifica un péptido líder también se puede insertar debajo de la secuencia de señal y encima de la secuencia de ADN que codifica el precursor de insulina.

[0135] La célula huésped de levadura en la que se introduce la secuencia de ADN o el vector recombinante puede ser cualquier célula de levadura que sea capaz de expresar el precursor de insulina e incluye *Saccharomyces spp.* o *Schizosaccharomyces spp.*, en particular cepas de *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces kluyveri*. Otros ejemplos de células de levadura adecuada son las cepas de *Kluyveromyces*, tal como *K. lactis*, *Hansenula*, por ejemplo *H. polymorpha*, o *Pichia*, por ejemplo *P. pastoris* (véase Gleeson et al., J. Gen. Microbiol. 132, 1986, pp. 3459-3465; US 4,882,279).

[0136] Métodos para transformar células de levadura con ADN heterólogo y producir polipéptidos heterólogos son descritos a partir de allí, por ejemplo en US 4,599,311, US 4,931,373, US 4,870,008, 5,037,743, y US 4,845,075. Células transformadas se seleccionan por un fenotipo determinado por una etiqueta seleccionable, resistencia comúnmente farmacológica o la capacidad para crecer en ausencia de un nutriente particular, por ejemplo leucina. Un vector preferido para usar en la levadura es el vector POT1 descrito en US 4,931,373.

[0137] El proceso según la presente invención es denominado proceso de fermentación. La fermentación es preferiblemente realizada en, tanques asépticos agitados con líneas de suministro para la adición de gases comprimidos estériles que consisten en pero no están limitados a aire, oxígeno y amoníaco. Un tanque de fermentación puede contener dispositivos/sensores para el control de pH, temperatura, presión, índice de agitación, nivel de oxígeno disuelto, contenido líquido, nivel de espuma, índices de adición de alimentación y índices de adición de ácido y base. Además, el tanque de fermentación se puede equipar con dispositivos ópticos para el seguimiento de los niveles de control de densidad de célula, concentraciones de metabolitos y productos independientemente de sus forma físico-química. La formación y consumo de compuestos volátiles se monitoriza usando análisis de gases en las entradas de gas y salidas de gas del tanque de fermentación. Todas las señales de variables monitorizadas se pueden usar con propósitos de control que permiten que las variables se mantengan dentro de rangos predefinidos o cambiados continuamente según el perfil predefinido respecto al tiempo. Alternativamente, las variables se controlan en respuesta a señalar cambios de otra variable monitoreada.

[0138] El producto deseado producido durante la fermentación está presente como material extracelular soluble o como material intracelular bien en forma de material soluble o como material insoluble incluyendo material agregado. La

formación de producto es constitutiva o inducida y es dependiente o independiente del crecimiento microbiano. El proceso de fermentación se realiza en tanques con un volumen de trabajo que varía de 100 mL a 200 000 L. Un proceso de fermentación puede ser operado como un proceso por lotes, un proceso lote alimentado, un proceso lote alimentado repetido o un proceso continuo.

5

[0139] El medio usado para cultivo de las células en el proceso de fermentación puede ser cualquier medio convencional adecuado para el crecimiento de las células huésped, tales como medios mínimos o complejos que contienen suplementos apropiados. Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según recetas publicadas (*p. ej.* en catálogos de American Type Culture Collection). Así el medio contendrá al menos una fuente de carbono, una o más fuentes de nitrógeno, sales esenciales incluyendo sales de potasio, sodio, magnesio, fosfato, nitrato y sulfato, metales residuales, vitaminas solubles en agua, ayudas de incluyendo pero no limitado a inhibidores de proteasa, estabilizadores, ligandos, agentes antiespumantes e inductores. El medio puede contener componentes que están parcialmente precipitados o dispersos en el medio líquido en algunas condiciones de funcionamiento incluyendo esterilización por calor. El medio puede estar compuesto por la mezcla de diferentes líquidos y soluciones gaseosas. Estas soluciones pueden mezclarse antes de entrar en el tanque de fermentación o ellos se suministran al tanque de fermentación como corrientes de líquido separadas adicionadas en una proporción predefinida. La proporción entre soluciones de líquido diferentes de componentes de medio pueden variar durante los estadios diferentes del proceso de fermentación que significa que la composición total del medio puede variar durante el curso de la fermentación.

20

[0140] Un medio de fermentación adecuado puede contener entre 20 y 60 mM de sales de mM PO_4^{3-} , entre 50 y 70 mM K^+ , entre 20 y 35 mM SO_4^{2-} , entre 4 y 6 mM Na^+ , entre 6 y 13 mM Mg^{2+} , entre 0,5 y 1,5 mM Mn^{2+} , entre 0.02 y 0.04 mM Cu^{2+} , entre 0.1 y 0.3 mM Fe^{2+} , entre 0.01 y 0.05 mM Zn^{2+} , cantidades traza de Co, Mo y Ni adicionadas como parte de una fuente de aminoácido complejo, entre 1 y 40 g/L de extracto de levadura, vitaminas seleccionados de inositol M (entre 100 y 250 mg/L), pantotenato de calcio (entre 2 y 20 mg/L), tiamina, HCl (entre 0.5 y 20 mg/L), piridoxina (entre 0.2 y 20 mg/L), nicotinamida de niacina (entre 2 y 7 mg/L), biotina (entre 0,03 y 0,8 mg/L), y colina-dihidrogenocitrato (entre 0.1 y 0.2 mg/L), un ligando tal como ácido cítrico, H_2O (entre 0.5 y 7 g/L) y glucosa como fuente de carbono (entre 50 y 200 g/L). El nitrógeno se añade continuamente sea como NH_3 gaseoso o NH_4OH líquido en una cantidad de entre 400 y 1800 mM. El agua del grifo se usa como una fuente natural de calcio y Cl⁻.

30

[0141] El péptido producido por las células puede luego ser recuperado del medio de cultivo por procedimientos convencionales que incluyen separar las células huésped del medio por centrifugado o filtración, precipitación de los componentes proteínicos del sobrenadante o filtrada mediante una sal, por ejemplo sulfato de amonio, purificación por una variedad de procedimientos cromatográficos, por ejemplo cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad, o similar, dependiendo del tipo de péptido en cuestión.

35

[0142] Después del aislamiento del caldo de cultivo la insulina madura o análogo de insulina se puede convertir en por ejemplo formas aciladas por acilación de en particular el grupo ϵ - amino del residuo B29Lys. Métodos para la acilación de insulinas se conocen bien en la técnica y están descritos en por ejemplo las patentes EP 792,290 y 894,095 y en la patente EE.UU. Nos. 5,693,609, 5,646,242, 5,922, 675, 5,750,497 y 6,011,007.

40

[0143] Ejemplo de insulinas aciladas son $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}$ insulina humana des(B30) de tetradecanoilo, $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}$ insulina humana des(B30) de litocoloil- γ -glutamilo, $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}$ -(N^α -($\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}$)- γ -Glu) insulina humana des(B30) o $\text{N}^{\epsilon\text{B}29}$ -(N^α -($\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}$)- γ -Glu) insulina humana des(B30).

45

[0144] Con "desB30" o "B(1-29)" se entiende una cadena B de insulina natural o un derivado análogo que carece del residuo de aminoácido B30.

50

[0145] B(1-30) significa la cadena B natural de insulina humana y "A(1-21)" la insulina natural una cadena

[0146] A18Q insulina humana es un análogo de insulina con un Gln en la posición A18 de la cadena A de insulina humana. B10E, A8H, A14E es un análogo de insulina con un Glu en la posición B10, una His en posición A8 y un Glu en la posición A14, respectivamente.

55

[0147] Con "B1", "A1" etc. se entiende el residuo de aminoácido en la posición 1 en la cadena B de insulina (contado del extremo N-terminal) y el residuo de aminoácido en la posición 1 en la cadena A de insulina (contado del extremo terminal), respectivamente. El residuo de aminoácido en una posición específica también se puede denominar como por ejemplo $\text{Phe}^{\text{B}1}$ que significa que el residuo de aminoácido en la posición B1 es un residuo de fenilalanina.

60

[0148] Con "péptido-C" se entiende la secuencia peptídica que conecta las cadenas A y B de péptido de la molécula de insulina.

[0149] Con "insulina madura" se entiende una insulina bicatenaria con la composición de residuo de aminoácido correcto y la misma conformación estructural como la molécula de insulina humana natural es decir con puentes de disulfuro entre $\text{Cis}^{\text{A}7}$ y $\text{Cis}^{\text{B}7}$ y entre $\text{Cys}^{\text{A}20}$ y $\text{Cys}^{\text{B}19}$ y un puente disulfuro interno entre $\text{Cys}^{\text{A}6}$ y $\text{Cys}^{\text{A}11}$ y con actividad

65

insulínica. Así, una insulina madura según la presente invención sería insulina humana. Un análogo de la insulina humana madura comprenderá una o varias mutaciones en la molécula de insulina como se ha explicado previamente. Así un análogo de insulina madura puede ser B28Asp insulina humana, desB30 insulina humana, A14Glu,B25His insulina humana y B31Leu, B32Ala insulina humana.

5

[0150] Por "derivado de insulina" como se utiliza en este caso se entiende una insulina de origen natural o un análogo de insulina que ha sido químicamente modificada, por ejemplo por introducción de una cadena lateral en una o más posiciones del esqueleto de insulina o por oxidación o reduciendo los grupos de los residuos de aminoácidos en la insulina o por acilación de un grupo amino libre o un grupo-hidroxi.

10

[0151] Con "Kex2" o "Kex2p" se entiende una endoproteasa tipo subtilisina que cataliza preferentemente escisión después de que una secuencia de dos residuos básicos (lisina o arginina) (Rockwell, NC, Krysan, DJ, Komiyama, T & Fuller, RS 2002 Precursors processing by Kex2/Furin. Chem. Rev. 102: 4525-4548).

15

[0152] Con "Kex1" o "Kex1p" se entiende una carboxipeptidasa de serina que cataliza preferentemente la eliminación de terminal-C lisilo y/o residuos de arginil (Shilton BH, Thomas DY, Cygler M 1997 estructura cristalina de Kex1deltap, una carboxipeptidasa de tratamiento con prohormonas de *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemistry 36: 9002-9012).

20

[0153] Con CPY se entiende carboxipeptidasa Y una carboxipeptidasa que preferentemente cataliza la eliminación de residuos de aminoácidos C-terminal pesado o hidrofóbico tal como Phe y Leu (Remington, S.J. & Breddam, K. (1994) Carboxypeptidases C and D. Methods Enzymol. 244,231-248)

[0154] Con "correctamente procesado" se entiende una escisión enzimática al punto de escisión deseada que da el producto deseado con secuencia de residuo de aminoácido correcto.

25

[0155] "Escisión eficaz" significa una escisión de al menos 80%, preferiblemente al menos 85% y más preferiblemente al menos 95%.

30

[0156] "POT" es el gen de triosa fosfato isomerasa de *Schizosaccharomyces pombe*, y "TPI1" es el gen triosa fosfato isomerasa de *S. cerevisiae*.

[0157] Por un "leader" se entiende una secuencia de aminoácidos que consiste en un prepéptido (el péptido señal) y un propéptido.

35

[0158] El término "péptido señal" se entiende un prepéptido que está presente como una secuencia N-terminal en la forma precursora de una proteína. La función del péptido señal es permitir que la proteína heteróloga facilite la translocación en el retículo endoplasmático. El péptido señal se escinde normalmente en el curso de este proceso. El péptido señal puede ser heterólogo u homólogo al organismo huésped que produce la proteína.

40

[0159] Una región codificante del péptido señal eficaz para células huésped fúngicas filamentosas es la región codificante del péptido señal obtenida del gen de amilasa TAKA *Aspergillus oryzae*, gen de amilasa neutra de *Aspergillus niger*, el gen de proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, *Humicola lanuginosa cellulase* o gen de lipasa, o la lipasa de *Rhizomucor miehei* o gen de proteasa, *Aspergillus* sp. amilasa o glucoamilasa, un gen que codifica una lipasa de *Rhizomucor miehei* o proteasa. El péptido señal es preferiblemente derivado del gen que codifica una amilasa TAKA A., a-amilasa neutra de *A. niger*, A. amilasa estable de *A. niger*, o *A. glucoamilasa niger*.

45

[0160] Péptidos señales útiles para células huésped de levadura se obtienen de los genes para factor-a de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Varios péptidos señal que se pueden usar con la construcción de ADN de la invención incluyen proteasa aspártica de levadura 3 (Yps1) péptido señal o cualquier análogo funcional (Egel-Mitani et al. (1990) Yeast 6:127-137 y US 5,726,038) y el α -factor señal del gen MF α 1 (Thorner (1981) en the Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Strathern et al., eds., págs 143-180, Cold Spring Harbor Laboratory, NY y US 4,870,008 " el péptido señal de amilasa salival de ratón (cf. O. Hagenbucle et al, Nature 289, 1981, págs. 643- 646), un péptido señal de carboxipeptidasa modificada (cf. L.A. Valls et al., Cell 48, 1987, págs. 887-897) y la levadura BAR1 péptido señal (cf. WO 87/02670).

50

[0161] El término "pro-péptido" significa una secuencia polipeptídica cuya función es permitir que el polipéptido expresado sea dirigido del retículo endoplasmático al aparato de Golgi y después a una vesícula secretora para 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 la levadura α -factor pro-péptido, 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. Pro-péptidos sintéticos adecuados son aquellos descritos en US 5,395,922, 5,795,746, 5,162,498. WO 89/02463, WO 92/11378 y WO 98/32867.

60

[0162] La secuencia polinucleótida de la invención también puede ser de origen genómico mixto, ADNc, y sintético. Por ejemplo, una secuencia de codificación genómica o de ADNc de un péptido líder se puede juntar a una secuencia de

65

ADNc o genómica que codifica las cadenas A y B, después de lo cual la secuencia de ADN se puede modificar en un sitio por oligonucleótidos sintéticos de inserción que codifican la secuencia de aminoácidos deseada para la recombinación homóloga conforme a procedimientos bien conocidos o preferiblemente generar la secuencia deseada por PCR usando oligonucleótidos adecuados.

5

[0163] La invención abarca un vector que es capaz de replicarse en el microorganismo seleccionado o célula huésped y que lleva una secuencia polinucleótida que codifica el producto de insulina deseado. El vector recombinante puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, la replicación del cual es independiente de replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma, o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando introducido en la célula huésped, se integra en el genoma y replicado con el(los) cromosoma(s) en que ha sido integrado. Además, puede ser utilizado 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. El vector puede ser lineal o plásmidos cerrados circulares y preferiblemente contiene un(unos) 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.

10

15

[0164] En una forma de realización, el vector de expresión recombinante es capaz de replicarse en la levadura. Ejemplos de secuencias que permiten al vector replicarse en la levadura son los genes de replicación REP 1-3 de plásmido de levadura 2 μ m y origen de replicación.

20

[0165] El vector también puede comprender una etiqueta seleccionable, por ejemplo un gen el producto del cual complementa un defecto en la célula huésped o uno que confiere resistencia a un fármaco, por ejemplo ampicilina, canamicina, tetraciclina, cloranfenicol, neomicina, higromicina o metotrexato.

25

[0166] Marcadores seleccionables para usar en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina-carbamoiltransferasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa) y *trpC* (antranilato sintasa).

30

[0167] Marcadores adecuados para células huéspedes de levadura son *ADE2*, *HIS3*, *LEU2*, *LYS2*, *MET3*, *TRP1*, y *URA3*. Un marcador seleccionable preferido para la levadura es el gen TPI *Schizosaccharomyces pombe* (Russell (1985) Gene 40:125-130).

[0168] En el vector, la secuencia polinucleótida está operativamente conectada a una secuencia promotora adecuada. El promotor puede ser cualquier secuencia de ácidos nucleicos que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección incluyendo mutante, truncado, y promotores híbridos, y se pueden obtener de polipéptidos intracelulares o extracelulares de genes que codifican bien homólogo o heterólogo a la célula huésped.

35

[0169] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción en una célula huésped fúngica filamentosa son promotores obtenidos por los genes para TAKA *amilasa Aspergillus oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, y alfa-amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*.

40

[0170] En un huésped de levadura, promotores útiles son el *Saccharomyces cerevisiae* MF α 1, TPI, ADH o promotores PGK.

45

[0171] El constructo polinucleótido de la invención típicamente se conectará operativamente también 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).

[0172] Los procedimientos usados para enlazar las secuencias de ADN que codifican el producto de insulina, el promotor y opcionalmente el terminador y/o secuencia señal secretora, respectivamente, e insertarlas en vectores adecuados con la información necesaria para la replicación, se conocen para personas expertas en la técnica (cf., por ejemplo, Sambrook et al. Molecular Cloning : A Laboratory Manual Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989).

50

[0173] Se entenderá que el vector se puede construir bien primero preparando una construcción de ADN con la secuencia de ADN que codifica entera los precursores de insulina de la invención, y posteriormente insertando este fragmento en un vector de expresión adecuado, o insertando consecutivamente fragmentos de ADN que contienen información genética para los elementos individuales (tal como la señal, propéptido, péptido-C modificado, cadenas A y B) seguidas de ligamiento.

55

[0174] La presente invención también se refiere a células de hongos recombinantes, que comprende una secuencia polinucleótida que codifica el producto de insulina deseada. Un vector que comprende tal secuencia polinucleótida se introduce en la célula huésped de modo que el vector es mantenido como un integrante cromosómico o como un vector extracromosomal que se duplica como se describe anteriormente. El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula madre que no sea idéntico a la célula madre debido a mutaciones que tienen lugar durante la replicación.

60

65

[0175] La célula huésped usada en la presente invención es una célula fúngica. "Fungi" como se utiliza en este caso incluye el fila de Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, y Zygomycota (como se define por Hawkswort et al., en, Ainswort y Bisby's Dictionary of The Fungi, 8th edition, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido) al igual que la Oomycota (como se ha citado en el Hawkswort et al., 1995, *supra*, página 171) y todos hongos mitospóricos (Hawkswort et al., 1995, *supra*).

[0176] En una forma de realización la célula huésped fúngica es una célula de levadura. "Levadura" como se utiliza en este caso incluye levadura ascoesporógena (Endomycetales), levadura basidioesporogénea, y levadura de los Fungi Imperfecti (Blastomycetos). Las levaduras ascoesporógenas se dividen en las familias Spermophthoraceae y Saccharomycetaceae. Esta última está compuesta por cuatro subfamilias, Schizosaccharomycoideae (p. ej., género *Schizosaccharomyces*), Nadsonioideae, Lipomycoideae, y Saccharomyces (p. ej., géneros *Pichia*, *Kluyveromices* y *Saccharomyces*). Las levaduras basidioesporogéneas incluyen los géneros *Leucosporidium*, *Rhodospodium*, *Sporidiobolus*, *Filobasidium*, y *Filobasidiella*. La levadura de los Fungi Imperfecti se dividen en dos familias, Sporobolomycetaceae (p. ej., géneros *Sorobolomyces* y *Bullera*) y *Cryptococcaceae* (p. ej., género *Candida*). Dado que la clasificación de levadura puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, la levadura debe ser definida como se describe en Biology and Activities of Yeast (Skinner, F.A., Passmore, S.M., y Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series n° 9, 1980. La biología de la levadura y la manipulación de genética de la levadura se conocen sea en la técnica (ver, por ejemplo, Biochemistry and Genetics of Yeast, Bacil, M., Horecker, B.J., y Stopani, editores A.O.M., 2nd edition, 1987; The Yeasts, Rose, A.H., y Harrison, J.S., editors, 2nd edition, 1987; and the Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, Strathern et al., editors, 1981).

[0177] La célula huésped de levadura se puede seleccionar de una célula de unas especies de *Candida*, *Kluyveromices*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Yarrowia*. En una forma de realización, la célula huésped de levadura es una *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oviformis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces uvarum* "*Pichia Kluyveri*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida utilis*, *Candida cacaoi*, y *Geotrichum fermentans*. Otras células huésped de levadura útiles son un *Kluyveromyce lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris* *Yarrowia lipolytica*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Ustilgo maylis*, *Candida maltosa*, *Pichia guillermondii* y *Pichia methanolii* (cf. Gleeson et al., J. Gen. Microbiol. 132, 1986, págs. 3459-3465; US 4,882,279 y US 4,879,231).

[0178] En una forma de realización la célula huésped fúngica es una célula micótica filamentosa. "Hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (como se ha definido por Hawkswort et al., 1995, *supra*). Los hongos filamentosos se caracterizan por el hecho de que un micelio vegetativo compuesto por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano, y otros polisacáridos complejos. La célula huésped fúngica filamentosa se puede elegir del grupo consistiendo en *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Thielavia*, *Tolipocladium*, y *Trichoderma*

[0179] La expresión "un aminoácido codificable" o "un residuo de aminoácido codificable" se utiliza para indicar un aminoácido o residuo de aminoácido que se puede codificar por un triplete ("codón") de nucleótidos.

[0180] En el presente contexto la tres letras o indicaciones de una sola letra de los aminoácidos han sido usadas en su significado convencional como se indica en la siguiente tabla. A menos que se indique explícitamente, los aminoácidos mencionados aquí son L-aminoácidos. Además, a la izquierda y extremidades adecuadas de una secuencia de aminoácidos de un péptido son, respectivamente, N y C terminales a menos que se especifique lo contrario.

Abreviaturas para aminoácidos:

[0181]

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
Methionina	Met	M
Cisteína	Cys	C

Fenilalanina	Phe	F
Tirosina	Tyr	Y
Triptófano	Trp	W
Histidina	His	H
Lisina	Lys	K
Arginina	Arg	R
Glutamina	Gln	Q
Asparagina	Asn	N
Acido Glutámico	Glu	E
Acid Aspártico	Asp	D
Serine	Ser	S
Treonina	Thr	T

5 [0182] Por fermentación se entenderá un proceso aséptico usado para propagar microorganismos sumergidos en un medio líquido. La fermentación se realiza preferiblemente en tanques asépticos agitados con líneas de suministro para la adición de gases comprimidos estériles que consisten pero no están limitados a aire, oxígeno y amoníaco. Un tanque de fermentación puede contener dispositivos/sensores para control pH, temperatura, presión, índice de agitación, nivel de oxígeno disuelto, contenido líquido, nivel de espuma, índices de adición de alimentación y índices de adición ácido y base. Además, el tanque de fermentación se puede equipar con legados ópticos para niveles de control de densidad de 10 célula, concentraciones de metabolitos y productos independientemente de sus forma físico-química. Formación y consumo de compuestos volátiles son monitorizados usando el análisis de gases en las entradas y salidas de gas del tanque de fermentación. Todas las señales de variables monitorizadas se pueden usar para fines de control que permiten que las variables sean mantenidas dentro de gamas predefinidas o cambiadas continuamente según perfil predefinido respecto al tiempo. Alternativamente, las variables se controlan en respuesta a señales de cambios de otra 15 variable monitorizada.

[0183] El producto deseado producido durante la fermentación está presente como material extracelular soluble o como material intracelular bien en forma de material soluble o como material insoluble incluyendo material agregado. La formación de producto es bien constitutiva o inducida y es dependiente o independiente del crecimiento microbiano. El 20 proceso de fermentación se realiza en tanques con un volumen de trabajo que varía de 100 mL a 200 000 L. Un proceso de fermentación puede ser operado como un proceso por lotes, un proceso de alimentación por lotes, un proceso de alimentación por lotes repetido o un proceso continuo.

[0184] Con un proceso discontinuo se entiende una fermentación donde el medio estéril está contenido en el tanque de fermentación antes de que los microorganismos se agreguen al tanque. Durante el proceso ácido, base, agente antiespumante, inhibidores, estabilizadores e inductores se agregan bien automáticamente o manualmente. Ácido y base se agregan bien como soluciones líquidas o como componentes gaseosos. Estos componentes se pueden 25 adicionar a través de una línea de alimentación o se pueden suministrar al tanque de fermentación en líneas separadas. El contenido de tanque de fermentación solo se quita para fines de análisis durante el proceso de fermentación. Todo el contenido del tanque de fermentación se cosecha al final del proceso de fermentación. No obstante, para procesos de lote consecutivos el contenido del tanque de fermentación es solo parcialmente cosechado y el tanque de fermentación es rellenado con medio fresco, estéril que permite que tenga lugar otra fermentación por lotes. 30

[0185] Un proceso de alimentación por lotes es una fermentación donde solo una parte del medio se rellena en el tanque de fermentación de antes que los microorganismos sean agregados. Los componentes de medio restante o 35 cantidades restantes de los componentes de medio ya parcialmente adicionados se suministran al tanque de fermentación bien como una pulsación, como una serie de impulsos discretos o como un flujo continuo adicionado a índice constante o variable. Un proceso de alimentación por lotes se puede preceder por un proceso discontinuo seguido del modo operativo lote alimentado. Componentes de medio añadidos al tanque de fermentación durante el proceso consisten en, pero de forma no limitativa componentes de crecimiento limitantes, componentes difícilmente 40 solubles, componentes volátiles o componentes con estabilidad limitada en el entorno líquido. El índice de crecimiento de los microorganismos se puede controlar a través de los ajustes del índice al que componentes de medio se agregan al tanque de fermentación. Ácido, base, antiespumante, inhibidores, estabilizadores e inductor se agregan durante el proceso bien automáticamente o manualmente. Ácido y base se agregan bien como parte de soluciones de líquido o como componentes gaseosos. Todos los componentes adicionados durante el proceso de alimentación por lotes se 45

suministran a través de una línea de alimentación o se pueden suministrar al tanque de fermentación en las líneas de suministro separado. Durante un proceso de alimentación por lotes el contenido de tanque de fermentación solo se quita para fines de análisis. Todo el contenido del tanque de fermentación se cosecha al final del proceso.

5 [0186] Una variante del proceso de alimentación por lotes es el proceso del lote alimentado de modo repetido. Una fermentación de lote alimentado de modo repetido se realiza similarmente al proceso de lote alimentado pero parte del contenido de tanque de fermentación se quita en uno o más casos durante el proceso. La eliminación parcial de contenido del tanque de fermentación puede ser seguida por la adición de medio fresco. La adición de medio fresco se puede seguir de un proceso discontinuo antes de reanudar la operación de proceso de lote alimentado. La composición de medio fresco y el medio adicionado durante el proceso de alimentación por lotes no son necesariamente idénticas.

10 [0187] Por un proceso continuo se entiende una fermentación donde algo del medio se añade al tanque antes de la agregación de los microorganismos y el comienzo de la fermentación. Medio fresco que contiene todos los componentes de medio necesarios para el crecimiento junto con inhibidores, inductores, antiespumante, ácido, base y componentes estabilizantes el producto son agregados continuamente. Estos componentes se pueden adicionar a través de una línea de alimentación o se pueden suministrar al tanque de fermentación en las líneas de suministro separadas para aumentar la estabilidad del medio usado o mejorar su calidad. Ácido y base se agregan bien como parte de soluciones de líquido o como componentes gaseosos. Todos los componentes se agregan al tanque de fermentación como una serie de impulsos discretos o como un flujo continuo adicionado a constante o índice variable. La cosecha del contenido de tanque de fermentación se realiza continuamente para mantener el contenido del tanque de fermentación dentro de una gama predefinida. El crecimiento del microorganismo se puede controlar por el índice de adición de medio al tanque de fermentación al igual que por ajuste del contenido de tanque de fermentación.

15 [0188] Por un medio se entiende una solución líquida que contiene al menos una fuente de carbono, una o más fuentes de nitrógeno, sales esenciales incluyendo sales de potasio, sodio, magnesio, fosfato, nitrato y sulfato, metales traza, vitaminas solubles en agua, auxiliares de proceso incluyendo pero no limitado a inhibidores de proteasa, estabilizadores, ligandos, agentes antiespumantes e inductores. El medio puede contener componentes que están parcialmente precipitados o dispersos en el medio líquido en algunas condiciones de funcionamiento incluyendo la esterilización por calor. El medio puede estar compuesto por la mezcla de diferentes líquidos y soluciones gaseosas. Estas soluciones pueden mezclarse antes de entrar en el tanque de fermentación o se suministran al tanque de fermentación como corrientes de líquido separadas adicionadas en una proporción predefinida. La proporción entre soluciones de líquido diferentes de componentes de medio puede variar durante los estadios diferentes del proceso de fermentación lo que significa que la composición total del medio puede variar durante el curso de la fermentación. La tabla a continuación contiene una lista de rangos de concentración para los diferentes componentes del medio. Estas concentraciones se calculan como la cantidad total de un medio adicionado de componentes dividido por el volumen inicial de medio en el tanque de fermentación. Las concentraciones medias para cultivos continuos son incluidas como las concentraciones en el medio que entran en el tanque de fermentación.

20 [0189] La siguiente tabla es una revisión de los componentes típicos de un medio de fermentación.

25 [0190] Componentes típicos de un medio de fermentación

Fin principal	Componente	Nivel bajo	Nivel Alto
Fuentes-C	Glucosa	0	500 g/L
	Sacarosa	0	500 g/L
	Maltosa	0	500 g/L
	Lactosa	0	300 g/L
	L-Ácido Málico	0	200 g/L
	Maltodextrinas	0	600 g/L
	Etol	0	500 g/L
	Metanol	0	500 g/L
	Pectinas	0	40 g/L
	Ácidos Grasos	0	50 g/L
	Emulsiones de aceites PIT	0	20 g/L
	Triglicéridos	0	60 g/L

ES 2 464 282 T3

Fuente inorgánica-P	Sales de ortofosfato		4 mM	100 mM
Minerales esenciales para el crecimiento	Sales de sulfato		1 mM	60 mM
		Sales de amonio	0	1800 mM
		Sales de magnesio	0.5 mM	20 mM
		Sales de potasio	3 mM	100 mM
		Sales de sodio	0.2	500 mM
		Sales de calcio	1 mM	50 mM
Otras fuentes-N	Amoníaco		0	1800 mM
	Urea		0	900 mM
	Aminoácidos		0	25 g/L
	Extracto soluble de maíz		0	100 g/L
	Extracto de levadura		0	75 g/L
	Proteínas de planta		0	50 g/L
	Proteínas de planta hidrolizada		0	30 g/L
Metales residuales		Fe	10	350 µM
		Zn	10	300 µM
		Mn	5	1500 µM
		Cu	3	75 µM
		Mo	0	1 µM
		H ₃ BO ₃	0	60 µM

Fin principal	Componente	Nivel bajo	Nivel alto
Vitaminas	Biotina	0.01 mg/L	10 mg/L
	Pantotenato, Ca	1 mg/L	1000 mg/L
	Niacina	1 mg/L	200 mg/L
	Tiamina, HCl	0.2 mg/L	200 mg/L
	Ácido p-aminobenzoico	0	100 mg/L
	Citrato de hidrogeno de colina	10 mg/L	200 mg/L
	m-Inositol	10 mg/L	2000 mg/L
	Piridoxina, HCl	0.2 mg/L	100 mg/L
	Ácido fólico	0	50 µg/L
	Riboflavina	0	200 mg/L
	Ácido ascórbico	0	1000 mg/L
Auxotrofia	Uridina/Uracilo	0	1000 mg/L
Procesos de ayuda y ligandos.	PPO	0	1000 ppm
	PPO-PEO bloque de copolímero	0	5000 ppm
	Antiespuma (a base de silicona)	0	1000 ppm
	Antiespuma (a base de aceite)	0	1000 ppm

	Ácido Cítrico	0	1000 mg/L
	Trimetilglicina	0	10.000 mg/L
	Imidazol	0	10 mM
	EDTA	0	100 µM
	Histidina-L	0	1000 mg/L
	Análogo no metabolizable de fuentes de carbono	0	200 mg/L

- 5 [0191] Las composiciones farmacéuticas con los análogos de insulina de esta invención se pueden usar en el tratamiento de estados que son sensibles a la insulina. Así, se pueden usar en el tratamiento de diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 e hiperglicemia por ejemplo como a veces visto en personas seriamente perjudicadas y personas que se han sometido a cirugía mayor. El nivel de dosis óptimo para cualquier paciente dependerá de una variedad de factores incluyendo la eficacia del análogo de insulina específico empleado, la edad, peso corporal, actividad física, y dieta del paciente, en una combinación posible con otros fármacos, y en la gravedad del estado a tratar. Se recomienda que la dosificación diaria del derivado insulínico de esta invención sea determinada para cada paciente individual por expertos en la técnica de una manera similar a composiciones de insulina conocida.
- 10 [0192] Las composiciones farmacéuticas de los análogos de insulina contendrán adyuvantes usuales y aditivos y son preferiblemente formuladas como una solución acuosa. El medio acuoso se hace isotónico, por ejemplo, con cloruro sódico, acetato sódico o glicerol. Además, el medio acuoso puede contener iones de zinc, tampones y conservantes. El valor de pH de la composición se ajusta al valor deseado y puede ser aproximadamente entre 4 a 8.5.
- 15 [0193] La composición farmacéutica comprenderá adyuvantes usuales tales uno o varios agentes adecuados para la estabilización, conservación o estoicidad, por ejemplo, iones de zinc, fenol, cresol, un parabeno, cloruro sódico, glicerol o manitol.
- 20 [0194] El tampón usado en la industria farmacéutica se puede seleccionar del grupo que consiste en el acetato sódico, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrógeno fosfato de sodio, hidrógeno fosfato de disodio, fosfato sódico, y tris(hidroximetil)-aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas derivadas.
- 25 [0195] El conservante farmacéuticamente aceptable se puede seleccionar del grupo que consiste en el fenol, o-Cresol, m-cresol, p-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, butilo p-hidroxibenzoato, 2-feniletanol, alcohol benzílico, clorobutanol, y tiomersal, bronopol, ácido benzoico, clorhexidina, deshidoacetato de sodio, clorocresol, p-hidroxibenzoato etilo, cloruro de bencetonio, clorfenesina (3p-clorfenoxipropano-1,2-diol) o mezclas derivadas. En otra forma de realización de la invención del conservante está presente en una concentración de 0.1 mg/ml a 20 mg/ml. En otra forma de realización de la invención del conservante está presente en una concentración de 0.1 mg/ml a 5 mg/ml. En otra forma de realización de la invención del conservante está presente en una concentración de 5 mg/ml a 10 mg/ml. En otra forma de realización de la invención del conservante está presente en una concentración de 10 mg/ml a 20 mg/ml. Cada uno de estos conservantes específicos constituye una forma de realización alternativa de la invención. El uso de un conservante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por la persona experta. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995.
- 30 [0196] El agente de isotonicidad se puede seleccionar del grupo que consiste en una sal (p. ej. cloruro sódico), un azúcar o alcohol de azúcar, un aminoácido (p. ej. L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (p. ej. glicerol (glicerina), propanodiol de 1,2 (propilenglicol), propanodiol de 1,3, butanodiol de 1,3) polietilenglicol (p. ej. PEG400), o mezclas derivadas. Cualquier azúcar tal como mono-, di-, o polisacáridos, o glucanos hidrosolubles, incluyendo por ejemplo fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, almidón de hidroxietilo y carboximetilcelulosa-Na puede ser utilizado. En una forma de realización el aditivo de azúcar es sacarosa. El alcohol de azúcar se define como un hidrocarburo C4-C8 con al menos un grupo-- OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol, y arabitol. En una forma de realización el aditivo de alcohol de azúcar es manitol. Los azúcares o polialcoholes mencionados anteriormente se pueden utilizar individualmente o en la combinación. No hay límite fijo para la cantidad usada, puesto que el azúcar o el alcohol de azúcar son solubles en la preparación líquida y no afectan negativamente a los efectos estabilizantes conseguidos utilizando los métodos de la invención. En una forma de realización, el azúcar o concentración de alcohol de azúcar es entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml. En otra forma de realización de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/ml a 50 mg/ml. En otra forma de realización de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/ml a 7 mg/ml. En otra forma de realización de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de 8 mg/ml a 24 mg/ml. En otra forma de realización de la invención el agente isotónico está presente en una concentración de 25 mg/ml a 50 mg/ml. El uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas es bien
- 55

conocido por la persona experta. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995.

5 [0197] Todos encabezamientos y sub-encabezamientos se usan aquí solo por conveniencia y no deberían ser interpretados de ninguna manera como limitantes de la invención. El uso de cualquier y todos ejemplos, o idioma ejemplar (p. ej., "tal como") proporcionado aquí, se destina meramente a iluminar mejor la invención y no plantea una limitación en el ámbito de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ningún idioma en la especificación debería ser interpretado como indicación cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención. La citación de los documentos de patentes aquí se hace solo por conveniencia y no refleja ninguna vista de la validez, patentabilidad, y/o ejecutabilidad de tales documentos de patente. Esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes del objeto nombrado en las reivindicaciones aquí anexas como permitido por la ley aplicable.

15 EJEMPLOS

Procedimientos Generales

20 [0198] Todos los plásmidos de expresiones son del tipo C-POT, similar a aquellos descritos en EP 171,142. Estos son vectores de expresión basados en 2 μ caracterizados por el contenido del gen de triosa fosfato isomerasa de *Schizosaccharomyces pombe* (POT) para el propósito de selección plásmida y estabilización en *S. cerevisiae*. Los plásmidos también contienen la triosa fosfato isomerasa de *S. cerevisiae* promotor y terminador (figura 1). Estas secuencias son similares a las secuencias correspondientes en plásmido pKFN1003 (descritas en WO 9010075) como son todas secuencias excepto las siguientes: 1) la secuencia del fragmento EcoRI-XbaI que codifica la proteína de fusión del líder y el producto de insulina y 2) una mutación imperceptible ha sido introducidas dando como resultado la eliminación de un sitio NcoI en la región 2 μ en el vector de expresión. Para facilitar la clonación de diferentes proteínas de fusión la secuencia de ADN que codifica el MF α 1 pre-pro líder ha sido cambiada para incorporar un sitio NcoI (ver figura 2) y se llama el pre-pro líder MF α 1*. Así el Fragmento de NcoI-XbaI es simplemente sustituido por un fragmento de NcoI-XbaI que codifica el constructo de insulina de interés. Tales Fragmentos de NcoI-XbaI se pueden sintetizar usando oligonucleótidos sintéticos y PCR según técnicas estándar. Además del líder alfa otros líderes pueden ser usados.

35 [0199] Los transformantes de levadura fueron preparados por la transformación de las cepas huésped de la cepa *S. cerevisiae* MT663 o ME1719. La cepa de levadura MT663 (MATa/MATa pep4-3/pep4-3 HIS4/his4 Δ tpi::LEU2/ Δ tpi::LEU2 Cir') fue depositada en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen en relación con la presentación WO 92111378 y fue dado el número de depósito DSM 6278. La cepa de *S. cerevisiae* ME1719 (MATa/a leu2/leu2 pep4-3/pep4-3 Δ tpi::LEU2/ Δ tpi::LEU2 Δ ura3/ Δ ura3 Δ ips1::URA3 / Δ ips1::ura3 Cir+) se describe en WO 98/01535.

40 [0200] MT663 o ME1719 se cultivaron en YPGA_L (1% extracto de bacto-levadura, 2% bacto-peptona, 2% galactosa, 1% Lactato) a un O.D. a 600 nm de 0.6. 100 ml de cultivo fue cosechado por centrifugado, lavado con 10 ml de agua, recentrifugado y resuspendido en 10 ml de una solución que contiene 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, centrifugada y las células resuspendidas en 10 ml de una solución que contiene 1.2 M sorbitol, 10 mM Na₂EDTA. 0.1 M citrato sódico, pH 0 5.8, y 2 mg NovozymC3234. 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)-aminometane) pH = 7.5) y resuspendidas en 2 ml de CAS. durante la transformación, 1 ml de células suspendidas en CAS fueron mezcladas con aprox. 0.1 mg de ADN plásmido y dejadas a temperatura ambiente durante 15 minutos. 1 ml de (20% polietilenglicol 4000, 10 mM CaCl₂, 10 mM Tris HCl, pH = 7.5) fueron añadidos y la mezcla dejada durante otros 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla fue centrifugada y el sedimento resuspendido en 0.1 ml de SOS (1.2 M sorbitol, 33% vlv YPD, 6.7 mM CaCl₂) e incubado a 30°C durante 2 horas. La suspensión fue luego centrifugada y el sedimento resuspendido en 0.5 ml de 1.2 M sorbitol. Luego, 6 ml de agar superior (el medio SC de Sherman et al. (1982) Métodos en la Genética de Levadura, Laboratorio de Cold Spring Harbour) que contiene 1.2 M sorbitol más 2.5% agar) fue añadido a 52°C y la suspensión vertida encima de placas que contienen el mismo agar-solidificado, sorbitol que contiene medio.

55 EJEMPLO 1

60 [0201] Construcción de un sistema de expresión de levadura para el precursor de insulina A14E, B25H, B(1-30)-LARRDLGKR(SEC ID NO:45)-A(1-21).

[0202] La Figura 1 muestra una levadura llamada plásmido pESI42-33. El plásmido contiene un casete de expresión que incluye un fragmento EcoRI - XbaI insertado en el plásmido entre el promotor de transcripción y el terminador de transcripción del gen TPI de *S. cerevisiae*. En el plásmido pESI142-33 el EcoRI - XbaI el fragmento codifica un producto de fusión compuesto por el pre-pro líder MF α 1*, un sitio de escisión Lys-Arg para el procesamiento dibásico de endopeptidasa de Kex2, y el precursor de insulina A14E, B25H, B(1-30)-LARRDLGKR(SEC ID NO:45)-A(1-21).

[0203] Un fragmento de ADN que contiene secuencias que codifican el precursor de insulina A14E, B25H, B(1-30)-LARRDLGKR(SEQ ID NO:45)-A(1-21) fue construido utilizando oligonucleótidos sintéticos y amplificaciones de PCR estándar. El fragmento de PCR resultante fue purificado, digerido con NcoI y XbaI y ligado al fragmento de vector NcoI - XbaI del vector de expresión de tipo cPOT modificado (figura 1). El plásmido de expresión fue propagado en el *E. coli*, crecido en presencia de ampicilina y aislado utilizando técnicas estándar (Sambrook et al., 1989). El plásmido ADN fue controlado para insertar por nucleasas de restricción apropiadas (e.g. EcoRI, NcoI, XbaI) y fue mostrado por análisis de secuencias para contener la secuencia apropiada del precursor de insulina A14E, B25H, B(1-30)-LARRDLGKR(SEQ ID NO:45)-A(1-21). La Figura 2 muestra la secuencia de ADN de un fragmento de NcoI-XbaI y la secuencia de aminoácidos correspondiente que corresponde a SEC ID n°: 46. El plásmido fue transformado en la cepa de *S. cerevisiae* MT663. Transformantes de levadura que albergan el plásmido fueron seleccionados por la utilización de glucosa como fuente de carbono en YPD (1 % extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa) agar (2%) placas.

EJEMPLO 2

15 Procesamiento del precursor de insulina por adición de CPY directamente al caldo de fermentación.

[0204] La cepa de *S. Cerevisiae* MT663 transformada con un plásmido para la expresión de A14E, B25H, B(1-30)-LARRDLGKR(SEQ ID NO:45)-A(1-21), fue inoculado en 5 ml de un medio consistiendo en 5 g/L (NH₄)₂SO₄, 184 mg/L (NH₄)₂HPO₄, 2,88 g/L KH₂PO₄, 1,42 g/L MgSO₄·7H₂O, 1,28 g/L, K₂SO₄, 10.00 g/L ácido succínico, 10.00 g/L ácidos de casamino, 0,0112 g/L FeSO₄·7H₂O, 0,0086 g/L MnSO₄·H₂O, 0,0014 g/L CuSO₄·5H₂O, 0,00185 g/L nSO₄·7H₂O, 0,0129 g/L CaCl₂·2H₂O, 0,071 g/L ácido cítrico, 28.0 mg/L inositol M, 14.0 mg/L cloruro de colina, 2,8 mg/L tiamina, 2,8 mg/L nicotinamida, 2,1 mg/L ácido Ca-pantoténico, 0,14 mg/L biotina, 0,14 mg/L ácido fólico, 40 g/L glucosa. El cultivo se efectuó a 30°C durante 3 días. Análisis LC-MS del caldo de fermentación sugerido que -50 % de las especies de insulina total secretadas fueron completamente procesadas (PM = 5763). El restante -50 % fueron de insulina con el C-terminal de la cadena B extendido con LA (Mw = 5947). Para la eliminación proteolítica de la extensión LA, 100 µl del caldo de fermentación fue añadido 0.8 µl CPY purificada de *S. cerevisiae* (~0.1 Unidad), e incubado durante 5 minutos, 30°C antes del análisis LC-MS. Este mostró que la extensión-LA fue eliminada por completo.

EJEMPLO 3

[0205] Análogos de insulina adicionales fueron preparados como se describe en el ejemplo 1. Los rendimientos de expresión fueron comparados con la expresión del precursor de insulina descrito en EP patente n° 163529: B(1-29)-Ala-Ala-Lys- A(1- 21) (MT748). Además el porcentaje del procesamiento completo por Kex2 medido y comparado con una insulina sin terminal-C de extensión de la cadena B. Todos los análogos de insulina tienen la mutación A14E y B25H .

[0206] Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

X ₁	X ₂	Z	X ₃	X ₄	Rendimiento (en porcentaje con respecto a MT748)	%Completamente procesado por KEX2
Ninguno	KR	DLG	KR	enlace	190	50
LG	KR	DLG	KR	enlace	190	>90
LA	RR	DLG	KR	enlace	170	>90
LL	RR	DLG	KR	enlace	146	>90
LM	RR	DLG	KR	enlace	151	>90
LI	RR	DLG	KR	enlace	120	>90
LN	KR	DGL	KR	enlace	175	>90
LD	KR	DGL	KR	enlace	200	>90
LE	KR	DGL	KR	enlace	190	>90
LT	KR	DGL	KR	enlace	200	>90
LS	KR	DGL	KR	enlace	170	>90
LP	KR	DGL	KR	enlace	170	>90

EJEMPLO 4

Procesamiento del precursor de insulina con un único sitio Kex2 por adición de CPY y DAP1 directamente al caldo de fermentación.

[0207] La cepa de *S. cerevisiae* MT663 transformada con un plásmido para la expresión de A14E, B25H, B(1-30)-LGRREAEA(SEQ ID NO:47)-(A1-21) fue inoculada en 5 ml de un medio similar al que descrito en el ejemplo 2.

[0208] El cultivo se efectuó a 30°C durante 3 días. Análisis LC-MS del caldo de fermentación sugirió que -50 % de las especies de insulina totales secretadas fueron procesadas por Kex1p y Kex2p, conduciendo a una forma con el C-terminal de la cadena-B extendido con LG y el N-terminal de la cadena A extendido con EAEA (Mw = 6333). El restante -50 % fueron precursores no procesados (Mw = 6628).

[0209] Para la eliminación proteolítica de la extensión LG, 100 µl de caldo de fermentación fueron añadidos 1,6 µl CPY purificado de *S.cerevisiae* (~0,2 Unidad). 5 µl (~0,1 Unidad) DAP1 (Catapsina C, EC 3,4,14,1) purificado de Hígado de Pollo fue añadido para eliminar la extensión EAEA(SEQ ID NO:3). La mezcla fue incubada durante 200 minutos, 30°C antes de la análisis LC-MS. Este mostró que la extensión LG fue completamente eliminada, y ~75% de la extensión EAEA(SEQ ID NO:3) fue eliminada, dando el análogo de insulina maduro A14E, B25H - LGRREAEA(SEQ ID NO:47)-(A1-21) (PM = 5763).

EJEMPLO 5

[0210] Análogos de insulina adicionales fueron preparados como se describe en el ejemplo 1. Los rendimientos de expresión fueron comparados con el rendimiento de expresión del precursor de insulina anteriormente descrito MT748. Todos los análogos de insulina tuvieron las mutaciones A14E, B25H.

[0211] Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

X ₁	X ₂	Z	X ₃	X ₄	Rendimiento (en porcentaje con respecto a MT748)	%Completamente procesado por KEX2
LA	RR	DDLG (SEQ ID NO:1)	KR	enlace	200.3	>90
LA	RR	DDDLG (SEQ ID NO:2)	KR	enlace	221.7	>90

EJEMPLO 6

[0212] Análogos de insulina adicionales fueron preparados como se describe en el ejemplo 1. En estos análogos X₁ es LA, X₂ es RR, X₃ es KR y X₄ es un enlace y las mutaciones son A14E e y B25H mientras que Z es variada. Los rendimientos de expresión fueron comparados con el rendimiento de la expresión del precursor de insulina anteriormente descrito MT748.

[0213] Los resultados se muestran en las siguientes tablas

Z	Rendimiento (en porcentaje con respecto a MT748)	%Completamente procesado por KEX2
DADLG (SEQ ID NO:5)	249.2	>90
DRDLG (SEQ ID NO:6)	228.8	>90
DNDLG (SEQ ID NO:7)	232.7	>90
DCDLG (SEQ ID NO:8)	ND	>90
DQDLG (SEQ ID NO:9)	272.7	>90
DEDLG (SEQ ID NO:10)	ND	>90
DGDLG (SEQ ID NO:11)	192.1	>90
DHDLG (SEQ ID NO:12)	223,3	>90
DIDLG (SEQ ID NO:13)	ND	>90
DLDLG (SEQ ID NO:14)	216,8	>90

(continuación)		
DKDLG (SEQ ID NO:15)	181,1	>90
DMDLG (SEQ ID NO:16)	116,9	>90
DFDLG (SEQ ID NO:17)	119,7	>90
DPDLG (SEQ ID NO:18)	237,7	>90
DSDLG (SEQ ID NO:19)	197,2	>90
DTDLG (SEQ ID NO:20)	208,7	>90
DWDLG (SEQ ID NO:21)	146,7	>90
DYDLG (SEQ ID NO:22)	211,2	>90
DVDLG (SEQ ID NO:23)	141,0	>90
DDALG (SEQ ID NO:25)	79,7	>90
DDRLG (SEQ ID NO:26)	277,1	>90
DDNLG (SEQ ID NO:27)	249,4	>90
DDCLG (SEQ ID NO:28)	13,9	>90
DDQLG (SEPA ID NO:29)	107,4	>90
DDELG (SEQ ID NO:30)	232,1	>90
DDGLG (SEQ ID NO:31)	97,0	>90
DDHLG (SEQ ID NO:32)	325,6	>90
DDILG (SEQ ID NO:33)	79,7	>90
DDLLG (SEQ ID NO:34)	27,7	>90
DDKLG (SEQ ID NO:35)	239,0	>90
DDMLG (SEQ ID NO:36)	110,9	>90
DDFLG (SEQ ID NO:37)	145,5	>90
DDPLG (SEQ ID NO:38)	52,0	>90
DDSLG (SEQ ID NO:39)	256,3	>90
DDTLG (SEQ ID NO:40)	83,1	>90
DDWLG (SEQ ID NO:41)	83,1	>90
DDYLG (SEQ ID NO:42)	65,8	>90
DDVLG (SEQ ID NO:43)	79,7	>90

LISTADO DE SECUENCIAS

[0214]

5

<110> Novo Nordisk A/S
Norgaard, Per

10

<120> Método para hacer polipéptidos de insulina madurada
<130> 7393.204-WO

<160> 47

15

<170> Versión de patentIn 3.3

ES 2 464 282 T3

<210> 1
<211> 4
<212> PRT
<213> Saccharomyces cerevisiae
5 <220>
<223> Péptido C

<400> 1

Asp Asp Leu Gly
1
10

<210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial
15 <220>
<223> Péptido C

<400> 2

Asp Asp Asp Leu Gly
1 5
20

<210> 3
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial
25 <400> 3

Glu Ala Glu Ala
1
30

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial
35 <220>
<223> Péptido C
40 <220>
<221> X
<222> (2)..(2)
<223> X puede ser seleccionado de A, R, N, D, N, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y y V.
45

<400> 4

Asp Xaa Asp Leu Gly
1 5
50

<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial
55 <220>
<223> Péptido C

<400> 5

Asp Ala Asp Leu Gly
1 5
60

ES 2 464 282 T3

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

<220>
<223> Péptido C

10 <400> 6

Asp Arg Asp Leu Gly
1 5

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

20 <220>
<223> Péptido C

<400> 7

Asp Asn Asp Leu Gly
1 5

30 <210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido C

35 <400> 8

Asp Cys Asp Leu Gly
1 5

40 <210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido C

45 <400> 9

Asp Gln Asp Leu Gly
1 5

50 <210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido C

55 <400> 10

Asp Glu Asp Leu Gly
1 5

60 <210> 11

ES 2 464 282 T3

<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> Péptido C

<400> 11

10 Asp Gly Asp Leu Gly
1 5

<210> 12
<211> 5
<212> PRT
15 <213> Artificial

<220>
<223> Péptido C

20 <400> 12

Asp His Asp Leu Gly
1 5

<210> 13
<211> 5
25 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido C

30 <400> 13

Asp Ile Asp Leu Gly
1 5

<210> 14
<211> 5
35 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
40 <223> Péptido C

<400> 14

Asp Leu Asp Leu Gly
1 5

45 <210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<223> Péptido C

<400> 15

Asp Lys Asp Leu Gly
1 5

55 <210> 16
<211> 5
<212> PRT
60 <213> Artificial

ES 2 464 282 T3

<220>
<223> Péptido C

<400> 16

5 Asp Met Asp Leu Gly
1 5

<210> 17
<211> 5
<212> PRT
10 <213> Artificial

<220>
<223> Péptido C

15 <400> 17

Asp Phe Asp Leu Gly
1 5

<210> 18
<211> 5
20 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido C

25 <400> 18

Asp Pro Asp Leu Gly
1 5

<210> 19
<211> 5
30 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido C

35 <400> 19

Asp Ser Asp Leu Gly
1 5

<210> 20
<211> 5
40 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido C

45 <400> 20

Asp Thr Asp Leu Gly
1 5

50 <210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

55 <220>
<223> Péptido C

<400> 21

Asp Trp Asp Leu Gly
1 5

5 <210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Péptido C
<400> 22

Asp Tyr Asp Leu Gly
1 5

15 <210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Péptido C

<400> 23
Asp Val Asp Leu Gly
1 5

25 <210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> Péptido C

35 <220>
<221> X
<222> (3)..(3)

<400> 24

Asp Asp Xaa Leu Gly
1 5

40 <210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> Péptido C

<400> 25

Asp Asp Ala Leu Gly
1 5

50 <210> 26
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

55 <220>
<223> Péptido C

<400> 26

ES 2 464 282 T3

Asp Asp Arg Leu Gly
1 5

5 <210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Péptido C
<400> 27

Asp Asp Asn Leu Gly
1 5

15 <210> 28
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Péptido C
<400> 28

Asp Asp Cys Leu Gly
1 5

25 <210> 29
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> Péptido C
<400> 29

Asp Asp Gln Leu Gly
1 5

35 <210> 30
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> Péptido C
<400> 30

Asp Asp Glu Leu Gly
1 5

45 <210> 31
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<223> Péptido C

55 <400> 31

Asp Asp Gly Leu Gly
1 5

ES 2 464 282 T3

<210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial
5
<220>
<223> Péptido C

<400> 32
10 Asp Asp His Leu Gly
1 5

<210> 33
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial
15
<220>
<223> Péptido C
20
<400> 33
1 Asp Asp Ile Leu Gly
1 5

<210> 34
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial
25
<220>
<223> Péptido C
30
<400> 34
1 Asp Asp Leu Leu Gly
1 5

<210> 35
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial
35
<220>
<223> Péptido C
40
<400> 35
1 Asp Asp Lys Leu Gly
1 5

<210> 36
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial
45
<220>
<223> Péptido C
50
<400> 36
1 Asp Asp Met Leu Gly
1 5

<210> 37
<211> 5
<212> PRT
60

ES 2 464 282 T3

<213> Artificial

<220>
<223> Péptido C

5 <400> 37

Asp Asp Phe Leu Gly
1 5

<210> 38
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> Péptido C

15 <400> 38

Asp Asp Pro Leu Gly
1 5

20 <210> 39
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido C

25 <400> 39

Asp Asp Ser Leu Gly
1 5

30 <210> 40
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Péptido C

<400> 40

40 Asp Asp Thr Leu Gly
1 5

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

45 <220>
<223> Péptido C

50 <400> 41

Asp Asp Trp Leu Gly
1 5

<210> 42
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

55 <220>
<223> Péptido C

60

ES 2 464 282 T3

```

<400> 42
                                Asp Asp Tyr Leu Gly
                                1           5

5  <210> 43
    <211> 5
    <212> PRT
    <213> Artificial

    <220>
10  <223> Péptido C

    <400> 43
                                Asp Asp Val Leu Gly
                                1           5

15  <210> 44
    <211> 205
    <212> ADN
    <213> Homo sapiens

20  <400> 44
                                ccatggctaa gagattcgtt aaccaacact tgtgcgggtc ccaattgggt gaagctttgt      60
                                acttggtttg cggtgaaaga ggtttccact acactcctaa gaotctagcg agaagagact      120
                                tgggtaagag aggtattgtc gaacaaatgct gtacatcgat atgotccttg gaacaattgg      180
                                aaaactactg caactagact ctaga                                     205

25  <210> 45
    <211> 9
    <212> PRT
    <213> Artificial

30  <220>
    <223> Péptido C

    <400> 45
                                Leu Ala Arg Arg Asp Leu Gly Lys Arg
                                1           5

35  <210> 46
    <211> 59
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

40  <400> 46

```

ES 2 464 282 T3

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

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

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

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

- <210> 47
- 5 <211> 8
- <212> PRT
- <213> Artificial

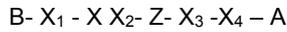
- <220>
- 10 <223> Péptido C

- <400> 47

Leu Gly Arg Arg Glu Ala Glu Ala
1 5

REIVINDICACIONES

5 1. Método para hacer insulina humana madura o un derivado análogo por cultivo de una célula fúngica que comprende una secuencia de ADN que codifica un precursor para la insulina humana o un análogo de insulina humana con la secuencia



10 donde B es la cadena B de insulina humana o un derivado análogo, A es la cadena A de insulina humana o un derivado análogo, X₁ es una secuencia peptídica de 2 residuos de aminoácidos que pueden ser los mismos o diferentes y que son seleccionados del grupo que consiste en Phe, Leu, Ile, Val y Ala, y que facilitarán una escisión más eficaz de Kex2 en la célula fúngica, X₂ es un sitio de escisión Kex2, Z es una secuencia peptídica con residuos de aminoácidos de 1 a 35 o un enlace peptídico, X₃ es un sitio de escisión Kex2 y X₄ es un enlace peptídico.

15 2. Método según la reivindicación 1, donde el residuo de aminoácido N-terminal de X₁ es Leu.

3. Método según la reivindicación 1, donde Z tiene de 1 a 5 residuos de aminoácidos que pueden ser los mismos o diferentes.

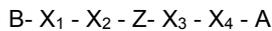
20 4. Método según la reivindicación 1, donde Z tiene de 3-5 residuos de aminoácidos que pueden ser los mismos o diferentes.

25 5. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde X₁ es posteriormente escindido de la cadena B mediante una carboxipeptidasa dando insulina humana madura o un derivado análogo.

6. Método de acuerdo con la reivindicación 5, donde la carboxipeptidasa se añade al medio de cultivo.

7. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde la célula fúngica es una célula de levadura.

30 8. Precursor para la insulina humana o un análogo de insulina humana con la secuencia



35 donde B es la cadena B de insulina humana o un derivado análogo, A es la cadena A de insulina humana o un derivado análogo, X₁ es una secuencia peptídica de 2 residuos de aminoácidos que pueden ser los mismos o diferentes y que son seleccionados del grupo que consiste en Phe, Leu, Ile, Val y Ala, y que facilitarán una escisión de Kex2 más eficaz en la célula fúngica, X₂ es un sitio de escisión Kex2, Z es una secuencia peptídica con residuos de aminoácidos de 1 a 35 o un enlace peptídico, X₃ es un sitio de escisión Kex2 y X₄ es un enlace peptídico.

40 9. Secuencia de ADN que codifica el precursor para la insulina humana o un análogo de insulina humana según la reivindicación 8.

Figura 1

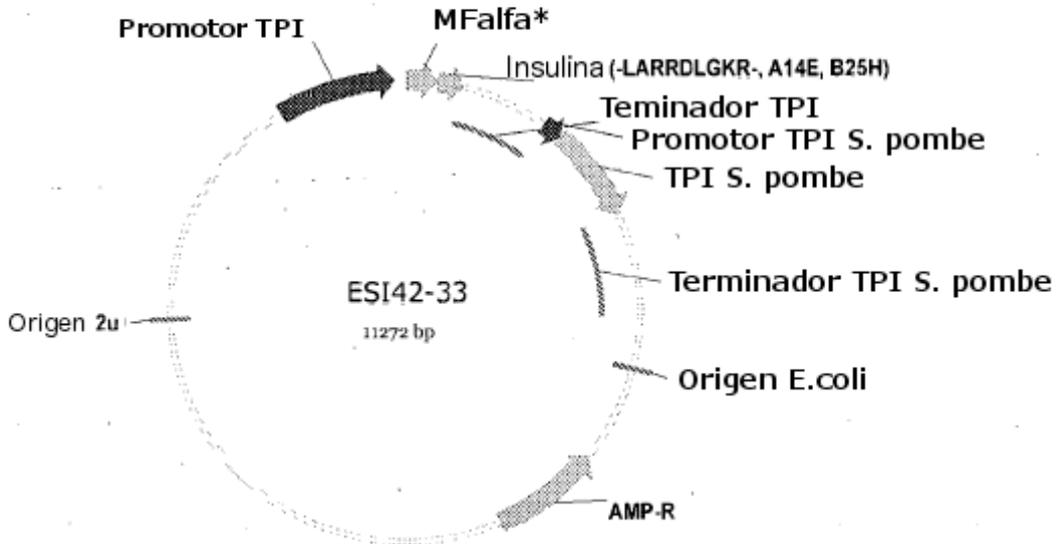


Figura 2

NcoI

~~~~~

SerMet AlaLysArg PheValAsnGln HisLeuCys GlySerHis LeuValGluAla  
 CCAT GGCTAAGAGA TTCGTTAACC AACACTTGTG CGGTTCCCAC TTGGTTGAAG  
 GGTA CCGATTCTCT AAGCAATTGG TTGTGAACAC GCCAAGGGTG AACCAACTTC

LeuTyrLeu ValCysGly GluArgGlyPhe HisTyrThr ProLysThr LeuAlaArgArg  
 CTTTGTACTT GGTTTGCGGT GAAAGAGGTT TCCACTACAC TCCTAAGACT CTAGCGAGAA  
 GAAACATGAA CCAAACGCCA CTTTCTCCAA AGGTGATGTG AGGATTCTGA GATCGCTCTT

AspLeuGly LysArgGly IleValGluGln CysCysThr SerIleCys SerLeuGluGln  
 GAGACTTGGG TAAGAGAGGT ATTGTCGAAC AATGCTGTAC ATCGATATGC TCCTTGGAAC  
 CTCTGAACCC ATTCTCTCCA TAACAGCTTG TTACGACATG TAGCTATACG AGGAACCTTG

XbaI

~~~~~

LeuGluAsn TyrCysAsn ***
 AATTGGAAAA CTACTGCAAC TAGACTCTAG A
 TTAACCTTTT GATGACGTTG ATCTGAGATC T

Figura 3

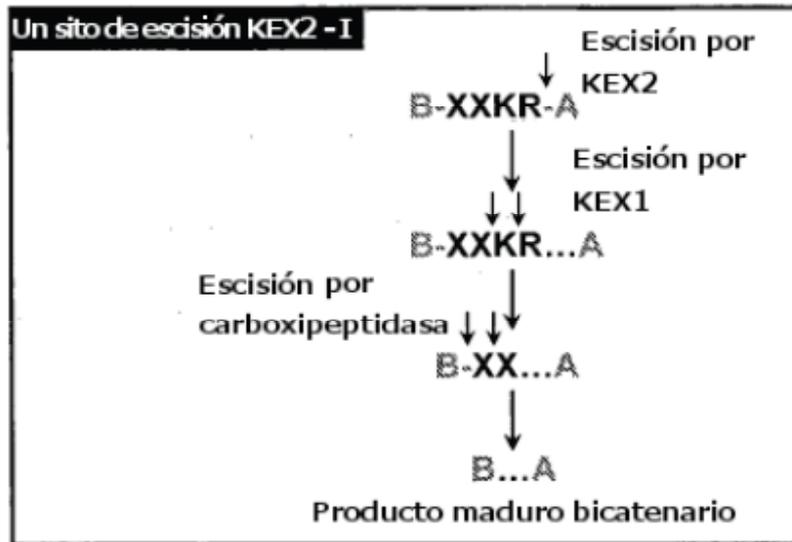


Figura 4

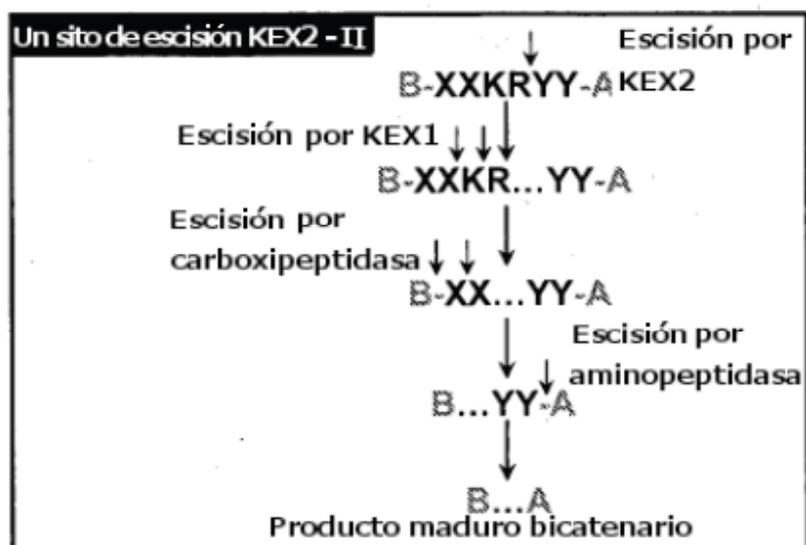


Figura 5

