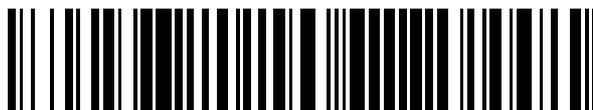


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 522 627**

51 Int. Cl.:

C07K 1/113 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2009 E 09738542 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 2274318**

54 Título: **Procedimientos para el replegamiento de insulina**

30 Prioridad:

30.04.2008 IN MU09542008

30.04.2008 IN MU09552008

18.07.2008 IN MU15182008

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

17.11.2014

73 Titular/es:

**WOCKHARDT LIMITED (100.0%)
D-4, MIDC Industrial Area Chikalthana
Aurangabad 431210, IN**

72 Inventor/es:

**EDUPUGANTI B, RAJU;
JAGIRDAR, HASEEB;
KUMAR, MANISH;
PARTHIPAN, JAYARAMAN;
YADAV, VIVEK y
SAHIB, MAHARAJ K**

74 Agente/Representante:

ZUAZO ARALUZE, Alexander

ES 2 522 627 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).

PROCEDIMIENTOS PARA EL REPLEGAMIENTO DE INSULINA**DESCRIPCIÓN****5 Campo de la invención**

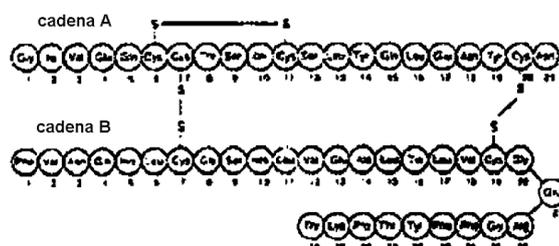
La invención se refiere a procedimientos para obtener un precursor de insulina, análogos de insulina o derivados de los mismos que tiene puentes de cistina unidos correctamente. El procedimiento incluye solubilizar un precursor de proinsulina que tiene puentes de cistina unidos incorrectamente en una disolución acuosa o un tampón que contiene uno o ambos de cisteína o clorhidrato de cisteína y uno o más de agentes auxiliares caotrópicos. Entonces se repliegan los precursores solubilizados añadiendo un diluyente a la mezcla solubilizada (dilución inversa). Además, los precursores solubilizados, en los que la concentración de precursor es de más de 0,65 g/litro, también pueden repliarse diluyendo la mezcla de reacción con un diluyente que contiene aproximadamente el 5-40% v/v de alcohol isopropílico.

15

Antecedentes de la invención

La insulina es una hormona proteica que consiste en una cadena A ácida de 21 residuos de aminoácido y una cadena B básica de 30 aminoácidos. La cadena A y la cadena B están unidas entre sí por seis residuos de cisteína que forman tres enlaces disulfuro entre las siguientes posiciones: A 6-A 11; A 7-B 7; A 20-B 19.

20



Los tres enlaces disulfuro son importantes en el mantenimiento de la conformación nativa y las actividades biológicas de la molécula de insulina. La insulina se pliega para dar una estructura tridimensional única compuesta principalmente por tres segmentos de hélice α (A2-A8, A13-A19 y B9-B19) estabilizados por sus tres enlaces disulfuro.

25

Los análogos y derivados de insulina difieren de la insulina humana en una o más de una posición de aminoácido y/o longitud de cadena de aminoácidos.

30

La insulina, análogos y derivados de insulina se preparan usando tecnología de ADN recombinante en *E. coli* o levadura. Cuando se usa *E. coli* como célula huésped, la insulina expresada no estará en su conformación soluble y biológicamente activa, nativa. A diferencia de la proteína nativa, se acumulan cuerpos de inclusión inactivos en la célula huésped. Estos cuerpos de inclusión contienen proteína recombinante en una forma altamente enriquecida con plegamiento incorrecto. Como consecuencia, la proteína recombinante debe aislarse, repliarse en condiciones adecuadas y convertirse enzimáticamente en la insulina biológicamente activa.

35

Existen dos cuestiones importantes en la recuperación de proteínas activas a partir de cuerpos de inclusión.

40

Éstas incluyen:

(a) Solubilización de proinsulinas, y

(b) Replegamiento de proinsulinas.

45

Se usan comúnmente agentes caotrópicos y detergentes como agentes solubilizantes. Actúan como agentes desnaturizantes de proteína. Los agentes caotrópicos rompen los puentes de hidrógeno en disolución, alterando así las interacciones intermoleculares e intramoleculares con desplegamiento parcial o completo de la estructura proteica.

50

Una clave para el procedimiento de solubilización es la adición de un agente reductor para mantener residuos de cisteína en el estado reducido y así impedir la formación de disulfuro intramolecular e intermolecular no nativo en disoluciones de proteína altamente concentradas a pH alcalino.

55

El replegamiento se logra mediante la eliminación de agentes desnaturizantes en exceso mediante dilución, intercambio de tampón, diafiltraciones, cromatografía de filtración en gel o inmovilización sobre un soporte sólido. Debido a su simplicidad, habitualmente se prefiere la dilución para el replegamiento de proteínas a escala industrial.

La concentración de proteína presente en una mezcla de solubilización que contiene agente reductor y agente auxiliar caotrópico desempeña un papel importante en la decisión del rendimiento final de proinsulinas plegadas correctamente. Como la concentración de proteína en medios de solubilización que contienen tanto cisteína como agente auxiliar caotrópico está aumentada, la probabilidad de agregación o precipitación de proteínas aumenta debido al aumento de la interacción.

El otro factor que da como resultado la agregación de moléculas de proteína es el cambio repentino en la concentración de agente desnaturizante, que fuerza a las moléculas de proteína a colapsarse para dar una estructura compacta que da como resultado precipitación o agregación.

Cuando se elimina el agente desnaturizante durante el replegamiento, el efecto hidrófobo hace que la molécula de proteína no plegada secuestre sus grupos hidrófobos, conduciendo a agregación. Para la aplicación industrial es deseable eliminar o minimizar la formación de agregados de proteína.

Las patentes estadounidenses n.^{os} 5.663.291; 5.473.049; 5.986.048; 6.380.355 y la solicitud de patente estadounidense 20070106063 dan a conocer procedimientos para obtener un precursor de insulina o derivados de insulina del mismo que tienen puentes de cistina unidos correctamente. Además, el documento RU2141531 da a conocer un método de replegamiento del precursor de insulina que implica la disolución de cuerpos de inclusión con urea/ditiotreitol presentes al mismo tiempo y la purificación posterior en alcohol isopropílico al 40%.

Winter, J. *et al.* Renaturation of human proinsulin-a study on refolding and conversion to insulin. *Analytical biochemistry* (2002), 310 (2), 148-155 dan a conocer el replegamiento de proinsulina humana en condiciones redox adecuadas.

Sumario de la invención

En un aspecto general se proporciona un procedimiento para obtener un precursor de insulina, análogos de insulina o derivados de los mismos que tienen puentes de cistina unidos correctamente, comprendiendo el procedimiento:

a. mezclar un precursor de insulina, análogos de insulina o derivados de los mismos que tienen puentes de cistina unidos incorrectamente con una disolución acuosa o un tampón que contiene tanto cisteína o clorhidrato de cisteína como uno o más de agentes auxiliares caotrópicos, a un pH de aproximadamente 8 a aproximadamente 11,5 y a una temperatura de aproximadamente 2°C a aproximadamente 55°C, en el que la concentración de precursor es de más de 0,65 g/litro;

b. diluir de manera inversa añadiendo lentamente un diluyente a la mezcla de reacción de la etapa (a), a un pH de aproximadamente 8 a aproximadamente 11,5 y a una temperatura de aproximadamente 2°C a aproximadamente 40°C; y

c. aislar el precursor de insulina, análogos de insulina y derivados de los mismos que tienen puentes de cistina unidos correctamente.

El término “análogo de insulina humana” (y expresiones similares) tal como se usa en el presente documento se refiere a insulina humana en la que uno o más aminoácidos se han delecionado y/o se han sustituido por otros aminoácidos, incluyendo aminoácidos no codificables, o insulina humana que comprende aminoácidos adicionales, es decir más de 51 aminoácidos.

El término “derivados de insulina humana” (y expresiones similares) tal como se usa en el presente documento se refiere a insulina humana o un análogo de la misma en la que al menos un sustituyente orgánico está unido a uno o más de los aminoácidos.

En otro aspecto general se proporciona un procedimiento para obtener un precursor de insulina, análogos de insulina o derivados de los mismos que tienen puentes de cistina unidos correctamente, comprendiendo el procedimiento:

a. mezclar un precursor de insulina, análogos de insulina o derivados de los mismos que tienen puentes de cistina unidos incorrectamente con una disolución acuosa o un tampón que comprende cisteína o clorhidrato de cisteína y uno o más de agentes auxiliares caotrópicos, a un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 11,5 y a una temperatura de aproximadamente 15°C a aproximadamente 55°C; en el que la concentración de precursor es de más de 0,65 g/litro,

b. mezclar la mezcla de reacción de la etapa (a) con un diluyente que contiene el 5-40% (v/v) de alcohol isopropílico, a un pH de 8 a 11,5 y una temperatura de 2°C a 40°C; y

c. aislar el precursor de insulina, análogos de insulina y derivados de los mismos que tienen puentes de

cistina unidos correctamente.

5 Las realizaciones del procedimiento para obtener el precursor de insulina, análogo de insulina o derivados de los mismos que tienen puentes de cistina unidos correctamente pueden incluir una o más de las siguientes características. El procedimiento puede incluir además tampones, disolventes, aditivos, agentes auxiliares caotrópicos, y similares.

10 Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y las reivindicaciones.

Descripción detallada de la invención

15 Los inventores han descubierto ahora que cuando se solubilizan precursores de proinsulina que tienen puentes de cistina unidos incorrectamente en una disolución que contiene tanto cisteína o clorhidrato de cisteína como agente auxiliar caotrópico y luego se diluyen los precursores solubilizados añadiendo un diluyente en la mezcla solubilizada (dilución inversa), el procedimiento da como resultado un aumento del rendimiento del precursor de proinsulina plegado correctamente como resultado de la reducción de la agregación forzada. Además, los inventores han encontrado sorprendentemente que hay un aumento en el rendimiento de precursores de insulina solubilizados cuando la concentración de precursor de insulina es de más de 0,65 g/l en fase de solubilización debido al aumento de las velocidades de reacción. Al aumentar el rendimiento de estas proteínas solubilizadas, hay un aumento posterior en el rendimiento de la proteína plegada correctamente cuando se diluyen estas proteínas solubilizadas usando un tampón de replegamiento que contiene opcionalmente disolventes alcohólicos o apróticos.

25 Los procedimientos pueden aplicarse a escala industrial y son rentables. Todo el procedimiento puede llevarse a cabo en un solo recipiente.

30 La concentración de cisteína o clorhidrato de cisteína en la etapa (a) varía desde aproximadamente 20 mM hasta aproximadamente 60 mM.

Los agentes auxiliares caotrópicos pueden seleccionarse del grupo que consiste en sulfato de amonio, clorhidrato de guanidina, carbonato de etileno, tiocianato, dimetilsulfóxido y urea.

35 En una de las realizaciones, el agente auxiliar caotrópico es urea o clorhidrato de guanidina.

En otra realización de la invención, la concentración de agente auxiliar caotrópico es desde aproximadamente 5 M hasta aproximadamente 10 M.

40 Los tampones adecuados para llevar a cabo la reacción en la etapa (a) incluyen uno o más de tampón glicina, tampón fosfato, tampón Tris y tampón etanolamina.

En una de las realizaciones de la presente invención, el tampón es tampón Tris.

45 El diluyente adecuado para llevar a cabo la dilución en la etapa (b) incluye uno o más de agua, tampón glicina, tampón fosfato, tampón Tris y tampón etanolamina, alcohol C₁-C₄ y disolución de cisteína o clorhidrato de cisteína.

En una de las realizaciones de la presente invención, el diluyente es tampón Tris.

50 En otra realización de la invención, el disolvente alcohólico o aprótico puede seleccionarse del grupo que consiste en metanol, etanol, isopropanol, n-propanol, t-butanol, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, N-metilpirrolidona, tetrahidrofurano, dioxano y acetónitrilo.

Aún en otra realización de la invención, el disolvente alcohólico es alcohol isopropílico.

55 En otra realización de la invención, la disolución acuosa o tampón en la etapa (a) puede comprender además uno o más aditivos.

60 Los aditivos adecuados incluyen ácido etilendiaminetetraacético, ácido etilenglicoltetraacético (EGTA), arginina, metionina, prolina, glicina, alanina, azúcares, polioles, sales tales como sulfato de amonio y cloruro de magnesio, y ciclodextrinas o sales de las mismas.

En una de las realizaciones de la invención, el aditivo añadido al disolvente de la etapa (a) es ácido etilendiaminetetraacético.

65 En otra realización de la invención, la temperatura de la etapa (a) está en el intervalo de aproximadamente 2°C a aproximadamente 25°C.

En otra realización de la invención, la etapa (b) se lleva a cabo en un intervalo de temperatura de 2°C a aproximadamente 25°C.

5 En otra realización de la invención, la etapa (a) se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 8 a aproximadamente 9,5.

En otra realización de la invención, la etapa (b) se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 8 a aproximadamente 9,5.

10 En una de las realizaciones de la invención, el precursor de la insulina o un derivado de insulina del mismo, tiene la secuencia según la fórmula I



15 en la que

R² es

- 20 a. un átomo de hidrógeno,
- b. un residuo de aminoácido del grupo que consiste en lisina (Lys) y arginina (Arg),
- o
- 25 c. un péptido que tiene de 2 a 45 residuos de aminoácido, que comprende el residuo de aminoácido lisina (Lys) o arginina (Arg) en el extremo carboxilo del péptido;

R¹ es un residuo de fenilalanina (Phe) o un enlace covalente;

30 R⁴ corresponde a la posición B-3 de la insulina humana y es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en asparagina, lisina y prolina

R⁵-R⁶-R⁷ corresponde a la posición B-28, B-29 y B-30 de la cadena de la insulina humana respectivamente.

35 R⁵ puede seleccionarse del grupo que consiste en asparagina, lisina, leucina, prolina, valina, ácido aspártico, ácido glutámico y alanina opcionalmente sustituidos con un grupo acilo que tiene al menos 10 átomos de carbono.

R⁶ puede seleccionarse del grupo que consiste en lisina, ácido glutámico y prolina opcionalmente sustituidos con un grupo acilo que tiene al menos 10 átomos de carbono.

40 R⁷ puede seleccionarse del grupo que consiste en treonina, des-treonina, alanina y serina.

(B2 y B4-B27) son los residuos de aminoácido en las posiciones B2, B4 a B27 de la cadena B de la insulina humana, insulina animal o un derivado de insulina de las mismas;

45 X es

- i. un residuo de aminoácido del grupo que consiste en lisina (Lys) y arginina (Arg), o
- 50 ii. un péptido que tiene de 2 a 35 residuos de aminoácido, que comprende el residuo de aminoácido lisina (Lys) o arginina (Arg) en el extremo N-terminal y en el extremo carboxilo del péptido, o
- iii. un péptido que tiene de 2 a 35 aminoácidos que pueden codificarse genéticamente, que comprende de 1 a 5

55 (A2-A20) son los residuos de aminoácido en las posiciones A2 a A20 de la cadena A de la insulina humana, insulina animal o un derivado de insulina de las mismas, y

60 R³ es un residuo de aminoácido que puede codificarse genéticamente.

La secuencia de aminoácidos de péptidos y proteínas se indica desde el extremo N-terminal de la cadena de aminoácidos hacia delante. Los detalles en la fórmula I entre paréntesis, por ejemplo A6, A20, B2, B4, B7 o B19, corresponden a la posición de residuos de aminoácido en las cadenas A o B de la insulina.

65 El término "residuo de aminoácido que puede codificarse genéticamente" representa los aminoácidos Gly, Ala, Ser, Thr, Val, Leu, Ile, Asp, Asn, Glu, Gln, Cys, Met, Arg, Lys, His, Tyr, Phe, Trp, Pro y selenocisteína.

5 Los términos “residuos A2-A20” y “residuos B2-B29” de “insulina animal” se entiende que significan, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de insulina de reses, cerdos o pollos. Los términos “residuos A2-A20” y “B2-B29” de derivados de insulina representan las secuencias de aminoácidos correspondientes de la insulina humana, que se forman mediante el remplazo de aminoácidos por otros aminoácidos que pueden codificarse genéticamente.

La cadena A de la insulina humana tiene la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 1):

10 Glylle Val GluGlnCysCysThr Ser IleCys Ser LeuTyrGlnLeuGluAsnTyrCysAsn.

La cadena B de la insulina humana tiene la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 2):

PheVal AsnGln His LeuCysGly Ser His Leu Val Glu Ala LeuTyrLeu Val CysGlyGluArgGlyPhePheTyrThr Pro LysThr.

15 El procedimiento según la invención es particularmente adecuado para obtener un precursor de insulina o un derivado de insulina que tiene la fórmula I, cuyos puentes de cistina (no mostrados en la fórmula I) están plegados correctamente, en la que

20 R² es

a) un átomo de hidrógeno, o

b) un péptido que tiene de 2 a 15 residuos de aminoácido, en cuyo extremo carboxilo se encuentra un residuo de arginina (Arg);

25 R¹ es un residuo de fenilalanina (Phe);

R⁴ es asparagina o lisina;

30 R⁵ es lisina, prolina, ácido glutámico o ácido aspártico;

R⁶ es lisina, prolina, ácido glutámico opcionalmente sustituidos con un grupo acilo que tiene al menos 10 átomos de carbono;

35 R⁷ es treonina o des-treonina;

(B2 y B4-B27) son los residuos de aminoácido en las posiciones B2, B4 a B27 de la cadena B de la insulina humana;

40 X es el residuo de aminoácido arginina (Arg) o un péptido que tiene de 2 a 35 residuos de aminoácido, en el que al principio y al final del péptido hay dos residuos de aminoácido básicos, en particular arginina (Arg) y/o lisina (Lys);

El residuo Z que codifica para un aminoácido extra en la cadena B de la insulina o análogos de insulina o derivados de los mismos, por norma general, es parte de X en la secuencia de aminoácidos del precursor de fórmula I.

45 (A2-A20) son los residuos de aminoácido en las posiciones A2 a A20 de la cadena A de la insulina humana; y

R³ es el residuo de aminoácido asparagina (Asn), serina (Ser) o glicina (Gly).

50 En la insulina glargina, R³ en la fórmula I es glicina (Gly), R¹ es fenilalanina (Phe), R⁴ es asparagina, R⁵ es prolina, R⁶ es lisina, R⁷ es treonina y Z es un residuo de arginina (Arg) o un residuo peptídico Arg-Arg-OH.

En la insulina Lispro, R³ en la fórmula I es asparagina (Asn), R¹ es fenilalanina (Phe), R⁴ es asparagina, R⁵ es lisina, R⁶ es prolina, R⁷ es treonina.

55 El procedimiento de la presente invención puede realizarse en un solo recipiente. El precursor de insulina, análogo de insulina o derivados de los mismos que tienen puentes de cistina unidos correctamente pueden obtenerse añadiendo el precursor de insulina, análogo de insulina o derivados de los mismos que tienen puentes de cistina unidos incorrectamente en un recipiente. Se añade una disolución acuosa o un tampón que contiene cisteína o clorhidrato de cisteína y uno o más agentes auxiliares caotrópicos al recipiente que contiene precursor, a un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 11,5 y a una temperatura de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 55°C. Tras aproximadamente 4 h, se añade lentamente un diluyente al recipiente que contiene la mezcla de reacción a un pH de aproximadamente 8 a aproximadamente 11,5 y una temperatura de aproximadamente 2°C a aproximadamente 40°C. La mezcla de reacción diluida se agita durante aproximadamente 24 h. Tras 24 h, se aísla

entonces el precursor de insulina, análogos de insulina y derivados de los mismos que tienen puentes de cistina unidos correctamente de la mezcla de reacción.

5 El precursor de fórmula I puede producirse en microorganismos con la ayuda de un constructo genético, que se expresa en *Escherichia coli* o estreptomicetos durante la fermentación usando el procedimiento conocido en la técnica.

10 La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que se proporcionan simplemente a modo de ejemplo de la invención y no limitan el alcance de la invención. Determinadas modificaciones y equivalentes resultarán evidentes para los expertos en la técnica y se pretende que se incluyan dentro del alcance de la invención.

Ejemplo 1: Cuantificación de precursor de insulina en cuerpos de inclusión

15 Tras completarse la fermentación, se separaron las células mediante centrifugación y se alteraron mediante homogenización a alta presión habitual. Se aislaron los cuerpos de inclusión de proteínas de fusión liberados mediante centrifugación. Se liofilizaron los cuerpos de inclusión aislados que tenían secuencia de proinsulina. Se determinó la cantidad de precursor de insulina en los cuerpos de inclusión mediante HPLC.

20 Se disolvieron 100 mg de cuerpos de inclusión en 100 ml de una disolución de urea 8 M que contenía 100 mM de ditiotreitól. Se mezcló la disolución apropiadamente y entonces se calentó a 95°C durante 5 min. Se centrifugó la disolución durante 10 min a 10000 rpm y se aplicaron 0,002 ml en una columna HPLC para la cuantificación.

Condiciones de HPLC analítica:

25

Velocidad de flujo: 1 ml/min

Detección UV: 214 nm

30

Columna: Spherisorb C 18 de Waters, 4,6 X 250 mm, 5 micrómetros, 120 Å

Tampón A: el 90% de agua, el 10% de acetonitrilo y TFA al 0,1%

Tampón B: el 20% de agua, el 80% de acetonitrilo y TFA al 0,15

35

Temperatura de la columna: 40°C

Se equilibró la columna con el 10% de tampón B antes de la inyección de la muestra.

40 La elución en gradiente comienza tras 2 min de inyección y aumenta hasta el 100% de B en 25 minutos. El tiempo de análisis total fue de 30 min.

Ejemplo 2: Procedimiento para obtener un precursor de insulina cuyos puentes de cistina están plegados correctamente

45

Se recogió la proteína de fusión expresada como cuerpos de inclusión insolubles que tenía la secuencia de proinsulina 1 (SEQ ID NO: 3) a partir de células de *E. coli*.

Secuencia de proinsulina 1 (SEQ ID NO: 3)

50

Ala ThrThr Ser ThrGlyAsn Ser Ala ArgPhe Val AsnGln His LeuCysGly Ser His Leu
Val Glu Ala LeuTyrLeu Val CysGlyGluArgGlyPhePheTyrThr Pro LysThrArgArgGlu
Ala Glu Asp LeuGln Val GlyGln Val GluLeuGlyGlyGly Pro Gly Ala Gly Ser LeuGln
Pro Leu Ala LeuGluGly Ser LeuGlnLysArgGlyIle Val GluGlnCysCysThr Ser IleCys
Ser LeuTyrGlnLeuGluAsnTyrCysAsn

X es el péptido C de la insulina humana (SEQ ID NO: 4);

ArgArgGlu Ala Glu Asp LeuGln Val GlyGln Val GluLeuGlyGlyGly Pro Gly Ala
Gly Ser LeuGln Pro Leu Ala LeuGluGly Ser LeuGlnLysArg.

55

Ejemplo 2A: Replegamiento mediante dilución directa

Se añadieron 480 g de urea, 9,08 g de clorhidrato de L-cisteína y 0,75 g de sal disódica del ácido etilendiaminatetraacético a un litro de tampón Tris 20 mM y se ajustó el pH de la disolución a 8,5 con disolución de hidróxido de sodio 5 N. Se vertió esta disolución en un recipiente. Se pesó una cantidad igual a 40 g de cuerpos de inclusión liofilizados aislados que contenían 16 g de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 1 (SEQ ID NO: 3) (se determinó la parte de proteína de fusión que contenía insulina con la ayuda de HPLC, era del 40%) y se disolvió en la disolución anterior que contenía tanto L-cisteína como urea. Se agitó la disolución durante una hora a temperatura ambiente. Se ajustó el pH de la disolución a 10,6 con hidróxido de sodio 5 N y se continuó agitando adicionalmente durante 1 h a temperatura ambiente. Se añadió lentamente la mezcla solubilizada a 29 litros de tampón Tris (20 mM) enfriado previamente ($10\pm 2^{\circ}\text{C}$) que contenía EDTA 2 mM a pH 10,6. Se ajustó el pH de la mezcla de reacción a 10,6 con disolución de hidróxido de sodio 5 N. Se agitó la mezcla de replegamiento diluida durante 24 h. Tras 24 h, se determinó el contenido de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 1 que tenía puentes de cistina unidos correctamente en la mezcla de reacción con la ayuda de HPLC. Se recuperaron 8,0 g de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 1 plegado correctamente (corresponde a una recuperación del 50%).

Ejemplo 2B: Replegamiento tras dilución inversa

Se añadieron 480 g de urea, 9,08 g de clorhidrato de L-cisteína y 0,75 g de sal disódica del ácido etilendiaminatetraacético a un litro de tampón Tris 20 mM y se ajustó el pH de la disolución a 8,5 con disolución de hidróxido de sodio 5 N. Se vertió esta disolución en un recipiente. Se pesó una cantidad igual a 40 g de cuerpos de inclusión liofilizados aislados que contenían 16 g de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 1 (se determinó la parte de proteína de fusión que contenía insulina con la ayuda de HPLC, era del 40%) y se disolvió en la disolución anterior que tenía tanto cisteína como urea. Se agitó la disolución durante 1 h a temperatura ambiente. Se ajustó el pH de la disolución a 10,6 con hidróxido de sodio 5 N y se continuó agitando adicionalmente durante 1 h a temperatura ambiente. A la mezcla solubilizada anterior se le añadieron lentamente 29 litros de tampón Tris (20 mM) enfriado previamente ($10\pm 2^{\circ}\text{C}$) que contenía EDTA 2 mM a pH 10,6. Se ajustó el pH de la mezcla de reacción a 10,6 con disolución de hidróxido de sodio 5 N. Se agitó la mezcla de replegamiento durante 24 h a ($10\pm 2^{\circ}\text{C}$). Tras 24 h, se determinó el contenido de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 1 que tenía puentes de cistina unidos correctamente en la mezcla de reacción con la ayuda de HPLC. Se recuperaron 9,83 g de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 1 plegado correctamente (corresponde a una recuperación del 61,6%).

Ejemplo 2C: Replegamiento sin IPA

Se añadieron 573 g de clorhidrato de guanidina, 3,5 g de clorhidrato de L-cisteína y 0,75 g de sal disódica del ácido etilendiaminatetraacético a un litro de tampón Tris 20 mM y se ajustó el pH de la disolución a 8,5 con disolución de hidróxido de sodio 5 N. Se vertió esta disolución en un recipiente. Se pesó una cantidad igual a 8 g de cuerpos de inclusión liofilizados aislados que contenían 3,2 g de precursor de insulina de secuencia 3 (SEQ ID NO: 3) (se determinó la parte de proteína de fusión que contenía insulina con la ayuda de HPLC, era del 40%) y se disolvió en la disolución anterior que tenía tanto L-cisteína como clorhidrato de guanidina. Se agitó la disolución durante cuatro horas a temperatura ambiente y se transfirió a lo largo de un periodo de 4 h a 9 litros de tampón Tris 20 mM enfriado previamente ($10\pm 2^{\circ}\text{C}$) a pH 9,0 que contenía 6,7 g de EDTA, 1,08 g de L-cistina y 773,79 g de clorhidrato de guanidina. Se agitó adicionalmente la mezcla de replegamiento diluida durante 24 h a ($10\pm 2^{\circ}\text{C}$). Tras 24 h, se determinó el contenido de precursor de insulina de secuencia 3 que tenía puentes de cistina unidos correctamente en la mezcla de reacción con la ayuda de HPLC. Se recuperaron 1,12 g de precursor de insulina de secuencia 3 plegado correctamente (corresponde a una recuperación del 35,02%).

Ejemplo 2D: Replegamiento con IPA al 10%

Se añadieron 573 g de clorhidrato de guanidina, 3,5 g de clorhidrato de L-cisteína y 0,75 g de sal disódica del ácido etilendiaminatetraacético a un litro de tampón Tris 20 mM y se ajustó el pH de la disolución a 8,5 con disolución de hidróxido de sodio 5 N. Se vertió esta disolución en un recipiente. Se pesó una cantidad igual a 8 g de cuerpos de inclusión liofilizados aislados que contenían 3,2 g de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 3 (SEQ ID NO: 3) (se determinó la parte de proteína de fusión que contenía insulina con la ayuda de HPLC, era del 40%) y se disolvió en la disolución anterior que tenía tanto L-cisteína como clorhidrato de guanidina. Se agitó la disolución durante cuatro horas a temperatura ambiente y se transfirió a lo largo de un periodo de 4 h a 9 litros de tampón Tris (20 mM) enfriado previamente ($10\pm 2^{\circ}\text{C}$) que contenía 6,7 g de EDTA, 1,08 g de L-cistina, 773,79 g de clorhidrato de guanidina y 1 litro de alcohol isopropílico a pH 9. Se agitó la mezcla de replegamiento diluida durante 24 h a ($10\pm 2^{\circ}\text{C}$). Tras 24 h, se determinó el contenido de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 3 que tenía puentes de cistina unidos correctamente en la mezcla de reacción con la ayuda de HPLC. Se recuperaron 1,39 g de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 3 plegado correctamente (corresponde a una recuperación del 43,55%).

Ejemplo 2E: Replegamiento con IPA al 20%

Se añadieron 573 g de clorhidrato de guanidina, 3,5 g de clorhidrato de L-cisteína y 0,75 g de sal disódica del ácido etilendiaminatetraacético a un litro de tampón Tris 20 mM y se ajustó el pH de la disolución a 8,5 con disolución de hidróxido de sodio 5 N. Se vertió esta disolución en un recipiente. Se pesó una cantidad igual a 8 g de cuerpos de inclusión liofilizados aislados que contenían 3,2 g de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 3 (SEQ ID NO: 3) (se determinó la parte de proteína de fusión que contenía insulina con la ayuda de HPLC, era del 40%) y se disolvió en la disolución anterior que tenía tanto L-cisteína como clorhidrato de guanidina. Se agitó la disolución durante cuatro horas a temperatura ambiente y se transfirió a lo largo de un periodo de 4 h a 9 litros de tampón Tris (20 mM) enfriado previamente ($10\pm 2^\circ\text{C}$) que contenía 6,7 g de EDTA, 1,36 g de L-cistina, 773,79 g de clorhidrato de guanidina y 2 litros de alcohol isopropílico a pH 9. Se agitó la mezcla de replegamiento diluida durante 24 h a ($10\pm 2^\circ\text{C}$). Tras 24 h, se determinó el contenido de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 3 que tenía puentes de cistina unidos correctamente en la mezcla de reacción con la ayuda de HPLC. Se recuperaron 1,52 g de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 3 plegado correctamente (corresponde a una recuperación del 47,64%).

Ejemplo 3: Procedimiento para obtener un precursor de derivados de insulina, cuyos puentes de cistina están plegados correctamente

Se recogió la proteína de fusión expresada como cuerpos de inclusión insolubles que tenía la secuencia de proinsulina 2 (SEQ ID NO: 5) a partir de células de *E. coli*.

Secuencia de proinsulina 1. (SEQ ID NO: 5)

Ala ThrThr Ser ThrGlyAsn Ser Ala ArgPhe Val AsnGln His LeuCysGly Ser His Leu
Val Glu Ala LeuTyrLeu Val CysGlyGluArgGlyPhePheTyrThr Pro LysThrArgArgGlu
Ala Glu Asp LeuGln Val GlyGln Val GluLeuGlyGlyGly Pro Gly Ala Gly Ser LeuGln
Pro Leu Ala LeuGluGly Ser LeuGlnLysArgGlyIle Val GluGlnCysCysThr Ser IleCys
Ser LeuTyrGlnLeuGluAsnTyrCysGly

X es el péptido C de la insulina humana (SEQ ID NO: 4);

ArgArgGlu Ala Glu Asp LeuGln Val GlyGln Val GluLeuGlyGlyGly Pro Gly Ala
Gly Ser LeuGln Pro Leu Ala LeuGluGly Ser LeuGlnLysArg.

Ejemplo 3A: Replegamiento mediante dilución directa

Se añadieron 480 g de urea, 9,08 g de clorhidrato de L-cisteína y 0,75 g de sal disódica del ácido etilendiaminatetraacético a un litro de tampón Tris 20 mM y se ajustó el pH de la disolución a 8,5 con disolución de hidróxido de sodio 5 N. Se vertió esta disolución en un recipiente. Se pesó una cantidad igual a 40 g de cuerpos de inclusión liofilizados aislados que contenían 14 g de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 2 (SEQ ID NO: 5) (se determinó la parte de proteína de fusión que contenía insulina con la ayuda de HPLC, era del 35%) y se disolvió en la disolución anterior que tenía tanto L-cisteína como urea. Se agitó la disolución durante una hora a temperatura ambiente. Se ajustó el pH de la disolución a 10,6 con hidróxido de sodio 5 N y se continuó agitando adicionalmente durante 1 h a temperatura ambiente. Se añadió lentamente la mezcla solubilizada a 29 litros de tampón Tris (20 mM) enfriado previamente ($10\pm 2^\circ\text{C}$) que contenía EDTA 2 mM a pH 10,6. Se ajustó el pH de la mezcla de reacción a 10,6 con disolución de hidróxido de sodio 5 N. Se agitó la mezcla de replegamiento diluida durante 24 h. Tras 24 h, se determinó el contenido de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 2 que tenía puentes de cistina unidos correctamente en la mezcla de reacción con la ayuda de HPLC. Se recuperaron 6,74 g de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 2 plegado correctamente (corresponde a una recuperación del 48,28%).

Ejemplo 3B: Replegamiento tras dilución inversa

Se añadieron 480 g de urea, 9,08 g de clorhidrato de L-cisteína y 0,75 g de sal disódica del ácido etilendiaminatetraacético a un litro de tampón Tris 20 mM y se ajustó el pH de la disolución a 8,5 con disolución de hidróxido de sodio 5 N. Se vertió esta disolución en un recipiente. Se pesó una cantidad igual a 40 g de cuerpos de inclusión liofilizados aislados que contenían 14 g de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 2 (SEQ ID NO: 5) (se determinó la parte de proteína de fusión que contenía insulina con la ayuda de HPLC, era del 35%) y se disolvió en la disolución anterior que contenía tanto L-cisteína como urea. Se agitó la disolución durante 1 h a temperatura ambiente. Se aumentó el pH de la disolución hasta 10,6 con hidróxido de sodio 5 N y se continuó

agitando adicionalmente durante 1 h a temperatura ambiente. A la mezcla solubilizada anterior se le añadieron lentamente 29 litros de tampón Tris (20 mM) enfriado previamente ($10\pm 2^\circ\text{C}$) que contenía EDTA 2 mM a pH 10,6. Se ajustó el pH de la mezcla de reacción a 10,6 con disolución de hidróxido de sodio 5 N. Se mantuvo la mezcla de replegamiento con agitación durante 24 h a ($10\pm 2^\circ\text{C}$). Tras 24 h, se determinó el contenido de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 2 (SEQ ID NO: 5) que tenía puentes de cistina unidos correctamente en la mezcla de reacción con la ayuda de HPLC. Se recuperaron 7,7 g de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 2 plegado correctamente (corresponde a una recuperación del 55,7%).

Ejemplo 3C: Replegamiento sin IPA

Se añadieron 573 g de clorhidrato de guanidina, 3,5 g de clorhidrato de L-cisteína y 0,75 g de sal disódica del ácido etilendiaminatetraacético a un litro de tampón Tris 20 mM y se ajustó el pH de la disolución a 8,5 con disolución de hidróxido de sodio 5 N. Se vertió esta disolución en un recipiente. Se pesó una cantidad igual a 8 g de cuerpos de inclusión liofilizados aislados que contenían 3,2 g de precursor de insulina de secuencia 5 (SEQ ID NO: 5) (se determinó la parte de proteína de fusión que contenía insulina con la ayuda de HPLC, era del 40%) y se disolvió en la disolución anterior que tenía tanto L-cisteína como clorhidrato de guanidina. Se agitó la disolución durante cuatro horas a temperatura ambiente y se transfirió a lo largo de un periodo de 4 h a 9 litros de tampón Tris 20 mM enfriado previamente ($10\pm 2^\circ\text{C}$) a pH 9,0 que contenía 6,7 g de EDTA, 1,08 g de L-cisteína y 773,79 g de clorhidrato de guanidina. Se agitó adicionalmente la mezcla de replegamiento diluida durante 24 h a ($10\pm 2^\circ\text{C}$). Tras 24 h, se determinó el contenido de precursor de insulina de secuencia 5 que tenía puentes de cistina unidos correctamente en la mezcla de reacción con la ayuda de HPLC. Se recuperaron 1,1 g de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 5 plegado correctamente (corresponde a una recuperación del 34,5%).

Ejemplo 3D: Replegamiento con IPA al 10%

Se añadieron 573 g de clorhidrato de guanidina, 3,5 g de clorhidrato de L-cisteína y 0,75 g de sal disódica del ácido etilendiaminatetraacético a un litro de tampón Tris 20 mM y se ajustó el pH de la disolución a 8,5 con disolución de hidróxido de sodio 5 N. Se vertió esta disolución en un recipiente. Se pesó una cantidad igual a 8 g de cuerpos de inclusión liofilizados aislados que contenían 3,2 g de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 5 (SEQ ID NO: 5) (se determinó la parte de proteína de fusión que contenía insulina con la ayuda de HPLC, era del 40%) y se disolvió en la disolución anterior que tenía tanto L-cisteína como clorhidrato de guanidina. Se agitó la disolución durante cuatro horas a temperatura ambiente y se transfirió a lo largo de un periodo de 4 h a 9 litros de tampón Tris (20 mM) enfriado previamente ($10\pm 2^\circ\text{C}$) que contenía 6,7 g de EDTA, 1,08 g de L-cistina, 773,79 g de clorhidrato de guanidina y 1 litro de alcohol isopropílico a pH 9. Se agitó la mezcla de replegamiento diluida durante 24 h a ($10\pm 2^\circ\text{C}$). Tras 24 h, se determinó el contenido de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 5 que tenía puentes de cistina unidos correctamente en la mezcla de reacción con la ayuda de HPLC. Se recuperaron 1,3 g de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 5 plegado correctamente (corresponde a una recuperación del 40,71%).

Ejemplo 3E: Replegamiento con IPA al 20%

Se añadieron 573 g de clorhidrato de guanidina, 3,5 g de clorhidrato de L-cisteína y 0,75 g de sal disódica del ácido etilendiaminatetraacético a un litro de tampón Tris 20 mM y se ajustó el pH de la disolución a 8,5 con disolución de hidróxido de sodio 5 N. Se vertió esta disolución en un recipiente. Se pesó una cantidad igual a 8 g de cuerpos de inclusión liofilizados aislados que contenían 3,2 g de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 5 (SEQ ID NO: 5) (se determinó la parte de proteína de fusión que contenía insulina con la ayuda de HPLC, era del 40%) y se disolvió en la disolución anterior que tenía tanto L-cisteína como clorhidrato de guanidina. Se agitó la disolución durante cuatro horas a temperatura ambiente y se transfirió a lo largo de un periodo de 4 h a 9 litros de tampón Tris (201 nM) enfriado previamente ($10\pm 2^\circ\text{C}$) que contenía 6,7 g de EDTA, 1,36 g de L-cistina, 773,79 g de clorhidrato de guanidina y 2 litros de alcohol isopropílico a pH 9. Se agitó la mezcla de replegamiento diluida durante 24 h a ($10\pm 2^\circ\text{C}$). Tras 24 h, se determinó el contenido de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 5 que tenía puentes de cistina unidos correctamente en la mezcla de reacción con la ayuda de HPLC. Se recuperaron 1,47 g de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 5 plegado correctamente (corresponde a una recuperación del 46,22%).

Ejemplo 4: Procedimiento para obtener un precursor de análogo de insulina, cuyos puentes de cistina están plegados correctamente

Se recogió la proteína de fusión expresada como cuerpos de inclusión insolubles que tenía la secuencia de proinsulina 3 (SEQ ID NO: 6) a partir de células *E. coli*.

Secuencia de proinsulina 1 (SEQ ID NO: 6)

Ala ThrThr Ser ThrGlyAsn Ser Ala ArgPhe Val AsnGln His LeuCysGly Ser His Leu
 Val Glu Ala LeuTyrLeu Val CysGlyGluArgGlyPhePheTyrThrLys Pro ThrArgArgGlu
 Ala Glu Asp LeuGln Val GlyGln Val GluLeuGlyGlyGly Pro Gly Ala Gly Ser LeuGln
 Pro Leu Ala LeuGluGly Ser LeuGlnLysArgGlyIle Val GluGlnCysCysThr Ser IleCys
 Ser LeuTyrGlnLeuGluAsnTyrCysAsn.

X es el péptido C de la insulina humana (SEQ ID NO: 4);

ArgArgGlu Ala Glu Asp LeuGln Val GlyGln Val GluLeuGlyGlyGly Pro Gly Ala
 Gly Ser LeuGln Pro Leu Ala LeuGluGly Ser LeuGlnLysArg.

5

Ejemplo 4A: Replegamiento mediante dilución directa

10 Se añadieron 480 g de urea, 9,08 g de clorhidrato de L-cisteína y 0,75 g de sal disódica del ácido
 etilendiaminatetraacético a un litro de tampón Tris 20 mM y se ajustó el pH de la disolución a 8,5 con disolución de
 hidróxido de sodio 5 N. Se vertió esta disolución en un recipiente. Se pesó una cantidad igual a 40 g de cuerpos de
 inclusión liofilizados aislados que contenían 14 g de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 3 (SEQ ID
 NO: 6) (se determinó la parte de proteína de fusión que contenía insulina con la ayuda de HPLC, era del 35%) y se
 15 disolvió en la disolución anterior que tenía tanto L-cisteína como urea. Se agitó la disolución durante una hora a
 temperatura ambiente. Se ajustó el pH de la disolución a 10,6 con hidróxido de sodio 5 N y se continuó agitando
 adicionalmente durante 1 h a temperatura ambiente. Se añadió lentamente la mezcla solubilizada a 29 litros de
 tampón Tris (20 mM) enfriado previamente ($10\pm 2^\circ\text{C}$) que contenía EDTA 2 mM a pH 10,6. Se ajustó el pH de la
 mezcla de reacción a 10,6 con disolución de hidróxido de sodio 5 N. Se agitó la mezcla de replegamiento diluida
 20 durante 24 h. Tras 24 h, se determinó el contenido de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 3 que tenía
 puentes de cistina unidos correctamente en la mezcla de reacción con la ayuda de HPLC. Se recuperaron 7,14 g de
 precursor de insulina de secuencia de proinsulina 3 plegado correctamente (corresponde a una recuperación del
 51%).

Ejemplo 4B: Replegamiento tras dilución inversa

25 Se añadieron 480 g de urea, 9,08 g de clorhidrato de L-cisteína y 0,75 g de sal disódica del ácido
 etilendiaminatetraacético a un litro de tampón Tris 20 mM y se ajustó el pH de la disolución a 8,5 con disolución de
 hidróxido de sodio 5 N. Se vertió esta disolución en un recipiente. Se pesó una cantidad igual a 40 g de cuerpos de
 inclusión liofilizados aislados que contenían 14 g de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 3 (SEQ ID
 NO: 6) (se determinó la parte de proteína de fusión que contenía insulina con la ayuda de HPLC, era del 35%) y se
 30 disolvió en la disolución anterior que tenía tanto L-cisteína como urea. Se agitó la disolución durante 1 h a
 temperatura ambiente. Se ajustó el pH de la disolución a 10,6 con hidróxido de sodio 5 N y se continuó agitando
 adicionalmente durante 1 h a temperatura ambiente. A la mezcla solubilizada anterior se le añadieron lentamente 29
 litros de tampón Tris (20 mM) enfriado previamente ($10\pm 2^\circ\text{C}$) que contenía EDTA 2 mM a pH 10,6. Se ajustó el pH
 35 de la mezcla de reacción a 10,6 con disolución de hidróxido de sodio 5 N. Se agitó la mezcla de replegamiento
 durante 24 h a ($10\pm 2^\circ\text{C}$). Tras 24 h, se determinó el contenido de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 3
 que tenía puentes de cistina unidos correctamente en la mezcla de reacción con la ayuda de HPLC. Se recuperaron
 7,5 g de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 3 plegado correctamente (corresponde a una
 recuperación del 54%).

40

Ejemplo 4C: Replegamiento sin IPA

Se añadieron 573 g de clorhidrato de guanidina, 3,5 g de clorhidrato de L-cisteína y 0,75 g de sal disódica del ácido
 etilendiaminatetraacético a un litro de tampón Tris 20 mM y se ajustó el pH de la disolución a 8,5 con disolución de
 45 hidróxido de sodio 5 N. Se vertió esta disolución en un recipiente. Se pesó una cantidad igual a 8 g de cuerpos de
 inclusión liofilizados aislados que contenían 2,8 g de precursor de insulina de secuencia 6 (SEQ ID NO: 6) (se
 determinó la parte de proteína de fusión que contenía insulina con la ayuda de HPLC, era del 35%) y se disolvió en
 la disolución anterior que tenía tanto L-cisteína como clorhidrato de guanidina. Se agitó la disolución durante cuatro
 horas a temperatura ambiente y se transfirió a lo largo de un periodo de 4 h a 9 litros de tampón Tris 20 mM enfriado
 50 previamente ($10\pm 2^\circ\text{C}$) a pH 9,0 que contenía 6,7 g de EDTA, 1,08 g de L-cisteína y 773,79 g de clorhidrato de
 guanidina. Se agitó adicionalmente la mezcla de replegamiento diluida durante 24 h a ($10\pm 2^\circ\text{C}$). Tras 24 h, se
 determinó el contenido de precursor de insulina de secuencia 6 que tenía puentes de cistina unidos correctamente
 en la mezcla de reacción con la ayuda de HPLC. Se recuperaron 0,793 g de precursor de insulina plegado
 correctamente de secuencia 6 (corresponde a una recuperación del 28,34%).

55

Ejemplo 4D: Replegamiento con IPA al 1,0%

5 Se añadieron 573 g de clorhidrato de guanidina, 3,5 g de clorhidrato de L-cisteína y 0,75 g de sal disódica del ácido
etilendiaminatetraacético a un litro de tampón Tris 20 mM y se ajustó el pH de la disolución a 8,5 con disolución de
hidróxido de sodio 5 N. Se vertió esta disolución en un recipiente. Se pesó una cantidad igual a 8 g de cuerpos de
10 inclusión liofilizados aislados que contenían 2,8 g de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 6 (SEQ ID
NO: 6) (se determinó la parte de proteína de fusión que contenía insulina con la ayuda de HPLC, era del 35%) y se
disolvió en la disolución anterior que tenía tanto L-cisteína como clorhidrato de guanidina. Se agitó la disolución
durante cuatro horas a temperatura ambiente y se transfirió a lo largo de un periodo de 4 h a 9 litros de tampón Tris
15 (20 mM) enfriado previamente ($10\pm 2^{\circ}\text{C}$) que contenía 6,7 g de EDTA, 1,08 g de L-cistina, 773,79 g de clorhidrato de
guanidina y 1 litro de alcohol isopropílico a pH 9. Se agitó la mezcla de replegamiento diluida durante 24 h a
($10\pm 2^{\circ}\text{C}$). Tras 24 h, se determinó el contenido de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 6 que tenía
puentes de cistina unidos correctamente en la mezcla de reacción con la ayuda de HPLC. Se recuperaron 1,02 g de
precursor de insulina de secuencia de proinsulina 6 plegado correctamente (corresponde a una recuperación del
36,58%).

Ejemplo 4E: Replegamiento con IPA al 20%

20 Se añadieron 573 g de clorhidrato de guanidina, 3,5 g de clorhidrato de L-cisteína y 0,75 g de sal disódica del ácido
etilendiaminatetraacético a un litro de tampón Tris 20 mM y se ajustó el pH de la disolución a 8,5 con disolución de
hidróxido de sodio 5 N. Se vertió esta disolución en un recipiente. Se pesó una cantidad igual a 8 g de cuerpos de
inclusión liofilizados aislados que contenían 2,8 g de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 6 (SEQ ID
25 NO: 6) (se determinó la parte de proteína de fusión que contenía insulina con la ayuda de HPLC, era del 35%) y se
disolvió en la disolución anterior que tenía tanto L-cisteína como clorhidrato de guanidina. Se agitó la disolución
durante cuatro horas a temperatura ambiente y se transfirió a lo largo de un periodo de 4 h a 9 litros de tampón Tris
(20 mM) enfriado previamente ($10\pm 2^{\circ}\text{C}$) que contenía 6,7 g de EDTA, 1,36 g de L-cistina, 773,79 g de clorhidrato de
guanidina y 2 litros de alcohol isopropílico a pH 9. Se agitó la mezcla de replegamiento diluida durante 24 h a
30 ($10\pm 2^{\circ}\text{C}$). Tras 24 h, se determinó el contenido de precursor de insulina de secuencia de proinsulina 6 que tenía
puentes de cistina unidos correctamente en la mezcla de reacción con la ayuda de HPLC. Se recuperaron 1,6 g de
precursor de insulina de secuencia de proinsulina 6 plegado correctamente (corresponde a una recuperación del
48,65%).

35 Aunque la invención se ha descrito en cuanto a sus realizaciones específicas, determinadas modificaciones y
equivalentes resultarán evidentes para los expertos en la técnica y se pretende que estén incluidas dentro del
alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

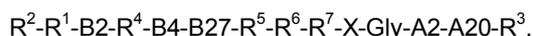
1. Procedimiento para obtener un precursor de insulina, análogos de insulina o derivados de los mismos que tienen puentes de cistina unidos correctamente, comprendiendo el procedimiento:

mezclar un precursor de insulina, análogos de insulina o derivados de los mismos que tienen puentes de cistina unidos incorrectamente con una disolución acuosa o un tampón que contiene tanto cisteína o clorhidrato de cisteína como uno o más de agentes auxiliares caotrópicos a un pH de 8 a 11,5 y a una temperatura de desde 2°C hasta 55°C; en el que la concentración de precursor es de más de 0,65 g/litro;

b. diluir de manera inversa añadiendo lentamente un diluyente a la mezcla de reacción de la etapa (a), a un pH de 8 a 11,5 y a una temperatura de 2°C a 40°C; y

c. aislar el precursor de insulina, análogos de insulina o derivados de los mismos que tienen puentes de cistina unidos correctamente

en el que dicho precursor de la insulina o un derivado de insulina del mismo tiene una secuencia según la fórmula I:



en la que

R² es

a. un átomo de hidrógeno,

b. un residuo de aminoácido del grupo que consiste en lisina (Lys) y arginina (Arg), o

c. un péptido que tiene de 2 a 45 residuos de aminoácido, que comprende el residuo de aminoácido lisina (Lys) o arginina (Arg) en el extremo carboxilo del péptido;

R¹ es un residuo de fenilalanina (Phe) o un enlace covalente;

R⁴ corresponde a la posición B-3 de la insulina humana y es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en asparagina, lisina y prolina;

R⁵-R⁶-R⁷ corresponde a la posición B-28, B-29 y B-30 de la cadena de la insulina humana, respectivamente;

R⁵ puede seleccionarse del grupo que consiste en asparagina, lisina, leucina, prolina, valina, ácido aspártico, ácido glutámico y alanina opcionalmente sustituidos con un grupo acilo que tiene al menos 10 átomos de carbono;

R⁶ puede seleccionarse del grupo que consiste en lisina, ácido glutámico y prolina opcionalmente sustituidos con un grupo acilo que tiene al menos 10 átomos de carbono;

R⁷ puede seleccionarse del grupo que consiste en treonina, des-treonina, alanina y serina;

(B2 y B4-B27) son los residuos de aminoácido en las posiciones B2, B4 a B27 de la cadena B de la insulina humana o insulina animal;

X es

i. un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en lisina (Lys) y arginina (Arg), o

ii. un péptido que tiene de 2 a 35 residuos de aminoácido, que comprende el residuo de aminoácido lisina (Lys) o arginina (Arg) en el extremo N-terminal y en el extremo carboxilo del péptido, o

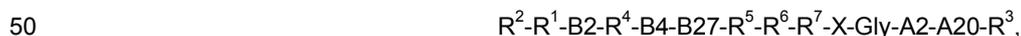
iii. un péptido que tiene de 2 a 35 aminoácidos que pueden codificarse genéticamente, que comprende de 1 a 5 residuos de histidina;

(A2-A20) son los residuos de aminoácido en las posiciones A2 a A20 de la cadena A de la insulina humana o insulina animal; y

R³ es un residuo de aminoácido que puede codificarse genéticamente.

- 5
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la concentración de cisteína o clorhidrato de cisteína en la etapa (a) varía desde 20 mM hasta 60 mM.
- 10
3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que uno o más de agentes auxiliares caotrópicos se seleccionan del grupo que consiste en sulfato de amonio, clorhidrato de guanidina, carbonato de etileno, tiocianato, dimetilsulfóxido y urea.
- 15
4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que la concentración de agente auxiliar caotrópico varía desde 5 M hasta 10 M.
5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el tampón en la etapa (a) puede seleccionarse del grupo que consiste en tampón glicina, tampón fosfato, tampón carbonato, tampón tris y tampón etanolamina.
- 20
6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el diluyente en la etapa (b) puede seleccionarse del grupo que consiste en agua, tampón glicina, tampón fosfato, tampón carbonato, tampón tris, tampón etanolamina, alcohol C₁-C₄ y disolución de cistina o clorhidrato de cistina.
- 25
7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la disolución acuosa o un tampón en la etapa (a) o diluyente en la etapa (b) puede comprender además uno o más aditivos seleccionados del grupo que consiste en ácido etilendiaminatetraacético, ácido etilenglicoltetraacético (EGTA), arginina, glicina, alanina, azúcares, polioles, sales tales como sulfato de amonio y cloruro de magnesio, y ciclodextrinas o sales de las mismas.
- 30
8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa (a) o la etapa (b) se lleva a cabo a una temperatura de desde 2°C hasta 25°C.
- 35
9. Procedimiento para obtener un precursor de insulina, análogo de insulina o derivados de los mismos que tienen puentes de cistina unidos correctamente, comprendiendo el procedimiento:
- 40
- a. mezclar un precursor de insulina, análogo de insulina o derivados de los mismos que tienen puentes de cistina unidos incorrectamente con una disolución acuosa o un tampón que comprende tanto cisteína o clorhidrato de cisteína como uno o más de agentes auxiliares caotrópicos a un pH de 7 a 11,5 y a una temperatura de 2°C a 55°C; en el que la concentración de precursor es de más de 0,65 g/litro;
- 45
- b. mezclar la mezcla de reacción de la etapa (a) con un diluyente que contiene 5-40% (v/v) de alcohol isopropílico a un pH de 8 a 11,5 y a una temperatura de 2°C a 40°C; y
- c. aislar los precursores de insulina, análogos de insulina y derivados de los mismos que tienen puentes de cistina unidos correctamente

en el que dicho precursor de la insulina o un derivado de insulina del mismo tiene una secuencia según la fórmula I:



en la que

R² es

- 55
- a. un átomo de hidrógeno,
- b. un residuo de aminoácido del grupo que consiste en lisina (Lys) y arginina (Arg), o
- 60
- c. un péptido que tiene de 2 a 45 residuos de aminoácido, que comprende el residuo de aminoácido lisina (Lys) o arginina (Arg) en el extremo carboxilo del péptido;

R¹ es un residuo de fenilalanina (Phe) o un enlace covalente;

- 65
- R⁴ corresponde a la posición B-3 de la insulina humana y es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en asparagina, lisina y prolina;

R⁵-R⁶-R⁷ corresponde a la posición B-28, B-29 y B-30 de cadena de la insulina humana, respectivamente;

5 R⁵ puede seleccionarse del grupo que consiste en asparagina, lisina, leucina, prolina, valina, ácido aspártico, ácido glutámico y alanina opcionalmente sustituidos con un grupo acilo que tiene al menos 10 átomos de carbono;

10 R⁶ puede seleccionarse del grupo que consiste en lisina, ácido glutámico y prolina opcionalmente sustituidos con un grupo acilo que tiene al menos 10 átomos de carbono;

R⁷ puede seleccionarse del grupo que consiste en treonina, des-treonina, alanina y serina;

15 (B2 y B4-B27) son los residuos de aminoácido en las posiciones B2, B4 a B27 de la cadena B de la insulina humana o insulina animal;

X es

20 i. un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en lisina (Lys) y arginina (Arg), o

25 ii. un péptido que tiene de 2 a 35 residuos de aminoácido, que comprende el residuo de aminoácido lisina (Lys) o arginina (Arg) en el extremo N-terminal y en el extremo carboxilo del péptido, o

iii. un péptido que tiene de 2 a 35 aminoácidos que pueden codificarse genéticamente, que comprende de 1 a 5 residuos de histidina;

30 (A2-A20) son los residuos de aminoácido en las posiciones A2 a A20 de la cadena A de la insulina humana o insulina animal; y

R³ es un residuo de aminoácido que puede codificarse genéticamente.

35 10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que la concentración de cisteína o clorhidrato de cisteína en la etapa (a) varía desde 20 mM hasta 60 mM.

40 11. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que uno o más de agentes auxiliares caotrópicos se seleccionan del grupo que consiste en sulfato de amonio, clorhidrato de guanidina, carbonato de etileno, tiocianato, dimetilsulfóxido y urea.

12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que la concentración de agente auxiliar caotrópico varía desde 5 M hasta 10 M.

45 13. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que el tampón en la etapa (a) puede seleccionarse del grupo que consiste en tampón glicina, tampón fosfato, tampón carbonato, tampón tris y tampón etanolamina.

50 14. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que la disolución acuosa o un tampón en la etapa (a) y diluyente en la etapa (b) pueden comprender además uno o más de aditivos seleccionados del grupo que consiste en, ácido etilendiaminatetraacético, ácido etilenglicoltetraacético (EGTA), arginina, glicina, alanina, azúcares, sales tales como sulfato de amonio y cloruro de magnesio, y ciclodextrinas o sales de las mismas.

15. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que la etapa (a) o la etapa (b) se lleva a cabo a una temperatura de desde 2°C hasta 25°C.