

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 693**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/62** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2005 E 05716149 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.10.2014 EP 1735343**

54 Título: **Procedimiento para la obtención de insulinas mediante una mejor aireación del plegado**

30 Prioridad:

**01.04.2004 DE 102004015965**

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

**28.01.2015**

73 Titular/es:

**SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH  
(100.0%)  
BRÜNINGSTRASSE 50  
65929 FRANKFURT AM MAIN, DE**

72 Inventor/es:

**RUBROEDER, FRANZ-JOSEF;  
KELLER, REINHOLD y  
HERBERT, HEIKE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 527 693 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

Procedimiento para la obtención de insulinas mediante una mejor aireación del plegado

5 La presente invención se refiere a un procedimiento optimizado para la obtención de insulinas o derivados de insulina, con puentes de cistina unidos correctamente, en presencia de cisteína o hidrocloreto de cisteína y de un aditivo caotrópico, en donde el plegado tiene lugar en una mezcla de reacción en la que la proporción de volumen a superficie es mayor que 1 y/o la concentración de oxígeno es de 1 a 15 mg/L.

10 La insulina humana es una proteína que tiene dos cadenas de aminoácidos con un total de 51 restos de aminoácidos. En ambas cadenas de aminoácidos existen 6 restos de cisteína, en donde dos sendos restos de cisteína están unidos entre sí mediante un puente de disulfuro. En la insulina humana biológicamente activa, las cadenas A y B están unidas entre sí mediante dos puentes de cistina y, en la cadena A, existe un puente de cistina adicional. En una molécula de insulina humana existen, desde el punto de vista estadístico, 15 posibilidades para la formación de puentes de disulfuro. En la insulina humana biológicamente activa sólo se presenta una de las 15 posibilidades. Los siguientes restos de cisteína están unidos entre sí en la insulina humana:

A 6 – A 11

15 A 7 – B 7

A 20 – B 19

20 Las letras A y B representan las correspondientes cadenas de aminoácidos de insulina y el número indica la posición del resto de aminoácido, contado desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo de la correspondiente cadena de aminoácidos. También pueden formarse puentes de disulfuro entre dos moléculas de insulina humana, de manera que pueden existir muchos puentes de disulfuro diferentes que pasen fácilmente inadvertidos.

25 Un procedimiento conocido para preparar insulina humana se basa en el uso de proinsulina humana. La proinsulina humana es una proteína con una cadena lineal de aminoácidos de 86 restos de aminoácidos, en la que las cadenas A y B de la insulina humana están unidas entre sí a través de un péptido C con 35 restos de aminoácidos. La formación de los puentes de disulfuro existentes en la insulina humana se produce a través de un producto intermedio, en donde los restos de cisteína de la insulina humana están provistos de un grupo protector de azufre, por ejemplo un grupo S-sulfonato (-S-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (documento EP 0037255). Se conoce, además, un procedimiento para la obtención de proinsulina con puentes de cistina unidos correctamente (*Biochemistry*, 60, (1968), páginas 622 a 629), derivada de proinsulina obtenida del páncreas porcino, en la que los restos de cisteína están presentes como restos tiol (-SH). Por la expresión "puentes de cistina unidos correctamente" se entienden los puentes de disulfuro que están presentes en la insulina biológicamente activa procedente de mamíferos.

35 Los procedimientos de tecnología genética permiten preparar en microorganismos un precursor de insulina o derivados de insulina, en especial proinsulina humana o proinsulina que posee una secuencia de aminoácidos y/o una longitud de cadena de aminoácidos que son divergentes de las de la insulina humana. Las proinsulinas preparadas en células de *Escherichia coli* genéticamente modificada carecen de puentes de cistina unidos correctamente. Un procedimiento para la obtención de insulina humana con *E. coli* (documento EP 0055945) consiste en las siguientes etapas procedimentales:

40 Fermentación de microorganismos – disgregación celular – aislamiento de la proteína de fusión – escisión del halogenuro de cianógeno de la proteína de fusión – aislamiento del producto de la escisión con la secuencia de proinsulina – protección de los restos de cisteína de la proinsulina con grupos S-sulfonato – purificación cromatográfica del S-sulfonato – formación de los puentes de cistina unidos correctamente – eliminación de las sales de la proinsulina – purificación cromatográfica de la proinsulina con puentes de cistina unidos correctamente – concentración de la solución de proinsulina - purificación cromatográfica de la solución concentrada de proinsulina – escisión enzimática de la proinsulina para obtener insulina humana - purificación cromatográfica de la insulina humana formada.

45 Los inconvenientes de este procedimiento son el número de etapas procedimentales y las pérdidas en las etapas de purificación, que determinan un bajo rendimiento de insulina. Debido a las múltiples etapas de la vía procedimental se debe contar con pérdidas considerables. En la etapa de la proteína de fusión aislada por escisión con halogenuro de cianógeno, sulfitolisis y purificación de la proinsulina hay que prever una pérdida de hasta 40% de proinsulina (documento EP 0055945). En el curso de las subsiguientes etapas de purificación hasta el producto final se pueden producir pérdidas igualmente elevadas.

50 En la preparación por tecnología genética de insulina humana o derivados de insulina es posible alcanzar incrementos del rendimiento cuando se puede reducir sustancialmente el número de etapas del procedimiento.

55 Por los documentos EP 0600372 A1 (o US 5.473.049) y EP 0668292 A2 se conoce un procedimiento correspondientemente optimizado para la obtención de insulinas o derivados de insulina, en el que el precursor de insulina o el precursor del derivado de insulina cuyos puentes de cistina no están correctamente acoplados se transforman en presencia de un mercaptano, por ejemplo cisteína, y de al menos un adyuvante caotrópico, por ejemplo,

urea o hidrocloreuro de guanidina, en un precursor de insulina o un precursor del derivado de insulina con puentes de cisteína unidos correctamente. En el procedimiento conocido, estas proteínas se disuelven inicialmente en soluciones acuosas de un adyuvante caotrópico o de mezclas de diferentes adyuvantes caotrópicos en muy baja concentración. A continuación, se combina la mezcla de proteínas con una solución acuosa de mercaptano.

5 De manera sorprendente, se ha encontrado ahora que es posible aumentar el rendimiento de precursores de insulina o derivados de insulina correctamente plegados y, por lo tanto, rebajar los tiempos de reacción para el proceso de plegado, cuando el precursor no se lleva a solución en una primera etapa con el adyuvante caotrópico, sino que inicialmente se incorpora mercaptano, a saber cisteína o hidrocloreuro de cisteína, a la suspensión acuosa del precursor, y, sólo en una etapa posterior, se agrega a la solución del precursor una solución acuosa del adyuvante caotrópico y, por último, se lleva a efecto el plegado correcto del precursor por medio de la dilución de la mezcla hasta una concentración preferida de cisteína o hidrocloreuro de cisteína, mediante la incorporación de la mezcla en una cantidad correspondiente de agua.

10 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de un precursor de insulinas o derivados de insulina con puentes de cistina unidos correctamente, en presencia de cisteína o hidrocloreuro de cisteína y de un adyuvante caotrópico, que se distingue por que se llevan a cabo sucesivamente las siguientes etapas:

- a. Mezclar una suspensión acuosa del precursor de insulinas o derivados de insulina con una cantidad de cisteína o hidrocloreuro de cisteína que proporcione 1 hasta 15 restos de SH de cisteína o del hidrocloreuro de cisteína por resto de cisteína del precursor;
- 20 b. Incorporar la suspensión del precursor que contiene cisteína o hidrocloreuro de cisteína en una solución 4 a 9 molar del adyuvante caotrópico, con un valor de pH de 8 a 11,5 y una temperatura de 15 a 55°C, y mantener la mezcla obtenida a esta temperatura durante aproximadamente 10 a 60 minutos, y
- c. Incorporar la mezcla a un valor de pH de 8 a 11,5 y a una temperatura de 5 a 30°C a una cantidad de agua que determine una dilución de la concentración de la cisteína o del hidrocloreuro de cisteína en la mezcla a aproximadamente 1 a 5 mM y del adyuvante caotrópico a 0,2 hasta 1,0 M,

25 en donde, en la etapa (c), la mezcla se trata con gas en un recipiente, de modo que la concentración de oxígeno en la mezcla es de 1 a 15 mg/L,

en donde la proporción de volumen a superficie de la mezcla es mayor que 1 m, en especial mayor que 2 m, en especial mayor que 3 m, y la concentración de oxígeno en la mezcla es de 2 a 10 mg/L.

Preferiblemente, el procedimiento también se distingue por que tiene lugar

30 en la etapa (a), la cantidad de cisteína o hidrocloreuro de cisteína corresponde a una cantidad que proporciona 1 a 6 restos SH de la cisteína o del hidrocloreuro de cisteína por resto de cisteína del precursor,

en la etapa (b), la incorporación de la suspensión del precursor que contiene cisteína o hidrocloreuro de cisteína en una solución 4 a 9 molar del adyuvante caotrópico a un valor de pH de 8 a 11 y a una temperatura de 30 a 45°C, la mezcla obtenida se mantiene a esta temperatura durante 20 a 40 minutos, y

35 en la etapa (c), la incorporación de la mezcla a un valor de pH de 8 a 11 y a una temperatura de 15 a 20°C, a una cantidad de agua que produce una dilución de la concentración de la cisteína o del hidrocloreuro de cisteína en la mezcla a aproximadamente 1 a 5 mM y una concentración del adyuvante caotrópico de 0,2 a 1,0 M.

Adyuvantes caotrópicos son compuestos que, en solución acuosa, rompen los enlaces de puentes de hidrógeno, por ejemplo, sulfato de amonio, hidrocloreuro de guanidina, carbonato de etileno, tiocianato, dimetilsulfóxido y urea.

40 En el procedimiento según la presente invención, se utiliza como adyuvante caotrópico preferiblemente guanidina, hidrocloreuro de guanidina o, de forma especialmente preferida, urea.

La concentración del adyuvante caotrópico en la etapa (b) del procedimiento según la invención es preferiblemente de 7,0 a 9,0 M, la temperatura en la etapa (b) es preferiblemente de 40°C y el valor de pH en la etapa (b) es preferiblemente de 10 a 11.

45 En el procedimiento según la invención, el valor de pH en la etapa (c) es preferiblemente de 10 a 11. En la etapa (c) del procedimiento según la presente invención, la cantidad de agua a la que incorpora la muestra se selecciona, preferiblemente, de manera tal que produzca una dilución de la concentración de cisteína o hidrocloreuro de cisteína en la mezcla a 2,5 a 3,0 mM y una concentración del adyuvante caotrópico de 0,5 M.

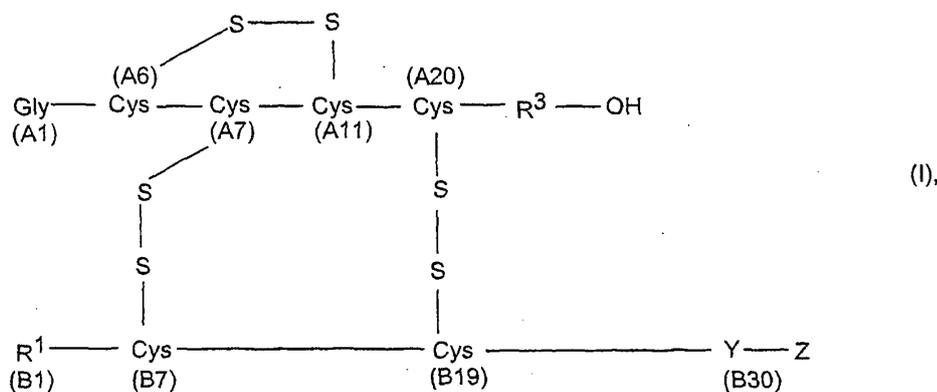
50 De forma especialmente preferida, el procedimiento según la invención se distingue por que la concentración del adyuvante caotrópico en la etapa (b) es de aproximadamente 8 M, la temperatura en la etapa (b) es de aproximadamente 40°C, el valor de pH en la etapa (b) es de aproximadamente 10,2, el valor de pH en la etapa (c) es de aproximadamente 10,6 y, en la etapa (c), la cantidad de agua produce una dilución de la concentración de la cisteína o

del hidrocloreuro de cisteína en la mezcla hasta aproximadamente 2,5 a 3,0 mM y una concentración del adyuvante caotrópico de 0,5 M.

El resultado del procedimiento según la presente invención es un precursor de insulinas o derivados de insulina, en particular de proinsulina, cuyos puentes de cisteína están unidos correctamente.

- 5 Los derivados de insulina son derivados de insulinas de origen natural, a saber insulina humana (véase la SEC ID NO 1 = cadena A de insulina humana; véase SEC ID NO 2 = cadena B de insulina humana, protocolo de secuencias), o insulinas animales, que se diferencian por la sustitución de al menos un resto de aminoácido de origen natural y/o la adición de al menos un resto de aminoácido y/o un resto orgánico de la correspondiente insulina de origen natural que, por lo demás, es idéntica.
- 10 A partir del precursor de insulina o derivado de insulina, obtenido con la ayuda del procedimiento según la presente invención, que tiene puentes de cistina unidos correctamente, se puede preparar por último una insulina o un derivado de insulina con puentes de cistina unidos correctamente según el procedimiento descrito en el documento EP 0600372 A1 (o US 5.473.049) o en el documento EP 0668292 A2, mediante escisión enzimática con tripsina o una enzima similar a la tripsina y, eventualmente, además mediante carboxipeptidasa B y la subsiguiente purificación en una resina de adsorción.
- 15

La insulina o derivado de insulina que se puede preparar a partir del precursor se puede describir preferiblemente por la Fórmula I



en la que significan:

Y un resto de aminoácido codificable genéticamente,

Z a) un resto de aminoácido del grupo His, Arg o Lys,

b) un péptido con 2 o 3 restos de aminoácido, que contiene el resto de aminoácido Arg o Lys en el extremo carboxilo del péptido,

c) un péptido con 2 a 35 aminoácidos codificables genéticamente, que contiene 1 hasta 5 restos de histidina, o

d) OH,

R<sup>1</sup> un resto de fenilalanina (Phe) o un enlace covalente,

R<sup>3</sup> un resto de aminoácido codificable genéticamente,

- 20 en donde los restos A2 a A20, que no se muestran con el fin de simplificar la Fórmula I, corresponden a la secuencia de aminoácidos de la cadena A de la insulina A, insulina animal o de un derivado de insulina, y los restos B2 a B20, que no se muestran con el fin de simplificar la Fórmula I, corresponden a la secuencia de aminoácidos de la cadena B de la insulina humana, insulina animal o de un derivado de insulina.

- 25 La secuencia de aminoácidos de péptidos y proteínas se designa a partir del extremo N-terminal de la cadena de aminoácidos. Los datos indicados entre paréntesis en la Fórmula I, por ejemplo, A6, A20, B1, B7 o B19, corresponden a la posición de los restos de aminoácidos en las cadenas A o B de la insulina.

La expresión "resto de aminoácido codificable genéticamente" incluye los aminoácidos Gly, Ala, Ser, Thr, Val, Leu, Ile, Asp, Asn, Glu, Gln, Cys, Met, Arg, Lys, His, Tyr, Phe, Trp, Pro y seleno-cisteína.

Por las expresiones "restos A2 a A20" y "restos B2 a B20" de insulina animal se entienden, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de insulina de bovino, cerdo o pollo. La expresión "restos A2 a A20" y "B2 a B20" de derivados de insulina representa las correspondientes secuencias de aminoácidos de insulina humana que se forman por el intercambio de aminoácidos con otros aminoácidos codificables genéticamente.

5 La cadena A de la insulina humana tiene, por ejemplo, la siguiente secuencia (SEC ID NO:1):

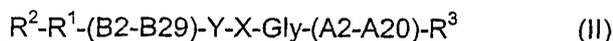
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu  
Glu Asn Tyr Cys Asn.

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

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr  
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr.

En este caso, en la Fórmula I R<sup>3</sup> es asparagina (Asn), R<sup>1</sup> es fenilalanina (Phe), Y es treonina (Thr) y Z es OH.

10 El procedimiento según la presente invención es especialmente apropiado, por lo tanto, para la obtención de un precursor de insulinas o derivados de insulina con la Fórmula general II, cuyos puentes de cistina (no se muestran en la Fórmula II) están correctamente plegados,



en donde significan

- R<sup>2</sup>            a) un átomo de hidrógeno  
                  b) un resto de aminoácido del grupo de lisina (Lys) o arginina (Arg), o  
                  c) un péptido con 2 a 45 restos de aminoácidos que contiene el resto de aminoácido lisina (Lys) o arginina (Arg) en el extremo carboxilo del péptido,
- R<sup>1</sup>            un resto de fenilalanina (Phe) o un enlace covalente,
- (B2-B29)    los restos de aminoácidos en las posiciones B2 a B29 de la cadena B de insulina humana, insulina animal o un derivado de insulina con variaciones, eventualmente, en una o múltiples de estas posiciones,
- Y             un resto de aminoácido codificable genéticamente,
- X             a) un resto de aminoácido del grupo de lisina (Lys) o arginina (Arg),  
                  b) un péptido con 2 a 35 restos de aminoácidos, que contiene el resto aminoácido de lisina (Lys) o arginina (Arg) en el extremo N-terminal y en el extremo carboxilo del péptido, o  
                  c) un péptido con 2 a 35 aminoácidos codificables genéticamente, que contiene 1 a 5 restos de histidina,
- (A2-A20)    los restos de aminoácidos en las posiciones A2 a A20 de la cadena B de insulina humana, insulina animal o de un derivado de insulina con variaciones eventualmente en una o múltiples posiciones
- R<sup>3</sup>            un resto de aminoácido codificable genéticamente.

15 Preferiblemente, en la Fórmula II significan:

- R<sup>2</sup>            a) un átomo de hidrógeno o  
                  b) un péptido con 2 a 25 restos de aminoácidos, que contiene el resto de aminoácido arginina (Arg) en el extremo carboxilo del péptido,
- R<sup>1</sup>            un resto de fenilalanina (Phe),
- (B2-B29)    los restos de aminoácidos en las posiciones B2 a B29 de la cadena B de insulina humana
- Y             un resto de aminoácido del grupo de alanina (Ala), treonina (Thr) o serina (Ser),

- X el resto de aminoácido arginina (Arg) o un péptido con la secuencia de aminoácidos de la cadena C de insulina humana,
- (A2-A20) los restos de aminoácidos en las posiciones A2 a A20 de la cadena B de insulina humana, y
- R<sup>3</sup> un resto de aminoácido del grupo de asparagina (Asn), serina (Ser) o glicina (Gly).

La cadena C de la insulina humana tiene la siguiente secuencia (SEC ID NO:3):

Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly  
 Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu  
 Gln Lys Arg.

2. Preferiblemente, en la Fórmula II significan:

- R<sup>2</sup> a) un átomo de hidrógeno o  
 b) un péptido con 2 a 15 restos de aminoácidos, en cuyo extremo carboxilo se encuentra un resto de arginina (Arg),
- R<sup>1</sup> un resto de fenilalanina (Phe),
- (B2-B29) los restos de aminoácidos en las posiciones B2 a B29 de la cadena B de insulina humana
- Y un resto de treonina (Thr),
- X el resto de aminoácido arginina (Arg) o un péptido con 2 a 35 restos de aminoácidos, en donde al comienzo y al final del péptido hay dos restos de aminoácidos básicos, en especial arginina (Arg) y/o lisina (Lys),
- (A2-A20) los restos de aminoácidos en las posiciones A2 a A20 de la cadena B de insulina humana, y
- R<sup>3</sup> un resto de aminoácido de asparagina (Asn) o glicina (Gly).

5 El resto Z de la insulina o del derivado de insulina de la Fórmula I es, por lo general, parte de la secuencia de aminoácidos de X del precursor de la Fórmula II y se forma por la actividad de proteasas tales como tripsina, una enzima similar a la tripsina o carboxipeptidasa B. El resto R<sup>3</sup> es un resto de aminoácido que está situado en la posición A21 de la cadena A de la insulina. El resto Y es un resto de aminoácido que está situado en la posición B30 de la cadena B de la insulina.

10 La tripsina o la enzima similar a la tripsina son proteasas que escinden las cadenas de aminoácidos en el resto arginina o lisina.

La carboxipeptidasa B es una exoproteasa que escinde los restos de aminoácidos básicos tales como Arg o Lys situados en el extremo carboxiterminal de las cadenas de aminoácidos. (Kemmler et al., *J. Biol. Chem.* 246, páginas 6786-6791).

15 A partir del precursor indicado en 1 se puede obtener, por ejemplo, una insulina o un derivado de insulina de la Fórmula I con puentes de cistina unidos correctamente, en donde Y, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, A2-A20 y B2-B29 tienen el significado indicado en 1, y Z significa un resto de arginina (Arg), un resto de péptido Arg-Arg u -OH.

A partir del precursor indicado en 2 se puede obtener, por ejemplo, una insulina o un derivado de insulina de la Fórmula I con puentes de cistina unidos correctamente, en donde Y, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, A2-A20 y B2-B29 tienen el significado indicado en 2, y Z significa un resto de arginina (Arg), un resto de péptido Arg-Arg o Lys-Lys u -OH.

20 El precursor de la Fórmula II se puede formar con una multiplicidad de construcciones obtenidas por tecnología genética en microorganismos (documentos EP 0489780, EP 0347781, EP 0453969). Las construcciones de tecnología genética se expresan en microorganismos tales como *Escherichia coli* o estreptomicetos durante la fermentación. Las proteínas formadas se depositan en el interior de los microorganismos (documento EP 0489780) o se liberan a la solución de fermentación.

25 Para el procedimiento según la invención se pueden utilizar precursores de insulinas o derivados de insulina de la Fórmula II que, directamente después de la disgregación celular, están todavía contaminados con múltiples proteínas procedentes de la solución de fermentación y de los microorganismos. Sin embargo, los precursores de la Fórmula II también se pueden utilizar en forma previamente purificada, por ejemplo después de una precipitación o una purificación cromatográfica.

30 A continuación, la invención se explicará por medio de ejemplos, sin limitarla a los mismos.

Ejemplo 1 (Ejemplo comparativo, estado de la técnica)

Por medio de la fermentación de células de *Escherichia coli* modificada genéticamente (documento EP 0489780) se prepara una proteína de fusión con la siguiente secuencia de aminoácidos.

Secuencia de proinsulina (SEC ID NO:4):

Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Asn Gln His  
 Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu  
 Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu  
 Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu  
 Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu  
 Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys  
 5 Asn

La secuencia de proinsulina corresponde a la Fórmula II, en la que significan

- X péptido C de insulina humana,
- Y Thr (B30),
- R<sup>1</sup> Phe (B1),
- 10 R<sup>2</sup> un péptido con 11 restos de aminoácidos,
- R<sup>3</sup> Gly (A21), y

A2-A20 la secuencia de aminoácidos de la cadena A de insulina humana (restos de aminoácidos 2 a 20) y B2-B29, la secuencia de aminoácidos de la cadena B de insulina humana (restos de aminoácidos 2 a 29).

- 15 En las células de *E. coli* se acumula la proteína de fusión expresada con la secuencia de proinsulina 1 y se forman cuerpos de inclusión. Después de finalizar la fermentación, las células se separan por centrifugación y se disgregan por homogeneización de alta presión habitual. Los corpúsculos de inclusión de proteína de fusión liberados se aíslan por centrifugación.

A la suspensión acuosa de proteína de fusión, que contiene 40 kg de proteína de fusión (calculado por liofilización de una parte alícuota), se agregan 5 kg de hidrocloreuro de cisteína hidrato.

- 20 La suspensión (la fracción de la proteína de fusión que contiene insulina se determina con ayuda de HPLC. Representa 50%) se disuelve con la secuencia de proinsulina 1 en 550 L de una solución 8 M de urea a pH 10,2 y a 40°C. La solución transparente se agita en 9.000 L de agua a un valor de pH de 10,6 y a una temperatura de 16°C. Después de 4 h de agitación, se determina con ayuda de HPLC analítica el contenido en la mezcla de reacción de la secuencia de proinsulina 1 con puentes de cistina unidos correctamente, en donde 5 kg corresponden a una conversión de 25%.
- 25 La solución de 9.500 L se ajusta con HCl 1 N a un pH de 5,0, y se separa. Seguidamente, por la adición de sosa cáustica 1 N se ajusta a pH 9. Se agregan 10 g de tripsina a la solución. Según la medición por HPLC se forman aprox. 2,2 kg de precursor de insulina 2.

La insulina 2 corresponde a la Fórmula I, en la que significan

- Y Thr (B30),
- 30 Z Arg-Arg,
- R<sup>1</sup> Phe (B1),
- R<sup>3</sup> Gly (A21), y

A2-A20 la secuencia de aminoácidos de la cadena A de insulina humana (restos de aminoácidos 2 a 20) y B2-B29 es la secuencia de aminoácidos de la cadena B de insulina humana (restos de aminoácidos 2 a 29).

- 35 La insulina 2 está formada por una cadena A con la secuencia

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly  
 (SEC ID NO:5)

y una cadena B con la secuencia

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg (SEC ID NO:6)

enlazadas entre sí mediante puentes de cistina unidos correctamente.

5 La solución se concentra por medio de una resina adsorbente y se purifica.

El eluato, que contiene insulina 2, se puede seguir purificando de inmediato en una columna cromatográfica, después de diluir con agua y ajustar el pH.

Ejemplo 2 (Procedimiento según la presente invención)

10 Por medio de la fermentación de células de *Escherichia coli* genéticamente modificada (documento EP 0489780) se prepara una proteína de fusión con la secuencia de aminoácidos de la secuencia de proinsulina 1 (SEC ID NO:4).

En las células de *E. coli* se acumula la proteína de fusión expresada con la secuencia de proinsulina 1 y se forman cuerpos de inclusión. Después de finalizar la fermentación, las células se separan por centrifugación y se disgregan por homogeneización de alta presión habitual. Los corpúsculos de inclusión de proteína de fusión liberados se aíslan por centrifugación.

15 A la suspensión acuosa de proteína de fusión, que contiene 40 kg de proteína de fusión (calculado por liofilización de una parte alícuota), se agregan 5 kg de hidrocloreto de cisteína hidrato.

20 La suspensión (la fracción de la proteína de fusión que contiene insulina se determina con ayuda de HPLC. Representa 50%) se disuelve con la secuencia de proinsulina 1 en 550 L de una solución 8 M de urea a pH 10,2 y a 40°C. La solución transparente se agita en 9.000 L de agua a un valor de pH de 10,6 y a una temperatura de 15°C. El espacio para el gas del recipiente se trata con una cantidad de aire de revestimiento de 4 m<sup>3</sup>/h durante todo el periodo de reacción, con agitación de la mezcla. En el recipiente de 10.000 L de capacidad, con un diámetro de 2.000 mm y dos placas de desvío situadas sobre la región cilíndrica, se hacen circular los 9.500 L de la solución de plegado de una agitadora trapezoidal de tres fases, con un diámetro de órgano de agitación de 1.100 mm y una potencia de propulsión de 2 kW, de tal forma que se garantiza la mezcla del contenido con gas desde el fondo. La proporción volumen/superficie de la mezcla de reacción es de 1:3,14. El contenido de oxígeno se mantuvo en 8 mg/L mediante agitación y suministro de gas.

Tras finalizar la reacción de plegado después de 4 h, se determina con ayuda de HPLC analítica el contenido de secuencia de proinsulina 1 con puentes de cistina unidos correctamente en la mezcla de reacción, en donde 10,0 kg corresponden a una conversión de 50%.

30 Los 9.500 L de solución se ajustan a un pH de 5,0 con HCl 1 N y se separan. A continuación, por adición de sosa cáustica 1 N se ajusta a pH 9. Se agregan 10 g de tripsina a la solución. Se forman 4,5 kg de insulina 2 según la medición por HPLC.

La solución se concentra por medio de resina adsorbente y se purifica.

35 El eluato, que contiene insulina 2, se puede seguir purificando en una columna cromatográfica inmediatamente después de diluir con agua y ajustar el pH.

40

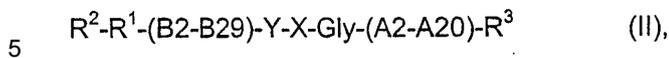
45

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de insulinas o de un derivado de insulina con puentes de cisteína unidos correctamente, a partir de un precursor de la insulina o del derivado de insulina, en donde el precursor se somete a un proceso de plegado en presencia de cisteína o hidrocloreuro de cisteína y de un adyuvante caotrópico, después del cual se obtiene a partir del precursor, por escisión enzimática con tripsina o una enzima similar a la tripsina y, eventualmente, con el uso adicional de carboxipeptidasa B y la subsiguiente purificación en una resina adsorbente, una insulina o un derivado de insulina con puentes de cisteína unidos correctamente, caracterizado por que para la realización del proceso de plegado se llevan a cabo sucesivamente las siguientes etapas:
- mezclar una suspensión acuosa del precursor de insulinas o derivados de insulina con una cantidad de cisteína o hidrocloreuro de cisteína que proporciona 1 a 15 restos SH de la cisteína o del hidrocloreuro de cisteína por resto de cisteína del precursor,
  - incorporar la suspensión del precursor que contiene cisteína o hidrocloreuro de cisteína a una solución 4 a 9 molar del adyuvante caotrópico, a un valor de pH de 8 a 11,5 y a una temperatura de aproximadamente 15 a 55°C, y mantener la mezcla obtenida durante aproximadamente 10 a 60 minutos a esta temperatura, y
  - incorporar la mezcla a un valor de pH de 8 a 11,5 y a una temperatura de 5 a 30°C a una cantidad de agua que produce una dilución de la concentración de cisteína o de hidrocloreuro de cisteína en la mezcla a aproximadamente 1 a 5 mM y del adyuvante caotrópico a 0,2 hasta 1,0 M,
- en donde, en la etapa (c), la mezcla se trata con gas en un recipiente, de manera que la concentración de oxígeno en la suspensión es de 1 a 15 mg/L.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la proporción de volumen a superficie de la mezcla en la etapa (c) es mayor que 1.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que la proporción de volumen a superficie de la mezcla es mayor que 2.
4. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la concentración de oxígeno en la mezcla es de 2 a 10 mg/L.
5. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que en la etapa (a) la cantidad de cisteína o hidrocloreuro de cisteína corresponde a una cantidad que proporciona 1 a 6 restos SH de la cisteína o del hidrocloreuro de cisteína por resto de cisteína del precursor,
- en la etapa (b), tiene lugar la incorporación de la suspensión del precursor que contiene cisteína o hidrocloreuro de cisteína en una solución 4 a 9 molar del adyuvante caotrópico a un valor de pH de 8 a 11 y a una temperatura de 30 a 45°C, y la mezcla obtenida se mantiene a esta temperatura durante 20 a 40 minutos, y
- en la etapa (c), se produce la incorporación de la mezcla a un valor de pH de 8 a 11 y a una temperatura de 15 a 20°C a una cantidad de agua que produce una dilución de la concentración de cisteína o del hidrocloreuro de cisteína en la mezcla a aproximadamente 1 a 5 mM y una concentración del adyuvante caotrópico de 0,2 a 1,0 M.
6. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que el adyuvante caotrópico es guanidina, hidrocloreuro de guanidina o urea.
7. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que la concentración del adyuvante caotrópico en la etapa (b) es de 7,0 a 9 M.
8. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que la temperatura en la etapa (b) es de 40°C.
9. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que el valor de pH en la etapa (b) es de 10 a 11.
10. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que el valor de pH en la etapa (c) es de 10 a 11.
11. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado por que, en la etapa (c), la cantidad de agua produce una dilución de la concentración de cisteína o del hidrocloreuro de cisteína en la mezcla a 2,5 a 3,0 mM y una concentración de adyuvante caotrópico a 0,5 M.
12. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado por que la concentración del adyuvante caotrópico en la etapa (b) es de aproximadamente 8 M, la temperatura en la etapa (b) es de aproximadamente 40°C, el valor de pH en la etapa (b) es de aproximadamente 10,2, el valor de pH en la etapa (c) es de aproximadamente 10,6, y en la etapa (c) la cantidad de agua produce una dilución de la concentración de cisteína o de

hidrocloruro de cisteína en la mezcla a aproximadamente 2,5 a 3,0 M, y una concentración del adyuvante caotrópico de 0,5 M.

13. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado por que el precursor de insulinas o derivados de insulina tiene la secuencia según la Fórmula general II



en la que significan

- $R^2$
- a) un átomo de hidrógeno
  - b) un resto de aminoácido del grupo de lisina (Lys) o arginina (Arg), o
  - c) un péptido con 2 a 45 restos de aminoácidos que contiene el resto de aminoácido lisina (Lys) o arginina (Arg) en el extremo carboxilo del péptido,

$R^1$  un resto de fenilalanina (Phe) o un enlace covalente,

(B2-B29) los restos de aminoácidos en las posiciones B2 a B29 de la cadena B de insulina humana, insulina animal o un derivado de insulina con variaciones, eventualmente, en una o múltiples de estas posiciones,

Y un resto de aminoácido codificable genéticamente,

- X
- a) un resto de aminoácido del grupo de histidina (His), lisina (Lys) o arginina (Arg), o
  - b) un péptido con 2 a 35 restos de aminoácidos, que contiene el resto aminoácido de lisina (Lys) o arginina (Arg) en el extremo N-terminal y en el extremo carboxilo del péptido, o
  - c) un péptido con 2 a 35 aminoácidos codificables genéticamente, que contiene 1 a 5 restos de histidina,

(A2-A20) los restos de aminoácidos en las posiciones A2 a A20 de la cadena B de insulina humana, insulina animal o de un derivado de insulina con variaciones eventualmente en una o múltiples posiciones

$R^3$  un resto de aminoácido codificable genéticamente.

14. Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado por que en la Fórmula II significan

- $R^2$
- a) un átomo de hidrógeno o
  - b) un péptido con 2 a 25 restos de aminoácidos, que contiene el resto de aminoácido arginina (Arg) en el extremo carboxilo del péptido,

$R^1$  un resto de fenilalanina (Phe),

(B2-B29) los restos de aminoácidos en las posiciones B2 a B29 de la cadena B de insulina humana

Y un resto de aminoácido del grupo de alanina (Ala), treonina (Thr) o serina (Ser),

X el resto de aminoácido arginina (Arg) o un péptido con la secuencia de aminoácidos de la cadena C de insulina humana,

(A2-A20) los restos de aminoácidos en las posiciones A2 a A20 de la cadena B de insulina humana, y

$R^3$  un resto de aminoácido del grupo de asparagina (Asn), serina (Ser) o glicina (Gly).

15. Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado por que en la Fórmula II significan

- $R^2$
- a) un átomo de hidrógeno o
  - b) un péptido con 2 a 15 restos de aminoácidos, en cuyo extremo carboxilo se encuentra un resto de arginina (Arg),

$R^1$  un resto de fenilalanina (Phe),

(B2-B29) los restos de aminoácidos en las posiciones B2 a B29 de la cadena B de insulina humana

## ES 2 527 693 T3

- Y un resto de treonina (Thr),
- X el resto de aminoácido arginina (Arg) o un péptido con 2 a 35 restos de aminoácidos, en donde al comienzo y al final del péptido hay dos restos de aminoácidos básicos, en especial arginina (Arg) y/o lisina (Lys),
- (A2-A20) los restos de aminoácidos en las posiciones A2 a A20 de la cadena B de insulina humana, y
- R<sup>3</sup> un resto de aminoácido de asparagina (Asn) o glicina (Gly).