

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 016**

51 Int. Cl.:

C07K 14/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2005 E 05813799 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015 EP 1934252**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de conjugados de insulina**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.09.2015

73 Titular/es:

**BIOCON LIMITED (100.0%)
20TH K.M. HOSUR ROAD, ELECTRONICS CITY
P.O.
BANGALORE 560 100 KARNATAKA, IN**

72 Inventor/es:

**DAVE, NITESH;
HAZRA, PARTHA;
GOEL, ANUJ;
ROY, NITA;
KHEDKAR, ANAND;
IYER, HARISH;
KRISHNAN, GAUTAM;
MANJUNATH, H. S.;
SURYANARAYAN, SHRIKUMAR;
MANIKAM, GOVINDASAMY;
SACHDEV, GOLDY y
GARG, MAYANK**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 546 016 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 preparación de conjugados de insulina****5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para un producto conjugado de insulina-oligómero de fórmula insulina-oligómero. El procedimiento implica clonar y expresar un precursor IP-F de fórmula G-A-V-R-[Cadena B]-R-D-A-D-D-R-[Cadena A] y someter el precursor biosintético expresado a conjugación con un oligómero activado seguido de tratamiento con proteasa y purificación para obtener un producto conjugado de insulina-oligómero activo.

Antecedentes de la invención

Las células beta de los islotes pancreáticos secretan un precursor de cadena sencilla de insulina, conocido como pro-insulina que después de la proteólisis da como resultado el polipéptido biológicamente activo insulina. La molécula de insulina está altamente conservada en todas las especies y generalmente consiste en dos cadenas de aminoácidos unidos por enlaces disulfuro. La molécula natural de insulina humana (p.m. 5.807 Daltons), tiene una cadena de 21 residuos de aminoácidos con glicina en el extremo amino; y una cadena B de 30 residuos de aminoácidos con fenilalanina en el extremo amino. La insulina puede existir como un monómero o puede agregarse en un dímero o un hexámero formado a partir de tres de los dímeros. El monómero tiene la capacidad de unirse a los receptores y es la forma biológicamente activa.

Polipéptido de insulina es la principal hormona responsable de controlar el transporte, la utilización y el almacenamiento de la glucosa en el organismo. Un defecto en el metabolismo de los carbohidratos como resultado de una producción insuficiente de insulina o de una reducción de la sensibilidad del receptor a la insulina conduce al trastorno biológico de diabetes. La diabetes afecta la capacidad normal a utilizar la glucosa, como resultado aumenta los niveles de azúcar en la sangre (hiperglucemia). A medida que la glucosa se acumula en la sangre, los niveles excesivos de azúcar son excretados en la orina (glucosuria). Otros síntomas de la diabetes incluyen el aumento del volumen y la frecuencia de micción, sed, picor, hambre, pérdida de peso y debilidad. La diabetes cuando se deja sin tratar conduce a cetosis, seguida de acidosis con náuseas y vómitos. A medida que los productos tóxicos continúan acumulándose, el paciente entra en un coma diabético, lo que conduce a la muerte del paciente. Hay dos tipos de diabetes. La de tipo I es la diabetes mellitus insulino dependiente o DMID. La DMID era anteriormente conocida como "diabetes de inicio juvenil". En la DMID, la insulina no es secretada por el páncreas y debe ser proporcionada desde una fuente externa. La diabetes tipo II o de inicio en la edad adulta normalmente puede ser controlada por la dieta, aunque en algunos casos avanzados se requiere insulina.

Tradicionalmente se utilizó casi exclusivamente insulina bovina y porcina para el tratamiento de la diabetes en los seres humanos. Con el desarrollo de la tecnología recombinante, fue posible la fabricación a escala comercial de insulina humana mediante fermentación. Además, se han desarrollado análogos de insulina mediante ingeniería genética que tienen una actividad biológica comparable a la de la insulina humana natural para combatir la enfermedad. Sin embargo, el tratamiento de la diabetes normalmente requiere inyecciones regulares de insulina. Debido a la incomodidad de las inyecciones de insulina, se han intentado diversos enfoques para formular insulina para su administración por vías no inyectables. Una lista de tales publicaciones incluye: el documento US 4.338.306 (Kitao et al.) informa de composiciones farmacéuticas de insulina y ácidos grasos que tienen de 8 a 14 átomos de carbono y sus sales no tóxicas para la administración rectal de insulina; el documento US 4.579.730 (Kidron et al) informa de composiciones de insulina con recubrimiento entérico con un ácido biliar o sal de metal alcalino del mismo para la administración oral de insulina; el documento US 5.283.236 (Chiou et al.) informa de una composición de insulina con un agente para mejorar la penetración para ayudar a la absorción sistémica de polipéptidos de peso molecular superior, así como inhibidores de peptidasa para la liberación sistémica de insulina a través de los ojos, en donde el fármaco se excreta al conducto nasolagrimal y se pasa a ser absorbido a la circulación; el documento US 5.658.878 (Backstrom et al.) informa de una sal de insulina y sodio de un ácido graso saturado de longitud de cadena carbonada de 10 (es decir, caprato de sodio), 12 (laurato de sodio), o 14 (miristato de sodio) que mejora la absorción de insulina en el tracto respiratorio inferior; el documento US 5.853.748 (New et al.) - informa de una composición con recubrimiento entérico de insulina, sal biliar o ácido biliar, e iones carbonato o bicarbonato, que se utiliza para ajustar el pH del intestino a un pH de 7,5 a 9, para la administración oral de insulina. El documento US 6.200.602 (Watts et al) informa de una composición de liberación de fármacos de insulina para liberación colónica de insulina con un promotor de absorción que incluye una mezcla de ácidos grasos que tienen de 6 a 16 átomos de carbono y sus sales o una mezcla de mono/diglicéridos de ácidos grasos de cadena media junto con un agente dispersante, en un recubrimiento para prevenir la liberación de insulina y promotor de absorción hasta que el comprimido, cápsula o gránulo alcanza el colon proximal.

Varios intentos para liberar insulina por medio de administración oral se encuentran en la bibliografía. Los problemas asociados con la administración oral de insulina para lograr la normoglucemia en pacientes diabéticos están bien documentados en la bibliografía médica y farmacéutica. Las enzimas digestivas en el tracto GI degradan

rápida mente la insulina, dando como resultado productos de degradación biológica. En el estómago, por ejemplo, la insulina administrada oralmente sufre proteólisis enzimática y degradación ácida. La supervivencia en el intestino se ve obstaculizada por la proteólisis excesiva. En el lumen, la insulina es bombardeada por una variedad de enzimas incluyendo enzimas gástricas y pancreáticas, exo- y endopeptidasas, y peptidasas de borde en cepillo. Incluso si la insulina sobrevive a este ataque enzimático, las barreras biológicas que deben ser atravesadas antes de que la insulina pueda alcanzar sus receptores in vivo pueden limitar la administración oral de insulina. Por ejemplo, la insulina puede poseer baja permeabilidad de membrana, lo que limita su capacidad para pasar del lumen al torrente sanguíneo.

5
10
15
Se han conjugado polipéptidos farmacéuticamente activos tales como la insulina con mezclas polidispersas de polietilenglicol o mezclas polidispersas de polietilenglicol que contiene polímeros para proporcionar mezclas polidispersas de productos conjugados de fármaco-oligómero; el documento US 4.179.337 (Davis et al) Informa de la conjugación de polipéptidos tales como insulina con diversos polietilenglicoles tales como MPEG-1 900 y MPEG-5000 suministrados por Union Carbide. El documento US 5.567.422 (Greenwald) Informa de la conjugación de nucleófilos biológicamente activos con polietilenglicoles tales como m-PEG-OH (Union Carbide), que tiene un peso molecular medio numérico de 5.000 Daltons.

20
La conjugación de polipéptidos tales como insulina con polímeros de glicolípidos modificados con polietilenglicol y polímeros de ácidos grasos modificados con polietilenglicol se presentan en el documento US 5.359.030 (Ekwuribe et al.).

25
30
El documento US 6.011.008 (Domb et al.) informa de un método para producir un producto conjugado de polisacárido soluble en agua de una sustancia sensible a la oxidación que comprende activar el polisacárido a un dialdehído por medio de oxidación con peryodato; (b) purificar el dialdehído de aniones y subproductos interferentes; y (c) acoplar la sustancia al dialdehído purificado mediante la formación de una base de Schiff para formar el producto conjugado. Opcionalmente, el producto conjugado de la etapa (c) se reduce a un producto conjugado de amina mediante una sustancia reductora. La insulina se conjugó con AG (arabinogalactano) oxidado a través de un enlace amina o imina haciendo reaccionar una solución de AG (arabinogalactano) oxidado puro en solución tampón de borato a pH 8,9 con insulina a 4°C durante la noche. La solución clara se sometió a diálisis a través de una diálisis de celulosa y la solución se liofilizó para producir 115 mg de un sólido de color blanco.

35
El documento US 6.022.524 (Maisano et al.) informaron de la conjugación de Gd-DTPA con insulina porcina en una solución de DTPA y dimetilsulfóxido (DMSO) que fue preparada por medio de calentamiento y agitación, después se enfrió a temperatura ambiente y se le añadió una solución de 11,73 g (0,102 moles) de NHS en 300 ml de DMSO y, a continuación, gota a gota, con una solución de 19,6 g de N,N'-díciclohexilcarbodiimida (0,097 moles) en 400 ml de DMSO. La mezcla se agitó durante 16 horas, después se filtró y el producto filtrado se concentró mediante evaporación a 50°C y 5 Pa hasta un aceite espeso de un volumen de aproximadamente 160 ml.

40
La Patente de los Estados Unidos Núm. 6.309.633 (Ekwuribe et al.) informa del uso de insulina sólida para la conjugación de la insulina con laurato de PEG₅ en presencia de Trietilamina y DMSO a temperatura ambiente. La reacción se controló mediante HPLC cada 30 minutos. El producto conjugado se purificó usando una HPLC preparativa.

45
50
55
La Patente de los Estados Unidos Núm. 6.828.297 (Ekwuribe et al.) informa de métodos para elaborar PEG7-hexil-insulina mediante el uso de cinc o insulina humana libre de cinc para su conjugación con un oligómero activado y purificación de PEG7-hexil-insulina modificada con B29, la insulina en dimetilsulfóxido y trietilamina se hizo reaccionar con oligómero activado a 22 +/- 4°C. La mezcla de reacción bruta se sometió a diálisis o diafiltración para eliminar los disolventes orgánicos y pequeñas impurezas de peso molecular, se sometió a intercambio frente a tampón de acetato de amonio y se liofilizó; que se sometió adicionalmente a RP-HPLC equilibrada con tampón de trietilamina al 0,5%/ ácido fosfórico al 0,5% (TEAP A). La columna se eluyó con un gradiente de flujo utilizando un sistema disolvente TEAP A y TEAP B (acetonitrilo al 80% y TEAP A al 20%). Las fracciones que contenían el producto conjugado se agruparon y el tampón de elución y el disolvente se eliminaron mediante diálisis o diafiltración frente a tampón de acetato de amonio y se liofilizaron para producir un polvo de color blanco de PEG7-hexil-insulina, monoconjugado con B29 (pureza > 97%). En la actualidad, la técnica anterior existente ilustra el uso de polvo o cristales de insulina pura como materia de partida para la fabricación de insulina conjugada en donde la insulina utilizada es una forma biológicamente activa.

60
El documento WO-A-2004/083234 describe métodos para la síntesis de polipéptidos de proinsulina que incluyen poner en contacto un polipéptido de proinsulina que incluye un polipéptido de insulina acoplado a uno o más péptidos por enlace o enlaces peptídicos susceptibles de ser escindidos para producir el polipéptido de insulina con un oligómero en condiciones suficientes para acoplar el oligómero a la porción de polipéptido insulina del polipéptido de proinsulina y proporcionar un producto conjugado de polipéptido de proinsulina-oligómero, y escindir los uno o más péptidos del producto conjugado de polipéptido de proinsulina-oligómero para proporcionar el producto conjugado de polipéptido de insulina-oligómero. También se proporcionan métodos de síntesis de productos

conjugados de polipéptido de proinsulina-oligómero, productos conjugados de polipéptido péptido C-oligómero y otros productos conjugados de pro-polipéptido-oligómero.

5 El documento WO-A-2007/007345 se refiere a un procedimiento para elaborar un producto conjugado de insulina-oligómero en una reacción en un solo recipiente por medio de conjugación de la insulina-éster con un oligómero activado en donde se llevan a cabo el desbloqueo y la conjugación simultáneos.

10 Ding Jin-Guo et al: "Expression of monomeric insulin precursor in *Pichia pastoris* and its conversion into monomeric B27 Lys destriptide insulin by tryptic hydrolysis", *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, Blackwell Publishing, Inc., Malden, MA, EEUU, Vol. 37, Núm. 4, 1 de Abril de 2005, páginas 234-240, comentan el diseño y la producción de B27 Lys-destripéptido-insulina monomérica (B27 Lys DTrI) a partir de su precursor expresado en *Pichia pastoris* a través de la hidrólisis con tripsina. El precursor de B27 Lys-DTrI monomérica (MIP) se purificó a partir de un medio de cultivo de *P. pastoris* por medio de una combinación de cromatografía de exclusión por tamaño, y de intercambio iónico, hidrófoba y se convirtió mediante hidrólisis con tripsina, en B27 Lys DTrI, que se purificó a continuación mediante cromatografía de intercambio iónico hasta la homogeneidad tal como se evaluó mediante electroforesis en gel nativo, HPLC, composición de aminoácidos y el análisis de espectrometría de masas por electropulverización.

15 Kjeldsen T et al: "Secretory expression and characterization of insulin in *Pichia pastoris*", *Biotechnology and Applied Biochemistry*, Academic Press, US, Vol. 29, 1 de Enero de 1999, páginas 79-86 informan de que las levaduras *Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae* tienen características globales similares con respecto a la expresión de la secreción de la insulina. El líder prepro del factor α (factor α) de emparejamiento de *S. cerevisiae* facilitó la secreción de un precursor de insulina, pero no proinsulina expresada en *P. pastoris*. Los líderes prepro sintéticos desarrollados para la expresión de la secreción del precursor de insulina en *S. cerevisiae* también facilitaron la secreción del precursor de insulina expresado en *P. pastoris*. En contraste con *S. cerevisiae*, solo precursor de insulina y no proteína de fusión de líder Pro del factor α hiperglicosilado no procesado/precursor insulina se secretan desde *P. pastoris*. Un péptido espaciador en la proteína de fusión aumentó el rendimiento de la fermentación del precursor de insulina en *P. pastoris*. Un líder prepro sintético, pero no un líder prepro del factor α que carece de sitios de N-glicosilación, facilitó la secreción del precursor de insulina en *P. pastoris*. *P. pastoris* tiene una capacidad para la expresión de la secreción del precursor de insulina que es igual o mejor que la de *S. cerevisiae*.

20 Wang Yan et al: "Human insulin from a precursor overexpressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and a simple procedure for purifying the expression product", *Biotechnology and Bioengineering*, Wiley & Sons, Hoboken, NJ, US, Vol. 73, Núm. 1, 5 de Abril de 2001, páginas 74-79, ilustra la expresión de un precursor de insulina que utiliza *Pichia pastoris*. Se obtuvo un transformante con un alto número de copias del gen integrado en el cromosoma por medio del método de transferencia puntual. En la fermentación de alta densidad utilizando un medio de cultivo sencillo compuesto principalmente de sal y metanol, el nivel de expresión llegó a 1,5 g/L. Se estableció un método de dos etapas para purificar el producto de expresión del medio de cultivo con una recuperación global de aproximadamente 80%. Después de transpeptidación con tripsina, se obtuvo insulina humana con capacidad de unión al receptor y la actividad biológica completas.

25 La presente invención facilita la elaboración de un producto conjugado de insulina-oligómero partir de un precursor especificado IP-X de fórmula Z-[Cadena B]-Q-[Cadena A], donde Z es un líder donde Z es una secuencia de péptido líder, la cadena B es la cadena B de la insulina humana o su análogo, Q es una secuencia peptídica conectora entre la cadena A y B, la cadena A es la cadena A de la insulina humana o su análogo.

30 El precursor de IP-X se conjuga con un oligómero especificado en la posición LysB²⁹ en la cadena B y el aminoácido N-terminal del péptido líder Z. El producto conjugado IP-X-oligómero se somete a continuación a tratamiento con proteasas seguido de purificación para obtener un producto conjugado de insulina-oligómero activo.

35 El material de partida es el caldo fermentado que contiene el precursor IP-X. El caldo que contiene el IP-X se somete a una combinación de cromatografía de tipo intercambio iónico, HPLC, RP-HPLC y cristalización para purificar el IP-X.

40 La presente invención es una forma más simplificada y económica en la elaboración de un producto conjugado de insulina-oligómero en donde varias etapas implicadas en la obtención de cristales de insulina puros en forma biológicamente activa son evitadas p. ej., transpeptidación del precursor de insulina y escisión del precursor de insulina para obtener la insulina activa y varias etapas de purificación cromatográfica p. ej., cromatografía de intercambio iónico, HPLC y RP-HPLC para obtener los cristales de insulina puros.

60 **Compendio de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento de elaboración de un producto conjugado de insulina-oligómero que comprende IN-105, expresando el precursor de IN-105 IP-F de fórmula G-A-V-R-[Cadena B]-R-D-A-D-D-R-[Cadena A], tratando IP-F con un oligómero activado que se conjuga en la posición LysB²⁹ del IP-F y en el amino

ácido Gly¹ del extremo N-terminal del péptido líder GAVR. El IP-F se somete a conjugación con un oligómero que tiene la fórmula general CO-(CH₂)₂-(OCH₂CH₂)₃-OCH₃. Específicamente, la invención proporciona un procedimiento para la preparación del producto conjugado de insulina-oligómero IN-105 de fórmula insulina-CO-CH₂-CH₂-(OCH₂CH₂)₃-OCH₃, comprendiendo el procedimiento:

- 5 i) clonación y expresión del precursor del polipéptido sintético IP-F que tiene el SEQ ID NO: 2, en *Pichia pastoris*;
- ii) fermentación del clon de *Pichia pastoris* que expresa IPF;
- iii) aislamiento y purificación del IP-F;
- 10 iv) conjugación del IP-F con un derivado de succinimida de C₁₄H₂₃NO₈ (Núm. CAS 622 405-78-1) en Lys-B²⁹ de la cadena B en IP-F para obtener el producto conjugado de oligómero IP-F IP-F-CO-CH₂-CH₂-(OCH₂CH₂)₃-OCH₃;
- v) tratamiento del producto conjugado de IP-F-oligómero IP-F-CO-CH₂-CH₂-(OCH₂CH₂)₃-OCH₃ con una proteasa para obtener el producto conjugado de insulina-oligómero activo insulina-CO-CH₂-CH₂-(OCH₂CH₂)₃-OCH₃.

La presente invención implica el uso de la secuencia del precursor biosintético IP-F de fórmula G-A-V-R-[Cadena B]-R-D-A-D-D-R-[Cadena A]. La secuencia líder G-A-V-R utilizada en la presente invención no tiene ningún aminoácido cargado negativamente como se requiere para una mayor expresión de la insulina en la levadura como se describe en la bibliografía. El procedimiento de la presente invención es más simplificado y económico en la fabricación de un producto conjugado de insulina en donde se evitan varias etapas de purificación para obtener la insulina pura en forma biológicamente activa. La presente invención da como resultado un producto sin conjugación de la cadena A o el péptido C (RDADDR) de precursor de IN-105 IP-F y en donde la conjugación tiene lugar en la cadena B (LysB²⁹), y en la Gly de la cadena líder G-A-V-R que a continuación se somete a tratamiento con proteasas para obtener el producto conjugado de insulina-oligómero IN-105. El coste total de producción de la insulina conjugada como resultado de este procedimiento se reduce al mínimo.

Descripción detallada

30 IP-F representa un precursor de insulina-oligómero de la fórmula Z-[Cadena B]-Q-[Cadena A], en donde Z es una secuencia peptídica líder GAVR, la cadena B es B(1-30) de la insulina humana, el péptido conector Q es una secuencia peptídica conectora RDADDR entre las cadenas A y B, y la cadena A es A(1-21) de la insulina humana. El IP-F se clona en marco con el péptido señal Mat-alfa en el vector de expresión de *Pichia pastoris*, pPIC9K. La cepa anfitriona de *Pichia pastoris*, GS115 es transformada con el plásmido recombinante para obtener un clon de *Pichia* que expresa IPF. El IP-F secretado se trata con tripsina, carboxipeptidasa B y éster de N-hidroxisuccinimida (oligómero activado) para producir IN 105.

Secuencia para el precursor de IP-F IN-105.

	secuencia líder		Cadena B	
	gggtgctgtagattgttaaccaacattgtgtggttctcatttggtgaagctttgtac			
40	G A V R F V N Q H L C G S H L V E A L Y			
	Cadena B		conector-péptido	
	ttggtttgtggtgaaagagggttttttacactccaaagactagagatgctgatgtaga			
	L V C G E R G F F Y T P K T R D A D D R			
			Cadena A	
	ggattgtgaacaatgtgtacttctattgttctttgtaccaattggaaaactactgtaac			
45	G I V E Q C C T S I C S L Y Q L E N Y C N			

; Secuencia: codones optimizados para la expresión en *Pichia pastoris*
 Peso molecular pronosticado: 6907,82 Da
 Valor de pI estimado: 5,46
 nucleótidos (183 pb) y aminoácidos (61 aa)

El precursor de IN-105 IP-F es secretado por *P. pastoris* al medio de cultivo. El caldo se centrifuga y las células se separan del sobrenadante. Existen varias opciones disponibles para la captura del precursor IP-F incluyendo Cromatografía de interacción hidrófoba y Cromatografía de intercambio iónico. En la presente invención, la cromatografía de intercambio catiónico y la HIC se utilizan para capturar el IP-F.

La cristalización del precursor de IN-105 IP-F, elimina cualquier impureza transferidas del caldo de fermentación al material eluido SP-Sepharose, esto ayuda a reducir el ensuciamiento de la columna en la fase 1 de la RP-HPLC. La sal de acetato de amonio, que se utiliza para eluir el producto de la columna de intercambio iónico, se elimina también por medio de cristalización. Un precursor cristalino puro también ayuda a la reducción de costes en la etapa de conjugación subsiguiente y aumenta la eficiencia de la reacción. La forma cristalina puede ser congelada y almacenada, lo que haría que fuera sustancialmente estable durante varios días cuando se almacene a -20°C.

El IN-105 es producido por una reacción en donde IP-F se conjuga en primer lugar en la Lisina B²⁹ utilizando un oligómero activado para proporcionar el producto conjugado de IP-F-oligómero. El producto conjugado de IP-F-oligómero se somete a tratamiento con proteasas, donde el conector-péptido (RDADDR) y la secuencia líder (GAVR) son escindidos para obtener el producto conjugado de insulina-oligómero activo. Las dos proteasas utilizadas son tripsina y carboxipeptidasa B. A medida que la LysB²⁹ es bloqueada por el oligómero, la probabilidad de escisión por tripsina en LysB²⁹ es mínima. Pero los otros sitios probables para la escisión con tripsina son el extremo C-terminal de B-22 (Arg), C-1 (Arg) y C-6 (Arg). Se realiza un segundo tratamiento con proteasa (carboxipeptidasa B) para eliminar el aminoácido alcalino (Arg) de la cadena B, donde una Arg adicional se ancla a B-30 (Thr) para obtener el producto final IN-105. El tratamiento con dos proteasa se lleva a cabo en una sola operación en condiciones de reacción óptimas donde se maximiza el rendimiento, generándose mínimas impurezas relacionadas con los productos.

Después de completar la reacción de escisión enzimática, las impurezas se pueden separar de IN-105 p. ej., la primera etapa de RP-HPLC. En la presente invención se eliminan las impurezas cuando la primera RP se ejecuta a un pH bajo y la purificación final se realiza a un pH alto. Se llevó a cabo una carga baja y un gradiente partiendo de 20 a 35 a 15 g/L de carga de resina. La primera etapa de la RP-HPLC proporcionó una pureza de aproximadamente 93-95%. Hubo una serie de impurezas que necesitaron ser eliminadas, donde las impurezas que quedan después de la primera etapa de RP-HPLC se purifican sometiendo el material eluido a otra ronda de RP-HPLC. El producto final de IN-105 tenía una pureza de 97-98%.

Ejemplos

Ejemplo 1

Expresión del precursor de IN105 IP-F en *Pichia PASTORIS*

El plásmido pPIC9K/IP-F se digirió con Bgl II y se utilizó para transformar células electrocompetentes de *P. pastoris* GS115 (*his4*). La mezcla de regeneración se cultivo en placa sobre placas de agar YNBD (Base Nitrogenada para Levaduras al 1,34% sin aminoácidos, Dextrosa al 2%, agar al 2%) y se incubó a 30°C durante 48 horas. Las colonias se cultivaron en caldo YPD (extracto de levadura al 1%, Peptona al 2%, Dextrosa al 2%) en placas de microtitulación junto con los controles apropiados. Las placas se estampan sobre placas de agar YPD (extracto de levadura 1%, Peptona al 2%, Dextrosa al 2%, agar al 2%) que contenían geneticina (G418) y se incubaron a 30°C durante 48 horas. Los clones resistentes a G418 a 1-3 mg/ml de se utilizaron para estudios de expresión.

El ADN genómico se preparó a partir de los clones recombinantes de *Pichia* seleccionados utilizando la enzima zimoliasa para la lisis. La PCR se llevó a cabo utilizando cebadores específicos de genes para confirmar la integración de IP-F en el genoma. La cepa anfitriona GS115 se utilizó como control negativo.

Se llevaron a cabo estudios de expresión en *P. pastoris* en donde los clones se cultivaron a 30°C en BMGY (Peptona al 1%, Extracto de levadura al 2%, Base Nitrogenada para Levadura al 1,34%, Glicerol al 2%, Biotina a 4 x 10⁻⁵%, tampón de fosfato 100 mM, pH 6,0). Esto estuvo seguido de la inducción con metanol en BMMY (Peptona al 1%, Extracto de levadura al 2%, Base Nitrogenada para Levadura al 1,34%, Metanol al 0,5%, Biotina a 4 x 10⁻⁵%, tampón de fosfato 100 mM, pH 6,0). La inducción con metanol se llevó a cabo durante un total de 3 días.

El sobrenadante bruto de cada uno de los clones se analizó mediante SDS-PAGE teñida con Azul de Coomassie. El IP-F fue secretado como una proteína de ~ 7 kDa.

Se analizaron los clones para determinar la secreción de IP-F durante tres días después de la inducción con metanol en matraces de agitación. Se utilizó un método de HPLC para el análisis usando una columna Symmetry C18 (4,6 x 250 mm, 300 Å, 5 micras, Waters) y tampones A (TFA al 0,1% en agua) y B (Acetonitrilo al 100%). La columna se equilibró con tampón A al 25% antes de la inyección de la muestra. Se aplica un gradiente programado a una velocidad de flujo de 1 ml/min para la estimación de la muestra: se prepara un gradiente lineal de tampón A al 25% a tampón A al 40% durante los primeros 15 minutos del gradiente programado después de la inyección de la muestra;

el Tampón A al 40% se mantiene durante los minutos 15 y 16 del programa; a continuación, la concentración de Tampón A se lleva de nuevo a 25% mediante el uso del gradiente entre 16 y 18 minutos; la concentración de Tampón A se mantiene constante durante la ronda de los últimos 5 minutos para equilibrar la columna para la próxima ronda.

5

Ejemplo 2

Un asa de siembra cargada de cultivo de una sola colonia aislada desarrollada en medio de siembra (Extracto de levadura al 1%, peptona 0,5, agar al 2% y monohidrato de dextrosa al 20%) se cultiva en un matraz de 250 ml que contiene 50 ml de medio BYYG (Peptona al 1%, Extracto de levadura al 2%, Base Nitrogenada para Levadura al 1,34%, Glicerol al 2% y de tampón fosfato 1 M al 10% de pH 6,0) a 30 +/- 1°C y 230 +/- 10 rpm. Después de 48~50 horas de incubación la densidad óptica medida a 600 nm alcanza 10 +/- 2. Las células se resuspendieron en 6 ml de medio de producción (Peptona al 1%, Extracto de levadura 2%, Base Nitrogenada para Levadura al 1,34%, Metanol al 0,5% y tampón fosfato 1 M al 10% de pH 6,0) en un matraz de 100 ml con el fin de elaborar una suspensión celular al 50% p/v. Los matraces se incubaron a 30°C. Se añadieron 30 µL de metanol a todos los matraces cada día a partir del 2º día. El análisis el 4º día fue de 0,069 g/L.

10

15

Ejemplo 3

Los matraces de siembra se prepararon mediante el cultivo de células congeladas (-85°C) de *Pichia* en un matraz de 250 ml que contenía 50 ml de medio de crecimiento (extracto de levadura al 1%, peptona al 2%, tampón de fosfato 1 M al 10% de pH 6,0, Base nitrogenada para levadura al 0,67% y glicerol al 0,1%) a 30 +/- 1°C y 230 +/- 10 rpm. Después de 20-28 horas de incubación, la DO (600 nm) alcanza 10-12. Estas células se cultivaron adicionalmente en un fermentador de 2 L que contenía un litro de medio de fermentación que consistía en glicerol al 4%, sulfato de calcio al 0,0093%, sulfato de potasio al 1,82%, sulfato de magnesio al 1,49%, hidróxido de potasio al 0,0413%. El fermentador se hizo funcionar a 30°C y pH de 5,0. La velocidad de aireación se ajustó de 0,1 a 1,0 Wm. La velocidad de agitación se ajustó para mantener el oxígeno disuelto por encima del 10%. La biomasa se acumuló hasta 300-400 g/L por la alimentación de glicerol al 50%. El metanol se alimentó para la inducción. El análisis el día 5 de alimentación de metanol fue de 0,76 g/L.

30

Ejemplo 4 (conjugación selectiva)

Se prepara IN-105 a partir del caldo de fermentación libre de células que contiene el precursor de IN-105 por medio de las etapas que comprenden,

35

a) La columna SP-Sepharose se equilibró con tampón A (2C.V), el pH del caldo libre de células se ajustó a 4,0 con ácido acético glacial y el sobrenadante se cargó en la columna a 45 g/L de resina. El lavado se realizó utilizando tampón A (CV 1,5) y el producto se eluyó a 60% de Tampón B. El material eluido se concentró 8 veces y rendimiento fue de 95%. [Tampón A- acetato de amonio 10 mM de pH 4,0; Tampón B- acetato de amonio 1 M de pH 4,0].

40

b) El material eluido que contenía el precursor de IN-105 se recogió a una dilución 1:1 con agua y el pH se ajustó a 5,0 con NaOH 10N. Se añadieron fenol al 0,4% (v/v) y cloruro de cinc 0,3 N al 4% (v/v). La mezcla se mantuvo bajo condiciones de frío durante 6-8 horas para la cristalización. La recuperación de precursor de IN-105 fue de 95%.

45

c) Se recogieron 6 g de sedimento húmedo que contenía los cristales de precursor de IN-105 y a esto se añadieron 32 ml de tampón de borato 500 mM de pH 8,1. El pH se ajustó a 10,5 con NaOH 10 N. Se añadieron 370 mg de Oligómero disueltos en 11 ml de acetonitrilo y se agitó el contenido. El rendimiento del producto conjugado total fue de aproximadamente 78%

50

d) Se recogió un volumen igual de producto conjugado de la etapa (c) y de agua. El pH de la solución se ajustó a 5,0 con ácido acético glacial, a continuación, se añadieron a la mezcla fenol al 0,4% (v/v) y cloruro de cinc 0,3 N 4% (v/v) de y el pH se ajustó a 5,1 con NaOH 1N. La mezcla se mantuvo durante la noche a 4°C para la cristalización. El rendimiento en esta etapa fue de 90%,

55

e) El sedimento cristalino húmedo de la etapa (d) se solubilizó en solución de base Tris 0,5 M para hacer una concentración de producto de 16 g/l. El pH de la solución se hizo 7,4 utilizando NaOH 1N. A continuación se añadieron a la mezcla de reacción tripsina 0,027 mM y carboxipeptidasa B 0,3 x 10⁻³ mM y se mantuvo a 24°C durante 12 horas. El producto formado fue IN-105 con un rendimiento de etapa de 80%,

60

f) Una columna cargada con resina de tamaño de partícula: 10-15µ, tamaño de poro: 120 Å se equilibró utilizando B al 15%, la mezcla de reacción de la etapa (e) se diluyó 1:10 y pH se ajustó a 7,0 antes de la carga, y el lavado se realizó con B al 15%. La elución se realizó utilizando B al 15 a 25% sobre CV 20. Se consiguieron fracciones de 95% de pureza [Tampón A: acetato de sodio 10 mM de pH 7,0; Tampón B: acetonitrilo al 100%].

g) El eluyente de la etapa (f) se diluyó adicionalmente y el pH se ajustó a 8,5 antes de la carga, y el lavado se realizó con B al 20%. La elución se realizó utilizando B de 20 a 35% sobre CV 15. Se consiguieron fracciones de 97% de pureza [Tampón: Tris 100 mM de pH 8,5; Cloruro de magnesio 20 mM; Tampón B:

acetonitrilo]

- 5 **h)** El material eluido de la etapa (g) se recogió y la concentración de IN-105 se redujo a 6 mg/ml mediante dilución con agua. El pH de la muestra se ajustó a 4,5 con ácido acético glacial. Se añadieron fenol al 0,6% (v/v) y cloruro de cinc 0,3 N al 4% (v/v) y finalmente se preparó un pH de 5 y la mezcla se mantuvo a 4°C durante la noche para formar cristales. Los cristales se recogieron después de la centrifugación con un rendimiento de la etapa de 90%.

Ejemplo 5 (Conjugación selectiva)

- 10 Se prepara IN-105 a partir del caldo de fermentación libre de células que contiene el precursor de IN-105 mediante las etapas que comprenden,

- 15 **a)** El Caldo libre de células recogido a pH 7 se cargó en una columna cargada con PLRP S 50 - 70 MICRON. El caldo se preparó con MeCN al 5% y se cargó en la columna, que se equilibró con acetato de sodio 10 mM pH 7,0 y MeCN al 5%. Se consiguió una recuperación de 90% a partir de una carga de 4 g/L,
- 20 **b)** El material eluido que contenía el precursor de IN-105 se recogió a una dilución 1:1 con agua y el pH se ajustó a 5,0 con NaOH 10N. Se añadió fenol al 0,4% (v/v) y de cloruro de cinc 0,3 N al 4% (v/v). La mezcla se mantuvo bajo condiciones de frío durante 6-8 horas para la cristalización. La recuperación de precursor de IN-105 fue de 95%.
- 25 **c)** Se recogieron 20 g del sedimento húmedo que contenía cristales del precursor de IN-105 y se añadieron 92 ml de tampón de borato 500 mM de pH 8,1. El pH se ajustó a 10,5 utilizando NaOH 10 N; se añadieron 1,13 g de oligómero disuelto en 40 ml de acetonitrilo mientras se agitaba la mezcla de reacción. El rendimiento del producto conjugado total fue de 77%.
- 30 **d)** Se recogió un volumen igual de producto conjugado de la etapa (c) y de agua. El pH de la solución se ajustó a 5,0 con ácido acético glacial a continuación, se añadieron a la mezcla fenol al 0,4% (v/v) y de cloruro de cinc 0,3 N al 4% (v/v) y el pH se ajustó a 5,1 con NaOH 1N. La mezcla se mantuvo durante la noche a 4°C para la cristalización. El rendimiento en esta etapa fue de 90%.
- 35 **e)** El sedimento cristalino húmedo de la etapa (d) se solubilizó en solución de base Tris 0,5 M para preparar una concentración de producto de 20 g/l. El pH de la solución se ajustó a 7,4 con NaOH 1N. Se añadieron tripsina 0,02 mM y carboxipeptidasa B 13×10^{-3} mM a la mezcla de reacción. Al cabo de 12 hrs el producto formado fue IN-105 con un rendimiento de etapa de 85%.
- 40 **f)** Una columna cargada con resina de tamaño de partícula: 10-15g, tamaño de poro: 120 Å se equilibró utilizando, tampón B al 10%, la mezcla de reacción de la etapa (e) se diluyó 1:10 con concentración de MeCN al 33% y pH ajustado a 3,5, el lavado se realizó con B al 15%. La elución se realizó utilizando un gradiente escalonado. Se obtuvo un rendimiento de 58,6%, Tampón A: Acetato de Sodio 10 mM de pH 7,0, Tampón B: acetonitrilo al 100%.
- 45 **g)** El eluyente de la etapa (f) se diluyó adicionalmente y el pH se ajustó a 7,5 antes de la carga, y el lavado se realizó con tampón B al 20%. La elución se realizó utilizando tampón B de 22 a 32% sobre CV 20. Se consiguieron fracciones de 97% de pureza [Tampón A: Tris 100 mM de pH 8,5; Cloruro de magnesio 20 mM; Tampón B: Acetonitrilo].
- h)** El material eluido de la etapa (g) se recogió y la concentración de IN-105 se redujo a 6 mg/ml mediante dilución con agua. El pH de la muestra se ajustó a 4,5 con ácido acético glacial. Se añadieron fenol al 0,6% (v/v) y cloruro de cinc 0,3 N al 4% (v/v) y finalmente se preparó un pH de 5 y la mezcla se mantuvo a 4°C durante la noche para formar cristales de IN-105. Los cristales se recogieron después de la centrifugación con un rendimiento de la etapa de 90%.

Ejemplo 6 (conjugación exhaustiva)

- 50 **a)** La columna SP-Sepharose se equilibró con tampón A (C.V 2), el pH del caldo libre de células se ajustó a 4,0 con ácido acético glacial y el sobrenadante se cargó en la columna a 20 g/l de carga. El lavado se realizó utilizando tampón A (C.V 1,5) y el producto se eluyó a 0 a 100% de B en C.V. 10. El material eluido se concentró 8 veces y rendimiento fue de 98%. [Tampón A- Acetato de amonio 10 mM de pH 4,0; Tampón B-acetato de amonio 1 M de pH 4,0].
- 55 **b)** El material eluido que contenía el precursor de IN-105 fue recogido a una dilución 1:1 con agua y el pH se ajustó a 5,0 con NaOH 10 N. Se añadió fenol al 0,4% (v/v) y cloruro de cinc 0,3 N al 4% (v/v). La mezcla se mantuvo bajo condiciones de frío durante 6-8 horas para la cristalización. La recuperación de precursor de IN-105 fue de 95%.
- 60 **c)** El sedimento cristalino húmedo se solubiliza en DMSO para preparar la concentración del producto de 60 g/ml. A la mezcla de reacción se le añadió trietilamina al 0,001% (v/v). El oligómero se solubilizó en tetrahidrofurano (THF) a una concentración de 0,4 M y se añadió a la mezcla de reacción. Al cabo de 15 hrs se recuperó producto conjugado exhaustivamente con un rendimiento de 80%.
- d)** Se recogió un volumen igual de producto conjugado de la etapa (c) y de agua. El pH de la solución se ajustó a 5,0 con ácido acético glacial, a continuación, se añadieron a la mezcla fenol al 0,4% (v/v) y cloruro

de cinc 0,3 N al 4% (v/v) y el pH se ajustó a 5,1 con NaOH 1N. La mezcla se mantuvo durante la noche a 4°C para la cristalización. El rendimiento en esta etapa fue de 90%

e) El sedimento cristalino húmedo de la etapa (d) se solubilizó en solución de base Tris 0,5 M para preparar una concentración de producto de 25 g/l. El pH de la solución se elevó a 7,4 con NaOH 1N. Se añadieron a la mezcla de reacción tripsina 0,02 mM y carboxipeptidasa 3×10^{-3} . Al cabo de 14 horas, el IN-105 formado tenía un rendimiento de etapa de 80%

f) Una columna cargada con resina de tamaño de partícula: 10-15 μ , tamaño de poro: 120 Å se equilibró utilizando tampón B al 15%; la mezcla de reacción de la etapa (e) se diluyó 1:10 y el pH se ajustó a 7,0 antes de la carga. El lavado se realizó con tampón B al 15% y la elución se realizó utilizando tampón B de 27 a 37% de sobre CV 20. Se consiguieron fracciones de 90% de pureza. Tampón A: Tris 100 mM de pH 8,0; MgCl₂ 20mM, pH 8,5. Tampón B: acetonitrilo al 100%.

g) El eluyente de la etapa (f) se diluyó adicionalmente y el pH se ajustó a 9,0 antes de la carga, y el lavado se realizó con tampón B al 20%. La elución se realizó utilizando tampón B de 20 a 35% sobre CV 15. Se consiguieron fracciones de 97% de pureza [Tampón A: Tris 100 mM de pH 9,0; Cloruro de Magnesio 20 mM; Tampón B: acetonitrilo].

h) El material eluido de la etapa (g) se recogió y la concentración de IN-105 se redujo a 6 mg/ml mediante dilución con agua. El pH de la muestra se ajustó de 8,3 a 4,5 con ácido acético glacial. Se añadieron fenol al 0,6% (v/v) y cloruro de cinc 0,3 N al 4% (v/v) y finalmente se preparó un pH de 5 y la mezcla se mantuvo a 4°C durante la noche para formar cristales. Los cristales se recogieron después de la centrifugación con un rendimiento de la etapa de 90%.

Ejemplo 7 (conjugación exhaustiva)

a) La columna SP-Sepharose se equilibró con tampón A (C.V 2), el pH del caldo libre de células se ajustó a 4,0 con ácido acético glacial y el sobrenadante se cargó en la columna a una carga de 45 g/l. El lavado se realizó utilizando tampón A (CV 1,5) y el producto se eluyó a 60% de B. El material eluido se concentró 8 veces y rendimiento fue de 95%, [Tampón A - Acetato de Amonio 10 mM de pH 4,0; Tampón B - Acetato de Amonio 1 M de pH 4,0]

b) El material eluido que contenía el precursor de IN-105 fue recogido a una dilución 1:1 con agua y el pH se ajustó a 5,0 con NaOH 10N. Se añadió fenol al 0,4% (v/v) y cloruro de cinc 0,3 N al 4% (v/v). La mezcla se mantuvo bajo condiciones de frío durante 6-8 horas para la cristalización. La recuperación de precursor de IN-105 fue de 95%,

c) El sedimento cristalino húmedo se solubilizó en DMSO para preparar la concentración del producto de 60 g/ml. Se añadió a la mezcla de reacción trietilamina al 0,001% (v/v). El oligómero se solubilizó en tetrahidrofurano (THF) a una concentración de 0,4 M y se añadió a la mezcla de reacción. Al cabo de 15 hrs se recuperó producto conjugado exhaustivamente con un rendimiento de 80%.

d) Se recogió un volumen igual de producto conjugado de la etapa (c) y de agua. El pH de la solución se ajustó a 5,0 con ácido acético glacial, a continuación, se añadieron a la mezcla fenol al 0,4% (v/v) y de cloruro de cinc 0,3 N al 4% (v/v) y el pH se ajustó a 5,1 con NaOH 1N. La mezcla se mantuvo durante la noche a 4°C para la cristalización. El rendimiento en esta etapa fue de 90%,

e) El sedimento cristalino húmedo de la etapa (d) se solubilizó en una solución de base Tris 0,5 M para preparar una concentración de producto de 25 g/l. El pH de la solución se elevó a 7,4 con NaOH 1 N, a la mezcla de reacción se le añadieron tripsina 0,02 mM y carboxipeptidasa B 3×10^{-3} . Al cabo de 14 horas, el IN-105 formado tenía un rendimiento de etapa de 80%

f) Una columna cargada con resina de tamaño de partícula: 10-15 μ , tamaño de poro: 120 Å se equilibró utilizando tampón B al 10%, la mezcla de reacción de la etapa (e) se diluyó 1:10 con concentración de MeCN al 15% y el pH se ajustó a 3,5 y la carga se filtró a través de un filtro de 5 micras; el lavado se realizó con B al 15%. La elución se realizó con tampón B de 17 a 23% sobre CV 20. Se consiguió proteína pura 94,2%, con un rendimiento de 77%. [Tampón A: ácido acético 250 mM, Tampón B: acetonitrilo]

g) El eluyente de la etapa (f) se diluyó adicionalmente y el pH se ajustó a 9,0 antes de la carga, y el lavado se realizó con tampón B al 20%. La elución se realizó utilizando B de 22 a 32% sobre CV 15. Se consiguieron fracciones de 97% de pureza [Tampón A: Tris 100 mM de pH 9,0; Cloruro de magnesio 20 mM; Tampón B: acetonitrilo]

h) El material eluido de la etapa (g) se recogió y la concentración de IN-105 se redujo a 6 mg/ml mediante dilución con agua. El pH de la muestra se ajustó de 8,3 a 4,5 con ácido acético glacial. Se añadieron fenol al 0,6% (v/v) y cloruro de cinc 0,3 N al 4% (v/v) y finalmente se preparó un pH de 5 y la mezcla se mantuvo a 4°C durante la noche para formar cristales de IN-105. Los cristales se recogieron después de la centrifugación con un rendimiento de etapa de 90%.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación del producto conjugado de insulina-oligómero IN-105 de fórmula insulina-CO-CH₂-CH₂-(OCH₂CH₂)₃-OCH₃, comprendiendo el procedimiento:
- 5 i) clonación y expresión del precursor del polipéptido sintético IP-F que tiene el SEQ ID NO: 2, en *Pichia pastoris*;
- ii) fermentación del clon de *Pichia pastoris* que expresa IPF;
- iii) aislamiento y purificación del IP-F;
- 10 iv) conjugación del IP-F con un derivado de succinimida de C₁₄H₂₃NO₈ (Núm. CAS 622 405-78-1) en Lys-B²⁹ de la cadena B en IP-F para obtener el producto conjugado de oligómero IP-F IP-F-CO-CH₂-CH₂-(OCH₂CH₂)₃-OCH₃;
- v) tratamiento del producto conjugado de IP-F-oligómero IP-F-CO-CH₂-CH₂-(OCH₂CH₂)₃-OCH₃ con una proteasa para obtener el producto conjugado de insulina-oligómero activo insulina-CO-CH₂-CH₂-(OCH₂CH₂)₃-OCH₃.
- 15
2. Un procedimiento de la reivindicación 1, en donde el precursor de IP-F se aísla a partir del caldo mediante cromatografía de intercambio iónico seguido de cristalización.
3. Un procedimiento de la reivindicación 2, en donde la cristalización se lleva a cabo en fenol y ZnCl₂.
- 20
4. Un procedimiento de la reivindicación 1, 2 o 3, en donde la conjugación de IP-F con el derivado de succinimida de C₁₄H₂₃NO₈ (Núm. CAS 622 405-78-1) se lleva a cabo en uno o más disolventes seleccionados entre tampón de borato, acetonitrilo, DMSO.
- 25
5. Un procedimiento de la reivindicación 1 a 4, en donde el oligómero conjugado de IP-F IP-F-CO-CH₂-CH₂-(OCH₂CH₂)₃-OCH₃ se somete adicionalmente a cristalización.
6. Un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la proteasa se selecciona entre tripsina o carboxipeptidasa B o mezcla de las mismas.
- 30
7. Un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el producto conjugado de insulina-oligómero activo insulina-CO-CH₂-CH₂-(OCH₂CH₂)₃-OCH₃ se purifica mediante RP-HPLC y cristalización.