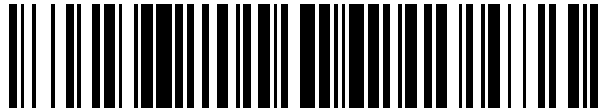


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 773**

51 Int. Cl.:

C07K 14/62 (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2007 E 07843856 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 2074140**

54 Título: **Insulina y análogos de la insulina resistentes a la fibrilación**

30 Prioridad:

04.10.2006 US 828153 P

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

23.12.2015

73 Titular/es:

**CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY
(100.0%)
10900 Euclid Avenue
Cleveland, OH 44106-7219, US**

72 Inventor/es:

WEISS, MICHAEL

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 554 773 T3

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

DESCRIPCIÓN

Insulina y análogos de la insulina resistentes a la fibrilación

Antecedentes de la invención

5 La estabilidad de las proteínas utilizadas en tratamientos médicos es una preocupación importante en medicina. La degradación de las proteínas puede clasificarse como degradación física o química. La degradación física se genera por un cambio en la conformación que conduce a la agregación de la proteína y a la formación de fibrillas. La degradación química de las proteínas supone un cambio en el patrón de enlaces covalentes entre los átomos, tales como la rotura o el intercambio de puentes disulfuro, desaminación o transaminación de la proteína. La presente invención hace referencia a la prevención de la fibrilación y la degradación química.

10 La administración de insulina se ha establecido durante largo tiempo como tratamiento para la diabetes mellitus. La insulina es una proteína pequeña globular que cumple una función central en el metabolismo de los vertebrados. La insulina contiene dos cadenas, una cadena A, que contiene 21 residuos y una cadena B que contiene 30 residuos. La hormona se almacena en las células β pancreáticas como un hexámero estabilizado por Zn^{2+} , pero funciona como un monómero libre de Zn^{2+} en el torrente sanguíneo. La insulina es el producto de un precursor de cadena
 15 única, en el que una región conectora (35 residuos) enlaza el residuo C-terminal de la cadena B (residuo B30) con el residuo N-terminal de la cadena A (Fig. 1A). Aunque la estructura de la proinsulina no ha sido determinada aún, a modo de evidencia, una variedad indica que consiste en un núcleo similar a la insulina y un péptido conector desordenado (Fig. 1B). Se cree que la formación de tres puentes disulfuro específicos (A6-A11, A7-B7, y A20-B19; Fig. 1B) está acoplada al plegamiento oxidativo de la proinsulina en el retículo endoplasmático rugoso (RE). La proinsulina se ensambla para formar hexámeros solubles centrados por Zn^{2+} poco después de exportarlos desde el
 20 RE al aparato de Golgi. La digestión endoproteolítica y la conversión a insulina tiene lugar en gránulos secretores inmaduros, seguido de condensación morfológica. Se han visualizado matrices cristalinas de hexámeros de insulina de zinc dentro de gránulos de almacenamiento maduros mediante microscopía electrónica (ME). El ensamblaje y desensamblaje de oligómeros nativos es por tanto intrínseco a la vía de la biosíntesis, almacenamiento, secreción y acción de la insulina (Fig. 2).

La insulina sufre fácilmente un plegamiento anómalo in vitro formando un amiloide prototípico. Sin guardar relación con el ensamblaje nativo, se cree que la fibrilación tiene lugar a través de un plegamiento parcial amiloidogénico (Fig. 1C). Los factores que aceleran o impiden la fibrilación han sido ampliamente investigados en relación a las
 30 formulaciones farmacéuticas. La insulina libre de zinc es susceptible de fibrilación bajo un amplio rango de condiciones, y ésta se fomenta por factores que afectan a la dimerización nativa y al auto-ensamblaje de orden superior. Se cree que una forma de almacenamiento de la insulina en células β pancreáticas, y en la mayoría de las formulaciones farmacéuticas, se estabiliza mediante iones de zinc centrados axialmente por las cadenas laterales de los aminoácidos de la insulina, específicamente los residuos His^{B10}. La formulación de insulina o análogos de la insulina como un hexámero estabilizado con zinc retrasa pero no evita la fibrilación, especialmente por encima de la
 35 temperatura ambiente y en agitación.

Las sustituciones de aminoácidos en las cadenas A- y/o B de la insulina se han investigado ampliamente para determinar sus posibles efectos favorables sobre la farmacocinética de la acción de la insulina tras su inyección por vía subcutánea. Son conocidos en el arte ejemplos de sustituciones que aceleran o retrasan el tiempo de absorción. Tales sustituciones (tales como Asp^{B28} en Novalog® y [Lys^{B28}, Pro^{B29}] en Humalog®) pueden encontrarse, y a menudo están, asociadas con una fibrilación más rápida y con peor estabilidad física. De hecho, se ha sometido a ensayo una serie de diez análogos de la insulina humana para determinar su susceptibilidad a la fibrilación, incluyendo la insulina Asp^{B28} y la insulina Asp^{B10}. Se observó que los diez son más susceptibles a la fibrilación a un pH 7,4 y a 37 °C que la insulina humana. Las 10 sustituciones se situaron en diversos sitios en la molécula de insulina y es probable que estén asociadas a una amplia variedad de cambios en la estabilidad termodinámica clásica. Estos resultados sugieren que las sustituciones que protegen un análogo de la insulina de la fibrilación bajo condiciones farmacéuticas son poco frecuentes; no existen normas o criterios estructurales claros para su diseño. La presente teoría de fibrilación de proteínas postula que el mecanismo de fibrilación se desarrolla a través de un estado intermedio plegado parcialmente, que a su vez se agrega para formar un núcleo amiloidogénico. En esta teoría, es posible que las sustituciones de aminoácidos que estabilizan el estado nativo puedan o no estabilizar el estado intermedio plegado parcialmente y que pueda o no incrementar (o reducir) la barrera de energía libre entre el estado nativo y el estado intermedio. Por lo tanto, la actual teoría indica que la propensión de una sustitución determinada de aminoácidos en la molécula de insulina a incrementar o reducir el riesgo de fibrilación es sumamente impredecible.

La fibrilación, que es una preocupación seria en la elaboración, almacenamiento y uso de la insulina o análogos de la insulina para el tratamiento de la diabetes, se incrementa con temperaturas más elevadas, pH bajo, agitación, o con la presencia de urea, guanidina, co-disolvente de etanol, o superficies hidrófobas. El actual reglamento de fármacos de Estados Unidos exige que la insulina sea descartada si ocurre fibrilación en un nivel de un uno por ciento o más. Debido a que la fibrilación se ve aumentada a temperaturas más elevadas, los individuos diabéticos,

de manera óptima, deben mantener la insulina refrigerada previamente a su uso. La fibrilación de la insulina o de un análogo de la insulina puede ser una preocupación en particular para los pacientes diabéticos que utilizan una bomba de insulina externa, en la que pequeñas cantidades de insulina o del análogo de la insulina se inyectan en el organismo del paciente en intervalos regulares. En un uso de este tipo, la insulina o análogo de la insulina no se mantiene refrigerado dentro del aparato de la bomba y la fibrilación de la insulina puede tener como resultado un bloqueo del catéter utilizado para inyectar la insulina o análogo de la insulina en el organismo, lo que potencialmente tiene como resultado fluctuaciones impredecibles en el nivel de glucosa en sangre o incluso una peligrosa hiperglucemia. Al menos un informe reciente ha indicado que la insulina lispro (un análogo de la insulina en la que los residuos B28 y B29 se intercambian en relación a sus posiciones en la insulina humana de tipo silvestre; nombre comercial Humalog®), puede ser particularmente susceptible a la fibrilación y la resultante obstrucción de los catéteres de la bomba de insulina.

La fibrilación de la insulina es una preocupación incluso mayor en las bombas de insulina implantables, en donde la insulina estaría contenida en el interior del implante durante 1-3 meses en una alta concentración y a temperatura fisiológica (es decir, 37 °C), en lugar de a temperatura ambiente como ocurre con la bomba externa. Adicionalmente, la agitación causada por el movimiento habitual tendería además a acelerar la fibrilación de la insulina. A pesar del incremento del potencial para que ocurra fibrilación de la insulina, las bombas de insulina implantables son aún objeto de esfuerzos de investigación, debido a las potenciales ventajas de tales sistemas. Estas ventajas incluyen un sistema de administración intraperitoneal de la insulina al sistema circulatorio portal, lo que imita el sistema de administración fisiológico de la insulina mucho mejor que la inyección subcutánea, que proporciona insulina al paciente a través del sistema circulatorio sistémico. La administración por vía intraperitoneal proporciona una absorción más rápida y consistente de la insulina en comparación con la inyección subcutánea, que puede proporcionar una absorción y degradación variable de un sitio de inyección a otro. La administración de la insulina mediante una bomba implantable también proporciona potencialmente un aumento de la comodidad del paciente. Mientras que los esfuerzos para evitar la fibrilación, tales como la adición de un tensioactivo al depósito, han ofrecido algunas mejoras, estas mejoras se han considerado hasta ahora insuficientes para permitir un uso fiable de una bomba de insulina implantada en pacientes diabéticos fuera de los ensayos clínicos estrictamente monitorizados.

La resistencia a la fibrilación causada por calor u otras causas sería particularmente ventajosa para la insulina y análogos de la insulina en regiones tropicales o sub-tropicales de países en desarrollo. La principal barrera para el almacenamiento y uso práctico de las formulaciones farmacéuticas de insulina y análogos de la insulina disponibles en la actualidad, a temperaturas por encima de 30 °C es la aceleración de la fibrilación de la proteína. La principal razón para las limitaciones de la vida útil en almacenamiento de las formulaciones farmacéuticas actualmente disponibles de insulina y análogos de la insulina a temperaturas por encima de 10 °C se debe a la fibrilación de la proteína. Tal como se señala anteriormente, la fibrilación es una especial preocupación para los análogos de insulina de acción rápida o "con las comidas" (tales como Humalog® y Novalog®), en particular cuando estas formulaciones son diluidas por el paciente y almacenadas a temperatura ambiente durante más de 15 días.

Se sabe que modificaciones de proteínas tales como la insulina aumentan la resistencia a la fibrilación pero dificultan la actividad biológica. Por ejemplo, el término "mini-proinsulina" se utiliza para describir una variedad de análogos de proinsulina que contiene regiones conectoras acortadas tales como un conector dipeptídico entre las cadenas A y B de la insulina. Pueden estar presentes también sustituciones adicionales, tales como Ala^{B30} que se encuentra en la insulina porcina, en lugar de Thr^{B30} como se encuentra en la insulina humana. Este análogo se denomina en ocasiones Precursor de la Insulina Porcina, o PIP. Los análogos de la mini-proinsulina son frecuentemente resistentes a la fibrilación pero presentan problemas en cuanto a su actividad. En general, los péptidos conectores de longitud de < 4 residuos bloquean la fibrilación de la insulina a costa de la actividad biológica; se informa que las afinidades para el receptor de la insulina se reducen en al menos 10.000 veces. Aunque tales análogos son útiles como intermedios en la fabricación de la insulina recombinante, no son de utilidad per se en el tratamiento de la diabetes mellitus. Por lo tanto, existe la necesidad de análogos de insulina y análogos de otras proteínas que sean resistentes a la fibrilación y que mantengan al menos una parte de su actividad biológica.

No se pretende que el desarrollo de análogos de insulina resistentes a la fibrilación conduzca a proteínas con una vida útil en almacenamiento indefinida debido a la final degradación de la proteína por su modificación química. Mientras que la fibrilación representa un cambio en la estructura y relaciones espaciales entre las moléculas de insulina mediante interacciones no covalentes alteradas, la modificación química altera el patrón del enlace covalente entre los átomos de la molécula de insulina. Ejemplos de degradación química son la rotura de los puentes de disulfuro, la formación de puentes de disulfuro no nativos entre las moléculas de insulina para formar dímeros covalentes y polímeros de orden superior, la desaminación de una cadena lateral de asparagina para formar una cadena lateral de ácido aspártico, y la reordenación del ácido aspártico para formar ácido iso-aspártico dentro de la molécula de insulina. Aunque la tendencia de un análogo de insulina para formar fibrillas no está correlacionada con su estabilidad termodinámica global, se ha establecido que aumentar la estabilidad termodinámica de la molécula de insulina protege la proteína de la degradación química. Por lo tanto, entre los análogos resistentes a la fibrilación, una propiedad deseable sería también un aumento de la estabilidad termodinámica para simultáneamente conferir protección ante la degradación química. Sería de esperar que la combinación de la resistencia a la fibrilación y la resistencia a la degradación química optimizara el uso seguro y

efectivo de un análogo de la insulina dentro del depósito de una bomba de insulina implantable, la vida útil en almacenamiento de una formulación de un análogo de insulina a o por encima de la temperatura ambiente, y el uso rutinario de una formulación de insulina inyectable por los pacientes con diabetes mellitus en regiones del mundo sub-tropicales y tropicales.

- 5 Se han investigado las sustituciones de aminoácidos en la insulina para determinar sus efectos en la estabilidad termodinámica y actividad biológica. No se ha observado una relación consistente entre la estabilidad y la actividad. Mientras que algunas sustituciones que aumentan la estabilidad termodinámica también mejoran el enlace al receptor de la insulina, otras sustituciones que aumentan la estabilidad impiden tal enlace.

10 Una aproximación tradicional para proteger la insulina o análogos de la insulina de la degradación física y química se basa en el auto-ensamblaje de la proteína en su estado nativo para formar dímeros u oligómeros de orden superior. Debido a que el proceso de fibrilación se desarrolla a través de un monómero de insulina alterado de manera conformacional, secuestro del monómero dentro de un ensamblaje nativo reduce la concentración de monómeros susceptibles. Un ensamblaje de este tipo también mejora la estabilidad termodinámica, retrasando la degradación química. Además, el ensamblaje de insulina amortigua las fluctuaciones conformacionales, reduciendo las tasas de tanto la degradación física como de la química. Debido a estas ventajas, un método común de formulación es formar hexámeros de insulina estabilizados con zinc, la forma predominante de la proteína en los productos Humalin™ (Eli Lilly y Co.), Humalog™ (Eli Lilly y Co.), Novalin™ (Novo-Nordisk), y Novalog™ (Novo-Nordisk). El uso de hexámeros de insulina complica el tratamiento de la diabetes mellitus al retrasar la absorción de la proteína después de su inyección por vía subcutánea.

20 El control glucémico por terapia de reemplazo de la insulina, ya sea administrada mediante una bomba externa, una bomba intraperitoneal, o inyección manual subcutánea, se incrementa mediante análogos de insulina de absorción rápida. La rápida absorción permite que el tiempo de acción de la insulina en los tejidos diana esté más cerca de coincidir con el tiempo de absorción de los nutrientes después de una comida, y de ahí que se aproxime más al control fisiológico de la concentración y el metabolismo de la glucosa en sangre en una persona sana (no diabética). La absorción de la insulina se retrasa por su auto-ensamblaje, como en las formulaciones de insulina humana y de insulinas animales, tales como los hexámeros de insulina estabilizados con zinc. Se ha proporcionado una solución parcial a este problema con los análogos de insulina para la hora de las comidas, en los que la formulación hexamérica se desestabiliza mediante sustituciones de aminoácidos en la molécula de insulina (ver lo anterior). Esta aproximación no es óptima ya que las sustituciones dificultan la estabilidad física y la estabilidad termodinámica del análogo de la insulina, lo que conduce a tasas elevadas de fibrilación y degradación química. Tal disminución de la estabilidad requiere una formulación continuada tal como un hexámero de zinc, que conduzca a su vez a un retraso en la absorción en relación a la inyección de un análogo de insulina monomérica. Hasta la fecha, no se han desarrollado análogos monoméricos que muestren suficiente estabilidad física y estabilidad termodinámica para permitir su formulación y uso terapéutico. Por lo tanto, existe la necesidad de análogos de insulina que combinen las propiedades favorables de retener al menos una actividad biológica parcial, que permanezcan monoméricos en solución en concentraciones proteicas milimolares en tampones compatibles con formulaciones farmacéuticas, que resistan la fibrilación y otras formas de agregación de proteínas no nativas, y que muestren un incremento de la estabilidad termodinámica para retrasar la degradación química.

40 Los análogos de la insulina con afinidades demasiado bajas o demasiado altas para el receptor de insulina pueden tener propiedades biológicas desfavorables en el tratamiento de la diabetes mellitus. Debido a que el aclaramiento de insulina del torrente sanguíneo está mediado principalmente por interacciones con el receptor de la insulina en los tejidos diana, sería de esperar que actividades de unión al receptor menores al 25% mostraran tiempos de vida en el torrente sanguíneo más prolongados. Un aclaramiento tan retrasado sería poco deseable en un análogo de insulina de acción rápida administrado en coordinación con la ingesta de comida para un control estricto de la glucemia. Unas afinidades tan reducidas reducirían también la potencia del análogo de la insulina, lo que requiere la inyección de un mayor volumen de solución de la proteína o bien el uso de una solución de la proteína más sumamente concentrada.

50 Por el contrario, los análogos de la insulina con mayores afinidades para el receptor de la insulina que las de la insulina de tipo silvestre, pueden estar asociados con propiedades de señalización alteradas y un procesamiento celular alterado del complejo hormona-receptor. Un tiempo de permanencia prolongado del complejo entre el análogo de insulina súper activo y el receptor de insulina sobre la superficie de una célula diana o en la superficie de una vesícula intracelular, puede conducir a una señalización mitogénica elevada. La mitogenicidad puede ocurrir si las sustituciones de aminoácidos no solamente aumentan la unión del análogo al receptor de insulina, sino también al receptor de IGF de tipo I. Por estas razones, entre los análogos de insulina resistentes a la fibrilación, es deseable tener análogos cuyas afinidades para el receptor de insulina y el receptor de IGF sean similares a las de la insulina humana de tipo silvestre.

Se ha descrito una modificación de la insulina (sustitución de His^{B10} por Asp) que mejora la estabilidad termodinámica de la insulina y también aumenta su afinidad para el receptor de insulina el doble. Debido a que esta sustitución bloquea la unión del zinc y evita el ensamblaje de los dímeros de insulina en hexámeros, se investigó

como candidato análogo de acción rápida. El desarrollo clínico se detuvo, sin embargo, cuando se observó que la insulina Asp^{B10} mostraba un incremento de la mitogenicidad, unión cruzada al receptor de insulina, y tasas elevadas de formación de tumores de mama con la administración crónica en ratas Sprague-Dawley. Debido a que las propiedades de otro modo favorables de la insulina Asp^{B10} y posiblemente de otros análogos de insulina se desprecian a causa de estas propiedades adversas, sería deseable tener un método de diseño que mantenga las propiedades favorables conferidas por tales sustituciones al mismo tiempo que se evitan las propiedades adversas. Un ejemplo en particular sería el re-diseño de la molécula de insulina para que mantenga la estabilidad termodinámica y las propiedades de unión al receptor asociadas con la sustitución de His^{B10} por Asp sin incurrir en la unión cruzada al receptor de IGF de tipo I o en el incremento de la mitogenicidad.

10 Resumen de la invención

Un aspecto de la presente invención proporciona un análogo de insulina que comprende un polipéptido de cadena única que contiene un polipéptido de la cadena A de la insulina y un polipéptido de la cadena B de la insulina mediante un conector truncado, en donde el conector truncado es un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:

15 un polipéptido con la secuencia GGGPRR (SEQ ID NO. 19),

un polipéptido con la secuencia GGPRR (SEQ ID NO. 20),

un polipéptido con la secuencia GSEQRR (SEQ ID NO. 21),

un polipéptido con la secuencia RREQR (SEQ ID NO. 22),

un polipéptido con la secuencia RREALQKR (SEQ ID NO. 23),

20 un polipéptido con la secuencia GAGPRR (SEQ ID NO. 24),

un polipéptido con la secuencia GPRR (SEQ ID NO. 25),

en donde el polipéptido de la cadena B de la insulina contiene, opcionalmente, uno o más de:

una sustitución de aspartato en la posición correspondiente a la posición B10 de la insulina,

una sustitución de lisina o aspartato en la posición correspondiente a la posición B28 de la insulina, y

25 una sustitución de prolina en la posición correspondiente a la posición B29 de la insulina,

y en donde el polipéptido de la cadena A de la insulina contiene una sustitución de histidina en la posición correspondiente a la posición A8 de la insulina.

La presente invención hace referencia a análogos de la insulina que son más resistentes a la fibrilación que sus homólogos de tipo silvestre, a la vez que mantienen al menos una parte de la actividad biológica del tipo silvestre.

30 La presente invención hace referencia además a análogos de insulina que son más resistentes a la fibrilación que sus insulinas homólogas, pero mantienen al menos una mayor parte de su actividad biológica. En un ejemplo, un análogo de la insulina resistente a la fibrilación muestra menos de un uno por ciento de fibrilación con la incubación y agitación a 37 °C durante al menos 21 días, y mantiene al menos una mayor parte de la afinidad para el receptor de insulina de la insulina de tipo silvestre. En otro ejemplo, un análogo de insulina resistente a la fibrilación muestra menos de un uno por ciento de fibrilación con la incubación y agitación a 37 °C durante al menos 30 días y mantiene al menos una mayor parte de la afinidad para el receptor de insulina de la insulina de tipo silvestre. En aún otro ejemplo, un análogo de insulina resistente a la fibrilación muestra menos de un uno por ciento de fibrilación con la incubación y agitación a 37 °C durante al menos 60 días. En aún otro ejemplo, un análogo de insulina resistente a la fibrilación muestra menos de un uno por ciento de fibrilación con la incubación y agitación a 37 °C durante al menos 60 días y mantiene al menos una mayor parte de la afinidad del receptor de insulina de la insulina de tipo silvestre. En aún otro ejemplo, un análogo de insulina resistente a la fibrilación muestra menos de un uno por ciento de fibrilación con la incubación y agitación a 37 °C durante al menos 90 días. En aún otro ejemplo, un análogo de insulina resistente a la fibrilación muestra menos de un uno por ciento de fibrilación con la incubación y agitación a 37 °C durante al menos 180 días y mantiene al menos una mayor parte de la afinidad para el receptor de insulina de la insulina de tipo silvestre. Este análogo además muestra estabilidad termodinámica mejorada y es refractario a la degradación química (aparte de la desaminación de la asparagina) durante al menos 180 días.

Los análogos de la presente invención combinan sustituciones de aminoácidos en las cadenas A y B de la insulina con una secuencia peptídica conectora, de tal manera que el punto isoeléctrico de la proteína monomérica sea similar a o menor que el de la insulina humana de tipo silvestre, conservando por tanto la solubilidad de la proteína en condiciones de pH neutro.

- 5 Es aún otro aspecto de la presente invención proporcionar una secuencia de ácidos nucleicos que codifique un análogo de insulina de cadena única de la invención. Tales análogos muestran un aumento en la resistencia a la fibrilación en comparación a una insulina correspondiente de dos cadenas.

Otro aspecto de la invención proporciona un análogo de la insulina de la invención para su uso como medicamento, por ejemplo, para su uso en la terapia de reemplazo de la insulina o en el tratamiento de la diabetes mellitus.

- 10 La presente invención encuentra utilidad en un método para el tratamiento de un paciente que comprende administrar al paciente un análogo de la insulina resistente a la fibrilación. En un ejemplo, el análogo de insulina resistente a la fibrilación es un análogo de insulina de cadena única. En otro ejemplo, la insulina se administra mediante una bomba de insulina externa o implantable.

- 15 También se revela en la presente patente un diseño molecular para evitar un aumento significativo en la unión cruzada por parte de un análogo de la insulina al receptor de IGF de tipo I, y para evitar un aumento significativo de la mitogenicidad, incluyendo la estimulación del crecimiento de las células cancerígenas humanas en cultivo celular. Un conector entre las cadenas A y B de un análogo de la insulina se interpone para reducir tal unión cruzada y mitogenicidad, conferida de otro modo en los análogos de insulina de dos cadenas mediante determinadas sustituciones de aminoácidos en las cadenas A o B.

- 20 En general, la presente invención proporciona un análogo de insulina de un vertebrado o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, que comprende un análogo de insulina de cadena única que contiene una insulina de cadena A y una insulina de cadena B conectadas mediante un conector truncado, tal como se define anteriormente. El análogo de insulina de cadena única de la presente invención puede contener además otras modificaciones, tales como sustituciones de una Histidina en los residuos A4, A8 y B1 según se describe de forma más completa en la Solicitud Internacional pendiente de tramitación N° PCT/US07/00320 (WO 2007/081824). En un ejemplo, el análogo de insulina de un vertebrado es un análogo de insulina de un mamífero, tal como por ejemplo un análogo de insulina humano, porcino, bovino, felino, canino o equino.

- 25 También se revela en la presente patente una composición farmacéutica que comprende análogos de insulina de este tipo y que pueden opcionalmente incluir zinc. Los iones de zinc pueden estar incluidos en una composición de este tipo en un nivel de relación molar de entre 2,2 y 3,0 por hexámero del análogo de insulina. En una formulación de este tipo, la concentración del análogo de insulina estaría habitualmente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 3 nM; las concentraciones de hasta 3 nM pueden ser utilizadas en el depósito de una bomba de insulina. En otro ejemplo, una composición farmacéutica que incluye un análogo de insulina de cadena única que muestra menos de un 1 por ciento de fibrilación a 37 °C en una relación molar del zinc de menos de 2, 1,5, 1 por hexámero o incluso en ausencia de zinc en otra cantidad distinta de esta, presente como impureza.

- 30 El análogo de acción rápida insulina Glulisina (Apidra®; Sanofi-Aventis Pharmaceuticals) es un ejemplo de una formulación libre de zinc; el análogo presumiblemente existe en un equilibrio que contiene dímeros, trímeros, tetrámeros y hexámeros cuya rápida disociación (en relación a hexámeros estabilizados con zinc) facilita la absorción después de la inyección por vía subcutánea. Un objetivo largamente perseguido pero no conseguido es el desarrollo de formulaciones de insulina libres de zinc. La inyección subcutánea de una formulación monomérica sería el no va más en cuanto a rapidez de absorción, una característica favorable para su uso en bombas externas o implantables. La barrera para utilizar formulaciones monoméricas en el pasado ha sido su elevada tasa de fibrilación. Esta barrera parece ser intrínseca a la estructura de la molécula de insulina ya que el monómero es la especie más susceptible a la fibrilación. La presente invención proporciona una combinación de prolongaciones (tethers) entre las cadenas A y B y sustituciones de aminoácidos en las cadenas A y B que pueden ser utilizadas para obtener una formulación monomérica que sea activa y sumamente resistente a la fibrilación, incluso a 37 °C.

- 35 Los excipientes pueden incluir glicerol, glicina, otros tampones y sales, y conservantes antimicrobianos tales como fenol y *meta*-cresol; es conocido que los anteriores conservantes mejoran la estabilidad del hexámero de insulina. Una composición farmacéutica de este tipo puede ser utilizada para tratar un paciente con diabetes mellitus u otra condición médica, administrando al paciente una cantidad fisiológicamente efectiva de la composición.

- 40 La presente invención además proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido, que codifica a su vez un análogo de insulina de cadena única de la invención, que contiene una secuencia que codifica una cadena A, una cadena B y un conector truncado tal como se describe anteriormente. El ácido nucleico puede además codificar otras modificaciones de la insulina de tipo silvestre tal como sustituciones del residuo de Histidina en los residuos A4 y A8, una sustitución de un residuo de Histidina en el residuo B1, y

combinaciones de los mismos. Los residuos que no sean Histidinas pueden ser sustituidos en la posición A8 o B10 para mejorar la estabilidad y la actividad. La secuencia de ácido nucleico puede codificar una secuencia de la cadena A o B que contenga una sustitución no relacionada o una extensión en otro lugar en el polipéptido o análogos de proinsulina modificados. El ácido nucleico también puede ser parte de un vector de expresión, y ese vector puede estar insertado en una célula hospedadora, tal como una célula hospedadora procariota como una línea celular de *E. coli*, o una línea celular eucariota tal como la cepa o línea celular *S. cerevisiae* o *Pischia pastoris*.

Es conocido que la degradación química de la insulina, tal como la desaminación, la formación de enlaces isopeptídicos, y el intercambio de disulfuro que conduce a la formación de polímeros covalentes, se reduce mediante formulaciones o modificaciones que mejoran la estabilidad termodinámica de la estructura molecular nativa de la insulina o análogo de insulina. Dicha degradación puede además ser reducida mediante formulaciones o modificaciones que amortiguan la flexibilidad conformacional de la molécula de insulina. La introducción de una región conectora truncada en un análogo de insulina de cadena única puede conferir un incremento de la estabilidad termodinámica y/o reducir la flexibilidad conformacional, y por tanto retrasar la degradación química de la proteína. Pueden obtenerse el incremento adicional de la estabilidad termodinámica en el contexto de un análogo de cadena única mediante sustituciones en los residuos A8, B10 o en ambos.

Breve descripción de las diversas vistas de los dibujos

La Figura 1A es una representación esquemática de la secuencia de la proinsulina humana que incluye las cadenas A y B y la región conectora mostrada con sitios de corte dibásicos flanqueadores (círculos con relleno) y el péptido C (círculos huecos). La línea marcada como "péptido conector recortado" representa la región conectora en la mini-proinsulina, que es un análogo de la proinsulina que contiene un conector dipéptido (Ala-Lys) entre las partes de la cadena A y la cadena B de la insulina.

La Figura 1B proporciona un modelo estructural de proinsulina, que consiste en una fracción similar a la insulina y un péptido conector desordenado (línea discontinua). El asterisco indica al conector AK recortado en la mini-proinsulina.

La Figura 1C proporciona una representación de una vía propuesta de fibrilación de la insulina a través del desdoblamiento parcial del monómero. El estado nativo se protege mediante el clásico auto-ensamblaje (extremo izquierdo). El desensamblaje conduce al equilibrio entre monómeros nativos y parcialmente plegados (triángulo y trapecio hueco, respectivamente). Este plegamiento parcial puede desdoblarse completamente como un evento fuera de la vía (círculo hueco) o agregarse para formar un núcleo de camino a un protofilamento (extremo derecho).

La figura 2 es una representación de la vía de biosíntesis, almacenamiento y secreción de la insulina. A, la proinsulina naciente se pliega como un monómero en el RE, en donde la concentración de iones de zinc es baja; en el aparato de Golgi se ensambla el hexámero de proinsulina estabilizado con zinc, que es procesado por el corte del péptido conector para producir insulina madura. Se observan cristales de zinc-insulina en los gránulos secretores. B, ante el estímulo metabólico, se liberan cristales de zinc-insulina en la circulación portal y se disocian en etapas para liberar el monómero funcional.

La Figura 3 es un cromatograma de HPLC (Fig. 3A) y espectro de masas con analizador de tiempo de vuelo por desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDITOF) (Fig. 3B) de alícuotas de un análogo de insulina de cadena única incubado a 37 °C con agitación suave de 0-109 días. *R y *B representan el pico principal (análogo nativo) y productos de menor degradación.

La figura 4 es un gráfico de los resultados de un ensayo de unión al receptor en el que la unión del análogo de insulina de cadena única 57mer (línea discontinua; triángulos) se evaluó en relación a la insulina humana nativa (línea continua; cuadrados). Este ensayo mide el desplazamiento de la insulina marcada con ¹²⁵I enlazada al receptor mediante un análogo no marcado o insulina fría.

La Figura 5 es una representación con cintas de la estructura de RMN de un análogo de insulina de cadena única 57mer sintético (panel D), en relación a la estructura de RMN de un análogo de insulina de dos cadenas 51mer sintético que contiene las mismas cuatro sustituciones en las cadenas A y B (panel C), un protómero en el estado T cristalográfico extraído del clásico hexámero de insulina T6 (A; código de acceso en la Protein Database 4INS) y estructura de RMN de un monómero de insulina modificado por ingeniería genética (B; "insulina DKP", código de acceso de la Protein Database 2JMN). En cada caso las cadenas(o dominios) A- y B- se muestran en gris oscuro y claro, respectivamente.

Descripción detallada de la invención

La presente invención está dirigida hacia análogos de insulina de cadena única que proporcionan un aumento de la resistencia a la fibrilación y su uso en el tratamiento de la diabetes, en particular su uso en la administración de insulina mediante bombas externas o implantables. Con esa finalidad, la presente invención proporciona análogos

de la insulina que contienen un polipéptido de la cadena A de la insulina y un polipéptido de la cadena B de la insulina conectados mediante un polipéptido conector truncado, tal como se describe anteriormente.

El análogo de la insulina de cadena única de la presente invención puede además contener otras modificaciones. Tal como se utiliza en la presente especificación y en las reivindicaciones, se pueden advertir los análogos de diversas sustituciones mediante la convención que indica el aminoácido que se sustituye, seguido de la posición del aminoácido, opcionalmente en superíndice. La posición del aminoácido en cuestión incluye la cadena A o B de la insulina donde se localiza la sustitución. Por ejemplo, el análogo de insulina de cadena única de la presente invención puede también contener una sustitución de ácido aspártico (Asp o D) o Lisina (Lys o K) por Prolina (Pro o P) en el aminoácido 28 de la cadena B (B28), o una sustitución de Pro por Lys en el aminoácido 29 de la cadena B (B29) o una combinación de las mismas. Estas sustituciones pueden además indicarse como Asp^{B28}, Lys^{B28}, y Pro^{B29}, respectivamente. A menos que se señale de otro modo o siempre que sea obvio por el contexto, debe considerarse que los aminoácidos señalados en la presente patente son L-aminoácidos.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de un conector entre las cadenas A y B modificadas de la insulina, simultáneamente, para permitir (a) la optimización de la resistencia a la fibrilación, (b) la obstaculización del auto-ensamblaje nativo para permitir la formulación de un análogo monomérico en concentraciones milimolares de proteínas, (c) una estabilidad termodinámica mejorada y de ahí estabilidad química, (d) actividad biológica nativa o cercana a la nativa, (d) evitar de forma significativa el aumento de la unión cruzada al receptor de IGF de Tipo I, y (e) evitar el aumento significativo de la mitogenicidad.

La sustitución Asp^{B28} está presente en el análogo de insulina conocido como insulina Aspart y se vende como Novalog®, mientras que las sustituciones Lys^{B28} y Pro^{B29} están presentes en el análogo de insulina conocido como insulina Lispro y que se vende bajo el nombre Humalog®. Estos análogos se describen en las Patentes estadounidenses Nos. 5.149.777 y 5.474.978. Ambos análogos se conocen como insulinas de acción rápida, pero también se conoce que han incrementado su propensión a agregarse y formar fibrillas. Por lo tanto, se prevé que los análogos de insulina de cadena única resistentes a la formación de fibrillas de la presente invención, incrementarán la utilidad de los análogos de insulina que lleven sustituciones, tales como las sustituciones Asp^{B28} o Lys^{B28}, Pro^{B29}, por ejemplo.

También se prevé que la actividad de unión al receptor de un análogo de insulina de cadena única, reducida generalmente por el dominio conector incluso cuando es de una longitud de 5-15 residuos, puede ser en parte o totalmente restaurado mediante sustituciones de aminoácidos adecuadas en el dominio A y/o B. Ejemplos de tales sustituciones son los reemplazos de Thr por His en la posición A8 y el reemplazo de His por Asp en la posición B10.

Se prevé además que los dominios conectores truncados en análogos de insulina de cadena única pueden ser diseñados para reducir la unión cruzada del análogo al receptor de IGF de Tipo I y de ahí la mitogenicidad y la carcinogenicidad potencial del análogo. Un péptido conector recortado apropiado puede por tanto permitir la incorporación de sustituciones de aminoácidos dentro del dominio A o B del análogo de insulina de cadena única que de otro modo (en el contexto de un análogo de dos cadenas), conduciría a un incremento significativo hacia la unión cruzada al receptor de IGF de Tipo I. Un ejemplo de tal sustitución es el reemplazo de His por Asp en la posición B10. Las sustituciones de aminoácidos que mejoran la afinidad de un análogo de insulina de dos cadenas pueden además estar asociadas con un tiempo de permanencia prolongado dentro del complejo hormona-receptor. Un péptido conector recortado diseñado adecuadamente puede ajustar la afinidad de un análogo de este tipo para parecerse más a la de la insulina humana nativa, y por tanto evitar cualquier cambio en la señalización celular asociada con un tiempo de permanencia prolongado cuando el análogo se une al receptor de insulina.

Los análogos de insulina de cadena única de la presente invención pueden además contener sustituciones que han sido consideradas previamente inadecuadas para su uso en sujetos humanos. Por ejemplo, se sabe que la sustitución de Asp por Histidina (His o H) en el aminoácido 10 de la cadena B (Asp^{B10}), mencionada anteriormente, impide la unión del zinc y la formación de hexámero, acelera la absorción después de la inyección subcutánea, estabiliza los monómeros de insulina y aumenta la actividad sobre la de la insulina no análoga. Este análogo de la insulina ha sido descrito como "súper-activo" en las patentes estadounidenses Nos. 4.992.417 y 4.992.418. Tal como se menciona en la misma, se cree que la superactividad del análogo Asp^{B10} se debe a una afinidad mayor del análogo del receptor de la insulina que la de la insulina natural. Sin embargo, el análogo de la insulina no es adecuado para su uso clínico ya que el análogo además presenta un aumento de la afinidad para el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I (IGFR), lo que tiene como resultado la mitogenicidad. Se prevé que el conector truncado en los análogos de insulina de cadena única de la presente invención puede diseñarse para interferir con la unión del análogo de la insulina al IGFR, proporcionando de ese modo un análogo de insulina Asp^{B10} de acción rápida que resiste la fibrilación, pero además no representa ningún riesgo de inducción de cáncer por la activación del IGFR más allá de la insulina natural. Para este propósito, puede resultar ventajoso utilizar un conector que no contenga la secuencia Arg-Arg-Xaa₂₋₈ o Tirosina con Argininas en tándem, como están presentes en el dominio C del Factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IFG-1), ya que estas secuencias han sido identificadas como importantes para la unión del IFG-1 al IGFR.

Aún otras sustituciones son también compatibles con los análogos de insulina de cadena única de la presente invención. Tal como se ha mencionado anteriormente, las sustituciones de His en A4, A8 y B1 se describen en la Solicitud Internacional N° PCT/US07/00320 (WO 2007/081824). Sin desear estar sujetos a la teoría, se cree que cuando la sustitución His^{B1} está presente, la cadena lateral del residuo His B1, en combinación con la cadena lateral de Histidina B5 Histidina, proporciona un sitio de unión a B1-B5 bi-Histidina Zn-, que confiere una protección de la fibrilación dependiente de Zn. De manera similar, aunque sin desear estar sujetos a la teoría, se cree que las sustituciones [His^{A4}, His^{A8}] también proporcionan un potencial sitio de unión a bi-Histidina Zn-, que además confiere protección de la fibrilación. Se prevé además que la estabilización de la insulina con zinc no afectará la actividad in vivo porque se prevé que tales estructuras de zinc-proteína se disocian en concentraciones de proteína y zinc menores de aproximadamente 1 µM. El efecto protector de la unión del zinc puede estar mediado bien mediante la unión a la estructura molecular nativa, o bien a una estructura molecular distorsionada, ya que se cree ocurre como un intermedio en el proceso de fibrilación.

También se prevé que la resistencia intrínseca de estos análogos de insulina de cadena única a la fibrilación hace innecesario formular tales análogos como hexámeros estabilizados con zinc u otros oligómeros de orden superior. Debido a que el desensamblaje del hexámero estabilizado con zinc retrasa generalmente la absorción de la insulina o análogos de la insulina en las actuales formulaciones, se prevé que una formulación resistente a la fibrilación de un análogo de insulina de cadena única, tal como un monómero o dímero de insulina libre de zinc conferiría una adsorción más rápida en el torrente sanguíneo a continuación de la inyección subcutánea, o más rápida absorción en la circulación portal a continuación de una administración por vía intraperitoneal mediante una bomba de insulina implantable.

Se prevé además que los análogos de insulina de cadena única de la presente invención pueden además utilizar cualquier cantidad de cambios presentes en los análogos de insulina existentes, insulinas modificadas, o dentro de diversas formulaciones farmacéuticas, tales como la insulina habitual, insulina NPH, insulina lenta o insulina ultralenta, además de la insulina humana. Los análogos de la insulina de cadena única de la presente invención pueden además contener sustituciones presentes en análogos de la insulina humana que, mientras no se utilicen clínicamente, siguen siendo útiles experimentalmente, tales como la insulina DKP, que contiene las sustituciones Asp^{B10}, Lys^{B28} y Pro^{B29} o la sustitución Asp^{B9}. La presente invención no está, sin embargo, limitada a la insulina humana y a sus análogos. También se contempla que estas sustituciones puedan además ser realizadas en insulinas de origen animal tales como en insulinas porcinas, bovinas, equinas y caninas, a modo de ejemplos no limitativos. Además, en vista de la similitud entre la insulina humana y la animal, y el uso en el pasado de insulinas animales en pacientes diabéticos humanos, se prevé también que puedan introducirse otras modificaciones menores en la secuencia de la insulina, especialmente aquellas sustituciones consideradas sustituciones "conservadoras". Por ejemplo, pueden realizarse sustituciones adicionales de aminoácidos dentro de grupos de aminoácidos con cadenas laterales similares, sin alejarse de la presente invención. Estos incluyen los aminoácidos hidrófobos neutrales: Alanina (Ala o A), Valina (Val o V), Leucina (Leu o L), Isoleucina (Ile o I), Prolina (Pro o P), Triptófano (Trp o W), Fenilalanina (Phe o F) y Metionina (Met o M). De igual manera, los aminoácidos polares neutrales pueden ser sustituidos entre sí dentro de su grupo de Glicina (Gly o G), Serina (Ser o S), Treonina (Thr o T), Tirosina (Tyr o Y), Cisteína (Cys o C), Glutamina (Glu o Q), y Asparragina (Asn o N). Se considera que los aminoácidos básicos incluyen Lisina (Lys o K), Arginina (Arg o R) e Histidina (His o H). Los aminoácidos ácidos son el ácido Aspártico (Asp o D) y el ácido glutámico (Glu o E). En un ejemplo, el análogo de la insulina de la presente invención contiene tres o menos sustituciones conservadoras distintas del conector modificado de la presente invención. En otro ejemplo, el análogo de insulina de la presente invención contiene uno o menos sustituciones conservadoras distintas del conector modificado de la presente invención.

Se proporciona la secuencia de aminoácidos de la proinsulina humana, con propósitos de comparación, como SEQ. ID. NO. 1. Se proporciona la secuencia de aminoácidos de la cadena A de la insulina humana como SEQ. ID. No. 2. Se proporciona la secuencia de aminoácidos de la cadena B de la insulina humana, con propósitos de comparación, como SEQ. ID. NO. 3. Se muestra la secuencia de aminoácidos de una insulina humana de cadena única, según se describe en la presente patente, como SEQ. ID. NO. 4, donde Xaa representa cualquier aminoácido. En diversos ejemplos, el conector representado por Xaa puede ser de 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 aminoácidos de longitud. En un ejemplo, el conector comprende aminoácidos naturales que inmediatamente flanquean las cadenas A y B laterales. Las SEQ. ID. NOS. 5-14 proporcionan secuencias en las que el conector comprende aminoácidos en sus localizaciones naturales en la proinsulina. Expresado de otro modo, el conector natural de la proinsulina está truncado en diversas cantidades, dejando aminoácidos naturales inmediatamente adyacentes a las cadenas A y B de la proinsulina. En la SEQ. ID. NO. 5, están presentes los residuos de Arg que flanquean inmediatamente las cadenas A y B. En la SEQ. ID. NO. 6, están presentes los dos residuos de Arg que se encuentran normalmente adyacentes a la cadena B y los residuos de Arg y Lys que se encuentran normalmente adyacentes a la cadena A. En las SEQ. ID. NOS. 7 y 8, están presentes la secuencia de Arg-Arg-Glu que se encuentra normalmente adyacente a la cadena B, y la secuencia Gln-Lys-Arg que se encuentra normalmente adyacente a la cadena A. En la SEQ. ID. NO. 7 pueden estar presentes de manera opcional 1-4 aminoácidos adicionales. Las SEQ. ID. NOS. 9-14 proporcionan conectores de diversas longitudes, que consisten en varias secuencias que se encuentran de forma natural en la secuencia de la proinsulina.

Los conectores truncados utilizados en los análogos de la invención, con secuencias que no se encuentran de forma natural en la insulina, son tal como sigue a continuación. La SEQ. ID. NO. 19 proporciona un conector con la secuencia Gly-Gly-Gly-Pro-Arg-Arg, la SEQ. ID. NO. 20 proporciona un conector con la secuencia Gly-Gly-Pro-Arg-Arg, la SEQ. ID. NO. 21 proporciona un conector con la secuencia Gly-Ser-Glu-Gln-Arg-Arg, la SEQ. ID. NO. 22 proporciona un conector con la secuencia Arg-Arg-Glu-Gln-Lys-Arg, la SEQ. ID. NO. 23 proporciona un conector con la secuencia Arg-Arg-Glu-Ala-Leu-Gln-Lys-Arg, la SEQ. ID. NO. 24 proporciona un conector con la secuencia Gly-Ala-Gly-Pro-Arg-Arg, la SEQ. ID. NO. 25 proporciona un conector con la secuencia Gly-Pro-Arg-Arg. Se prevé que cualquiera de estos conectores truncados pueden ser utilizados en los análogos de insulina de cadena única de la presente invención, ya sea solos o en combinación con otras sustituciones u otros cambios en la secuencia del polipéptido de insulina, tal como se señala en la presente patente.

Diversas sustituciones, incluyendo sustituciones de análogos de insulina conocidos anteriormente, pueden también estar presentes en el análogo de insulina de cadena única de la presente invención. Por ejemplo, se proporciona una secuencia de aminoácidos de un análogo de insulina de cadena única que también lleve las sustituciones Lys^{B28} Pro^{B29} de la insulina lispro como SEQ. ID. NO. 15. De igual manera, una secuencia de aminoácidos de un análogo de insulina de cadena única con la sustitución Asp^{B28} de la insulina aspart, se proporciona como la SEQ. ID. NO. 16. Adicionalmente, se proporcionan ejemplos de secuencias de aminoácidos de análogos de insulina de cadena única que también tienen la sustitución Asp^{B10} como las SEQ. ID. NOS. 17 y 18.

El aumento de actividad de la sustitución Asp^{B10}, junto con la estructura tridimensional alterada del análogo de cadena única de la presente invención proporciona un análogo de insulina que ha aumentado la actividad en comparación con la insulina natural, pero que no tiene una afinidad por el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina que sea más de dos veces superior que el de la insulina normal. La actividad de la insulina o análogo de insulina puede determinarse mediante ensayos de unión al receptor, según se describe en más detalle más adelante en la presente invención. La actividad relativa puede definirse en términos de valores ED₅₀, la concentración de insulina o análogo de insulina sin marcar que se requiere para desplazar un 50 por ciento de la insulina humana marcada unida de forma específica, tal como insulina humana marcada radiactivamente (tal como insulina marcada con ¹²⁵I) o análogo de insulina con una alta afinidad marcada radiactivamente. De manera alternativa, la actividad puede ser expresada simplemente como un porcentaje de la insulina normal. La afinidad para el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina puede determinarse también de la misma manera con el desplazamiento del IGFR que se está midiendo. En particular, resulta deseable que el análogo de insulina de cadena única tenga una actividad que sea mayor del 100 por cien de insulina, tal como 110, 120, 130, 140, 150, o 200 por cien de insulina normal o más, a la vez que presenta una afinidad para el IGFR que es menor o igual al 100 por cien de la insulina normal, tal como 90, 80, 70, 60 o 50 por cien de la insulina normal o menos. Es deseable determinar la actividad de la insulina *in vitro* según se describe en la presente patente, en lugar de *in vivo*. Se ha apreciado que *in vivo*, el aclaramiento de la insulina del torrente sanguíneo depende de la unión del receptor. De esta manera, los análogos de la insulina pueden mostrar una elevada actividad, incluso alcanzando aproximadamente el 100 por cien de actividad *in vivo*, incluso aunque son menos activos a nivel celular, debido al aclaramiento más lento del torrente sanguíneo. Sin embargo, un análogo de insulina puede aún ser útil en el tratamiento de la diabetes incluso si la actividad de unión al receptor *in vitro* es tan baja como un 20% debido a este aclaramiento más lento. En tales ejemplos, el análogo de insulina de cadena única tiene la secuencia de SEQ. ID. NOS. 4, 15, 16 o 17, donde los primeros aminoácidos de Xaa₄₋₁₀ son aminoácidos distintos a Arg.

Se realizó un análogo de insulina de cadena única con la secuencia polipeptídica SEQ. ID. NO. 26 mediante síntesis química total, utilizando el ligamiento de un fragmento nativo mediado por tiol-éster de tres segmentos de polipéptido. Los segmentos comprendían residuos 1-6 (segmento I), 7-42 (segmento II), y 43-57 (segmento III). Cda segmento se sintetizó mediante el método de fase sólida. Los segmentos I y segmento II se prepararon mediante N- α -terc-butiloxicarbonilo con química-(Boc) en OCH₂-Pam-resina (Applied Biosystems); el segmento III se preparó mediante N- α -(9-fluoronilmetoxicarbonilo con química-(Fmoc) en resina de Polietilenglicol-Poliestireno (PEG-PS) con grupos protectores de cadena única estándar. El segmento I se sintetizó como tioéster (beta-mercaptoleucina, β Mp-Leu). La síntesis se comenzó a partir de Boc-Leu-OCH₂-Pam resina, y la cadena peptídica se extendió por etapas hasta el residuo N-terminal. El segmento II también se sintetizó como tioéster con péptido, Arg-Arg-Gly, unido al extremo C-terminal del residuo β Mp para aumentar la solubilidad del segmento. El aminoácido N-terminal, cisteína, del segmento II se protegió como tiazolidina (Thz) y se convirtió a Cisteína mediante MeONH₂.HCl después del ligamiento. A continuación del ligamiento nativo, se permitió que la cadena polipeptídica en toda su longitud se plegara en una mezcla de 100 mM de glutatión (GSH) reducido, y 10 mM de glutatión oxidado (GSSG) a un pH 8,6 y sometido a purificación mediante HPLC utilizando una columna C4 (1,0 x 25 cm) en un gradiente de elución de 15 % a 35 % (A/B) durante 40 min a una tasa de flujo de 4 ml/min. Las fracciones puras correspondientes a SCI (1) se agruparon y se liofilizaron. La masa molecular prevista fue verificada mediante espectrometría de masas.

Con propósitos de comparación, se sintetizó un análogo de insulina de dos cadenas que contenía las mismas cuatro sustituciones que en los dominios A y B del análogo de cadena única anterior (His^{A8}, Asp^{B10}, Asp^{B28}, y Pro^{B29}). Este análogo de dos cadenas contiene por tanto una cadena A modificada de 21 residuos (SEQ. ID. NO. 29) y una cadena B modificada de 30 residuos (SEQ. ID. NO. 28), las mismas longitudes que están presentes en la insulina humana de tipo silvestre. La comparación de las propiedades del análogo de dos cadenas con la insulina humana

indica los efectos intrínsecos de las cuatro sustituciones. La comparación de las propiedades del análogo de cadena única y del análogo de dos cadenas indica cómo estas propiedades alteradas se modulan por la interposición de un péptido conector entre las cadenas. Juntas, las sustituciones de aminoácidos en las cadenas A y B y la secuencia de aminoácidos del conector confieren un equilibrio electrostático, lo que permite al análogo de cadena única mantener un punto isoeléctrico similar al de la insulina humana de tipo silvestre. De este modo, las dos cargas positivas adicionales introducidas por los dos residuos de Arg en el conector y la carga positiva parcial introducida por la sustitución de Thr^{A8} por His están desplazadas por la introducción de cargas negativas por Asp^{B10} y Asp^{B28} y por la eliminación de la carga positiva de Lys^{B29} y la carga parcial positiva de His^{B10}. Se prevé que de ese modo el punto isoeléctrico sea ligeramente inferior (es decir, más ácido) que el de la insulina humana de tipo silvestre, que sería de esperar que aumentara la solubilidad a un pH neutro. La secuencia de aminoácidos del análogo de cadena única también carece de cargas positivas en el segmento B28-B32, lo que por otro lado favorece la unión del receptor IGF de tipo I. El diseño de las sustituciones de compensación para lograr un equilibrio electrostático, y el hecho de evitar las cargas positivas favorables para la unión cruzada al receptor de IGF de tipo I representan dos principios independientes e importantes de diseño.

El análogo de cadena única 57-mer con la secuencia polipeptídica de SEQ. ID. NO. 26, se sintetizó y se sometió a ensayo para determinar su actividad y resistencia a la fibrilación según se proporciona en la presente patente en comparación con la insulina humana, insulina Asp^{B10}, insulina humana His^{A8}, y el análogo de acción rápida en Humalog (es decir, en el que Pro en la posición B28 se reemplaza por Lys, y Lys en la posición B29 es reemplazado por Pro). Se realizó un ensayo de fibrilación bajo condiciones libres de zinc para destacar la nueva viabilidad de formular el presente análogo de cadena única 57mer como un monómero resistente a la fibrilación; es decir, la protección mediante el ensamblaje en un hexámero estabilizado con zinc no es necesaria para lograr estabilidad a largo plazo a una temperatura elevada. Además, debido a que incluso en soluciones hexaméricas el monómero es la especie susceptible en el mecanismo de fibrilación, la protección específica del conector contra la fibrilación en un análogo monomérico predice una protección comparable o mayor en una formulación hexamérica. Como control se preparó un análogo de insulina de dos cadenas.

Se evaluó la estabilidad física y química del análogo de cadena única por triplicado durante la incubación en 60 µM de solución tampón de fosfatos a un pH 7,4 a 37 °C bajo agitación suave. Se observaron las muestras durante 109 días. Las tres muestras mostraron estabilidad física, permaneciendo transparentes sin señal de precipitación o escarchado del vial de cristal. La inspección de alícuotas en puntos sucesivos no reveló fibrillas o precipitados amorfos en micrografías electrónicas. La estabilidad química de las muestras se investigó mediante HPLC en fase reversa y espectrometría de masas con MALDI-TOF de sucesivos alícuotas. Estos exámenes revelaron la lenta formación de derivados de insulina de cadena única desamidados (< diez por ciento del material de partida), un proceso bien conocido en el que las asparaginas se convierten a ácido aspártico. Se cree que este es un cambio químico bien conocido no altera la conformación o actividad de la insulina. La actividad de unión al receptor en los días 0 y 90 fue equivalente, consistente con la actividad completa previamente establecida para los derivados de insulina desamidados. Estos resultados se muestran en las Figuras 3A y 3B, lo que proporciona la evolución en el tiempo de un cromatograma de HPLC (Fig. 3A) y el espectro de masas con MALDI-TOF (Fig. 3B) de 0-109 días. En los intervalos de tiempo indicados (0 a 109 días de incubación), se retiraron alícuotas con jeringuillas estériles y se aplicaron en una columna C8 HPLC de fase reversa; la proteína y sus derivados se eluyeron con un gradiente de metanol. La masa de los picos de la HPLC se determinó con MALDI-TOF MS (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). La diferencia de 1-2 unidades de masa entre el análogo nativo y los productos de degradación representa desamidación. *R y *B representan el producto de degradación de pico mayor (análogo nativo) y menor. No hubo evidencia de separación de la cadena, formación de dímeros covalentes, isómeros de disulfuro, u otras formas de reordenamiento.

Se sintetizó un gen para dirigir la expresión del mismo polipéptido en levadura *Piscia pastoris* y otros microorganismos. La secuencia del ADN es:
 TTC/GTC/AAC/CAG/CAC/CTC/TGC/GGC/AGC/GAC/CTC/GTC/GAA/GCA/CTC/T
 AC/CTC/GTC/TGC/GGA/GAA/CGA/GGA/TTC/TTC/TAC/ACA/GAC/CCA/ACA/GG
 A/GGA/GGA/CCA/CGA/CGA/GGA/ATA/GTA/GAA/CAA/TGC/TGC/CAC/AGC/AT
 A/TGT/AGC/CTC/TAC/CAA/CTA/GAA/AAC/TAC/TGC/AAC. (SEQ. ID. NO. 27) Se prepararon genes sintéticos adicionales para dirigir la síntesis de análogos de este polipéptido que contiene sustituciones de aminoácidos variantes en las posiciones A4, A8, B28 y B29; además, se codificaron sucesivos cambios en la longitud del péptido conector dentro de la secuencia de ADN variante.

Ensayos de unión al receptor. La actividad relativa se define como la relación del análogo con respecto a insulina humana de tipo silvestre 125 requerida para desplazar el 50 por ciento de 1 insulina humana unida de forma específica. Se empleó una preparación de una membrana placentaria humana que contenía el receptor de insulina (RI), según se conoce en el estado del arte. Los fragmentos de membrana (0,025 mg proteína/tubo) fueron incubados con insulina marcada con ¹²⁵I (ca. 30.000 cpm) en presencia de concentraciones seleccionadas de un análogo no marcado durante 18 horas a 4 °C en un volumen final de 0,25 ml de 0,05 M Tris-HCl y 0,25 por ciento (p/v) de albúmina de suero bovino a un pH 8. Posteriormente a la incubación, se diluyeron mezclas con 1 ml de tampón helado y se centrifugaron (10.000g) durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se eliminó después mediante

aspiración, y se realizó recuento del granulado de la membrana para determinar la radiactividad. Los datos se corrigen para la unión no específica (cantidad de radiactividad restante asociada a la membrana en presencia de 1 μM de insulina humana. En todos los ensayos el porcentaje de trazador unido en ausencia de ligando competidos fue de menos del 15% para evitar la depleción de artefactos del ligando. Se realizó un ensayo adicional para monitorizar los cambios en la actividad durante el transcurso de la incubación del análogo de cadena única a 37 °C utilizando captura de anticuerpos en placa de microtitulación, según se conoce en el arte. Se incubaron placas de tiras de microtitulación (Nunc Maxisorb) durante la noche a 4 °C con AU5 IgG (100 μl /pocillo de 40 mg/ml en solución tampón de fosfatos). Los datos de unión se analizaron mediante un modelo secuencial de dos sitios. Se empleó un ensayo de anticuerpos en placa de microtitulación correspondiente utilizando el receptor de IGF de Tipo I para evaluar la unión cruzada a este receptor homólogo.

La actividad de unión al receptor del análogo de insulina de cadena única 57mer en relación a la insulina humana es 129% +/- 8%, tal como se muestra en la Tabla I. La afinidad de la insulina humana, cuya afinidad es 0,05 nM bajo condiciones de ensayo, y la de la insulina DKP, se proporciona en la Tabla I con propósitos de comparación. Adicionalmente, la figura 4 ilustra un ensayo de unión al receptor en el que se evaluó la unión del análogo de insulina de cadena única 57mer (línea discontinua; triángulos) en relación a la insulina humana nativa (línea continua; cuadrados). Este ensayo mide el desplazamiento de la insulina marcada con ^{125}I unida al receptor mediante bien un análogo o bien insulina (B/Bo) a través de un rango de concentraciones de análogo/insulina no marcados. Mientras que se ha mostrado previamente que la actividad de la mini-proinsulina se reduce en 10.000 veces, la actividad del análogo 57mer es esencialmente equivalente a la de la insulina humana de tipo silvestre. De hecho, el ligero cambio a la izquierda de la curva de desplazamiento del análogo 57mer indica un ligero aumento en la actividad biológica (129 \pm 8 por ciento en cuatro réplicas).

Tabla I

Afinidad de la insulina y análogos de insulina con el receptor de la Insulina	
Muestra	Afinidad (en relación a la insulina humana)
Insulina	100 %
Insulina DKP	161 \pm 19 %
Análogo 57mer de cadena única	129 \pm 8 %
Análogo correspondiente de dos cadenas	700 %

Estos datos indican que la afinidad de los análogos al receptor de insulina humana es tan grande o mayor que la de la insulina de tipo silvestre. Además, resulta evidente que el conector ha reducido la afinidad de un rango de superactividad (700%) a uno cercano nuevamente a la insulina humana de tipo silvestre (129 \pm 8 %).

La potencia in vivo del análogo de insulina de cadena única 57mer se sometió a ensayo en ratas diabéticas que se observaron eran equivalentes a la insulina humana de tipo silvestre. Para este propósito, se volvieron diabéticas ratas Lewis macho (~250 g de peso corporal) con estreptozotocina. La insulina humana y los análogos de insulina se purificaron mediante HPLC, se secaron hasta convertirlos en polvo, y se disolvieron en un diluyente de insulina (Eli Lilly Corp). Se inyectó a las ratas por vía subcutánea en la hora = 0 con 1,5 U/kg de peso corporal en 100 μl de diluyente. Se obtuvo sangre de la cola sujeta con pinzas en la hora 0 y cada 10 minutos hasta 90 minutos. La glucosa en sangre se midió utilizando un medidor Hypoguard Advance Micro-Draw. Se observó que las concentraciones de glucosa en sangre disminuyeron en tasas de 64,2 \pm 16,9 y 62,0 \pm 16,3 mg/dL por hora para la insulina humana y el análogo de insulina de cadena única 57mer, respectivamente. Estos valores son indistinguibles dentro de la variación.

La afinidad del análogo de insulina de cadena única 57mer para el receptor de IGF de tipo I es similar a la de la insulina humana; el grado de aumento de afinidad, si se encuentra presente, es menor que dos veces el de la insulina humana. Este valor es menor que el de la insulina lispro, que presenta una afinidad para el IGFR dos veces mayor que la de la insulina.

Se sometió a ensayo la mitogenicidad del análogo de insulina de cadena única 57mer en cultivo celular y se observó que era igualmente indistinguible de la insulina humana, en cada caso menos mitogénica que el IGF-I. Con esta finalidad, se cultivó la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 en una atmósfera húmeda de 5% CO_2 -95% aire a 37°C en un medio mínimo esencial de Eagle (MEM, Nacalai Tesque) complementado con aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio al 1%, y 2 mM de l-glutamina. Los medios de cultivo se complementaron con suero fetal bovino (FBS) al 10% (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, AA), penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100ug/mL). Aproximadamente 1,0 \times 10⁵ células se sembraron en platos de 35-mm y se cultivaron hasta estar subconfluentes. Se emplearon dos ensayos: (i) Las curvas de cultivo celular se determinaron mediante

hemocitometría. Se sembraron aproximadamente 5×10^4 en una placa de 24 pocillos y se cultivaron durante 24 horas. Después de 24 horas, el medio se retiró y se reemplazó con medio fresco que contenía BSA al 0,1%. Veinticuatro horas después, varias concentraciones de insulina, el análogo de insulina de cadena única 57mer, el correspondiente análogo de insulina de dos cadenas sin conector (SEQ. ID. NOS. 28 y 29), o el IGF-I se añadieron en el medio de cultivo fresco; los medios se cambiaron cada día. El número de células se determinó después de 3 días de exposición a las hormonas, (ii) el contenido de ADN celular se determinó utilizando un kit de medición de ADN (Invitrogen) después de 3 días de exposición a las hormonas en cultivo celular según se menciona anteriormente. Tal como se esperaba, la mitogenicidad del análogo de dos cadenas de SCI (es decir, un análogo de insulina que contiene las sustituciones His^{A8}, Asp^{B10}, Asp^{B28}, y Pro^{B29}) fue intermedia entre el análogo de insulina de cadena única (o insulina de tipo silvestre) y el IGF1, presumiblemente debido a la sustitución Asp^{B10}. De ese modo, el conector permite el uso de la sustitución Asp^{B10} de otro modo favorable, sin incurrir en el aumento de la mitogenicidad.

Las estabilidades termodinámicas de los análogos de insulina se evaluaron mediante desnaturalización de la guanidina (Tabla II). Los datos se obtuvieron a 37 °C y a un pH neutro para corresponder con las condiciones de una bomba de insulina implantable, o al uso de una formulación a una temperatura elevada. En concordancia cualitativa con estudios pasados a temperaturas inferiores, la introducción de His^{A8} o Asp^{B10} en un análogo de insulina de dos cadenas aumentó la estabilidad termodinámica de 2,4 kcal/mol (insulina humana de tipo silvestre) a 3,4 kcal/mol (insulina His^{A8}) o 3,6 kcal/mol (insulina Asp^{B10}). No se observó ningún cambio con la introducción de Asp^{B28} (2,4 kcal/mol). La introducción simultánea de cuatro sustituciones (His^{A8}, Asp^{B10}, Asp^{B28}, y Pro^{B29}) produjo una estabilidad marcada (4,3 kcal/mol). No se observó ningún cambio adicional en la estabilidad con la interposición de un conector de 6 residuos entre B30 y A1 (4,3 kcal/mol). De este modo, la interposición del conector permite que los efectos favorables de las sustituciones sobre la estabilidad termodinámica (y de ahí la resistencia a la degradación química) se mantengan, mientras que al mismo tiempo “ajusta” la mitogenicidad y afinidades del receptor de IGF de tipo I (demasiado elevada en el análogo de cadena única) para asegurar su similitud con la insulina humana de tipo silvestre.

Tabla II

Estabilidades termodinámicas de análogos de insulina (37 °C y pH 7,4)	
Muestra	ΔG_u
Insulina	2,4 Kcal/mol
Insulina His ^{A8}	3,4
Insulina Asp ^{B10}	3,6
Insulina Asp ^{B28}	2,4
Análogo de cadena única 57mer	4,3
Análogo correspondiente de dos cadenas	4,3

El espectro de RMN del análogo de insulina de cadena única muestra desplazamientos químicos y anchos de línea característicos de una solución monomérica monodispersa. La estructura de la solución del análogo es esencialmente idéntica a la estructura cristalina de una mini-proinsulina 50-mer, con excepción del conector de seis residuos, que en parte empaqueta contra una cara del núcleo hidrófobo. Se proporciona una estructura de RMN del 57mer en la Fig. 5D, que proporciona la estructura de RMN de un análogo de insulina de cadena única 57mer sintético (ensamblaje de las estructuras DG/RMD) en relación a un modelo con cintas de la estructura cristalina de la mini-proinsulina (un análogo de cadena única 50mer). La cadena A se muestra en color gris claro y la cadena B en color gris oscuro; el principio y el final del dominio conector (seis residuos; GGGPRR) se indican mediante puntas de flechas. Se emplearon 847 restricciones en el cálculo de DG/RMD. Se realizaron estudios de RMN de control del correspondiente análogo de insulina de dos cadenas que contiene las mismas cuatro sustituciones (His^{A8}, Asp^{B10}, Asp^{B28}, y Pro^{B29}). La insulina de dos cadenas es asimismo monomérica en solución neutra en una concentración de proteínas cercana a 1 mM. El patrón de desplazamientos químicos es similar al del análogo de cadena única, lo que indica una correspondencia de las estructuras. En base a los cálculos de DG/RMD, este análogo (Figura 5C) se parece mucho a un protómero en el estado T cristalográfico (Figura 5A) y a una estructura derivada de RMN previa de un monómero de insulina modificado por ingeniería genética (insulina DKP; Figura 5B).

Dicroísmo circular – Se disolvieron muestras bien en 10 mM de fosfato y 100 mM de KCl (pH 7,4), o bien en HCl 0,01 N (pH 2,0) en una concentración de proteína de 25 μ M. para eliminar la materia en partículas y los agregados, se filtraron las muestras (0,22 μ M; Satorius, Goettingen, Alemania). Los espectros, adquiridos con un espectropolarímetro Aviv (de Aviv Biomedical, Inc., Lakewood, NJ), fueron normalizados. Los datos se obtuvieron a

4 °C y se ajustaron mediante mínimos cuadrados no lineales a un modelo de dos estados. Los espectros DC para los análogos fueron similares a las insulinas nativas y DKP (no se muestran los datos).

5 Ensayo de Fibrilación – Insulina humana y análogos se prepararon en una cantidad de 60 µM en un tampón desoxigenado que consiste en 10 mM de fosfato de sodio (pH 7,4), y 140 mM de NaCl. Las muestras (por triplicado) se colocaron en viales de cristal sellados y se colocaron en una mesa basculante automática a 37 °C. En tiempos sucesivos las alícuotas se retiraron y se analizaron mediante ensayo de espectroscopia de fluorescencia con tioflavina T (ThT) para determinar la aparición de la fibrilación como sigue a continuación.

10 Se preparó Tioflavina T (ThT) en una cantidad de 1 mM en agua bidestilada y se almacenó a 4 °C en la oscuridad. Para monitorizar la fibrilación, se obtuvieron 10-µl de alícuotas de las muestras en puntos de tiempo indicados y se mezclaron con 3 ml de tampón de ensayo con ThT (5 µM de ThT en 50 mM de Tris-HCl (pH 7,5) y 100 mM de NaCl). Se realizaron mediciones de la fluorescencia utilizando un espectrofluorómetro Aviv en cubetas de cuarzo de 1 cm. Se recogieron espectros de emisión de 470 a 500 nm a continuación de la excitación a 450 nm; el tiempo de integración fue de 1 segundo. Se utilizó ThT en tampón sin proteína como línea de referencia. El tiempo de retardo de la fibrilación se define como el tiempo requerido para observar un aumento del doble en la emisión de ThT. Al
15 umbral de fluorescencia de la ThT con el doble de aumento, le sigue un rápido incremento de la turbidez asociada con un alargamiento de las fibrillas maduras y un incremento adicional de la fluorescencia de ThT. Bajo estas condiciones, la insulina humana sufre fibrilación en 3-4 días en ausencia de zinc. Los tiempos de retardo previos a la fibrilación de los análogos en una concentración de proteínas de 60 µM se proporcionan en la Tabla III. Se ha observado menos de un 1 % de fibrilación para el análogo de insulina de cadena única 57mer después de 4 meses de incubación a 37 °C.

20 También se ha examinado la resistencia a la fibrilación de un análogo de insulina de cadena única en una concentración más elevada. El análogo de insulina de cadena única 57mer (SEQ. ID NO. 26) se incubó a 37 °C en una concentración de proteína de 3 mM, según se describe de otro modo anteriormente. Una concentración de 3 mM es similar a la concentración que se observa en una formulación de insulina U-400 (400 U.I./ml) adecuada para su uso en una bomba de insulina implantable. Una formulación de este tipo es óptima para una bomba de insulina implantable para maximizar el tiempo entre el momento de rellenar el depósito de insulina. Sin embargo, la tasa de fibrilación de la insulina generalmente aumenta con la concentración de insulina. El 57mer resiste la fibrilación bajo estas condiciones durante más de 60 días. En comparación, bajo estas condiciones y en esta concentración, la insulina lispro(KP) forma fibrillas en aproximadamente un día.

30 Tabla III

Tiempos de retardo de la Fibrilación de la insulina libre de zinc y sus análogos en 60 µM	
Muestra	Tiempo de retardo (días ± 10%)
Insulina	3,5
Insulina KP	2,0
Insulina DKP	11,5
Insulina His ^{A8}	13
Insulina Asp ^{B10}	18
Insulina Asp ^{B12} -DKP	40
Insulina Trp ^{A8} -KP	3
Análogo de cadena única 57mer	> 120
Análogo correspondiente de dos cadenas	70 ± 5 días

35 *Microscopía electrónica por transmisión* – La presencia o ausencia de fibrillas (como un evento distinto de la precipitación o cristales amorfos) se verificó mediante MET. Se depositaron alícuotas (10 µl) en rejillas de cobre con malla de 400 recubierta con Formvar (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) durante 5 minutos. El exceso de solución fue adsorbido en papel de filtrado. Las rejillas se lavaron tres veces con agua bidestilada y tres veces con acetato de uranilo al 1% filtrado para una tinción negativa. Las rejillas coloreadas se dejaron secar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se observaron con un microscopio electrónico de transmisión Jeol 1200EX que opera con un voltaje de aceleración de 80 kV.

40 Se realizó una comparación adicional de un análogo de insulina de cadena única anterior con el actual análogo. Un análogo de insulina de cadena única que contiene una cadena A de insulina de tipo silvestre (SEQ. ID. NO. 2) y una

cadena B de insulina de tipo silvestre (SEQ. ID. NO. 3) unida por un polipéptido de siete aminoácidos con la secuencia SEQ. ID. NO. 30 se sintetizó tal como se describe anteriormente. El análogo resultante se analizó utilizando un ensayo de unión al receptor de insulina específico a la isoforma, tal como sigue a continuación.

- 5 Se preparó ADN para su transfección según el método de Mynarcik et al. (J. Biol. Chem., 1997, 272, págs. 18650-18655). Los ADNc receptores fueron expresados de forma transitoria en células pEAK Rapid utilizando polietilenimina. Las células se cosecharon mediante lisis en 0,15M de NaCl y 0,1M de Tris (pH 8) que contiene un 1% (v/v) de Triton X-100 y un cóctel inhibidor de la proteasa tres días después de la transfección. Los lisados se almacenaron a -80 °C hasta el ensayo. Los ensayos de unión al receptor se realizaron tal como se describe por Mynarcik. Se incubaron placas de tiras de microtitulación (Nunc Maxisorb) durante la noche a 4 °C con IgG anti-FLAG (100ml/pocillo de una solución de 40mg/ml en PBS). Se realizaron ensayos de lavado, bloqueo, unión al receptor y unión competitiva con péptidos marcados y no marcados, tal como se describe. Se analizaros los datos de la unión mediante un modelo secuencial de dos sitios con ligandos homólogos o heterólogos marcados y no marcados para obtener constantes de disociación, según se describe por Whittaker et al. (J. Biol. Chem., 2001, 276, págs.43980-43986).
- 10
- 15 La actividad de unión al receptor del análogo que contiene el conector de SEQ. ID. NO. 30 tenía 0,2 – 1,0% de la actividad de la insulina humana, A modo de contraste, el análogo con la secuencia SEQ. ID. NO. 26 tenía una actividad de unión de un 47% de la insulina humana para la isoforma B y 440% de la insulina humana para la isoforma A.
- Aunque sin desear estar sujetos por la teoría, los solicitantes creen que la actividad reducida del análogo anterior que contiene el conector de SEQ. ID. NO. 30, se debe a un punto isoelectrico alterado causado por la presencia de lisina y arginina en el conector sin una sustitución de compensación en la cadena A o B que mantener. El análogo de insulina de cadena única de SEQ. ID. NO. 26, sin embargo, tiene un punto isoelectrico similar al de la insulina humana, ya que las cargas positivas proporcionadas por los residuos introducidos en el conector compensan al menos algo de las cargas alteradas introducidas por las sustituciones Asp^{B10}, Asp^{B28} y Pro^{B29}. Pueden utilizarse sustituciones adicionales o alternas en las cadenas A o B para influir en el punto isoelectrico de un análogo de insulina resultante. Por ejemplo, se prevé que la histidina puede mantenerse en B10 para mantener la unión del zinc y la formación del hexámero de insulina. En un ejemplo de este tipo, el punto isoelectrico podría mantenerse utilizando un aminoácido neutro en otra posición tal como la A8 o eliminado una arginina en el conector de la SEQ. ID. NO. 26.
- 20
- 25
- 30 En base a la anterior revelación, debería resultar claro ahora que los análogos de insulina de cadena única proporcionados en la presente patente proporcionarán un incremento de la resistencia a la fibrilación sobre la insulina natural, a la vez que mantienen al menos la mayor parte de la actividad de la insulina.

Listado de secuencias

- <110> Weiss, Michael
- 35 <120> INSULINA RESISTENTE A LA FIBRILACIÓN
- <130> 200512.00055
- <140> PCTUS0780467
- <141> 2007-10-04
- <150> US 60/828,153
- 40 <151> 2006-10-04
- <160> 30
- <170> PatentIn versión 3.4
- <210> 1
- <211> 86
- 45 <212> PRT

ES 2 554 773 T3

<213> Homo sapiens

<400> 1

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg
20 25 30
Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
35 40 45
Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
50 55 60
Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
65 70 75 80
Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
85

<210> 2

5 <211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Asn
20

10 <210> 3

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
20 25 30

15

<210> 4

<211> 52

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> Insulina de cadena única artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (31)..(31)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

10 <400> 4

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

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

Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu
 35 40 45

Asn Tyr Cys Asn
 50

<210> 5

<211> 54

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Insulina de cadena única artificial

<220>

<221> misc_feature

20 <222> (32)..(32)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 5

ES 2 554 773 T3

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

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

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

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
50

<210> 6

<211> 56

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Insulina de cadena única artificial

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (33)..(33)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 6

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

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

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

Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
50 55

<210> 7

15 <211> 58

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Insulina de cadena única artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 7

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

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

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

Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
50 55

<210> 8

<211> 57

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Insulina de cadena única artificial

<400> 8

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

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

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

Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
50 55

15

<210> 9

<211> 58

<212> PRT

ES 2 554 773 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Insulina de cadena única artificial

<400> 9

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

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

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

Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
50 55

<210> 10

<211> 58

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Insulina de cadena única artificial

<400> 10

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

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

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

Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
50 55

15 <210> 11

<211> 59

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 554 773 T3

<220>

<223> Insulina de cadena única artificial

<400> 11

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg
20 25 30
Glu Ala Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile
35 40 45
Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
50 55

5 <210> 12

<211> 60

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Insulina de cadena única artificial

<400> 12

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg
20 25 30
Glu Ala Glu Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser
35 40 45
Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
50 55 60

<210> 13

<211> 60

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Insulina de cadena única artificial

<400> 13

ES 2 554 773 T3

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

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

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

Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
50 55 60

<210> 14

<211> 61

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Insulina de cadena única artificial

<400> 14

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

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

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

Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
50 55 60

10

<210> 15

<211> 52

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Insulina de cadena única artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (31)..(31)

20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

ES 2 554 773 T3

<400> 15

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

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

Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu
35 40 45

Asn Tyr Cys Asn
50

<210> 16

<211> 52

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Insulina de cadena única artificial

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (31)..(31)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 16

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

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

Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu
35 40 45

Asn Tyr Cys Asn
50

15

<210> 17

<211> 52

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Insulina de cadena única artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (31)..(31)

5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 17

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

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

Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu
 35 40 45

Asn Tyr Cys Asn
 50

<210> 18

<211> 58

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Insulina de cadena única artificial

<220>

15 <221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 18

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

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

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

Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 50 55

20

ES 2 554 773 T3

<210> 19

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Artificial

<400> 19

Gly Gly Gly Pro Arg Arg
1 5

<210> 20

10 <211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial

15 <400> 20

Gly Gly Pro Arg Arg
1 5

<210> 21

<211> 6

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> Artificial

<400> 21

Gly Ser Glu Gln Arg Arg
1 5

25 <210> 22

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

ES 2 554 773 T3

<223> Artificial

<400> 22

Arg Arg Glu Gln Lys Arg
1 5

<210> 23

5 <211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial

10 <400> 23

Arg Arg Glu Ala Leu Gln Lys Arg
1 5

<210> 24

<211> 6

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Artificial

<400> 24

Gly Ala Gly Pro Arg Arg
1 5

20 <210> 25

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Artificial

<400> 25

Gly Pro Arg Arg
1

<210> 26

ES 2 554 773 T3

<211> 57

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> Insulina de cadena única artificial

<400> 26

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

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

Gly Pro Arg Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys His Ser Ile Cys Ser
35 40 45

Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
50 55

<210> 27

10 <211> 171

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial

15 <400> 27

ttcgtcaacc agcacctctg cggcagcgac ctcgtcgaag cactctacct cgtctgcgga 60
gaacgaggat tcttctacac agaccaaca ggaggaggac cacgacgagg aatagtagaa 120
caatgctgcc acagcatatg tagcctctac caactagaaa actactgcaa c 171

<210> 28

<211> 30

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> Artificial

<400> 28

ES 2 554 773 T3

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

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

<210> 29

<211> 21

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Artificial

<400> 29

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

Glu Asn Tyr Cys Asn
20

10 <210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Artificial

<400> 30

Gly Gly Gly Pro Gly Lys Arg
1 5

REIVINDICACIONES

1. Análogo de insulina que comprende un polipéptido de cadena única que contiene un polipéptido de la cadena A de la insulina y un polipéptido de la cadena B de la insulina conectado mediante un conector truncado, en donde el conector truncado es un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:

5 un polipéptido con la secuencia GGGPRR (SEQ ID NO. 19),

un polipéptido con la secuencia GGPRR (SEQ ID NO. 20),

un polipéptido con la secuencia GSEQRR (SEQ ID NO. 21),

un polipéptido con la secuencia RREQR (SEQ ID NO. 22),

un polipéptido con la secuencia RREALQKR (SEQ ID NO. 23),

10 un polipéptido con la secuencia GAGPRR (SEQ ID NO. 24),

un polipéptido con la secuencia GPRR (SEQ ID NO. 25),

en donde el polipéptido de la cadena B de la insulina contiene opcionalmente uno o más de:

una sustitución de aspartato en la posición correspondiente a la posición B10 de la insulina,

una sustitución de lisina o aspartato en la posición correspondiente a la posición B28 de la insulina, y

15 una sustitución de prolina en la posición correspondiente a la posición B29 de la insulina,

y en donde el polipéptido de la cadena A de la insulina contiene una sustitución de histidina en la posición correspondiente a la posición position A8 de la insulina.

2. Análogo de insulina según la reivindicación 1, en donde el análogo de la insulina muestra menos de 1 por ciento de fibrilación con incubación a 37 °C durante 90 días.

20 3. Análogo de insulina según la reivindicación 1 o 2, en donde el polipéptido de la cadena A de la insulina comprende un polipéptido con la secuencia GIVEQCCHSICSLSLYQLENYCN (SEQ. ID. NO. 29).

4. Análogo de insulina según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el conector truncado tiene seis aminoácidos de longitud y al menos el primer y segundo aminoácido del conector truncado no son arginina.

25 5. Análogo de insulina según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el conector truncado tiene la secuencia GGGPRR (SEQ. ID. NO. 19).

6. Análogo de insulina según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende un polipéptido con la secuencia de FVNQHLCGSDLVEALYLVCGERGFFYTDPTGGGPRRGIVEQCCHSICSLSLYQLE NYCN (SEQ. ID. NO. 26).

7. Ácido nucleico que codifica un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

8. Ácido nucleico según la reivindicación 7, en donde el ácido nucleico comprende la secuencia:

TTCGTCAACCAGCACCTCTGCGGCAGCGACCTCGTCGAAGCACTCTACCTCGT

CTGCGGAGAACGAGGATTCTTCTACACAGACCCAACAGGAGGAGGACCACG

ACGAGGAATAGTAGAACAATGCTGCCACAGCATATGTAGCCTCTACCAACTA

30 GAAACTACTGCAAC (SEQ. ID. NO. 27).

9. Vector de expresión que comprende un ácido nucleico según las reivindicaciones 7 u 8.

10. Célula hospedadora transformada con el vector de expresión según la reivindicación 9.
11. Análogo de la insulina según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso como medicamento.
12. Análogo de la insulina según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso en la terapia de reemplazo de insulina o en el tratamiento de la diabetes mellitus.
- 5 13. Análogo de la insulina según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso según la reivindicación 11 o 12, en donde el polipéptido de la cadena B de la insulina contiene una sustitución Asp en la posición correspondiente a la posición B10 de la insulina y en donde la afinidad de unión del análogo de la insulina para el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina es esencialmente igual o menor que la afinidad de unión de la insulina humana para el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina.
- 10 14. Análogo de la insulina para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en donde un polipéptido de la cadena A de la insulina comprende una sustitución de histidina en la posición correspondiente a la posición A10 de la insulina.
- 15 15. Análogo de la insulina para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 11-14, en donde el análogo de la insulina de cadena única es un polipéptido con la secuencia FVNQHLCGSDLVEALYLVCGERGFFYTDPTG
GGPRRGIVEQCCHSICSLYQLENYCN (SEQ. ID. NO. 26).

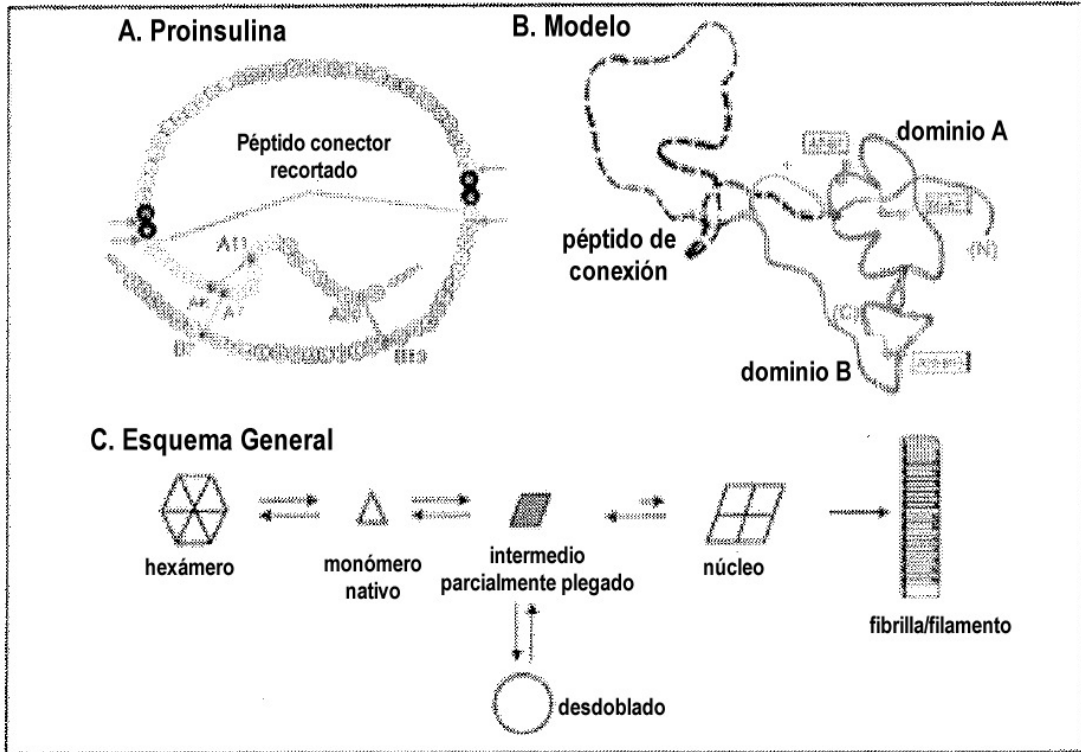


Fig. 1
(Arte Previo)

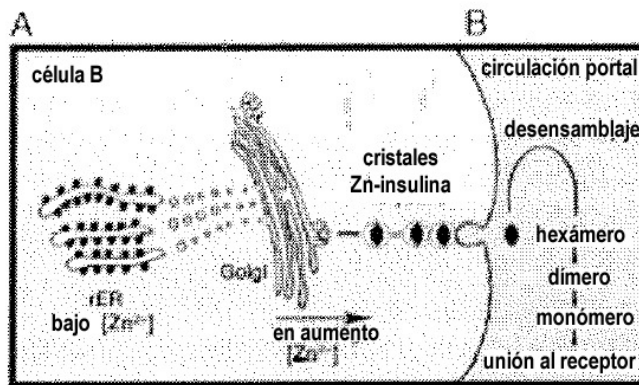


Fig. 2
(Arte Previo)

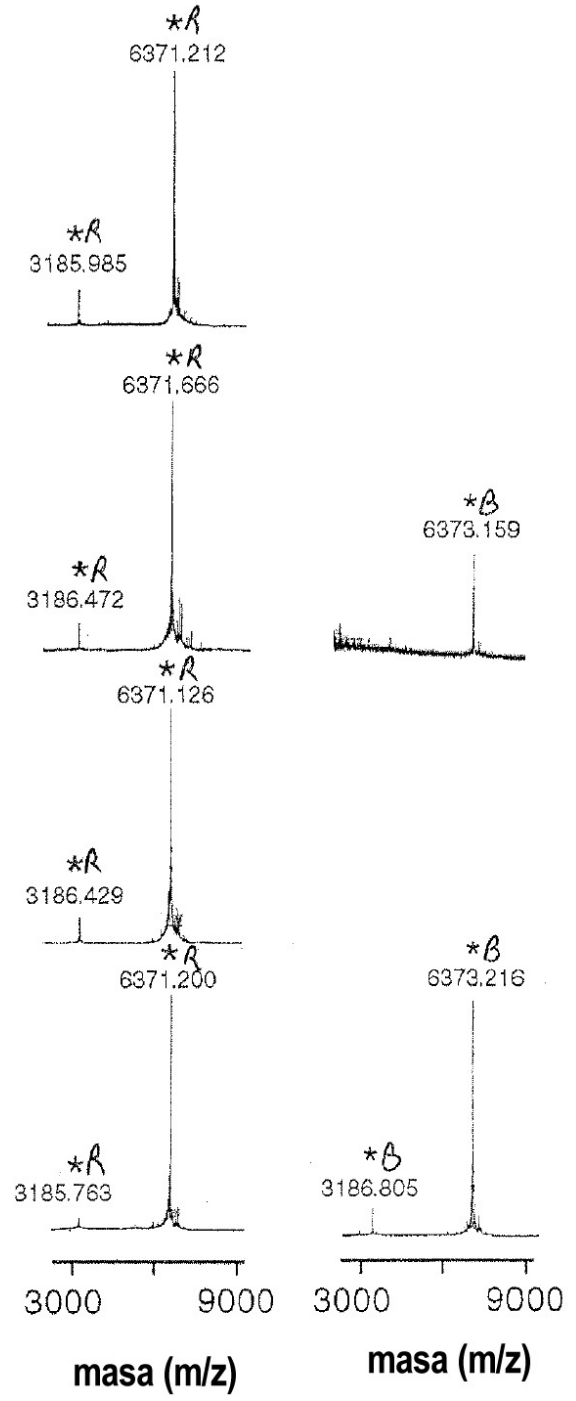
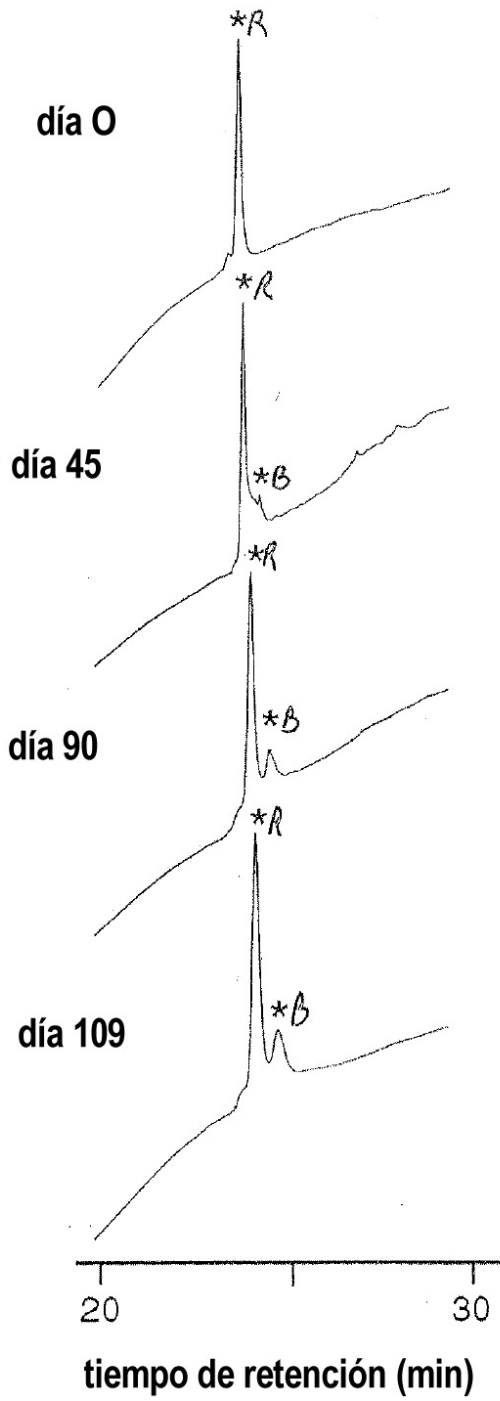


Fig. 3A

Fig. 3B

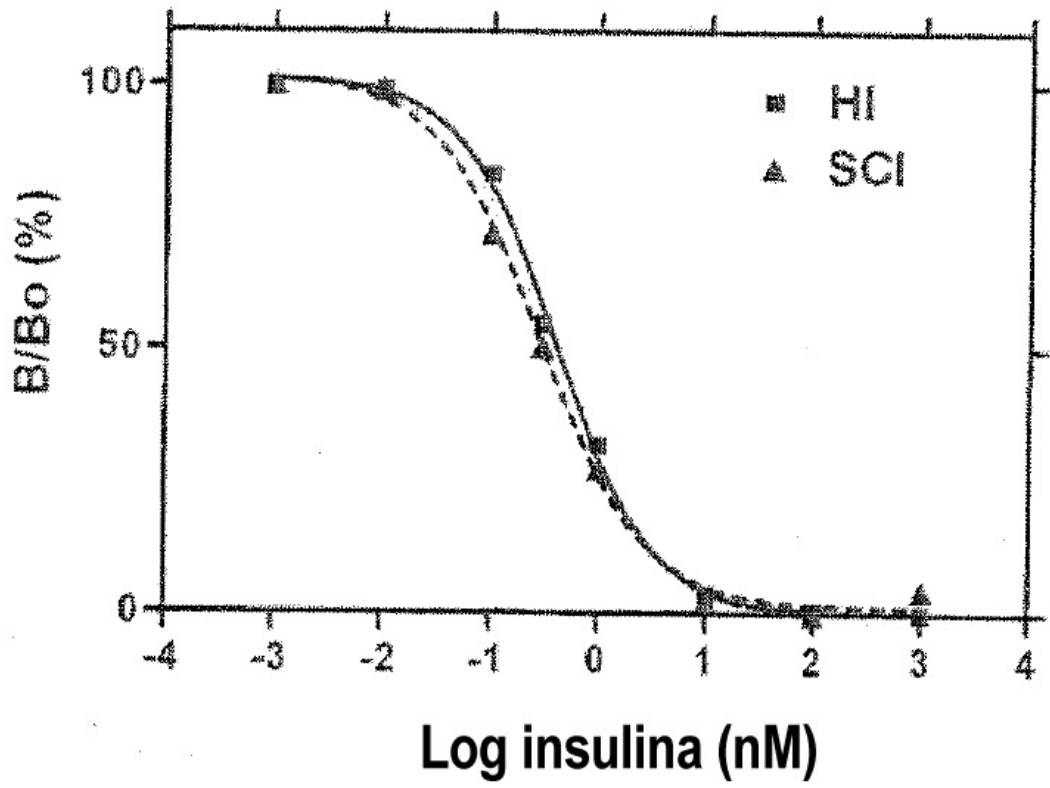


Fig. 4

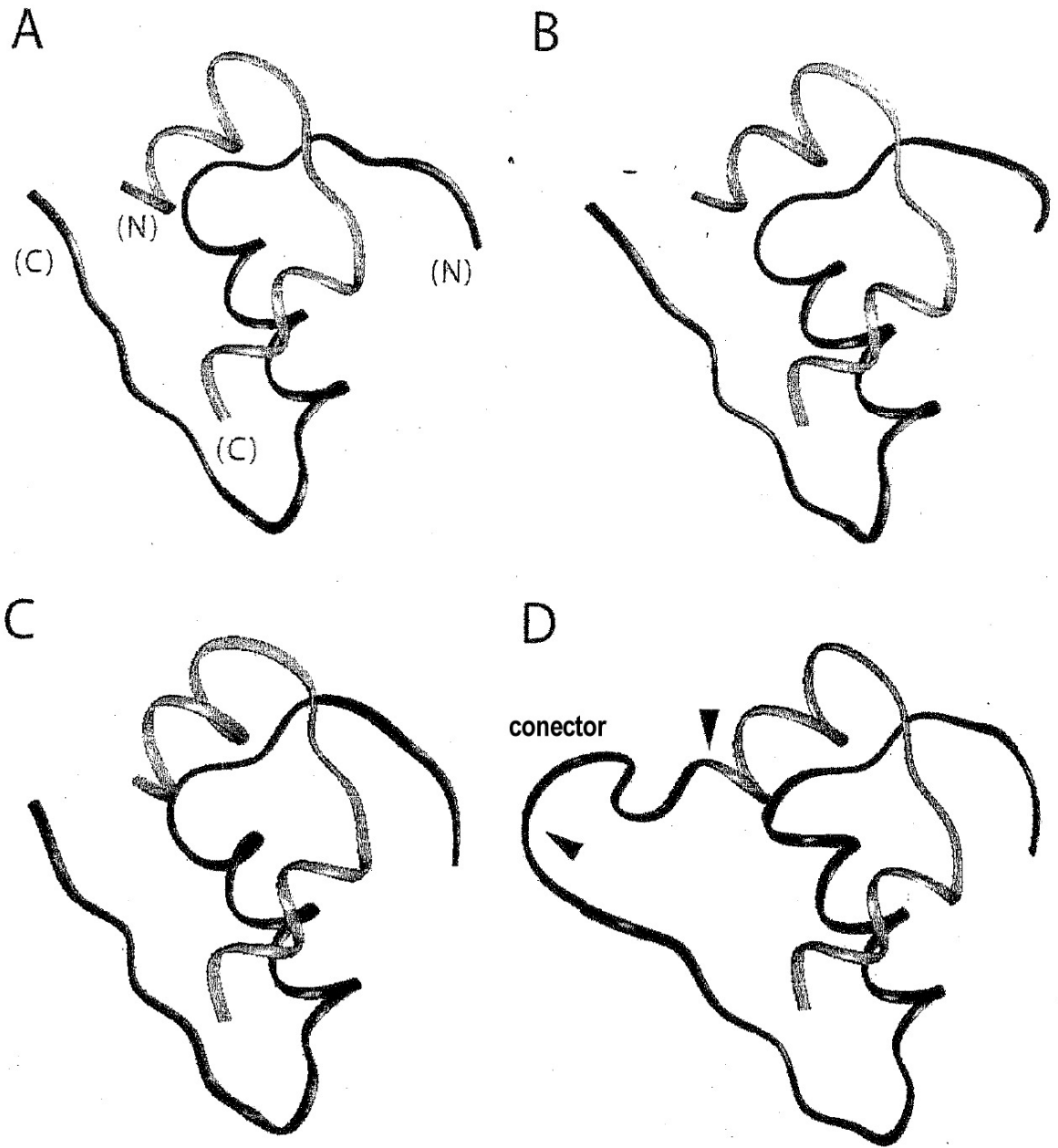


Fig. 5