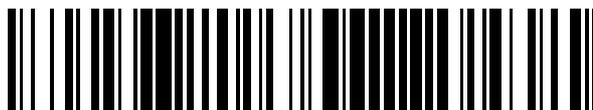


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 570 937**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/12** (2006.01)

**C07K 14/62** (2006.01)

**C12P 21/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2008 E 08876705 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016 EP 2307441**

54 Título: **Un proceso para la preparación de compuestos de insulina**

30 Prioridad:

**07.08.2008 IN CH19042008**

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

**23.05.2016**

73 Titular/es:

**BIOCON LIMITED (100.0%)  
20th KM Hosur Road Electronic City  
Bangalore 560 100 Karnataka, IN**

72 Inventor/es:

**HAZRA, PARTHA;  
SATHYANARAYANA, SRIKANTH  
GOLLARAHOSAHALLI;  
SREENIVAS, SUMA;  
SHIVARUDRAIAH, MANJUNATH  
HADAVANAHALLI;  
SASTRY, KEDARNATH NANJUND y  
IYER, HARISH**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 570 937 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

Un proceso para la preparación de compuestos de insulina

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la preparación de compuestos de insulina incluyendo sus análogos o derivados de la misma a partir de sus formas precursoras correspondientes por medio de una reacción enzimática en una etapa que implica el uso combinado y concurrente de cantidades óptimas de tripsina y carboxipeptidasa B que funcionan de manera sinérgica dirigiendo la reacción de manera controlada para evitar la producción aleatoria de productos secundarios no deseados. Particularmente, las reacciones de conversión enzimática de la presente invención ofrecen como ventajas la reducción del número de etapas operativas, mayor rendimiento y pureza de los productos finales deseados.

15 **Antecedentes y técnica anterior de la invención**

Los métodos de modificación genética están permitiendo cada vez más que las formas precursoras de la insulina se expresen en microorganismos (documentos EP-A-347 781, EP-A-367 163). Las pre pro secuencias habitualmente se escinden química y/o enzimáticamente (documentos DE-P-3 440 988, EP-A-0264250). Los métodos de conversión enzimática que se conocen se basan en la escisión con tripsina y carboxipeptidasa B (Kemmler W. et al. J. Biol. Chem., 246 (1971) 6786-6791; documento EP-A-195 691; documento EP-B-89007). En el proceso típico de conversión de la molécula precursora de insulina en la molécula correspondiente, se elimina el péptido enlazador entre las cadenas A y B. La reacción enzimática con tripsina es una reacción enzimática y compleja que no solo escinde los enlaces peptídicos cuya escisión produce insulina humana o los productos finales deseados, sino también, en una reacción competitiva, la escisión en otros sitios susceptibles que produce una pluralidad de productos secundarios no deseados.

Cousens et al. (Gene [1987] 61, 265-275) y Jonasson et al. (Gene [1998] 210, 203-210) desvelan la expresión de proinsulina en *S. cerevisiae* y *E. coli*, respectivamente, y su purificación posterior. Gusarov et al. (J Chromatography B [2009] 877, 1216-1220) describen la purificación de insulina humana utilizando HPLC. La Solicitud de Patente Internacional WO 2004/044206 desvela la expresión, conjugación y purificación de una molécula de insulina. La Solicitud de Patente Internacional WO 2007/043059 desvela la formación de insulina por medio de la expresión y purificación de una proteína de fusión proinsulínica. Castellanos-Serra et al. (FEBS Letters [1971] 378, 171-176) desvelan la formación de insulina por medio de la expresión de un proteína de fusión IL2-proinsulina en *E. coli*. Nielsson et al. (Journal of Biotechnology [1996] 48, 241-250) desvela la formación de insulina en *E. coli* a partir de cuerpos de inclusión que contienen una proteína de fusión. La Patente Europea EP 0 195 691 desvela la expresión en levaduras y el aislamiento de precursores de insulina. La Solicitud de Patente británica GB 931.954 desvela la purificación de insulina utilizando un intercambiador aniónico de aminocelulosa.

Los métodos de la técnica anterior incluyen el uso de tripsina y una segunda enzima carboxipeptidasa de tal manera que la segunda enzima carboxipeptidasa se añade cuando se forme el intermediario necesario en la reacción. La desventaja de estos métodos es la formación de grandes cantidades de productos secundarios como impurezas que solo se pueden eliminar de la solución de reacción con dificultad. En el caso particular de la conversión de la forma precursora humana en insulina humana (insulina humana, I-II), se produce la formación de grandes cantidades de des-Thr(B30)-insulina humana (des-Thr(B30)-HI).

A partir de lo anterior, es evidente que sería ventajoso seguir un proceso de reacción enzimática más simple para la escisión de los compuestos precursores de insulina, sus análogos y derivados de la misma en insulina por medio de una etapa mucho más simple que elimine la posible formación de impurezas poliméricas tan completamente como sea posible y, al mismo tiempo, que aumente la concentración del producto insulínico final deseado tanto como sea posible. Una condición adicional es la necesidad de asegurar un alto rendimiento total que aumente la facilidad de funcionamiento, calidad así como la cantidad del producto final deseado.

Las desventajas de los procesos conocidos se han remediado llevando a cabo las reacciones enzimáticas de la presente invención, y resultó que el aumento en el rendimiento sin productos secundarios no deseados se relaciona con la concentración óptima de tripsina y carboxipeptidasa que se utilice en condiciones de reacción propicias. Los inventores se han esforzado en el desarrollo de un proceso de reacción enzimática en una etapa que implica el uso en combinación y concurrente de cantidades óptimas de tripsina y carboxipeptidasa B que funcionan sinérgicamente para proporcionar los productos finales deseados aumentando la facilidad operativa, la pureza y el rendimiento de los productos finales.

**Objetivos de la invención**

El objetivo principal de la presente invención es obtener un proceso de preparación de compuestos de insulina y sus análogos o derivados a partir de sus correspondientes precursores con mínima formación de subproductos no deseados que haga posible, mediante una reacción enzimática de una etapa que implica el uso en combinación y

concurrente de cantidades óptimas de tripsina y carboxipeptidasa B que funcionan de manera sinérgica, proporcionar los productos finales deseados.

5 Otro objetivo principal de la presente invención es proporcionar un precursor análogo de insulina que se representa por las SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 que se pueden utilizar como material de partida, pudiendo estar dichos precursores en forma líquida o cristalina.

10 Otro objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un vector de expresión para la expresión de proinsulina o sus análogos o derivados que comprende dicha secuencia de ADN respectiva que codifica la molécula precursora.

15 Otro objetivo más de la presente invención es proporcionar un microorganismo/hospedador adecuado que se transforma con dicho vector de expresión y posteriormente proporcionar un proceso para preparar los respectivos compuestos de insulina, que comprende el cultivo de dicho microorganismo transformado en un medio de fermentación adecuado y las condiciones de fermentación para producir las formas de precursor de insulina.

20 Otro objetivo más de la presente invención incluye el método de conversión de las formas precursoras del compuesto de insulina en sus respectivas formas activas por medio de una reacción enzimática en una etapa única en la que se añaden juntas tripsina y carboxipeptidasa en cantidades óptimas que permiten la sinergia y una reacción controlada que minimiza la producción de productos finales no deseados.

25 Otro objetivo más de la presente invención es obtener un proceso para la obtención de una insulina o su análogo o derivados de la misma a partir de su respectivo precursor equivalente que comprende llevar a cabo sucesivamente las etapas en un orden secuencial.

Otro objetivo más de la presente invención es obtener una molécula de insulina.

30 Otro objetivo más de la presente invención es obtener una molécula de insulina que se selecciona de entre el grupo que consiste en insulina, lispro, aspart, glulisina o IN-105.

### Resumen de la invención

35 En consecuencia, la presente invención se refiere a un proceso para la preparación de compuestos de insulina y sus análogos o derivados a partir de sus correspondientes precursores que comprende el tratamiento de dicho precursor con tripsina y carboxipeptidasa que se usan en combinación y concurrentemente, siempre que la proporción de la concentración relativa de tripsina respecto a carboxipeptidasa sea desde aproximadamente 5:1 a aproximadamente 50:1; un proceso para obtener una insulina o su análogo o derivados de la misma a partir de sus respectivos precursores equivalentes que comprende llevar a cabo sucesivamente las siguientes etapas en el siguiente orden

40 secuencial: (a) disolver una cantidad óptima del precursor de insulina o un derivado de insulina en una solución tampón; (b) preparar distintas alícuotas de la solución del precursor con un intervalo de pH de aproximadamente 7,0 a 9,0; (c) introducir las enzimas tripsina y carboxipeptidasa de manera concurrente en las distintas alícuotas preparadas en la Etapa (b) e incubar la mezcla durante aproximadamente 4-10 horas; (d) precipitar el producto insulínico deseado por la adición de un tampón de ácido cítrico y ZnCl<sub>2</sub>; una molécula de insulina preparada y una molécula de insulina de entre el grupo que comprende insulina, lispro, aspart, glulisina o IN-105.

45

### Breve descripción del listado de secuencias adjuntas

SEQ ID NO 1: Secuencia de aminoácidos de la molécula precursora de Aspart.

50 SEQ ID NO 2: Secuencia de aminoácidos de la molécula precursora de Aspart.

SEQ ID NO 3: Secuencia de aminoácidos de la molécula precursora de Aspart.

55 SEQ ID NO 4: Secuencia de aminoácidos de la molécula precursora de Lispro.

SEQ ID NO 5: Secuencia de aminoácidos de la molécula precursora de Lispro.

SEQ ID NO 6: Secuencia de aminoácidos de la molécula precursora de Lispro.

60 SEQ ID NO 7: Secuencia de aminoácidos de la molécula precursora de Glulisina.

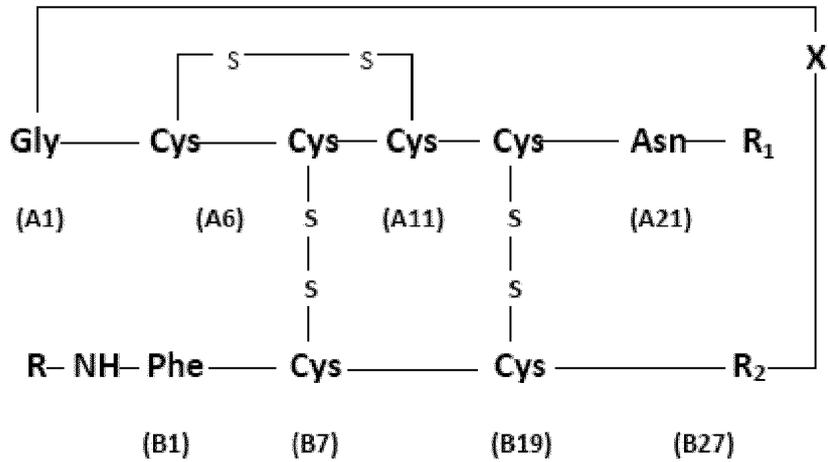
SEQ ID NO 8: Secuencia de aminoácidos de la molécula precursora de Glulisina.

65 SEQ ID NO 9: Secuencia de aminoácidos de la molécula precursora de Glulisina.

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere a un proceso para la preparación de compuestos de insulina y sus análogos o derivados a partir de sus correspondientes precursores que se representan por la fórmula:

5



donde,

10 **R** es hidrógeno o un resto de aminoácido escindible química o enzimáticamente o un péptido escindible química o enzimáticamente que comprende al menos dos restos de aminoácido.

**R<sub>1</sub>** es OH o un resto de aminoácido, o Y<sub>1</sub>-Y<sub>2</sub> en el que Y es un resto de aminoácido.

Los restos A1 a A21 se corresponden con la cadena A de la insulina y los restos B1 a B27 se corresponden con la cadena B de la insulina, incluyendo la sustitución, delección y/o adiciones de aminoácidos de las mismas.

15

**R<sub>2</sub>** es Z<sub>1</sub>-Z<sub>2</sub> en el que Z<sub>1</sub> se selecciona de entre Pro, Lys, Asp, y Z<sub>2</sub> se selecciona de entre Lys o Pro o Glu o Z<sub>1</sub>-Z<sub>2</sub>-Z<sub>3</sub> en el que Z<sub>1</sub> se selecciona de entre Pro, Lys, Asp, y Z<sub>2</sub> se selecciona de entre Lys o Pro o Glu, y Z<sub>3</sub> es treonina o un resto peptídico de al menos tres restos de aminoácido con la condición de que el aminoácido que corresponde a B30 sea treonina.

20

**X** es un polipéptido que conecta la cadena A con la cadena B que se puede escindir enzimáticamente sin afectar ni a la cadena A ni a la cadena B, que tiene al menos dos aminoácidos en el que el primero y el último aminoácido son Lisina o Arginina. Los respectivos precursores se definen por una secuencia de aminoácidos que es homóloga en al menos un 85 % con las secuencias de aminoácidos que se exponen en las SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9.

25

El proceso comprende el tratamiento de dicho precursor con tripsina y carboxipeptidasa que se usan en combinación y de manera concurrente siempre que la proporción de la concentración relativa de tripsina con respecto a carboxipeptidasa sea de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 50:1. La reacción de conversión se lleva a cabo a un pH de 7 a 9. La cantidad relativa de tripsina con respecto a la del precursor de insulina varía de 1:10 a 1:100.

30

En otra realización de la presente invención, la cantidad relativa de carboxipeptidasa con respecto a la del precursor de insulina es aproximadamente de 1:500.

35

En otra realización más de la presente invención, la proporción de la concentración relativa de tripsina con respecto a carboxipeptidasa es aproximadamente de 5:1.

En otra realización más de la presente invención, la concentración de tripsina que se utiliza para la reacción de conversión es al menos de 0,01 mg/ml.

40

En otra realización más de la presente invención, la concentración de carboxipeptidasa que se utiliza para la reacción de conversión es al menos de 0,001 mg/ml.

En otra realización más de la presente invención, el precursor está en forma líquida o cristalina.

45

En otra realización más de la presente invención, la reacción de conversión se lleva a cabo a una temperatura que varía desde aproximadamente 2 °C a 40 °C.

En otra realización más de la presente invención la duración de la reacción de conversión enzimática es aproximadamente de 2 a 24 horas.

50

En otra realización más de la presente invención el medio de reacción contiene al menos un 30 % de agua o un disolvente miscible con agua.

5 En otra realización más de la presente invención el disolvente miscible con agua se selecciona de entre el grupo que comprende metanol, etanol, acetona o N,N-dimetilformamida.

En otra realización más de la presente invención el medio de reacción comprende además una sal que actúa como agente tamponador.

10 En otra realización más de la presente invención la sal se selecciona de entre el grupo que comprende TRIS, etilendiamina, trietanolamina, glicina, HEPES (ácido N-2-hidroxiethylpiperacina-N'-2-etanosulfónico).

En otra realización más de la presente invención la concentración de sal que se utiliza en el medio de reacción es aproximadamente de 10 mM a 1M.

15 En otra realización más de la presente invención la concentración de sal que se utiliza en el medio de reacción es aproximadamente de 0,6 M.

20 La presente invención se refiere a un proceso para la obtención de una insulina o su análogo o derivados de la misma a partir de sus respectivos precursores equivalentes. Los precursores se definen por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 % homóloga a las secuencias de aminoácidos que se exponen en las SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9. El proceso comprende llevar a cabo sucesivamente las siguientes etapas en el siguiente orden secuencial

25 (a) Disolver una cantidad óptima del precursor de insulina o un derivado de insulina en una solución tampón.

(b) Preparar distintas alícuotas de la solución del precursor a un pH que varía de aproximadamente 8,0 a 9,0.

30 (c) Introducir las enzimas tripsina y carboxipeptidasa de manera concurrente con una proporción de concentración relativa de 5:1 a 50:1 en las distintas alícuotas que se preparan en la Etapa (b) e incubar la mezcla durante aproximadamente 4-10 horas.

35 (d) Precipitar el producto insulínico deseado por la adición de un tampón de ácido cítrico y ZnCl<sub>2</sub>. También se proporciona una molécula de insulina que se prepara como se ha descrito anteriormente que se selecciona de entre el grupo que comprende insulina, lispro, aspart, glulisina o IN-105.

Se hará ahora referencia en detalle a los métodos desvelados que, junto con los siguientes ejemplos servirán para explicar los principios de la invención.

40 En la descripción y reivindicaciones de la presente invención, se utilizará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones que se exponen en el presente documento.

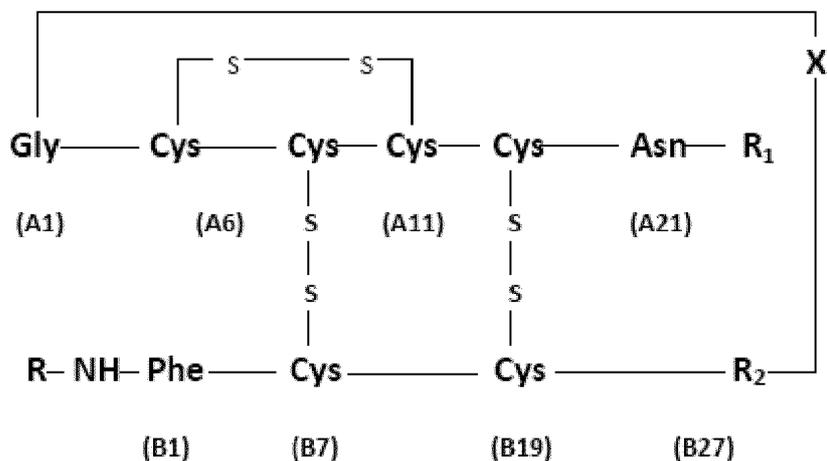
45 A menos de que se defina otra cosa en el presente documento, los términos científicos y técnicos que se utilizan en conexión con la presente invención tendrán los significados que entienden comúnmente los expertos habituados en la técnica. Además, a menos de que sea requerida otra cosa por el contexto, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluyen el singular. Los métodos y técnicas de la presente invención se llevan a cabo en general de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica. En general, las nomenclaturas que se utilizan en conexión con, y las técnicas descritas en el presente documento son aquellas bien conocidas y que se utilizan comúnmente en la técnica. Los métodos y técnicas de la presente invención se llevan a cabo en general de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica.

Como se utiliza en el presente documento “**aminoácido**” se refiere a secuencias peptídicas o proteicas o partes de las mismas. Los términos “proteína”, “péptido” y “polipéptido” se utilizan de manera intercambiable.

55 En el presente documento, el término “**insulina**” incluye la insulina de cualquier especie tal como la insulina porcina, insulina bovina, e insulina humana y complejos de la misma tales como los complejos de zinc que incluyen dímeros y oligómeros, por ejemplo, hexámeros de la misma. De manera adicional, el término “**insulina**” en el presente documento incluye los denominados “**análogos de insulina**”. Un análogo de insulina es una molécula de insulina que tiene una o más mutaciones, sustituciones, eliminaciones y/o adiciones de las cadenas de aminoácidos A y/o B con respecto a la molécula de insulina humana nativa. Más específicamente, puede haberse cambiado uno o más de los restos de aminoácido con otro resto de aminoácido y/o puede haberse eliminado uno o más restos de aminoácido y/o se ha podido añadir uno o dos restos de aminoácido, con la condición de que dicho análogo de insulina tenga una actividad insulínica suficiente. Los análogos de insulina son preferentemente aquellos en los que uno o más de los restos de aminoácido de origen natural, preferentemente uno, dos o tres de ellos, se han sustituido por otro resto de aminoácido codificable. Se describen ejemplos de análogos de insulina en las siguientes patentes y equivalentes de estas: US 5.618.913, EP 254.516, EP 280.534, US 5.750.497 y US 6.011.007. Ejemplos de

análogos de insulina específicos son insulina aspart (es decir, insulina humana AspB28) y la insulina lispro (es decir, insulina humana LysB28, ProB29) e "insulina glulisina" (insulina humana Lys B (3), Glu B (29)).

5 Un aspecto de la divulgación se refiere a compuestos precursores de insulina que se representan por la siguiente fórmula:



donde,

10 **R** es hidrógeno o un resto de aminoácido escindible química o enzimáticamente o un péptido escindible química o enzimáticamente que comprende al menos dos restos de aminoácido.

**R<sub>1</sub>** es OH o un resto de aminoácido, o **Y<sub>1</sub>-Y<sub>1</sub>** en el que **Y** es un resto de aminoácido.

15 Los restos **A<sub>1</sub>** a **A<sub>21</sub>** se corresponden con la cadena **A** de la insulina y los restos **B<sub>1</sub>** a **B<sub>27</sub>** se corresponden con la cadena **B** de la insulina, incluyendo la sustitución, delección y/o adiciones de aminoácidos de las mismas.

20 **R<sub>2</sub>** es **Z<sub>1</sub>-Z<sub>2</sub>** en el que **Z<sub>1</sub>** se selecciona de entre Pro, Lys, Asp, y **Z<sub>2</sub>** se selecciona de entre Lys o Pro o Glu o **Z<sub>1</sub>-Z<sub>2</sub>-Z<sub>3</sub>** en el que **Z<sub>1</sub>** se selecciona de entre Pro, Lys, Asp, y **Z<sub>2</sub>** se selecciona de entre Lys o Pro o Glu, y **Z<sub>3</sub>** es treonina o un resto peptídico de al menos tres restos de aminoácido con la condición de que el aminoácido que corresponde a B30 sea treonina.

25 **X** es un polipéptido que conecta la cadena A con la cadena B que se puede escindir enzimáticamente sin afectar ni a la cadena A ni a la cadena B, que tiene al menos dos aminoácidos en el que el primero y el último aminoácido son Lisina o Arginina.

30 Uno de los aspectos de la presente divulgación se refiere específicamente a la molécula IN-105 que es una molécula de insulina conjugada en el aminoácido épsilon Lisina de la posición B29 de la cadena B de la insulina con un oligómero anfílico con la fórmula estructural CH<sub>3</sub>O-(C<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH. La molécula puede estar monoconjugada en A1, B1 y B29, bi-conjugada en varias combinaciones de A1, B1 y B29, o triconjugada en varias combinaciones de A1, B1 y B29.

35 En un aspecto, la molécula precursora de insulina aislada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 81 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 82 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 83 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 84 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 85 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 86 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 87 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 88 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 89 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 91 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 92 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 93 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 94 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 96 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos aproximadamente un 97 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, como alternativa al menos

aproximadamente un 98 % de identidad de secuencia de ácido nucleico y como alternativa al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia de ácido nucleico con una molécula de polipéptido que se representa en las SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

5 La **tripsina** es una serina proteasa típica e hidroliza una proteína o un péptido en el extremo carboxilo de un resto arginina o lisina (Enzymes, pp 261-262(1979), ed. Dixon, M. y Webb, E. C., Longman Group Ltd., Londres). En particular se produce fácilmente la hidrólisis en un sitio dibásico donde haya dos restos de arginina o lisina sucesivos, y se sabe que la hidrólisis se produce más fácilmente cuando el sitio dibásico se localiza en o cerca de una estructura de giro  $\beta$  (Rholam, M., et al., FEBS Lett., 207, 1-6(1986). The Enzyme Vol. II, 3ª Edición, Editor Boyer, Acad. Press NY. Págs. 249-275). Particularmente, la tripsina escinde los enlaces peptídicos en los restos de arginina (Arg) o lisina (Lys) del extremo C. La escisión triptica de las moléculas precursoras de insulina puede producirse en diferentes sitios de escisión simultáneamente. Debido a los muchos sitios de escisión en una molécula precursora de insulina específica, se pueden formar muchos productos secundarios no deseados durante la reacción de escisión triptica.

15 La tripsina pancreática recombinante porcina tiene un peso molecular de aproximadamente 23.000 Dalton y una actividad enzimática óptima a un pH de 8,0. La tripsina se utiliza en el proceso industrial de producción de insulina y análogos de insulina. La producción de estas biomoléculas se describe en la bibliografía y se han seguido varias estrategias.

20 La **carboxipeptidasa B** hidroliza preferentemente los aminoácidos básicos lisina, arginina y ornitina en la posición del extremo C de polipéptidos. La carboxipeptidasa B es una exopeptidasa que cataliza una liberación hidrolítica de restos de aminoácidos básicos arginina y lisina del extremo C de péptidos y proteínas.

25 El término "**péptido C**" o "**péptido enlazador**" como se utiliza en el presente documento, incluye todas las formas de péptido C de insulina, incluyendo péptidos nativos o péptidos sintéticos. Dichos péptidos C de insulina pueden ser péptidos humanos, o pueden ser de otras especies animales y géneros, preferentemente mamíferos. Por lo tanto, se incluyen las variantes y modificaciones del péptido C de insulina siempre que mantengan la actividad del péptido C de insulina. Se sabe en la técnica cómo modificar las secuencias de proteínas o péptidos, mientras se mantiene su actividad útil y se puede conseguir utilizando técnicas que son convencionales en la técnica y ampliamente descritas en la bibliografía, por ejemplo, mutagénesis aleatoria o dirigida al sitio, escisión y unión de ácidos nucleicos, etc. Por lo tanto, las variantes o derivados funcionalmente equivalentes de las secuencias del péptido C de la insulina se pueden preparar fácilmente según las técnicas bien conocidas en la técnica, e incluyen secuencias peptídicas que tienen una actividad funcional, por ejemplo, biológica, de un péptido C de insulina. Todos dichos análogos, variantes, derivados o fragmentos del péptido C de insulina están incluidos especialmente en el ámbito de la presente invención, y se incorporan bajo la expresión "un péptido C de insulina".

40 Los principales requisitos de un péptido C son que tenga la suficiente longitud para permitir la formación de un enlace di-sulfuro entre las cadenas A y B y que se pueda escindir del precursor de insulina dando lugar a la formación de insulina. Un di-péptido típico que se utiliza como péptido C es -Arg-Arg-. Los péptidos C pueden ser de cualquier longitud que se inicie con Arg o Lys y termine con Arg o Lys.

45 Se proporcionan vectores que comprenden el ADN que codifica cualquiera de los genes descritos en el presente documento. Se proporciona también la célula hospedadora que comprende cualquiera de dichos vectores. A modo de ejemplo, las células hospedadoras pueden ser bacterianas, fúngicas o de mamífero.

50 La invención emplea una célula hospedadora recombinante en la que se produce al menos una parte de una secuencia de ácido nucleico que expresa el compuesto precursor de insulina. El sistema de expresión recombinante se selecciona de entre hospedadores procariontes y eucariotes. Los hospedadores eucariotes incluyen células de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*), células de mamífero o células vegetales. Las células bacterianas y eucariotas están disponibles en varias fuentes diferentes que incluyen las fuentes comerciales para los expertos en la técnica, por ejemplo, la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC; Rockville, Md.). Las fuentes comerciales de células que se utilizan para la expresión proteica recombinante también proporcionan instrucciones de uso de las células. La elección del sistema de expresión depende de las características que se deseen para el polipéptido que se va a expresar.

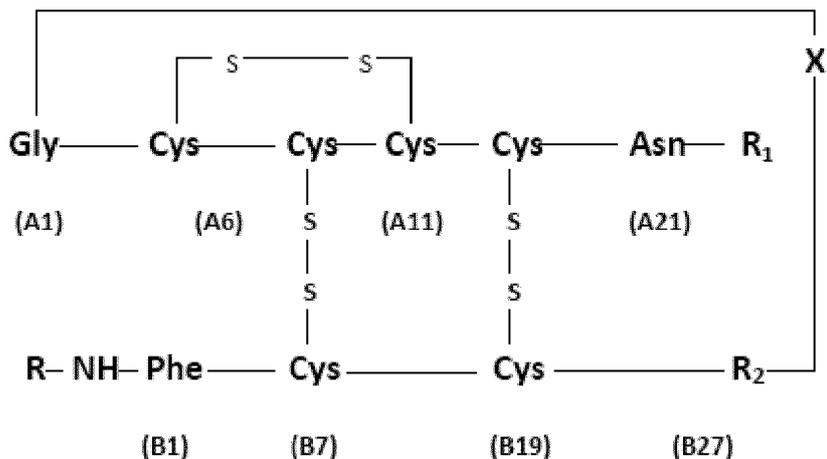
60 Más preferentemente en relación con los aspectos de las presentes invenciones, las células hospedadoras más preferidas son las levaduras metilotróficas. Las cepas de una levadura metilotrófica que se pueden modificar utilizando la presente invención incluyen, pero no se limitan a, cepas de levadura capaces de crecer en metanol, tales como las levaduras de los géneros *Pichia*, *Candida*, *Hansenula*, o *Torulopsis*. Las levaduras metilotróficas preferidas son las del género *Pichia*. Las cepas de levadura metilotrófica que se pueden modificar utilizando los presentes métodos incluyen también las cepas de levadura metilotrófica que se han modificado para que expresen una o más de las proteínas heterólogas de interés. La célula hospedadora más preferida de acuerdo con el aspecto de la presente invención es *Pichia pastoris* GS115.

65

La célula u organismo hospedador se puede modificar para que exprese la proteína o péptido recombinante utilizando técnicas convencionales. Por ejemplo, la proteína recombinante se puede expresar a partir de un vector o a partir de un gen exógeno insertado en el genoma del hospedador.

5 Los vectores que se pueden utilizar para expresar proteínas exógenas se conocen bien en la técnica y se describen posteriormente. Los vectores preferidos de la presente invención que portan genes de la molécula precursora de insulina incluyen pero no se limitan a pPIC9K.

10 El aspecto más significativo desvelado se refiere a un proceso para convertir en compuestos de insulina y sus análogos o derivados a partir de sus correspondientes precursores representados por la fórmula



donde,

15 **R** es hidrógeno o un resto de aminoácido escindible química o enzimáticamente o un péptido escindible química o enzimáticamente que comprende al menos dos restos de aminoácido.

**R<sub>1</sub>** es OH o un resto de aminoácido, o Y<sub>1</sub>-Y<sub>2</sub> en el que Y es un resto de aminoácido.

20 Los restos A1 a A21 se corresponden con la cadena A de la insulina y los restos B1 a B27 se corresponden con la cadena B de la insulina, incluyendo la sustitución, delección y/o adiciones de aminoácidos de las mismas.

25 **R<sub>2</sub>** es Z<sub>1</sub>-Z<sub>2</sub> en el que Z<sub>1</sub> se selecciona de entre Pro, Lys, Asp, y Z<sub>2</sub> se selecciona de entre Lys o Pro o Glu o Z<sub>1</sub>-Z<sub>2</sub>-Z<sub>3</sub> en el que Z<sub>1</sub> se selecciona de entre Pro, Lys, Asp, y Z<sub>2</sub> se selecciona de entre Lys o Pro o Glu, y Z<sub>3</sub> es treonina o un resto peptídico de al menos tres restos de aminoácido con la condición de que el aminoácido que corresponde a B30 sea treonina.

**X** es un polipéptido que conecta la cadena A con la cadena B que se puede escindir enzimáticamente sin afectar ni a la cadena A ni a la cadena B, que tiene al menos dos aminoácidos en el que el primero y el último aminoácido son Lisina o Arginina.

30 que comprende el tratamiento de dicho precursor con tripsina y carboxipeptidasa que se utilizan en combinación y de manera concurrente siempre que la proporción de la concentración relativa de tripsina con respecto a carboxipeptidasa sea de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 50:1.

La molécula precursora puede estar en forma líquida o cristalina.

35 El proceso de conversión de la molécula precursora de insulina en su correspondiente molécula de insulina se realiza en un medio acuoso que comprende al menos aproximadamente un 40 % de agua, sin embargo, esto no excluye la presencia de aproximadamente un 30 %, o aproximadamente un 50 % o aproximadamente un 60 % o aproximadamente un 70 % o aproximadamente un 80 % de agua y también la presencia de disolventes miscibles en agua tales como el metanol, etanol, acetona, N,N-dimetilformamida y similares.

40 El medio de reacción puede comprender adicionalmente cualquier sal con propiedades de tampón. Preferentemente, el medio de reacción comprende Tris como sal a una concentración que varía de 10 mM a 1 M. Más preferentemente la concentración de Tris que se utiliza en el medio de reacción es de 0,6 M.

45 La conversión se lleva a cabo con cualquiera de un amplio intervalo de temperaturas, en general desde aproximadamente 0 °C a 40 °C. Preferentemente la reacción se lleva a cabo a una temperatura de desde aproximadamente 10 °C a aproximadamente 30 °C y más preferentemente desde aproximadamente 15 °C a aproximadamente 25 °C.

50

El pH de la mezcla de reacción puede variar entre cualquiera de aproximadamente 2 a aproximadamente 12. Sin embargo, los mejores resultados se obtienen con el control cuidadoso del pH tal que la reacción progresa con un intervalo de pH de 7 a 9,5, preferentemente desde aproximadamente 8 a 9, y cuando se controla con precisión a un pH de 8,5.

5 El control del pH se controla con el uso de un agente tamponador. Los tampones adecuados incluyen cualquiera de un amplio intervalo incluyendo, TRIS, etilendiamina, trietanolamina, glicina, HEPES (ácido N-2-hidroxi-etilpiperacina-N'-2-etanosulfónico) y similares.

10 La cantidad de Tripsina y Carboxipeptidasa B que se utiliza en general es relativa tanto a la de las dos enzimas entre ellas como a la cantidad de molécula precursora de insulina. Las enzimas se pueden incorporar en las mezclas de reacción en solución o utilizando técnicas reconocidas tales como la inmovilización en un soporte adecuado y de esta manera ponerlas a disposición en el medio de reacción.

15 En una base de peso:peso, la tripsina en general estará presente en una cantidad relativa a la del precursor de insulina que varía desde aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:500, preferentemente, desde aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:200, más preferentemente desde aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:100 o de 1:10 a aproximadamente 1:50 o de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:25. La concentración más preferida de tripsina relativa a la concentración de insulina que se emplea es 1:100. La  
20 concentración de tripsina que se utiliza para la reacción de conversión es al menos de 0,01 mg/ml.

En una base de peso:peso, la carboxipeptidasa B en general estará presente en una cantidad relativa a la del precursor de insulina que varía desde aproximadamente 1:500 a aproximadamente 3:500. La concentración más preferida de carboxipeptidasa relativa a la concentración de insulina que se emplea es 1:500. La concentración de  
25 carboxipeptidasa que se utiliza para la reacción de conversión es al menos de 0,001 mg/ml. Otro parámetro significativo es la proporción de tripsina con respecto a carboxipeptidasa B en la mezcla de reacción. Generalmente, en una base de peso, la proporción de tripsina respecto a carboxipeptidasa B está en el intervalo de 5:1 a 50:1. Preferentemente, en una base de peso, la proporción de tripsina con respecto a carboxipeptidasa B es aproximadamente de 50:3 a aproximadamente 5:3. La proporción más preferida de tripsina respecto a  
30 carboxipeptidasa B es aproximadamente de 5:1.

La duración de la reacción puede variar desde aproximadamente 2 a 48 horas, preferentemente la duración de la reacción es aproximadamente de 2 a 24 horas.

35 En consecuencia, la presente invención se refiere a un proceso para obtener una insulina o sus análogos o derivados de la misma a partir de sus respectivos precursores equivalentes que comprende llevar a cabo sucesivamente las siguientes etapas en un orden secuencial que se proporciona a continuación:

(a) Disolver una cantidad óptima del precursor de insulina o un derivado de insulina en una solución tampón.

40 (b) Preparar distintas alícuotas de la solución del precursor a un pH que varía de aproximadamente 7,0 a 9,0.

(c) Introducir las enzimas tripsina y carboxipeptidasa de manera concurrente en las distintas alícuotas que se preparan en la Etapa (b) e incubar la mezcla durante aproximadamente 4-10 horas.

45 (d) Precipitar el producto insulínico deseado por la adición de un tampón de ácido cítrico y  $ZnCl_2$ .

La invención se elaboró además con la ayuda de los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos no se deben interpretar como limitantes del ámbito de la invención.

### 50 **Ejemplo 1A**

#### **Precursor de Aspart (SEQ ID NO 1, 2, y 3)**

55 El precursor de Aspart de Fórmula X-[cadena B de Aspart (B1-B30)]-Y-[cadena A de Aspart (A1-A21)], donde X es una secuencia peptídica líder, la cadena B es la secuencia de la cadena B de Aspart de B1-B30, Y es una secuencia de péptido enlazador entre la cadena B y la cadena A, la cadena A es la cadena A de Aspart. La secuencia puede estar desprovista de líder u otro péptido líder (por ejemplo, EEAE-AEAEPR o GAVR). El péptido enlazador Y puede ser cualquiera del ejemplo R, y RDADDR.

60 La secuencia del precursor está representada por las SEQ ID NO 1 y 2. El precursor se puede producir por cualquier sistema de expresión adecuado tal como *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, células CHO, etc.

65 El precursor de Aspart se clonó en fase con el péptido de señal Mat-alfa en el vector de expresión para *Pichia*, pPIC9K. Se transformó la cepa hospedadora de *Pichia pastoris* GS115 con el plásmido recombinante para obtener

el clon que expresaba el precursor de Aspart.

El precursor de Aspart es secretado por *Pichia pastoris* en el medio de cultivo. El caldo se centrifuga y las células se separan del sobrenadante. Hay múltiples opciones disponibles para la captura del precursor que incluyen cromatografía de intercambio iónico y cromatografía hidrófoba. Para la presente invención se utilizaron la

5 cromatografía de intercambio iónico y cromatografía hidrófoba. Para la presente invención se utilizaron la cromatografía de intercambio catiónico y la HIC para capturar el precursor específico.

#### Ejemplo 1B

##### 10 Precursor de Lispro (SEQ ID NO 3, 4 y 5)

El precursor de Lispro de Fórmula X-[cadena B de Lispro (B1-B30)]-Y-[cadena A de Lispro (A1-A21)], donde X es una secuencia peptídica líder, la cadena B es la secuencia de la cadena B de Lispro de B1-B30, Y es una secuencia de péptido enlazador entre la cadena B y la cadena A, la cadena A es la cadena A de Lispro. La secuencia puede

15 estar desprovista de líder u otro péptido líder. El péptido enlazador Y puede ser cualquiera de entre por ejemplo R o RDADDR. La secuencia del precursor está representada por la SEQ ID NO 3 y 4. El precursor puede producirse por cualquier sistema de expresión adecuado tal como *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, células CHO, etc.

20 El precursor de Lispro se clonó en fase con el péptido de señal Mat-alfa en el vector de expresión para *Pichia*, pPIC9K. Se transformó la cepa hospedadora de *Pichia pastoris* GS115 con el plásmido recombinante para obtener el clon que expresaba el precursor de Lispro.

25 El precursor de Lispro es secretado por *Pichia pastoris* en el medio de cultivo. El caldo se centrifuga y las células se separan del sobrenadante. Hay múltiples opciones disponibles para la captura del precursor que incluyen cromatografía de intercambio iónico y cromatografía hidrófoba. Para la presente invención se utilizaron la cromatografía de intercambio catiónico y la HIC para capturar el precursor específico.

#### Ejemplo 1C

##### 30 Precursor de Glulisina (SEQ ID NO 5, 6 y 7)

El precursor de Glulisina de Fórmula X-[cadena B de Glulisina (B1-B30)]-Y-[cadena A de Glulisina (A1-A21)], donde X es una secuencia peptídica líder, la cadena B es la secuencia de la cadena de Glulisina de B1-B30, Y es una secuencia de péptido enlazador entre la cadena B y la cadena A, la cadena A es la cadena A de Glulisina. La secuencia puede estar desprovista de líder u otro péptido líder. El péptido enlazador Y puede ser cualquiera de entre por ejemplo R o RDADDR. La secuencia del precursor está representada por la SEQ ID NO 5 y 6. El precursor puede producirse por cualquier sistema de expresión adecuado tal como *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, células CHO, etc. El precursor de Glulisina se clonó en fase con el péptido de señal Mat-alfa en el vector de expresión para *Pichia*, pPIC9K. Se transformó la cepa hospedadora de *Pichia pastoris* GS115 con el plásmido recombinante para obtener el clon que expresaba el precursor de Glulisina.

40 con el plásmido recombinante para obtener el clon que expresaba el precursor de Glulisina.

45 El precursor de Glulisina es secretado por *Pichia pastoris* en el medio de cultivo. El caldo se centrifuga y las células se separan del sobrenadante. Hay múltiples opciones disponibles para la captura del precursor que incluyen cromatografía de intercambio iónico y cromatografía hidrófoba. Para la presente invención se utilizaron la cromatografía de intercambio catiónico y la HIC para capturar el precursor específico.

#### Cristalización del precursor

50 Los diferentes compuestos precursores de insulina capturados del caldo de fermentación utilizando una etapa de cromatografía de intercambio catiónico se cristalizaron con el fin de eliminar el color y almacenarlos. Se llevó a cabo la cristalización tal que la concentración del precursor al inicio de la cristalización era alrededor de 2 a 20 g/l, preferentemente de 8 a 14 g/l. La cristalización se llevó a cabo añadiendo  $ZnCl_2$  y fenol y luego ajustando el pH entre 3,0 y 8,0, preferentemente entre 3,5 y 5,5. El fenol se puede añadir en un 0,1 a 0,5 % del volumen agrupado de elución CIEX. Se puede añadir una solución de  $ZnCl_2$  al 4 % en un 3 a 15 % del volumen agrupado de elución CIEX. El pH se puede ajustar utilizando cualquier álcali, preferentemente NaOH o TRIS. El proceso de cristalización se puede llevar a cabo a una temperatura de entre 2 y 30 °C y la suspensión se almacena durante un tiempo de manera que se formen los cristales completamente. Los cristales de precursor se pueden separar del sobrenadante por centrifugación o decantación.

60 por centrifugación o decantación.

#### Ejemplo 2A

##### Ejemplo de cristalización del precursor de Lispro

65 Se tomaron 463 ml del agrupamiento de elución (concentración del precursor 13,8 g/l) y se añadieron 2,315 ml de fenol (0,5 % del volumen del EP) tras descongelarlo apropiadamente. Se continuó con la adición de 57,875 ml de

una solución de  $ZnCl_2$  al 4 % (12,5 % del volumen del EP). El pH era de 4,08 en este estadio y se ajustó a 4,8 añadiendo 420 ml de NaOH 2,5 N. El agua madre se mantuvo en condiciones de agitado lento durante 15 minutos y luego se transfirió a una cámara refrigerada (2-8 °C), donde se mantuvo durante una noche. Después toda la mezcla se centrifugó a 5000 rpm durante 20 minutos en una centrífuga Beckman Coulter Avanti J-26 XP. La pérdida en el sobrenadante fue del 1,55 %.

### Ejemplo 2B

#### Ejemplo de cristalización del precursor de Aspart

Se tomaron 500 ml del agrupamiento de elución (concentración del precursor 2,9 g/l) y se añadieron 0,625 ml de fenol (0,125 % del volumen del EP) tras descongelarlo apropiadamente. Se continuó con la adición de 15,625 ml de una solución de  $ZnCl_2$  al 4 % (3,125 % del volumen del EP). El pH era de 4,08 en este estadio y se ajustó a 4,8 añadiendo 315 ml de NaOH 2,5 N. El agua madre se mantuvo en condiciones de agitado lento durante 15 minutos y luego se transfirió a una cámara refrigerada (2-8 °C), donde se mantuvo durante cinco horas. Después el sobrenadante se separó por centrifugación. La pérdida en el sobrenadante fue del 4 %.

Comentario: ¿Se puede cambiar la numeración (aspart como 2A y Lispro como 2B)? El resto de los lugares que se están dando en los ejemplos mantienen la secuencia de A: Aspart, B: Lispro y C: Glulisina.

### Ejemplo 2C

#### Ejemplo de cristalización del precursor de Glulisina

Se tomaron 250 ml del agrupamiento de elución del procesamiento del precursor de Glulisina en Sp sefarosa (concentración del precursor 3,8 g/l) y se añadieron 0,31 ml de fenol (0,125 % del volumen del EP) tras descongelarlo apropiadamente. Se continuó con la adición de 7 ml de una solución de  $ZnCl_2$  al 4 % (3 % del volumen del EP). El pH era de 4,13 en este estadio y se ajustó a 4,9 añadiendo NaOH 2,5 N. El agua madre se mantuvo en condiciones de agitado lento durante 30 minutos y luego se transfirió a una cámara refrigerada (2-8 °C), donde se mantuvo durante cinco horas. Después el sobrenadante se separó por centrifugación. La pérdida en el sobrenadante fue del 7 %.

### Ejemplo 3A

#### Reacciones enzimáticas

Los diferentes compuestos de insulina se pueden preparar a partir de su precursor correspondiente por medio de una conversión enzimática. La conversión directa del precursor en producto final se puede obtener mediante la presencia de dos enzimas proteasas. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo de dos maneras diferentes. 1° el precursor tiene que tratarse con tripsina o enzimas tipo tripsina de origen vegetal, animal o microbiano recombinante. Cuando la reacción con Tripsina estaba en el intermedio se trataron en las mismas mezclas de reacción con la 2ª enzima proteasa Carboxipeptidasa B o una enzima similar de origen vegetal, animal o microbiano recombinante. La carboxipeptidasa B puede actuar sobre el aminoácido básico del extremo C. Como alternativa, las enzimas Tripsina y Carboxipeptidasa se añadieron en la mezcla de reacción como un cóctel (juntas) y se permitió que las reacciones continuaran hasta que se produjera la formación del producto óptimo correspondiente.

### Ejemplo 4A

#### Cuando solo se añade Tripsina a la mezcla de reacción de precursores individuales

Se solubilizaron 2 g de cristales de los precursores individuales de Aspart, Lispro y Glulisina en 5 ml de solución TRIS 6 M. La concentración de producto en la mezcla de reacción individual se mantuvo a 3-5 mg/ml. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a 8,5. Se añadió tripsina a la mezcla de reacción individual a una concentración de 50 µg/ml. Las reacciones se llevaron a cabo tanto a  $4 \pm 0,5$  °C como a temperatura ambiente ( $24 \pm 0,5$  °C). Se observó que el perfil cromatográfico al final de la reacción de la mezcla no cambiaba con respecto a la temperatura de reacción pero el tiempo para completar la reacción disminuía según aumentaba la temperatura. La temperatura para las reacciones se mantuvo a  $24 \pm 0,5$  °C. Se continuaron las reacciones durante 8 h y al final de las 8 h se analizaron las muestras.

De manera similar, se solubilizaron los precursores individuales de Aspart, Lispro y Glulisina en solución Tris y un 50 % de disolvente Dimetil Formamida a una concentración de 3-5 mg/ml. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a 8,5 y la temperatura de la mezcla de reacción se mantuvo a  $24 \pm 0,5$  °C. Se añadió Tripsina a la mezcla de reacción individual a una concentración de 50 µg/ml.

**Observación**

5 El precursor de Aspart se había convertido en B-30 Des-treonina Aspart y Des-octapéptido insulina. El porcentaje de Des-treonina Aspart era del 45 %, el des-octapéptido de insulina era del 36 %. La formación del intermediario necesario, Aspart con un resto de Arginina adicional en la posición B31, era alrededor de 10-14 %. Por lo tanto incluso cuando se añadió la 2ª enzima Carboxipeptidasa B a la mezcla de reacción, el rendimiento total para hacer el producto final sería <10-15 %.

10 Se encontró un perfil de producto similar cuando la reacción se llevaba a cabo con un 50 % de disolvente. Pero la velocidad de reacción era muy lenta en presencia del disolvente. Para conseguir el tipo de perfil similar las reacciones tenían que continuar durante al menos 18 h.

15 Por lo tanto, no podía ser posible la generación de Aspart a partir del correspondiente precursor por medio de la reacción sucesiva con proteasas. Por lo tanto se entendió que Lys B-29 de Aspart es el sitio más potente para la escisión con Tripsina y según continúa la reacción, el sitio Arg B-22 también tiene tendencia a la escisión con Tripsina y al final de la reacción se obtuvo una población mezclada de B-30 des-treonina y des-octapéptido de cada precursor individual. El producto de la escisión en Arginina B31 es muy lento en todos los productos precursores.

20 El precursor de Lispro, en condiciones similares, se convirtió en el producto Lispro con un resto adicional de Arginina en la posición B31 junto con altas cantidades de des-octapéptido insulina. Se encontró un tipo similar de observación cuando se trataba el precursor de Glulisina con Tripsina en condiciones idénticas. Pero los perfiles cromatográficos de la mezcla de reacción no estaban claros en todos los casos de precursor de Lispro y Glulisina. Esto sugiere que aunque los productos finales posibles, Lispro y Glulisina, se pueden producir por medio de la reacción sucesiva con la 2ª proteasa carboxipeptidasa B, el rendimiento total sería muy pobre.

25 La presencia de un 50 % de Dimetil Formamida solo enlentece la velocidad de reacción en el caso del precursor de Lispro así como de Glulisina.

30 Para comprobar el concepto se intentó una reacción de tipo similar con Tripsina en el resto Lys B-29 del precursor de IN-105 cuando el precursor se bloqueó en el precursor de IN-105 con una cadena corta de una molécula de PEG así como con la molécula del precursor sin conjugar. Se observó que en el caso del precursor de IN-105 conjugado, la Tripsina escinde más preferentemente en el resto Arginina del extremo C del aminoácido 31 para generar IN-105 con un resto de arginina adicional en el extremo C de la cadena B. Junto con el IN-105 Arginina B-31 también se generaba des-octa insulina en esta mezcla de reacción. Pero cuando se trató el precursor no conjugado con tripsina, la proteasa escindía preferentemente el resto de lisina B-29 del extremo C para generar des-treonina Insulina. El perfil cromatográfico al final de la reacción es el mismo tanto en presencia como en ausencia de cualquier disolvente en la mezcla de reacción. Se observó que la presencia de disolvente enlentecía la velocidad de la reacción.

**Ejemplo 4B**

40 En la siguiente fase de las condiciones experimentales, se llevaron a cabo las reacciones añadiendo tripsina y carboxipeptidasa B juntas en la mezcla de reacción del precursor individual.

45 La concentración del precursor era en general aproximadamente de 5 a 50 g/l. La reacción se llevó a cabo a un pH de aproximadamente 5 a 12, preferentemente a un pH de aproximadamente 8 a 10. La temperatura de la reacción era aproximadamente de 0-40 °C, preferentemente aproximadamente de 2-25 °C. se utilizó trishidroximetilaminometano (TRIS) u otros sistemas tampón con diferentes fuerzas iónicas para mantener el pH necesario. El tiempo de reacción era variable y le afectaban otras condiciones de la reacción. Se continuó la reacción hasta que la pureza del producto empezaba a disminuir debido a la hidrólisis del producto. En general, duraba aproximadamente de 30 minutos a 24 horas y en la mayoría de los casos aproximadamente de 4 a 10 horas.

50 La concentración de la enzima se determinó dependiendo de la concentración de sustratos y la actividad enzimática. Por ejemplo, se utilizó preferentemente tripsina cristalina disponible en el mercado con una concentración de aproximadamente 10 a 100 mg/l.

**Ejemplo 4B (I)**

60 Se disolvieron 4 g de precursor cristalizado en 20 ml de solución TRIS 1 M. La concentración de producto de la solución se mantuvo a 5 mg/ml y la concentración de TRIS se mantuvo a 0,6 M por adición. Se tomaron alícuotas de ciertas cantidades ajustando el pH de la mezcla de reacción con NaOH 2,5 N o ácido acético Glacial 2 N. Se prepararon alícuotas de la mezcla de reacción a pH de 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0. Se pasó 1 ml de cada alícuota de esta mezcla de reacción a cada tubo como una mezcla de reacción individual a diferentes concentraciones. Se llevó a cabo la reacción en todas las muestras añadiendo tripsina y carboxipeptidasa B juntas con diferentes concentraciones. Los diferentes parámetros que se variaron se han tabulado.

65

Parámetros constantes:

- Concentración del producto 5 g/l
- Concentración del tampón TRIS 0,6 M

5

Parámetros variables:

- Concentración de tripsina: 25-500 mg/l
- Concentración de carboxipeptidasa: 10-30 mg/l
- pH: 7,0-9,0

10

Concentración del precursor (g/l)	Concentración de Tris (M)	Concentración de Tripsina mg/l	Concentración de Carboxipeptidasa B (mg/l)	pH	Rendimiento (%)
5	0,6	500	10	7,0	53
				8,0	66
				9,0	17,5
			30	7,0	54
				8,0	64
				9,0	16
		200	10	7,0	51
				8,0	59
				9,0	24
			30	7,0	28
				8,0	65
				9,0	64
		50	10	7,5	44
				8,0	68
				8,5	75
			30	7,5	45
				8,0	63
				8,5	66
		25	10	7,5	31
				8,0	49
				8,5	61
			30	7,5	31
				8,0	49
				8,5	62

**Resultados**

15 Se observó que cuando la tripsina y la carboxipeptidasa se añadieron juntas en la mezcla de reacción, no se observaba la formación de la forma des-octapéptido ni des-treonina. Al final de la reacción el producto principal en la reacción es Aspart. La pureza y el rendimiento del Aspart generado varían con la condición individual de reacción. El mejor rendimiento de un 75 % de Aspart se observó con una concentración de tripsina de 50 mg/l, concentración de carboxipeptidasa de 10 mg/l y un pH de 8,5.

20

**Ejemplo 4B (II)**

Se disolvieron 5 g del precursor de Lispro cristalizado en 25 ml de solución TRIS 1 M. La concentración de producto en la solución se mantuvo a 5 mg/ml y la concentración de TRIS se mantuvo a 0,6 M por adición. Se tomaron alícuotas de ciertas cantidades ajustando el pH de la mezcla de reacción con NaOH 2,5 N o ácido acético Glacial 2 N. Se prepararon alícuotas de la mezcla de reacción a pH de 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0. Se pasó 1 ml de cada alícuota de esta mezcla de reacción a cada tubo como y se marcaron como muestra A, B, C, etc. Se llevó a cabo la reacción en todas las muestras añadiendo tripsina y carboxipeptidasa B juntas con diferentes concentraciones. Las diferentes condiciones se han tabulado.

30

Parámetros constantes:

- Concentración del producto 5 g/l
- Concentración del tampón TRIS 0,6 M

35

## ES 2 570 937 T3

Parámetros variables:

- Concentración de tripsina: 25-200 mg/l
- Concentración de carboxipeptidasa: 10-30 mg/l
- pH: 7,0-9,0

5

Concentración del precursor (g/l)	Concentración de Tris (M)	Concentración de Tripsina mg/l	Concentración de Carboxipeptidasa B (mg/l)	pH	Rendimiento (%)
5	0,6	200	10	7,0	33
				7,5	49
				8,0	62
				8,5	65
				9,0	29
			30	7,0	52
				7,5	55
				8,0	61
				8,5	64
				9,0	26
		100	10	7,0	11
				7,5	34
				8,0	55
				8,5	59
				9,0	31
			30	7,0	24
				7,5	41
				8,0	54
				8,5	66
				9,0	34
		50	10	7,0	21
				7,5	46
				8,0	66
				8,5	78
				9,0	62
			30	7,0	38
				7,5	55
				8,0	64
8,5	71				
9,0	65				
25	10	7,0	13		
		7,5	25		
		8,0	41		
		8,5	44		
		9,0	51		
	30	7,0	22		
		7,5	25		
		8,0	33		
		8,5	46		
		9,0	55		

### Resultados

- 10 Se observó que cuando se añadían juntas tripsina y carboxipeptidasa en la mezcla de reacción, no se observaba la formación de la forma des-octapéptido ni des-treonina. El mejor rendimiento del 78 % de Lispro se observó con una concentración de tripsina de 50 mg/l, concentración de carboxipeptidasa de 10 mg/l y un pH de 8,5.

**Ejemplo 4B (III)**

Se disolvieron 5 g del precursor de Glulisina cristalizado en 25 ml de solución TRIS 1 M. La concentración de producto en la solución se mantuvo a 5 mg/ml y la concentración de TRIS se mantuvo a 0,6 M por adición. Se tomaron alícuotas de ciertas cantidades ajustando el pH de la mezcla de reacción con NaOH 2,5 N o ácido acético Glacial 2 N. Se prepararon alícuotas de la mezcla de reacción a pH de 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0. Se pasó 1 ml de cada alícuota de esta mezcla de reacción a cada tubo como y se marcaron como muestra A, B, C, etc. Se llevó a cabo la reacción en todas las muestras añadiendo tripsina y carboxipeptidasa B juntas con diferentes concentraciones. Las diferentes condiciones se han tabulado.

Parámetros constantes:

- Concentración del producto 5 g/l
- Concentración del tampón TRIS 0,6 M

Parámetros variables:

- Concentración de tripsina: 25-200 mg/l
- Concentración de carboxipeptidasa: 10-30 mg/l
- pH: 7,0-9,0

Concentración del precursor (g/l)	Concentración de Tris (M)	Concentración de Tripsina mg/l	Concentración de Carboxipeptidasa B (mg/l)	pH	Rendimiento (%)
5	0,6	200	10	7,0	29
				7,5	56
				8,0	49
				8,5	61
				9,0	49
			30	7,0	44
				7,5	59
				8,0	42
				8,5	29
				9,0	21
		100	10	7,0	25
				7,5	33
				8,0	47
				8,5	61
				9,0	64
			30	7,0	41
				7,5	62
				8,0	65
				8,5	71
				9,0	49
		50	10	7,0	28
				7,5	46
				8,0	68
				8,5	78
9,0	70				
30	7,0		36		
	7,5		44		
	8,0		59		
	8,5		69		
	9,0		72		
25	10	7,0	14		
		7,5	29		
		8,0	35		
		8,5	49		

Concentración del precursor (g/l)	Concentración de Tris (M)	Concentración de Tripsina mg/l	Concentración de Carboxipeptidasa B (mg/l)	pH	Rendimiento (%)
				9,0	51
				7,0	24
				7,5	35
			30	8,0	44
				8,5	64
				9,0	68

## Resultados

5 El mejor rendimiento del 78 % de Glulicina se observó con una concentración de tripsina de 50 mg/l, concentración de carboxipeptidasa de 10 mg/l y un pH de 8,5.

## Ejemplo 5

### Precipitación final

10 Se llevaron a cabo las mejores condiciones que se han explicado anteriormente para las reacciones enzimáticas de los correspondientes precursores de Lispro, Aspart y Glulicina.

15 La mezcla de reacción enzimática final individual se precipitó añadiendo un tampón de ácido cítrico y solución de  $ZnCl_2$  y ajustando el pH. (El tampón de ácido cítrico comprende 15,4 g/l de ácido cítrico (anhidro), 90 g/l de tampón de ortofosfato di-sódico (anhidro), pH ajustado a 6,3 + 0,1, con ácido o-fosfórico). La precipitación se hizo con un intervalo de pH de 4,0 a 10,0, preferentemente de 6,0 a 8,0. La concentración del producto era preferentemente de 1-10 g/l. Tras la precipitación, se separó el producto del sobrenadante transparente centrifugando o decantando el sobrenadante sin perturbar el precipitado asentado. El precipitado así obtenido se lavó con agua fría para retirar los iones presentes no unidos.

20 El rendimiento del proceso de precipitación es del 85-90 %.

25 La descripción y ejemplos se han dado solo para facilitar la comprensión. No se deberían entender limitaciones innecesarias de los mismos, ya que serán obvias modificaciones para los expertos en la técnica quienes reconocerán que la invención se puede practicar con modificaciones y variaciones dentro del espíritu de las reivindicaciones adjuntas.

30 Los medios expuestos en el presente documento superan los problemas que se han resaltado anteriormente y avanzan la técnica proporcionando un método de reacción que inhibe la pérdida de producto y facilita la operación respecto a otros métodos conocidos. Este sistema reduce los costes utilizando las metodologías descritas para conseguir un determinado aumento de eficacia de conversión con respecto a cualquiera de los procesos conocidos, superando de esta manera las principales desventajas que se conocen en este campo de la técnica.

## 35 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Biocon Ltd Hazra, Partha

40 <120> Proceso para la preparación de compuestos de insulina

<130> 200608

<160> 9

45 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 67

<212> PRT

50 <213> *Pichia pastoris*

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(67)

55

<400> 1

ES 2 570 937 T3

Glu Glu Ala Glu Ala Glu Ala Glu Pro Arg Phe Val Asn Gln His Leu  
1 5 10 15

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

Gly Phe Phe Tyr Thr Asp Lys Thr Arg Asp Ala Asp Asp Arg Gly Ile  
35 40 45

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

Tyr Cys Asn  
65

5 <210> 2  
<211> 61  
<212> PRT  
<213> *Pichia pastoris*

10 <220>  
<221> PÉPTIDO  
<222> (1)..(61)  
<400> 2

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

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

Lys Thr Arg Asp Ala Asp Asp 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

15 <210> 3  
<211> 57  
<212> PRT  
<213> *Pichia pastoris*

20 <220>  
<221> PÉPTIDO  
<222> (1)..(57)  
25 <400> 3

ES 2 570 937 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 Asp Lys Thr Arg Asp  
20 25 30

Ala Asp Asp 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

5 <210> 4  
<211> 67  
<212> PRT  
<213> *Pichia pastoris*

10 <220>  
<221> PÉPTIDO  
<222> (1)..(67)

<400> 4

Glu Glu Ala Glu Ala Glu Ala Glu Pro Arg Phe Val Asn Gln His Leu  
1 5 10 15

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

Gly Phe Phe Tyr Thr Lys Pro Thr Arg Asp Ala Asp Asp Arg Gly Ile  
35 40 45

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

Tyr Cys Asn  
65

15 <210> 5  
<211> 61  
<212> PRT  
<213> *Pichia pastoris*

20 <220>  
<221> PÉPTIDO  
<222> (1)..(61)

25 <400> 5

ES 2 570 937 T3

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

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

Pro Thr Arg Asp Ala Asp Asp 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

5 <210> 6  
<211> 57  
<212> PRT  
<213> *Pichia pastoris*

10 <220>  
<221> PÉPTIDO  
<222> (1)..(57)

<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 Lys Pro Thr Arg Asp  
          20                    25                    30

Ala Asp Asp 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> 7  
<211> 67  
<212> PRT  
<213> *Pichia pastoris*

20 <220>  
<221> PÉPTIDO  
<222> (1)..(67)

25 <400> 7

ES 2 570 937 T3

Glu Glu Ala Glu Ala Glu Ala Glu Pro Arg Phe Val Lys Gln His Leu  
1 5 10 15

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

Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Glu Thr Arg Asp Ala Asp Asp Arg Gly Ile  
35 40 45

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

Tyr Cys Asn  
65

5 <210> 8  
<211> 61  
<212> PRT  
<213> *Pichia pastoris*

10 <220>  
<221> PÉPTIDO  
<222> (1)..(61)  
<400> 8

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

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

Glu Thr Arg Asp Ala Asp Asp 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

15 <210> 9  
<211> 57  
<212> PRT  
<213> *Pichia pastoris*

20 <220>  
<221> PÉPTIDO  
<222> (1)..(57)

25 <400> 9

ES 2 570 937 T3

Phe Val Lys 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 Glu Thr Arg Asp  
          20                    25                    30

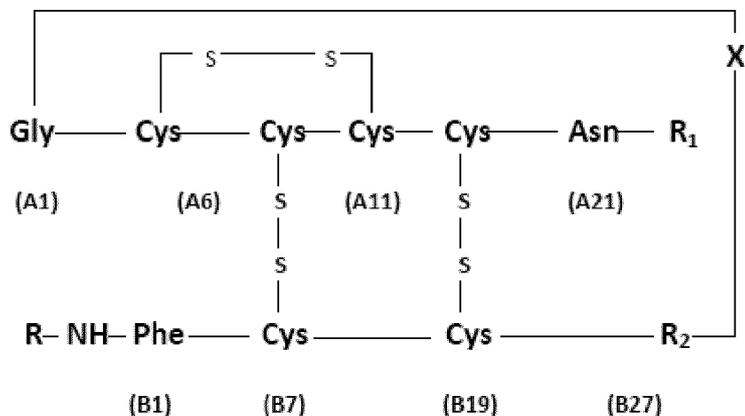
Ala Asp Asp Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser  
          35                    40                    45

Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn  
          50                    55

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para preparar compuestos de insulina y sus análogos o derivados a partir de sus correspondientes precursores de insulina, que se representan por la fórmula:

5



donde,

10 R es hidrógeno o un resto de aminoácido escindible química o enzimáticamente o un péptido escindible química o enzimáticamente que comprende al menos dos restos de aminoácido,

R<sub>1</sub> es OH o un resto de aminoácido, o Y<sub>1</sub>-Y<sub>2</sub> en el que Y es un resto de aminoácido,

los restos A1 a A21 se corresponden con la cadena A de la insulina y los restos B1 a B27 se corresponden con la cadena B de la insulina, incluyendo la sustitución, delección y/o adiciones de aminoácidos de las mismas,

15 R<sub>2</sub> es Z<sub>1</sub>-Z<sub>2</sub> en el que Z<sub>1</sub> se selecciona de entre Pro, Lys, Asp y Z<sub>2</sub> se selecciona de entre Lys o Pro o Glu o Z<sub>1</sub>-Z<sub>2</sub>-Z<sub>3</sub>

en donde Z<sub>1</sub> se selecciona de entre Pro, Lys, Asp y Z<sub>2</sub> se selecciona de entre Lys o Pro o Glu y Z<sub>3</sub> es treonina o un resto peptídico de al menos tres restos de aminoácido, con la condición de que el aminoácido que corresponde a

15 B30 sea treonina, y X es un polipéptido que conecta la cadena A a la cadena B y que se puede escindir enzimáticamente sin afectar ni a la cadena A ni a la cadena B, que tiene al menos dos aminoácidos, en el que el

primero y el último aminoácido son Lisina o Arginina, dichos precursores se definen por una secuencia de

20 aminoácidos que es al menos un 85 % homóloga a las secuencias de aminoácidos que se exponen en las SEQ ID

NO 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9,

que comprende el tratamiento de dicho precursor con tripsina y carboxipeptidasa que se utilizan en combinación y

de manera concurrente, en donde la reacción se lleva a cabo en un intervalo de pH de 8 a 9, y en donde la

proporción de la concentración relativa de tripsina con respecto a carboxipeptidasa es de 5:1 a 50:1 y la cantidad

25 relativa de tripsina con respecto a la del precursor de insulina es de 1:10 a 1:100.

2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cantidad relativa de tripsina con respecto a la del precursor de insulina es de 1:100.

30 3. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que la reacción se lleva a cabo en un intervalo de pH de 8 a 8,5.

4. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cantidad relativa de carboxipeptidasa con respecto a la del precursor de insulina es de 1:500.

35 5. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que proporción de la concentración relativa de tripsina con respecto a carboxipeptidasa es de 5:1.

6. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la concentración de tripsina que se utiliza para la reacción de conversión es de 0,025 mg/ml a 0,5 mg/ml.

7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la concentración de carboxipeptidasa que se utiliza para la reacción de conversión es de 0,01 mg/ml a 0,03 mg/ml.

45 8. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el precursor está en forma líquida o cristalina.

9. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la reacción de conversión se lleva a cabo a una temperatura que varía desde 2 °C a 40 °C.

50 10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la duración de la conversión enzimática es de 4 horas a 10 horas.

11. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medio de reacción contiene al menos un 30 % de agua o un disolvente miscible en agua.
- 5 12. El proceso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el disolvente miscible en agua es metanol, etanol, acetona o N,N-dimetilformamida.
13. El proceso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el medio de reacción comprende además una sal que actúa como un agente tamponador, en donde la concentración de sal es opcionalmente de 0,5 M a 1 M.
- 10 14. El proceso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la sal es TRIS, etilendiamina, trietanolamina, glicina o HEPES (ácido N-2-hidroxi-etilpiperacina-N'-2- etanosulfónico).
- 15 15. Un proceso para la obtención de una insulina o su análogo o derivados de la misma a partir de sus respectivos precursores equivalentes, dichos precursores se definen por una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 % homóloga a las secuencias de aminoácidos que se exponen en las SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, que comprende llevar a cabo sucesivamente las siguientes etapas en el siguiente orden secuencial
- 20 (a) Disolver una cantidad óptima del precursor de insulina o de un derivado de insulina en una solución tampón,  
(b) Preparar distintas alícuotas de la solución del precursor a un pH que varía de 8,0 a 9,0,  
(c) Introducir las enzimas tripsina y carboxipeptidasa de manera concurrente con una proporción de la concentración relativa de 5:1 a 50:1 en las distintas alícuotas que se preparan en la Etapa (b) e incubar la mezcla durante 4-10 horas, y  
(d) Precipitar el producto insulínico deseado mediante la adición de un tampón de ácido cítrico y ZnCl<sub>2</sub>.