

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 418**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/62** (2006.01)

**A61K 38/28** (2006.01)

**C12N 15/17** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.11.2013 PCT/US2013/068585**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14071405**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2013 E 13850542 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2914620**

54 Título: **Análogos de insulina de cadena sencilla de acción prolongada**

30 Prioridad:

**05.11.2012 US 201261722350 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.12.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WEISS, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 694 418 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**

Análogos de insulina de cadena sencilla de acción prolongada

5 Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional pendiente de Estados Unidos No. 61/722,350, presentada el 5 de noviembre de 2012.

10 Declaración sobre investigación o desarrollo con patrocinio federal

Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno bajo acuerdos de cooperación otorgados por los Institutos Nacionales de la Salud con los números de concesión DK040949 y DK074176. El gobierno de los Estados Unidos puede tener ciertos derechos sobre la invención.

15 Antecedentes de la invención

Esta invención se relaciona con análogos de hormonas polipeptídicas que exhiben propiedades farmacéuticas potenciadas, tales como estabilidad termodinámica aumentada, resistencia aumentada a fibrilación térmica por encima de la temperatura ambiente, mitogenicidad disminuida y/o propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas alteradas, es decir, que confieren una duración de acción más prolongada o más rápida duración de la acción en relación con las formulaciones solubles de la hormona humana de tipo salvaje correspondiente. Más particularmente, esta invención se relaciona con análogos de insulina que consisten en una cadena sencilla polipeptídica que contiene una novedosa clase de dominios de conexión (C) escorzados entre los dominios A y B. Residuos de longitud 6-11, los dominios C de esta clase consisten en un elemento ácido del terminal N y un segmento del terminal C derivado del dominio de conexión de IGF-II humano. Los análogos de insulina de cadena sencilla de la presente invención pueden contener opcionalmente sustituciones de aminoácidos estándar o no estándar en otros sitios en los dominios A o B.

La manipulación de proteínas no estándar, incluidos los agentes terapéuticos y las vacunas, puede tener amplios beneficios médicos y sociales. Las proteínas de origen natural, como las codificadas en los genomas de los seres humanos, otros mamíferos, organismos vertebrados, organismos invertebrados o células eucariotas en general, confieren a menudo múltiples actividades biológicas. Un beneficio de las proteínas derivadas sería lograr una actividad selectiva, como la disminución del enlace a receptores celulares homólogos asociados con un efecto secundario no deseado y desfavorable, como la promoción del crecimiento de células cancerosas. Otro ejemplo más de un beneficio social sería la resistencia aumentada a la degradación a o por encima de la temperatura ambiente, facilitando el transporte, distribución y uso. La insulina proporciona un ejemplo de una proteína terapéutica. La insulina humana de tipo salvaje y las moléculas de insulina codificadas en los genomas de otros mamíferos se enlazan a receptores de insulina en múltiples órganos y diversos tipos de células, independientemente de la isoforma del receptor generada por modos alternativos de empalme de ARN o por patrones alternativos de glicosilación postraducción. La insulina de tipo salvaje también se enlaza con menor afinidad al receptor homólogo del factor de crecimiento similar a la insulina de Tipo 1 (IGF-1R).

Un ejemplo de un beneficio médico adicional sería la optimización de la estabilidad de una proteína hacia el despliegue o la degradación. Dicho beneficio social sería potenciado por la manipulación de proteínas más refractarias que las proteínas estándar con respecto a la degradación a temperatura ambiente o por encima de ella, para su uso en regiones del mundo en desarrollo donde la electricidad y la refrigeración no están disponibles de manera consistente. Los análogos de insulina que consisten en una cadena sencilla polipeptídica y que opcionalmente contienen sustituciones de aminoácidos no estándar, pueden mostrar propiedades superiores con respecto a la resistencia a la degradación térmica o mitogenicidad disminuida. El desafío planteado por su degradación física se profundiza por la epidemia pendiente de diabetes mellitus en África y Asia. Debido a que la fibrilación representa la principal ruta de degradación por encima de la temperatura ambiente, el diseño de formulaciones resistentes a la fibrilación puede mejorar la seguridad y la eficacia de la terapia de reemplazo de insulina en tales regiones atacadas.

La administración de insulina se ha establecido durante mucho tiempo como un tratamiento para la diabetes mellitus. Un objetivo importante de la terapia convencional de reemplazo de insulina en pacientes con diabetes mellitus es el control estricto de la concentración de glucosa en la sangre para evitar desviaciones por encima o por debajo del intervalo normal característico de los sujetos humanos sanos. Desviaciones por debajo del intervalo normal se asocian con síntomas adrenérgicos o neuroglucopépicos inmediatos, que en episodios graves conducen a convulsiones, coma y muerte. Desviaciones por encima del intervalo normal se asocian con un mayor riesgo a largo plazo de enfermedad microvascular, incluyendo retinopatía, ceguera y fallo renal.

La insulina es una pequeña proteína globular que desempeña un papel 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 la célula β pancreática como un hexámero estabilizado con Zn<sup>2+</sup>, pero funciona como un monómero libre de Zn<sup>2+</sup> en el torrente sanguíneo. La insulina es el producto de un precursor de cadena sencilla, proinsulina, en la que una región de conexión (35 residuos) une el residuo del terminal C de la cadena B (residuo B30)

al residuo del terminal N de la cadena A (Figura 1A). Una variedad de evidencia indica que consiste en un núcleo similar a la insulina y un péptido de conexión desordenado (Figura 1B). Se cree que la formación de tres puentes disulfuro específicos (A6-A11, A7-B7 y A20-B19; Figuras 1A y 1B) está acoplada a un plegamiento oxidativo de proinsulina en el retículo endoplásmico rugoso (ER). La proinsulina se ensambla para formar hexámeros solubles coordinados con  $Zn^{2+}$  poco después de la salida del ER al aparato de Golgi. La digestión endoproteolítica y la conversión a insulina se producen en gránulos secretorios inmaduros seguidos de condensación morfológica. Las matrices cristalinas de hexámeros de insulina de zinc dentro de gránulos de almacenamiento maduros se han visualizado mediante microscopía electrónica (EM). La secuencia de la insulina se muestra en forma esquemática en la Figura 1C. Los residuos individuales están indicados por la identidad del aminoácido (generalmente utilizando un código estándar de tres letras), la cadena y la posición de la secuencia (generalmente como un superíndice). Pertinente a la presente invención es la invención de nuevos dominios C escorzados de longitud 6-11 residuos en lugar del dominio C de tipo salvaje de 36 residuos, característicos de la proinsulina humana.

La fibrilación, que es una preocupación importante en la fabricación, almacenamiento y uso de la insulina y los análogos de la insulina para el tratamiento de la diabetes mellitus, se mejora con temperatura más alta, un menor pH, agitación o la presencia de urea, guanidina, codisolvente de etanol, o superficies hidrófobas. Las regulaciones actuales de fármacos de los Estados Unidos, exigen que se deseche la insulina si la fibrilación se produce a un nivel del uno por ciento o más. Debido a que la fibrilación se potencia a temperaturas más altas, los pacientes con diabetes mellitus deben mantener la insulina refrigerada, de manera óptima, antes de usarla. La fibrilación de insulina o un análogo de insulina puede ser una preocupación particular para los pacientes que utilizan una bomba de insulina externa, en la que se inyectan pequeñas cantidades de insulina o análogo de insulina en el cuerpo del paciente a intervalos regulares. En tal uso, la insulina o el análogo de insulina no se mantienen refrigerados dentro del aparato de la bomba, y la fibrilación de la insulina puede provocar el bloqueo del catéter utilizado para inyectar en el cuerpo la insulina o el análogo de la insulina, lo que puede resultar potencialmente en fluctuaciones impredecibles en los niveles de glucosa en la sangre o incluso hiperglucemia peligrosa. La insulina muestra un aumento en la tasa de degradación de 10 veces o más por cada incremento de 10 °C en la temperatura por encima de 25 °C; en consecuencia, las pautas exigen el almacenamiento a temperaturas <30 °C y preferiblemente con refrigeración. La fibrilación de los análogos de insulina basal formulados como soluciones solubles a pH inferior a 5 (como Lantus® (Sanofi-Aventis), que contiene una solución no regulada de insulina glargina e iones de zinc a pH 4,0) también puede limitar su vida útil debido a la degradación física en o por encima de la temperatura ambiente; las condiciones ácidas empleadas en tales formulaciones deterioran el auto ensamblaje de la insulina y debilitan el enlace de los iones de zinc, reduciendo la medida en que los análogos de la insulina pueden protegerse mediante el secuestro dentro de los ensamblajes de la proteína de zinc.

La insulina es susceptible a la degradación química, implicando la ruptura de los enlaces químicos con la pérdida de la reorganización de los átomos dentro de la molécula o la formación de enlaces químicos entre diferentes moléculas de insulina. Dichos cambios en los enlaces químicos generalmente están mediados en el estado desplegado de la proteína, por lo que las modificaciones de la insulina que aumentan su estabilidad termodinámica también es probable que retrasen o prevengan la degradación química. La insulina también es susceptible a la degradación física. La presente teoría de la fibrilación de proteínas postula que el mecanismo de la fibrilación procede a través de un estado intermedio parcialmente plegado, 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 parcialmente plegado y puedan o no aumentar (o disminuir) la barrera de energía libre entre el estado nativo y el estado intermedio. Por lo tanto, la teoría actual indica que la tendencia de una sustitución de aminoácidos dada en la molécula de insulina de dos cadenas para aumentar o disminuir el riesgo de fibrilación es altamente impredecible. Los modelos de la estructura de la molécula de insulina prevén un despliegue casi completo de las tres hélices alfa (como se ve en el estado nativo) con la formación de disposiciones paralelas de láminas beta, apilamiento sucesivo de cadenas B y apilamiento sucesivo de cadenas A; se conserva el emparejamiento de disulfuro nativo entre cadenas y dentro de la cadena A. Estas láminas beta entrecruzadas paralelas requieren una separación sustancial entre el terminal N de la cadena A y el terminal C de la cadena B (> 30 Å), terminales que normalmente se encuentran en cercana proximidad en el estado nativo del monómero de insulina (<10 Å). La marcada resistencia a la fibrilación de análogos de insulina de cadena sencilla con dominios C escorzados es conocida en la técnica y se cree que refleja una incompatibilidad topológica entre la estructura extendida de láminas beta entrecruzadas paralelas en un protofilamento de insulina y la estructura de una insulina de cadena sencilla análoga con el emparejamiento de disulfuro nativo en el que el dominio C escorzado restringe la distancia entre el terminal N de la cadena A y el terminal C de la cadena B para que sea desfavorable en un protofilamento.

Por lo tanto, los análogos de insulina de cadena sencilla pueden, por lo tanto, parecer proporcionar una metodología favorable hacia el diseño de análogos de insulina resistentes a la fibrilación. Sin embargo, en el pasado, tales análogos han exhibido actividades bajas, que pueden ser del 1% o menos en relación con la insulina humana de tipo salvaje. (Aunque Lee, H.C., et al. (2000) afirmaron que los análogos de insulina de cadena sencilla con dominios A y B de tipo salvaje de longitud de 57 residuos o 58 residuos exhiben afinidades de enlace al receptor en el intervalo de 30-40% con respecto a insulina humana, esta publicación se retiró en 2009 debido a una falta de conducta científica; en nuestras manos, los análogos divulgados por Lee, H.C. et al muestran afinidades relativas de menos del 1%.) La afinidad se puede restaurar en parte mediante la introducción de AspB10, una sustitución conocida en la técnica por potenciar la afinidad de la insulina por el receptor de insulina. Anteriormente hemos descrito una insulina de cadena

sencilla de 57 residuos que contiene AspB10 con el enlazador de dominio C GGGPRR. Sin embargo, el uso de dominios C escorzados junto con tales sustituciones en el dominio A y/o el dominio B puede sesgar la proporción de enlace hacia una proporción mejorada de enlace a IR-A en relación con IR-B como se divulga en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 12/989,399, titulada "Análogos de la insulina específicos de isoformas". Se describió un análogo de insulina de cadena sencilla con alta afinidad de enlace al receptor en el que el dominio C escorzado era el dominio C de 12 residuos del factor I de crecimiento tipo insulina (IGF-I; secuencia YGSSRRAPQT; SEQ ID NO: 12), produciendo una proteína quimérica. Sin embargo, tales moléculas quiméricas exhiben afinidades relativas y absolutas potenciadas para IGF-1R. Dichas alteraciones, como las asociadas con AspB10 y otras sustituciones en la posición B10, han generado una gran preocupación debido a la posible asociación con un mayor riesgo de cáncer en animales o pacientes humanos que toman dichos análogos. Esta preocupación está especialmente marcada con respecto a los análogos de insulina basales, es decir, aquellos diseñados para la administración una vez al día con un perfil de absorción de insulina de 12-24 horas desde un depósito subcutáneo y un perfil de acción de insulina de 12-24 horas.

La presente invención fue motivada por las necesidades médicas y sociales para diseñar un análogo de insulina basal de cadena sencilla, de administración una vez al día, que combina (i) resistencia a la degradación con (ii) potencia hipoglucémica in vivo sustancial con (iii) reducción de enlace entrecruzado a IGF-1R y (iv) una proporción de afinidades para las isoformas A y B del receptor de insulina que es similar a la de la insulina humana de tipo salvaje. El último objetivo reflejaba las funciones pleitrópicas y los tejidos diana de la insulina en el cuerpo humano. El paradigma clásico de la acción de la insulina se ha centrado en las funciones específicas de los adipocitos en los órganos (donde la insulina regula el almacenamiento de combustibles en forma de gotitas de triglicéridos), el hígado (donde la insulina regula la producción de glucosa a través de la gluconeogénesis y regula el almacenamiento de combustible en la forma de glucógeno) y músculo (donde la insulina regula la entrada de glucosa del torrente sanguíneo a través del tráfico a la membrana plasmática de GLUT4) como los tejidos diana de la hormona. Sin embargo, investigaciones recientes han revelado que la insulina tiene funciones fisiológicas en otros órganos y tejidos, como en el hipotálamo del cerebro, en el que los circuitos neurales sensibles a la insulina influyen en el metabolismo hepático, el apetito, la saciedad y posiblemente el punto fijado para el peso corporal ideal. Aunque el genoma humano contiene un único gen que codifica el receptor de insulina, una proteína transmembrana que contiene un dominio citoplasmático de tirosina-quinasa, su ARN premensajero sufre un empalme alternativo para producir distintas isoformas A y B, cuya distribución fraccional puede diferir de órgano a órgano y cuyas funciones de señalización pueden diferir dentro de las mismas células.

Las isoformas A y B (designadas como IR-A e IR-B) difieren en la afinidad por la insulina (la afinidad por IR-A es dos veces mayor que la afinidad por IR-B), y solo IR-A (que carece de un dominio peptídico en la subunidad alfa codificada por el exón 11) se enlaza a IGF-1R con alta afinidad. Aunque en la técnica se conocen análogos de insulina que difieren de la insulina de tipo salvaje en la proporción de afinidades respectivas para IR-A e IR-B, es posible que la seguridad y la eficacia de la terapia de reemplazo de insulina requiera óptimamente la administración de un análogo de insulina cuya ración de afinidades por IR-A e IR-B es similar a la de la insulina de tipo salvaje. El enlace reducido de un análogo de insulina a IR-A en relación con IR-A, por ejemplo, podría llevar a una disminución relativa o absoluta en el alcance de la señalización de insulina en el cerebro y en los glóbulos blancos, que expresan un predominio de receptores de IR-A. De manera similar, el enlace reducido de un análogo de insulina a IR-B en relación con IR-B, por ejemplo, podría conducir a una disminución relativa o absoluta en la extensión de la señalización de la insulina en los órganos diana clásicos que exhiben predominio de receptores de IR-B. Dichas afinidades de enlace sesgadas también pueden perturbar la función celular de las células diana (como las células beta pancreáticas) en las que se cree que la señalización de la insulina mediada por IR-A y la señalización de la insulina mediada por IR-B median en las diferentes funciones celulares que cada una contribuye a viabilidad de las células beta y función secretora. Debido a que las células cancerosas pueden presentar una sobreexpresión de IR-A, el tratamiento de un paciente con un análogo que muestra una potencia mejorada de la señalización de IR-A (en relación con la insulina humana de tipo salvaje) puede representar un riesgo de aumento del crecimiento del tumor. La señalización mitogénica por los análogos de la insulina en las células cancerosas puede estar mediada por análogos que muestran un enlace entrecruzado potenciado con el receptor mitogénico IGF-1R (en relación con la insulina humana de tipo salvaje) o por los análogos que muestran un enlace potenciado a IR-A (en relación con la insulina humana de tipo salvaje) o por análogos que exhiben tiempos de residencia prolongados en IGF-1R, IR-A o IR-B (en relación con la insulina humana de tipo salvaje). Residuos básicos cerca del terminal C de la cadena B o del dominio B (B28-B30), dentro de una extensión del terminal C (B31 o B32), o en las posiciones equivalentes de un análogo de insulina de cadena sencilla (C1 y C2) puede potenciar el enlace entrecruzado de un análogo de insulina a IGF-1R y por lo tanto potenciar la mitogenicidad.

Sería deseable, por lo tanto, inventar un análogo de insulina de cadena sencilla con mitogenicidad insignificante y enlace entrecruzado al IGF-1R que, sin embargo, retenga al menos una parte del efecto reductor de la glucosa de la insulina de tipo salvaje. Más generalmente, existe la necesidad de un análogo de insulina que muestre una estabilidad termodinámica aumentada y una mayor resistencia a la fibrilación por encima de la temperatura ambiente, mientras que exhibe una proporción de afinidades para las isoformas A y B del receptor de insulina, y por lo tanto, por implicación al menos un subconjunto de las múltiples actividades biológicas específicas de los órganos, de la insulina de tipo salvaje.

## Sumario de la invención

La presente invención proporciona un análogo de insulina de cadena sencilla que comprende las secuencias de una cualquiera de las SEQ ID NOS: 4-10.

5 La presente invención también proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica un análogo de insulina de cadena sencilla de cualquiera de las SEQ ID NOS: 4-10.

10 La presente invención también proporciona un análogo de insulina de cadena sencilla o una sal fisiológicamente aceptable del mismo que comprende la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID Nos: 4-10, para uso en un método para reducir el azúcar en sangre de un paciente.

15 Es, por lo tanto, un aspecto de la presente invención proporcionar análogos de insulina de cadena sencilla que proporcionan una disminución del enlace entrecruzado a IGF-1R y una duración prolongada de acción mientras se retiene al menos una parte de la actividad reductora de glucosa de la insulina de tipo salvaje en roedores tras inyección subcutánea. Los análogos de la presente invención contienen histidina en la posición B10 y, por lo tanto, evitan las preocupaciones relacionadas con la carcinogénesis que está asociada con una sustitución ácida (ácido aspártico o ácido glutámico) en esta posición. Es un aspecto adicional de la presente invención que las afinidades in vitro absolutas del análogo de insulina de cadena sencilla para IR-A e IR-B están en el intervalo del 5 al 100% con respecto a la insulina humana de tipo salvaje y, por lo tanto, es poco probable que exhiban tiempos de residencia prolongada en el complejo hormona-receptor. La presente invención aborda la utilidad de los análogos de insulina de cadena sencilla que muestran una proporción de afinidades de enlace para IR-A e IR-B que es similar a la de la insulina humana de tipo salvaje.

25 La combinación anterior de características se confiere mediante un nuevo diseño de dominio C, en el que un polipéptido de conexión escorzado (longitud 6-11 residuos) contiene un elemento ácido del terminal N (residuos C1 y C2), una junta o bisagra flexible (C3), y segmento del terminal C derivado del dominio C de IGF-II (C4-C<sub>n</sub>, donde n= 6, 7, 8, 9, 10 u 11). El elemento ácido del terminal N se diseñó de acuerdo con estudios de análogos de insulina de dos cadenas que contienen cadenas B de 32 residuos en los que se revirtieron las cargas del elemento básico Arg<sup>B31</sup>-Arg<sup>B32</sup> de insulina glargina (Patente de Estados Unidos No. 8,399,407, titulada "Análogos de insulina no estándar". Aunque no se desea estar limitado por la teoría, se

35 prevé que el residuo ácido de dos residuos introduce una repulsión electrostática desfavorable en el enlace del análogo a IGF-1R pero es bien tolerado por las isoformas del receptor de insulina. Además, sin desear estar limitado por la teoría, se prevé además que el segmento del terminal C derivado del IGF-II del dominio C de la presente invención introduce interacciones favorables con las isoformas del receptor de insulina y, por lo tanto, funciona como un elemento auxiliar de enlace al receptor, en lugar de un simple elemento de atadura o espacio.

40 En general, la presente invención proporciona un análogo de insulina de cadena sencilla que comprende un dominio C de la presente invención y una cadena A modificada que contiene sustituciones en la posición A8. La presente invención se refiere, por lo tanto, a una nueva clase de análogos de insulina de cadena sencilla en los que el dominio de conexión (dominio C) tiene una longitud de 6-11 y consta de dos elementos. El elemento del terminal N consiste en los primeros dos residuos (designados C1, C2 y C3, correspondientes a los residuos B31-B33 de una cadena B extendida de insulina) en donde (i) C1 y C2 contienen al menos una cadena lateral ácida y una carga electrostática neta formal a pH 7,4 de -1 o -2 y (ii) C3 proporciona una junta o torcedura flexible según lo proporcionado por la glicina, alanina, prolina o serina. Los ejemplos son, pero no se limitan a, los siguientes segmentos de dipéptidos: EEG, AEG, EAG, EDG, DEG, DDG, ADG, ADG, EEA, AEA, EAA, EDA, DEA, DDA, ADA, ADA, EEP, AEP, EAP, EDP, DEP, DDP, ADP, ADP, EES, AES, EAS, EDS, DES, DDS, ADS o ADS. El elemento del terminal C contiene un segmento peptídico derivado del factor II de crecimiento humano tipo insulina (IGF-II) cuyo dominio C tiene la secuencia SRVSRRSR (SEQ ID NO: 13). Los residuos C4-C<sub>n</sub> (donde n= 6-11) se derivan del dominio C de los fragmentos IGF-II o del terminal C con las secuencias RVSRRSR, VSRRSR, SRRSR, RRSR o RSR. Estos dominios C híbridos, por lo tanto, varían en longitud desde un mínimo de 6 (tres residuos en el elemento del terminal N y tres residuos en el elemento del terminal C) hasta un máximo de 11 (tres residuos en el elemento del terminal N y ocho residuos en el elemento del terminal C). La cadena A contiene una sustitución básica en A8 (lisina, arginina o histidina) y una sustitución en A21 (Gly, Ala o Ser) para evitar la desamidación catalizada por ácido u otros modos de degradación química relacionada con Asn. En un ejemplo, la cadena B también contiene sustituciones Lys<sup>B29</sup>→Arg para evitar la escisión proteolítica específica de Lys en el curso de la biosíntesis en levadura.

60 En otro ejemplo, la presente invención proporciona una serie de moléculas de insulina de cadena sencilla (SCI) con enlazadores de la forma EEGX<sub>n</sub> donde (i) el elemento EE en las posiciones C1 y C2 (opuesta en carga al elemento RR de la insulina glargina, el componente activo de Lantus®) deteriora el enlace entrecruzado de IGF-1R, (ii) G proporciona una bisagra flexible, y (iii) X<sub>n</sub> se deriva del dominio C de IGF-II (secuencia SRVSRRSR; SEQ ID NO: 13). El uso de una atadura derivada de IGF-II proporciona la presencia de múltiples residuos de Arg (que compensan el elemento EE negativo para proporcionar un cambio neto en el punto isoeléctrico) y el papel conjeturado en la potenciación del enlace del receptor IR. El SCI denominado Termalina basal contiene un péptido de conexión de 8

residuos (secuencia EEGSRRSR; SEQ ID NO: 14). Se cree que los dominios C de esta longitud son compatibles con el mecanismo de ajuste inducido en el enlace del receptor.

Breve descripción de las varias vistas de los dibujos

5 La figura 1A es una representación esquemática de la secuencia de proinsulina humana que incluye las cadenas A y B y la región de conexión que se muestra con los sitios de escisión dibásicos que flanquean (círculos rellenos) y péptido C (círculos abiertos).

10 La figura 1B es un modelo estructural de proinsulina, que consiste en una unidad estructural tipo insulina y un péptido de conexión desordenado (línea discontinua).

La figura 1C es una representación esquemática de la secuencia de insulina humana que indica la posición de los residuos B27 y B30 en la cadena B.

15 La figura 2 es un gráfico que muestra los resultados de estudios de enlace al receptor de insulina humana de tipo salvaje y un análogo de insulina de cadena sencilla de la presente invención (SCI-59B). Panel superior, ensayo de desplazamiento competitivo que emplea la isoforma A del receptor de insulina (IR-A). Panel medio, ensayo de desplazamiento competitivo que emplea la isoforma B del receptor de insulina (IR-B). Panel inferior, ensayo de desplazamiento competitivo que emplea el receptor de IGF tipo 1 (IGF-1R). Símbolos: insulina humana (■) y SCI-59 (▲). El análisis de estos datos permite estimar las constantes de disociación hormona-receptor como se proporciona en la Tabla 1.

25 La figura 3 proporciona el espectro 2D-NMR de un análogo de insulina de cadena sencilla de la presente invención (SCI-59B). El espectro se adquirió a pH 3,5 (como en una formulación basal) y 37 °C; el tiempo de mezcla fue de 200 ms y la intensidad de campo de 700 MHz.

La figura 4 es un gráfico que muestra los resultados de las pruebas biológicas de análogos de insulina de dosis media en ratas (20 µg por rata) que se hicieron diabéticas con esteptozotocina. Disminución de la [glucosa] en sangre con el tiempo (minutos): Humalog® (lispro insulina) (■), (SCI-59B; ▲), Lantus® (insulina glargina) (◆) y diluyente (●). Una unidad de cada formulación (como U-100) se inyectó por vía subcutánea en 5 ratas STZ (N= 5); las barras de error indican errores estándar.

35 La figura 5A es un gráfico que muestra los niveles de glucosa en la sangre a lo largo del tiempo en ratas Sprague-Dawley que se hicieron diabéticas con esteptozotocina y se les administró Termalina basal fresca (Tb; ▲), Termalina basal sometida a calor (●) Lantus® fresco (insulina glargina) (◆), Lantus® sometido a calor (insulina glargina) (■), o control de diluyente (×). Las muestras sometidas a calor se agitaron suavemente a 37 °C. La Termalina basal se calentó durante 56 días y el Lantus® durante 12 días.

40 La figura 5B es un gráfico que muestra los niveles de glucosa en sangre a lo largo del tiempo en ratas Sprague-Dawley que se hicieron diabéticas con esteptozotocina y se les administró Termalina basal fresca (T-b; ▲), Termalina basal sometida a calor (●), Lantus® fresco (insulina glargina) (◆), Lantus® sometido a calor (insulina glargina) (■), control de diluyente (×). Las muestras sometidas a calor se agitaron suavemente a 45 °C. La Termalina basal se calentó durante 39 días y el Lantus® durante 6 días.

45 Descripción detallada de la invención

La presente invención abarca un análogo de insulina de cadena sencilla que proporciona una duración prolongada de acción, una proporción de afinidades de enlace al receptor IR-A/IR-B similar a la de la insulina de tipo salvaje con afinidades absolutas en el intervalo del 5 al 100% (el límite inferior elegido para corresponder a la proinsulina), discriminación aumentada contra IGF-1R, presunta resistencia aumentada a la degradación química en la posición A21 (debido a la sustitución de Asn por Gly, Ala o Ser), presunta resistencia aumentada a la fibrilación sobre la temperatura ambiente (debido a la topología de cadena sencilla), y se presume un aumento de la actividad termodinámica (debido en parte a la sustitución de Thr<sup>A8</sup> por una cadena lateral básica; Arg, Lys, His, Orn).

55 Es un aspecto de al menos algunos ejemplos de la presente invención que el punto isoeléctrico del análogo de cadena sencilla está entre 6,8 y 7,8, de modo que una formulación soluble bajo condiciones ácidas (pH 3,0-4,5) debería sufrir una precipitación isoeléctrica en el depósito subcutáneo debido a un cambio de pH a casi neutralidad. También es un aspecto de al menos algunos ejemplos de la presente invención que el análogo de insulina de cadena sencilla conserva la capacidad para someterse a la formación de hexámeros de proteína dependientes de iones de zinc, análogos al hexámero de insulina de zinc clásico conocido en la técnica como hexámero de insulina T<sub>6</sub>, hexámero de insulina T<sub>3</sub>R<sub>3</sub> o hexámero de insulina R<sub>6</sub>.

65 También se prevé que los análogos de cadena sencilla también se puedan hacer con secuencias de los dominios A y B derivadas de insulinas animales, como las insulinas porcinas, bovinas, equinas y caninas, a modo de ejemplos no limitativos. Además, o como alternativa, el análogo de insulina de la presente invención puede contener una

eliminación de los residuos B1-B3 o puede combinarse con una variante de la cadena B que carece de lisina (por ejemplo, LysB29 en insulina humana de tipo salvaje) para evitar proteólisis dirigida a Lys, de un polipéptido precursor en la biosíntesis de levadura en *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* u otras especies o cepas de expresión de levadura. El dominio B de la insulina de cadena sencilla de la presente invención puede contener opcionalmente otras sustituciones, destinadas a aumentar la estabilidad termodinámica y la actividad de enlace al receptor. También se prevé que Thr<sup>B27</sup>, Thr<sup>B30</sup>, o uno o más residuos de serina en el dominio C pueden modificarse, individualmente o en combinación, por un aducto de monosacárido; se proporcionan ejemplos de N-acetil-β-D-galactopiranosido unido a O (denominado GalNAc-O<sup>β</sup>-Ser o GalNAc-O<sup>β</sup>-Thr), α-D-manopiranosido unido a O (manosa-O<sup>β</sup>-Ser o manosa-O<sup>β</sup>-Thr), y/o α-D-glucopiranosido (glucosa-O<sup>β</sup>-Ser o glucosa-O<sup>β</sup>-Thr).

Además, en vista de la similitud entre las insulinas humanas y animales, y el uso en el pasado de insulinas animales en pacientes humanos con diabetes mellitus, también se prevé que se puedan introducir otras modificaciones menores en la secuencia de la insulina, especialmente aquellas sustituciones consideradas "conservadoras". Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones adicionales de aminoácidos dentro de grupos de aminoácidos con cadenas laterales similares, sin apartarse de la presente invención. Estos incluyen los aminoácidos hidrófobos neutros: 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). Del mismo modo, los aminoácidos polares neutros se pueden sustituir 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 asparagina (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 ácido aspártico (Asp o D) y ácido glutámico (Glu o E). A menos que se indique lo contrario o donde sea obvio en el contexto, los aminoácidos destacados aquí deben considerarse como L-aminoácidos. Los aminoácidos estándar también pueden estar sustituidos por aminoácidos no estándar que pertenecen a la misma clase química. A modo de ejemplo no limitativo, la cadena lateral básica Lys puede reemplazarse por aminoácidos básicos de cadena lateral más corta (ornitina, ácido diaminobutírico o ácido diaminopropiónico). Lys también puede ser reemplazada por la isómera alifática neutra Norleucina (Nle), que a su vez puede ser sustituida por análogos que contienen cadenas laterales alifáticas más cortas (ácido aminobutírico o ácido aminopropiónico).

La secuencia de aminoácidos de la proinsulina humana se proporciona, con fines comparativos, como SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 1 (proinsulina humana)

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

La secuencia de aminoácidos de la cadena A de la insulina humana se proporciona como SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 2 (cadena A humana)

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

La secuencia de aminoácidos de la cadena B de la insulina humana se proporciona como SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NO: 3 (cadena B humana)

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

La secuencia de aminoácidos de los análogos de insulina de cadena sencilla de la presente invención se proporciona en las SEQ ID NOS: 4-10, correspondientes a polipéptidos de longitud 57, 57, 58, 59, 60, 61 y 62.

SEQ ID NO: 4

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-  
Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Xaa<sub>2</sub>-Thr-Xaa<sub>3</sub>-Glu-Gly-Arg-Ser-Arg-Gly-Ile-Val-  
Glu-Gln-Cys-Cys-Xaa<sub>1</sub>-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Xaa<sub>4</sub>

donde Xaa<sub>1</sub> indica His, Arg, Lys u Orn; y donde Xaa<sub>2</sub> es Lys, Arg u Orn; Xaa<sub>3</sub> es Ala, Gly o Ser; y donde Xaa<sub>4</sub> es Gly, Ala o Ser.

5

SEQ ID NO: 5

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-  
Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Xaa<sub>2</sub>-Thr-Glu-Xaa<sub>3</sub>-Gly-Arg-Ser-Arg-Gly-Ile-Val-  
Glu-Gln-Cys-Cys-Xaa<sub>1</sub>-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Xaa<sub>4</sub>

10 donde Xaa<sub>1</sub> indica His, Arg, Lys u Orn; y donde Xaa<sub>2</sub> es Lys, Arg u Orn; Xaa<sub>3</sub> es Ala, Gly o Ser; y donde Xaa<sub>4</sub> es Gly, Ala o Ser.

SEQ ID NO: 6

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-  
Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Xaa<sub>2</sub>-Thr-Glu-Glu-Gly-Arg-Arg-Ser-Arg-Gly-Ile-Val-  
15 Glu-Gln-Cys-Cys-Xaa<sub>1</sub>-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Xaa<sub>3</sub>

donde Xaa<sub>1</sub> indica His, Arg, Lys u Orn; y donde Xaa<sub>2</sub> es Lys, Arg u Orn; y donde Xaa<sub>3</sub> es Gly, Ala o Ser.

20

SEQ ID NO: 7

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-  
Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Xaa<sub>2</sub>-Thr-Glu-Glu-Gly-Ser-Arg-Arg-Ser-Arg-Gly-Ile-  
Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Xaa<sub>1</sub>-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Xaa<sub>3</sub>

donde Xaa<sub>1</sub> indica His, Arg, Lys u Orn; y donde Xaa<sub>2</sub> es Lys, Arg u Orn; y donde Xaa<sub>3</sub> es Gly, Ala o Ser.

25

SEQ ID NO: 8

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-  
Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Xaa<sub>2</sub>-Thr-Glu-Glu-Gly-Val-Ser-Arg-Arg-Ser-Arg-  
Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Xaa<sub>1</sub>-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Xaa<sub>3</sub>

donde Xaa<sub>1</sub> indica His, Arg, Lys u Orn; y donde Xaa<sub>2</sub> es Lys, Arg u Orn; y donde Xaa<sub>3</sub> es Gly, Ala o Ser.

30

SEQ ID NO: 9

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-  
Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Xaa<sub>2</sub>-Thr-Glu-Glu-Gly-Arg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser-  
Arg-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Xaa<sub>1</sub>-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-  
Xaa<sub>3</sub>

35 donde Xaa<sub>1</sub> indica His, Arg, Lys u Orn; y donde Xaa<sub>2</sub> es Lys, Arg u Orn; y donde Xaa<sub>3</sub> es Gly, Ala o Ser.

SEQ ID NO: 10

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Xaa<sub>2</sub>-Thr-Glu-Glu-Gly-Ser-Arg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser-Arg-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Xaa<sub>1</sub>-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Xaa<sub>3</sub>,

5 donde Xaa<sub>1</sub> indica His, Arg, Lys u Orn; y donde Xaa<sub>2</sub> es Lys, Arg u Orn; y donde Xaa<sub>3</sub> es Gly, Ala o Ser.

La siguiente secuencia de ADN codifica el análogo de insulina de cadena sencilla SCI-59B (ver más abajo) con codones optimizados para patrones de uso en *Pichia pastoris*.

10 SEQ. ID. NO 11

TTTCGTC AATCAACACTTGTGTGGTTCCTACTTGGTGTGAGGCATTGTACTTGGTCTGTGGTGTG  
AGAGAGGATTCCTTCTACACCCCTAGAACTGAGGAGGGTCTAGAAGATCTAGAGGAATCG  
TCGAGCAATGTTGTAGATCCATTTGTTCTTGTACCAATTGGAGA ACTACTGCGGATAA

15 Se han preparado y clonado genes sintéticos análogos en *Pichia pastoris* que codifica SCI-59A (ver más abajo) y derivados de SCI-59A y SCI-59B que contienen la sustitución adicional Glu<sup>B13</sup>→Gln.

Se prepararon dos análogos de insulina de cadena sencilla de la presente invención (designados SCI-59A y SCI-59B) mediante biosíntesis de un polipéptido precursor en *Pichia pastoris*; este sistema secreta una proteína plegada que contiene puentes disulfuro nativos con escisión del péptido de extensión del terminal N. Los productos de insulina de cadena sencilla escindidos tenían una longitud de 59, la suma de un dominio B de 30 residuos, un dominio C de 8 residuos y un dominio A de 21 residuos. La secuencia del dominio C fue en cada caso EEGSRRSR (SEQ ID NO: 14), en la que se introdujo el elemento ácido (posiciones C1 y C2; **negrita**) para deteriorar el enlace a IGF-1R, Gly (posición C3;  *cursiva*) se introdujo como una junta flexible, y un elemento derivado del dominio C de IGF-II (posiciones C4-C8 en el presente análogo; subrayado). SCI-59A contenía sustituciones adicionales Thr<sup>A8</sup>→His, Asn<sup>A21</sup>→Gly y Lys<sup>B29</sup>→Arg, mientras que SCI-59B contenía sustituciones adicionales Thr<sup>A8</sup>→Arg, Asn<sup>A21</sup>→Gly y Lys<sup>B29</sup>→Arg (SEQ ID NO: 7). Fue previsto que el punto isoeléctrico formal (pI) de SCI-59A se desplazaría hacia la neutralidad por los efectos combinados de la secuencia del dominio C (tres residuos de arginina adicionales compensados parcialmente por dos residuos de ácido glutámico adicionales) y una histidina titulable adicional en la posición A8; se esperaba que la sustitución de Arg por Lys en B29 tuviera un efecto insignificante en el punto isoeléctrico. Se predijo que el pI formal de SCI-59B se desplazaría más hacia la neutralidad por los efectos combinados de la secuencia del dominio C (tres residuos de arginina adicionales compensados parcialmente por dos residuos de ácido glutámico adicionales como en SCI-59A) y una Arg adicional en la posición A8.

Tabla 1. Afinidades de enlace in vitro al receptor

	insulina	SCI-59A	SCI-59B
IR-A Humano	0,026 ± 0,005	0,249 ± 0,036	0,055 ± 0,008
IR-B Humano	0,058 ± 0,007	1,20 ± 0,165	0,154 ± 0,021
IGF-1R Humano	3,45 ± 0,54	102,3 ± 32,0	35,3 ± 7,4
<i>Abreviaciones:</i> IR-B, empalme de la isoforma B del receptor de insulina.; IGF-1R, receptor IGF Tipo 1.			

35 La Tabla 1 contiene afinidades de enlace al receptor de SCI-59A y SCI-59B en relación con la insulina humana de tipo salvaje. En la Figura 2 se proporcionan datos representativos. Cada uno de los dos análogos de una sola cadena muestra un enlace entrecruzado muy bajo al IGF-1R en relación con la insulina de tipo salvaje. (La actividad relativa se define como la proporción de las constantes de disociación hormona-receptor del análogo a la insulina humana de tipo salvaje, medida por un ensayo de desplazamiento competitivo que usa insulina humana <sup>125</sup>I). SCI-59B muestra afinidades relativas para IR-A e IR-B en el intervalo diana 5-100% con una proporción similar a la de la insulina de tipo salvaje. Por el contrario, las afinidades IR-A e IR-B de SCI-59A (que difieren en la posición A8) son cada una más bajas que las de SCI-59B. Mientras que la afinidad de SCI-59A por IR-A está dentro del intervalo diana (ca. 10%), su afinidad por IR-B se encuentra en la parte inferior del intervalo diana (5% dentro del error experimental), lo que resulta en una proporción de enlace de IR-A/IR-B que puede estar elevada en relación con la insulina de tipo salvaje. Estos hallazgos sugieren que se prefiere Arg sobre His en la posición A8 en el contexto del enlazador EEGSRRSR (SEQ ID

NO: 14). El pl previsto de SCI-59B también es más cercano al de la insulina glargina (que también contiene un exceso de dos residuos de arginina) que el de SCI-59A.

El protocolo para el ensayo de las actividades de enlace al receptor fue el siguiente. Las placas de tira de microtitulación (Nunc Maxisorb) se incubaron durante la noche a 4 °C con IgG AU5 (100 µl/pozo de 40 mg/ml en solución salina regulada con fosfato). Los datos de enlace se analizaron mediante un modelo secuencial de dos sitios. Los datos se corrigieron para enlace no específico (la cantidad de radioactividad restante de la membrana asociada en presencia de 1 µM de insulina humana. En todos los ensayos, el porcentaje de trazador enlazado en ausencia de ligando competitivo fue inferior al 15% para evitar artefactos de agotamiento del ligando. Constantes de disociación ( $K_d$ ) se determinaron mediante el ajuste a un modelo matemático según lo descrito por Whittaker y Whittaker (2005. J. Biol. Chem. 280:20932-20936), el modelo empleó regresión no lineal con el supuesto de competencia heteróloga (Wang, 1995, FEBS Lett. 360:111-114).

Los estudios estructurales y biológicos se centraron en SCI-59B a la luz de su mayor afinidad de enlace al receptor y su punto isoeléctrico previsto más favorable. El espectro 2D-NMR NOESY proporcionó evidencia para una estructura plegada (Figura 3); el patrón de NOEs y los cambios químicos están de acuerdo con el análisis previo de un análogo de insulina de cadena sencilla de 57 residuos (Hua, Q. X. et al. (2008)).

Para evaluar la actividad biológica y la potencia de los análogos en un modelo animal, las ratas Sprague-Dawley macho (masa corporal media de ~300 gramos) se hicieron diabéticas mediante tratamiento con estreptozotocina (STZ). Soluciones de proteínas que contienen KP-insulina (insulina Lispro, el componente activo de Humalog®; Eli Lilly and Co.), insulina Glargina (Lantus®; Sanofi-Aventis) y/o una insulina de cadena sencilla de la presente invención. Se proporcionó un control mediante la inyección de diluyente de Lilly sin proteínas (obtenido de Eli Lilly and Co.) compuesto de 16 mg de glicerina, 1,6 mg de meta-cresol, 0,65 mg de fenol y 3,8 mg de fosfato de sodio, pH 7,4. La actividad de SCI-59B se evaluó en relación con la de Humalog® (concentración de U-100 tomada de un vial comercial no expirado) y Lantus® (concentración de U-100 tomada de un vial comercial no expirado) como se muestra en la Figura 4. SCI 57B se formuló de acuerdo con la formulación de insulina Glargine en Lantus®, excepto que el pH se ajustó en 3,5 (en lugar de pH 4,0). Una unidad de cada una de estas formulaciones se inyectó por vía subcutánea, y los cambios resultantes en la concentración de glucosa en sangre se controlaron mediante mediciones en serie utilizando un glucómetro clínico (medidor de micro-extracción Hypoguard Advance). Las ratas se inyectaron subcutáneamente en el tiempo  $t = 0$  en grupos de zinc ( $N = 5$ ). La sangre se obtuvo de la punta recortada de la cola en el tiempo 0 y cada 10 minutos hasta 360 min. Se encontró que el SCI-59B de la presente invención, bajo condiciones de formulación similares a la de Lantus®, retenía una proporción sustancial de la actividad biológica de la insulina glargina y con una duración de acción similar o superior a la de Lantus®.

Se sintetizó un SCI 59mer con las sustituciones Arg<sup>A8</sup>, Gly<sup>A21</sup>, Arg<sup>B29</sup> y con el enlazador EEGRSSSR (SEQ ID NO: 7). Este SCI se conoce como Termalina basal o abreviado como T-b en la Figura 5. La estabilidad termodinámica se evaluó a 25 °C y pH 4,0 mediante desnaturalización de guanidina controlada por CD. Se obtuvo una energía libre de despliegue ( $\Delta G_u$ ) de 3,5 ( $\pm 0,1$ ) kcal/mol mediante la aplicación de un modelo de dos estados, que es mayor que la estabilidad de la insulina glargina bajo estas condiciones (2,7 ( $\pm 0,1$ ) kcal/mol). Este aumento en la energía libre ( $\Delta\Delta G_u$  0,7( $\pm 0,2$ ) kcal/mol) predice una estabilidad química significativamente potenciada.

La resistencia a la fibrilación se sondeó mediante agitación suave en una formulación U-100 a 37 y 45 °C a pH 4,0 en relación con la insulina glargina. Mientras que Lantus se precipitó después de 10 días a 37 °C y después de 5 días a 45 °C, las soluciones de Termalina basal permanecieron transparentes y sin aumento en la fluorescencia de la tioflavina T (una sonda de amiloide).

La potencia se probó en ratas Sprague-Dawley (ca. 300 g) que se hicieron diabéticas por estreptozotocina (Figuras 5A y 5B). Después de la inyección subcutánea de U-100 (0,6 mM) de Termalina basal o Lantus® (1 unidad por rata;  $N = 5$  en el grupo Termalina basal ( $\blacktriangle$ ) y  $N = 10$  en el grupo de Lantus® ( $\blacklozenge$ )), la reducción y recuperación resultantes de la concentración de glucosa en sangre (AUC) indicaron que la potencia de Termalina basal es similar a, o mayor que la de Lantus®. La duración de la actividad de Termalina basal también supera la de Lantus®. La retención o pérdida de potencia de Termalina basal o Lantus® en agitación suave a 37 y 45 °C muestra que mientras Lantus® pierde rápidamente su potencia ( $\blacksquare$ ), la Termalina basal ( $\bullet$ ) mantuvo la actividad completa durante varias semanas en estas condiciones desafiantes.

Un método para tratar a un paciente con diabetes mellitus comprende administrar un análogo de insulina de cadena sencilla como se describe aquí. Otro aspecto de la presente invención es que los análogos de insulina de cadena sencilla pueden prepararse ya sea en levadura (*Pichia pastoris*) o someterse a síntesis química total por ligación de fragmentos nativos. La ruta sintética de preparación se prefiere en el caso de modificaciones no estándar; sin embargo, sería factible fabricar un subconjunto de análogos de cadena sencilla que contengan modificaciones no estándar por medio de tecnología de código genético extendida o tecnología de codón de cuatro bases. Otro aspecto más de la presente invención es que el uso de sustituciones de aminoácidos no estándar puede aumentar la resistencia del análogo de insulina de cadena sencilla a la degradación química o a la degradación física. Además, visualizamos los análogos de la presente invención que proporcionan un método para el tratamiento de la diabetes mellitus o el

síndrome metabólico. La vía de administración del análogo de insulina es por inyección subcutánea mediante el uso de una jeringa o dispositivo de pluma.

Una composición farmacéutica puede comprender tales análogos de insulina y que puede incluir opcionalmente zinc. Los iones de zinc pueden incluirse en diferentes proporciones de iones de zinc:proteínas, que oscilan desde 2,2 átomos de zinc por hexámero de análogo de insulina a 10 átomos de zinc por hexámero de análogo de insulina. El pH de la formulación está en el intervalo de pH 3,0-4,5. En tal formulación, la concentración del análogo de insulina estaría típicamente entre aproximadamente 0,6-5,0 mM; se pueden usar concentraciones de hasta 5 mM en vial o pluma; las formulaciones más concentradas (U-200 o superior) pueden ser particularmente beneficiosas en pacientes con resistencia marcada a la insulina. Los excipientes pueden incluir glicerol, glicina, arginina, Tris, otros reguladores y sales, y conservantes antimicrobianos tales como fenol y meta-cresol; estos últimos conservantes son conocidos por mejorar la estabilidad del hexámero de insulina. Dicha composición farmacéutica puede usarse para tratar a un paciente que tiene diabetes mellitus u otra afección médica administrando una cantidad fisiológicamente eficaz de la composición al paciente.

Con base en la divulgación anterior, ahora debería ser evidente que los análogos de insulina de cadena sencilla proporcionados llevarán a cabo los objetos expuestos aquí anteriormente. Específicamente, estos análogos de la insulina muestran una resistencia potenciada a la fibrilación al tiempo que conservan las características farmacocinéticas y farmacodinámicas deseables (confieren una acción prolongada) y mantienen al menos una fracción de la actividad biológica de la insulina de tipo salvaje.

La siguiente bibliografía se cita para demostrar que los métodos de prueba y ensayo descritos aquí serían entendidos por una persona de experiencia ordinaria en la técnica.

Glendorf, T., Knudsen, L., Stidsen, C.E., Hansen, B.F., Hegelund, A.C., Sørensen, A.R., Nishimura, E., & Kjeldsen, T. 2012. Systematic evaluation of the metabolic to mitogenic potency ratio for B10-substituted insulin analogues. *PLoS One* 7(2), e29198.

Hohsaka, T., & Sisido, M. 2012. Incorporation of non-natural amino acids into proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 809-15.

Hua, Q.X., Nakagawa, S.H., Jia, W., Huang, K., Phillips, N.B., Hu, S. & Weiss, M.A. (2008) Design of an active ultrastable single-chain insulin analog: synthesis, structure, and therapeutic implications. *J. Biol. Chem.* 283, 14703-14716.

Kristensen, C., Andersen, A.S., Hach, M., Wiberg, F.C., Schäffer, L., & Kjeldsen, T. 1995. A single-chain insulin-like growth factor I/insulin hybrid binds with high affinity to the insulin receptor. *Biochem. J.* 305, 981-6.

Lee, H.C., Kim, S.J., Kim, K.S., Shin, H.C., & Yoon, J.W. 2000. Remission in models of type 1 diabetes by gene therapy using a single-chain insulin analogue. *Nature* 408, 483-8. *Retraction in:* Lee HC, Kim KS, Shin HC. 2009. *Nature* 458, 600.

Phillips, N.B., Whittaker, J., Ismail-Beigi, F., & Weiss, M.A. (2012) Insulin fibrillation and protein design: topological resistance of single-chain analogues to thermal degradation with application to a pump reservoir. *J. Diabetes Sci. Technol.* 6, 277-288.

Sciacca, L., Cassarino, M.F., Genua, M., Pandini, G., Le Moli, R., Squatrito, S., & Vigneri, R. 2010. Insulin analogues differently activate insulin receptor isoforms and post-receptor signalling. *Diabetologia* 53, 1743-53.

Wang, Z.X. 1995. An exact mathematical expression for describing competitive binding of two different ligands to a protein molecule *FEBS Lett.* 360: 111-114.

Whittaker, J., and Whittaker, L. 2005. Characterization of the functional insulin binding epitopes of the full-length insulin receptor. *J. Biol. Chem.* 280: 20932-20936.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY  
<120> ANALOGOS DE INSULINA DE ACCIÓN PROLONGADA DE CADENA SENCILLA  
<130> 200512.00232  
10 <150> documento US 61/772,350  
<151> 2012-11-05  
<160> 14  
15 <170> PatentIn versión 3,5  
<210> 1  
20 <211> 86  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
25 <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

30 <210> 2  
<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <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

<210> 3

10

<211> 30

<212> PRT

15 <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

20

<210> 4

<211> 57

25 <212> PRT

<213> estructura sintética

<220>

30

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISC

<222> (29)..(29)

35 <223> Xaa es Lys, Arg, u Orn

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISC

40

<222> (31)..(31)

<223> Xaa es Ala, Gly, u Ser

45 <220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISC

<222> (44)..(44)

50

<223> Xaa indica His, Arg, Lys u Orn

<220>

5 <221> CARACTERÍSTICAS\_MISC

<222> (57)..(57)

<223> Xaa es Gly, Ala o Ser

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 Xaa Thr Xaa Glu  
          20            25            30

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

Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Xaa  
          50            55

15 <210> 5

<211> 57

<212> PRT

20

<213> estructura sintética

<220>

25 <221> CARACTERÍSTICAS\_MISC

<222> (29)..(29)

<223> Xaa es Lys, Arg, u Orn

30

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISC

35 <222> (32)..(32)

<223> Xaa es Ala, Gly, u Ser

<220>

40

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISC

<222> (44)..(44)

45 <223> Xaa indica His, Arg, Lys u Orn

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISC

5 <222> (57)..(57)

<223> Xaa es Gly, Ala u Ser

<400> 5

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 Xaa Thr Glu Xaa  
          20            25            30

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

Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Xaa  
          50            55

<210> 6

15 <211> 58

<212> PRT

<213> estructura sintética

20

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISC

25 <222> (29)..(29)

<223> Xaa es Lys, Arg, u Orn

<220>

30

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISC

<222> (45)..(45)

35 <223> Xaa indica His, Arg, Lys u Orn

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISC

40

<222> (58)..(58)

<223> Xaa es Gly, Ala o Ser

45 <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 Xaa Thr Glu Glu  
          20            25            30

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

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

<210> 7

5 <211> 59

<212> PRT

<213> estructura sintética

10

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISC

15

<222> (29)..(29)

<223> Xaa es Lys, Arg, u Orn

<220>

20

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISC

<222> (46)..(46)

25

<223> Xaa indica His, Arg, Lys u Orn

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISC

30

<222> (59)..(59)

<223> Xaa es Gly, Ala o Ser

35

<400> 7

ES 2 694 418 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 Xaa Thr Glu Glu  
          20            25            30

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

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

<210> 8

5 <211> 60

<212> PRT

10 <213> estructura sintética

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISC

15 <222> (29)..(29)

<223> Xaa es Lys, Arg, u Orn

<220>

20 <221> CARACTERÍSTICAS\_MISC

<222> (47)..(47)

25 <223> Xaa indica His, Arg, Lys u Orn

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISC

30 <222> (60)..(60)

<223> Xaa es Gly, Ala o Ser

35 <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 Xaa Thr Glu Glu

20 25 30

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

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

<210> 9

5 <211> 61

<212> PRT

<213> estructura sintética

10

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISC

15

<222> (29)..(29)

<223> Xaa es Lys, Arg, u Orn

<220>

20

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISC

<222> (48)..(48)

25

<223> Xaa indica His, Arg, Lys u Orn

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS\_MISC

30

<222> (61)..(61)

<223> Xaa es Gly, Ala o Ser

35

<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 Xaa Thr Glu Glu  
 20 25 30

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

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

- <210> 10
- 5 <211> 62
- <212> PRT
- <213> estructura sintética
- 10 <220>
- <221> CARACTERÍSTICAS\_MISC
- 15 <222> (29)..(29)
- <223> Xaa es Lys, Arg, u Orn
- <220>
- 20 <221> CARACTERÍSTICAS\_MISC
- <222> (49)..(49)
- 25 <223> Xaa indica His, Arg, Lys u Orn
- <220>
- <221> CARACTERÍSTICAS\_MISC
- 30 <222> (62)..(62)
- <223> Xaa es Gly, Ala o Ser
- 35 <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 Xaa Thr Glu Glu  
20 25 30

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

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

- 40 <210> 11
- <211> 180
- <212> ADN

ES 2 694 418 T3

<213> Homo sapiens

<400> 11

ttcgtcaatc aacacttgtg tggttccac ttggtgagg cattgtactt ggtctgtggt 60

gagagaggat tcttctacac ccctagaact gaggagggtt ctagaagatc tagaggaatc 120

5 gtcgagcaat gttgtagatc cattgttcc ttgtaccaat tggagaacta ctgcggataa 180

<210> 12

<211> 12

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 12

Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr  
1 5 10

<210> 13

20

<211> 8

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 13

Ser Arg Val Ser Arg Arg Ser Arg  
1 5

30

<210> 14

<211> 8

35 <212> PRT

<213> estructura sintética

<400> 14

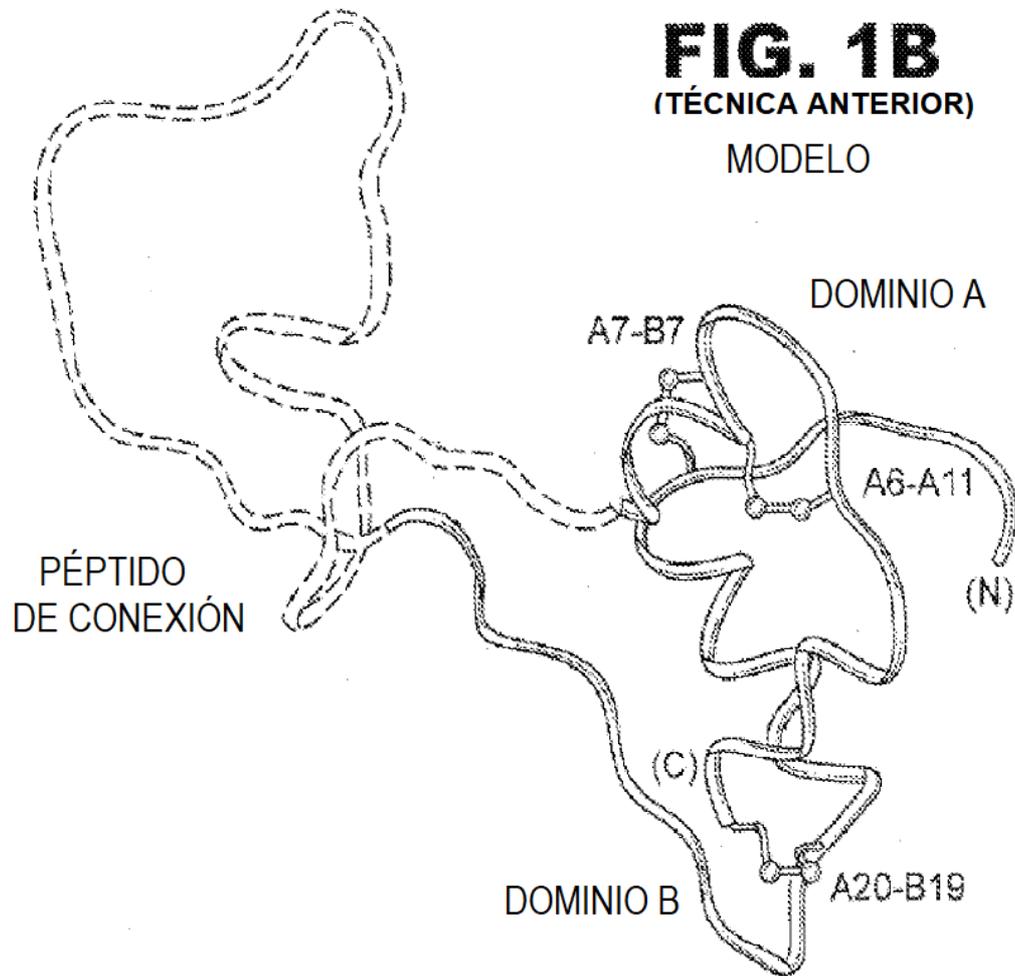
40

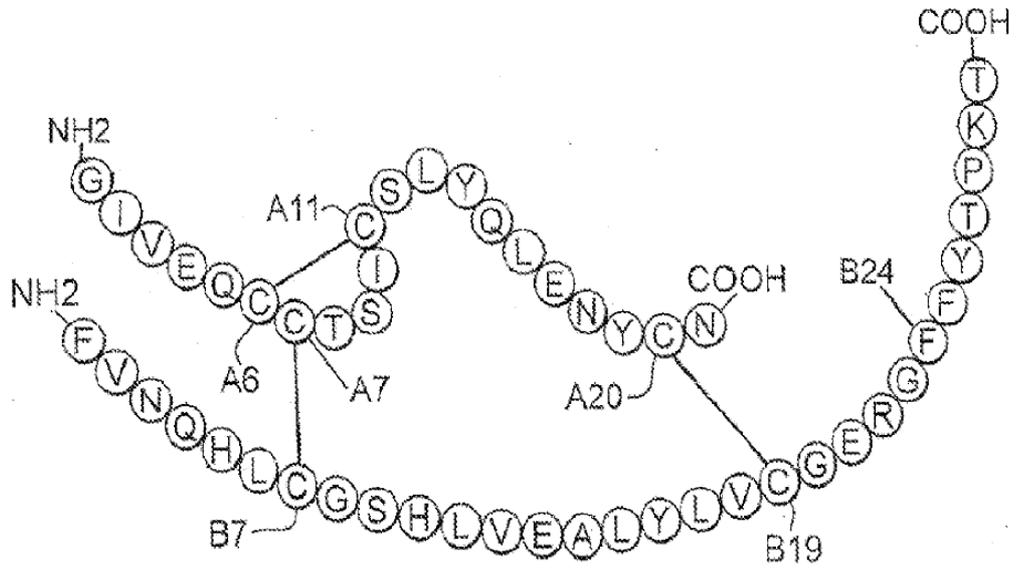
Glu Glu Gly Ser Arg Arg Ser Arg  
1 5

**REIVINDICACIONES**

1. Un análogo de insulina de cadena sencilla que comprende las secuencias de una cualquiera de las SEQ ID NOS: 4-10.
- 5 2. El análogo de insulina de cadena sencilla de la reivindicación 1, que comprende la secuencia SEQ ID NO: 7.
3. El análogo de insulina de cadena sencilla de la reivindicación 2, en el que Xaa en la posición 29 es Arg.
- 10 4. El análogo de insulina de cadena sencilla de la reivindicación 3, en el que Xaa en la posición 59 es Gly.
5. El análogo de insulina de cadena sencilla de la reivindicación 4, en el que Xaa en la posición 46 es Arg.
- 15 6. El análogo de insulina de cadena sencilla de la reivindicación 4, en el que Xaa en la posición 46 es His.
7. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un análogo de insulina de cadena sencilla de cualquiera de las SEQ ID NOS: 4-10.
- 20 8. La secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 7, en la que la secuencia comprende la SEQ ID NO: 11.
9. Un análogo de insulina de cadena sencilla o una sal fisiológicamente aceptable del mismo que comprende la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NOS: 4-10, para usar en un método para reducir el azúcar en la sangre de un paciente.
- 25 10. El análogo de insulina de cadena sencilla o una de sus sales fisiológicamente aceptables para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el análogo de insulina de cadena sencilla tiene la secuencia SEQ ID NO: 7.
- 30 11. El análogo de insulina de cadena sencilla o una sal fisiológicamente aceptable del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que Xaa en la posición 29 de la SEQ ID NO: 7 es Arg.
12. El análogo de insulina de cadena sencilla o una sal fisiológicamente aceptable del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que Xaa en la posición 59 de la SEQ ID NO: 7 es Gly.
- 35 13. El análogo de insulina de cadena sencilla o una sal fisiológicamente aceptable del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que Xaa en la posición 46 de la SEQ ID NO: 7 es Arg.
14. El análogo de insulina de cadena sencilla o una sal fisiológicamente aceptable del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que Xaa en la posición 46 de la SEQ ID NO: 7 es His.



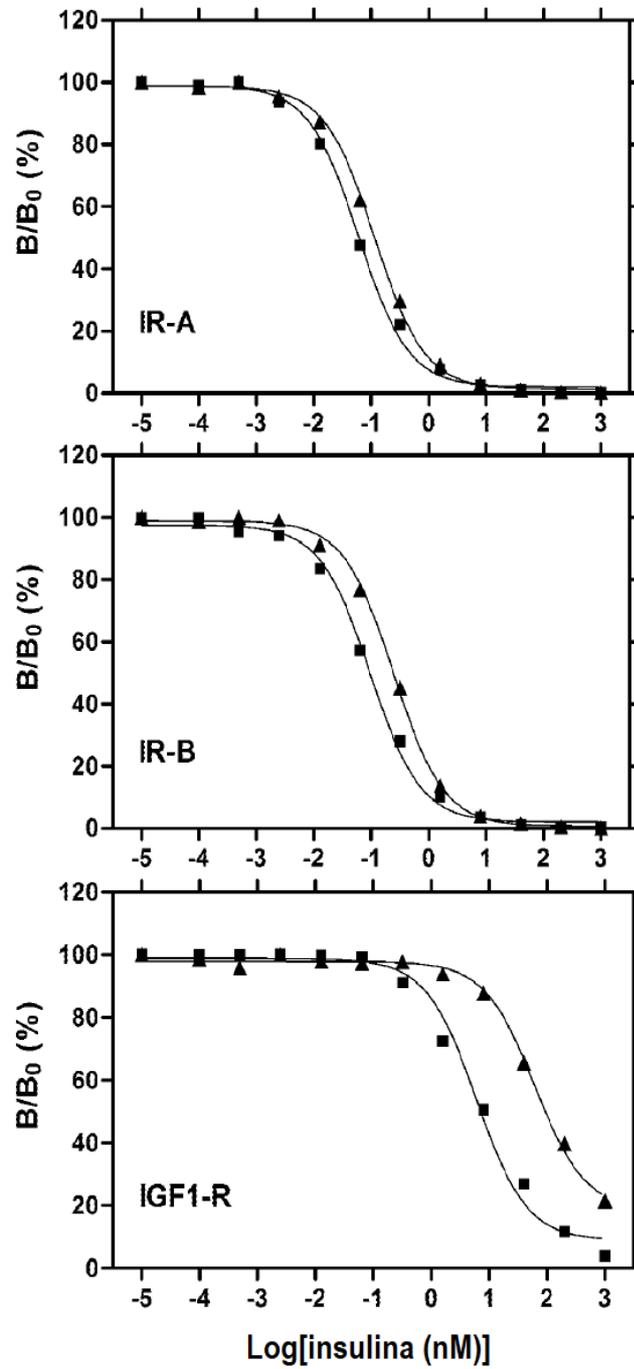




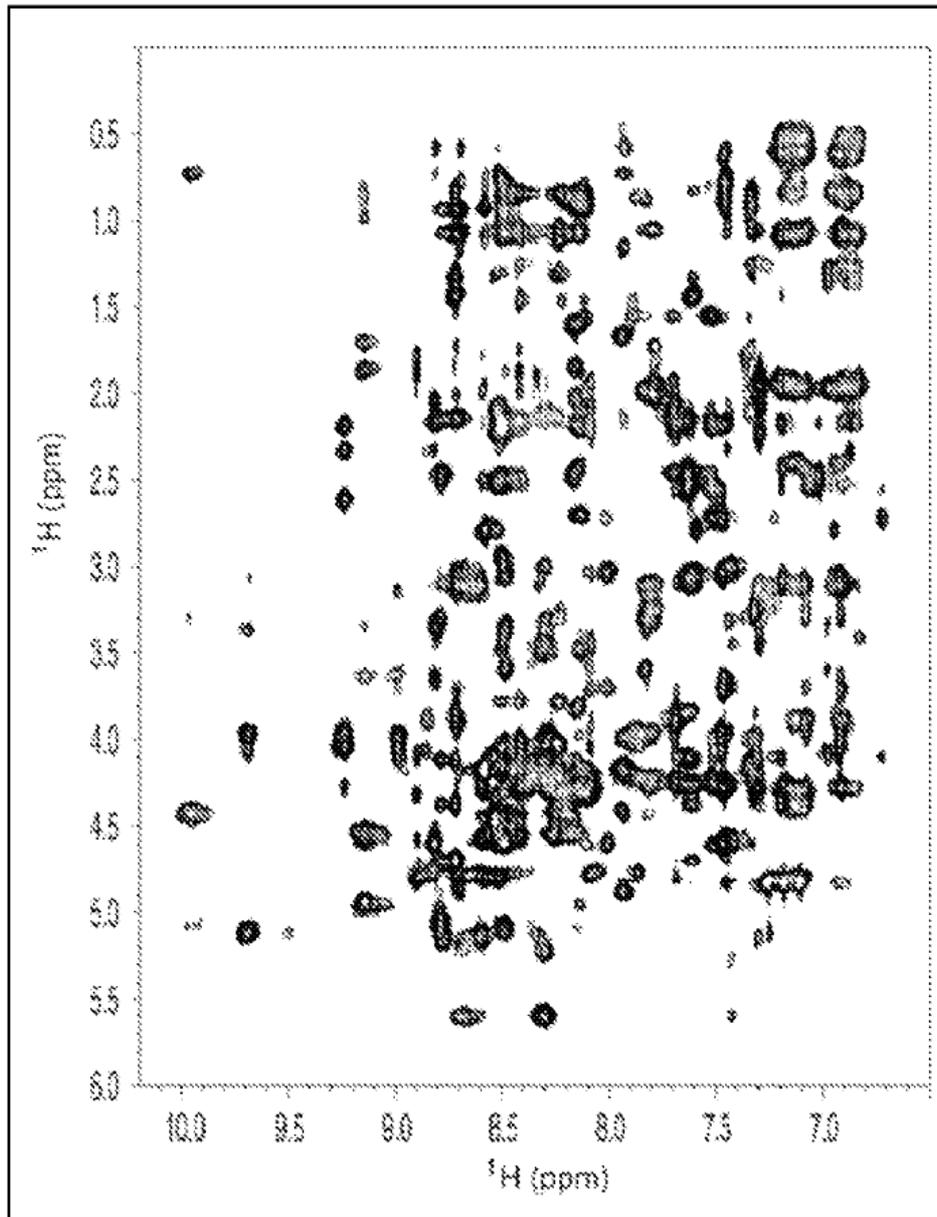
**FIG. 1C**

(TÉCNICA ANTERIOR)

**FIG. 2**  
**Estudios de enlace del receptor**



**FIG. 3**  
**Estudios 2D-NMR**



**FIG. 4**  
**Estudios de rata STZ**

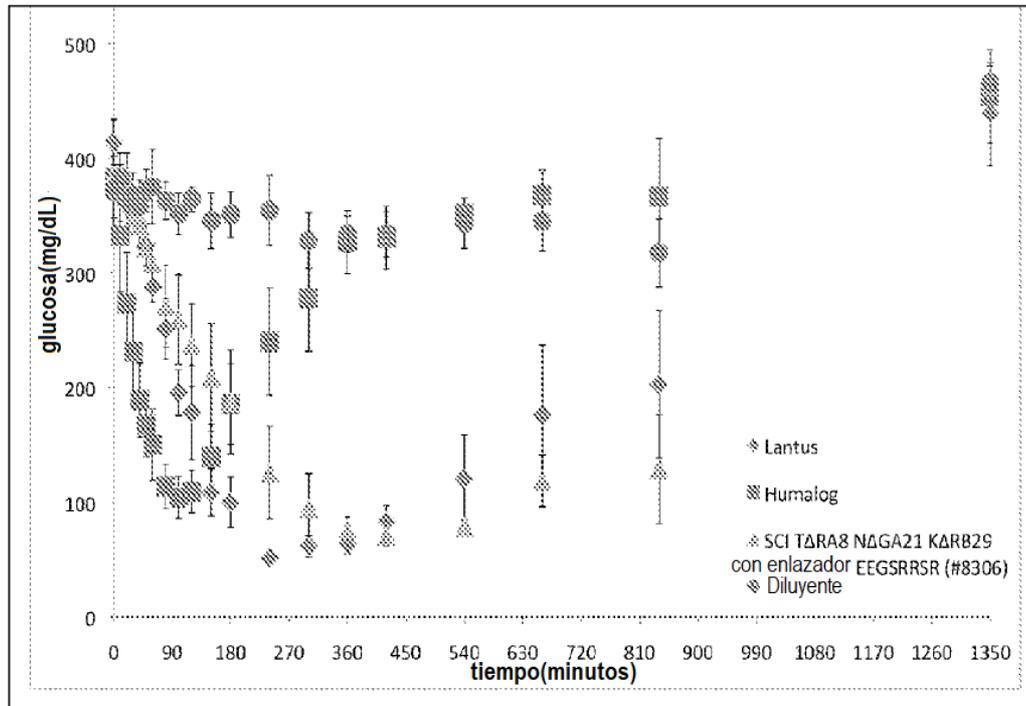


FIG. 5A

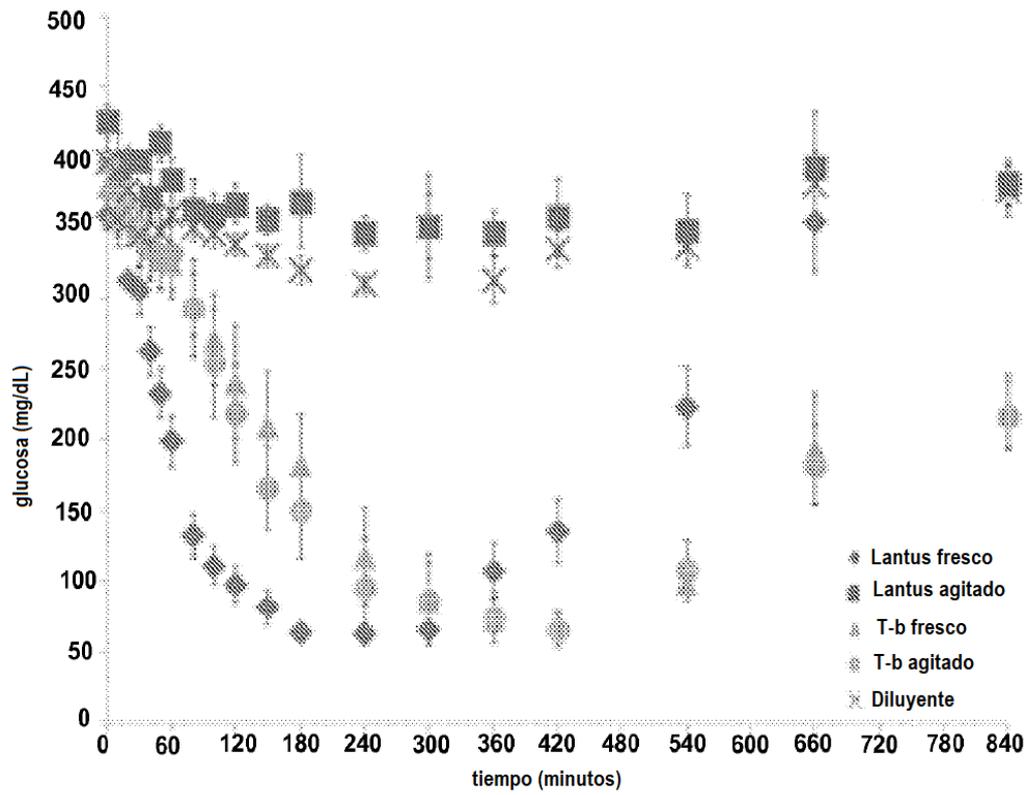


FIG. 5B

