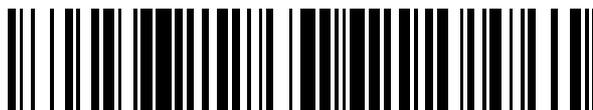


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 776**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/62** (2006.01)

**A61K 47/68** (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2014 PCT/KR2014/001593**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.09.2014 WO14133324**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2014 E 14757629 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 2963056**

54 Título: **Análogo de la insulina y uso del mismo**

30 Prioridad:

**26.02.2013 KR 20130020703**

**12.07.2013 KR 20130082511**

**20.01.2014 KR 20140006937**

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

**03.07.2020**

73 Titular/es:

**HANMI PHARM. CO., LTD. (100.0%)**

**214 Muha-ro, Paltan-myeon**

**Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-958, KR**

72 Inventor/es:

**HWANG, SANG YOUNG;**

**HUH, YONG HO;**

**KIM, JIN YOUNG;**

**HONG, SUNG HEE;**

**CHOI, IN YOUNG;**

**JUNG, SUNG YOUB;**

**KWON, SE CHANG;**

**KIM, DAE JIN;**

**KIM, HYUN UK;**

**JANG, MYUNG HYUN y**

**KIM, SEUNG SU**

74 Agente/Representante:

**GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio**

ES 2 770 776 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

Análogo de la insulina y uso del mismo

5 **[Campo técnico]**

La presente divulgación se refiere a un análogo de la insulina que tiene un título de insulina reducido y una afinidad de unión al receptor de la insulina reducida en comparación con la forma nativa con el fin de aumentar la vida media en la sangre de la insulina, un conjugado preparado uniendo el análogo de la insulina y un vehículo, una formulación de acción prolongada que incluye el conjugado y un procedimiento para preparar el conjugado.

**[Técnica antecedente]**

15 Se conoce que las proteínas in vivo se eliminan por diversas vías, como la degradación por enzimas proteolíticas en la sangre, la excreción a través del riñón o la eliminación por receptores. De este modo, se han realizado muchos esfuerzos para mejorar la eficacia terapéutica evitando los mecanismos de eliminación de proteínas y aumentando la vida media de las proteínas fisiológicamente activas.

20 Por otro lado, la insulina es una hormona secretada por el páncreas del cuerpo humano, que regula los niveles de la glucosa en la sangre y desempeña un papel en el mantenimiento de los niveles normales de la glucosa en la sangre mientras transporta el exceso de glucosa en la sangre a las células para proporcionar energía a las células. Sin embargo, en los pacientes diabéticos, la insulina no funciona correctamente debido a la falta de la insulina, la resistencia a la insulina y la pérdida de la función de las células beta, y de este modo la glucosa en la sangre no puede utilizarse como fuente de energía y el nivel de la glucosa en la sangre es elevado, conduciendo a la hiperglucemia.

25 Eventualmente, se produce la excreción urinaria, lo que contribuye al desarrollo de diversas complicaciones. Por lo tanto, la terapia con la insulina es esencial para los pacientes con secreción anormal de la insulina (Tipo I) o la resistencia a la insulina (Tipo II), y los niveles de la glucosa en la sangre pueden regularse normalmente mediante la administración de la insulina. Sin embargo, al igual que otras proteínas y hormonas peptídicas, la insulina tiene una vida media in vivo muy corta y, de este modo, tiene la desventaja de la administración repetida. Dicha administración frecuente causa dolor intenso y molestias a los pacientes. Por esta razón, para mejorar la calidad de vida aumentando la vida media in vivo de la proteína y reduciendo la frecuencia de administración, se han realizado muchos estudios sobre la formulación de las proteínas y la conjugación química (conjugado de ácido graso, conjugado de polímero de polietileno). La insulina de acción prolongada comercialmente disponible incluye la insulina glargina fabricada por Sanofi

30 Aventis (lantus, que dura aproximadamente 20–22 horas), y la insulina detemir (levemir, que dura aproximadamente 18–22 horas) y tresiba (degludec, que dura aproximadamente 40 horas) fabricado por Novo Nordisk. Estas formulaciones de la insulina de acción prolongada no producen un pico en la concentración de la insulina en la sangre y, de este modo, son adecuadas como insulina basal. Sin embargo, debido a que estas formulaciones no tienen una vida media suficientemente larga, la desventaja de una o dos inyecciones por día aún permanece. Como consecuencia, existe una limitación para lograr el objetivo previsto de que la frecuencia de administración se reduzca notablemente para mejorar la comodidad de los pacientes diabéticos que necesitan una administración a largo plazo.

La investigación previa informó un procedimiento específico de eliminación de la insulina in vivo; el 50 % o más de la insulina se elimina en el riñón y el resto se elimina a través un procedimiento de eliminación mediada por receptor (RMC) en sitios objetivo como el músculo, la grasa, el hígado, etc.

45 En este sentido, muchos estudios, incluidos J Pharmacol Exp Ther (1998) 286: 959, Diabetes Care (1990) 13: 923, Diabetes (1990) 39: 1033, han informado que la actividad in vitro se reduce para evitar la RMC de la insulina, aumentando de este modo el nivel en sangre. Sin embargo, estos análogos de la insulina que tienen una afinidad de unión al receptor reducida no pueden evitar la eliminación renal, que es un mecanismo de eliminación principal, aunque la RMC se reduce. Como consecuencia, ha existido un límite para aumentar notablemente la vida media de la sangre.

Kristensen y otros, J. Biol. Chem., 272 (20), 12978 – 12983 (1997) se refiere a la "mutagénesis de análisis de la alanina de la insulina", y en particular al hallazgo de que "la insulina B20Aa retiene una unión de alta afinidad al receptor."

55 El documento WO 2011/122921 se refiere a "un conjugado de la insulina que tiene una duración y estabilidad in vivo mejoradas, que se prepara uniendo covalentemente la insulina con una región Fc de inmunoglobulina a través de un polímero no peptídico."

60 El documento KR10–2011–0134209 se refiere a "un complejo análogo de cadena simple de la insulina que usa un fragmento de la inmunoglobulina."

Chu y otros, J. Protein Chem., 11 (5), 571 – 577 (1992) se refieren a una investigación sobre "la contribución del residuo de tirosina encontrado en la posición 14 de la cadena A, a la actividad biológica de la insulina" en análogos de la insulina porcina.

65 El documento US2012/0071402 se refiere a "los análogos de la insulina pegilada estabilizados con proteasa."

5 Con estos antecedentes, los autores actuales han hecho muchos esfuerzos para aumentar la vida media en la sangre de la insulina. Como resultado, descubrieron que un nuevo análogo de la insulina que no tiene una secuencia de la insulina nativa pero una secuencia de la insulina no nativa, muestra un título reducido in vitro y una afinidad de unión al receptor de la insulina reducida, y por lo tanto, su aclaramiento renal puede reducirse. Ellos descubrieron también que la vida media en sangre de la insulina puede aumentarse además al vincular el análogo de la insulina con un fragmento Fc de inmunoglobulina como un vehículo representativo eficaz para mejorar la vida media.

**[Divulgación]**

10 **[Problema técnico]**

Un objetivo de la presente divulgación es proporcionar un análogo de la insulina que esté preparado para tener un título reducido in vitro con el fin de prolongar la vida media in vivo de la insulina, y un conjugado preparado uniendo un vehículo al mismo.

15 En concreto, un objetivo de la presente divulgación es proporcionar un análogo de la insulina que tenga un título de insulina reducido, en comparación con la forma nativa.

20 Otro objetivo de la presente divulgación es proporcionar un conjugado del análogo de la insulina que se prepara uniendo el análogo de la insulina al vehículo.

Aún otro objetivo de la presente divulgación es proporcionar una formulación de la insulina de acción prolongada que incluye el conjugado de análogo de la insulina.

25 Aún otro objetivo de la presente divulgación es proporcionar un procedimiento para preparar el conjugado de análogo de la insulina.

30 Aún otro objetivo de la presente divulgación es proporcionar un procedimiento para aumentar la vida media in vivo mediante el uso del análogo de la insulina o del conjugado de análogo de la insulina preparado uniendo el análogo de la insulina al vehículo.

Un procedimiento divulgado además para tratar enfermedades relacionadas con la insulina, que incluye la etapa de administrar el análogo de la insulina o el conjugado de análogo de la insulina a un sujeto que necesite el mismo.

35 **[Solución Técnica]**

La presente invención se define en las reivindicaciones. La presente divulgación describe además materias relacionadas como se establece a continuación.

40 En un caso para lograr los objetivos anteriores, la presente divulgación proporciona un análogo de la insulina que tiene un título de insulina reducido, en comparación con la forma nativa, en la que se modifica un aminoácido de cadena B o cadena A.

45 En un ejemplo específico, la presente divulgación proporciona un análogo de la insulina que tiene una afinidad de unión al receptor de la insulina reducida.

50 En otro ejemplo específico, la presente divulgación proporciona un análogo de la insulina no nativo, en el que un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en el 8<sup>vo</sup> aminoácido, el 23<sup>er</sup> aminoácido, el 24<sup>to</sup> aminoácido y el 25<sup>to</sup> aminoácido de la cadena B y el 1<sup>er</sup> aminoácido, 2<sup>do</sup> aminoácido y el 19<sup>no</sup> aminoácido de la cadena A, está sustituido con alanina, o en el que 14<sup>to</sup> aminoácido de la cadena A se sustituye con ácido glutámico o asparagina en el análogo de la insulina de acuerdo con la presente divulgación.

55 Aún en otro ejemplo específico, la presente divulgación proporciona un análogo de la insulina, en el que el análogo de la insulina de acuerdo con la presente divulgación se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO. 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 y 36.

En otro caso, la presente divulgación proporciona un conjugado de análogo de la insulina que se prepara uniendo el análogo de la insulina descrito anteriormente a un vehículo capaz de prolongar la vida media.

60 En un ejemplo específico, la presente divulgación proporciona un conjugado de análogo de la insulina, en el que el conjugado de análogo de la insulina se prepara uniendo (i) el análogo de la insulina descrito anteriormente y (ii) una región Fc de inmunoglobulina a través de (iii) un enlazador peptídico o un enlazador no peptídico seleccionado del grupo que consiste de polietilenglicol, polipropilenglicol, copolímeros de etilenglicol propilenglicol, polioles polioxietilados, alcoholes polivinil, polisacáridos, dextrano, éter etil polivinilo, polímeros biodegradables, polímeros lipídicos, quitinas, ácido hialurónico y combinaciones de los mismos.

Aún en otro caso, la presente divulgación proporciona una formulación de la insulina de acción prolongada que incluye el conjugado de análogo de la insulina descrito anteriormente, en el que aumentan la duración y la estabilidad in vivo.

5 En un ejemplo específico, la presente divulgación proporciona una formulación de acción prolongada que se usa para el tratamiento de la diabetes.

En otro ejemplo, la presente divulgación proporciona un procedimiento para preparar el conjugado de análogo de la insulina descrito anteriormente.

10 Aún en otro ejemplo específico, la presente divulgación proporciona un procedimiento para aumentar la vida media in vivo mediante el uso del análogo de la insulina o del conjugado de análogo de la insulina que se prepara uniendo el análogo de la insulina y el vehículo.

15 Un procedimiento divulgado además para tratar enfermedades relacionadas con la insulina, que incluye la etapa de administrar el análogo de la insulina o el conjugado de análogo de la insulina a un sujeto que necesite el mismo.

### [Efectos ventajosos]

20 Un análogo de la insulina no nativa de la presente divulgación tiene un título de insulina reducido y una afinidad de unión al receptor de la insulina reducida, en comparación con la forma nativa, y de este modo evita mecanismos de eliminación in vivo. Por lo tanto, el análogo de la insulina ha aumentado la vida media en sangre in vivo, y un conjugado de análogo de la insulina-Fc de inmunoglobulina preparado mediante el uso del mismo se muestra una vida media en sangre notablemente aumentada, mejorando de este modo, la conveniencia de los pacientes que necesitan la administración de la insulina.

25

### [Descripción de los Dibujos]

30 La Figura 1 muestra el resultado del análisis de la pureza de un análogo de la insulina por electroforesis de proteínas, que es el resultado del análogo de la insulina representativo, Análogo núm. 7 (Carril 1: marcador de tamaño, Carril 2: insulina nativa, Carril 3: análogo de la insulina (núm. 7));

La Figura 2 muestra el resultado del análisis de la pureza de un análogo de la insulina por cromatografía de alta presión, que es el resultado del análogo de la insulina representativo, Análogo núm. 7 ((A) RP-HPLC, (B) SE-HPLC);

35 La Figura 3 muestra el resultado del mapeo peptídico de un análogo de la insulina, que es el resultado del análogo de la insulina representativo, Análogo núm. 7 ((A) insulina nativa, (B) análogo de la insulina (núm. 7));

La Figura 4 muestra el resultado del análisis de la pureza de un conjugado de análogo de la insulina-Fc de inmunoglobulina por electroforesis de proteínas, que es el resultado del análogo de la insulina representativo, Análogo núm. 7 (Carril 1: marcador de tamaño, Carril 2: conjugado de análogo de la insulina (núm. 7)-Fc de inmunoglobulina);

40 La Figura 5 muestra el resultado del análisis de la pureza de un conjugado de análogo de la insulina-Fc de inmunoglobulina por cromatografía de alta presión, que es el resultado del análogo de la insulina representativo, Análogo núm. 7 ((A) RP-HPLC, (B) SE-HPLC, (C) IE-HPLC); y

45 La Figura 6 muestra el resultado del análisis de la farmacocinética del conjugado de la insulina nativa-Fc de inmunoglobulina y del conjugado de análogo de la insulina-Fc de inmunoglobulina en ratas normales, que es el resultado del análogo de la insulina representativo, Análogo núm. 7 (○: conjugado insulina nativa-Fc de inmunoglobulina (21,7 nmol/kg), ●: conjugado insulina nativa-Fc de inmunoglobulina (65,1 nmol/kg), □: conjugado de análogo de la insulina-Fc de inmunoglobulina (21,7 nmol/kg), ■: conjugado de análogo de la insulina-Fc de inmunoglobulina (65,1 nmol/kg). (A) conjugado de la insulina nativa-Fc de inmunoglobulina y conjugado de análogo de la insulina (núm. 7)-Fc de inmunoglobulina, (B) conjugado de la insulina nativa-Fc de inmunoglobulina y conjugado de análogo de la insulina (núm. 8)-Fc de inmunoglobulina, (C) conjugado de la insulina nativa-Fc de inmunoglobulina y conjugado de análogo de la insulina (núm. 9)-Fc de inmunoglobulina.

50

### [Mejor Modo]

55 La presente divulgación se refiere a un análogo de la insulina que tiene un título in vitro reducido. Este análogo de la insulina se caracteriza porque tiene la secuencia de la insulina no nativa y, por lo tanto, tiene una afinidad de unión al receptor de la insulina reducida, en comparación con la insulina nativa, y en consecuencia, la eliminación mediada por el receptor se reduce notablemente por una constante de disociación aumentada, lo que resulta en una aumento de la vida media en sangre.

60

Como se usa en la presente memoria, el término "análogo de la insulina" incluye diversos análogos que tienen un título de insulina reducido, en comparación con la forma nativa.

65 El análogo de la insulina puede ser un análogo de la insulina que tiene un título de insulina reducido, en comparación con la forma nativa, en la que se modifica un aminoácido de cadena B o de la cadena A de la insulina. Las secuencias de aminoácidos de la insulina nativa son las siguientes.

- cadena A:

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

5 Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn (SEQ ID NO. 37)

- cadena B:

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-

10 Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-

15 Thr (SEQ ID NO. 38)

El análogo de la insulina usado en los ejemplos de la presente divulgación es un análogo de la insulina preparado por una técnica de recombinación genética. Sin embargo, la presente divulgación no se limita a la misma, sino que incluye todas las insulinas que tienen un título in vitro reducido. Preferentemente, el análogo de la insulina puede incluir insulinas invertidas, variantes de la insulina, fragmentos de insulina o similares, y el procedimiento de preparación puede incluir un procedimiento en fase sólida así como una técnica de recombinación genética, pero no se limita a los mismos.

El análogo de la insulina es un péptido que retiene una función de control de la glucosa en la sangre en el cuerpo, que es idéntico al de la insulina, y este péptido incluye agonistas de la insulina, derivados, fragmentos, variantes de los mismos o similares.

El agonista de la insulina de la presente divulgación se refiere a una sustancia que está unida al receptor de la insulina in vivo para exhibir las mismas actividades biológicas que la insulina, independientemente de la estructura de la insulina.

El análogo de la insulina de la presente divulgación indica un péptido que muestra una homología de secuencia de al menos 80 % con una secuencia de aminoácidos en comparación con la cadena A o la cadena B de la insulina nativa, tiene algunos grupos de residuos de aminoácidos alterados en forma de sustitución química (por ejemplo, alfa-metilación, alfa-hidroxilación), eliminación (por ejemplo, desaminación) o modificación (por ejemplo, N-metilación), y tiene la función de controlar la glucosa en sangre en el cuerpo. Con respecto a los objetivos de la presente divulgación, el análogo de la insulina es un análogo de la insulina que tiene una afinidad de unión al receptor de la insulina reducida, en comparación con la forma nativa, y los análogos de la insulina que tienen un título de insulina reducido en comparación con la forma nativa se incluyen sin limitación.

Mientras el análogo de la insulina sea capaz de exhibir baja internalización mediada por el receptor o eliminación mediada por el receptor, su tipo y tamaño no están particularmente limitados. Un análogo de la insulina, cuyo mecanismo principal de eliminación in vivo es la internalización mediada por el receptor o la eliminación mediada por el receptor, es adecuado para los objetivos de la presente divulgación.

El fragmento de la insulina de la presente divulgación indica el tipo de insulina en la que se añaden o eliminan uno o más aminoácidos, y los aminoácidos añadidos pueden ser aminoácidos no nativos (por ejemplo, aminoácidos de tipo D). Dichos fragmentos de la insulina conservan la función de controlar la glucosa en sangre en el cuerpo.

La variante de la insulina de la presente divulgación indica un péptido que difiere de la insulina en una o más secuencias de aminoácidos, y conserva la función de controlar la glucosa en sangre en el cuerpo.

Los procedimientos respectivos para la preparación de agonistas de la insulina, derivados, fragmentos y variantes de la presente divulgación pueden usarse independientemente o en combinación. En la presente divulgación se incluyen, por ejemplo, los péptidos de los cuales una o más secuencias de aminoácidos difieren de las de la insulina y que tienen desaminación en el residuo de aminoácido amino terminal y tienen además la función de controlar la glucosa en sangre en el cuerpo.

En concreto, el análogo de la insulina puede ser un análogo de la insulina en el que uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en el 8<sup>vo</sup> aminoácido, 23<sup>er</sup> aminoácido, 24<sup>to</sup> aminoácido y el 25<sup>to</sup> aminoácido de la cadena B y el 1<sup>er</sup> aminoácido, 2<sup>do</sup> aminoácido, 14<sup>to</sup> aminoácido y el 19<sup>no</sup> aminoácido de la cadena A están sustituidos con otros aminoácidos, y preferentemente, en el que uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en el 8<sup>vo</sup> aminoácido, 23<sup>er</sup> aminoácido, 24<sup>to</sup> aminoácido y el 25<sup>to</sup> aminoácido de la cadena B y el 1<sup>er</sup> aminoácido, 2<sup>do</sup> aminoácido y el 19<sup>no</sup> aminoácido de la cadena A están sustituidos con alanina o en los que 14<sup>to</sup> aminoácido de la cadena A está sustituido con ácido glutámico o asparagina. Además, el análogo de la insulina puede seleccionarse del grupo que consiste en la SEQ ID NO. 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 y 36, pero puede incluir cualquier análogo de la insulina que tenga una afinidad de unión al receptor de insulina reducida sin limitación.

De acuerdo con un ejemplo de la presente divulgación, los análogos de la insulina de las SEQ ID NO. 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 y 36, particularmente, se encontró que los análogos de la insulina representativos, 7, 8 y 9 (SEQ ID NO. 32, 34 y 36) tienen una afinidad de unión al receptor de la insulina reducida in vitro, en comparación con la forma nativa (Tabla 4).

5

En otro caso, la presente divulgación proporciona un conjugado de análogo de la insulina que se prepara uniendo el análogo de la insulina y un vehículo.

10

Como se usa en la presente memoria, el término "vehículo" indica una sustancia capaz de aumentar la vida media in vivo del análogo de la insulina unido. El análogo de la insulina de acuerdo con la presente divulgación se caracteriza porque tiene una afinidad de unión al receptor de la insulina notablemente reducida, en comparación con la forma nativa, y evita la eliminación mediada por el receptor o la eliminación renal. Por lo tanto, si un vehículo que se conoce que aumenta la vida media in vivo cuando se une a los diversos polipéptidos fisiológicamente activos conocidos se une con el análogo de la insulina, es evidente que la vida media in vivo puede mejorarse y el conjugado resultante puede usarse como una formulación de acción prolongada.

15

Por ejemplo, debido a que la mejora de la vida media es la primera prioridad, el vehículo a unir con la nueva insulina que tiene un título reducido no está limitada a la región Fc de inmunoglobulina. El vehículo incluye un material biocompatible que puede prolongar la vida media in vivo al unirlo con cualquier material biocompatible, capaz de reducir la eliminación renal, seleccionado del grupo que consiste de diversos polímeros (por ejemplo, polietilenglicol y ácido graso, albúmina y fragmentos de la misma, secuencia de aminoácidos particular, etc.), albúmina y fragmentos de la misma, materiales de unión a la albúmina y polímeros de unidades repetidas de secuencias de aminoácidos particulares, anticuerpo, fragmentos de anticuerpos, materiales de unión al FcRn, tejido conectivo in vivo o derivados de los mismos, nucleótidos, fibronectina, transferrina, sacárido y polímeros, pero no se limita a los mismos. Además, el procedimiento para unir el material biocompatible capaz de prolongar la vida media in vivo al análogo de la insulina que tiene un título reducido incluye la recombinación genética, la conjugación in vitro o similares. Los ejemplos del material biocompatible pueden incluir un material de unión al FcRn, ácido graso, polietilenglicol, un fragmento de aminoácido, o albúmina. El material de unión al FcRn puede ser una región Fc de inmunoglobulina.

20

25

El análogo de la insulina y el material biocompatible como vehículo pueden estar unidos entre sí a través de un péptido o un polímero no peptídico como un enlazador.

30

El conjugado de la insulina puede ser un conjugado de análogo de la insulina que se prepara uniendo (i) el análogo de la insulina y (ii) una región Fc de inmunoglobulina a través de (iii) un enlazador peptídico o un enlazador no peptídico seleccionado del grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol, copolímeros de etilenglicol-propilenglicol, polioles polioxiethylados, alcoholes polivinilos, polisacáridos, dextrano, éter etil polivinilo, polímeros biodegradables, polímeros lipídicos, quitinas, ácido hialurónico y combinaciones del mismo.

35

En un ejemplo específico del conjugado de análogo de la insulina de la presente divulgación, un polímero no peptídico como enlazador está unido al extremo amino de la cadena B del análogo de la insulina. En otro ejemplo específico del conjugado de la presente divulgación, un polímero no peptídico como enlazador está unido al residuo de la cadena B del análogo de la insulina. La modificación en la cadena A de la insulina conduce a una reducción en la actividad y a la seguridad. En estos ejemplos, por lo tanto, el polímero no peptídico como enlazador está unido a la cadena B de la insulina, manteniendo de este modo la actividad de la insulina y mejorando la seguridad.

40

45

Como se usa en la presente memoria, el término "actividad" significa la capacidad de la insulina para unirse al receptor de la insulina, y significa que la insulina se une a su receptor para exhibir su acción. Tal unión del polímero no peptídico al extremo amino de la cadena B de la insulina de la presente divulgación puede lograrse mediante control del pH, y el intervalo de pH preferido es de 4,5 a 7,5.

50

Como se usa en la presente memoria, el término "extremo N" puede usarse indistintamente como "región N terminal".

En un ejemplo específico, los presentes autores prepararon un conjugado de análogo de la insulina-PEG-Fc de inmunoglobulina uniendo el PEG al extremo N de una región Fc de inmunoglobulina, y acoplado selectivamente el extremo N de la cadena B de insulina a la misma. La vida media en suero de este conjugado de análogo de la insulina-PEG-Fc de inmunoglobulina aumentó, en comparación con el no conjugado, y mostró un efecto hipoglucémico en los modelos animales con enfermedades. Por lo tanto, es evidente que puede prepararse una nueva formulación de la insulina de acción prolongada que mantenga la actividad in vivo.

55

La región Fc de inmunoglobulina es segura para su uso como vehículo de fármacos porque es un polipéptido biodegradable que se metaboliza in vivo. Además, la región Fc de inmunoglobulina tiene un peso molecular relativamente bajo, en comparación con las moléculas de inmunoglobulina completas, y de este modo, es ventajoso en términos de preparación, purificación y rendimiento del conjugado. La región Fc de inmunoglobulina no contiene un fragmento Fab, que es altamente no homogéneo debido a las diferentes secuencias de aminoácidos de acuerdo con las subclases de anticuerpos, y de este modo puede esperarse que la región Fc de inmunoglobulina pueda aumentar considerablemente la homogeneidad de las sustancias y ser menos antigénico en la sangre.

60

65

Como se usa en la presente memoria, el término "región Fc de inmunoglobulina" se refiere a una proteína que contiene la región constante de la cadena pesada 2 (CH2) y la región constante de la cadena pesada 3 (CH3) de una inmunoglobulina, excluyendo las regiones variables de la cadena pesada y las cadenas ligeras, la región constante de la cadena pesada 1 (CH1) y la región constante de la cadena ligera 1 (CL1) de la inmunoglobulina. Puede incluir además una región de bisagra en la región constante de la cadena pesada. La región Fc de inmunoglobulina de la presente divulgación puede contener además, una parte o toda la región Fc que incluye la región constante de la cadena pesada 1 (CH1) y/o la región constante de la cadena ligera 1 (CL1), excepto las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina, siempre que tenga un efecto sustancialmente similar o mejor que el de la forma nativa. Puede ser además un fragmento que tiene una delección en una porción relativamente larga de la secuencia de aminoácidos de CH2 y/o CH3.

Es decir, la región Fc de inmunoglobulina de la presente divulgación puede incluir 1) un dominio CH1, un dominio CH2, un dominio CH3 y un dominio CH4, 2) un dominio CH1 y un dominio CH2, 3) un dominio CH1 y un dominio CH3, 4) un dominio CH2 y un dominio CH3, 5) una combinación de uno o más dominios y una región bisagra de inmunoglobulina (o una porción de la región bisagra), y 6) un dímero de cada dominio de las regiones constantes de la cadena pesada y la región constante de la cadena ligera.

Además, la región Fc de inmunoglobulina de la presente divulgación incluye una secuencia derivada (mutante) de la misma, así como una secuencia de aminoácidos nativa. Un derivado de secuencia de aminoácidos tiene una secuencia que es diferente de la secuencia de aminoácidos nativa debido a una delección, una inserción, una sustitución no conservativa o combinaciones de las mismas de uno o más residuos de aminoácidos. Por ejemplo, en una Fc de IgG, los residuos de aminoácidos que se conoce que son importantes en la unión, en las posiciones 214 a 238, 297 a 299, 318 a 322, o 327 a 331, pueden usarse como un objetivo adecuado para la modificación.

Además, son posibles otros derivados diversos, que incluyen los derivados que tienen una delección de una región capaz de formar un enlace disulfuro, una delección de varios residuos de aminoácidos en el extremo N de una forma Fc nativa, o una adición de residuo de metionina al extremo N de una forma Fc nativa. Además, para eliminar las funciones efectoras, puede producirse una delección en un sitio de unión al complemento, tal como un sitio de unión a C1q y un sitio ADCC (citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos). Las técnicas para preparar tales derivados de secuencia de la región Fc de inmunoglobulina se divulgan en los documentos WO 97/34631 y WO 96/32478.

Los intercambios de aminoácidos en proteínas y péptidos, que generalmente no alteran la actividad de las moléculas, son conocidos en la técnica (H. Neurath, RL Hill, The Proteins, Academic Press, Nueva York, 1979). Los intercambios más comunes son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly, en ambas direcciones.

La región Fc, si se desea, puede modificarse por fosforilación, sulfatación, acrilación, glicosilación, metilación, farnesilación, acetilación, amidación o similares.

Los derivados de Fc mencionados anteriormente son derivados que tienen una actividad biológica idéntica a la de la región Fc de la presente divulgación o la estabilidad estructural mejorada contra el calor, el pH o similares.

Además, estas regiones Fc pueden obtenerse de formas nativas aisladas de seres humanos y otros animales, que incluyen vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas y cobayas, o pueden ser recombinantes o derivados de los mismos, obtenidos de las células animales transformadas o de microorganismos. Aquí, pueden obtenerse de una inmunoglobulina nativa aislando las inmunoglobulinas completas de seres humanos o animales y tratándolas con una enzima proteolítica. La papaína digiere la inmunoglobulina nativa en las regiones Fab y Fc, y el tratamiento con pepsina produce la producción de pF'c y F(ab)<sub>2</sub>. Estos fragmentos pueden someterse a cromatografía de exclusión por tamaño para aislar el Fc o el pF'c.

Preferentemente, una región Fc de origen humano es una región Fc de inmunoglobulina recombinante que se obtiene de un microorganismo.

Además, la región Fc de inmunoglobulina puede estar en forma de cadenas de azúcar nativas, cadenas de azúcar aumentadas en comparación con una forma nativa o cadenas de azúcar disminuidas en comparación con la forma nativa, o tal vez en una forma desglicosilada. El aumento, disminución o eliminación de las cadenas de azúcar Fc de inmunoglobulina puede lograrse mediante procedimientos comunes en la técnica, como un procedimiento químico, un procedimiento enzimático y un procedimiento de ingeniería genética mediante el uso de un microorganismo. Aquí, la eliminación de las cadenas de azúcar de una región Fc da como resultado una fuerte disminución en la afinidad de unión al complemento (c1q) y una disminución o pérdida en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos o la citotoxicidad dependiente del complemento, lo que no induce de este modo las respuestas inmunes innecesarias in vivo. En este sentido, una región Fc de inmunoglobulina en una forma desglicosilada o aglicosilada puede ser más adecuada para el objetivo de la presente divulgación como un vehículo del fármaco.

El término "desglicosilación", como se utiliza en la presente memoria, significa eliminar enzimáticamente restos de azúcar de una región Fc, y el término "aglicosilación" significa que una región Fc se produce en una forma no glicosilada por un procarionta, preferentemente E. coli.

5 Por otro lado, la región Fc de inmunoglobulina puede derivarse de seres humanos u otros animales, que incluyen vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas y cobayas, y preferentemente los seres humanos. La región Fc de inmunoglobulina puede ser además, una región Fc que se deriva de IgG, IgA, IgD, IgE e IgM, o que se forma mediante combinaciones de las mismas o híbridos de las mismas. Preferentemente, se deriva de IgG o IgM, que se encuentra entre las proteínas más abundantes en la sangre humana, y con máxima preferencia, de IgG que se conoce que mejora la vida media de las proteínas de unión al ligando.

10 Por otro lado, el término "combinación", como se utiliza en la presente memoria, significa que los polipéptidos que codifican regiones Fc de inmunoglobulina de cadena simple del mismo origen están unidos a un polipéptido de cadena simple de un origen diferente para formar un dímero o multímero. Es decir, puede formarse un dímero o multímero a partir de dos o más fragmentos seleccionados del grupo que consiste en fragmentos Fc de IgG, Fc de IgA, Fc de IgM, Fc de IgD y Fc de IgE.

15 El término "híbrido", como se utiliza en la presente memoria, significa que las secuencias que codifican dos o más regiones Fc de inmunoglobulina de diferente origen están presentes en una región Fc de inmunoglobulina de cadena sencilla. En la presente divulgación, son posibles diversos tipos de híbridos. Es decir, los híbridos de dominio pueden estar compuestos de uno a cuatro dominios seleccionados del grupo que consiste en CH1, CH2, CH3 y CH4 de Fc de IgG, Fc de IgM, Fc de IgA, Fc de IgE y Fc de IgD, y pueden incluir la región bisagra.

20 Por otro lado, la IgG se divide en las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y la presente divulgación incluye combinaciones e híbridos de las mismas. Se prefieren las subclases IgG2 e IgG4, y con la máxima preferencia la región Fc de la IgG4 que rara vez tiene la función efectora, tal como la CDC (citotoxicidad dependiente del complemento). Es decir, como el vehículo del fármaco de la presente divulgación, con máxima preferencia la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc no glucosilada derivada de la IgG4 humana. La región Fc de origen humano es con mayor preferencia que una región Fc no de origen humano, que puede actuar como un antígeno en el cuerpo humano y causar respuestas inmunes inconvenientes, tal como la producción de un nuevo anticuerpo contra el antígeno.

25 En el ejemplo específico del conjugado de análogo de la insulina, ambos extremos del polímero no peptídico pueden unirse al extremo N de la región Fc de inmunoglobulina y al grupo amina del extremo N de la cadena B del análogo de la insulina o el grupo ε-amino o el grupo tiol del residuo interno de lisina de la cadena B, respectivamente.

30 El análogo de la región Fc-enlazador-insulina de la presente divulgación se realiza en diversas relaciones molares. Es decir, el número del fragmento Fc y/o enlazador unido a un solo análogo de la insulina no está limitado.

35 Además, el enlace de la región Fc, un cierto enlazador y el análogo de la insulina de la presente divulgación puede incluir todos los tipos de enlaces covalentes y todos los tipos de enlaces no covalentes, tales como enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrófobas cuando la región Fc y el análogo de la insulina se expresan como una proteína de fusión por la recombinación genética. Sin embargo, con respecto a la actividad fisiológica del análogo de la insulina, el enlace se realiza preferentemente mediante enlaces covalentes, pero no está limitado a los mismos.

40 Por otro lado, la región Fc de la presente divulgación, un cierto enlazador y el análogo de la insulina pueden unirse entre sí en un extremo N o en el extremo C, y preferentemente en un grupo libre, y especialmente, un enlace covalente puede formarse en un extremo amino terminal, un residuo de aminoácido de lisina, un residuo de aminoácido de histidina o un residuo de cisteína libre.

45 Además, el enlace de la región Fc de la presente divulgación, un cierto enlazador y el análogo de la insulina puede hacerse en una determinada dirección. Es decir, el enlazador puede unirse al extremo N, al extremo C o a un grupo libre de la región Fc de inmunoglobulina, y puede unirse además al extremo N, al extremo C o a un grupo libre del análogo de la insulina.

50 El enlazador no peptídico puede unirse al grupo amina N-terminal del fragmento de inmunoglobulina, y no está limitado a ninguno de los residuos de lisina o residuo de cisteína de la secuencia del fragmento de inmunoglobulina.

55 Además, en el ejemplo específico del conjugado de análogo de la insulina, el extremo del polímero no peptídico puede unirse al residuo de aminoácido interno o al grupo reactivo libre capaz de unirse al grupo reactivo al final del polímero no peptídico, además del extremo N de la región Fc de inmunoglobulina, pero no está limitado al mismo.

60 En la presente divulgación, el polímero no peptídico significa un polímero biocompatible que incluye dos o más unidades repetitivas unidas entre sí, en las que las unidades repetitivas están unidas por cualquier enlace covalente que excluye el enlace peptídico. Tal polímero no peptídico puede tener dos extremos o tres extremos.

65

5 El polímero no peptídico que puede usarse en la presente divulgación puede seleccionarse del grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, polioles polioxetilados, alcohol de polivinilo, polisacáridos, dextrano, éter etil polivinilo, polímeros biodegradables tales como PLA (poli(ácido láctico) y PLGA (poli ácido láctico–glicólico), polímeros lipídicos, quitinas, ácido hialurónico o la combinación de los mismos y preferentemente polietilenglicol. Los derivados de los mismos bien conocidos en la técnica y que se preparan fácilmente dentro del conocimiento de la técnica se incluyen además en el ámbito de la presente divulgación.

10 El enlazador peptídico que se usa en la proteína de fusión obtenida por un procedimiento convencional de fusión inframem tiene inconvenientes, que fácilmente se escinde in vivo por una enzima proteolítica, y de este modo un efecto suficiente de aumentar la vida media en sangre del fármaco activo por un vehículo no puede obtenerse como se esperaba. En la presente divulgación, sin embargo, el conjugado puede prepararse mediante el uso del enlazador no peptídico así como el enlazador peptídico. En el enlazador no peptídico, el polímero que tiene resistencia a la enzima proteolítica puede usarse para mantener la vida media en sangre del péptido que es similar a la del vehículo. Por lo tanto, cualquier polímero no peptídico puede usarse sin limitación, siempre que sea un polímero que tenga la función mencionada anteriormente, es decir, un polímero que tenga resistencia a la enzima proteolítica in vivo. El polímero no peptídico tiene un peso molecular que varía de 1 a 100 kDa, y preferentemente, que varía de 1 a 20 kDa.

20 El polímero no peptídico de la presente divulgación, unido a la región Fc de inmunoglobulina, puede ser un polímero o una combinación de diferentes tipos de polímeros.

El polímero no peptídico usado en la presente divulgación tiene un grupo reactivo capaz de unirse a la región Fc de inmunoglobulina y al fármaco proteico.

25 El polímero no peptídico tiene un grupo reactivo en ambos extremos, que se selecciona preferentemente del grupo que consiste en un grupo aldehído reactivo, un grupo propionaldehído, un grupo butiraldehído, un grupo maleimida y un derivado de succinimida. El derivado de succinimida puede ser propionato de succinimidilo, hidroxí succinimidilo, succinimidil carboximetilo, o carbonato de succinimidilo. Particularmente, cuando el polímero no peptídico tiene un grupo aldehído reactivo en ambos extremos del mismo, es efectivo en la unión en ambos extremos con un polipéptido fisiológicamente activo y una inmunoglobulina con mínimas reacciones inespecíficas. Un producto final generado por alquilación reductora por un enlace aldehído es mucho más estable que el unido por un enlace amida. El grupo reactivo aldehído se une selectivamente a un extremo N a un pH bajo, y se une a un residuo de lisina para formar un enlace covalente a un pH alto, como pH 9,0.

35 Los grupos reactivos en ambos extremos del polímero no peptídico pueden ser iguales o diferentes entre sí. Por ejemplo, el polímero no peptídico puede poseer un grupo maleimida en un extremo y un grupo aldehído, un grupo propionaldehído o un grupo butiraldehído en el otro extremo. Cuando se usa un polietilenglicol que tiene un grupo hidroxilo reactivo en ambos extremos del mismo como polímero no peptídico, el grupo hidroxilo puede activarse a diversos grupos reactivos mediante reacciones químicas conocidas, o un polietilenglicol que tiene un grupo reactivo modificado disponible comercialmente puede usarse para preparar el conjugado de análogo de la insulina de cadena simple de la presente divulgación.

40 El conjugado de análogo de la insulina de la presente divulgación mantiene actividades in vivo de la insulina convencional, tales como el metabolismo energético y el metabolismo del azúcar, y aumenta además la vida media en sangre del análogo de la insulina y aumenta notablemente la duración de la eficacia in vivo del péptido, y por lo tanto, el conjugado es útil en el tratamiento de la diabetes.

45 En un ejemplo de la presente divulgación, se confirmó que el análogo de la insulina que tiene una afinidad de unión al receptor de la insulina reducida exhibe una vida media in vivo mucho más alta que el conjugado de la insulina nativo, cuando se une al vehículo capaz de prolongar la vida media in vivo (Figura 6).

50 En otro caso, la presente divulgación proporciona una formulación de la insulina de acción prolongada que incluye el conjugado de análogo de la insulina. La formulación de la insulina de acción prolongada puede ser una formulación de la insulina de acción prolongada que tenga mayor duración y estabilidad in vivo. La formulación de acción prolongada puede ser una composición farmacéutica para el tratamiento de la diabetes.

55 La composición farmacéutica que incluye el conjugado de la presente divulgación puede incluir vehículos farmacéuticamente aceptables. Para la administración oral, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir un aglutinante, un lubricante, un desintegrador, un excipiente, un solubilizante, un agente dispersante, un estabilizador, un agente de suspensión, un agente colorante, un perfume o similar. Para preparaciones inyectables, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir un agente tamponado, un agente conservante, un analgésico, un solubilizante, un agente isotónico y un estabilizador. Para preparaciones para administración tópica, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir una base, un excipiente, un lubricante, un agente conservante o similares. La composición farmacéutica de la presente divulgación puede formularse en una variedad de formas de dosificación en combinación con los vehículos farmacéuticamente aceptables mencionados anteriormente. Por ejemplo, para la administración oral, la composición farmacéutica puede formularse en comprimidos, grageas, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes u obleas. Para preparaciones inyectables, la composición farmacéutica puede formularse en

ampollas de dosis única o en un recipiente multidosis. La composición farmacéutica puede formularse además en soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas y preparaciones de liberación sostenida.

5 Por otro lado, los ejemplos de vehículos, excipientes y diluyentes adecuados para la formulación incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, acacia, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, metilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, talco, estearato de magnesio, aceites minerales o similares.

10 Además, las formulaciones farmacéuticas pueden incluir además rellenos, agentes anticoagulantes, lubricantes, humectantes, perfumes, antisépticos o similares.

15 Se divulga además en la presente memoria un procedimiento para tratar enfermedades relacionadas con la insulina, que incluye administrar el análogo de la insulina o el conjugado de análogo de la insulina a un sujeto que necesite el mismo.

El conjugado de acuerdo con la presente divulgación es útil en el tratamiento de la diabetes y, por lo tanto, esta enfermedad puede tratarse administrando la composición farmacéutica que incluye la misma.

20 El término "administración", como se utiliza en la presente memoria, significa la introducción de una sustancia predeterminada en un paciente mediante un cierto procedimiento adecuado. El conjugado de la presente divulgación puede administrarse a través de cualquiera de las rutas comunes, siempre que sea capaz de hacer reaccionar un tejido deseado. Puede realizarse la administración intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, oral, tópica, intranasal, intrapulmonar e intrarrectal, pero la presente divulgación no se limita a los mismos. Sin embargo, dado que los péptidos se digieren tras la administración oral, los ingredientes activos de una composición para administración oral deben recubrirse o formularse para protegerlos contra la degradación en el estómago. Preferentemente, la presente composición puede administrarse en una forma inyectable. Además, la composición farmacéutica puede administrarse mediante el uso de un cierto aparato capaz de transportar los ingredientes activos a una célula objetivo.

30 Además, la composición farmacéutica de la presente divulgación puede determinarse por varios factores relacionados, que incluyen los tipos de enfermedades a tratar, las rutas de administración, la edad, el sexo, el peso y la gravedad de la enfermedad del paciente, así como por los tipos del fármaco como componente activo. Dado que la composición farmacéutica de la presente divulgación tiene una duración y un título in vivo excelentes, tiene la ventaja de reducir en gran medida la frecuencia de la administración de la formulación farmacéutica de la presente divulgación.

35 Aún en otro caso, la presente divulgación proporciona un procedimiento para preparar el conjugado de análogo de la insulina, que incluye preparar el análogo de la insulina; preparar el vehículo; y unir el análogo de la insulina y el vehículo.

40 Aún en otro caso, la presente divulgación proporciona un procedimiento para aumentar la vida media in vivo mediante el uso del análogo de la insulina o el conjugado de análogo de la insulina que se prepara uniendo el análogo de la insulina y el vehículo.

#### 45 **[Modo]**

De aquí en adelante, la presente divulgación se describirá en más detalles con referencia a los ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos son sólo con fines ilustrativos, y la divulgación no pretende estar limitada por estos ejemplos.

#### 50 **Ejemplo 1: Preparación del vector de expresión del análogo de la insulina de cadena sencilla**

Para preparar los análogos de la insulina, cada uno de ellos con un aminoácido modificado en la cadena A o en la cadena B, mediante el uso del vector de expresión de la insulina nativa como patrón, se sintetizaron los oligonucleótidos directo y reverso (Tabla 2), y después se llevó a cabo la PCR para amplificar cada gen análogo.

55 En la siguiente Tabla 1, se proporcionan las secuencias de aminoácidos modificadas en la cadena A o en la cadena B y los nombres de los análogos. Es decir, el Análogo 1 representa que la 1<sup>ra</sup> glicina de la cadena A se sustituye con alanina, y el Análogo 4 representa que la 8<sup>va</sup> glicina de la cadena B se sustituye con alanina.

60

65

[Tabla 1]

Análogo	Secuencia modificada
Análogo 1	A <sup>1</sup> G → A
Análogo 2	A <sup>2</sup> I → A
Análogo 3	A <sup>19</sup> Y → A
Análogo 4	B <sup>8</sup> G → A
Análogo 5	B <sup>23</sup> G → A
Análogo 6	B <sup>24</sup> F → A
Análogo 7	B <sup>25</sup> F → A
Análogo 8	A <sup>14</sup> Y → E
Análogo 9	A <sup>14</sup> Y → N

Los cebadores para la amplificación del análogo de la insulina se proporcionan en la siguiente Tabla 2.

[Tabla 2]

Análogos	Secuencia	SEQ ID NO.
Análogo 1	5' GGGTCCCTGCAGAAGCGTGCGATTGTGGAACAATGCTGT 3' 5' ACAGCATTGTTCCACAATCGCACGCTTCTGCAGGGACCC 3'	SEQ ID NO.1 SEQ ID NO.2
Análogo 2	5' TCCCTGCAGAAGCGTGGCGCGGTGGAACAATGCTGTACC 3' 5' GGTACAGCATTGTTCCACCGCGCCACGCTTCTGCAGGGA 3'	SEQ ID NO.3 SEQ ID NO.4
Análogo 3	5' CTCTACCAGCTGGAAAACGCGTGTAAGTGGAGGATCC 3' 5' GGATCCTCAGTTACACGCGTTTTCCAGCTGGTAGAG 3'	SEQ ID NO.5 SEQ ID NO.6
Análogo 4	5' GTTAACCAACACTTGTGTGCGTCACACCTGGTGGGAAGCT 3' 5' AGCTTCCACCAGGTGTGACGCACACAAGTGTGGTTAAC 3'	SEQ ID NO.7 SEQ ID NO.8
Análogo 5	5' CTAGTGTGCGGGGAACGAGCGTTCTTCTACACACCCAAG 3' 5' CTTGGGTGTGTAGAAGAACGCTCGTTCCCCGCACACTAG 3'	SEQ ID NO.9 SEQ ID NO.10
Análogo 6	5' GTGTGCGGGGAACGAGGCGCGTTCTACACACCCAAGACC 3' 5' GGTCTTGGGTGTGTAGAACGCGCCTCGTTCCCCGCACAC 3'	SEQ ID NO.11 SEQ ID NO.12
Análogo 7	5' TGCGGGGAACGAGGCTTCGCGTACACACCCAAGACCCGC 3' 5' GCGGGTCTTGGGTGTGTACGCGAAGCCTCGTTCCCCGCA 3'	SEQ ID NO.13 SEQ ID NO.14
Análogo 8	5'-CCAGCATCTGCTCCCTCGAACAGCTGGAGAACTACTG-3' 5'-Cagtagttctccagctgttcgagggagcagatgctgg-3'	SEQ 10 NO.15 SEQ ID NO.16
Análogo 9	5'-CAGCATCTGCTCCCTCAACCAGCTGGAGAACTAC-3' 5'-Gtagttctccagctgttcgagggagcagatgctg-3'	SEQ ID NO.17 SEQ ID NO.18

La PCR para la amplificación del análogo de la insulina se realizó bajo condiciones de 95 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos, 68 °C durante 6 minutos durante 18 ciclos. Los fragmentos de los análogos de la insulina obtenidos en las condiciones se insertaron en el vector pET22b para expresarse como cuerpos de inclusión intracelular, y los vectores de expresión resultantes se designaron como análogos de la insulina pET22b 1 al 9. Los vectores de expresión que contienen ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos de los análogos de la insulina 1 al 9 bajo el control del promotor T7, y las proteínas análogas a la insulina se expresaron como cuerpos de inclusión en las células huésped.

Las secuencias de ADN y las secuencias de proteínas de los análogos de la insulina 1 al 9 se proponen en la siguiente Tabla 3.

ES 2 770 776 T3

[Tabla 3]

Análogo		Secuencia	SEQ ID NO.
5	Análogo 1	ADN	19
10		TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GCG ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	
15		Proteína	20
20		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 <b>Ala</b> Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	
25	Análogo 2	ADN	21
30		TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC GCG GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	
35		Proteína	22
40		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 <b>Ala</b> Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	
45	Análogo 3	ADN	23
50		TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC GCG TGC AAC	
55		Proteína	24
60		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 <b>Ala</b> Cys Asn	
65	Análogo 4	ADN	25
		TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GCG TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	
		Proteína	26
		Phe Val Asn Gln His Leu Cys <b>Ala</b> 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	

ES 2 770 776 T3

Análogo		Secuencia	SEQ ID NO.
Análogo 5	ADN	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GCG TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	27
	Proteína	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg <b>Ala</b> 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	28
Análogo 6	ADN	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC GCG TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	29
	Proteína	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly <b>Ala</b> 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	30
Análogo 7	ADN	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC GCG TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC TAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC	31
	Proteína	Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe <b>Ala</b> 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	32
Análogo 8	ADN	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC GAA CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC TGA	33
	Proteína	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 <b>Glu</b> Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	34

Análogo		Secuencia	SEQ ID NO.
Análogo 9	ADN	TTC GTT AAC CAA CAC TTG TGT GGC TCA CAC CTG GTG GAA GCT CTC TAC CTA GTG TGC GGG GAA CGA GGC TTC TTC TAC ACA CCC AAG ACC CGC CGG GAG GCA GAG GAC CTG CAG GTG GGG CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT GGT GCA GGC AGC CTG CAG CCC TTG GCC CTG GAG GGG TCC CTG CAG AAG CGT GGC ATT GTG GAA CAA TGC TGT ACC AGC ATC TGC TCC CTC AAC CAG CTG GAG AAC TAC TGC AAC TGA	35
	Proteína	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 <b>Asn</b> Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn	36

**Ejemplo 2: Expresión del péptido de fusión análogo de la insulina recombinante**

Las expresiones de análogos de la insulina recombinantes se llevaron a cabo bajo el control del promotor T7. La E. coli BL21–DE3 (E. coli B F–dcm ompT hsdS (rB–mB–) gal λDE3); Novagen) se transformó con cada uno de los vectores que expresan análogos de la insulina recombinante. La transformación se realizó de acuerdo con el protocolo recomendado (Novagen). Las colonias individuales transformadas con cada vector de expresión recombinante se recogieron e inocularon en 2X Luria Broth (LB) que contenía ampicilina (50 µg/ml) y se cultivaron a 37 °C durante 15 horas. El caldo de cultivo de la cepa recombinante y el medio 2X LB que contenía 30 % de glicerol se mezclaron en una proporción de 1:1 (v/v). Cada 1 ml se dispensó a un criotubo y se almacenó a –140 °C, que se usó como una reserva celular de producción de la proteína de fusión recombinante.

Para expresar los análogos de la insulina recombinante, se descongeló 1 vial de cada reserva celular y se inoculó en 500 ml de caldo Luria 2X, y se cultivó con agitación a 37 °C durante 14~16 horas. El cultivo finalizó, cuando la DO600 alcanzó 5,0 o más. El caldo de cultivo se usó como caldo de cultivo de semillas. Este caldo de cultivo de semillas se inoculó en un fermentador de 50 L (MSJ–U2, B.E.MARUBISHI, Japón) que contenía 17 L de medio de fermentación, y se inició la fermentación inicial en el baño. Las condiciones de cultivo se mantuvieron a una temperatura de 37 °C, un caudal de aire de 20 L/min (1 vvm), una velocidad de agitación de 500 rpm y un pH de 6,70 mediante el uso de una solución de amoníaco al 30 %. La fermentación se llevó a cabo en modo de alimentación por lotes agregando una solución de alimentación, cuando los nutrientes se agotaron en el caldo de cultivo. El crecimiento de la cepa se controló por valor de DO. El IPTG se introdujo en una concentración final de 500 µM, cuando el valor de DO fue superior a 100. Después de la introducción, el cultivo se llevó a cabo durante aproximadamente 23~25 horas. Después de terminar el cultivo, las cepas recombinantes se cosecharon por centrifugación y se almacenaron a –80 °C hasta su uso.

**Ejemplo 3: Recuperación y renaturalización del análogo de la insulina recombinante**

Para cambiar los análogos de la insulina recombinante expresados en el ejemplo 2 en formas solubles, seguido de la renaturalización las células se rompieron. Se resuspendieron 100 g (peso húmedo) del sedimento celular en 1 L del tampón de lisis (Tris–HCl 50 mM (pH 9,0), EDTA 1 mM (pH 8,0), NaCl 0,2 M y Tritón X–100 al 0,5 %). Las células se rompieron mediante el uso de un procesador de microfluidificador M–110EH (AC Technology Corporation Modelo M1475C) a una presión de funcionamiento de 15,000 psi. De este modo el lisado celular se rompió, se centrifugó a 7,000 rpm y 4 °C durante 20 minutos. El sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en 3 L de tampón de lavado (Triton X–100 al 0,5 % y Tris–HCl 50 mM (pH 8,0), NaCl 0,2 M, EDTA 1 mM). Después de la centrifugación a 7,000 rpm y 4 °C durante 20 minutos, el sedimento celular se resuspendió en agua destilada, seguido de centrifugación de la misma manera. De este modo el sedimento obtenido se resuspendió en 400 ml de tampón (glicina 1 M, 3,78 g de cisteína–HCl, pH 10,6) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. De este modo para recuperar el análogo de la insulina recombinante resuspendido, se añadieron 400 ml de urea 8 M y se agitó a 40 °C durante 1 hora. Para la renaturalización de los análogos de la insulina recombinante solubilizada, la centrifugación se llevó a cabo a 7,000 rpm y 4 °C durante 30 minutos, y se obtuvo el sobrenadante. Se añadieron 2 L de agua destilada a la misma mediante el uso de una bomba peristáltica a un caudal de 1000 ml/h mientras se agitaba a 4 °C durante 16 horas.

**Ejemplo 4: Purificación por cromatografía de unión de cationes**

La muestra renaturalizada se cargó en una columna Source S (GE healthcare) equilibrada con tampón de citrato de sodio 20 mM (pH 2,0) que contenía etanol al 45 %, y después las proteínas análogas de la insulina se eluyeron en 10 volúmenes de columna con un gradiente lineal de 0 % a tampón de citrato de sodio al 100 % 20 mM (pH 2,0) que contenía cloruro de potasio 0,5 M y etanol al 45 %.

**Ejemplo 5: Tratamiento con tripsina y carboxipeptidasa B**

Las sales se eliminaron de las muestras eluidas mediante el uso de una columna de desalación, y el tampón se intercambió con un tampón (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0). Con respecto a la proteína de la muestra obtenida, se añadieron tripsina correspondiente a una relación molar de 1000 y carboxipeptidasa B correspondiente a una relación molar de 2000, y después se agitó a 16 °C durante 16 horas. Para terminar la reacción, se usó citrato de sodio 1 M (pH 2,0) para reducir el pH a 3,5.

**Ejemplo 6: Purificación por cromatografía de unión de cationes**

De este modo la muestra reaccionada se cargó en una columna Source S (GE healthcare) equilibrada con tampón de citrato de sodio 20 mM (pH 2,0) que contenía etanol al 45 %, y después las proteínas análogas de la insulina se eluyeron en 10 volúmenes de columna con un gradiente lineal del 0 % al 100 % de tampón de citrato de sodio 20 mM (pH 2,0) que contenía cloruro de potasio 0,5 M y etanol al 45 %.

**Ejemplo 7: Purificación por cromatografía de unión a aniones**

Las sales se eliminaron de las muestras eluidas mediante el uso de una columna de desalación, y el tampón se intercambió con un tampón (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5). Para aislar un análogo de la insulina puro de la muestra obtenida en el ejemplo 6, la muestra se cargó en una columna de intercambio aniónico (Source Q: GE healthcare) equilibrada con tampón Tris 10 mM (pH 7,5), y se eluyó la proteína análoga de la insulina en 10 volúmenes de columna con un gradiente lineal de 0 % a 100 % de tampón Tris 10 mM (pH 7,5) que contenía cloruro de sodio 0,5 M.

De este modo la pureza del análogo de la insulina purificado se analizó mediante electroforesis de proteínas (SDS-PAGE, Figura 1) y cromatografía de alta presión (HPLC) (Figura 2), y se identificaron las modificaciones de los aminoácidos mediante mapeo de péptidos (Figura 3) y análisis de peso molecular de cada pico.

Como resultado, se encontró que cada análogo de la insulina tenía la modificación deseada en su secuencia de aminoácidos.

**Ejemplo 8: Preparación del conjugado de análogo de la insulina (núm. 7)-Fc de inmunoglobulina**

Para pegar el extremo N de la cadena beta del análogo de la insulina mediante el uso de 3,4K ALD2 PEG (NOF, Japón), el análogo de la insulina y el PEG se hicieron reaccionar en una relación molar de 1:4 con una concentración del análogo de la insulina de 5 mg/ml a 4 °C durante aproximadamente 2 horas. En este momento, la reacción se realizó en citrato de sodio 50 mM a pH 6,0 e isopropanol al 45 %. Se añadió cianoborohidruro de sodio 3,0 mM como agente reductor y se dejó hacer reaccionar. La solución de reacción se purificó con columna SP-HP (GE Healthcare, Estados Unidos) mediante el uso de un tampón que contenía citrato de sodio (pH 3,0) y etanol al 45 %, y gradiente de concentración de KCl.

Para preparar un conjugado del fragmento análogo de la insulina-Fc de inmunoglobulina, el análogo de la insulina mono-PEGilado purificado y el fragmento Fc de inmunoglobulina se hicieron reaccionar en una relación molar de 1:1 a 1:2 y a 25 °C durante 13 horas, con una concentración de la proteína total de aproximadamente 20 mg/ml. En este momento, las condiciones del tampón de reacción fueron HEPES 100 mM a pH 8,2, y se añadió cianoborohidruro de sodio 20 mM como agente reductor a las mismas. Por lo tanto, el PEG se unió al extremo N del fragmento Fc.

Después de que se terminó la reacción, la solución de reacción se cargó en la columna Q HP (GE Healthcare, Estados Unidos) con tampón Tris-HCl (pH 7,5) y gradiente de concentración de NaCl para separar y purificar el fragmento Fc de inmunoglobulina sin reaccionar y el análogo de la insulina mono-PEGilada.

Posteriormente, se usó Source 15ISO (GE Healthcare, Estados Unidos) como una columna secundaria para eliminar el fragmento Fc de inmunoglobulina restante y el conjugado, en el que dos o más análogos de la insulina se unieron al fragmento de inmunoglobulina Fc, obteniendo así el conjugado de análogo de la insulina-fragmento Fc de inmunoglobulina. En este momento, la elución se llevó a cabo mediante el uso de un gradiente de concentración de sulfato de amonio que contenía Tris-HCl (pH 7,5), y el conjugado de análogo de la insulina-Fc de inmunoglobulina de este modo eluido, se analizó por electroforesis de proteínas (SDS-PAGE, Figura 4) y cromatografía de alta presión (HPLC) (Figura 5). Como resultado, se encontró que el conjugado tuvo casi un 99 % de pureza.

**Ejemplo 9: Comparación de la afinidad de unión del receptor de la insulina entre la insulina nativa, el análogo de la insulina, el conjugado insulina nativa-Fc de inmunoglobulina y el conjugado de análogo de la insulina-Fc de inmunoglobulina**

Para medir la afinidad de unión al receptor de la insulina del conjugado de análogo de la insulina-Fc de inmunoglobulina, se usó la resonancia de plasmón superficial (SPR, BIACORE 3000, GE healthcare) para el análisis. Los receptores de la insulina se inmovilizaron en un chip CM5 mediante acoplamiento de la amina, y se aplicaron 5 diluciones o más de la insulina nativa, análogo de la insulina, conjugado de la insulina nativa-Fc de inmunoglobulina, y

conjugado de análogo de la insulina-Fc de inmunoglobulina, independientemente. Después, se examinó la afinidad de unión al receptor de la insulina de cada sustancia. La afinidad de unión de cada sustancia se calculó mediante el uso del software de evaluación BIA. En este momento, el modelo que se usó fue la unión Langmuir 1:1 con deriva de referencia.

5 Como resultado, en comparación con la insulina humana, el análogo de la insulina (número 6) mostró una afinidad de unión al receptor del 14,8 %, el análogo de la insulina (número 7) mostró una afinidad de unión al receptor del 9,9 %, el análogo de la insulina (número 8) mostró una afinidad de unión al receptor del 57,1 %, el análogo de la insulina (número 9) mostró una afinidad de unión al receptor del 78,8 %, el conjugado insulina nativa-Fc de inmunoglobulina mostró una afinidad de unión al receptor del 3,7–5,9 % en dependencia de los análisis experimentales, el conjugado de análogo de la insulina (número 6)-Fc de inmunoglobulina mostró una afinidad de unión al receptor del 0,9 % o menos, el conjugado de análogo de la insulina (número 7)-Fc de inmunoglobulina mostró una afinidad de unión de receptor del 1,9 %, el conjugado de análogo de la insulina (número 8)-Fc de inmunoglobulina de mostró una afinidad de unión de receptor de 1.8% y el conjugado de análogo de la insulina (número 9)-Fc de inmunoglobulina mostró una afinidad de unión al receptor del 3,3% (Tabla 4). Como tal, se observó que los análogos de la insulina de la presente divulgación tuvieron la afinidad de unión al receptor de la insulina reducida, en comparación con la insulina nativa, y los conjugados análogo de la insulina-Fc de inmunoglobulina tuvieron además la afinidad de unión al receptor de la insulina reducida notablemente.

[Tabla 4]

Comparación de la afinidad de unión al receptor de insulina

Núm. de prueba	Nombre de la sustancia	$k_a$ (1/Ms, X10 <sup>3</sup> )	$k_c$ (1/s, X10 <sup>-3</sup> )	$k_c$ (nM)
Prueba 1	Insulina humana nativa	2,21 (100 %)	7,47 (100 %)	35,05 (100 %)
	Análogo de la insulina (número 6)	0,28 (12,6 %)	6,60 (88,4 %)	237,0 (14,8 %)
Prueba 2	Insulina humana nativa	2,29 (100 %)	10,1 (100 %)	46,1 (100 %)
	Conjugado insulina nativa-Fc de inmunoglobulina	0,09 (3,9 %)	7,8 (77,2 %)	781,3 (5,9 %)
	Conjugado análogo de la insulina (número 6)-Fc de inmunoglobulina	0,02 (0,9 %)	10,1 (100 %)	5260,0 (0,9 %)
Prueba 3	Insulina humana nativa	1,76 (100 %)	10,73 (100 %)	63,47 (100 %)
	Análogo de la insulina (número 7)	0,14 (7,8 %)	8,34 (77,7 %)	642,0 (9,9 %)
	Conjugado insulina nativa-Fc de inmunoglobulina	0,05 (2,7 %)	5,85 (54,5 %)	1236,67 (5,1 %)
	Conjugado análogo de la insulina (número 7)-Fc de inmunoglobulina	0,02 (1,3 %)	7,20 (67,1 %)	3270,0 (1,9 %)
Prueba 4	Insulina humana nativa	2,9 (100 %)	12,4 (100 %)	42,0 (100 %)
	Análogo de la insulina (número 8)	1,78 (60,0 %)	12,9 (104,6 %)	73,4 (57,1 %)
	Conjugado insulina nativa-Fc de inmunoglobulina	0,06 (2,1 %)	6,9 (56,1 %)	1140,0 (3,7 %)
	Conjugado análogo de la insulina (número 8)-Fc de inmunoglobulina	0,03 (0,9 %)	6,4 (51,6 %)	2320,0 (1,8 %)
Prueba 5	Insulina humana nativa	2,0 (100 %)	9,7 (100 %)	50,4 (100 %)
	Análogo de la insulina (número 9)	1,85 (92,5 %)	11,9 (122,5 %)	64,0 (78,8 %)
	Conjugado insulina nativa-Fc de inmunoglobulina	0,09 (4,3 %)	7,4 (76,5 %)	862,0 (5,9 %)
	Conjugado análogo de la insulina (número 9)-Fc de inmunoglobulina	0,05 (2,4 %)	7,3 (75,0 %)	1536,7 (3,3 %)

**Ejemplo 10: Comparación de la eficacia in vitro entre el conjugado insulina nativa-Fc de inmunoglobulina y el conjugado de análogo de la insulina-Fc de inmunoglobulina**

60 Para evaluar la eficacia in vitro del conjugado de análogo de la insulina-Fc de inmunoglobulina, se usaron adipocitos 3T3-L1 diferenciados derivados de ratón para evaluar la absorción de la glucosa o la síntesis de los lípidos. Las células 3T3-L1 se subcultivaron en DMEM que contenía 10 % de NBS (suero de ternero recién nacido) (Medio Eagle modificado de Dulbecco, Gibco, Cat. núm, 12430) dos veces o tres veces por semana, y se mantuvieron. Las células 3T3-L1 se suspendieron en un medio de diferenciación (DMEM que contuvo FBS al 10 %) y luego se inocularon a una densidad de 5 x 10<sup>4</sup> por pocillo en un placa de 48 pocillos y se cultivaron durante 48 horas. Para la diferenciación de

adipocitos, se mezclaron insulina humana de 1 µg/ml (Sigma, Cat. núm. 19278), IBMX 0,5 mM (3-isobutil-1-metilxantina, Sigma, Cat. núm. I5879) y Dexametasona 1 µM (Sigma, Cat. núm. D4902) con el medio de diferenciación, y se añadieron 250 µl de la mezcla a cada pocillo, después de eliminar el medio anterior. Después de 48 horas, el medio se intercambió con el medio de diferenciación suplementado con solo 1 µg/ml de insulina humana. Después de eso, mientras el medio se intercambió con el medio de diferenciación suplementado con 1 µg/ml de insulina humana cada 48 horas, se examinó la inducción de la diferenciación de adipocitos durante 7-9 días. Para evaluar la absorción de la glucosa, las células diferenciadas se lavaron con medio DMEM sin suero una vez, y luego se añadieron 250 µl para inducir la reducción del suero durante 4 horas. Se usó medio DMEM sin suero para llevar a cabo diluciones seriadas 10 veces para la insulina humana de 2 µM a 0,01 µM, y para el conjugado insulina nativa-Fc de inmunoglobulina y conjugados análogo de la insulina-Fc de inmunoglobulina de 20 µM a 0,02 µM. Cada 250 µl de las muestras preparadas de este modo, se añadieron a las células y se cultivaron en una incubadora al 5 % de CO<sub>2</sub> 37 °C durante 24 horas. Para medir la cantidad residual de la glucosa en el medio después de la incubación, se tomaron 200 µl del medio y se diluyeron 5 veces con D-PBS, seguido del ensayo GOPOD (estuche de ensayo GOPOD, Megazyme, Cat. núm. K-GLUC). La concentración de la glucosa que quedaba en el medio se convirtió sobre la base de la absorbancia de la solución estándar de la glucosa, y se calcularon los valores de CE50 para la absorción de la glucosa del conjugado insulina nativa-Fc de inmunoglobulina y los conjugados análogos de la insulina-Fc de inmunoglobulina, respectivamente.

Como resultado, el conjugado insulina nativa-Fc de inmunoglobulina mostró una absorción de la glucosa del 11,6 %, el conjugado de análogo de la insulina (núm. 6)-Fc de inmunoglobulina mostró una absorción de la glucosa del 0,43 %, el conjugado de análogo de la insulina (núm. 7)-Fc de inmunoglobulina mostró una absorción de la glucosa del 1,84 %, el conjugado de análogo de la insulina (núm. 8)-Fc de inmunoglobulina mostró una absorción de la glucosa del 16,0 %, el conjugado de análogo de la insulina (núm. 9)-Fc de inmunoglobulina mostró una absorción de glucosa del 15,1 % (Tabla 5) en comparación con la insulina humana. Como tal, se observó que el conjugado de análogo de la insulina (núm. 6)-Fc de inmunoglobulina y el conjugado de análogo de la insulina (núm. 7)-Fc de inmunoglobulina de la presente divulgación habían reducido notablemente el título in vitro, en comparación con el conjugado insulina nativa-Fc de inmunoglobulina, y el conjugado de análogo de la insulina (núm. 8)-Fc de inmunoglobulina y el conjugado de análogo de la insulina (núm. 9)-Fc de inmunoglobulina tuvieron un título in vitro similar al del conjugado insulina nativa-Fc de inmunoglobulina.

[Tabla 5]

Prueba núm.	Nombre de la sustancia	Absorción de la glucosa (en relación con la insulina nativa)
Prueba 1	Insulina humana nativa	100 %
	Conjugado insulina nativa-Fc de inmunoglobulina	11,6 %
	Conjugado análogo de la insulina núm. 6-Fc de inmunoglobulina	0,43 %
	Conjugado análogo de la insulina núm. 7-Fc de inmunoglobulina	1,84 %
Prueba 2	Insulina humana nativa	100 %
	Conjugado insulina nativa-Fc de inmunoglobulina	15,2 %
	Conjugado análogo de la insulina núm. 8-Fc de inmunoglobulina	16,0 %
Prueba 3	Insulina humana nativa	100 %
	Conjugado insulina nativa-Fc de inmunoglobulina	11,7 %
	Conjugado análogo de la insulina núm. 9-Fc de inmunoglobulina	15,1 %

**Ejemplo 11: Farmacocinética del conjugado de análogo de la insulina-Fc de inmunoglobulina**

Para examinar la farmacocinética de los conjugados análogo de la insulina-Fc de inmunoglobulina, se comparó su concentración en sangre en el tiempo en ratas normales (SD, rata, macho, 6 semanas de edad) adaptadas durante 5 días al laboratorio. Se inyectaron subcutáneamente 21,7 nmol/kg del conjugado insulina nativa-Fc de inmunoglobulina y 65,1 nmol/kg del conjugado de análogo de la insulina-Fc de inmunoglobulina, respectivamente. La sangre se recolectó a las 0, 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 y 216 horas. En cada punto del tiempo, las concentraciones en sangre del conjugado insulina nativa-Fc de inmunoglobulina y del conjugado de análogo de la insulina-Fc de inmunoglobulina se midieron mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), y se usó el Insulin ELISA (ALPCO, Estados Unidos) como un estuche. Sin embargo, como anticuerpo de detección, se usó el conjugado IgG4 HRP antihumano de ratón (Alpha Diagnostic Intl, Inc, Estados Unidos).

Los resultados del examen de la farmacocinética del conjugado insulina nativa–Fc de inmunoglobulina y el conjugado de análogo de la insulina–Fc de inmunoglobulina mostraron que sus concentraciones en sangre aumentaron en proporción a sus concentraciones de administración, y los conjugados análogos de la insulina–Fc de inmunoglobulina con afinidad de unión al receptor de insulina baja mostraron una vida media aumentada, en comparación con el conjugado insulina nativa–Fc (Figura 6).

Estos resultados sugieren que cuando los análogos de la insulina de la presente divulgación modificados para tener una afinidad de unión al receptor de la insulina reducida se unen a la región Fc de inmunoglobulina para preparar conjugados, los conjugados pueden proporcionarse como formulaciones de la insulina estables debido a una vida media sanguínea in vivo notablemente aumentada, y de este modo efectivamente usarse como agentes terapéuticos para la diabetes. Además, dado que los análogos de la insulina de acuerdo con la presente divulgación tienen además una afinidad de unión al receptor de la insulina reducida y un título reducido, los análogos de la insulina exhiben además el mismo efecto aunque están vinculados a otros vehículos diversos.

15 <110> HANMI PHARM. CO., LTD.

<120> Nuevo análogo de insulina y uso del mismo

20 <130> OPA14031-PCT

<150> KR 10-2013-0020703

<151> 2013-02-26

25 <150> KR 10-2013-0082511

<151> 2013-07-12

<150> KR 10-2014-0006937

<151> 2014-01-20

30 <160> 38

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

35 <211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> Cebador

<400> 1

gggtccctgc agaagcgtgc gattgtggaa caatgctgt 39

45 <210> 2

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

50 <220>

<223> Cebador

<400> 2

acagcattgt tcacaatcg cacgcttctg cagggacc 39

55 <210> 3

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

60 <220>

<223> Cebador

<400> 3

65 tccctgcaga agcgtggcgc ggtggaacaa tgctgtacc 39

ES 2 770 776 T3

<210> 4  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 4  
 10 ggtacagcat tgttccaccg cgccacgctt ctgcaggga 39  
 <210> 5  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 20 <400> 5  
 ctctaccagc tggaaaacgc gtgtaactga ggatcc 36  
 <210> 6  
 <211> 36  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 30 <400> 6  
 ggatcctcag ttacacgcgt ttccagctg gtagag 36  
 <210> 7  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 40 <400> 7  
 gttaaccaac acttgtgtgc gtcacacctg gtggaagct 39  
 <210> 8  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 8  
 55 agcttccacc aggtgtgacg cacacaagtg ttggtaac 39  
 <210> 9  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 60 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 9  
 65 ctagtgtgcg gggaacgagc gttcttctac acaccaag 39

ES 2 770 776 T3

<210> 10  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 10  
 10 cttgggtgtg tagaagaacg ctcgtcccc gcacactag 39  
 <210> 11  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 20 <400> 11  
 gtgtgcgggg aacgaggcgc gttctacaca cccaagacc 39  
 <210> 12  
 <211> 39  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 30 <400> 12  
 ggtcttgggt gtgtagaacg cgctctgttc cccgcacac 39  
 <210> 13  
 <211> 39  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 40 <400> 13  
 tgcggggaac gaggcttcgc gtacacacc aagaccgc 39  
 <210> 14  
 <211> 39  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 50 <400> 14  
 gcgggtcttg ggtgtgtacg cgaagcctcg ttccccga 39  
 <210> 15  
 <211> 37  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 60 <400> 15  
 65 ccagcatctg ctccctcga cagctggaga actactg 37

ES 2 770 776 T3

<210> 16  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 16  
 10 cagtagttct ccagctgttc gagggagcag atgctgg 37  
 <210> 17  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 20 <400> 17  
 cagcatctgc tccctcaacc agctggagaa ctac 34  
 <210> 18  
 <211> 34  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 30 <400> 18  
 gtatttctcc agctggtga gggagcagat gctg 34  
 <210> 19  
 <211> 258  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 35 <220>  
 <223> Análogo 1  
 40 <400> 19  
 ttcgttaacc aacacttgtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60  
 45 gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120  
 caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180  
 50 tccctgcaga agcgtgcgat tgtggaacaa tgctgtacca gcatctgctc cctctaccag 240  
 ctggagaact actgcaac 258  
 <210> 20  
 <211> 86  
 55 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Análogo 1  
 60 <400> 20  
 65

ES 2 770 776 T3

5 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  
 10 Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys  
 50 55 60  
 Arg Ala Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln  
 65 70 75 80  
 15 Leu Glu Asn Tyr Cys Asn  
 85

<210> 21  
 <211> 258  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Análogo 2  
 25 <400> 21  
 ttcgtaacc aacacttggtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgctggg 60  
 gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120  
 30 caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180  
 tccctgcaga agcgtggcgc ggtggaacaa tgctgtacca gcatctgctc cctctaccag 240  
 35 ctggagaact actgcaac 258

<210> 22  
 <211> 86  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>  
 <223> Análogo 2  
 45 <400> 22  
 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  
 55 Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys  
 50 55 60  
 Arg Gly Ala Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln  
 65 70 75 80  
 60 Leu Glu Asn Tyr Cys Asn  
 85

<210> 23  
 <211> 258  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial



ES 2 770 776 T3

<400> 26

5 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Ala 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  
 10 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  
 15 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

20 <210> 27  
 <211> 258  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <223> Análogo 5

<400> 27

30 ttcgtaacc aacacttggtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgctggg 60  
 gaacgagcgt tcttctacac acccaagacc cgccgggagag cagaggacct gcaggtgggg 120  
 caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180  
 35 tccctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcatctgctc cctctaccag 240  
 ctggagaact actgcaac 258

40 <210> 28  
 <211> 86  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>  
 <223> Análogo 5

<400> 28

50 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 Ala Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg  
 20 25 30  
 55 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  
 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

65 <210> 29



ES 2 770 776 T3

<220>  
<223> Análogo 7

<400> 32

5 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 Ala Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg  
20 25 30  
10 Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro  
35 40 45  
15 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  
20 Leu Glu Asn Tyr Cys Asn  
85

<210> 33  
<211> 261  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

25

<220>  
<223> Análogo 8

<400> 33

30 ttcgtaacc aacacttggtg tggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgctggg 60  
gaacgaggct tcttctacac acccaagacc cgccgggagag cagaggacct gcaggtgggg 120  
35 caggtggagc tgggcggggg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180  
tccctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcatctgctc cctcgaacag 240  
40 ctggagaact actgcaactg a 261

<210> 34  
<211> 86  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45

<220>  
<223> Análogo 8

<400> 34

50 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  
55 Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro  
35 40 45  
60 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 Glu Gln  
65 70 75 80  
65 Leu Glu Asn Tyr Cys Asn  
85



ES 2 770 776 T3

<220>

<223> Cadena B de la insulina

<400> 38

5 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

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un análogo de la insulina que tiene un título de insulina reducido en comparación con la forma nativa, en el que el análogo de la insulina tiene una cadena A de SEQ ID NO: 37 y cadena B de SEQ ID NO: 38 excepto por una sustitución del 14<sup>o</sup> aminoácido (tirosina) de la cadena A con ácido glutámico o asparagina.
2. El análogo de la insulina de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el título de insulina reducido se atribuye a una reducida afinidad de unión al receptor de la insulina.
- 10 3. Un análogo de la insulina que tiene SEQ ID NO: 34 o 36.
- 15 4. Un conjugado de análogo de la insulina, en el que (i) el análogo de la insulina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 está unido a (ii) un material biocompatible seleccionado del grupo que consiste en polietilenglicol, ácido graso, colesterol, albúmina y sus fragmentos, materiales de unión–albúmina, polímeros de unidades repetitivas de secuencia de aminoácidos particular, anticuerpo, fragmentos de anticuerpos, materiales de unión a FcRn, tejido conectivo in vivo o derivados del mismo, nucleótido, fibronectina, transferrina, sacárido y polímeros como un vehículo capaz de prolongar in vivo la vida media del análogo de la insulina.
- 20 5. El conjugado de análogo de la insulina de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el análogo de la insulina y el material biocompatible están unidos entre sí a través de un péptido o un polímero no peptídico como un enlazador.
- 25 6. El conjugado de análogo de la insulina de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el material de unión a FcRn es una región Fc de inmunoglobulina.
- 30 7. El conjugado de análogo de la insulina de acuerdo con la reivindicación 5, en el que (i) el análogo de la insulina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 se une con (ii) una región Fc de inmunoglobulina a través de (iii) un enlazador peptídico o un enlazador no peptídico seleccionado del grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol, copolímeros de etilenglicol–propilenglicol, polioles polioxietilados, alcoholes polivinilos, polisacáridos, dextrano, éter etil polivinilo, polímeros biodegradables, polímeros lipídicos, quitinas, ácido hialurónico y combinaciones del mismo.
- 35 8. El conjugado de análogo de la insulina de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el enlazador no peptídico está unido al extremo N de la cadena B del análogo de la insulina.
- 40 9. El conjugado de análogo de la insulina de acuerdo con la reivindicación 7, en el que ambos extremos del polímero no peptídico están unidos al extremo N de la región Fc de inmunoglobulina y al grupo amina N–terminal del análogo de la insulina o el grupo ε–amino o el grupo tiol del residuo interno de lisina de la cadena B, respectivamente.
- 45 10. El conjugado de análogo de la insulina de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la región Fc de inmunoglobulina está aglicosilada.
- 50 11. El conjugado de análogo de la insulina de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la región Fc de inmunoglobulina está compuesta de 1 a 4 dominios seleccionados del grupo que consiste en los dominios CH1, CH2, CH3 y CH4.
- 55 12. El conjugado de análogo de la insulina de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc derivada de IgG, IgA, IgD, IgE o IgM.
- 60 13. El conjugado de análogo de la insulina de acuerdo con la reivindicación 12, en el que cada dominio de la región Fc de inmunoglobulina es un híbrido de dominios que tienen orígenes diferentes y que se derivan de una inmunoglobulina seleccionada del grupo que consiste en IgG, IgA, IgD, IgE e IgM.
14. El conjugado de análogo de la insulina de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la región Fc de inmunoglobulina incluye además una región bisagra.
15. El conjugado de análogo de la insulina de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la región Fc de inmunoglobulina es un dímero o un multímero que consiste en inmunoglobulinas de cadena simple compuestas de dominios del mismo origen.
16. El conjugado de análogo de la insulina de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc de IgG4.
17. El conjugado de análogo de la insulina de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc aglicosilada derivada de IgG4 humana.

18. El conjugado análogo de insulina de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el grupo reactivo del enlazador no peptídico se selecciona del grupo que consiste en un grupo aldehído, un grupo propionaldehído, un grupo butiraldehído, un grupo maleimida y un derivado de succinimida.
- 5 19. El conjugado de análogo de la insulina de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el derivado de succinimida es propionato de succinimidilo, succinimidil carboximetilo, hidroxil succinimidilo o carbonato de succinimidilo.
20. El conjugado de análogo de la insulina de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el enlazador no peptídico tiene grupos aldehído reactivos en ambos extremos del mismo.
- 10 21. Una formulación de la insulina de acción prolongada que tiene una duración y estabilidad in vivo mejoradas, que comprende el conjugado de análogo de la insulina de la reivindicación 4.
- 15 22. La formulación de la insulina de acción prolongada de acuerdo con la reivindicación 21, en la que la formulación es un agente terapéutico para la diabetes.
- 20 23. Un procedimiento para preparar el conjugado de análogo de la insulina de la reivindicación 4, que comprende: unir el análogo de la insulina al material biocompatible seleccionado del grupo que consiste en polietilenglicol, ácido graso, colesterol, albúmina y fragmentos de los mismos, materiales de unión a la albúmina, polímeros de unidades repetitivas de secuencia de aminoácidos particular, anticuerpo, fragmentos de anticuerpos, materiales de unión a FcRn, tejido conectivo in vivo o derivados del mismo, nucleótido, fibronectina, transferrina, sacárido y polímeros como un vehículo capaz de prolongar la vida media in vivo del análogo de la insulina.

Figura 1

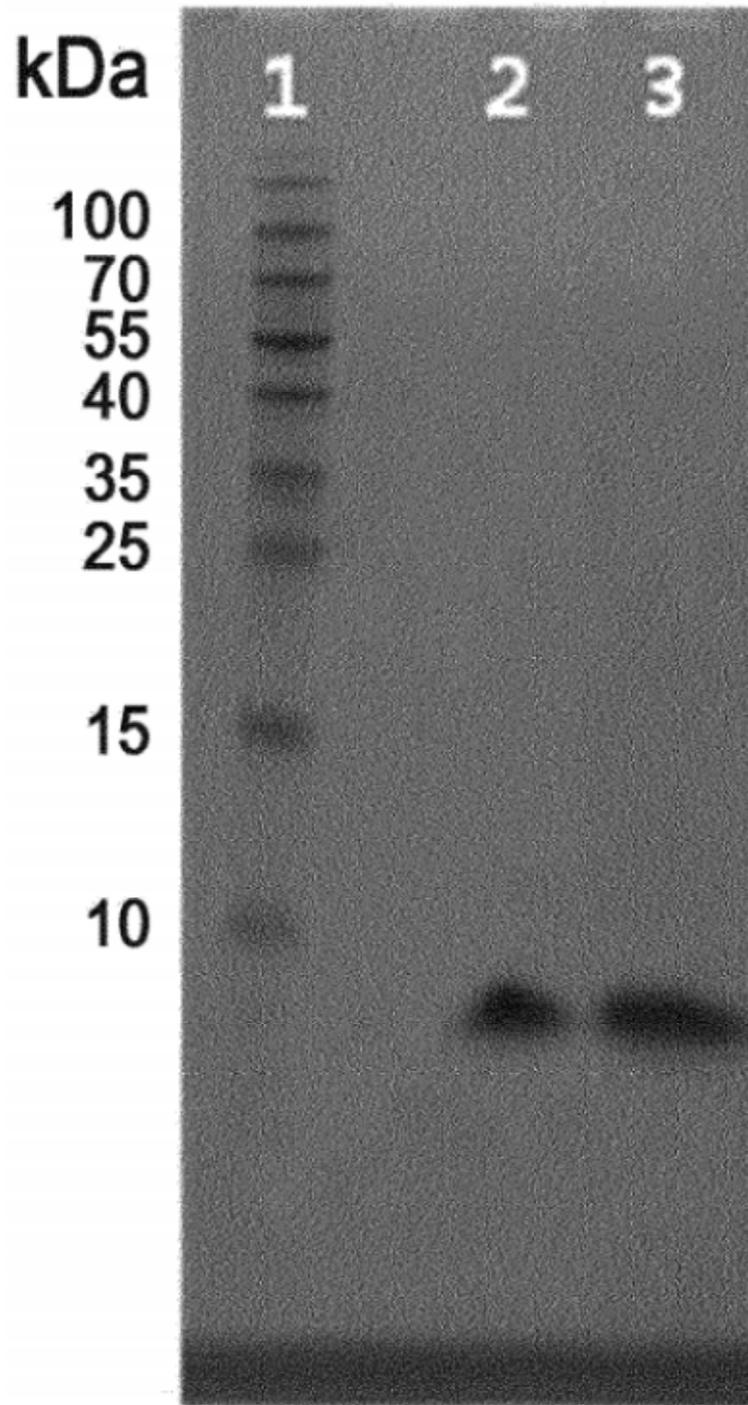


Figura 2

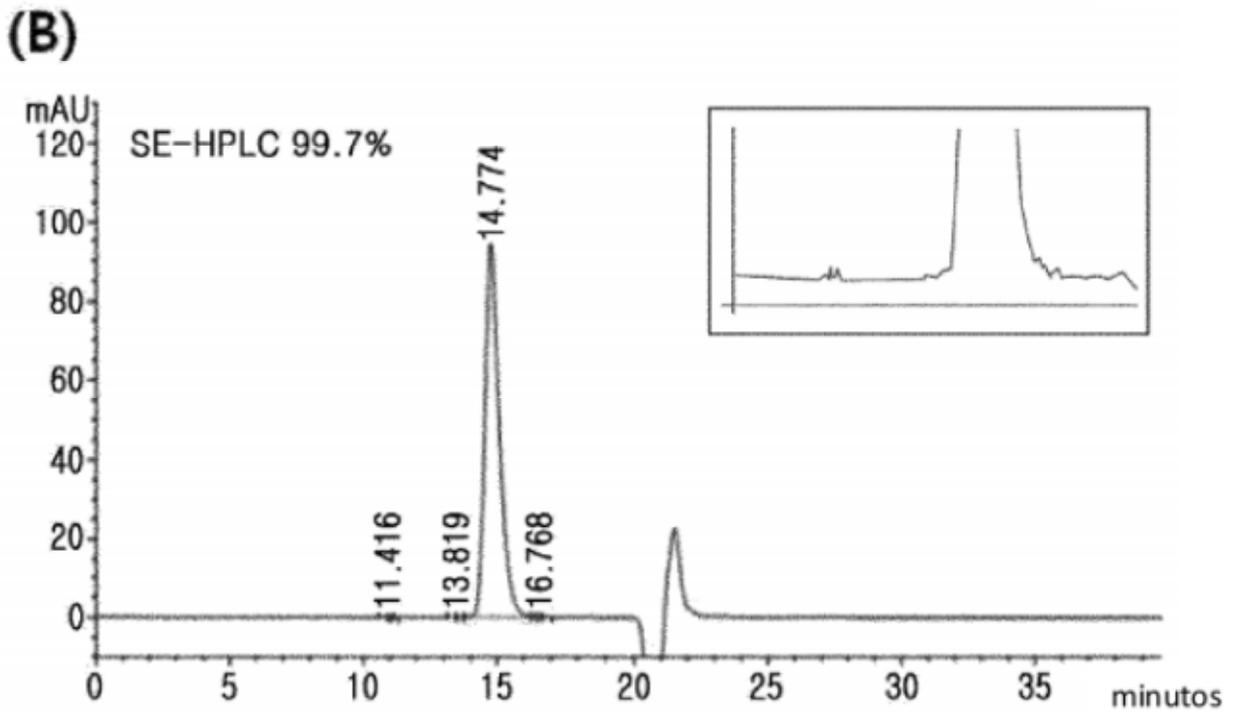
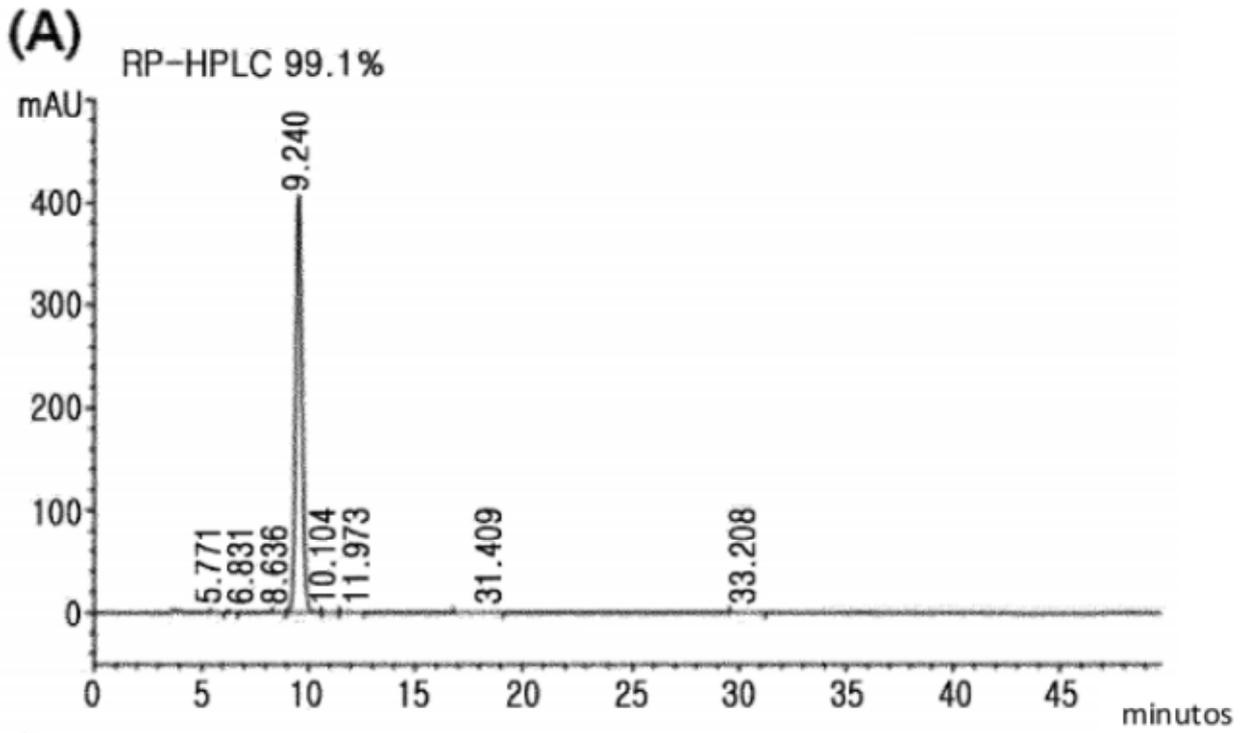
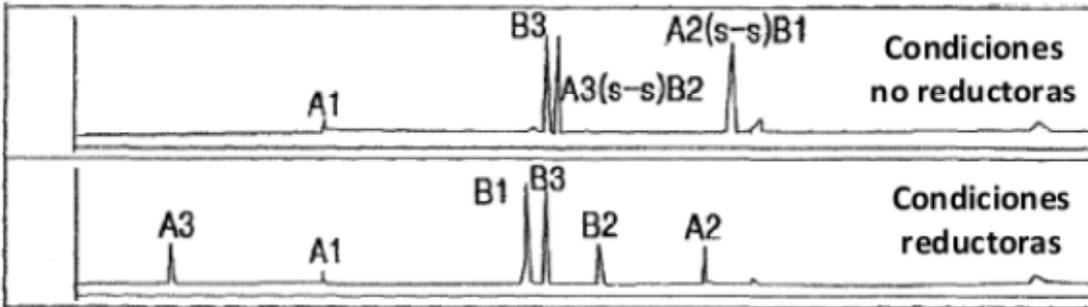
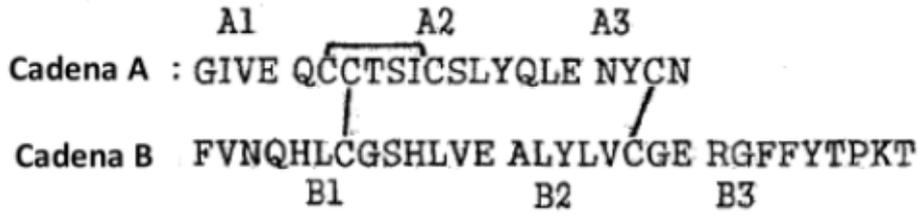


Figura 3

**(A)** fragmento de escisión Glu-C de la secuencia de la insulina nativa



**(B)** fragmento de escisión Glu-C de la secuencia del análogo de la insulina (núm. 7)

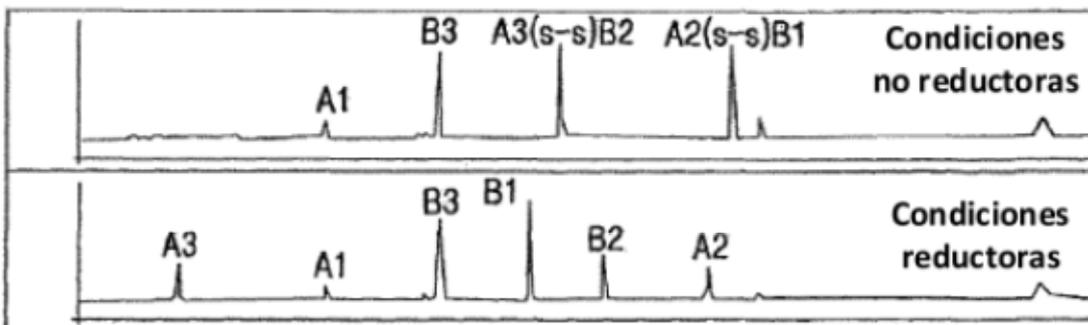
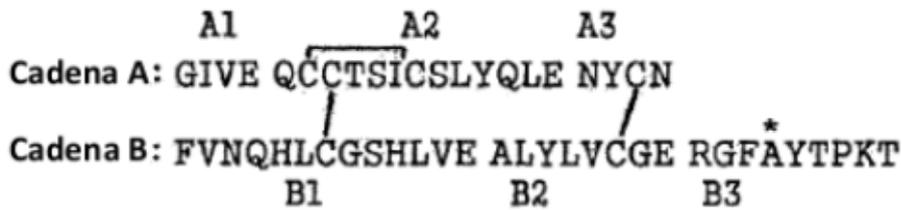


Figura 4

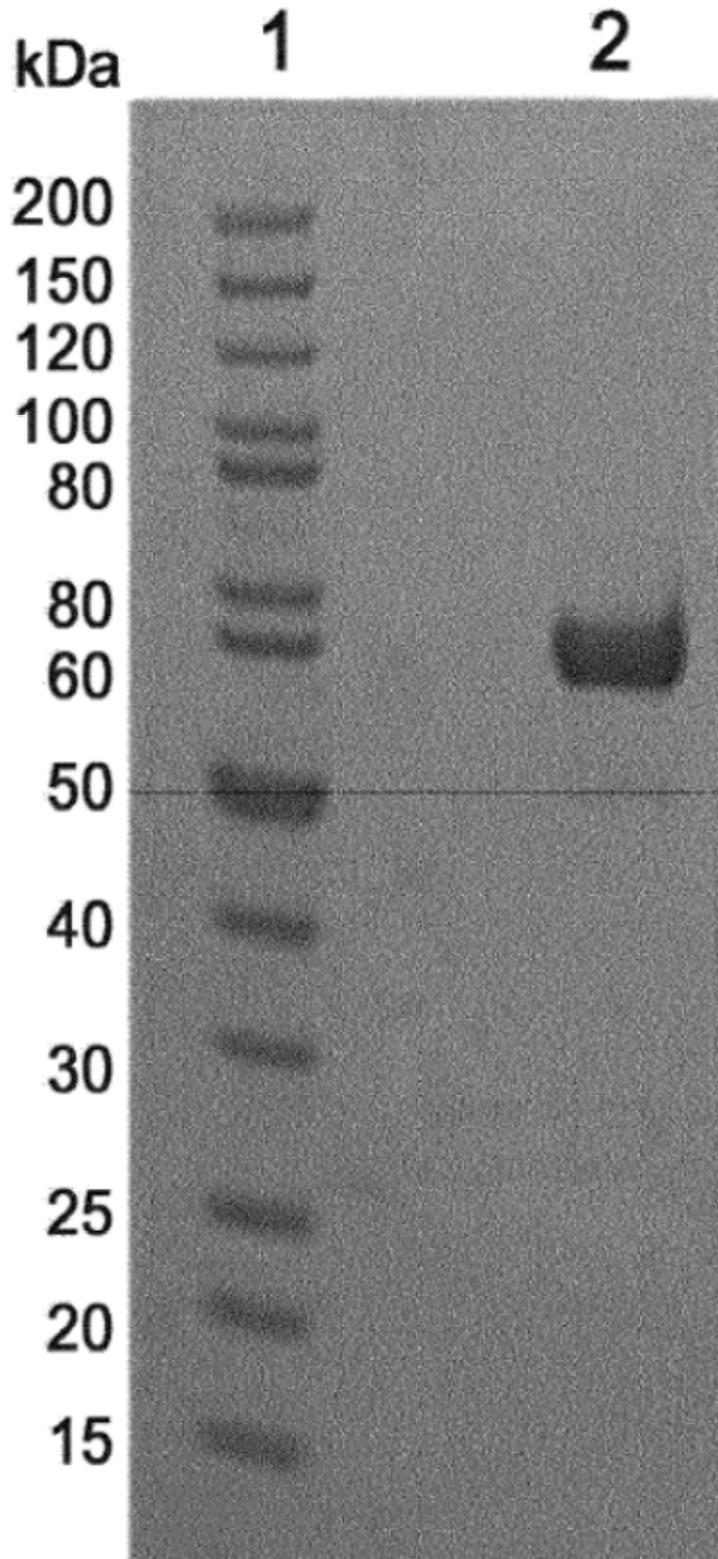


Figura 5

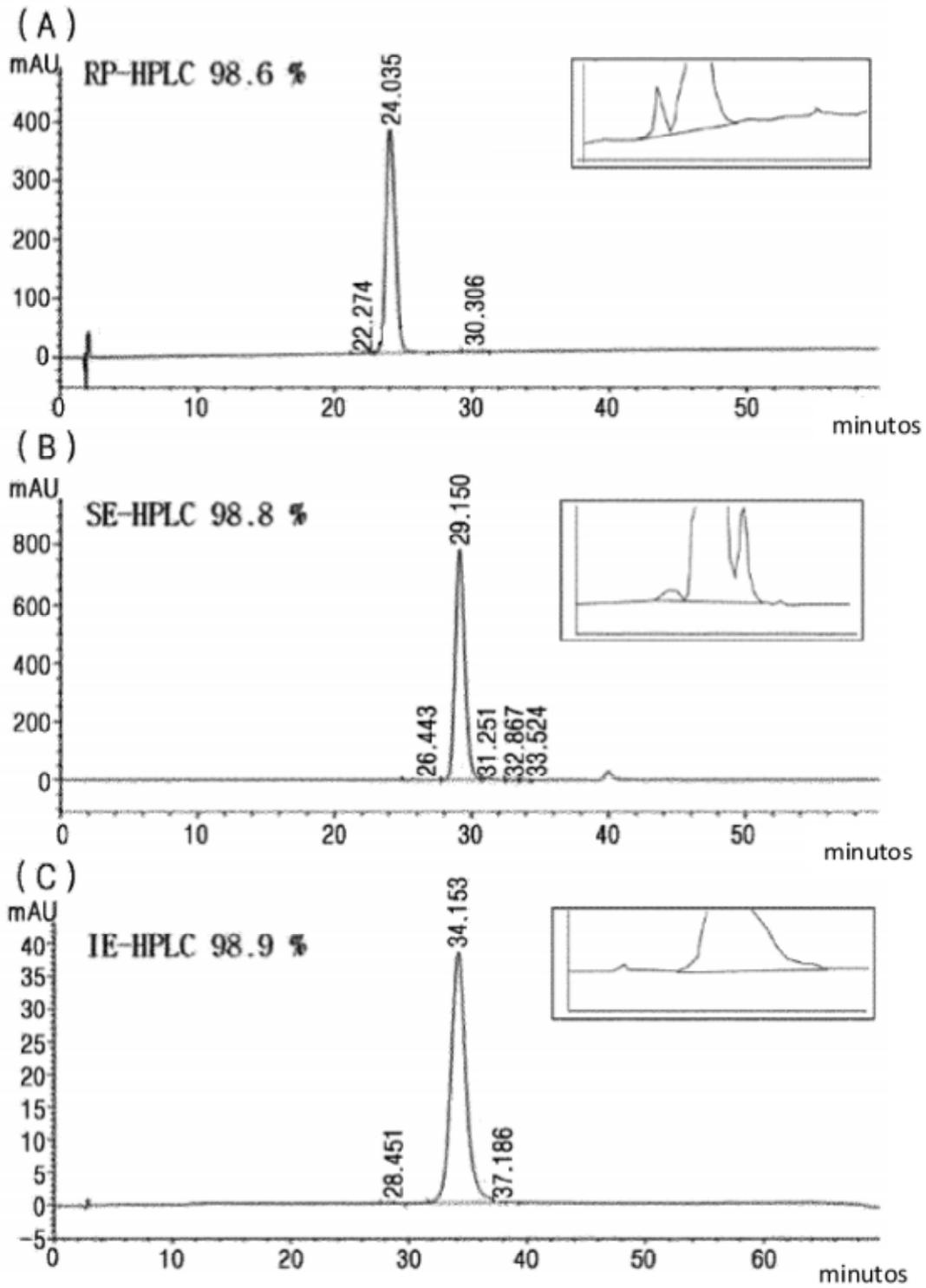


Figura 6

