



Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT



Organización y
Digitalización CSA Ltda

SOLICITUD DE

PATENTE DE INVENCION
PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL



10.76884

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: NUEVOS DERIVADOS DE INSULINA CON PERFIL
TIEMPO/ACCION EXTREMADAMENTE RETARDADO

52. CLASIFICACION INTERNACIONAL: C07K 14/62

71. SOLICITANTE: SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH

DOMICILIO: D-65929 Frankfurt am Main - ALEMANIA

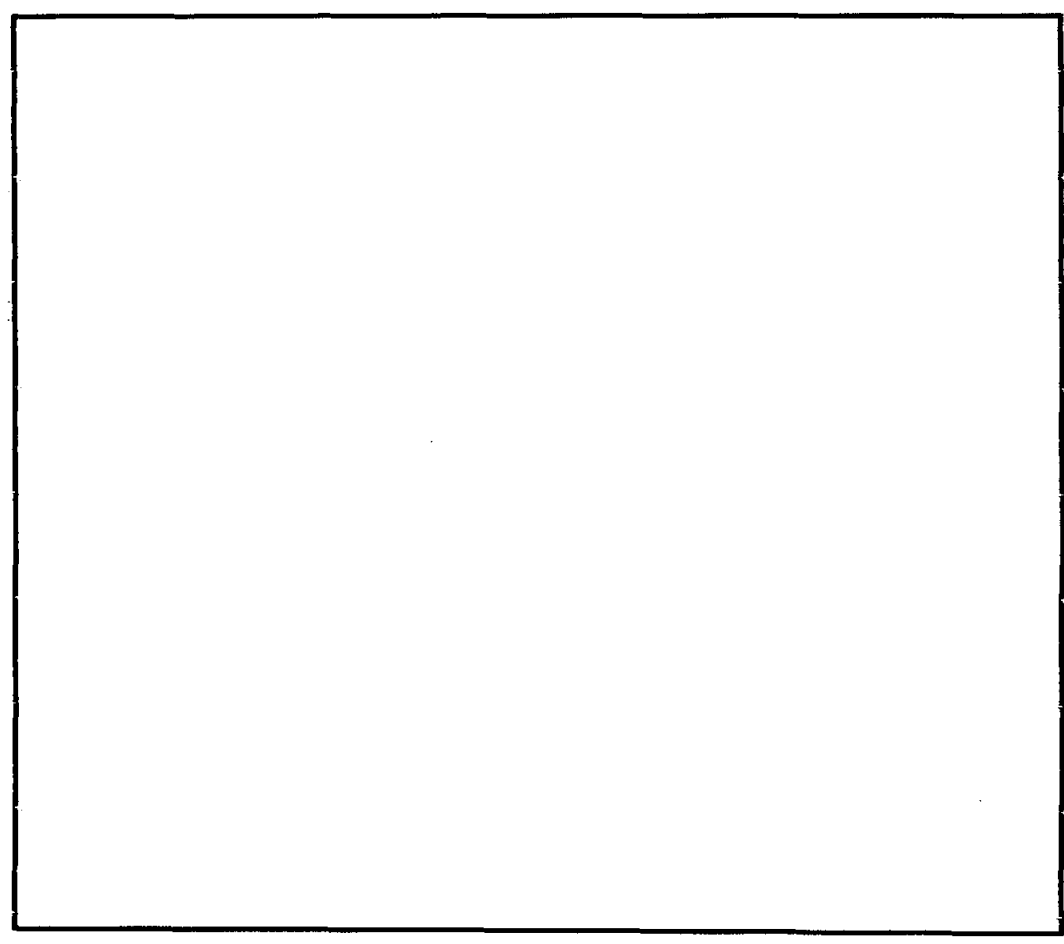
74. APODERADO: DR. LUIS PATIÑO LEYVA

22. BOGOTA, D.C., 25 JUN. 2010

10 Anex s

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso, junto con la sustitución del mismo a mi favor
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Tarjeta Propietario, Extracto para la publicación

11 FIGURA CARACTERISTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

LUIS PATINO LEYVA

25 JUN. 2010

FIRMA:

Luis Patino Leyva

C.C. No. 2.930.616 Bogotá - TPA 2.698 C.S.J.

ANEXO # 1
INVENTORES

1. **PAUL HABERMANN**
Sanofi-Aventis Deutschland GMBH
65926 Frankfurt am Main
ALEMANIA
2. **GERHARD SEIPKE**
Sanofi-Aventis Deutschland GMBH
65926 Frankfurt am Main
ALEMANIA
3. **ROLAND KURRLE**
Sanofi-Aventis Deutschland GMBH
65926 Frankfurt am Main
ALEMANIA
4. **GÜNTER MÜLLER**
Sanofi-Aventis Deutschland GMBH
65926 Frankfurt am Main
ALEMANIA
5. **MARK SOMMERFELD**
Sanofi-Aventis Deutschland GMBH
65926 Frankfurt am Main
ALEMANIA
6. **NORBERT TENNAGELS**
Sanofi-Aventis Deutschland GMBH
65926 Frankfurt am Main
ALEMANIA
7. **GEORG TSCHANK**
Sanofi-Aventis Deutschland GMBH
65926 Frankfurt am Main
ALEMANIA
8. **ULRICH WERNER**
Sanofi-Aventis Deutschland GMBH
65926 Frankfurt am Main
ALEMANIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 50,335
 FECHA : JUNIO 23 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-076884- -00000-0000

Fecha: 2010-06-25 13:49:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 116

**** CONSIGNACION ****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	130820745	23/06/2010	9,242,400.00

**** CONCEPTO ****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
		TOTAL :	\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

MIT : 300176087-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 50,337
 FECHA : JUNIO 23 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-076884- -00000-0000

Fecha: 2010-06-25 13:49:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 116

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	130820745	23/06/2010	9,242,400.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
27 50003-01-01 SOLICITUDES	*** REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL	702,000.00
	TOTAL :	\$ 702,000.00

SON: SETECIENTOS DOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

G. HOLLMANN RESTREPO
ABOGADOS LTDA

The undersigned, acting on behalf of and representing of domiciled in, hereby appoint(s) LUIS PATIÑO LEYVA and/or GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO, domiciled in Bogotá D.C., Republic of Colombia, as our true and legal attorney with the necessary powers:

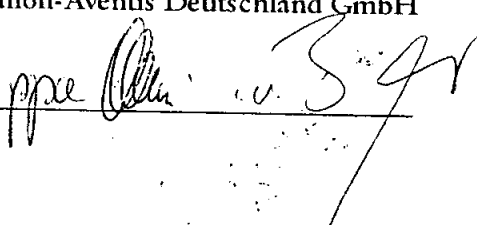
1) To apply to the administrative, judicial and police authorities of the Republic of Colombia, in any instance or appeal, for obtaining registration of patents, utility models, industrial models, as well as their assignments, extensions and changes of name; 2) To prepare, apply for, obtain, execute and register contracts, licenses, authorizations and registrations of any kind; 3) To intervene as plaintiff or defendant, in any instance or appeal, before any judge, court, tribunal, corporation, public officer or authority in any judicial, administrative or police action, caducity and nullity actions; recovery actions, actions arising from obtainment and working of license agreements; actions dealing with unfair competition; criminal actions; actions claiming indemnity for damages, complaints or remarks on patent matters; the performance of precautionary measures, and in any other similar action, measure or appeal related to patents.

To this effect, I (we) hereby authorize him to file applications, make descriptions, protests, amendments, declarations, oppositions, cancellations, appeals and claims; to pay taxes, quotas and liens as provided by Law; to waive or abandon granted rights or rights in process of being granted, to receive all kind of documents and securities; to issue the respective releases and, in general, to take, before said authorities, pertinent steps to the above mentioned purposes, and take all measures they may deem advisable to protect my (our) interests, with all other necessary legal faculties; and I (we) hereby declare as good and valid whatever the attorneys should do to my (our) benefit.

This power comprises the authority to ratify or confirm on my (our) behalf any action, as well as the faculty of receiving, conciliating, desisting, transacting, compromising, substituting and revoking substitutions, taking notifications, and appointing judicial or extra-judicial attorneys.

Signed in on this day of of

Sanofi-Aventis Deutschland GmbH

Signature: 

G. HOLLMANN RESTREPO
ABOGADOS LTDA

Yo (nosotros), obrando en nombre propio y representación de, con domicilio en, nombro(amos) a LUIS PATIÑO LEYVA y/o GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO, con domicilio en Bogotá D.C., República de Colombia, Cra 11ª No 94-76, Oficina 308, apoderado verdadero y legal, con poder especial, amplio y suficiente:

1) Para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, dibujos y modelos industriales, así como sus trasposos, prórrogas y cambios de nombre; 2) Elaborar, tramitar, solicitar, obtener, realizar, ejecutar y registrar contratos, licencias, autorizaciones y registros de cualesquiera clases; 3) Intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso y ante cualquier juez, entidad, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía; acciones reivindicatorias; acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal, demandas penales y civiles; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos, u observaciones a cualquier asunto sobre patentes; al ejercicio de medidas cautelares y cualesquiera otras acciones, medidas o recursos similares relacionados con patentes.

A este efecto, lo facultamos para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la Ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores dando al descargo respectivo, y en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros) intereses, con todas las facultades necesarias, y por este documento desde ahora declaro(amos) válido y bueno todo cuanto los apoderados hicieren en mi (nuestro) beneficio.

Este poder comprende la facultad de ratificar, o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado, así como la facultad de recibir, conciliar, desistir, transigir, comprometer, sustituir y revocar sustituciones, recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Firmado en el de de



Nummer 1529/2005 der Urkundenrolle

Der Notar versichert, daß er die Beteiligten nach einer Vorbefassung im Sinne des § 3 Abs. 1 Satz 1 Nr. 7 BeurkG gefragt hat. Die Frage wurde verneint.

The Notary Public confirms, that he has asked the participants, if there has been a prior involvement in the meaning of § 3 section 1 sentence 1 No. 7 BeurkG (Law on Notarization). This question was answered in the negative.

Die vorstehenden, heute vor mir anerkannten Unterschriften von

It is officially certified that

1. Prokurist Dr. Elmar-Michael Wein, Niedernhausen,
2. Handlungsbevollmächtigter Dieter Breuer, Frankfurt,

werden hiermit beglaubigt.
Sie sind mir persönlich bekannt.

have signed this document.
They are personally known to me.

Gleichzeitig wird bestätigt, daß die Personen zu 1) und 2) gemeinsam zeichnungs- und vertretungsberechtigt sind für die

At the same time it is confirmed that the persons 1) and 2) are entitled to jointly sign and represent in legally binding manner the

Sanofi-Aventis Deutschland GmbH in Frankfurt am Main

laut Eintragung im Handelsregister -HR B 40661-, das vom Notar am 10. Oktober 2005 eingesehen wurde, bzw. lt. vorliegender Vollmacht.

according to the Commercial Register -HR B 40661-, which has been inspected by the Notary Public on October 10, 2005, or according to the letter of authorization, which I have before me.

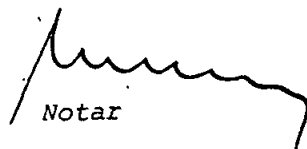
Frankfurt am Main, den 01. Dezember 2005



Friedrich, Notar

Kostenrechnung :

Wert : 10.000,-- EUR	
Gebühr §§ 141, 32, 45 Kost.O.	13,50 EUR
Gebühr § 150 Kost.O.	13,-- EUR
Steuer 16 %	4,24 EUR
	30,74 EUR
	=====


Notar





APOSTILLE

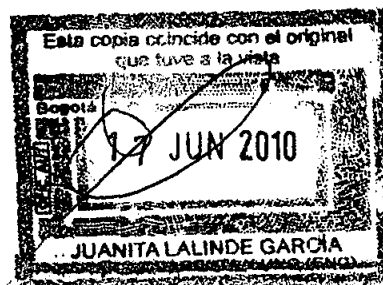
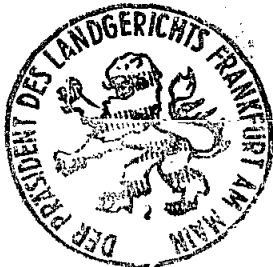
(Convention de la Haye du 5 octobre 1961)

1. Land: Bundesrepublik Deutschland
Diese öffentliche Urkunde
2. ist unterschrieben von Friedrich
3. in seiner Eigenschaft als amtlich bestellter Notar
4. sie ist versehen mit dem Siegel/Stempel des(der)
Notars

Bestätigt

5. in Frankfurt/Main
6. am 05.12.05
7. durch den Herrn Präsidenten des Landgerichts
8. unter Nr. 91 Ea A 9637
9. Siegel/Stempel
10. Unterschrift

i.A. Simon



[Traducción Oficial del Alemán]

Registro Notarial Número 1529/2005

El suscrito Notario confirma que él preguntó a los participantes acerca de un eventual impedimento en el sentido del Artículo 3 inciso 1 frase 1 numeral 7 de la Ley de Notarización. La pregunta fue contestada negativamente.

Autentico oficialmente las firmas que aparecen anteriormente, las cuales fueron reconocidas en mi presencia el día de hoy como las suyas propias por

1. Apoderado Dr. Elmar-Michael Wein, domicilio Niedernhausen,
2. Apoderado Dieter Breuer, domicilio Frankfurt,

quienes son conocidos personalmente por el suscrito Notario.

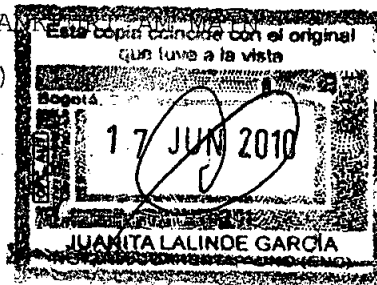
Al mismo tiempo confirmo que las personas señaladas en 1) y 2) se encuentran legalmente autorizados para firmar conjuntamente en nombre y representación de la compañía

Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
domiciliada en Frankfurt am Main

según consta en la correspondiente entrada del Registro Comercial HRB 40661 del Juzgado Municipal de Frankfurt am Main que fue revisado por el Notario el día 10 de Octubre de 2005 o según consta en el poder que él ha tenido a la vista.

Frankfurt am Main, 01 de Diciembre de 2005

KLAUS PETER FRIEDRICH, NOTARIO EN FRANKFURT AM MAIN
(Firma y Sello Oficial)

Nota de gastos:

Valor del negocio: 10.000,-- EUROS

Impuesto Artículo 141, 32, 45 Disp. Impuestos	13,50 EUROS
Impuesto Artículo 150 Disposición de Impuestos	13,-- EUROS
I.V.A. 16%	4,24 EUROS
Total:	30,74 EUROS

Klaus Peter Friedrich, Notario (Firma)

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

400145

Adolf Watzke
COTA FIRMADA POR EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 DIC 27 P 12:03

Watzke
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

ADMITECO91



CERTIFICACIÓN
SOCIEDADES

00 010

El(la) infrascrito(a) _____ certifica: que la(s) firma(s) que antecede(n) y dice(n) es (son) auténtica(s); que el (los) signatario(s) desempeña(n) actualmente el cargo(s) de _____ de _____ que tiene(n) facultad para otorgar este poder; y que dicha compañía existe, cumple su objeto social y está organizada en _____ conforme a las Leyes de _____
 Todos los hechos anteriores le constan, por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe.

Firmado en _____ el _____ de _____ de _____.

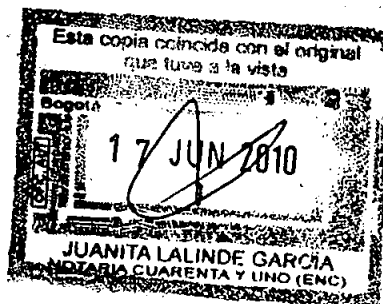
Certification
Companies

The undersigned Klaus Peter Friedrich certifies that the preceding signatures reading Elmar-Michael Wein and Dieter Breuer are authentic; that the signers at present fill the position of Prokurist and of Authorized Signatory of Sanofi Aventis Deutschland GmbH; that they are empowered to grant this power and that said company exists, accomplishes its social object and is organized in Frankfurt am Main in accordance with the Laws of Germany.

All the foregoing facts are known to me due to my having examined the respective documents to which I attest.

Signed in
Frankfurt am Main

on this 19 day of May 2006



Friedrich, Notary Public

Comisión

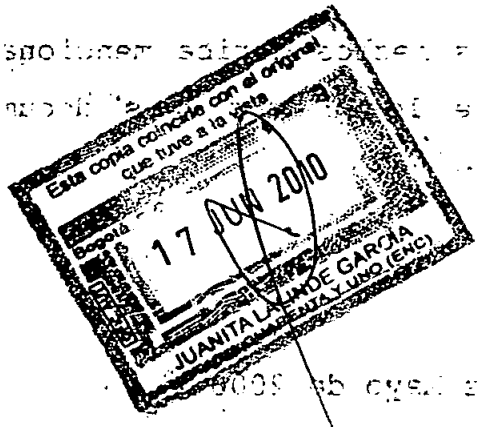
Comisión

El presente documento es una copia de la información que se encuentra en el expediente de la causa No. 1001 de 2009, en el cual se está tramitando la solicitud de inscripción de la compañía de seguros de vida denominada "Seguros de Vida S.A.S.", en el Registro de la Cámara de Comercio de Bogotá D.C. La información contenida en este documento es de carácter confidencial y no debe ser divulgada a terceros sin el consentimiento expreso de la Comisión de Regulación de Seguros.

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2009-10-18 A 10:59

JEFES DE LEYALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

1962-10-18
P. J. J. J. J.
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES DE SECRETARIO

El presente documento es una copia de la información que se encuentra en el expediente de la causa No. 1001 de 2009, en el cual se está tramitando la solicitud de inscripción de la compañía de seguros de vida denominada "Seguros de Vida S.A.S.", en el Registro de la Cámara de Comercio de Bogotá D.C. La información contenida en este documento es de carácter confidencial y no debe ser divulgada a terceros sin el consentimiento expreso de la Comisión de Regulación de Seguros.

1001-10-18

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
16. Juli 2009 (16.07.2009)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2009/087082 A2(51) Internationale Patentklassifikation:
C07K 14/62 (2006.01)Frankfurt am Main (DE). WERNER, Ulrich [DE/DE];
Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, 65926 Frankfurt am
Main (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2009/000018

(74) Gemeinsamer Vertreter: SANOFI-AVENTIS
DEUTSCHLAND GMBH; Patentabteilung, Indus-
triepark Höchst, Geb. K 801, 65926 Frankfurt am Main
(DE).(22) Internationales Anmeldedatum:
6. Januar 2009 (06.01.2009)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2008 003 566.1 9. Januar 2008 (09.01.2008) DE
61/044,662 14. April 2008 (14.04.2008) US
10 2008 025 007.4 24. Mai 2008 (24.05.2008) DE(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE,
EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH
[DE/DE]; Brüningstraße 50, 65929 Frankfurt am Main
(DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HABERMANN, Paul
[DE/DE]; Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, 65926
Frankfurt am Main (DE). SEIPKE, Gerhard [DE/DE];
Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, 65926 Frankfurt am
Main (DE). KURRLE, Roland [DE/DE]; Sanofi-Aventis
Deutschland GmbH, 65926 Frankfurt am Main (DE).
MÜLLER, Günter [DE/DE]; Sanofi-Aventis Deutsch-
land GmbH, 65926 Frankfurt am Main (DE). SOMMER-
FELD, Mark [DE/DE]; Sanofi-Aventis Deutschland
GmbH, 65926 Frankfurt am Main (DE). TENNAGELS,
Norbert [DE/DE]; Sanofi-Aventis Deutschland GmbH,
65926 Frankfurt am Main (DE). TSCHANK, Georg
[DE/DE]; Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, 65926(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektro-
nischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom In-
ternationalen Büro erhältlich

(54) Title: NOVEL INSULIN DERIVATIVES HAVING AN EXTREMELY DELAYED TIME-ACTION PROFILE

(54) Bezeichnung: NEUE INSULINDERIVATE MIT EXTREM VERZÖGERTEM ZEIT- / WIRKUNGSPROFIL

(57) Abstract: The invention relates to novel insulin analogs having a basal time-action profile, which are characterized by the addition and/or substitution of negatively and positively charged amino acid residues and by an amidation of the C-terminal carboxy group of the B chain and histidine in position 8 of the insulin A chain. The invention also relates to the production and use thereof.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft neue Insulinanaloga mit basalem Zeit- / Wirkungsprofil, die durch Addition und/oder Substitution negativ und positiv geladener Aminosäurereste, sowie einer Amidierung der C-terminalen Carboxygruppe der B-Kette und Histidin in Position 8 der Insulin A-Kette charakterisiert sind, ihre Herstellung und Verwendung.

Neue Insulinderivate mit extrem verzögertem Zeit- / Wirkungsprofil

- 5 Die Erfindung betrifft neue Insulinanaloga mit basalem Zeit- / Wirkungsprofil, ihre Herstellung und Verwendung.

Über die letzten Jahre hat die Zahl der Erkrankungen an Diabetes in einem geradezu epidemischen Ausmaß zugenommen. Aufgrund der Erkrankung kann es zu einer gravierenden Verkürzung der Lebenserwartung kommen. Menschen mit Diabetes müssen ihrem Körper oft Insulin von außen zuführen. Es ist sinnvoll, die Behandlung mit Insulin zu optimieren. Mittlerweile gibt es unterschiedliche Insuline mit spezifischen pharmakologischen Eigenschaften zur Behandlung.

15 Praktischerweise werden die unterschiedlichen Insuline nach ihrer Wirkdauer unterschieden in kurzwirksame Insuline, schnellwirkende Insuline, langwirksame Insuline und Mischinsuline. Synonym verwendete Bezeichnungen für langwirksame Insuline sind Verzögerungsinsulin, Depotinsulin oder auch Basalinsulin. Die Wirkstoffe vieler dieser Insulinpräparate sind sogenannte Insulinanaloga, die vom humanen Insulin abgeleitet worden sind durch Substitution, Deletion und / oder Addition einer oder mehrerer Aminosäuren. Die Begriffe „Insulinanaloga“ und „Insuline“ werden hier synonym verwendet.

Das Konzept der intensivierten Insulintherapie versucht das Gesundheitsrisiko abzumindern, indem eine stabile Kontrolle des Blutzuckerspiegels durch frühe Gabe von Basalinsulinen angestrebt wird. Ein Beispiel für ein gängiges Basalinsulin ist das Medikament Lantus® (Wirkstoff: Insulin Glargin = Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) Humaninsulin). Generell gilt es, bei der Entwicklung neuer, verbesserter Basalinsuline die Zahl hypoglykämischer Ereignisse zu minimieren. Ein ideales Basalinsulin wirkt dabei sicher in jedem Patienten mindestens 24 Stunden.

25 Idealerweise setzt die Insulinwirkung verzögert und mit einem möglichst flachen Zeit- / Wirkungsprofil ein, so dass die Gefahr einer kurzfristigen Unterzuckerung deutlich minimiert ist und die Applikation sogar ohne vorherige Einnahme von Nahrungsmitteln erfolgen kann. Eine gute Versorgung mit Basalinsulin ist dann gegeben, wenn die Insulinwirkung möglichst lange gleichbleibend anhält, d.h. der

Körper mit einer konstanten Menge Insulin versorgt wird. Damit ist die Gefahr hypoglykämischer Ereignisse gering und eine patienten- und tagesspezifische Variabilität minimiert. Das pharmakokinetische Profil eines idealen Basalinsulins sollte also durch einen verzögerten Wirkeintritt und durch eine verzögerte, d.h. lang anhaltende und gleichmäßige Wirkung gekennzeichnet sein.

Jedoch zeigt - trotz der bereits erreichten therapeutischen Vorteile - keines der bisher beschriebenen Verzögerungsinsuline die pharmakokinetischen Eigenschaften eines idealen Basalinsulins. Wünschenswert sind Insuline, die ein solch flaches und lang andauerndes Zeit- / Wirkungsprofil haben, dass die Gefahr hypoglykämischer Ereignisse und der tagesabhängigen Varianz im Patienten weiter minimiert ist und die Wirkdauer weiter verzögert ist, so dass unter Umständen nicht mehr täglich Insulin verabreicht werden muss. Dies würde eine vereinfachte Behandlung von Diabetikern ermöglichen, insbesondere von älteren und pflegebedürftigen Diabetikern, die sich Insulin nicht mehr selber injizieren können und wäre somit auch von großem volkswirtschaftlichem Nutzen. In der frühen Phase des Diabetes Typ 2 wären solche Basalinsuline zudem nützlich. Kliniker berichten, dass die bei vielen Menschen vorhandene Phobie vor Spritzen sie davor zurückschrecken lässt, rechtzeitig mit der Insulintherapie zu beginnen. Als Konsequenz ergibt sich eine schlechte Blutzuckereinstellung, die diabetische Spätfolgen nach sich zieht. Ein Basalinsulin, das die Anzahl der durch Spritzen erfolgten Insulingaben vermindert, könnte bewirken, dass Patienten leichter die Insulintherapie annehmen.

Kohn et al. (Peptides 28 (2007) 935-948) beschreiben, dass man die Optimierung der Pharmakodynamik von Insulin dadurch erreichen kann, dass man Insulinanaloge herstellt, deren isoelektrischer Punkt (pI) durch Addition von Lysin oder Arginin an das B- Kettenende oder den N-Terminus der A und B- Kette in Richtung des alkalischen Bereichs verschoben ist, verglichen mit dem isoelektrischen Punkt von Humaninsulin (pI = 5,6), so dass die Löslichkeit unter physiologischen Bedingungen verringert ist und sich ein verlängertes Zeit- / Wirkungsprofil ergibt. Verbindung 18 aus Kohn et al. (Arg (A0), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) Humaninsulin (pI experimentell bestimmt = 7,3; pI berechnet = 7,58) wird dabei als beste Verbindung im Sinne des Konzeptes dargestellt. Das hauptsächlich Ziel bei der Gestaltung

neuer Insulinanaloga sehen Kohn et al. daher in der Addition von positiv geladenen Aminosäuren zur Aminosäuresequenz von Humaninsulin zwecks Erhöhung des isoelektrischen Punktes von $pI = 5,6$ in den neutralen Bereich.

- 5 Es wurde nun aber überraschend gefunden, dass solche Insulinanaloga zu dem beschriebenen wünschenswerten basalen Zeit- / Wirkungsprofil führen, die durch die Merkmale charakterisiert sind, dass
- das B- Kettenende aus einem amidierten basischen Aminosäurerest wie Lysin bzw. Argininamid besteht, d.h. bei dem amidierten basischen Aminosäurerest am B-
 - 10 Kettenende liegt die Carboxylgruppe der endständigen Aminosäure in ihrer amidierten Form vor, und
 - die Aminosäureposition A8 durch einen Histidinrest besetzt wird, und
 - die Aminosäureposition A21 durch einen Glycinrest, Alaninrest, Serinrest oder Threoninrest besetzt wird, und
 - 15 • nicht mehr als ein Aminosäurerest der Gruppe enthaltend A5, A15, A18, B-1, B0, B1, B2, B3 und B4 Asp oder Glu entspricht.

Überraschenderweise haben gerade die beschriebenen Insulinanaloga die gewünschten vorteilhaften dem Ideal nahe kommenden Zeit - / Wirkungsprofile, d.h.

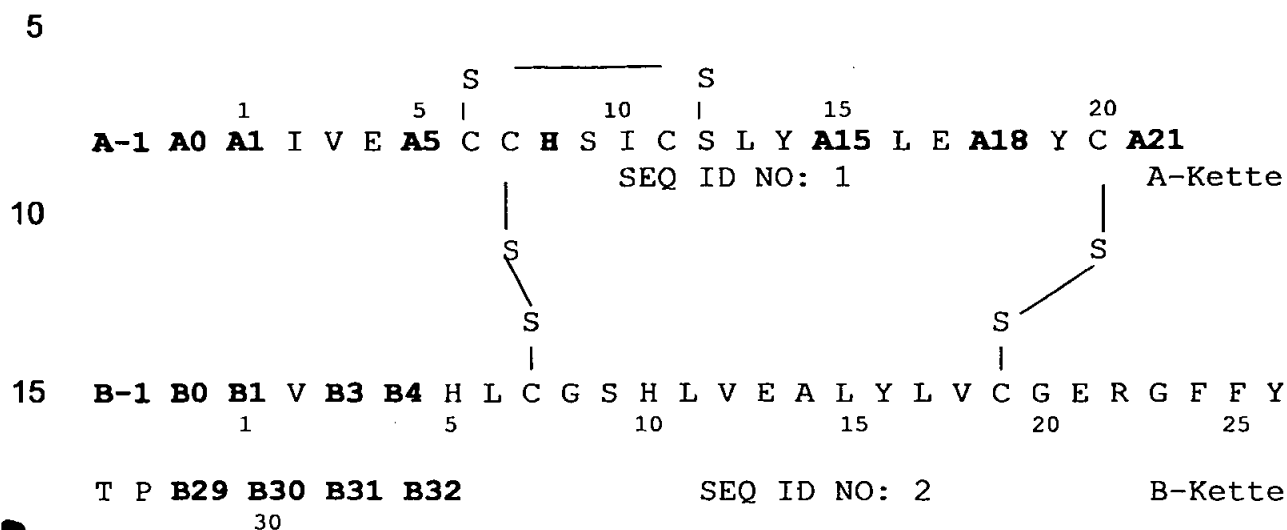
20 einen verzögerten flachem Wirkeintritt und eine längere Wirkdauer auf. Damit wird die Gefahr von hypoglykämischen Ereignissen deutlich minimiert. Die Verzögerung ist so deutlich, dass sich der Effekt überraschend sogar in Modellversuchen an Ratten nachweisen lässt. Im Gegensatz dazu ist die verzögerte Wirkung von Insulin Glargin, wie Figur 2 zeigt, in der Ratte nicht eindeutig zu beobachten. In Figur 1 ist

25 die hypoglykämische Wirkung der erfindungsgemäßen Verbindung YKL202 und YKL203 dargestellt. Die im Rattenversuch erzielten Ergebnisse werden im Hundeversuch bestätigt. Auch hier wird eine deutlich verlängerte Wirkdauer gegenüber Insulin Glargin beobachtet. Damit sind neue Basalinsuline bereitgestellt worden, die deutlich weniger häufig appliziert werden müssen. Neben diesen

30 beschriebenen pharmakokinetischen Vorteilen weisen die erfindungsgemäßen Analoga gegenüber Insulin Glargin bessere Eigenschaften in pharmakokinetischer Hinsicht auf. Zudem zeigen die beanspruchten Insuline auch in physikalisch – chemischer Hinsicht Vorteile.

00 016

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, dass Insulinanaloge der Formel I



B1 Asp, Glu, Phe oder eine chemische Bindung;

B3 Asp, Glu oder Asn;

5 B4 Asp, Glu oder Gln;

B29 Arg, Lys oder einer Aminosäure ausgewählt aus einer Gruppe enthaltend die Aminosäuren Phe, Ala, Thr, Ser, Val, Leu, Glu oder Asp, oder einer chemischen Bindung;

10

B30 Thr oder einer chemischen Bindung;

B31 Arg, Lys oder einer chemischen Bindung;

15

B32 Arg-Amid oder Lys-Amid

20

entspricht, wobei nicht mehr als ein Aminosäurerest der Gruppe enthaltend A5, A15, A18, B-1, B0, B1, B2, B3 und B4 Asp oder Glu entspricht, das gewünschte pharmakologische Profil, d.h. einen verzögerten Wirkeintritt und durch eine länger anhaltende und gleichmäßige Wirkung, haben. Diese Insulinanaloga sind daher Gegenstand der Erfindung.

25

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Insulinanalogon wie oben beschrieben, wobei ein Aminosäurerest der Gruppe enthaltend A5, A15, A18, B-1, B0, B1, B2, B3 und B4 Asp oder Glu entspricht.

30

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Insulinanalogon wie oben beschrieben, wobei bevorzugt A-1 Arg, A0 Arg, A5 Glu, A15 Glu, A18 Asp, A8 His, A21 Gly, B0 Glu, B3 Asp, B4 Glu, B30 Arg oder B30 Lys entspricht.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Insulinanalogon wie oben beschrieben, wobei dieses ausgewählt wird aus einer Gruppe enthaltend Arg (A-1), Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ Humaninsulin, Arg (A-1), Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Lys (B30) – NH₂ Humaninsulin,

- Arg (A-1), Arg (A0), Glu (A15), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ Humaninsulin,
Arg (A-1), Arg (A0), Glu (A15), His (A8), Gly (A21), Lys (B30) – NH₂ Humaninsulin,
Arg (A-1), Arg (A0), Asp (A18), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ Humaninsulin,
Arg (A-1), Arg (A0), Asp (A18), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ Humaninsulin,
5 Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B30) – NH₂ Humaninsulin,
Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Lys (B30) – NH₂ Humaninsulin,
Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B30) – NH₂ Humaninsulin,
Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Lys (B30) – NH₂ Humaninsulin,
Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B30) – NH₂ Humaninsulin,
10 Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Lys (B30) – NH₂ Humaninsulin,
Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin,
Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – Humaninsulin,
Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin,
Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – Humaninsulin,
15 Arg (A0), Asp (A18), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin,
Arg (A0), Asp (A18), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – Humaninsulin,
Arg (A0), Glu (A15), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin,
Arg (A0), Glu (A15), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – Humaninsulin,
Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin,
20 Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – Humaninsulin,
Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin,
Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – Humaninsulin,
Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin,
Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – Humaninsulin,
25 Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ – Humaninsulin,
Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Lys (B30) – NH₂ – Humaninsulin,
Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ – Humaninsulin,
Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Lys (B30) – NH₂ – Humaninsulin,
Arg (A0), Arg (A1), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ – Humaninsulin,
30 Arg (A0), Arg (A1), His (A8), Gly (A21), Lys (B30) – NH₂ – Humaninsulin,
His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin.

Durch die Angabe des Begriffs "Humaninsulin" in den Bezeichnungen der genannten Insulinanaloge wird Bezug auf die Aminosäuresequenzen der A- und B-Kette von

Humaninsulin genommen und alle Abweichungen (Additionen, Substitutionen, Deletionen) davon sind in einer gegebenen Bezeichnung eines Insulinanalogons angegeben.

- 5 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines Insulinanalogons wie oben beschrieben, wobei ein Vorläufer des Insulinanalogons rekombinant hergestellt wird, der Vorläufer enzymatisch zu zwei –kettigem Insulin prozessiert wird und eine Kupplung mit Argininamid in Gegenwart eines Enzyms mit Trypsinaktivität durchgeführt wird, und das Insulinanalogon isoliert wird.

10

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines Insulinanalogons wie oben beschrieben, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Diabetes Mellitus., insbesondere von Diabetes Mellitus Typ I oder Typ II.

15

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Arzneimittel enthaltend ein Insulinanalogon wie oben beschrieben und/oder physiologisch verträgliche Salze davon.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Arzneimittel enthaltend ein Insulinanalog wie oben beschrieben, das therapeutisch zur Knorpelregeneration eingesetzt wird.

- 20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Arzneimittel enthaltend ein Insulinanalog wie oben beschrieben, das therapeutisch zur Unterstützung der beta – Zellregeneration eingesetzt wird.

25

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Formulierung des Insulinanalogons wie oben beschrieben, wobei die Formulierung in wässriger Form enthaltend das gelöste Insulinanalogon vorliegt.

30

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Formulierung des Insulinanalogons wie oben beschrieben, wobei die Formulierung in Form von Pulver vorliegt, insbesondere in kristalliner und/oder amorpher Form.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Formulierung des Insulinanalogons wie oben beschrieben, wobei die Formulierung in Form einer Suspension vorliegt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Formulierung des Insulinanalogons wie oben beschrieben, wobei die Formulierung zusätzlich ein chemisches Chaperon enthält.

- 5 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine DNA kodierend für einen Vorläufer eines Insulinanalogons wie oben beschrieben.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine DNA kodierend für die A-Kette eines Insulinanalogons wie oben beschrieben.

10

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine DNA kodierend für die B-Kette eines Insulinanalogons wie oben beschrieben.

15

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Vektor enthaltend eine DNA wie oben beschrieben.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Wirtsorganismus enthaltend eine DNA wie oben beschrieben oder einen Vektor wie oben beschrieben.

- 20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Präproinsulinanalogon, dadurch gekennzeichnet, dass das C-Peptid an seinem N-Terminus den Aminosäurerest Arginin trägt und sein C-Terminus durch die Form Arg Arg, Arg Lys oder Lys Arg Arg gekennzeichnet ist.

- 25 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Formulierung wie oben beschrieben, bei der noch zusätzlich ein Glucagon-Like Peptide-1 (GLP1) oder ein Analogon oder Derivat davon, oder Exendin-3 bzw. -4 oder ein Analogon oder Derivat davon, vorzugsweise Exendin-4 enthalten ist.

- 30 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Formulierung wie oben beschrieben, bei dem ein Analogon von Exendin-4 ausgewählt wird aus einer Gruppe enthaltend H-desPro³⁶-Exendin-4-Lys₆-NH₂,
H-des(Pro^{36,37})-Exendin-4-Lys₄-NH₂ und
H-des(Pro^{36,37})-Exendin-4-Lys₅-NH₂,

oder ein pharmakologisch tolerierbares Salz davon.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Formulierung wie oben beschrieben, bei dem ein Analogon von Exendin-4 ausgewählt wird aus einer Gruppe enthaltend

- 5 desPro³⁶[Asp²⁸]Exendin-4 (1-39),
 desPro³⁶[IsoAsp²⁸]Exendin-4 (1-39),
 desPro³⁶[Met(O)¹⁴, Asp²⁸]Exendin-4 (1-39),
 desPro³⁶[Met(O)¹⁴, IsoAsp²⁸]Exendin-4 (1-39),
 desPro³⁶[Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]Exendin-2 (1-39),
 10 desPro³⁶[Trp(O₂)²⁵, IsoAsp²⁸]Exendin-2 (1-39),
 desPro³⁶[Met(O)¹⁴Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]Exendin-4 (1-39) und
 desPro³⁶[Met(O)¹⁴Trp(O₂)²⁵, IsoAsp²⁸]Exendin-4 (1-39),
 oder ein pharmakologisch tolerierbares Salz davon.

- 15 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Formulierung wie im vorigen Absatz beschrieben, bei denen an die C-Termini der Analoga von Exendin-4 das Peptid - Lys₆-NH₂ angefügt ist.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Formulierung wie oben beschrieben, bei dem ein Analogon von Exendin-4 ausgewählt wird aus einer Gruppe enthaltend

- 20 H-(Lys)₆- des Pro³⁶[Asp²⁸]Exendin-4(1-39)-Lys₆-NH₂
 des Asp²⁸Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ Exendin-4(1-39) -NH₂,
 H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]Exendin-4(1-39) -NH₂,
 H-Asn-(Glu)₅ des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]Exendin-4(1-39) -NH₂,
 25 des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]Exendin-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
 H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]Exendin-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
 H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]Exendin-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

- H-(Lys)₆- des Pro³⁶[Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]Exendin-4(1-39)-Lys₆-NH₂,
 30 H- des Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵]Exendin-4(1-39) -NH₂,
 H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]Exendin-4(1-39) -NH₂,
 H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]Exendin-4(1-39) -NH₂,
 des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]Exendin-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
 H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]Exendin-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]Exendin-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

H-(Lys)₆- des Pro³⁶ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]Exendin-4(1-39)-Lys₆-NH₂,

des Met(O)¹⁴ Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ Exendin-4(1-39) -NH₂,

H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]Exendin-4(1-39) -NH₂,

5 H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] Exendin-4(1-39) -NH₂,

des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]Exendin-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]Exendin-4(1-39)-Lys₆-NH₂,

H-Asn-(Glu)₅ des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] Exendin-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

10 H-(Lys)₆- des Pro³⁶ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]Exendin-4(1-39)-Lys₆-NH₂,

des Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵]Exendin-4(1-39) -NH₂,

H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]Exendin-4(1-39) -NH₂,

H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] Exendin-4(1-39) -NH₂,

des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]Exendin-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

15 H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]Exendin-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] Exendin-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

oder ein pharmakologisch tolerierbares Salz davon.

20

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Formulierung wie oben beschrieben, bei dem zusätzlich Arg³⁴, Lys²⁶ (N^ε(γ-glutamyl(N^α-hexadecanoyl))) GLP-1 (7-37) [liraglutide] oder ein pharmakologisch tolerierbares Salz davon enthalten ist.

25 Dem Fachmann ist dabei klar, dass die erfindungsgemäßen Insuline Gegenstand einer pharmazeutischen Formulierung sein können, die nach Applikation vorteilhaft wirkt. Dabei geht man von wässrigen Lösungen aus. Entsprechend müssen weitere Komponenten mischbar sein. Die Gefahr viraler tierischer Kontamination wird dadurch minimiert, dass die Zubereitung keine Komponenten enthalten sollte, die

30 aus tierischen Quellen stammen. Es ist weiterhin vorteilhaft, durch Zusatz von Konservierungsmitteln eine mikrobielle Verunreinigung zu verhindern. Durch den Zusatz isotoner Agentien kann eine mögliche negative Auswirkung der Formulierung auf die Physiologie der Gewebezellen an der Applikationsstelle kompensiert werden. Stabilisierend kann sich der Zusatz von Protamin auswirken, so dass man

weitgehend salzfreien Insulinzubereitung gelangen kann, wenn man der Formulierung Protamin zufügt. Der Zusatz von einer phenolischen Komponente kann zu einer Stabilisierung der Struktur des verwendeten Insulinanalogons führen und so unter anderem den Verzögerungseffekt beim Wirkungseintritt zusätzlich bewirken.

- 5 Der Formulierung zugesetzt können auch Substanzen sein, die die Raumstruktur der erfindungsgemäßen Verzögerungs-insuline stabilisieren und zu besserer thermischen Stabilität führen. Solche chemischen Chaperone können z.B. kurze synthetische Peptide, die auch Aminosäureanaloge enthalten können oder z.B. vom C-Peptid des Insulin abgeleitete Peptidsequenzen umfassen.

10

Zur Entwicklung von Depotformen können die erfindungsgemäßen Insuline in Nanopartikel eingebunden werden. Denkbar sind auch sogenannte „Slow release“ Formulierungen, bei denen das erfindungsgemäße Verzögerungsinsulin reversibel an polymere Träger gebunden vorliegt.

15

Die erfindungsgemäßen Insuline können parallel zu schnellwirksamen Insulinen wie Apidra®, NovoRapid®, Humalog® oder sich in Entwicklung befindlichen Insulinderivaten oder Formulierungen mit entsprechendem Zeit - / Aktionsprofil oder inhalierbarem Insulin oder nasal oder oral applizierten Insulinen, die sich in

- 20 Entwicklung befinden, verabreicht werden. Dabei ist es dem Fachmann klar, dass dazu auch entsprechend formulierte Mischungen aus schnell wirksamen und erfindungsgemäßem Verzögerungsinsulin verwendet werden können. Weiterhin können die erfindungsgemäßen Insulinanaloge in pharmazeutischen Zubereitungen verwendet werden, die Peptide, die durch eine dem GLP-1 (Glucagon like Peptide-1)

- 25 oder dem Exendin-4 bzw. Exendin-3 vergleichbare Aktivität beschrieben sind, enthalten. Beispiele für solche Peptide stellen GLP-1 (7-37), Exenatide (Byetta®) oder Peptide, deren Herstellung in den Patentanmeldungen WO 2006/058620, WO 2001/04156, WO 2004/005342 und WO 98/08871 beschrieben ist, dar. Besonders vorteilhaft sind dabei Formulierungen, die eine Depotformulierung dieser Peptide

- 30 nthalten. Vorteilhaft besonders in der Anfangsphase der TypII Diabetes Erkrankung sind Therapieformen, die parallel zu Verabreichung der erfindungsgemäßen Pharmazeutika vorsehen, die die Insulinwirkung erhöhen, wie z.B. Metformin. Kombinationstherapien mit Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitoren, die den Spiegel an Inkretinen erhöhen, sind wie Kombinationen mit Sulfonylharnstoffen, die die

Insulinausschüttung im Pankreas erhöhen, ebenfalls möglich. Besonders vorteilhaft können die erfindungsgemäßen Verzögerungsinsuline dann eingesetzt werden, wenn durch Applikation von Differenzierungsfaktoren, die Regeneration von Betazellen aus entsprechenden Stammzellen eingeleitet wird. All diese

5 Anwendungen sind beispielhaft für die Therapie des Diabetes genannt und ebenfalls Gegenstand der Erfindung. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist somit die Verwendung der erfindungsgemäßen Insuline in Kombination mit anderen Wirkstoffen zur Behandlung von Diabetes, insbesondere Diabetes Typ I oder Typ II Diabetes.

10

Weiterer Erfindungsgegenstand ist auch eine Verwendung der erfindungsgemäßen Insuline bei Regenerationsprozessen, die das Skelett, wie z.B. die Knorpelregeneration, betreffen. Bei dieser Verwendung kommt es darauf an, kontrolliert das mitogene Potential von Insulinen zu nutzen, ohne dabei eine starke metabolische Reaktion hervorzurufen.

15

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Arzneimittel, das ein erfindungsgemäßes Analogon enthält, welches insbesondere eine wässrige Formulierung oder ein Pulver darstellt.

20

Das Arzneimittel ist eine pharmazeutische Zubereitung, die vorzugsweise eine Lösung oder Suspension zu Injektionszwecken ist; sie ist gekennzeichnet durch einen Gehalt an mindestens einem erfindungsgemäßen Insulinanalog, und/oder mindestens einem von deren physiologisch verträglichen Salzen in gelöster, amorpher und/oder kristalliner – vorzugsweise in gelöster – Form.

25

Die Zubereitung weist vorzugsweise einen pH-Wert zwischen etwa 2,5 und 8,5, insbesondere zwischen etwa 4,0 und 8,5 auf, enthält ein geeignetes Isotonisierungsmittel, ein geeignetes Konservierungsmittel und gegebenenfalls ein n
30 geeigneten Puffer, sowie vorzugsweise auch eine bestimmte Zink - Ionenkonzentration, in steriler wässriger Lösung. Die Gesamtheit der Zubereitungsbestandteile außer dem Wirkstoff bildet den Zubereitungs-Träger. Geeignete Isotonisierungsmittel sind z.B. Glycerin, Glukose, Mannit, NaCl, Calcium- oder Magnesium-Verbindungen wie CaCl_2 etc. Durch die Wahl des

Isotonisierungsmittels und/oder Konservierungsstoffes beeinflusst man die Löslichkeit der erfindungsgemäßen Insuline bzw. deren physiologisch verträgliche Salze bei schwach sauren pH-Werten.

- 5 Geeignete Konservierungsmittel sind z.B. Phenol, m-Cresol, Benzylalkohol und/oder p-Hydroxybenzoesäureester.

Als Puffersubstanzen, insbesondere zur Einstellung eines pH-Wertes zwischen etwa 4,0 und 8,5 können z.B. Natriumacetat, Natriumcitrat, Natriumphosphat etc.

- 10 verwendet werden. Ansonsten sind zur Einstellung des pH-Wertes auch physiologisch unbedenkliche verdünnte Säuren (typischerweise HCl) bzw. Laugen (typischerweise NaOH) geeignet.

- 15 Wenn die Zubereitung einen Zinkgehalt besitzt, ist ein solcher von 1 µg/ml bis 2 mg/ml, insbesondere von 1 µg/ml bis 200 µg Zink/ml bevorzugt. Über den Zusatz von Zink lässt sich das Wirkprofil der erfindungsgemäßen Insulinanaloga überraschend gut beeinflussen. Dies erlaubt Zubereitungen, die sich in Bezug auf Gesamtwirkungsdauer, die Geschwindigkeit des Wirkungseintritts und das Profil der Wirkungskurve unterscheiden herzustellen, die so eine individuelle Einstellung des
- 20 Patienten erlauben.

- 25 Zwecks Variation des Wirkstoffprofils der erfindungsgemäßen Zubereitung kann auch unmodifiziertes Insulin, vorzugsweise Rinder-, Schweine- oder Human-Insulin, insbesondere Humaninsulin, oder Insulinanaloga und Derivate davon zugemischt werden. Ebenfalls können ein oder mehrere Exendin-4 Derivate oder Peptide, die durch eine dem GLP-1 (Glucagon like peptide-1) vergleichbare Aktivität charakterisiert sind, zugemischt werden. Solche Arzneimittel (Zubereitungen) sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

- 30 Bevorzugte Wirkstoffkonzentrationen sind solche entsprechend etwa 1 – 1500, weiter bevorzugt etwa 5 – 1000 und insbesondere etwa 40 – 400 internationale Einheiten/ml.

Die erfindungsgemäßen Insulinanaloga werden zunächst als Vorstufe, die noch nicht das Amid umfasst, biotechnologisch hergestellt. Dem Fachmann ist geläufig, das es eine Vielzahl von Möglichkeiten zur Herstellung von Insulinen gibt. Als Wirtszellsysteme finden dabei Bakterien, Hefen und höhere Pflanzen bzw.

- 5 fermentativ zu kultivierende Pflanzenzellen Verwendung. Falls die Kostenbetrachtung es erlaubt sind auch Expressionssysteme, die tierische Zellen als Wirtssystem nutzen, denkbar. Voraussetzung dafür ist aber eine sichere Freiheit von tierischen Viren. Somit ist klar, dass die beispielhaft beschriebenen Expressionssysteme nur einen kleinen Ausschnitt der für die rekombinante
- 10 Herstellung von Proteinen entwickelten Wirts/Vektorsysteme darstellen. In der Anmeldung werden z.B. biotechnologische Verfahren, die Hefe- oder Pflanzensysteme wie Moose, Algen oder höhere Pflanzen wie Tabak, Erbse, Distel, Gerste, Mais oder Raps zur Grundlage haben nicht beschrieben. Dennoch sind Wirts/Vektor Systeme sowie kodierende DNA – Sequenzen, die die Herstellung der
- 15 Zielpeptide in entsprechenden biotechnologischen Expressionssystemen erlauben, ebenfalls Bestandteil der Erfindung. Wirtsorganismen können also insbesondere ausgewählt werden aus dem Pflanzenreich aus Organismen der ersten Abteilung Schizophyta enthaltend Schizomycetes, Bakterien oder Blaualgen, Organismen der 2. Abteilung Phycophyta V. Klasse Chlorophyceae, Organismen der 2. Abteilung
- 20 Phycophyta VII. Klasse Rhodophyceae, Organismen der 3. Abteilung Mycophyta, Organismen der 5. Abteilung Bryophyta und Organismen der 7. Abteilung Spermatophyta.

- 25 In der Europäischen Patentanmeldung EP-A 1 222 207 ist ein Plasmid pINT358d beschrieben, das für ein Prä - Proinsulin codiert, welches ein verändertes C-Peptid umfasst. Mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist es nun möglich, gezielt die das Proinsulin kodierende Sequenz so zu verändern, dass Prä - Proinsuline exprimiert werden können, die als Vorstufen für die erfindungsgemäßen Insuline dienen können. Entsprechende Fusionsproteine müssen nicht notwendigerweise
- 30 intrazellulär hergestellt werden. Es ist dem Fachmann klar, dass solche Proteine auch durch bakterielle Expression mit anschließender Sekretion in das Periplasma und/oder in den Kulturüberstand hergestellt werden können. Die Europäische Patentanmeldung EP-A 1 364 029 beschreibt dies beispielhaft. Die Proinsulin-

vorstufen, die zu den erfindungsgemäßen Analoga führen, sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Die so hergestellten Proinsuline können prinzipiell zu einer Insulinanalogavorstufe umgewandelt werden, die in Position A0 Lysin oder Arginin umfasst und am C-terminalen Ende der B - Kette Lysin oder Arginin trägt. Alternativ kann eine positiv geladene Aminosäure semisynthetisch an den N-Terminus der A-Kette addiert werden, wenn Lysin oder Arginin nicht ohnehin schon vorliegen.

Liegen die erfindungsgemäßen Proinsuline nach intrazellulärer Expression in Bakterien als Einschlusskörper oder löslich vor, müssen diese Vorstufen durch in vitro Faltung in die richtige Konformation gefaltet werden, bevor die Prozessierung und biochemische Modifikation vorgenommen werden kann. Dabei erlaubt das beschriebene Fusionsprotein eine direkte Faltung nach Denaturierung mittels Harnstoff oder Guanidinium Hydrochlorid, Faltungsintermediate sind dabei ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Zur Anreicherung der einzelnen Zwischenstufen finden biochemische Methoden insbesondere Trennverfahren Verwendung, deren zugrunde liegenden Prinzipien publiziert und sogar Gegenstand von Lehrbüchern sind. Dem Fachmann ist klar, dass solche Prinzipien in Folge kombiniert werden können und so zu Verfahren führen können, die in ihre Abfolge vorher nicht publiziert wurden. Verfahren, die zur Reinigung der erfindungsgemäßen Analoga führen sind somit ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Insulinanaloga, wobei ein Vorläufer des Insulinanalogons rekombinant hergestellt und enzymatisch zu einer 2 – kettigen Insulinvorstufe umgewandelt wird, die N-terminal zu Aminosäure 1 der A- Kette Arginin bzw. Lysin trägt und am C-terminalen Ende der B-Kette einen Lysin oder Argininrest aufweist, der mit Argininamid oder Lysinamid in Gegenwart eines Enzyms mit Trypsinaktivität in das Amid und somit in das erfindungsgemäße Verzögerungsinsulin überführt und über ein biochemischer Reinigungsverfahren hochrein dargestellt wird.

Proteine, welche sich durch Substitution wenigstens eines natürlich auftretenden Aminosäurerestes mit anderen Aminosäureresten und/oder Addition und/oder Entfernen wenigstens eines Aminosäurerestes von dem entsprechenden, ansonsten gleichen natürlich vorkommenden Protein unterscheiden, werden als „Analoga“ von Proteinen bezeichnet. Dabei kann es sich bei den hinzugefügten und / oder ersetzten Aminosäureresten auch um solche handeln, die nicht natürlich vorkommen.

Proteine, welche durch chemische Modifizierung bestimmter Aminosäurereste von Ausgangsproteinen erhalten werden, bezeichnet man als „Derivate“ von Proteinen. Die chemische Modifikation kann z.B. in der Addition einer oder mehrerer bestimmter chemischer Gruppen an eine oder mehrere Aminosäuren bestehen.

Figurenlegende:

Fig. 1: Blutzuckersenkende Wirkung von erfindungsgemäßen Insulinanaloga in Ratten

Fig. 2: Blutzuckersenkende Wirkung von Insulin Glargin in Ratten

Die folgenden Beispiele sollen den Erfindungsgedanken illustrieren, ohne dabei beschränkend zu wirken.

Beispiel 1: Herstellung des Vektorderivates pINT3580, das für Gly (A21) – Insulin und ein modifiziertes C-Peptid, das an der C/A- Kettengrenze Arg Arg trägt, kodiert.

Die Europäische Patentanmeldung EP-A 1 222 207 beschreibt die Plasmide pINT358d, pINT91d und die Primer – Sequenz Tir. DNA dieser Produkte findet Verwendung in der Konstruktion des Plasmides pINT3580. Das Plasmid pINT358d ist dabei durch eine Gensequenz charakterisiert, die für ein modifiziertes C-Peptid mit besonderen Eigenschaften kodiert. Drei Primersequenzen werden synthetisiert:

00 029

pint3580_glya21rev

5'-CAAAGGTCGACTATTAGGCCGCAGTAGTTCTCCAGCTGG-3' (SEQ ID NO: 3)

- 5 Dieser Primer dient nach Aufarbeitung dazu in Position 21 der A-Kette der von pINT358d kodierten Proinsulinsequenz Glycin (fett gedruckt, unterstrichen) anstelle von Asparagin einzuführen.

arg_cjuncf

10

5'-GTCCCTGCAGCGTCGCGGCATCGTGGAGCAG-3' (SEQ ID NO: 4)

Dieser Primer dient, wie der Primer arg_cjunc_rev, zur Einführung von Arginin anstelle von Lysin an der Insulin A-/ B- Kettengrenze.

15

arg_cjunc_rev

5'-CCACGATGCC GCGACGCTGC AGGGACCCCT CCAGCG-3' (SEQ ID NO: 5)

- 20 Das Codon für das einzuführende Arginin ist in beiden Primern fett gedruckt. Mit DNA des Plasmides pINT358d als Matrize wird mit den Primerpaaren Tir / arg_cjunc_rev und arg_cjuncf / pint3580_glya21rev entsprechend der Europäischen Patentanmeldung EP-A 1 222 207 je eine PCR durchgeführt. Aliquots der Produkte beider Reaktionen werden kombiniert und zusammen mit dem Primerpaar Tir /
- 25 pint3580_glya21rev in einer dritten PCR eingesetzt. Das Produkt dieser Reaktion wird nach gelelektrophoretischer Auftrennung des Reaktionsgemisches gereinigt und mit den Restriktionsenzymen Sal1 / Nco1 nach Angaben des Herstellers in ein und derselben Reaktion verdaut, das Reaktionsgemisch gelelektrophoretisch aufgetrennt und das die Proinsulinsequenz kodierende DNA – Fragment isoliert. Das Fragment
- 30 wird anschließend über eine DNA- Ligasereaktion in die Nco1 / Sal1 geöffnete pINT91d Vektor DNA inseriert.

Mit dem Ligationsgemisch werden kompetente E. coli Bakterienzellen transformiert. Das Transformationsgemisch wird auf Selektionsplatten, die 25 mg/ l Ampicillin

00 030

enthalten, ausplattiert. Plasmid DNA wird von Kolonien isoliert und mittels DNA – Sequenzanalyse charakterisiert. Richtige Plasmide erhalten die Bezeichnung pINT3580.

5

Beispiel 2: Konstruktion des Plasmides pINT3581 kodierend für His (A8), Gly (A21) – Präproinsulin

10 Di Konstruktion erfolgt wie in Beispiel 1 beschrieben über 3 Polymerase Kettenreaktionen. Das Produkt der dritten Reaktion wird nach Nco1/ Sal1 Spaltung in die Nco1 / Sal1 geöffnete pINT91d Vektor DNA inseriert. Verwendet werden die Primer Tir und pint3580_glya21rev. Zwei weitere Primer werden synthetisiert:

pint3580_Ha8f

15

5'-AGCAGTGCTGCCACAGCATCTGCTCCCTCTAC-3' (SEQ ID NO: 6)

pint3580_Ha8rev

20 5'-GAG CAGATGCT GTG GCAGCACTG CTCCACGATG-3' (SEQ ID NO: 7)

Das Codon, das für Histidin in Position 8 der A- Kette kodiert ist jeweils fett herausgestellt. Die Konstruktion wird wie ins Beispiel 1 beschrieben durchgeführt. Template für PCR1 und 2 ist DNA des Plasmides pINT3580. PCR1 wird mit dem Primerpaar Tir/ pint3580_Ha8rev und PCR2 mit dem Primerpaar pint3580_Ha8f/ pint3580_glya21rev durchgeführt. In PCR3 wird mit dem Primerpaar Tir/ pint3580_glya21rev eingesetzt. Template ist dabei ein Gemisch der Reaktionsprodukte von PCR1 und PCR2. Richtige Plasmide erhalten die Bezeichnung pINT3581.

30

Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL202, die als Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin charakterisiert ist und die nach Amidierung mit Argininamid entsteht.

Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL202b, die als Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – Humaninsulin charakterisiert ist und die nach Amidierung mit Lysinamid entsteht.

5

Beispiel 3: Konstruktion des Plasmides pINT3582 kodierend für His (A8), Glu (A5), Gly (A21) – Präproinsulin

Die Konstruktion erfolgt wie in Beispiel 1 und 2 beschrieben über 3 Polymerase Kettenreaktionen. Das Produkt der dritten Reaktion wird nach Nco1/ Sal1 Spaltung in die Nco1 / Sal1 geöffnete pINT91d Vektor DNA insertiert. Verwendet werden die Primer Tir und pint3580_glya21rev. Zwei weitere Primer werden synthetisiert:

pint3581_Ea5f

15

5'GCATCGTGGAGGAGTGCTGCCACAGCATCTG 3' (SEQ ID NO: 8)

pint3581_Ea5rev

20 5'-CTGT GGCAGCACTC CTCCACGATG CCGCGACG-3' (SEQ ID NO: 9)

Das Codon, das für Glutaminsäure in Position 5 der A- Kette kodiert, ist jeweils fett herausgestellt. Die Konstruktion wird wie ins Beispiel 1 beschrieben durchgeführt.

Template ist DNA des Plasmides pINT3581. Richtige Plasmide erhalten die

25 Bezeichnung pINT3582.

Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL202-1, die als Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin charakterisiert ist und die nach Amidierung mit Argininamid entsteht.

30

Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL202-1b, die als Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) –

NH₂ – Humaninsulin charakterisiert ist und die nach Amidierung mit Lysinamid entsteht.

00 032

- 5 Beispiel 4: Konstruktion des Plasmides pINT3583 kodierend für His (A8), Asp (A18), Gly(A21) – Präproinsulin

Die Konstruktion erfolgt abweichend von Beispiel 1 über nur eine Polymerase Kettenreaktion. Das Produkt dieser Reaktion wird nach Nco1/ Sal1 Spaltung in die

- 10 Nco1 / Sal1 geöffnete pINT91d Vektor DNA inseriert. Verwendet wird der Primer Tir. Ein weiterer Primer wird synthetisiert:

pint3580_Da18rev

- 15 5' CAAAGGTCGACTATTAGCCGCAGTAGTCCTCCAGCTGGTAGAGGGAG 3'
(SEQ ID NO: 10)

- Das Codon, das für Asparaginsäure in Position 18 der A- Kette kodiert, ist fett
herausgestellt. Template ist DNA des Plasmides pINT3581. Richtige Plasmide
20 erhalten die Bezeichnung pINT3583.

Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung
YKL202, die als Arg (A0), Asp (A18), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂
– Humaninsulin charakterisiert ist und die nach Amidierung mit Argininamid entsteht.

- 25 Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung
YKL202-2b, die als Arg (A0), Asp (A18), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) –
NH₂ – Humaninsulin charakterisiert ist und die nach Amidierung mit Lysinamid
ntsteht.

30

Beispiel 5: Konstruktion des Plasmides pINT3585 kodierend für His (A8), Glu (A15),
Gly (A21) – Präproinsulin

00 033
Die Konstruktion erfolgt abweichend von Beispiel 1 über nur ein Polymerase Kettenreaktion. Das Produkt dieser Reaktion wird nach Nco1/ Sal1 Spaltung in die Nco1 / Sal1 geöffnete pINT91d Vektor DNA insertiert. Verwendet wird der Primer Tir. Ein weiterer Primer wird synthetisiert:

5

pint3580_Ea15rev

5'- CAAAGGTCGA CTATTAGCCG CAGTAGTTCTCCAGCTCGTA GAGGGAGCAG
ATGCTG -3' (SEQ ID NO: 11)

10

Das Codon, das für Glutaminsäure in Position 15 der A- Kette kodiert, ist fett herausgestellt. Template ist DNA des Plasmides pINT3581. Richtige Plasmide erhalten die Bezeichnung pINT3585.

15

Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL202-3, die als Arg (A0), Glu (A15), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin charakterisiert ist und die nach Amidierung mit Argininamid entsteht.

20

Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL202-3b, die als Arg (A0), Glu (A15), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – Humaninsulin charakterisiert ist und die nach Amidierung mit Lysinamid entsteht.

25

Beispiel 6: Konstruktion des Plasmides pINT3588 kodierend für His (A8), Gly (A21), Asp (B3)- Präproinsulin

30

Die Konstruktion erfolgt wie in Beispiel 1 und 2 beschrieben über 3 Polymerase Kettenreaktionen. Das Produkt der dritten Reaktion wird nach Nco1/ Sal1 Spaltung in die Nco1 / Sal1 geöffnete pINT91d Vektor DNA insertiert. Verwendet werden die Primer Tir und pint3580_glya21rev. Zwei weitere Primer werden synthetisiert:

pint3581_Db3f

5'- GCACGATTTGTGGACCAGCACCTGTGCGGC -3' (SEQ ID NO: 12)

pint3581_Db3rev

5

5'- CACAGG TGCTGGTCCA CAAATCGTGC CGAATTTC -3' (SEQ ID NO: 13)

Das Codon, das für Asparagin in Position 3 der Insulin B- Kette kodiert ist jeweils fett herausgestellt. Die Konstruktion wird wie ins Beispiel 1 beschrieben durchgeführt.

10 Template ist DNA des Plasmides pINT3581. Richtige Plasmide erhalten die Bezeichnung pINT3588.

Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL202-4, die als Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin charakterisiert ist und die nach Amidierung mit Argininamid entsteht.

15

Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL202-4b, die als Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – Humaninsulin charakterisiert ist und die nach Amidierung mit Lysinamid entsteht.

20

Beispiel 7: Konstruktion des Plasmides pINT3593 kodierend für His (A8), Gly (A21), Glu (B4) Präproinsulin

25

Die Konstruktion erfolgt wie in Beispiel 1 und 2 beschrieben über 3 Polymerase Kettenreaktionen. Das Produkt der dritten Reaktion wird nach Nco1/ Sal1 Spaltung in die Nco1 / Sal1 geöffnete pINT91d Vektor DNA inseriert. Verwendet werden die Primer Tir und pint3580_glya21rev. Zwei weitere Primer werden synthetisiert :

30

pint3581_Eb4f

5'- ACGATTTGTGAACGAGCACCTGTGCGGCTC -3' (SEQ ID NO: 14)

pint3581_Eb4rev

5'- CGCACAGG TGCTCGTTCA CAAATCGTGC CGAATTTC -3' (SEQ ID NO: 15)

- 5 Das Codon, das für Glutamin in Position 4 der Insulin B- Kette kodiert, ist fett herausgestellt. Die Konstruktion wird wie ins Beispiel 1 beschrieben durchgeführt. Template ist DNA des Plasmides pINT3581. Richtige Plasmide erhalten die Bezeichnung pINT3593.
- 10 Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL202-5, die als Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin charakterisiert ist und die nach Amidierung mit Argininamid entsteht.
- 15 Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL202-5b, die als Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – Humaninsulin charakterisiert ist und die nach Amidierung mit Lysinamid entsteht.
- 20
- Beispiel 8: Konstruktion des Plasmides pINT3597 kodierend für His (A8), Gly (A21), Glu (B0) -Präproinsulin
- Die Konstruktion erfolgt über 2 Polymerase Kettenreaktionen. Verwendet wird der
- 25 Primer pint3580_glya21rev. Zwei weitere Primer werden synthetisiert:
- pint3581_Eb0f1
- 5'- CAACAGGAA ATTCGGCACG AGAGTTTGTG AACCAGCACC TGTG-3' (SEQ
- 30 ID NO: 16)
- pint3581_Eb01f2

00 036

5'- TATCGA CCAT GG CAACAACA TCAACAGGAA ATTCGGCACG AGAG-3'

(SEQ ID NO: 17)

5 Dabei überlappen sich die beiden Primer partial. Pint3581_Eb0f2 enthält eine NcoI – Erkennungssequenz. Diese ist unterstrichen dargestellt. Das Codon, das für Glutaminsäure in Position 0 am Anfang B- Kette kodiert, ist jeweils fett herausgestellt. Template für PCR1 ist DNA des Plasmides pINT3581.

10 PCR1 wird mit dem Primerpaar pint3581_Eb-1f2 / pint3580_glya21rev. Template für PCR2 ist das Produkt aus PCR1. PCR2 wird mit dem Primerpaar pint3581_Eb-1f2 / pint3580_glya21rev durchgeführt. Das Produkt aus PCR2 überdeckt die vollständige Präproinsulinsequenz. Das Produkt der zweiten Reaktion wird nach NcoI/ SalI Spaltung in die NcoI / SalI geöffnete pINT91d Vektor DNA inseriert. Richtige Plasmide erhalten die Bezeichnung pINT3597.

15 Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL202-6, die als Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin charakterisiert ist und die nach Amidierung mit Argininamid entsteht.

20 Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL202-6b, die als Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – Humaninsulin charakterisiert ist und die nach Amidierung mit Lysinamid entsteht.

25 Ersetzt man das Codon für Glutaminsäure in Position B0 durch das Codon von Asparaginsäure und folgt dem Beispiel, so gelangt man zu Plasmiden, die in Position B0 anstelle von Glutaminsäure Asparaginsäure tragen.

30 Beispiel 9: Konstruktion des Plasmides pINT3700 kodierend für His (A8), Gly (A21), Lys (B0) - Präproinsulin

Die Konstruktion dient dazu, an der Grenze zwischen Präsequenz und Start der B-Kette anstelle des Codons für Arginin das Codon für Lysin einzuführen. Die Konstruktion erfolgt über zwei Polymerase Kettenreaktionen. Verwendet wird der Primer pint3580_glya21rev. Zwei weitere Primer werden synthetisiert.

5

pint3581_Eb0f1

5'- CAACAGGAA ATTCGGCA **AAGTTT**GTG AACCAGCACC TGTG – 3' (SEQ ID NO: 18)

10

pint3581_Eb01f2

5'- TATCGA CCAT GG CAACAACA TCAACAGGAA ATTCGGCAGAG – 3' (SEQ ID NO: 19)

15

Dabei überlappen sich die beiden Primer partial und pint3581_Eb0f2 enthält eine NcoI – Erkennungssequenz. Diese ist unterstrichen dargestellt. Das Codon, das für Glutaminsäure in Position 0 am Anfang B- Kette kodiert, ist jeweils fett herausgestellt. Template für PCR1 ist DNA des Plasmides pINT3581. PCR1 wird mit dem Primerpaar pint3581_Eb-1f2 / pint3580_glya21rev durchgeführt. Template für PCR2 ist das Produkt aus PCR1. PCR2 wird mit dem Primerpaar pint3581_Eb-1f2 / pint3580_glya21rev durchgeführt. Das Produkt aus PCR2 überdeckt die vollständige Präproinsulinsequenz. Das Produkt der zweiten Reaktion wird nach NcoI/ SalI Spaltung in die NcoI / SalI geöffnete pINT91d Vektor DNA inseriert.

20

5 Richtige Plasmide erhalten die Bezeichnung pINT3700.

Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ – Humaninsulin. Um zu der Verbindung zu gelangen stellt man zunächst durch Umsetzung mit Trypsin und Lysyl – Endopeptidase C die Zwischenstufe Arg (A0), His (A8), Gly (A21), des Thr (B30) - Humaninsulin her, die anschließend über Amidierung mit Argininamid zu der gewünschten Verbindung YKL202-7, die als Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ – Humaninsulin charakterisiert ist, umgewandelt wird.

30

Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL202-7b, die als Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Lys (B30) – NH₂ – Humaninsulin charakterisiert ist und die nach Amidierung mit Lysinamid entsteht.

5

Beispiel 10: Konstruktion des Plasmides pINT3701 kodierend für Gly (A21) Lys (B0) - Präproinsulin

10 Die Konstruktion dient dazu, an der Grenze zwischen Präsequenz und Start der B-Kette anstelle des Codons für Arginin das Codon für Lysin einzuführen. Folgt man der Konstruktionsstrategie aus Beispiel 9, verwendet aber als Template für PCR1 DNA des Plasmides pINT358d, so gelangt man zu dem Plasmid pINT3701, das wie das ursprüngliche Plasmid pINT358d dadurch charakterisiert ist, das die Grenze zwischen C- Peptid und A- Kette durch die Aminosäurefolge Lys-Arg gebildet wird

15

Beispiel 11: Konstruktion des Plasmides pINT3702 kodierend für His (A8), Gly (A21), Lys (B0) - Präproinsulin mit dem C- Peptid gemäß Beispiel 10

20 Folgt man dem im Beispiel 2 beschriebenen Konstruktionsplan, verwendet aber als Template DNA des Plasmides pINT3701, so gelangt man zu dem Plasmid pINT3702.

25 Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ – Humaninsulin. Um zu der Verbindung zu gelangen stellt man zunächst durch Umsetzung nur mit Lysyl – Endopeptidase C die Zwischenstufe Arg (A0), His (A8), Gly (A21), des Thr (B30) - Humaninsulin her, die anschließend über Amidierung mit Argininamid zu der gewünschten Verbindung YKL202-8, die als Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ – Humaninsulin charakterisiert ist, umgewandelt wird

30

Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL202-8b, die als Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Lys (B30) – NH₂ – Humaninsulin charakterisiert ist und die nach Amidierung mit Lysinamid entsteht.

00 039

Beispiel 12: Herstellung des Vektorderivates pINT3703, das für His (A8), Gly (A21), Lys (B0) - Präproinsulin und ein modifiziertes C-Peptid, das an der C/A-Kettengrenze das Tri-Peptid Lys-Arg-Arg trägt, kodiert.

- 5 Benutzt wird DNA des Plasmides pINT3702 als Template, sowie die Primer pint3580_glya21rev und Tir. Zwei Primersequenzen werden synthetisiert.

3702_arg_cjuncf

- 10 5' - TGC AGAAGCGCAGAGGCATCGTG GAGCAGTGC - 3' (SEQ ID NO: 20)

Dieser Primer dient wie der Primer arg_cjunc_rev zur Einführung von Arginin an der Insulin A-/ B- Kettengrenze.

- 5 3702_cjunc_rev

5' - TCC ACGATGCCTCTGCGCTTCTG CAGGGACCC - 3' (SEQ ID NO: 21)

- 20 Das Codon für das einzuführende Arginin ist in beiden Primern fett gedruckt. Mit DNA des Plasmides pINT3702 als Matrize werden mit den Primerpaaren Tir / 3702_cjunc_rev und 3702_arg_cjuncf / pint3580_glya21rev entsprechend EP-A 1 222 207 je eine PCR durchgeführt. Aliquots der Produkte beider Reaktionen werden kombiniert und zusammen mit dem Primerpaar Tir / pint3580_glya21rev in einer dritten PCR eingesetzt. Das Produkt dieser Reaktion wird nach gelelektrophoretischer
- 25 Auftrennung des Reaktionsgemisches gereinigt und mit den Restriktionsenzymen Sal1 / Nco1 nach Angaben des Herstellers in ein und derselben Reaktion verdaut, das Reaktionsgemisch gelelektrophoretisch aufgetrennt und das die Proinsulinsequenz kodierende DNA – Fragment isoliert. Das Fragment wird anschließend über eine DNA- Ligasereaktion in die Nco1 / Sal1 geöffnete pINT91d
- 30 Vektor DNA insertiert.

Mit dem Ligationsgemisch werden kompetente E. coli Bakterienzellen transformiert. Das Transformationsgemisch wird auf Selektionsplatten, die 25 mg/ l Ampicillin enthalten ausplattiert. Plasmid DNA wird von Kolonien isoliert und mittels DNA –

Sequenzanalyse charakterisiert. Richtige Plasmide erhalten die Bezeichnung pINT3702.

5 Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ – Humaninsulin. Um zu der Verbindung zu gelangen, stellt man zunächst durch Umsetzung mit Lysyl – Endopeptidase C die Zwischenstufe Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), des Thr (B30) - Humaninsulin her, die anschließend über Amidierung mit Argininamid zu der gewünschten Verbindung umgewandelt wird.

10

Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Lys (B30) – NH₂ – Humaninsulin, die nach Amidierung mit Lysinamid entsteht.

15 Es ist dem Fachmann klar, dass man entsprechend den Beispielen 3-8 Asparaginsäure oder Glutaminsäure in die entsprechenden Positionen der A bzw. B- Kette einführen kann. Diese Proinsuline sind Vorstufe für die Verbindungen

YKL202-10a	Arg (A-1), Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH ₂ – Humaninsulin
YKL202-10b	Arg (A-1), Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Lys (B30) – NH ₂ – Humaninsulin
YKL202-11a	Arg (A-1), Arg (A0), Glu (A15), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH ₂ – Humaninsulin
YKL202-11b	Arg (A-1), Arg (A0), Glu (A15), His (A8), Gly (A21), Lys (B30) – NH ₂ – Humaninsulin
YKL202-12a	Arg (A-1), Arg (A0), Asp (A18), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH ₂ – Humaninsulin
YKL202-12b	Arg (A-1), Arg (A0), Asp (A18), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH ₂ – Humaninsulin
YKL202-13a	Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B30) – NH ₂ – Humaninsulin
YKL202-	Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Lys (B30) – NH ₂ –

00 041

13b	Humaninsulin
YKL202-14a	Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B30) – NH ₂ – Humaninsulin
YKL202-14b	Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Lys (B30) – NH ₂ – Humaninsulin
YKL202-15a	Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B30) – NH ₂ – Humaninsulin
YKL202-15b	Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Lys (B30) – NH ₂ – Humaninsulin

Beispiel13: Herstellung des Vektorderivates pINT3704, das für His (A8), Gly (A21), Lys (B0) - Präproinsulin kodiert

Dieses Beispiel beschreibt die Herstellung des Vektorderivates pINT3704, das für His (A8), Gly (A21), Lys (B0) - Präproinsulin kodiert und ein modifiziertes C-Peptid, das an der C/A- Kettengrenze das Tri-Peptid Lys-Arg-Arg trägt, und bei dem die Aminosäure Glycin, welche in Humaninsulin in Position A21 vorkommt, deletiert ist.

Folgt man dem in Beispiel 12 beschriebenen Syntheschema und ersetzt die Primer 3702_arg_cjuncf und 3702_arg_cjuncfrev durch die Primer 3703_Δ Ga1f und 3703_Δ Ga1rev und benutzt DNA des Plasmides pINT3703 als Template, so gelangt man zu dem Plasmid pINT3704, das dadurch gekennzeichnet ist, dass das in dem kodierten Präproinsulin die Aminosäure Glycin in Position 1 der A- Kette deletiert ist und der übrige Sequenzverlauf dem, der von pINT3703 kodierten Sequenz entspricht.

3703_Δ Ga1f

5' - TGC AGAAGCGCAGAATCGTG GAGCAGTGCTGC – 3' (SEQ ID NO: 22)

3703_Δ Ga1rev

5' - TGCTCC ACGATTCTGCGCTTCTG CAGGGACCC – 3' (SEQ ID NO: 23)

Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung Arg (A0), Arg (A1), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ – Humaninsulin. Um zu der Verbindung zu gelangen, stellt man zunächst durch Umsetzung mit Lysyl – Endopeptidase C die Zwischenstufe Arg (A0), Arg (A1), His (A8), Gly (A21), des Thr (B30) - Humaninsulin her, die anschließend über Amidierung mit Argininamid zu der gewünschten Verbindung umgewandelt wird.

Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung Arg (A0), Arg (A1), His (A8), Gly (A21), Lys (B30) – NH₂ – Humaninsulin, die nach Amidierung mit Lysinamid entsteht.

Dem Fachmann ist klar, dass man entsprechend Beispiel 12 negativ geladene Aminosäuren in die Präproinsulinsequenz einführen kann. Auch lässt sich in Analogie zu Beispiel 13 aus dem Plasmid pINT3702 ein Plamid herstellen, dass für eine Proinsulinsequenz kodiert, die die Herstellung von Insulinderivaten erlaubt, die in Position 1 der A-Kette ein Arginin als N- terminale Aminosäure tragen.

Beispiel 14: Expression der Proinsulinderivate

Die Expression wird entsprechend Beispiel 1 der Europäischen Patentanmeldung EP-A 1 222 207 durchgeführt.

Beispiel 15: Faltung der Proinsulinderivate

Die Faltung erfolgt prinzipiell nach der in EP-A 0 668 282 beschriebenen Methode.

Beispiel 16: Prozessierung der Proinsuline aus den Beispielen 2-8 mittels Trypsin

Es erfolgt die enzymatische Prozessierung der gefalteten Präproinsulin zu der zweikettigen Arg (A0) –Insulinvorstufe, deren C-terminales B-Kettenende durch Lysin oder Arginin charakterisiert ist. Die enzymatische Prozessierung d r gefalteten

Präproinsulinvorstufe erfolgt wie z.B. in Beispiel 4 von WO91/03550 beschrieben. Als besonders vorteilhaft erweist sich dabei der Einsatz der in WO 2007/031187 A1 beschriebenen Trypsinvariante.

5

Beispiel 17: Prozessierung der Proinsuline aus den Beispielen 9-13 mittels Endoproteinase Lys-C

Endoprotease Lys-C aus *Achromobacter lyticus* ist kommerziell erhältlich

10 (Merck/Calbiochem). Die Reaktion wird leicht modifiziert wie von Jekel, P.A. et al. [Anal. Biochem. 134, 347-354, (1983)] beschrieben durchgeführt. Es wird ein pH von 9,5 eingestellt und die Reaktionstemperatur beträgt 30°C.

15

In der Eintopfreaktion wird die Präsequenz abgespalten und das C-Peptid beginnend mit Thr (B30) herausgespalten, so dass das C-terminale Ende der B- Kette von Lysin gebildet wird, das als reaktive Stelle für die enzymkatalysierte Kupplungsreaktion vorliegt.

20 Beispiel 18: Herstellung der Arg – NH₂ bzw. Lys - NH₂ Insulinverbindung aus der zweikettigen Vorstufe über Kupplung mit Arginin – bzw. Lysinamid

25

Unabhängig von der Positionierung der zusätzlichen sauren Aminosäuren wird eine Standardreaktion wie folgt durchgeführt: 100 mg Arg (A0), Gly (A21), Arg (B31) - Insulinanalog werden in 0.95 ml Argininamidlösung (446 g/L) gelöst, 0.13 mL M Na-Acetatpuffer (pH 5.8) und 2 ml DMF zugegeben. Die Reaktionsmischung wird auf 12° C gekühlt und durch Zugabe von 0.094 ml Trypsin (0.075 mg, Roche Diagnostics) gestartet. Nach 8 h wird die Reaktion durch Zugabe von TFA bis pH 2.5 gestoppt und per HPLC analysiert. Es bildet sich >60 % . Arg (A0), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32)- NH₂- Insulinanalogon Nach Zusatz von Trypsininhibitorlösung erfolgt die Reinigung des amidierten Analogs in Analogie zu US 5,656,722.

30

Die Herstellung der entsprechenden Lysinamid - Verbindung erfolgt analog. Allerdings geht man von einer wässrigen Lysinamid Stammlösung aus, die 366g/L Lysinamid gelöst enthält.

5

Beispiel 19: Semisynthetische Herstellung von Lys (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – Insulinamid

10

Die in Beispiel 11 beschriebene Verbindung YKL202-8, die einem Insulinderivat der Struktur Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – Insulinamid entspricht, dient als Ausgangsmaterial zur Herstellung der Verbindung YKL202-11, die Lys (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – Insulinamid. 200mg der Verbindung werden in 40 ml eines 100mM Na₂ HPO₄ / CH₃CN (50:50) - Gemisches gelöst und ein pH von

15

7,7 – 8,2 eingestellt. Als weiteres Material wird ein Boc-Lys (Boc) - NHS Ester hergestellt indem man 0,3 mM Boc-Lys(Boc)-OH, 0,4 mM N-hydroxysuccineimide (NHS) und 0,4mM Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in Dichlormethan 40 Minuten mischt. Das Reaktionsgemisch im Rotationsvakuumverdampfer zur Trockene eingengt. Das Gemisch wird anschließend in 5 ml Methanol aufgenommen und dem gelösten Ausgangsinsulin zugesetzt. Die Reaktion wird bei Raumtemperatur mindestens 60, maximal aber 120 Minuten gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 200µl TFA gestoppt. Die Masse der Reaktionsprodukte wird über LC-MS massenspektroskopisch charakterisiert, um den Nachweis zu erbringen, dass monoacyliertes Produkt, das aus drei Komponenten besteht vorliegt. Die

20

Komponenten werden über HPLC getrennt. Dabei werden auch di- acylierte und tri- acylierte Nebenprodukte abgetrennt. Die Fraktionen der HPLC – Trennung werden massenspektroskopisch analysiert. Die 3 Fraktionen, in denen jeweils

25

monoacyliertes Produkt enthalten, werden einer Aminosäuresequenzanalyse unterzogen, deren Interpretation die Identifikation der HPLC – Fraktion erlaubt, die die gewünschte Verbindung enthält von der anschließend durch Hydrolyse die Boc-Schutzgruppen entfernt werden. Nach erneuter HPLC- Reinigung wird das gewünschte Produkt auf seine biologischen Eigenschaften getestet.

30

Beispiel 20: Herstellung des Plasmids pINT358_ha8, das für His (A8), Gly (A21) Proinsulin kodiert.

5 Folgt man dem Herstellungsschema aus Beispiel 2 und verwendet als Template für die PCR1 und PCR2 DNA des Plasmides pINT358d, so gelangt man zu dem Plasmid pINT358_ha8, das für His (A8), Gly (A21) Proinsulin kodiert. Das von dem Plasmid kodierte Proinsulin dient als Vorstufe für die Verbindung der Form His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ - Humaninsulin. Die Prozessierung des Präproinsulins zu His (A8), Gly (A21), Arg (B31) als Zwischenstufe vor Amidierung
10 erfolgt dabei wie in WO91/03550 beschrieben. Dabei setzt man herkömmliches Trypsin ein.

Beispiel 21: Formulierung der amidierten Insulinderivate

15 Um die erfindungsgemäßen Insulinderivate auf ihre biologisch, pharmakologischen und physikalisch chemischen Eigenschaften zu testen, wurde von den Verbindungen wie folgt eine Lösung hergestellt: Das erfindungsgemäße Insulinderivat wurde mit einer Zielkonzentration von $240 \pm 5 \mu\text{M}$ in 1 mM Salzsäure mit 80 $\mu\text{g/mL}$ Zink (als
20 Zinkchlorid) aufgelöst. Hierzu wurde von dem gefriergetrockneten Material zunächst eine um etwa 30% höhere Menge als aufgrund des Molekulargewichts und der angestrebten Konzentration benötigt eingewogen. Danach wurde die vorliegende Konzentration mittels analytischer HPLC bestimmt und die Lösung anschließend auf das zur Erreichung der Zielkonzentration erforderliche Volumen mit 5 mM Salzsäure
35 mit 80 $\mu\text{g/mL}$ Zink aufgefüllt. Falls erforderlich, wurde dabei der pH-Wert auf $3,5 \pm 0,1$ nachjustiert. Nach der endgültigen Analyse durch HPLC zur Absicherung der Zielkonzentration von $240 \pm 5 \mu\text{M}$ wurde die fertige Lösung mittels einer Spritze mit einem 0,2 μm Filtervorsatz in ein mit einem Septum und einer Bördelkappe verschlossenes steriles Fläschchen überführt. Für die kurzfristige, einmalige Testung
30 der erfindungsgemäßen Insulinderivate wurde keine Optimierung der Formulierungen, z.B. hinsichtlich eines Zusatzes isotonischer Agentien, Konservierungsmittel oder Puffersubstanzen, vorgenommen.

Beispiel 22: Herstellung von His (A8), Gly (A21), Arg(B31) Humaninsulin mittels Hefeexpression

EP-A 1 364 032 beschreibt die Expression und Sekretion eines Fusionsproteins aus Hirudin und Miniproinsulin durch Hefe. Als besonders vorteilhafte Hefewirtsorganismen werden dabei *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *H. polymorpha* und *P. pastoris* benannt. In Beispiel 4 der genannten Patentanmeldung ist die Konstruktion eines Plasmides beschrieben, das die Herstellung des Fusionsprotein in *P. pastoris* erlaubt und dessen DNA als Template zur Herstellung eines Miniproinsulins dient, dessen Aminosäuresequenz in der A- Kette in den Positionen A8, A15, A18 und A21 durch die Aminosäuren Histidin (A8), Glutaminsäure (A15), Asparaginsäure (A18) und Glycin (A21) charakterisiert ist. Verwendet wird der Primer pichia_H_if1. Neu synthetisiert und nach Synthese gereinigt werden folgende Primer:

15 pichia_G21_rev

5'-TTTTTTGGCG CCGAATTCAC TATTAGCCAC AGTAGTTTTC CAGCTGGTA-3'
(SEQ ID NO: 24)

Das fett hervorgehobene Codon markiert die Positionen A 21.

20

pichia_H8_f mit der Sequenz

5'-GAACAATGTTGTCATAGTATCTGTTCTTTGTACCAGCTGGAAACTACTG-3'
(SEQ ID NO: 25)

25

Das fett hervorgehobene Codon markiert die Positionen A 8.

pichia-a1-12rev

5'- GAACAGATACTATGACAACATTGTTCAACGATACC -3' (SEQ ID NO: 26)

30

Das fett hervorgehobene Codon markiert die Positionen A 8.

Äquimolare Mengen (1µg) an Primer pichia_G21_rev und Primer pichia_H8f, die sich partial überdecken, werden in Gegenwart einer thermophilen Polymerase und Polymerasepuffer, der die 4 Deoxynukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP 5'

enthält, bei 95°C denaturiert, anschließend 10 - 15 Minuten bei 56°C inkubiert. Das Reaktionsvolumen dieser Reaktion 1 beträgt 25µl. In einer Standard Polymerasekettenreaktion (Reaktion 2) werden parallel die Primer pichia_H_if1 und pichia-a1-12rev mit der beschriebenen Template DNA umgesetzt. In einer weiteren Polymerasekettenreaktion werden die Reaktionsprodukte der Reaktionen 1 und 2 als Template mit den Primern pichia_H_if1 / pichia_G21rev umgesetzt. Das Reaktionsprodukt dieser Reaktion wird mittels Gelelektrophorese gereinigt. Nach Umsetzung mit den Restriktionsenzymen XhoI und SacII wird das DNA-Fragment, welches das Fusionsprodukt überdeckt in, Analogie zu Beispiel 4 in den beschriebenen Vektor pPICZαA eingesetzt. Es entsteht das Plasmid pPIC_ins202. Unter Anwendung des beschriebenen kommerziell erhältlichen Expressions - Kits erfolgt die Expression des von dem Plasmid kodierten Fusionsproteins. Nach Herstellung der His (A8), Gly (A21), Arg (B31) – Humaninsulinvorstufe erfolgt nun die Kupplung von Arginin – Amid entsprechend der Beschreibung an Arginin (B31). Es entsteht die Verbindung His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Insulin (YKL203), die ein neues Verzögerungsinsulin entsprechend Beispiel 20 darstellt und im Rattenversuch getestet wird. Die Kupplung mit Lysin – Amid führt in Analogie zu der Verbindung YKL203b, die als His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – Insulin charakterisiert ist.

Die Verbindung kann aber auch als Zwischenstufe zur Darstellung der Verbindung Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B31) Arg(B32) - NH₂ – Insulin, die in Anlehnung an Kohn et al. [Peptides 28 (2007) 935-948] hergestellt wird, dienen. Dazu werden 200mg der Verbindung His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin in 40 ml eines Gemisches von 100 mM Na₂HP0₄ / CH₃CN (50:50) gelöst und ein pH von 7,7 – 8,2 eingestellt.

Als weiteres Material wird ein Boc-Arg - NHS Ester hergestellt, indem man 0,3 mM Boc-Arg-OH, 0,4 mM N-hydroxysuccineimide (NHS) und 0,4 mM

Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in Dichlormethan 40 Minuten mischt. Das Reaktionsgemisch wird im Rotationsvakuumverdampfer zur Trockene eingeeengt. Das Gemisch wird anschließend in 5 ml Methanol aufgenommen und dem gelösten Ausgangsinsulin zugesetzt. Die Reaktion wird bei Raumtemperatur mindestens 60, aber maximal 120 Minuten g rührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 200µl TFA

gestoppt. Die Masse der Reaktionsprodukte wird über LC-MS massenspektroskopisch charakterisiert, um den Nachweis zu erbringen, dass monoacyliertes Produkt, das aus drei Komponenten besteht, vorliegt. Die Komponenten werden über HPLC getrennt. Dabei werden auch di-acylierte und tri-acylierte Nebenprodukte abgetrennt. Die Fraktionen der HPLC – Trennung werden massenspektroskopisch analysiert. Die drei Fraktionen, die jeweils monoacyliertes Produkt enthalten, werden einer Aminosäuresequenzanalyse unterzogen, deren Interpretation die Identifikation der HPLC – Fraktion erlaubt, die die gewünschte Verbindung enthält von der anschließend durch schonende Hydrolyse die Boc-Schutzgruppen entfernt werden. Nach erneuter HPLC- Reinigung wird das gewünschte Produkt auf seine biologischen Eigenschaften getestet.

15 Beispiel 23: Evaluierung der blutzuckersenkenden Wirkung von neuen Insulinanaloga in der Ratte

Die blutzuckersenkende Wirkung von ausgewählten neuen Insulinanaloga wird in männlichen, gesunden, normoglykämischen Wistarratten geprüft. Männlichen Ratten wird eine Dosis von 9 nmol/kg eines Insulinanalogons subkutan injiziert. Unmittelbar vor der Injektion des Insulinanalogons und in regelmäßigen Abständen bis zu acht Stunden nach der Injektion werden den Tieren Blutproben entnommen und darin der Blutzuckergehalt bestimmt. Das Experiment zeigt deutlich (vgl. Fig. 1), dass das erfindungsgemäße Insulinanalogon zu einem deutlich verzögerten Wirkeintritt und einer längeren, gleichmäßigen Wirkdauer führt.

25 Beispiel 24: Evaluierung der blutzuckersenkenden Wirkung von neuen Insulinanaloga im Hund

30 Die blutzuckersenkende Wirkung von ausgewählten neuen Insulinanaloga wird in männlichen, gesunden, normoglykämischen Beaglehunden geprüft. Männlichen Tieren wird eine Dosis von 6 nmol/kg eines Insulinanalogons subkutan injiziert. Unmittelbar vor der Injektion des Insulinanalogons und in regelmäßigen Abständen bis zu achtundvierzig Stunden nach der Injektion werden den Tieren Blutproben

entnommen und darin der Blutzuckergehalt bestimmt. Das Experiment zeigt deutlich, dass das erfindungsgemäße Insulinanalogon zu einem deutlich verzögerten, flachen Wirkeintritt und einer längeren, gleichmäßigen Wirkdauer führt.

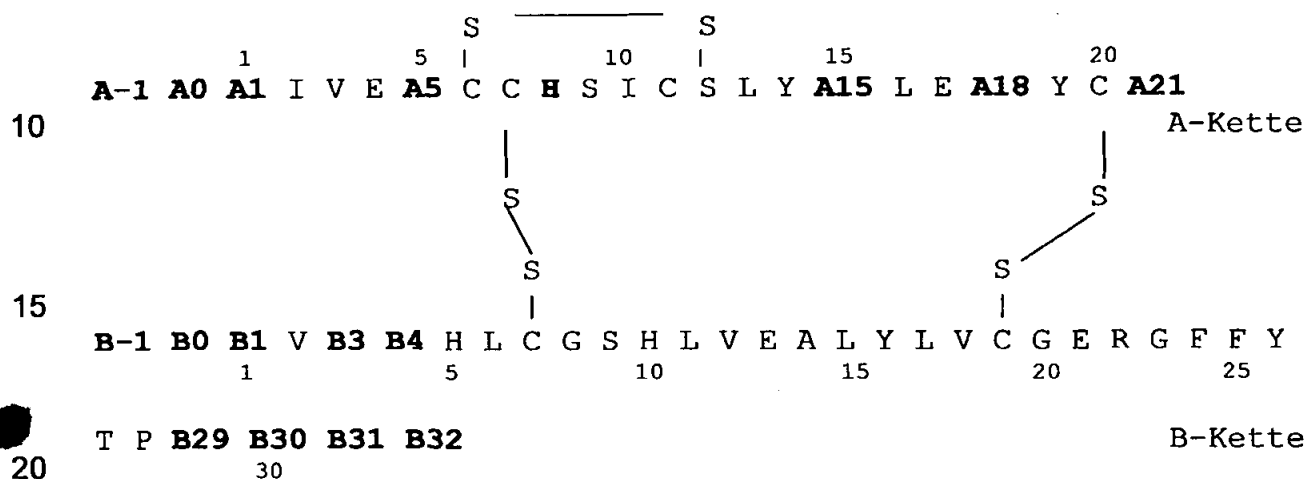
DE2008/002 WO

Dr. OL

00 050

Patentansprüche:

5 1. Insulinanalogon der Formel I



B0 Asp, Glu oder eine chemische Bindung;

B1 Asp, Glu, Phe oder eine chemische Bindung;

5 B3 Asp, Glu oder Asn;

B4 Asp, Glu oder Gln;

10 B29 Arg, Lys oder einer Aminosäure ausgewählt aus einer Gruppe enthaltend die Aminosäuren Phe, Ala, Thr, Ser, Val, Leu, Glu oder Asp, oder einer chemischen Bindung;

B30 Thr oder einer chemischen Bindung;

15 B31 Arg, Lys oder einer chemischen Bindung;

B32 Arg-Amid oder Lys-Amid

20 entspricht, wobei nicht mehr als ein Aminosäurerest der Gruppe enthaltend A5, A15, A18, B-1, B0, B1, B2, B3 und B4 gleichzeitig und unabhängig voneinander Asp oder Glu entsprechen.

2. Insulinanalogon gemäß Anspruch 1, wobei A-1 Arg entspricht.

25 3. Insulinanalogon gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, wobei A0 Arg entspricht.

4. Insulinanalogon gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, wobei A5 Glu entspricht.

30 5. Insulinanalogon gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, wobei A15 Glu entspricht.

6. Insulinanalogon gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, wobei A18 Asp entspricht.
7. Insulinanalogon gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, wobei A8 His entspricht.
8. Insulinanalogon gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, wobei A21 Gly entspricht.
9. Insulinanalogon gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, wobei B0 Glu entspricht.
10. Insulinanalogon gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, wobei B3 Asp entspricht.
11. Insulinanalogon gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, wobei B4 Glu entspricht.
12. Insulinanalogon gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, wobei B30 Arg entspricht.
13. Insulinanalogon gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, wobei B30 Lys entspricht.
14. Insulinanalogon nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 13 ausgewählt aus einer Gruppe enthaltend
Arg (A-1), Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ Humaninsulin,
Arg (A-1), Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Lys (B30) – NH₂ Humaninsulin,
Arg (A-1), Arg (A0), Glu (A15), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ Humaninsulin,
Arg (A-1), Arg (A0), Glu (A15), His (A8), Gly (A21), Lys (B30) – NH₂ Humaninsulin,
Arg (A-1), Arg (A0), Asp (A18), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ Humaninsulin,
Arg (A-1), Arg (A0), Asp (A18), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ Humaninsulin,
Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B30) – NH₂ Humaninsulin,
Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Lys (B30) – NH₂ Humaninsulin,

- Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B30) – NH₂ Humaninsulin,
 Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Lys (B30) – NH₂ Humaninsulin,
 Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B30) – NH₂ Humaninsulin,
 Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Lys (B30) – NH₂ Humaninsulin,
 5 Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin,
 Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – Humaninsulin,
 Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin,
 Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – Humaninsulin,
 Arg (A0), Asp (A18), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin,
 10 Arg (A0), Asp (A18), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – Humaninsulin,
 Arg (A0), Glu (A15), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin,
 Arg (A0), Glu (A15), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – Humaninsulin,
 Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin,
 Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – Humaninsulin,
 15 Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin,
 Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – Humaninsulin,
 Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin,
 Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – Humaninsulin,
 Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ – Humaninsulin,
 20 Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Lys (B30) – NH₂ – Humaninsulin,
 Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ – Humaninsulin,
 Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Lys (B30) – NH₂ – Humaninsulin,
 Arg (A0), Arg (A1), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ – Humaninsulin,
 Arg (A0), Arg (A1), His (A8), Gly (A21), Lys (B30) – NH₂ – Humaninsulin,
 25 His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin.

15. Verfahren zur Herstellung eines Insulinanaloges gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14.

- 30 16. Verfahren gemäß Anspruch 15, wobei ein Vorläufer des Insulinanaloges rekombinant hergestellt wird, der Vorläufer enzymatisch zu zwei –kettigem Insulin prozessiert wird und eine Kupplung mit Argininamid in Gegenwart eines Enzyms mit Trypsinaktivität durchgeführt wird, und das Insulinanalogon isoliert wird.

17. Verwendung eines Insulinanalog gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Diabetes Mellitus.

5 18. Verwendung gemäß Anspruch 17 in einem Verfahren zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Diabetes Mellitus Typ I oder Typ II, zur Knorpelregeneration oder zur Unterstützung der beta –Zellregeneration.

19. Arzneimittel enthaltend ein Insulinanalog gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 und/oder physiologisch verträgliche Salze davon.

10

20. Formulierung des Insulinanalogons gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei die Formulierung in wässriger Form enthaltend das gelöste Insulinanalogon vorliegt.

15 21. Formulierung des Insulinanalogons gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei die Formulierung in Form von Pulver vorliegt.

22. Formulierung gemäß Anspruch 21, wobei das Insulinanalogon gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 in kristalliner und/oder amorpher Form vorhanden ist.

20

23. Formulierung des Insulinanalogons gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei die Formulierung in Form einer Suspension vorliegt.

24. Formulierung des Insulinanalogons gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei die Formulierung zusätzlich ein chemisches Chaperon enthält.

25

25. DNA kodierend für einen Vorläufer eines Insulinanalogons gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14.

30 26. DNA kodierend für die A-Kette eines Insulinanalogons gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14.

27. DNA kodierend für die B-Kette eines Insulinanalogons gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14.

28. Vektor enthaltend eine DNA nach einem oder mehreren der Ansprüche 25 bis 27.

29. Wirtsorganismus enthaltend eine DNA nach einem oder mehreren der Ansprüche 25 bis 27 oder einen Vektor gemäß Anspruch 28.

30. Präproinsulinanalogon, dadurch gekennzeichnet, dass das C-Peptid an seinem N-Terminus den Aminosäurerest Arginin trägt und sein C-Terminus durch die Form Arg Arg, Arg Lys oder Lys Arg Arg gekennzeichnet ist.

31. Formulierung nach einem oder mehreren der Ansprüche 20 bis 24, bei der noch zusätzlich ein Glucagon-Like Peptide-1 (GLP1) oder ein Analogon oder Derivat davon, oder Exendin-3 bzw. -4 oder ein Analogon oder Derivat davon enthalten ist.

32. Formulierung nach Anspruch 31, bei dem zusätzlich Exendin-4 enthalten ist.

33. Formulierung gemäß Anspruch 31, bei dem ein Analogon von Exendin-4 ausgewählt wird aus einer Gruppe enthaltend

H-desPro³⁶-Exendin-4-Lys₆-NH₂,

H-des(Pro^{36,37})-Exendin-4-Lys₄-NH₂ und

H-des(Pro^{36,37})-Exendin-4-Lys₅-NH₂,

oder ein pharmakologisch tolerierbares Salz davon.

34. Formulierung gemäß Anspruch 31, bei dem ein Analogon von Exendin-4 ausgewählt wird aus einer Gruppe enthaltend

desPro³⁶[Asp²⁸]Exendin-4 (1-39),

desPro³⁶[IsoAsp²⁸]Exendin-4 (1-39),

desPro³⁶[Met(O)¹⁴, Asp²⁸]Exendin-4 (1-39),

desPro³⁶[Met(O)¹⁴, IsoAsp²⁸]Exendin-4 (1-39),

desPro³⁶[Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]Exendin-2 (1-39),

desPro³⁶[Trp(O₂)²⁵, IsoAsp²⁸]Exendin-2 (1-39),

desPro³⁶[Met(O)¹⁴Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]Exendin-4 (1-39) und

desPro³⁶[Met(O)¹⁴Trp(O₂)²⁵, IsoAsp²⁸]Exendin-4 (1-39),

oder ein pharmakologisch tolerierbares Salz davon.

35. Formulierung gemäß Anspruch 31, bei denen an die C-Termini der Analoga von Exendin-4 das Peptid -Lys₆-NH₂ angefügt ist.

36. Formulierung gemäß Anspruch 31, bei dem ein Analogon von Exendin-4

5 ausgewählt wird aus einer Gruppe enthaltend

H-(Lys)₆- des Pro³⁶ [Asp²⁸]Exendin-4(1-39)-Lys₆-NH₂

des Asp²⁸Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ Exendin-4(1-39) -NH₂,

H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]Exendin-4(1-39) -NH₂,

H-Asn-(Glu)₅ des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]Exendin-4(1-39) -NH₂,

10 des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]Exendin-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]Exendin-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]Exendin-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

H-(Lys)₆- des Pro³⁶ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]Exendin-4(1-39)-Lys₆-NH₂,

15 H- des Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵]Exendin-4(1-39) -NH₂,

H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]Exendin-4(1-39) -NH₂,

H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]Exendin-4(1-39) -NH₂,

des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]Exendin-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]Exendin-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

20 H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]Exendin-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

H-(Lys)₆- des Pro³⁶ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]Exendin-4(1-39)-Lys₆-NH₂,

des Met(O)¹⁴ Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ Exendin-4(1-39) -NH₂,

H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]Exendin-4(1-39) -NH₂,

H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] Exendin-4(1-39) -NH₂,

25 des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]Exendin-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]Exendin-4(1-39)-Lys₆-NH₂,

H-Asn-(Glu)₅ des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] Exendin-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

H-(Lys)₆- des Pro³⁶ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]Exendin-4(1-39)-Lys₆-NH₂,

30 des Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵]Exendin-4(1-39) -NH₂,

H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]Exendin-4(1-39) -NH₂,

H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸] Exendin-4(1-39) -NH₂,

des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]Exendin-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

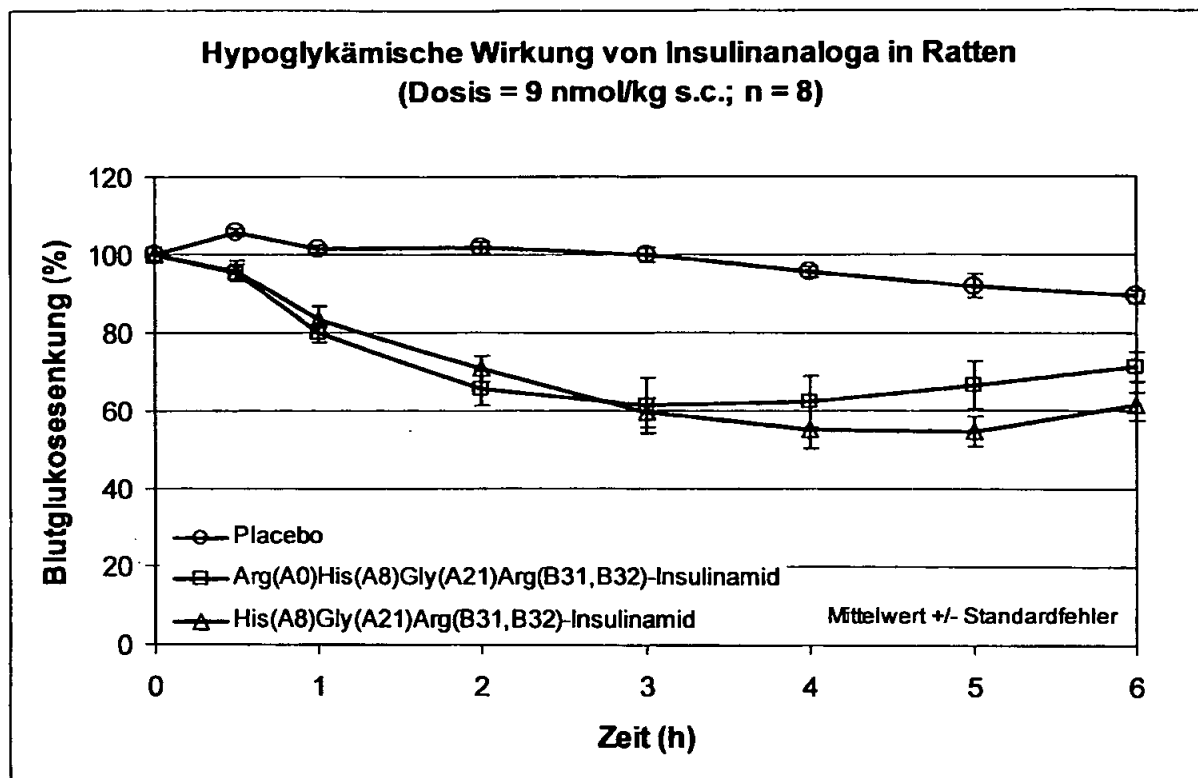
H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]Exendin-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸] Exendin-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

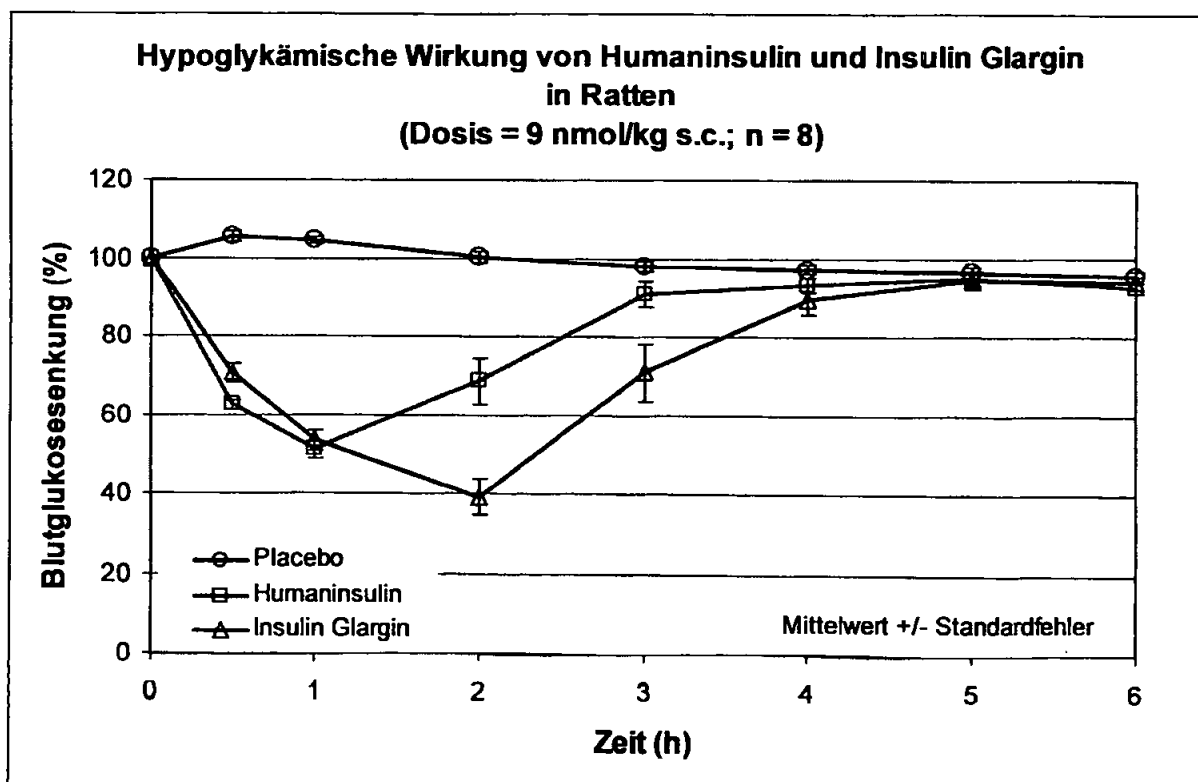
5 oder ein pharmakologisch tolerierbares Salz davon.

37. Formulierung nach Anspruch 31, bei dem zusätzlich Arg³⁴, Lys²⁶ (N^ε(γ-glutamyl(N^α-hexadecanoyl))) GLP-1 (7-37) [liraglutide] enthalten ist.

Figur 1



5 Figur 2



00 059

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
16. Juli 2009 (16.07.2009)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2009/087082 A3

(51) Internationale Patentklassifikation:
C07K 14/62 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2009/000018

(22) Internationales Anmeldedatum:
6. Januar 2009 (06.01.2009)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2008 003 566.1
9. Januar 2008 (09.01.2008) DE
61/044,662 14. April 2008 (14.04.2008) US
10 2008 025 007.4 24. Mai 2008 (24.05.2008) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH** [DE/DE]; Brüningstraße 50, 65929 Frankfurt am Main (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **HABERMANN, Paul** [DE/DE]; Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, 65926 Frankfurt am Main (DE). **SEIPKE, Gerhard** [DE/DE]; Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, 65926 Frankfurt am Main (DE). **KURRLE, Roland** [DE/DE]; Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, 65926 Frankfurt am Main (DE). **MÜLLER, Günter** [DE/DE]; Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, 65926 Frankfurt am Main (DE). **SOMMERFELD, Mark** [DE/DE]; Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, 65926 Frankfurt am Main (DE). **TENNAGELS, Norbert** [DE/DE]; Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, 65926 Frankfurt am Main (DE). **TSCHANK, Georg** [DE/DE]; Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, 65926 Frankfurt am Main (DE). **WERNER, Ulrich** [DE/DE]; Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, 65926 Frankfurt am Main (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: **SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH**; Patentabteilung, Industriepark Höchst, Geb. K 801, 65926 Frankfurt am Main (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

— mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:

24. September 2009

(54) Title: NOVEL INSULIN DERIVATIVES HAVING AN EXTREMELY DELAYED TIME-ACTION PROFILE

(54) Bezeichnung: NEUE INSULINDERIVATE MIT EXTREM VERZÖGERTEM ZEIT- / WIRKUNGSPROFIL

(57) Abstract: The invention relates to novel insulin analogs having a basal time-action profile, which are characterized by the addition and/or substitution of negatively and positively charged amino acid residues and by an amidation of the C-terminal carboxy group of the B chain and histidine in position 8 of the insulin A chain. The invention also relates to the production and use thereof.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft neue Insulinanaloga mit basalem Zeit- / Wirkungsprofil, die durch Addition und/oder Substitution negativ und positiv geladener Aminosäurereste, sowie einer Amidierung der C-terminalen Carboxygruppe der B-Kette und Histidin in Position 8 der Insulin A-Kette charakterisiert sind, ihre Herstellung und Verwendung.

WO 2009/087082 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/000018

00 060

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/62

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/081824 A (UNIV CASE WESTERN RESERVE [US]; WEISS MICHAEL [US]) 19 July 2007 (2007-07-19) abstract page 1, paragraph 3 page 4, paragraph 4 page 5, last paragraph	1-29, 31-37
X	WO 02/065985 A (NOBEX CORP [US]; EKWURIBE NNOCHIRI N [US]; PRICE CHRISTOPHER H [US]; S) 29 August 2002 (2002-08-29) abstract page 4, line 25 - line 27 page 11, paragraph 1	1-29, 31-37
	-/--	



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 Juni 2009

Date of mailing of the international search report

30/06/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Grötzinger, Thilo

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/000018

00 081

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 90/11299 A (NOVONORDISK AS [DK]) 4 October 1990 (1990-10-04) abstract page 1, line 2 - line 6 page 7, paragraph 3 page 12, paragraph 1 -----	1-29, 31-37
X	MARKUSSEN J ET AL: "SOLUBLE, PROLONGED-ACTING INSULIN DERIVATIVES. III. DEGREE OF PROTRACTION, CRYSTALLIZABILITY AND CHEMICAL STABILITY OF INSULINS SUBSTITUTED IN POSITIONS A21, B13, B23, B27 AND B30" PROTEIN ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 2, no. 2, 1 July 1988 (1988-07-01), pages 157-166, XP000006171 ISSN: 0269-2139 abstract page 159; table 1 page 161; table 3 -----	1-29, 31-37
X	WO 03/053339 A (LILLY CO ELI [US]; BEALS JOHN MICHAEL [US]; DEFELIPPIS MICHAEL ROSARIO) 3 July 2003 (2003-07-03) abstract page 10, line 11 - line 17 page 51; example 12 -----	30
X	WO 02/079250 A (NOVO NORDISK AS [DK]) 10 October 2002 (2002-10-10) abstract page 3, line 1 - line 16 -----	30
X	WO 01/25278 A (AVENTIS PHARMA GMBH [DE]) 12 April 2001 (2001-04-12) abstract page 2, line 28 - page 3, line 4 -----	30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2009/000018

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has found that the international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims 1-29, 31-37

Insulin analogs as characterized in claim 1 and corresponding embodiments.

2. Claim 30

Prepro-insulin analogs as characterized in claim 30.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/000018

00

034

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007081824	A	19-07-2007	NONE
WO 02065985	A	29-08-2002	BR 0207700 A 19-07-2005 CA 2437940 A1 29-08-2002 EP 1409006 A2 21-04-2004 JP 4113778 B2 09-07-2008 JP 2004527487 T 09-09-2004 MX PA03007374 A 04-12-2003 NZ 527392 A 31-01-2008
WO 9011299	A	04-10-1990	AT 116661 T 15-01-1995 AU 637365 B2 27-05-1993 CA 2049961 A1 21-09-1990 CN 1045793 A 03-10-1990 DD 298788 A5 12-03-1992 DE 69015811 D1 16-02-1995 DE 69015811 T2 11-05-1995 DK 0463072 T3 12-06-1995 EP 0463072 A1 02-01-1992 ES 2068384 T3 16-04-1995 GR 90100206 A 31-07-1991 HU 58349 A2 28-02-1992 IE 66564 B1 24-01-1996 JP 4503808 T 09-07-1992 NO 913687 A 19-11-1991 NZ 232953 A 28-10-1992 PT 93502 A 07-11-1990 US 5430016 A 04-07-1995 ZA 9002086 A 28-11-1990
WO 03053339	A	03-07-2003	AU 2002346490 A1 09-07-2003 BR 0215029 A 20-12-2005 CA 2468100 A1 03-07-2003 CZ 20040710 A3 16-02-2005 EP 1545460 A2 29-06-2005 HR 20040551 A2 31-10-2004 JP 2005519041 T 30-06-2005 MX PA04006084 A 31-03-2005 SK 2432004 A3 01-04-2005
WO 02079250	A	10-10-2002	EP 1377608 A1 07-01-2004 JP 2004533821 T 11-11-2004
WO 0125278	A	12-04-2001	AT 380196 T 15-12-2007 AU 778369 B2 02-12-2004 AU 7287700 A 10-05-2001 BR 0014464 A 11-06-2002 CA 2385857 A1 12-04-2001 CN 1377370 A 30-10-2002 DE 19947456 A1 05-04-2001 DK 1222207 T3 17-03-2008 EP 1222207 A1 17-07-2002 ES 2295054 T3 16-04-2008 HK 1049016 A1 14-10-2005 HU 0202755 A2 28-12-2002 JP 2003511018 T 25-03-2003 MX PA02003103 A 30-09-2002 NO 20021335 A 03-06-2002

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/EP2009/000018

00 035

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0125278	A	NZ 518066 A	28-05-2004
		PL 354078 A1	15-12-2003
		PT 1222207 E	11-02-2008
		TW 265168 B	01-11-2006
		US 6534288 B1	18-03-2003
		ZA 200202520 A	24-12-2002

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 INV. C07K14/62

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

C07K

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 2007/081824 A (UNIV CASE WESTERN RESERVE [US]; WEISS MICHAEL [US]) 19. Juli 2007 (2007-07-19) Zusammenfassung Seite 1, Absatz 3 Seite 4, Absatz 4 Seite 5, letzter Absatz	1-29, 31-37
X	WO 02/065985 A (NOBEX CORP [US]; EKWURIBE NNOCHIRI N [US]; PRICE CHRISTOPHER H [US]; S) 29. August 2002 (2002-08-29) Zusammenfassung Seite 4, Zeile 25 - Zeile 27 Seite 11, Absatz 1	1-29, 31-37
	-/--	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. Juni 2009

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

30/06/2009

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Grötzing, Thilo

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 90/11299 A (NOVONORDISK AS [DK]) 4. Oktober 1990 (1990-10-04) Zusammenfassung Seite 1, Zeile 2 - Zeile 6 Seite 7, Absatz 3 Seite 12, Absatz 1	1-29, 31-37
X	MARKUSSEN J ET AL: "SOLUBLE, PROLONGED-ACTING INSULIN DERIVATIVES. III. DEGREE OF PROTRACTION, CRYSTALLIZABILITY AND CHEMICAL STABILITY OF INSULINS SUBSTITUTED IN POSITIONS A21, B13, B23, B27 AND B30" PROTEIN ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 2, Nr. 2, 1. Juli 1988 (1988-07-01), Seiten 157-166, XP000006171 ISSN: 0269-2139 Zusammenfassung Seite 159; Tabelle 1 Seite 161; Tabelle 3	1-29, 31-37
X	WO 03/053339 A (LILLY CO ELI [US]; BEALS JOHN MICHAEL [US]; DEFELIPPIS MICHAEL ROSARIO) 3. Juli 2003 (2003-07-03) Zusammenfassung Seite 10, Zeile 11 - Zeile 17 Seite 51; Beispiel 12	30
X	WO 02/079250 A (NOVO NORDISK AS [DK]) 10. Oktober 2002 (2002-10-10) Zusammenfassung Seite 3, Zeile 1 - Zeile 16	30
X	WO 01/25278 A (AVENTIS PHARMA GMBH [DE]) 12. April 2001 (2001-04-12) Zusammenfassung Seite 2, Zeile 28 - Seite 3, Zeile 4	30

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2009/000018

00 088

Feld Nr. II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein internationaler Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche diese Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich _____
2. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, dass eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich _____
3. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefasst sind.

Feld Nr. III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Diese Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☒ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung solcher Gebühren aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Dieser internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfasst: _____

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Der Anmelder hat die zusätzlichen Recherchegebühren unter Widerspruch entrichtet und die gegebenenfalls erforderliche Widerspruchsgebühr gezahlt.
- ☐ Die zusätzlichen Recherchegebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt, jedoch wurde die entsprechende Widerspruchsgebühr nicht innerhalb der in der Aufforderung angegebenen Frist entrichtet.
- ☒ Die Zahlung der zusätzlichen Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-29, 31-37

Insulinanaloga wie in Anspruch 1 charakterisiert und entsprechende Ausführungsformen.

2. Anspruch: 30

Präproinsulinanalogon wie in Anspruch 30 charakterisiert.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2009/000018

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2007081824 A	19-07-2007	KEINE	
WO 02065985 A	29-08-2002	BR 0207700 A	19-07-2005
		CA 2437940 A1	29-08-2002
		EP 1409006 A2	21-04-2004
		JP 4113778 B2	09-07-2008
		JP 2004527487 T	09-09-2004
		MX PA03007374 A	04-12-2003
		NZ 527392 A	31-01-2008
WO 9011299 A	04-10-1990	AT 116661 T	15-01-1995
		AU 637365 B2	27-05-1993
		CA 2049961 A1	21-09-1990
		CN 1045793 A	03-10-1990
		DD 298788 A5	12-03-1992
		DE 69015811 D1	16-02-1995
		DE 69015811 T2	11-05-1995
		DK 0463072 T3	12-06-1995
		EP 0463072 A1	02-01-1992
		ES 2068384 T3	16-04-1995
		GR 90100206 A	31-07-1991
		HU 58349 A2	28-02-1992
		IE 66564 B1	24-01-1996
		JP 4503808 T	09-07-1992
		NO 913687 A	19-11-1991
		NZ 232953 A	28-10-1992
		PT 93502 A	07-11-1990
		US 5430016 A	04-07-1995
		ZA 9002086 A	28-11-1990
WO 03053339 A	03-07-2003	AU 2002346490 A1	09-07-2003
		BR 0215029 A	20-12-2005
		CA 2468100 A1	03-07-2003
		CZ 20040710 A3	16-02-2005
		EP 1545460 A2	29-06-2005
		HR 20040551 A2	31-10-2004
		JP 2005519041 T	30-06-2005
		MX PA04006084 A	31-03-2005
		SK 2432004 A3	01-04-2005
WO 02079250 A	10-10-2002	EP 1377608 A1	07-01-2004
		JP 2004533821 T	11-11-2004
WO 0125278 A	12-04-2001	AT 380196 T	15-12-2007
		AU 778369 B2	02-12-2004
		AU 7287700 A	10-05-2001
		BR 0014464 A	11-06-2002
		CA 2385857 A1	12-04-2001
		CN 1377370 A	30-10-2002
		DE 19947456 A1	05-04-2001
		DK 1222207 T3	17-03-2008
		EP 1222207 A1	17-07-2002
		ES 2295054 T3	16-04-2008
		HK 1049016 A1	14-10-2005
		HU 0202755 A2	28-12-2002
		JP 2003511018 T	25-03-2003
		MX PA02003103 A	30-09-2002
		NO 20021335 A	03-06-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2009/000018

00 071

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0125278 A		NZ 518066 A	28-05-2004
		PL 354078 A1	15-12-2003
		PT 1222207 E	11-02-2008
		TW 265168 B	01-11-2006
		US 6534288 B1	18-03-2003
		ZA 200202520 A	24-12-2002

NUEVOS DERIVADOS DE INSULINA CON PERFIL TIEMPO/ACCIÓN
EXTREMADAMENTE RETARDADO

072

La invención se refiere a nuevos análogos de insulina con perfil
5 tiempo/acción basal, a su preparación y uso.

La incidencia de la diabetes ha aumentado en los últimos años hasta un
grado casi epidémico. El trastorno puede resultar en un serio acortamiento en la
esperanza de vida. Las personas con diabetes deben, con frecuencia, abastecer a
su cuerpo con insulina desde el exterior. Es razonable optimizar el tratamiento con
10 insulina. Ahora hay disponibles diferentes insulinas con propiedades
farmacológicas específicas. En la práctica, las diferentes insulinas se diferencian,
de acuerdo con su duración de acción, en insulinas de acción corta, insulinas de
acción rápida, insulinas de acción prolongada e insulinas mixtas. Las
designaciones, utilizadas de forma sinónima para insulinas de acción prolongada,
15 son insulinas lentas, insulina de depósito o, si no, insulina basal. Los ingredientes
activos en muchos de estos productos de insulina son los denominados análogos
de insulina, los cuales se han derivado de la insulina humana por sustitución,
delección y/o adición de uno o más aminoácidos. Las expresiones "análogos de
insulina" e "insulinas" se utilizan de forma sinónima en esta memoria.

20 La política de la terapia con insulina intensificada intenta disminuir el riesgo
para la salud tratando lograr un control estable del nivel de glucosa en sangre
mediante la administración temprana de insulinas basales. Un ejemplo de una
insulina basal actual es el medicamento Lantus® (ingrediente activo: insulina
glargina = Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) insulina humana). El objetivo general
25 de desarrollar nuevas insulinas basales mejoradas consiste en minimizar el
número de sucesos hipoglucémicos. Una insulina basal ideal a este respecto es
una que actúe de forma fiable durante al menos 24 horas en cada uno de los
pacientes. De manera ideal, el efecto de la insulina aparece de forma retardada y
tiene un perfil tiempo/acción que es lo más plano posible, de modo que se
30 minimiza claramente el riesgo de una breve hipoglucemia e, incluso, se hace
posible una administración sin ingesta previa de alimentos. Existe un buen
suministro de insulina basal cuando el efecto de la insulina persiste al mismo nivel
el mayor tiempo posible, es decir el cuerpo es abastecido con una cantidad
constante de insulina. Así, el riesgo de sucesos hipoglucémicos es bajo y se
35 minimiza una variabilidad específica para el paciente y una variabilidad específica
para el día. Así, el perfil farmacocinético de una insulina basal ideal debería

caracterizarse por una aparición retardada de la acción y por una acción retardada, es decir prolongada y uniforme.

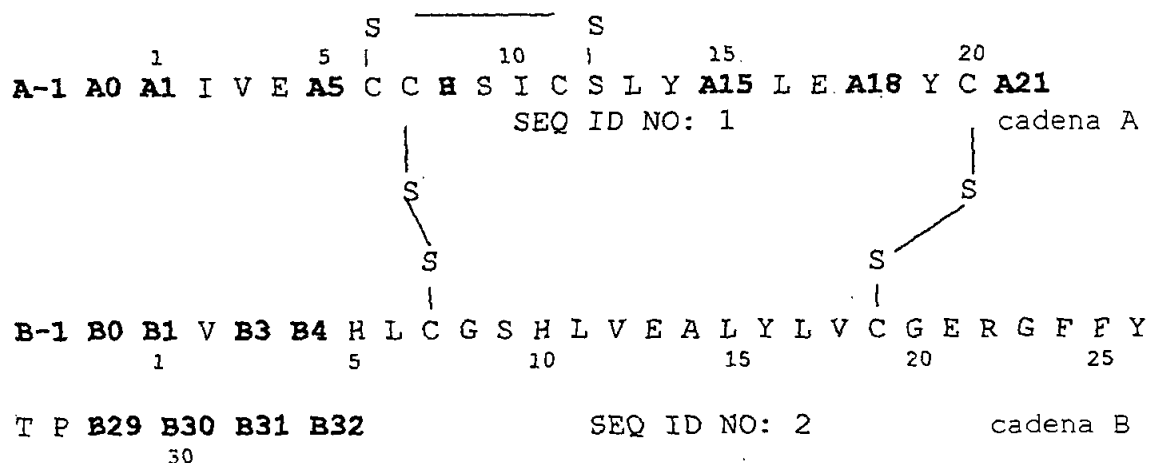
Sin embargo – a pesar de las ventajas terapéuticas ya alcanzadas – ninguna de las insulinas lentas descritas hasta la fecha muestra las propiedades farmacocinéticas de una insulina basal ideal. Insulinas deseables tienen un perfil tiempo/acción plano y prolongado tal que se minimiza adicionalmente el riesgo de sucesos hipoglucémicos y de las variaciones dependientes del día en el paciente y se retarda adicionalmente la duración de la acción, de manera que ya no es necesario, en algunas circunstancias, administrar diariamente insulina. Esto haría posible un tratamiento simplificado de los diabéticos, en especial de diabéticos de edad avanzada y de aquellos que requieran de cuidado, quienes ya no son capaces de inyectarse insulina por sí mismos y, así, sería de un gran beneficio económico. Insulinas basales de este tipo serían adicionalmente beneficiosas en la fase temprana de diabetes de tipo 2. Los médicos informan que la fobia a la inyección, presente en muchas personas, les disuade de iniciar a tiempo la terapia con insulina. Como consecuencia de ello, es deficiente el control de la glucosa en la sangre, lo que conduce a secuelas tardías de diabetes. Una insulina basal que reduce el número de dosis de insulina administradas por inyección pudiera tener el efecto de hacer más aceptable para los pacientes una terapia con insulina.

Kohn et al. (Peptides 28 (2007) 935-948) describen cómo es posible optimizar la farmacodinámica de la insulina, preparando análogos de insulina, cuyo punto isoelectrico (pI) esté desplazado, mediante la adición de lisina o arginina en el extremo de la cadena B o en el extremo N de las cadenas A y B, en la dirección del intervalo alcalino, comparado con el punto isoelectrico de la insulina humana (pI = 5,6), de modo que se reduce la solubilidad en condiciones fisiológicas y resulta un perfil tiempo/acción prolongado. El compuesto 18 de Kohn et al. (Arg (A0), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) insulina humana (pI experimentalmente determinado = 7,3; pI calculado = 7,58) se describe a este respecto como el mejor compuesto en el contexto de la idea. Por lo tanto, Kohn et al. consideran el objetivo principal el diseño de nuevos análogos de insulina la adición de aminoácidos positivamente cargados a la secuencia de aminoácidos de la insulina humana con el propósito de aumentar el punto isoelectrico desde pI = 5,6 al intervalo neutro.

Sin embargo, se ha encontrado ahora, sorprendentemente, que el perfil tiempo/acción basal deseable descrito se obtiene con análogos de insulina que se caracterizan por los rasgos de que

- el extremo de la cadena B consiste en un residuo aminoácido de carácter básico, amidado, tal como lisina o argininamida, es decir, en el residuo aminoácido de carácter básico amidado en el extremo de la cadena B el grupo carboxilo del aminoácido terminal está presente en su forma amidada, y
- 5
- la posición A8 del aminoácido está ocupada por un residuo histidina, y
 - la posición de aminoácido A21 está ocupada por un residuo glicina, residuo alanina, residuo serina o residuo treonina, y
 - no más de un residuo aminoácido del grupo que comprende A5, A15, A18, B-1, B0, B1, B2, B3 y B4 corresponde a Asp o Glu.
- 10
- De manera sorprendente, precisamente los análogos de insulina descritos tienen los perfiles tiempo/acción ventajosos deseados que se aproximan a la aparición ideal, es decir una aparición plana retardada de la acción y una duración más prolongada de la acción. Así, se minimiza claramente el riesgo de sucesos hipoglucémicos. La demora es tan acusada que, sorprendentemente, es posible
- 15
- detectar el efecto, incluso en experimentos de modelos en ratas. Por contraposición, la acción retardada de la insulina glargina no se puede observar de modo inequívoco en ratas, tal como se muestra en la figura 2. La figura 1 muestra el efecto hipoglucémico de los compuestos YKL202 e YKL203 de la invención. Los resultados obtenidos en el experimento en ratas se confirman en
- 20
- un experimento en perros. De nuevo, se observa que la duración de la acción es claramente más prolongada que la de la insulina glargina. Así, se han proporcionado nuevas insulinas basales, que necesitan ser administradas, claramente, con menos frecuencia. Aparte de estas ventajas farmacocinéticas descritas, los análogos de la invención muestran mejores propiedades en
- 25
- comparación con insulina glargina en aspectos farmacológicos. Además de ello, las insulinas reivindicadas muestran también ventajas en aspectos físico-químicos.

Sorprendentemente, se ha encontrado ahora que análogos de insulina de la fórmula I



en que

- A-1 corresponde a Lys, Arg o un grupo amino;
 - 5 A0 corresponde a Lys, Arg o un enlace químico;
 - A1 corresponde a Arg o Gly;
 - A5 corresponde a Asp, Glu o Gln;
 - A15 corresponde a Asp, Glu o Gln;
 - A18 corresponde a Asp, Glu o Asn;
 - 10 A21 corresponde a Ala, Ser, Thr o Gly;
 - B-1 corresponde a Asp, Glu o un grupo amino;
 - B0 corresponde a Asp, Glu o un enlace químico;
 - B1 corresponde a Asp, Glu, Phe o un enlace químico;
 - B3 corresponde a Asp, Glu o Asn;
 - 15 B4 corresponde a Asp, Glu o Gln;
 - B29 corresponde a Arg, Lys o un aminoácido seleccionado del grupo que comprende los aminoácidos Phe, Ala, Thr, Ser, Val, Leu, Glu o Asp, o un enlace químico;
 - B30 corresponde a Thr o un enlace químico;
 - 20 B31 corresponde a Arg, Lys o un enlace químico;
 - B32 corresponde a Arg-amida o Lys-amida,
- en que no más de un residuo aminoácido del grupo que comprende A5, A15, A18, B-1, B0, B1, B2, B3 y B4 corresponde a Asp o Glu tiene el perfil farmacológico deseado, es decir una aparición retardada de la acción y por un efecto de mayor
- 25 duración y uniforme. Por lo tanto, la invención se refiere a estos análogos de insulina.

La invención se refiere, además, a un análogo de insulina según se

describe antes, en que un residuo aminoácido del grupo que comprende A5, A15, A18, B-1, B0, B1, B2, B3 y B4 corresponde a Asp o Glu.

La invención se refiere, además, a un análogo de insulina según se describe antes, en que, de preferencia, A-1 corresponde a Arg, A0 corresponde a Arg, A5 corresponde a Glu, A15 corresponde a Glu, A18 corresponde a Asp, A8
5 corresponde a His, A21 corresponde a Gly, B0 corresponde a Glu, B3 corresponde a Asp, B4 corresponde a Glu, B30 corresponde a Arg o B30 corresponde a Lys.

La invención se refiere, además, a un análogo de insulina según se describe antes, en que éste se selecciona de un grupo que comprende
10 Arg (A-1), Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ insulina humana,
Arg (A-1), Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Lys (B30) – NH₂ insulina humana,
15 Arg (A-1), Arg (A0), Glu (A15), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ insulina humana,
Arg (A-1), Arg (A0), Glu (A15), His (A8), Gly (A21), Lys (B30) – NH₂ insulina humana,
Arg (A-1), Arg (A0), Asp (A18), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ insulina
20 humana,
Arg (A-1), Arg (A0), Asp (A18), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ insulina humana,
Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B30) – NH₂ insulina humana,
25 Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Lys (B30) – NH₂ insulina humana,
Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B30) – NH₂ insulina humana,
Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Lys (B30) – NH₂ insulina
30 humana,
Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B30) – NH₂ insulina humana,
Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Lys (B30) – NH₂ insulina humana,
35 Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – insulina humana,
Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – insulina humana,

- Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – insulina humana,
- Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – insulina humana,
- 5 Arg (A0), Asp (A18), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – insulina humana,
- Arg (A0), Asp (A18), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – insulina humana,
- Arg (A0), Glu (A15), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – insulina
- 10 humana,
- Arg (A0), Glu (A15), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – insulina humana,
- 15 Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – insulina
- 20 humana,
- Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – insulina humana,
- 25 Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ – insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Lys (B30) – NH₂ – insulina humana,
- Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ – insulina humana,
- Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Lys (B30) – NH₂ – insulina humana,
- Arg (A0), Arg (A1), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ – insulina humana,
- 30 Arg (A0), Arg (A1), His (A8), Gly (A21), Lys (B30) – NH₂ – insulina humana,
- His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – insulina humana.

La especificación de la expresión "insulina humana" en las designaciones de los análogos de insulina mencionados hace referencia a las secuencias de aminoácidos de la cadena A y la cadena B de insulina humana, y todas las

35 desviaciones (adiciones, sustituciones, deleciones) de la misma se indican en una designación dada de un análogo de insulina.

La invención se refiere, además, a un procedimiento para preparar un análogo de insulina tal como se describe antes, en que un precursor del análogo de insulina se prepara de forma recombinante, el precursor se trata enzimáticamente para dar insulina de dos cadenas, y se lleva a cabo un
5 acoplamiento con argininamida en presencia de una enzima con actividad de tripsina, y el análogo de insulina se aísla.

La invención se refiere, además, al uso de un análogo de insulina según se describe antes, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de diabetes mellitus, en particular de diabetes mellitus de tipo I o tipo II.

10 La invención se refiere, además, a un producto farmacéutico que comprende un análogo de insulina según se describe antes y/o sus sales fisiológicamente aceptables.

La invención se refiere, además, a un producto farmacéutico que comprende un análogo de insulina según se describe antes, que se emplea
15 terapéuticamente para la regeneración de cartílago.

La invención se refiere, además, a un producto farmacéutico que comprende un análogo de insulina según se describe antes, que se emplea terapéuticamente para ayudar a la regeneración de células beta.

La invención se refiere, además, a una formulación del análogo de insulina según se describe antes, en que la formulación está en una forma acuosa que
20 comprende el análogo de insulina disuelto.

La invención se refiere, además, a una formulación del análogo de insulina según se describe antes, en que la formulación está en forma de un polvo, en particular en forma cristalina y/o amorfa.

25 La invención se refiere, además, a una formulación del análogo de insulina según se describe antes, en que la formulación está en la forma de una suspensión.

La invención se refiere, además, a una formulación del análogo de insulina según se describe antes, en que la formulación comprende, adicionalmente, una
30 chaperona química.

La invención se refiere, además, a un ADN que codifica un precursor de un análogo de insulina según se describe antes.

La invención se refiere, además, a un ADN que codifica la cadena A de un análogo de insulina según se describe antes.

35 La invención se refiere, además, a un ADN que codifica la cadena B de un análogo de insulina según se describe antes.

La invención se refiere, además, a un vector que comprende un ADN según se describe antes.

La invención se refiere, además, a un organismo hospedante que comprende un ADN según se describe antes o un vector según se describe antes.

5 La invención se refiere, además, a un análogo de preproinsulina, en donde el péptido C porta el residuo aminoácido arginina en su extremo N y su extremo C se caracteriza por la forma Arg Arg, Arg Lys o Lys Arg Arg.

La invención se refiere, además, a una formulación según se describe antes, que comprende, adicionalmente, también un péptido similar al glucagón 1
10 (GLP1 - siglas en inglés) o un análogo o un derivado del mismo, o exendina-3 ó -4 o un análogo o derivado del mismo, de preferencia exendina-4.

La invención se refiere, además, a una formulación según se describe antes, en la que un análogo de exendina-4 se selecciona de un grupo que comprende
15 H-desPro³⁶-exendina-4-Lys₆-NH₂,
H-des(Pro^{36,37})-exendina-4-Lys₄-NH₂ y
H-des(Pro^{36,37})-exendina-4-Lys₅-NH₂,
o una sal farmacológicamente tolerable de los mismos.

La invención se refiere, además, a una formulación según se describe
20 antes, en la que un análogo de exendina-4 se selecciona de un grupo que comprende
desPro³⁶ [Asp²⁸]exendina-4 (1-39),
desPro³⁶ [IsoAsp²⁸]exendina-4 (1-39),
desPro³⁶ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]exendina-4 (1-39),
25 desPro³⁶ [Met(O)¹⁴, IsoAsp²⁸]exendina-4 (1-39),
desPro³⁶ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-2 (1-39),
desPro³⁶ [Trp(O₂)²⁵, IsoAsp²⁸]exendina-2 (1-39),
desPro³⁶ [Met(O)¹⁴Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4 (1-39) y
desPro³⁶ [Met(O)¹⁴Trp(O₂)²⁵, IsoAsp²⁸]exendina-4 (1-39),
30 o una sal farmacológicamente tolerable de los mismos.

La invención se refiere, además, a una formulación según se describe en el párrafo anterior, en que el péptido -Lys₆-NH₂ está fijado a los extremos C de los análogos de exendina-4.

La invención se refiere, además, a una formulación según se describe
35 antes, en la que un análogo de exendina-4 se selecciona de un grupo que comprende

- 00 000
- H-(Lys)₆- des Pro³⁶ [Asp²⁸]exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂
 des Asp²⁸Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ exendina-4(1-39)-NH₂,
 H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]exendina-4(1-39)-NH₂,
 H-Asn-(Glu)₅ des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]exendina-4(1-39)-NH₂,
 5 des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
 H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
 H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
- H-(Lys)₆- des Pro³⁶ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂,
 10 H- des Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵]exendina-4(1-39)-NH₂,
 H-(Lys)₆-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-NH₂,
 H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-NH₂,
 des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
 H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
 15 H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-
 NH₂,
 H-(Lys)₆- des Pro³⁶ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂,
 des Met(O)¹⁴ Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ exendina-4(1-39)-NH₂,
 H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-NH₂,
 20 H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-NH₂,
 des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
 H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂,
 H-Asn-(Glu)₅ des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-
 NH₂,
 25 H-(Lys)₆- des Pro³⁶ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂,
 des Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵]exendina-4(1-39)-NH₂,
 H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-NH₂,
 H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-NH₂,
 des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
 30 H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-
 (Lys)₆-NH₂,
 H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-
 (Lys)₆-NH₂,

o una sal farmacológicamente tolerable de los mismos.

- 35 La invención se refiere, además, a una formulación según se describe
 antes que comprende, adicionalmente, Arg³⁴, Lys²⁶ (N^ε(γ-glutamil)(N^α-

hexadecanoil))) GLP-1 (7-37) [liraglutida] o una sal farmacológicamente tolerable de la misma.

A este respecto, resulta claro para un experto que las insulinas de la invención pueden ser componente de una formulación farmacéutica que tiene un efecto ventajoso después de la administración. Soluciones acuosas son el punto de partida a este respecto. Por consiguiente, componentes adicionales deben ser miscibles. Se minimiza el riesgo de una contaminación viral del animal, debido a que la preparación no debería comprender componente alguno derivado de fuentes animales. Es ventajoso, además, prevenir una contaminación microbiana al añadir conservantes. Es posible añadir agentes isotónicos para compensar un posible efecto negativo de la formulación sobre la fisiología de las células del tejido en el sitio de la administración. La adición de protamina puede tener un efecto estabilizante, de modo que se puede obtener una preparación de insulina esencialmente exenta de sales al añadir protamina a la formulación. La adición de un componente fenólico puede conducir a la estabilización de la estructura del análogo de insulina utilizado y, así, dar lugar adicionalmente, entre otros, al efecto retardador de la aparición de la acción. También es posible añadir a la formulación sustancias que estabilizan la estructura espacial de las insulinas lentas de la invención y que conducen a una mejor estabilidad térmica. Chaperonas químicas de este tipo pueden ser, por ejemplo, péptidos sintéticos cortos, que pueden comprender también análogos de aminoácidos o que pueden incluir, por ejemplo, secuencias de péptidos derivadas del péptido C de la insulina.

Las insulinas de la invención se pueden incorporar en nanopartículas para desarrollar formas de depósito. También se pueden concebir las denominadas formulaciones de liberación lenta, en las que la insulina lenta de la invención está presente unida de manera reversible a un soporte polímero.

Las insulinas de la invención se pueden administrar en paralelo con insulinas de acción rápida, tales como Apidra®, NovoRapid®, Humalog® o derivados de insulina que experimentan desarrollo o formulaciones con un perfil tiempo/acción apropiado o insulina inhalable o insulinas administradas por vía nasal u oral que están experimentando desarrollo. A este respecto, resultará claro para un experto que para este propósito también se pueden utilizar mezclas, apropiadamente formuladas, de insulinas de acción rápida y lentas de la invención. Los análogos de insulina de la invención se pueden utilizar, además, en preparaciones farmacéuticas que comprenden péptidos que se describen por una actividad equiparable a GLP-1 (péptido similar a glucagón 1) o exendina-4 o

- exendina-3. GLP-1 (7-37), exenatida (Byetta®) o péptidos cuya preparación se describe en las solicitudes de patente WO 2006/058620, WO 2001/04156, WO 2004/005342 y WO 98/08871 representan ejemplos de péptidos de este tipo. Formulaciones particularmente ventajosas a este respecto son las que
- 5 comprenden una formulación de depósito de estos péptidos. Tipos de terapia, especialmente ventajosos en la fase inicial de diabetes de tipo II, son los que proporcionan en paralelo con la administración de los productos farmacéuticos de la invención, que incrementan el efecto de insulina, tal como, por ejemplo, metformina. Son igualmente posibles terapias de combinación con inhibidores de
- 10 dipeptidil peptidasa-4 que aumentan el nivel de incretinas, al igual que combinaciones con sulfonilureas que aumentan la secreción de insulina en el páncreas. Las insulinas lentas de la invención se pueden emplear, de manera particularmente ventajosa, cuando la regeneración de células beta a partir de células madre se inicia mediante la administración de factores de diferenciación.
- 15 Todas estas aplicaciones se mencionan a modo de ejemplo para la terapia de la diabetes, y la invención se refiere igualmente a las mismas. Así, la invención se refiere, además, al uso de las insulinas de la invención en combinación con otros ingredientes activos para el tratamiento de la diabetes, en especial diabetes de tipo I o diabetes de tipo II.
- 20 La invención también se refiere, además, al uso de las insulinas de la invención en procesos de regeneración que se refieren al esqueleto, tales como, por ejemplo, regeneración de cartílago. Es importante en este uso hacer un uso controlado del potencial mitogénico de insulinas sin provocar, al mismo tiempo, una fuerte reacción metabólica.
- 25 La invención se refiere, además, a un producto farmacéutico que comprende un análogo de la invención que representa, en particular, una formulación acuosa o un polvo.
- El producto farmacéutico es una preparación farmacéutica que, preferiblemente, es una solución o suspensión para fines de inyección; se
- 30 caracteriza por un contenido de al menos un análogo de insulina de la invención, y/o al menos una de las sales fisiológicamente toleradas del mismo en forma disuelta, amorfa y/o cristalina – preferiblemente disuelta -.
- La preparación tiene preferiblemente un pH de entre aproximadamente 2,5 y 8,5, en particular entre 4,0 y 8,5, preferiblemente comprende un agente de
- 35 tonicidad adecuado, un conservante adecuado y, en caso apropiado, un tampón adecuado, y preferiblemente también una concentración particular de iones zinc,

en solución acuosa estéril. La totalidad de los ingredientes de la preparación, aparte del ingrediente activo, forma el soporte de la preparación. Agentes de tonicidad adecuados son, por ejemplo, glicerol, glucosa, manitol, NaCl, compuestos de calcio o magnesio, tales como CaCl_2 , etc. La solubilidad de las insulinas de la invención o las sales fisiológicamente toleradas de las mismas a valores de pH débilmente ácido se ve influenciada por la elección del agente de tonicidad y/o conservante.

Ejemplos de conservantes adecuados son fenol, m-cresol, alcohol bencílico y/o ésteres p-hidroxibenzoicos.

10 Sustancias tampón que se pueden utilizar, en particular para ajustar un pH entre aproximadamente 4,0 y 8,5 son, por ejemplo, acetato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio, etc. Por lo demás, también son adecuados para ajustar el pH ácidos (típicamente HCl) o álcalis (típicamente NaOH) diluidos, fisiológicamente aceptables.

15 Si la preparación tiene un contenido en zinc, se da preferencia a una de 1 $\mu\text{g/ml}$ a 2 mg/ml , en particular de 1 $\mu\text{g/ml}$ a 200 μg de zinc/ml. El perfil de acción de los análogos de insulina de la invención puede verse influenciado de manera satisfactoria, sorprendentemente, mediante la adición de zinc. Esto permite la producción de preparaciones que difieran en relación a la duración total de la acción, la velocidad de la aparición de la acción y el perfil de la curva de efecto, permitiendo, así, una estabilización individual del paciente.

Con el fin de variar el perfil de ingrediente activo de la preparación de la invención es también posible mezclar insulina no modificada, de preferencia insulina bovina, porcina o humana, en especial insulina humana, o análogos de insulina y derivados de los mismos. Es igualmente posible mezclar uno o más derivados de exendina-4 o péptidos que se caracterizan por una actividad equiparable a GLP-1 (péptido similar a glucagón 1). La invención se refiere, igualmente, a productos farmacéuticos (preparaciones) de este tipo.

25 Concentraciones de ingrediente activo preferidas son aquellas que corresponden a aproximadamente 1-1500, con más preferencia a aproximadamente 5-1000 y, en particular, a aproximadamente 40-400 unidades internacionales/ml.

Los análogos de insulina de la invención se preparan, inicialmente, biotecnológicamente como precursor el cual no incluye todavía la amida. El experto está familiarizado con un gran número de posibilidades para preparar insulinas. Sistemas de células hospedantes, utilizados a este respecto, son

bacterias, levaduras y vegetales o células vegetales para el cultivo mediante fermentación. Si lo permiten las consideraciones de costos, también son concebibles sistemas de expresión que utilizan células animales como sistema hospedante. Sin embargo, la condición previa para ello es una ausencia fiable de virus animales. Así, resulta claro que los sistemas de expresión descritos a modo de ejemplo sólo representan un pequeño segmento de los sistemas hospedante/vector desarrollados para la preparación recombinante de proteínas. Por ejemplo, en la solicitud no se describen procedimientos biotecnológicos basados en sistemas de levaduras o vegetales, tales como musgos, algas o plantas superiores, tales como tabaco, guisante, cártamo, cebada, maíz o colza. No obstante, la invención incluye, igualmente, sistemas de hospedante/vector y secuencias de ADN codificadoras que permiten que los péptidos diana sean preparados en sistemas de expresión biotecnológicos apropiados. Así, organismos hospedantes se pueden seleccionar, en particular, del Reino Vegetal de organismos de la primera división Schizophyta que comprende Schizomycetes, bacterias o algas azules, organismos de la 2ª división Phycophyta clase V Chlorophyceae, organismos de la 2ª división Phycophyta clase VII Rhodophyceae, organismos de la 3ª división Mycophyta, organismos de la 5ª división Bryophyta y organismos de la 7ª división Spermatophyta.

La solicitud de patente europea EP-A 1 222 207 describe un plásmido pINT358d que codifica una preproinsulina que incluye un péptido C modificado. Es ahora posible, con ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR - siglas en inglés) modificar específicamente la secuencia codificadora de proinsulina, de manera que sea posible expresar preproinsulinas que puedan servir como precursores de las insulinas de la invención. No se requiere, necesariamente, preparar las proteínas de fusión correspondientes intracelularmente. Resulta claro para el experto que proteínas de este tipo también se pueden preparar por expresión bacteriana con secreción posterior en el periplasma y/o en el sobrenadante del cultivo. La solicitud de patente europea EP-A 1 364 029 describe esto a modo de ejemplo. De igual modo, la invención se refiere a los precursores de proinsulina que conducen a los análogos de la invención.

Las proinsulinas preparadas de esta manera pueden convertirse, en principio, en un precursor de análogo de insulina que incluye lisina o arginina en la posición A0 y porta lisina o arginina en el extremo C-terminal de la cadena B. Alternativamente, es posible añadir de forma semisintética un aminoácido cargado

positivamente al extremo N de la cadena A de lisina, si ya no están presentes lisina o arginina.

Si las proinsulinas de la invención están en forma de cuerpos de inclusión o en forma soluble después de la expresión intracelular en bacterias, estos
5 precursores deben ser plegados mediante plegamiento in vitro en la conformación correcta antes de poder emprender el tratamiento y la modificación bioquímica. A este respecto, la proteína de fusión descrita permite un plegamiento directo después de la desnaturalización por medio de urea o hidrocloreuro de guanidinio, y la invención se refiere, igualmente, a productos intermedios del plegamiento.

10 Se utilizan métodos bioquímicos para concentrar los productos intermedios individuales, en especial procedimientos de separación cuyos principios subyacentes están publicados y constituyen el objeto de libros de texto. Resulta claro para el experto que estos principios se pueden combinar, por consiguiente, y, así, pueden conducir a procedimientos que no han sido previamente publicados
15 en su secuencia. Así, igualmente la invención se refiere a procedimientos que conducen a la purificación de los análogos de la invención.

La invención se refiere, además, a un procedimiento para preparar los análogos de insulina de la invención, en el que un precursor del análogo de insulina se prepara de forma recombinante y se convierte, por vía enzimática, en
20 un precursor de insulina de dos cadenas que porta arginina o lisina N-terminalmente en relación con el aminoácido 1 de la cadena A, y que en el extremo C-terminal de la cadena B tiene un residuo lisina o arginina que se convierte con argininamida o lisinamida, en presencia de una enzima con actividad de tripsina, en la amida y, así, en la insulina lenta de la invención, y se
25 prepara con una alta pureza mediante un procedimiento de purificación bioquímico.

A proteínas que difieren, por la sustitución de al menos un residuo aminoácido que se produce de forma natural por otros residuos aminoácidos y/o por la adición y/o por la delección de al menos un residuo aminoácido de la
30 correspondiente proteína, que se produce de forma natural, por lo demás idéntica, se las alude como "análogos" de proteínas. A este respecto, también es posible que los residuos aminoácidos añadidos y/o reemplazados sean unos que no se producen de forma natural.

A proteínas que se obtienen por modificación química de determinados
35 residuos aminoácidos de proteínas iniciales se les alude como "derivados" de proteínas. La modificación química puede consistir, por ejemplo, en la adición de

uno o más grupos químicos particulares a uno o más aminoácidos.

Clave para las figuras:

5 Fig. 1: Efecto reductor de glucosa en sangre de análogos de insulina de la invención en ratas

Fig. 2: Efecto reductor de glucosa en sangre de insulina glargina en ratas

10 Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar el concepto de la invención sin tener un efecto restrictivo a este respecto.

Ejemplo 1: Preparación del derivado del vector pINT3580 que codifica Gly (A21)-insulina y un péptido modificado en C que porta Arg Arg en el límite de la cadena C/A.

15

La solicitud de patente europea EP-A 1 222 207 describe los plásmidos pINT358d, pINT91d y la secuencia de cebador Tir. El ADN de estos productos se utiliza para construir el plásmido pINT3580. Además, el plásmido pINT358d se caracteriza por una secuencia de genes que codifica un péptido modificado en C
20 que tiene propiedades particulares. Se sintetizan tres secuencias de cebador:

pint3580_glya21rev

5'-CAAAGGTCGACTATTAGGCCGCAGTAGTTCTCCAGCTGG-3' (SEQ ID NO: 3)

25

Este cebador sirve, después del tratamiento, para introducir glicina (en negrillas, subrayado) en lugar de asparagina en la posición 21 de la cadena A de la secuencia de proinsulina codificada por pINT358d.

30 arg_cjuncf

5'-GTCCCTGCAGCGTCGCGGCATCGTGGAGCAG-3' (SEQ ID NO: 4)

35 Este cebador sirve, al igual que el cebador arg_cjunc_rev, para introducir arginina en lugar de lisina en el límite de la cadena A/B de la insulina.

arg_cjunc_rev

5'- CCACGATGCC GCG**ACG**CTGC AGGGACCCCT CCAGCG-3' (SEQ ID NO: 5)

5

El codón para que la arginina sea introducida está en negrillas en los dos cebadores. Se lleva a cabo una PCR de acuerdo con la solicitud de patente europea EP-A 1 222 207 con cada uno de los pares de cebadores Tir / arg_cjunc_rev y arg_cjuncf / pint3580_glya21rev y con ADN del plásmido pINT358d como molde. Se combinan partes alícuotas de los productos de las dos reacciones y se emplean juntas con el par de cebadores Tir / pint3580_glya21rev en una tercera PCR. El producto de esta reacción se purifica después del fraccionamiento de la mezcla de reacción mediante electroforesis en gel y se digiere con las enzimas de restricción Sal1 / Nco1 de acuerdo con las instrucciones del fabricante en una sola reacción, la mezcla de reacción se fracciona mediante electroforesis en gel, y se aísla el fragmento de ADN que codifica la secuencia de proinsulina. Después, el fragmento se inserta, mediante una reacción con ADN ligasa, en el ADN del vector pINT91d abierto con Nco1 / Sal1.

La mezcla de ligamiento se utiliza para transformar células bacterianas de E. coli competentes. La mezcla de transformación se recoge en placas de selección que contienen 25 mg/l de ampicilina. El ADN del plásmido se aísla de colonias y se caracteriza mediante el análisis de la secuencia de ADN. Los plásmidos correctos se denominan pINT3580.

Ejemplo 2: Construcción del plásmido pINT3581 que codifica His (A8), Gly (A21) – preproinsulina

La construcción tiene lugar según se describe en el ejemplo 1 mediante 3 reacciones en cadena de la polimerasa. El producto de la tercera reacción se inserta, después de la escisión con Nco1 / Sal1, en el ADN del vector pINT91d abierto con Nco1 / Sal1. Se utilizan los cebadores Tir y pint3580_glya21rev. Se sintetizan dos cebadores adicionales:

pint3580_Ha8f

35

5'-AGCAGTGCTGCC**ACAG**CATCTGCTCCCTCTAC-3' (SEQ ID NO: 6)

pint3580_Ha8rev

5'-GAG CAGATGCT **GTG** GCAGCACTG CTCCACGATG-3' (SEQ ID NO: 7)

5

El codón que codifica histidina en la posición 8 de la cadena A queda resaltado mediante negrillas en cada caso. La construcción se lleva a cabo como se describe en el ejemplo 1. El molde para PCR1 y 2 es ADN del plásmido pINT3580. La PCR1 se lleva a cabo con el par de cebadores Tir/ pint3580_Ha8rev y la PCR2 se lleva a cabo con el par de cebadores pint3580_Ha8f/ pint3580_glya21rev. El par de cebadores Tir / pint3580_glya21rev se emplea en la PCR 3. En este caso, el molde es una mezcla de los productos de reacción de las PCR1 y PCR2. Los plásmidos correctos se denominan pINT3581.

La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL202, que está caracterizado como Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂-insulina humana, y que resulta después de la amidación con argininamida.

La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL202b, que está caracterizado como Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂-insulina humana, y que resulta después de la amidación con lisinamida.

Ejemplo 3: Construcción del plásmido pINT3582 que codifica His (A8), Glu (A5), Gly (A21) – preproinsulina

25

La construcción tiene lugar según se describe en los ejemplos 1 y 2 mediante 3 reacciones en cadena de la polimerasa. El producto de la tercera reacción se inserta, después de la escisión con Nco1 / Sal1, en el ADN del vector pINT91d abierto con Nco1 / Sal1. Se utilizan los cebadores Tir y pint3580_glya21rev. Se sintetizan dos cebadores adicionales.

pint3581_Ea5f

5'GCATCGTGGAGG**AGT**GCTGCCACAGCATCTG 3' (SEQ ID NO: 8)

35

pint3581_Ea5rev

5'-CTGT GGCAGCACTC CTCCACGATG CCGCGACG-3' (SEQ ID NO: 9)

El codón que codifica ácido glutámico en la posición 5 de la cadena A queda resaltado mediante negrillas en cada caso. La construcción se lleva a cabo como se describe en el ejemplo 1. El molde es ADN del plásmido pINT3581. Los plásmidos correctos se denominan pINT3582.

La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL202-1, que está caracterizado como Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂-insulina humana, y que resulta después de la amidación con argininamida.

La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL202-1b, que está caracterizado como Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂-insulina humana, y que resulta después de la amidación con lisinamida.

Ejemplo 4: Construcción del plásmido pINT3583 que codifica His (A8), Asp (A18), Gly(A21) – preproinsulina

La construcción difiere del ejemplo 1 al tener lugar mediante una sola reacción en cadena de la polimerasa. El producto de esta reacción se inserta, después de la escisión con Nco1 / Sal1, en el ADN del vector pINT91d abierto con Nco1 / Sal1. Se utiliza el cebador Tir. Se sintetiza un cebador adicional:

pint3580_Da18rev

5' CAAAGGTCGACTATTAGCCGCAGTAGTCCTCCAGCTGGTAGAGGGAG 3'
(SEQ ID NO: 10)

El codón que codifica ácido aspártico en la posición 18 de la cadena A queda resaltado mediante negrillas. El molde es ADN del plásmido pINT3581. Los plásmidos correctos se denominan pINT3583.

La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL202, que está caracterizado como Arg (A0), Asp (A18), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂-insulina humana, y que resulta después de la amidación con argininamida.

La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL202-2b, que está caracterizado como Arg (A0), Asp (A18), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂-insulina humana, y que resulta después de la amidación con lisinamida.

5

Ejemplo 5: Construcción del plásmido pINT3585 que codifica His (A8), Glu (A15), Gly (A21) – preproinsulina

La construcción difiere del ejemplo 1 al tener lugar mediante una sola
10 reacción en cadena de la polimerasa. El producto de esta reacción se inserta, después de la escisión con Nco1 / Sal1, en el ADN del vector pINT91d abierto con Nco1 / Sal1. Se utiliza el cebador Tir. Se sintetiza un cebador adicional:

pint3580_Ea15rev

15

5'- CAAAGGTCGA CTATTAGCCG CAGTAGTTCTCCAGCTCGTA
GAGGGAGCAG ATGCTG -3' (SEQ ID NO: 11)

El codón que codifica ácido glutámico en la posición 15 de la cadena A
20 queda resaltado mediante negrillas. El molde es ADN del plásmido pINT3581. Los plásmidos correctos se denominan pINT3585.

La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL202-3, que está caracterizado como Arg (A0), Glu (A15), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂-insulina humana, y que resulta después de la amidación
25 con argininamida.

La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL202-3b, que está caracterizado como Arg (A0), Glu (A15), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂-insulina humana, y que resulta después de la amidación con lisinamida.

30

Ejemplo 6: Construcción del plásmido pINT3588 que codifica His (A8), Gly (A21), Asp (B3) – preproinsulina

La construcción tiene lugar según se describe en los ejemplos 1 y 2
35 mediante 3 reacciones en cadena de la polimerasa. El producto de la tercera reacción se inserta, después de la escisión con Nco1 / Sal1, en el ADN del vector

pINT91d abierto con Nco1 / Sal1. Se utilizan los cebadores Tir y pint3580_glya21rev. Se sintetizan dos cebadores adicionales:

pint3581_Db3f

5

5'- GCACGATTTGTGG**ACC**AGCACCTGTGCGGC -3' (SEQ ID NO: 12)

pint3581_Db3rev

10 5'- CACAGG TGCTGG**TCCA** CAAATCGTGC CGAATTTC -3' (SEQ ID NO: 13)

El codón que codifica asparagina en la posición 3 de la cadena B de la insulina queda resaltado mediante negrillas en cada caso. La construcción se lleva a cabo como se describe en el ejemplo 1. El molde es ADN del plásmido pINT3581. Los plásmidos correctos se denominan pINT3588.

La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL202-4, que está caracterizado como Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂-insulina humana, y que resulta después de la amidación con argininamida.

20 La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL202-4b, que está caracterizado como Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂-insulina humana, y que resulta después de la amidación con lisinamida.

25 Ejemplo 7: Construcción del plásmido pINT3593 que codifica His (A8), Gly (A21), Glu (B4) – preproinsulina

La construcción tiene lugar según se describe en los ejemplos 1 y 2 mediante 3 reacciones en cadena de la polimerasa. El producto de la tercera reacción se inserta, después de la escisión con Nco1 / Sal1, en el ADN del vector pINT91d abierto con Nco1 / Sal1. Se utilizan los cebadores Tir y pint3580_glya21rev. Se sintetizan dos cebadores adicionales:

pint3581_Eb4f

35 5'- ACGATTTGTGAAC**GAG**CACCTGTGCGGCTC -3' (SEQ ID NO: 14)

pint3581_Eb4rev

5'- CGCACAGG TGCTCGTTCA CAAATCGTGC CGAATTTC -3' (SEQ ID NO: 15)

5

El codón que codifica glutamina en la posición 4 de la cadena B de la insulina queda resaltado mediante negrillas. La construcción se lleva a cabo como se describe en el ejemplo 1. El molde es ADN del plásmido pINT3581. Los plásmidos correctos se denominan pINT3593.

10 La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL202-5, que está caracterizado como Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂-insulina humana, y que resulta después de la amidación con argininamida.

15 La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL202-5b, que está caracterizado como Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂-insulina humana, y que resulta después de la amidación con lisinamida.

Ejemplo 8: Construcción del plásmido pINT3597 que codifica His (A8), Gly (A21), Glu (B0) – preproinsulina

La construcción tiene lugar mediante 2 reacciones en cadena de la polimerasa. Se utiliza el cebador pint3580_glya21rev. Se sintetizan dos cebadores adicionales:

25

pint3581_Eb0f1

5'- CAACAGGAA ATTCGGCACG **AGAG**TTTGTG AACCAGCACC TGTG-3' (SEQ ID NO: 16)

30

pint3581_Eb01f2

5'- TATCGA CCAT GG CAACAACA TCAACAGGAA ATTCGGCACG **AGAG**-3' (SEQ ID NO: 17)

35

En este caso, existe un solapamiento parcial de los dos cebadores.

Pint3581_Eb0f2 contiene una secuencia de reconocimiento de NcoI. Ésta se representa subrayada. El codón que codifica ácido glutámico en la posición 0 al comienzo de la cadena B queda resaltado mediante negrillas en cada caso. El molde para la PCR1 es ADN del plásmido pINT3581.

- 5 La PCR1 se lleva a cabo con el par de cebadores pint3581_Eb-1f2 / pint3580_glya21rev. El molde para la PCR2 es el producto de la PCR1. La PCR2 se lleva a cabo con el par de cebadores pint3581_Eb-1f2 / pint3580_glya21rev. El producto de la PCR2 cubre la secuencia completa de la preproinsulina. El producto de la segunda reacción se inserta, después de la escisión con Nco1 /
- 10 Sal1, en el ADN del vector pINT91d abierto con Nco1 / Sal1. Los plásmidos correctos se denominan pINT3597.

La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL202-6, que está caracterizado como Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂-insulina humana, y que resulta después de la amidación

15 con argininamida.

La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL202-6b, que está caracterizado como Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂-insulina humana, y que resulta después de la amidación con lisinamida.

- 20 La sustitución del codón para ácido glutámico en la posición B0 por el codón para ácido aspártico y siguiendo el ejemplo resulta en plásmidos que tienen ácido aspártico en lugar de ácido glutámico en la posición B0.

Ejemplo 9: Construcción del plásmido pINT3700 que codifica His (A8), Gly (A21),

25 Lys (B0) – preproinsulina

La construcción sirve para introducir el codón para lisina en lugar del codón para arginina en el límite entre la presecuencia y el comienzo de la cadena B. La construcción tiene lugar mediante dos reacciones en cadena de la

30 polimerasa. Se utiliza el cebador pint3580_glya21rev. Se sintetizan dos cebadores adicionales:

pint3581_Eb0f1

- 35 5'- CAACAGGAA ATTCGGCA **AAGTTTGTG** AACCAGCACC TGTG – 3' (SEQ ID NO: 18)

pint3581_Eb01f2

5'- TATCGA CCAT GG CAACAACA TCAACAGGAA ATTCGGCAGAG – 3' (SEQ ID NO: 19)

5

Existe un solapamiento parcial de los dos cebadores en este caso, y pint3581_Eb0f2 contiene una secuencia de reconocimiento de NcoI. Ésta se representa subrayada. El codón que codifica ácido glutámico en la posición 0 al comienzo de la cadena B queda resaltado mediante negrillas en cada caso. El molde para la PCR1 es ADN del plásmido pINT3581. La PCR1 se lleva a cabo con el par de cebadores pint3581_Eb-1f2 / pint3580_glya21rev. El molde para la PCR2 es el producto de la PCR1. La PCR2 se lleva a cabo con el par de cebadores pint3581_Eb-1f2 / pint3580_glya21rev. El producto de la PCR2 cubre la secuencia completa de la preproinsulina. El producto de la segunda reacción se inserta, después de la escisión con NcoI / SalI, en el ADN del vector pINT91d abierto con NcoI / SalI. Los plásmidos correctos se denominan pINT3700.

La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B30)-NH₂-insulina humana. El compuesto se obtiene preparando inicialmente el producto intermedio Arg (A0), His (A8), Gly (A21) de la Thr (B30)-insulina humana mediante reacción con tripsina y lisil endopeptidasa C, producto intermedio que se convierte subsiguientemente, mediante amidación con argininamida, en el compuesto YKL202-7 deseado, el cual está caracterizado como Arg (A0), His(A8), Gly(A21), Arg (B30)-NH₂-insulina humana.

La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL202-7b, que está caracterizado como Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Lys (B30)-NH₂-insulina humana, y que resulta después de la amidación con lisinamida.

Ejemplo 10: Construcción del plásmido pINT3701 que codifica Gly (A21), Lys (B0) – preproinsulina

La construcción sirve para introducir el codón para lisina en lugar del codón para arginina en el límite entre la presecuencia y el comienzo de la cadena B. Siguiendo la estrategia de construcción del Ejemplo 9, pero utilizando ADN del plásmido pINT358d como molde para la PCR1, resulta el plásmido pINT3701 el cual, al igual que el plásmido original pINT358d, está caracterizado por el límite

entre el péptido C y la cadena A formada por la secuencia de aminoácidos Lys-Arg.

Ejemplo 11 : Construcción del plásmido pINT3702 que codifica His (A8), Gly (A21), Lys (B0)-preproinsulina con el péptido C de acuerdo con el Ejemplo 10

- 5 Siguiendo el plan de construcción descrito en el Ejemplo 2, pero utilizando ADN del plásmido pINT3701 como molde, resulta el plásmido pINT3702.

La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B30)-NH₂-insulina humana. El compuesto se obtiene preparando inicialmente el producto intermedio Arg (A0), His (A8), Gly (A21) de la Thr (B30)-insulina humana mediante reacción sólo con lisil endopeptidasa C, producto intermedio que se convierte subsiguientemente, mediante amidación con argininamida, en el compuesto YKL202-8 deseado, el cual está caracterizado como Arg (A0), His(A8), Gly(A21), Arg (B30)-NH₂-insulina humana.

- 15 La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL202-8b, que está caracterizado como Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Lys (B30)-NH₂-insulina humana, y que resulta después de la amidación con lisinamida.

- 20 Ejemplo 12: Preparación del derivado de vector pINT3703 el cual codifica His (A8), Gly (A21), Lys (B0)-preproinsulina y un péptido C modificado que porta el tripéptido Lys-Arg-Arg en el límite de la cadena C/A.

ADN del plásmido pINT3702 se utiliza como molde, y se utilizan los
25 cebadores pint3580_glya21rev y Tir. Se sintetizan dos secuencias de cebador:

3702_arg_cjuncf

5' - TGC AGAAGCGCAGAGGCATCGTG GAGCAGTGC – 3' (SEQ ID NO: 20).

30

Este cebador sirve, al igual que el cebador arg_cjunc_rev, para introducir arginina en el límite de la cadena A/B de la insulina.

3702_cjunc_rev

35

5' - TCC ACGATGCCTCTGCGCTTCTG CAGGGACCC – 3' (SEQ ID NO: 21)

El codón para que la arginina sea introducida está en negrillas en los dos cebadores. Se lleva a cabo una PCR de acuerdo con la solicitud de patente europea EP-A 1 222 207 con cada uno de los pares de cebadores
5 Tir/3702_cjunc_rev y 3702_arg _cjuncf/pint3580_glya21rev y con ADN del plásmido pINT3702 como molde. Se combinan partes alícuotas de los productos de las dos reacciones y se emplean juntas con el par de cebadores Tir / pint3580_glya21rev en una tercera PCR. El producto de esta reacción se purifica después del fraccionamiento de la mezcla de reacción mediante electroforesis en
10 gel y se digiere con las enzimas de restricción Sal1 / Nco1 de acuerdo con las instrucciones del fabricante en una sola reacción, la mezcla de reacción se fracciona mediante electroforesis en gel, y se aísla el fragmento de ADN que codifica la secuencia de proinsulina. Después, el fragmento se inserta, mediante una reacción con ADN ligasa, en el ADN del vector pINT91d abierto con Nco1 /
15 Sal1.

La mezcla de ligamiento se utiliza para transformar células bacterianas de E. coli competentes. La mezcla de transformación se extiende en placas de selección que contienen 25 mg/l de ampicilina. El ADN del plásmido se aísla de colonias y se caracteriza mediante el análisis de la secuencia de ADN. Los
20 plásmidos correctos se denominan pINT3702.

La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B30)-NH₂-insulina humana. El compuesto se obtiene, inicialmente, preparando el producto intermedio Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21) de la Thr (B30)-insulina humana mediante reacción
25 con lisil endopeptidasa C, y el producto intermedio se convierte, subsiguientemente, mediante amidación con argininamida, en el compuesto deseado.

La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Lys (B30)-NH₂-insulina humana, y que
30 resulta después de la amidación con lisinamida.

Resulta claro para el experto que ácido aspártico o ácido glutámico se pueden introducir en las posiciones apropiadas de la cadena A o B de acuerdo con los Ejemplos 3-8. Estas proinsulinas son los precursores de los compuestos

YKL202-10a	Arg (A-1), Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Arg (B30)-NH ₂ -insulina humana
YKL202-10b	Arg (A-1), Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Lys (B30)-NH ₂ -insulina humana
YKL202-11a	Arg (A-1), Arg (A0), Glu (A15), His (A8), Gly (A21), Arg (B30)-NH ₂ -insulina humana
YKL202-11b	Arg (A-1), Arg (A0), Glu (A15), His (A8), Gly (A21), Lys (B30)-NH ₂ -insulina humana
YKL202-12a	Arg (A-1), Arg (A0), Asp (A18), His (A8), Gly (A21), Arg (B30)-NH ₂ -insulina humana
YKL202-12b	Arg (A-1), Arg (A0), Asp (A18), His (A8), Gly (A21), Arg (B30)-NH ₂ -insulina humana
YKL202-13a	Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B30)-NH ₂ -insulina humana
YKL202-13b	Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Lys (B30)-NH ₂ -insulina humana
YKL202-14a	Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B30)-NH ₂ -insulina humana
YKL202-14b	Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Lys (B30)-NH ₂ -insulina humana
YKL202-15a	Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B30)-NH ₂ -insulina humana
YKL202-15b	Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Lys (B30)-NH ₂ -insulina humana

Ejemplo 13: Preparación del derivado de vector pINT3704 que codifica His (A8), Gly (A21), Lys (B0)-preproinsulina

- 5 Este ejemplo describe la preparación del derivado de vector pINT3704 que codifica His (A8), Gly (A21), Lys (B0)-preproinsulina, y un péptido C modificado que porta el tripéptido Lys-Arg-Arg en el límite de la cadena C/A y en el que está suprimido el aminoácido glicina que aparece en la posición A21 en la insulina humana.
- 10 Siguiendo el esquema de síntesis descrito en el Ejemplo 12 y reemplazando los cebadores 3702_arg_cjuncf y 3702_arg_cjuncfrev por los cebadores 3703 Δ Ga1f v 3703 Δ Ga1rev v utilizando ADN del plásmido

pINT3703 como molde resulta el plásmido pINT3704, en donde está suprimido el aminoácido glicina en la posición 1 de la cadena A en la preproinsulina codificada, y el curso restante de la secuencia corresponde al de la secuencia codificada por pINT3703.

5

3703_Δ Ga1f

5' - TGC AGAAGCGC**AGA**ATCGTG GAGCAGTGCTGC - 3' (SEQ ID NO: 22)

10

3703_Δ Ga1rev

5' - TGCTCC ACGATTCTGCGCTTCTG CAGGGACCC - 3' (SEQ ID NO: 23)

La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto Arg (A0), Arg (A1), His (A8), Gly (A21), Arg (B30)-NH₂-insulina humana. El compuesto se obtiene, inicialmente, preparando el producto intermedio Arg (A0), Arg (A1), His (A8), Gly (A21), de la Thr (B30)-insulina humana mediante reacción con lisil endopeptidasa C, y el producto intermedio se convierte luego, mediante amidación con argininamida, en el compuesto deseado.

20

La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto Arg (A0), Arg (A1), His (A8), Gly (A21), Lys (B30)-NH₂-insulina humana, y que resulta después de la amidación con lisinamida.

Resulta claro para el experto que aminoácidos cargados negativamente se pueden introducir en la secuencia de preproinsulina de acuerdo con el Ejemplo 12. También es posible, en analogía al Ejemplo 13, preparar a partir del plásmido pINT3702 un plásmido que codifica una secuencia de proinsulina que permite la preparación de derivados de insulina que portan una arginina como aminoácido N-terminal en la posición 1 de la cadena A.

30

Ejemplo 14: Expresión de los derivados de proinsulina

La expresión se lleva a cabo de acuerdo con el ejemplo 1 de la solicitud de patente europea EP-A 1 222 207.

35

Ejemplo 15: Plegamiento de los derivados de proinsulina

El plegamiento tiene lugar, en principio, por el método descrito en el documento EP-A 0 668 282.

Ejemplo 16: Tratamiento de las proinsulinas de los Ejemplos 2-8 con tripsina

5 La preproinsulina plegada se trata enzimáticamente para dar el precursor Arg(A0) – insulina de dos cadenas, cuyo extremo C-terminal de la cadena B se caracteriza por lisina o arginina. El tratamiento enzimático del precursor de preproinsulina plegado tiene lugar según se describe, por ejemplo, en el ejemplo 4 del documento WO91/03550. Demuestra ser particularmente ventajoso en este
10 caso emplear la variante de tripsina descrita en el documento WO 2007/031187 A1.

Ejemplo 17: Tratamiento de las proinsulinas de los Ejemplos 9-13 con endoproteinasa Lys-C

15 La endoproteasa Lys-C de *Achromobacter lyticus* está comercialmente disponible (Merck/Calbiochem). La reacción se lleva a cabo con una ligera modificación según se describe por Jekel, P.A. et al. [Anal. Biochem. 134, 347-354, (1983)]. Se ajusta un pH de 9,5, y la temperatura de la reacción es 30°C.
20 En la reacción en un solo recipiente, se elimina la presecuencia y se escinde el péptido C partiendo con Thr (B30), de manera que se forma el extremo C-terminal de la cadena B por parte de lisina, que está presente como sitio reactivo para la reacción de acoplamiento catalizada por enzimas.

25 Ejemplo 18: Preparación del compuesto Arg-NH₂ o Lys-NH₂ insulina a partir del precursor de dos cadenas mediante acoplamiento con argininamida o lisinamida

 Independientemente del posicionamiento de los aminoácidos de carácter ácido adicionales, se lleva a cabo una reacción estándar como sigue: Se
30 disuelven 100 mg de análogo de Arg (A0), Gly (A21), Arg (B31) – insulina en 0,95 ml de solución de argininamida (446 g/L) y 0,13 mL de tampón de acetato de Na M (pH 5,8) y se añaden 2 ml de DMF. La mezcla de reacción se enfría a 12°C y se inicia añadiendo 0,094 ml de tripsina (0,075 mg, Roche Diagnostics). Después de 8 h, la reacción se detiene añadiendo TFA a pH 2,5 y se analiza por HPLC. Se
35 produce la formación de >60% de un análogo de Arg (A0), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – insulina. La adición de solución de inhibidor de tripsina va

seguida por la purificación del análogo amidado en analogía con el documento US 5.656.722.

La preparación del correspondiente compuesto de lisinamida tiene lugar de manera análoga. Sin embargo, una solución madre acuosa de lisinamida que
5 contiene 366 g/L de lisinamida en solución forma el material de partida.

Ejemplo 19: Preparación semisintética de Lys (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – insulín-amida

10 El compuesto YKL202-8 descrito en el Ejemplo 11, el cual corresponde a un derivado de insulina de la estructura Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B30)-insulín-amida sirve como material de partida para preparar el compuesto YKL202-11, Lys (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B30)-insulín-amida. 200 mg del compuesto se disuelven en 40 ml de una mezcla de Na₂ HPO₄ /
15 CH₃CN (50:50) 100 mM y se ajusta un pH de 7,7-8,2. Como material adicional, se prepara un éster Boc-Lys (Boc)-NHS, mezclando 0,3 mM de Boc-Lys(Boc)-OH, 0,4 mM de N-hidroxisuccinimida (NHS) y 0,4 mM de diciclohexilcarbodiimida (DCC) en diclorometano durante 40 minutos. La mezcla de reacción se concentra a sequedad en un evaporador rotatorio al vacío. La mezcla se recoge luego en
20 5 ml de metanol y se añade a la insulina inicial disuelta. La reacción se agita a la temperatura ambiente durante al menos 60, pero a lo sumo 120 minutos. La reacción se detiene añadiendo 200 µl de TFA. La masa de los productos de la reacción se caracteriza mediante espectrometría de masas LC-MS con el fin de demostrar que está presente producto monoacilado que consiste en tres
25 componentes. Los componentes se separan mediante HPLC. Durante esto, también se separan subproductos diacilados y triacilados. Las fracciones procedentes de la separación por HPLC se analizan mediante espectroscopía de masas. Las 3 fracciones, cada una de las cuales contiene producto monoacilado, se someten a un análisis de la secuencia de aminoácidos, cuya interpretación permite la identificación de la fracción de HPLC que contiene el compuesto
30 deseado, de la cual se separan subsiguientemente mediante hidrólisis los grupos protectores de Boc. Después de una purificación renovada por HPLC, el producto deseado se testa en cuanto a sus propiedades biológicas.

35 Ejemplo 20: Preparación del plásmido pINT358_ha8 que codifica His (A8), Gly (A21) proinsulina.

Siguiendo el esquema de preparación del Ejemplo 2 y utilizando ADN del plásmido pINT358d como molde para la PCR1 y la PCR2 resulta el plásmido pINT358_ha8 que codifica His (A8), Gly (A21) proinsulina. La proinsulina
5 codificada por el plásmido sirve como precursor del compuesto de la forma His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂-insulina humana. El tratamiento de la preproinsulina para dar His (A8), Gly (A21), Arg (B31) como producto intermedio antes de la amidación tiene lugar según se describe en el documento WO91/03550 en este caso. En este caso se emplea tripsina convencional.

10

Ejemplo 21: Formulación de los derivados de insulina amidada

Con el fin de testar los derivados de insulina de la invención en cuanto a sus propiedades biofarmacológicas y físico-químicas, se preparó una solución de
15 los compuestos como sigue: el derivado de insulina de la invención se disolvió con una concentración diana de $240 \pm 5 \mu\text{M}$ en ácido clorhídrico 1 mM con 80 $\mu\text{g/mL}$ de zinc (en forma de cloruro de zinc). Para este fin, se pesó inicialmente una cantidad del material liofilizado que es aproximadamente 30% mayor que la requerida sobre la base del peso molecular y la concentración deseada. La
20 concentración presente se determinó luego mediante HPLC analítica y, subsiguientemente, la solución se completó hasta el volumen necesario para lograr la concentración diana con ácido clorhídrico 5 mM con 80 $\mu\text{g/mL}$ de zinc. Si es necesario, el pH se reajustó a $3,5 \pm 0,1$. Después del análisis final mediante HPLC para verificar la concentración diana de $240 \pm 5 \mu\text{M}$, la solución acabada se
25 transfirió por medio de una jeringa con un accesorio de filtro de 0,2 μm a un vial estéril el cual se cerró con un tabique y un tapón ondulado. No se llevó a cabo optimización alguna de las formulaciones, p. ej. en relación con la adición de agentes isotónicos, conservantes o sustancias tampón para el ensayo sencillo a corto plazo de los derivados de insulina de la invención.

30

Ejemplo 22: Preparación de His (A8), Gly (A21), Arg(B31) insulina humana mediante expresión de levaduras

El documento EP-A 1 364 032 describe la expresión y secreción de una
35 proteína de fusión de hirudina y miniproinsulina mediante levaduras. Organismos de levaduras hospedantes que se mencionan como particularmente ventajosos a

este respecto son *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *H. polymorpha* y *P. pastoris*. El Ejemplo 4 de dicha solicitud de patente describe la construcción de un plásmido que permite la preparación de la proteína de fusión en *P. pastoris*, y cuyo ADN sirve como molde para preparar una miniproinsulina, cuya secuencia de aminoácidos en las posiciones A8, A15, A18 y A21 en la cadena A se caracteriza por los aminoácidos histidina (A8), ácido glutámico (A15), ácido aspártico (A18) y glicina (A21). Se utiliza el cebador *pichia_H_if1*. Los siguientes cebadores se sintetizan de nuevo y se purifican después de la síntesis:

10 *pichia_G21_rev*

5'-TTTTTTGGCG CCGAATTCAC TATTAGCCAC AGTAGTTTTC CAGCTGGTA-
3' (SEQ ID NO: 24)

El codón resaltado mediante negrillas marca las posiciones A21.

15

pichia_H8_f con la secuencia

5'-GAACAATGTTGT**C**ATAGTATCTGTTCTTTGTACCAGCTGGAAA**A**CTACTG-3'
(SEQ ID NO: 25)

20

El codón resaltado mediante negrillas marca las posiciones A8.

pichia-a1-12rev

25 5'- GAACAGATACTATGACAACATTGTTCAACGATACC -3' (SEQ ID NO: 26)

El codón resaltado mediante negrillas marca las posiciones A8.

Cantidades equimolares (1 µg) del cebador *pichia_G21_rev* y del cebador *pichia_H8f*, que se solapan parcialmente, se desnaturalizan a 95°C en presencia de una polimerasa termofílica y tampón polimerasa que contiene los 4 desoxinucleótidos dATP, dCTP, dGTP y dTTP 5', y después se incuba a 56°C durante 10-15 minutos. El volumen de esta reacción 1 es 25 µl. En una reacción en cadena de la polimerasa estándar (reacción 2), los cebadores *pichia_H_if1* y *pichia-a1-12rev* se hacen reaccionar en paralelo con el ADN molde descrito. En una reacción en cadena de la polimerasa adicional, los productos de las reacciones 1 y 2 se hacen reaccionar como molde con los cebadores *pichia_H_if1*

/ pichia_G21rev. El producto de esta reacción se purifica mediante electroforesis en gel. Después de la reacción con las enzimas de restricción XhoI y SacII, el fragmento de ADN, que cubre el producto de fusión, se inserta en el vector pPICZαA descrito, en analogía al Ejemplo 4. El resultado es el plásmido pPIC_ins202. La proteína de fusión codificada por el plásmido se expresa utilizando el kit de expresión comercialmente disponible descrito. La preparación del precursor His (A8), Gly (A21), Arg (B31)-insulina humana es seguida por el acoplamiento de argininamida de acuerdo con la descripción sobre arginina (B31). El resultado es el compuesto His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂-insulina (YKL203) el cual, por sí mismo, representa una nueva insulina lenta correspondiente al Ejemplo 20 y se testa en el experimento con ratas. El acoplamiento con lisinamida conduce análogamente al compuesto YKL203b el cual se caracteriza como His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂-insulina.

Sin embargo, el compuesto también puede servir como producto intermedio para preparar el compuesto Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B31) Arg(B32)-NH₂-insulina, cuya preparación se basa en Kohn et al. [Peptides 28 (2007) 935-948]. Para este fin, 200 mg del compuesto His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32)-NH₂-insulina humana se disuelven en 40 ml de una mezcla de Na₂HPO₄ / CH₃CN (50:50) 100 mM y se ajusta un pH de 7,7-8,2.

Como material adicional, se prepara un éster Boc-Arg-NHS, mezclando 0,3 mM de Boc-Arg-OH, 0,4 mM de N-hidroxisuccinimida (NHS) y 0,4 mM de diciclohexilcarbodiimida (DCC) en diclorometano durante 40 minutos. La mezcla de reacción se concentra a sequedad en un evaporador rotatorio al vacío. La mezcla se recoge luego en 5 ml de metanol y se añade a la insulina inicial disuelta. La reacción se agita a la temperatura ambiente durante al menos 60, pero a lo sumo 120 minutos. La reacción se detiene añadiendo 200 µl de TFA. La masa de los productos de la reacción se caracteriza mediante espectrometría de masas LC-MS con el fin de demostrar que está presente producto monoacilado que consiste en tres componentes. Los componentes se separan mediante HPLC. Durante esto, también se separan subproductos diacilados y triacilados. Las fracciones procedentes de la separación por HPLC se analizan mediante espectroscopía de masas. Las tres fracciones, cada una de las cuales contiene producto monoacilado, se someten a un análisis de la secuencia de aminoácidos, cuya interpretación permite la identificación de la fracción de HPLC que contiene el compuesto deseado, de la cual se separan subsiguientemente mediante hidrólisis suave los grupos protectores de Boc. Después de una purificación

renovada por HPLC, el producto deseado se testa en cuanto a sus propiedades biológicas.

5 Ejemplo 23: Evaluación del efecto reductor de glucosa en sangre de nuevos análogos de insulina en ratas

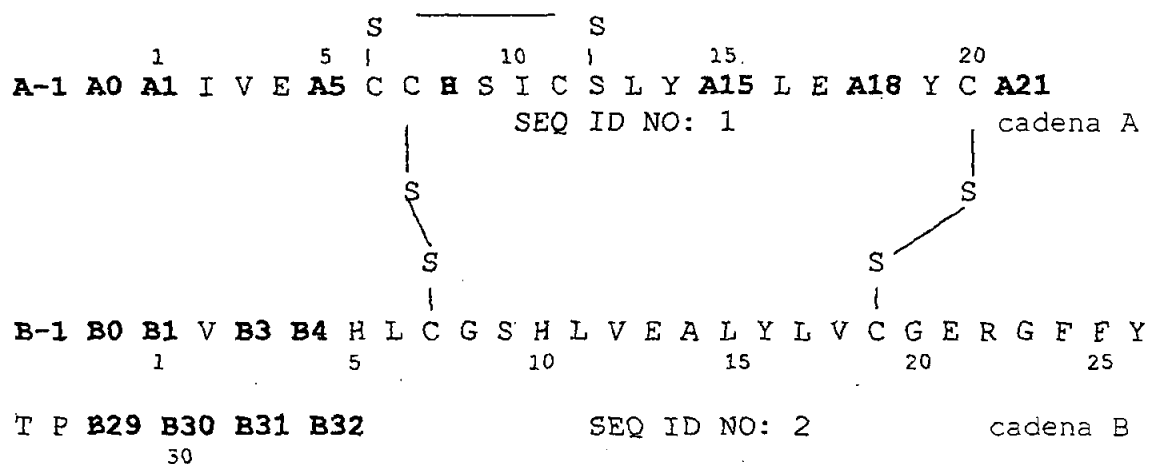
El efecto reductor de glucosa en sangre de nuevos análogos de insulina seleccionados se testa en ratas Wistar machos sanas glucémicas normales. Ratas machos reciben una inyección subcutánea de una dosis de 9 nmol/kg de un análogo de insulina. Se recogen muestras de sangre de los animales, inmediatamente antes de la inyección del análogo de insulina y a intervalos regulares de hasta ocho horas después de la inyección, y se determina en ellas el contenido de glucosa en sangre. El experimento muestra claramente (véase la fig. 1) que el análogo de insulina de la invención empleado conduce a una aparición claramente retardada de la acción y a una duración de la acción uniforme y mayor.

20 Ejemplo 24: Evaluación del efecto reductor de glucosa en sangre de nuevos análogos de insulina en perros

El efecto reductor de glucosa en sangre de nuevos análogos de insulina seleccionados se testa en perros Beagle machos sanos normoglucémicos. Animales machos reciben una inyección subcutánea de una dosis de 6 nmol/kg de un análogo de insulina. Se recogen muestras de sangre de los animales, inmediatamente antes de la inyección del análogo de insulina y a intervalos regulares de hasta 48 horas después de la inyección, y se determina en ellas el contenido de glucosa en sangre. El experimento muestra claramente que el análogo de insulina de la invención empleado conduce a una aparición plana claramente retardada de la acción y a una duración de la acción uniforme y mayor.

REIVINDICACIONES:

1. Un análogo de insulina de la fórmula I



5

en que

- A-1 corresponde a Lys, Arg o un grupo amino;
- A0 corresponde a Lys, Arg o un enlace químico;
- A1 corresponde a Arg o Gly;
- 10 A5 corresponde a Asp, Glu o Gln;
- A15 corresponde a Asp, Glu o Gln;
- A18 corresponde a Asp, Glu o Asn;
- A21 corresponde a Ala, Ser, Thr o Gly;
- B-1 corresponde a Asp, Glu o un grupo amino;
- 15 B0 corresponde a Asp, Glu o un enlace químico;
- B1 corresponde a Asp, Glu, Phe o un enlace químico;
- B3 corresponde a Asp, Glu o Asn;
- B4 corresponde a Asp, Glu o Gln;
- B29 corresponde a Arg, Lys o un aminoácido seleccionado del grupo que
- 20 comprende los aminoácidos Phe, Ala, Thr, Ser, Val, Leu, Glu o Asp, o un enlace químico;
- B30 corresponde a Thr o un enlace químico;
- B31 corresponde a Arg, Lys o un enlace químico;
- B32 corresponde a Arg-amida o Lys-amida,
- 25 en que no más de un residuo aminoácido del grupo que comprende A5, A15, A18, B-1, B0, B1, B2, B3 y B4 corresponde, simultánea e independientemente uno de otro, a Asp o Glu.

2. El análogo de insulina según la reivindicación 1, en que A-1 corresponde a Arg.
3. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que A0 corresponde a Arg.
- 5
4. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que A5 corresponde a Glu.
5. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que A15 corresponde a Glu.
- 10
6. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que A18 corresponde a Asp.
7. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que A8 corresponde a His.
- 15
8. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que A21 corresponde a Gly.
- 20
9. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que B0 corresponde a Glu.
10. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que B3 corresponde a Asp.
- 25
11. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que B4 corresponde a Glu.
12. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que B30 corresponde a Arg.
- 30
13. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que B30 corresponde a Lys.
- 35
14. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones 1 a 13,

seleccionado de un grupo que comprende:

- Arg (A-1), Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ insulina humana,
- 5 Arg (A-1), Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Lys (B30) – NH₂ insulina humana,
- Arg (A-1), Arg (A0), Glu (A15), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ insulina humana,
- Arg (A-1), Arg (A0), Glu (A15), His (A8), Gly (A21), Lys (B30) – NH₂ insulina humana,
- 10 Arg (A-1), Arg (A0), Asp (A18), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ insulina humana,
- Arg (A-1), Arg (A0), Asp (A18), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ insulina humana,
- 15 Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B30) – NH₂ insulina humana,
- Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Lys (B30) – NH₂ insulina humana,
- Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B30) – NH₂ insulina humana,
- 20 Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Lys (B30) – NH₂ insulina humana,
- Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B30) – NH₂ insulina humana,
- 25 Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Lys (B30) – NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – insulina humana,
- Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – insulina humana,
- 30 Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – insulina humana,
- Arg (A0), Asp (A18), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – insulina humana,
- 35 Arg (A0), Asp (A18), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – insulina humana,

- Arg (A0), Glu (A15), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – insulina humana,
- Arg (A0), Glu (A15), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – insulina humana,
- 5 Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – insulina humana,
- 10 Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – insulina humana,
- 15 Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ – insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Lys (B30) – NH₂ – insulina humana,
- Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ – insulina humana,
- 20 Arg (A-1), Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Lys (B30) – NH₂ – insulina humana,
- Arg (A0), Arg (A1), His (A8), Gly (A21), Arg (B30) – NH₂ – insulina humana,
- Arg (A0), Arg (A1), His (A8), Gly (A21), Lys (B30) – NH₂ – insulina humana,
- His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – insulina humana,
- 25 15. Un procedimiento para preparar un análogo de insulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
16. El procedimiento según la reivindicación 15, en el que un precursor del análogo de insulina se prepara de forma recombinante, el precursor se trata
- 30 enzimáticamente para dar insulina de dós cadenas, y se lleva a cabo un acoplamiento con argininamida en presencia de una enzima con actividad de tripsina, y el análogo de insulina se aísla.
17. El uso de un análogo de insulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a
- 35 14, para la fabricación de un medicamento para tratar diabetes mellitus.

18. El uso según la reivindicación 17 en un procedimiento para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de diabetes mellitus de tipo I o tipo II, para la regeneración de cartilago o para asistir a la regeneración de células beta.

5 19. Un producto farmacéutico que comprende un análogo de insulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

20. Una formulación del análogo de insulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en que la formulación está en una forma acuosa que
10 comprende el análogo de insulina disuelto.

21. Una formulación del análogo de insulina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en que la formulación está en forma de un polvo.

15 22. La formulación según la reivindicación 21, en que el análogo de insulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 está presente en forma cristalina y/o amorfa.

23. Una formulación del análogo de insulina según cualquiera de las
20 reivindicaciones 1 a 14, en que la formulación está en forma de una suspensión.

24. Una formulación del análogo de insulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en que la formulación comprende, adicionalmente, una chaperona química.

25

25. ADN que codifica un precursor de un análogo de insulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

26. ADN que codifica la cadena A de un análogo de insulina según cualquiera de
30 las reivindicaciones 1 a 14.

27. ADN que codifica la cadena B de un análogo de insulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

35 28. Un vector que comprende un ADN según una o más de las reivindicaciones 25 a 27.

29. Un organismo hospedante que comprende un ADN según una o más de las reivindicaciones 25 a 27.
- 5 29. Un organismo hospedante que comprende un ADN según una o más de las reivindicaciones 25 a 27 o un vector según la reivindicación 28.
30. Un análogo de preproinsulina, en donde el péptido C porta el residuo aminoácido arginina en su extremo N y su extremo C se caracteriza por la forma
- 10 Arg Arg, Arg Lys o Lys Arg Arg.
31. La formulación según una o más de las reivindicaciones 20 a 24, que comprende, adicionalmente, un péptido similar al glucagón-1 (GLP1) o un análogo o un derivado del mismo, o exendina-3 ó -4 o un análogo o derivado del mismo.
- 15 32. La formulación según la reivindicación 31, que comprende, adicionalmente, exendina-4.
33. La formulación según la reivindicación 31, en donde un análogo de exendina-4
- 20 se selecciona de un grupo que comprende
H-desPro³⁶-exendina-4-Lys₆-NH₂,
H-des(Pro^{36,37})-exendina-4-Lys₄-NH₂ y
H-des(Pro^{36,37})-exendina-4-Lys₅-NH₂,
o una sal farmacológicamente tolerable de los mismos.
- 25 34. La formulación según la reivindicación 31, en donde un análogo de exendina-4 se selecciona de un grupo que comprende
desPro³⁶[Asp²⁸]exendina-4 (1-39),
desPro³⁶[IsoAsp²⁸]exendina-4 (1-39),
30 desPro³⁶[Met(O)¹⁴, Asp²⁸]exendina-4 (1-39),
desPro³⁶[Met(O)¹⁴, IsoAsp²⁸]exendina-4 (1-39),
desPro³⁶[Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-2 (1-39),
desPro³⁶[Trp(O₂)²⁵, IsoAsp²⁸]exendina-2 (1-39),
desPro³⁶[Met(O)¹⁴Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4 (1-39) y
35 desPro³⁶[Met(O)¹⁴Trp(O₂)²⁵, IsoAsp²⁸]exendina-4 (1-39)
o una sal farmacológicamente tolerable de los mismos.

35. La formulación según la reivindicación 31, en que el péptido -Lys₆-NH₂ está fijado a los extremos C de los análogos de exendina-4.

- 5 36. La formulación según la reivindicación 31, en donde un análogo de exendina-4 se selecciona de un grupo que comprende
- H-(Lys)₆- des Pro³⁶ [Asp²⁸]exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂
des Asp²⁸Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ exendina-4(1-39) -NH₂,
H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]exendina-4(1-39)-NH₂,
- 10 H-Asn-(Glu)₅ des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]exendina-4(1-39)-NH₂,
des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
- 15 H-(Lys)₆- des Pro³⁶ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂,
H-des Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵] exendina-4(1-39)-NH₂,
H-(Lys)₆-des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-NH₂,
H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-NH₂,
des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
- 20 H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-
NH₂,
H-(Lys)₆- des Pro³⁶ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂,
des Met(O)¹⁴ Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ exendina-4(1-39)-NH₂,
- 25 H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-NH₂,
H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-NH₂,
des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂,
H-Asn-(Glu)₅ des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-
- 30 NH₂,
- H-(Lys)₆- des Pro³⁶ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂,
des Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵]exendina-4(1-39)-NH₂,
H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-NH₂,
- 35 H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-NH₂,
des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,

H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-
(Lys)₆-NH₂,

H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-
(Lys)₆-NH₂,

- 5 o una sal farmacológicamente tolerable de los mismos.

37. La formulación según la reivindicación 31, que adicionalmente comprende
Arg³⁴, Lys²⁶ (N^ε(γ-glutamil(N^α-hexadecanoil))) GLP-1 (7-37) [liraglutida].

Resumen

NUEVOS DERIVADOS DE INSULINA CON PERFIL TIEMPO/ACCIÓN
EXTREMADAMENTE RETARDADO

5

La invención se refiere a nuevos análogos de insulina con perfil basal de tiempo/acción, que se caracterizan por la adición y/o sustitución de residuos aminoácidos cargados negativa y positivamente, y una amidación del grupo carboxi C-terminal de la cadena B e histidina en la posición 8 de la cadena A de la

10

insulina, a su preparación y uso.

Figura 1

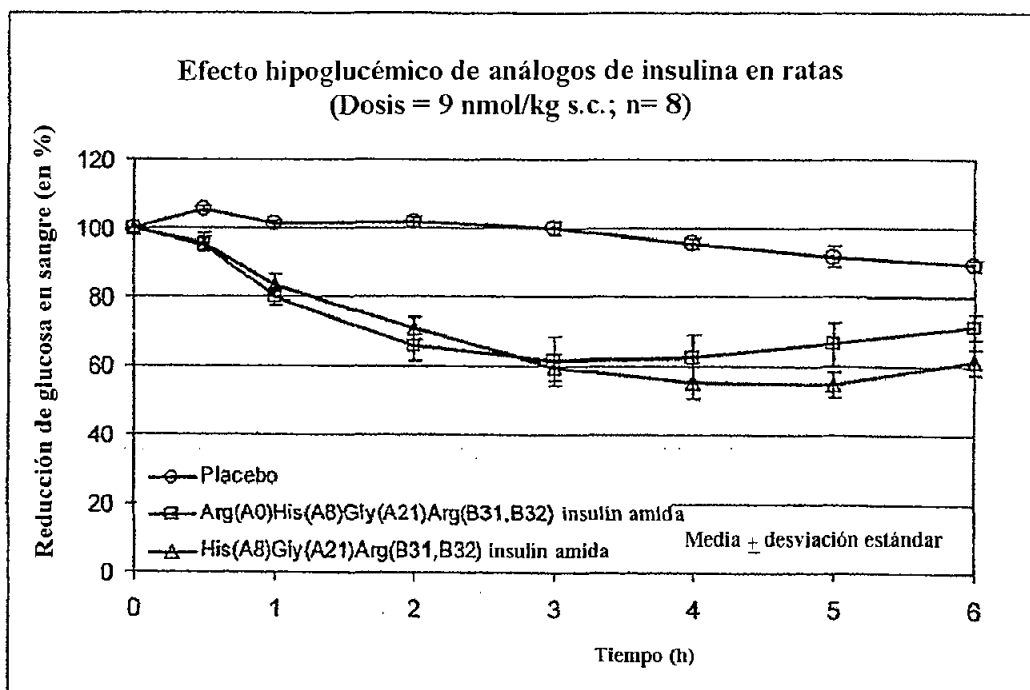
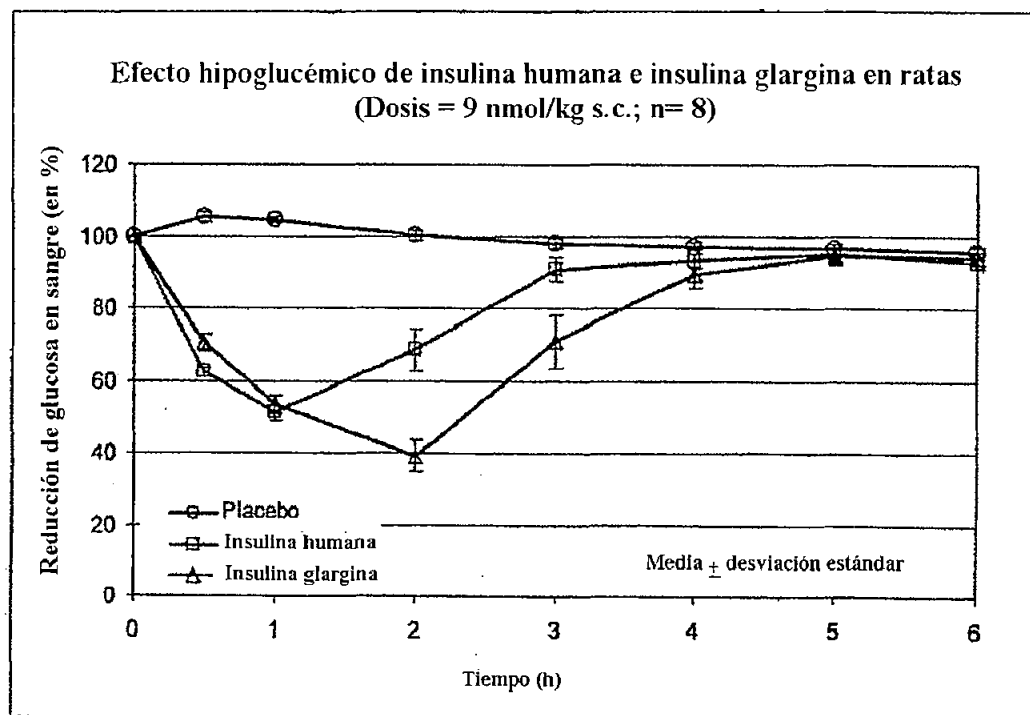


Figura 2





Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

00 115

PATENTE DE INVENCION ____ PCT X MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional:

(71) Solicitante(s) **SANOI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH**

(72) Inventor(es) **PAUL HABERMANN, GERHARD SEIPKE, ROLAND KURRLE, GÜNTER MÜLLER, MARK SOMMERFELD, NORBERT TENNAGELS, GEORG TSCHANK, ULRICH WERNER**

(74) Apoderado: **DR. LUIS PATIÑO LEYVA**

(30) Prioridad	(31)	N° Prioridad	(32)	Fecha	(33)	Pais
		10 2008 003 566.1		09/01/2008		DE
		61/044.662		14/04/2008		US
		10 2008 025 007.4		24/05/2008		DE

(86) Fecha inicio fase nacional:

Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha de presentación de la solicitud: **06/01/2009**

N° de solicitud **PCT/EP2009/000018**

(87) Publicación internacional

Fecha: **16/07/2009**

N° publicación: **WO 2009/087082 A2**

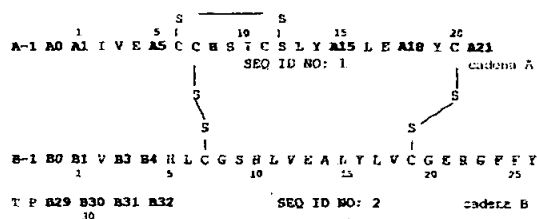
(54) Título: **NUEVOS DERIVADOS DE INSULINA CON PERFIL TIEMPO/ACCION EXTREMADAMENTE RETARDADO**

21) N° de solicitud:	(51) int. Cl.:
2) Fecha de solicitud:	(71) Solicitante(s) SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH
(30) Prioridad (31) N° Prioridad (32) Fecha (33) Pais	(72) Inventor(es) PAUL HABERMANN GERHARD SEIPKE ROLAND KURRLE Y OTROS
10 2008 003 566.1 09/01/2008 DE	(74) Apoderado: DR. LUIS PATIÑO LEYVA
61/044.662 14/04/2008 US	
10 2008 025 007.4 24/05/2008 DE	
85) Fecha limite inicio fase nacional:	(87) Publicación internacional
86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT	Fecha: 16/07/2009
Fecha de presentación de la solicitud: 06/01/2009	N° publicación: WO 2009/087082 A2
N° de solicitud PCT/EP2009/000018	

54) Titulo: **NUEVOS DERIVADOS DE INSULINA CON PERFIL TIEMPO/ACCION EXTREMADAMENTE RETARDADO**

Reivindicación(es):

1. Un análogo de insulina de la fórmula I



en que

- A-1 corresponde a Lys, Arg o un grupo amino;
 - A0 corresponde a Lys, Arg o un enlace químico;
 - A1 corresponde a Arg o Gly;
 - A5 corresponde a Asp, Glu o Gln;
 - A15 corresponde a Asp, Glu o Gln;
 - A18 corresponde a Asp, Glu o Asn;
 - A21 corresponde a Ala, Ser, Thr o Gly;
 - B-1 corresponde a Asp, Glu o un grupo amino;
 - B0 corresponde a Asp, Glu o un enlace químico;
 - B1 corresponde a Asp, Glu, Phe o un enlace químico;
 - B3 corresponde a Asp, Glu o Asn;
 - B4 corresponde a Asp, Glu o Gln;
 - B29 corresponde a Arg, Lys o un aminoácido seleccionado del grupo que comprende los aminoácidos Phe, Ala, Thr, Ser, Val, Leu, Glu o Asp, o un enlace químico;
 - B30 corresponde a Thr o un enlace químico;
 - B31 corresponde a Arg, Lys o un enlace químico;
 - B32 corresponde a Arg-amida o Lys-amida,
- en que no más de un residuo aminoácido del grupo que comprende A5, A15, A18, B-1, B0, B1, B2, B3 y B4 corresponde, simultánea e independientemente uno de otro, a Asp o Glu.

2. El análogo de insulina según la reivindicación 1, en que A-1 corresponde a Arg.

3. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que A0 corresponde a Arg.

4. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que A5 corresponde a Glu.

5. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que A15 corresponde a Glu.

6. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que A18 corresponde a Asp.

7. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que A8 corresponde a His.

8. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que A21 corresponde a Gly.

9. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que B0 corresponde a Glu.

10. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que B3 corresponde a Asp.

11. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que B4 corresponde a Glu.

12. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que B30 corresponde a Arg.

13. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que B30 corresponde a Lys.

14. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones 1 a 13, seleccionado de un grupo que comprende:



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-076884- -00000-0000

Fecha: 2010-06-25 13:49:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 116

PATENTE DE INVENCION

☐

MODELO DE UTILIDAD

☐

Art. 33 Decisión 486/00

☐

Indicación que se solicita una patente

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Descripción de la invención

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa

☐

Incompleta

☐

PATENTE DE INVENCION PCT

☒

MODELO DE UTILIDAD PCT

☐

Art. 33 Decisión 486/00
Circular Única

☒

Indicación que se solicita una PCT

☒

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☒

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☒

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa

☒

Incompleta

☐

DISEÑO INDUSTRIAL

☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita diseño industrial

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa

☐

Incompleta

☐

ESQUEMA DE TRAZADO

☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica de un esquema de trazado

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa

☐

Incompleta

☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
PATIÑO LEYVA LUIS
Apoderado(a) y/o Representante de
SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH

REFERENCIA	Radicación No.	10 076884
	Solicitud internacional	PCT/EP2009/000018
	Fecha inicio fase nacional	09/08/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	<u>NO 11193</u>

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. El solicitante debe presentar un nuevo título que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el título relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9)
2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continúa en la página siguiente...



Continuación radicado No: 10 076884



Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

03 SET. 2010

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____
adpa11