



PCT

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA
República de Colombia
Ministerio de Comercio, Industria y Turismo

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

Organización y
Digitalización CSA Ltda

SOLICITUD DE

SUPERINTENDENCIA INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

PATENTE DE INVENCION
PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

10-79133

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., 30 JUN. 2010

man, c
04-08-2010



PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-079133- -00000-0000

Fecha: 2010-06-30 15:23:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASOR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 111

ación

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTES
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

①

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☒ Capítulo I☐ Capítulo II

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND
GMBHDirección: Brünningstrasse 50
D-65929 Frankfurt am Main
ALEMANIANacionalidad o Domicilio: Frankfurt am Main
ALEMANIA

Lugar de Constitución: ALEMANIA

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: DR. LUIS PATIÑO LEYVA

Dirección: CALLE 94A No. 7A-09

Teléfono: 7560770 Fax: 7550158

E-mail: info@castellanosyco.com

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

2.930.616 TPA

2.698

④

INVENTOR (ES) (72)

VER ANEXO No. 1

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No.

PCT/EP2009/000017

Fecha

06/01/2009

Publicación Internacional No.

WO 2009/087081 A2

Fecha

16/07/2009

⑥

Título (54)

NUEVOS DERIVADOS DE INSULINA CON PERFIL TIEMPO/ACCION EXTREMADA-
MENTE RETARDADO ANALOGOS DE INSULINA EN LOS CUALES EL EXTREMO DE LACADENA B CONSISTE EN UN RESIDUO AMINOACIDO, EL RESIDUO DE AMINOACIDO N-TERMINAL DE LA CADENA
A DE LA INSULINA ES UN RESIDUO LISINA O ARGININA, LA POSICION A8 DEL AMINOACIDO ESTA
OCUPADA POR UN RESIDUO HISTIDINA Y SE EFECTUAN UNA O MAS SUSTITUCIONES Y/O ADICIONES DE

⑦

Clasificación Internacional (51)

C07K 14/62

RESIDUOS LA POSICION A21 DEL AMINOACIDO ESTA
OCUPADA POR UN RESIDUO GLICINA Y SE EFECTUAN UNA O MAS SUSTITUCIONES Y/O ADICIONES

⑧

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒NO ☐

DE

09/01/2008

10 2008 003 568,8

US

14/04/2008

61/044,659

DE

24/05/2008

10 2008 025 008,2

⑨

Comprobantes de pago Nos.

10-52,813 y 10-52,815

Fecha

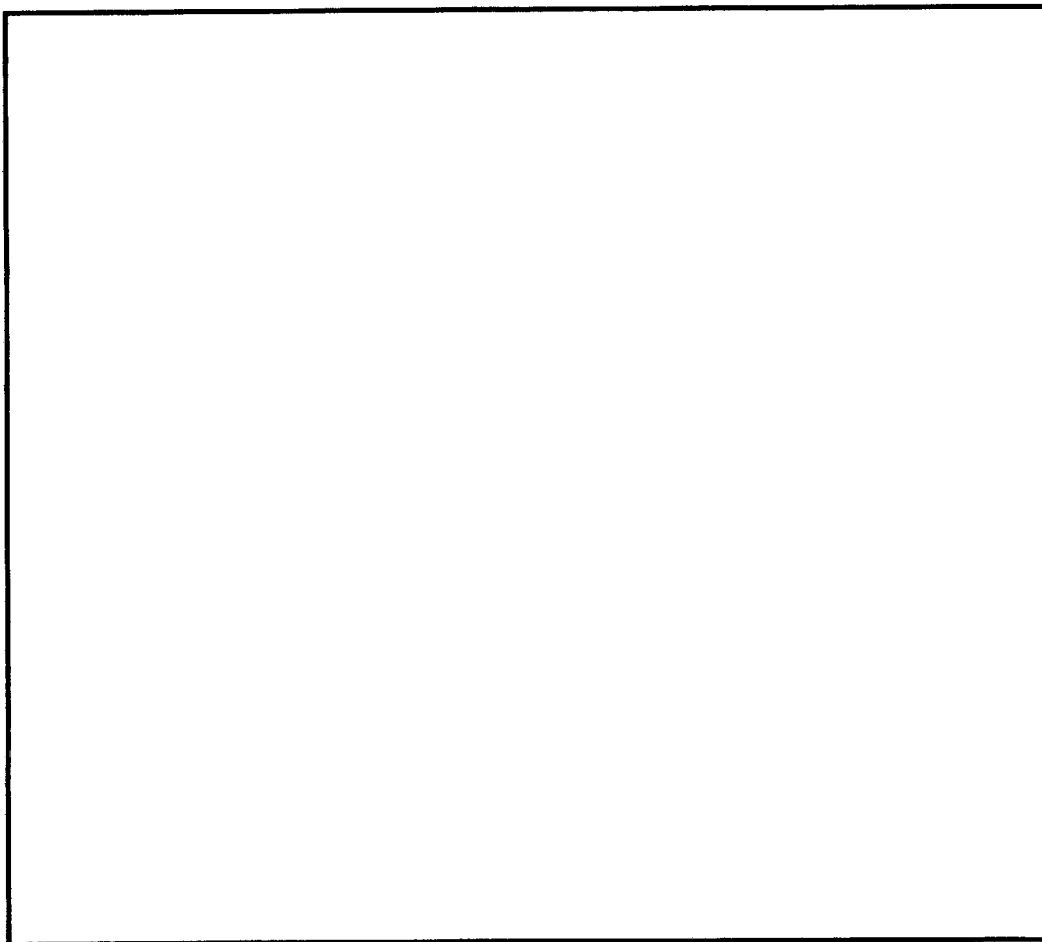
Junio 29 de 2010

→ SIGUE NUEVO TITULO → ... DE RESIDUOS AMINOACIDOS NEGATIVAMENTE CARGADOS
EN LAS POSICIONES A5, A15, A18, B-1, B0, B1, B2, B3 y B4

10 Anexos

- ☒ 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,

30 JUN. 2010

NOMBRE:

LOIS PATIÑO LEYVA

FIRMA:

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

CASTELLANOS & CO LTDA

ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A-09
Bogotá, D.C. - COLOMBIA

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 : 800176089-7

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 52,813
FECHA : JUNIO 29 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-079133- -00000-0000

Fecha: 2010-06-30 15:23:19 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Fojos. 111

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANDS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	46704335	29/06/2010	12,121,000.00

***** 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

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 52,815

FECHA : JUNIO 29 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-079133- -00000-0000

Fecha: 2010-06-30 15:23:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 111

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	46704335	29/06/2010	12,121,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS
			TOTAL : \$ 832,000.00

SON: OCHOCIENTOS TREINTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

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:

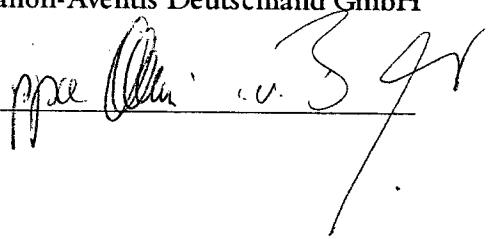
1) To apply to the administrative, judicial and police authorities of the Republic of Colombia, in any instance or appeal, for obtaining registration of patents, utility models, industrial models, as well as their assignments, extensions and changes of name; 2) To prepare, apply for, obtain, execute 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: 

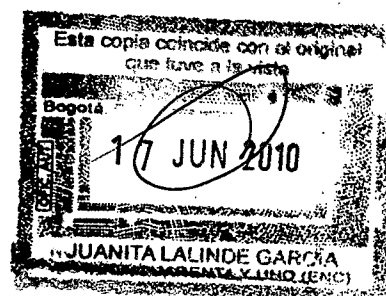
Yo (nosotros), obrando en nombre propio y representación de, con domicilio en, nombro(amos) a **LUIS PATIÑO LEYVA** y/o **GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO**, con domicilio en Bogotá D.C., República de Colombia, Cra 11ª No 94-76, Oficina 308, apoderado verdadero y legal, con poder especial, amplio y suficiente:

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,

worden 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



Kostenrechnung :

Wert : 10.000,-- EUR
Gebühr §§ 141, 32, 45 Kost.O.
Gebühr § 150 Kost.O.
Steuer 16 %

13,50 EUR
13,-- EUR
4,24 EUR
30,74 EUR
=====



Notar



APOSTILLE

(Convention de la Haye du 5 octobre 1961)

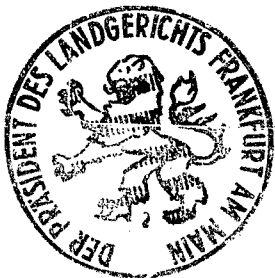
1. Land: Bundesrepublik Deutschland
Diese öffentliche Urkunde
2. ist unterschrieben von Friedrich
3. in seiner Eigenschaft als amtlich bestellter Notar
4. sie ist versehen mit dem Siegel/Stempel des(der)
Notars

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

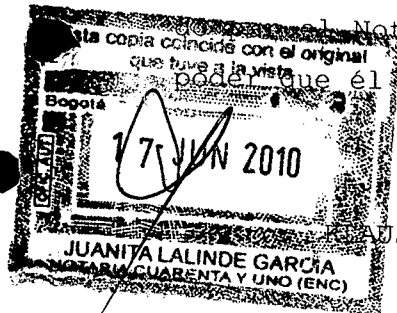
1. Apoderado Dr. Elmar-Michael Wein, domicilio Niedernhausen,
2. Apoderado Dieter Breuer, domicilio Frankfurt,

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 revisada 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)

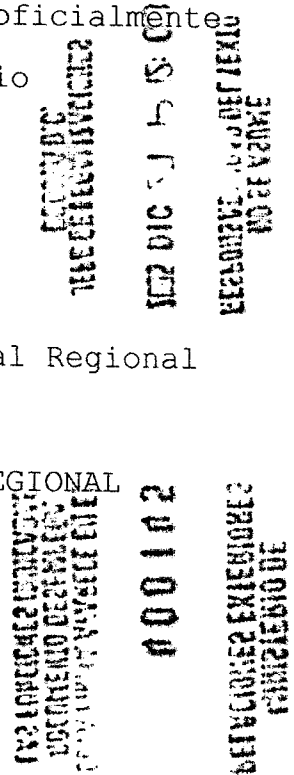
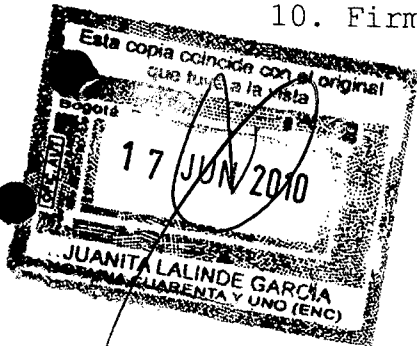
APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: República Federal de Alemania
Este documento público
2. Ha sido firmado por: Friedrich
3. En su calidad de: Notario nombrado oficialmente
4. Y lleva el sello oficial del: Notario

Confirmado

5. En: Frankfurt am Main
6. El día: 05.12.05
7. Por: El Señor Presidente del Tribunal Regional
8. Bajo el No.: 91 Ea A 9637
9. Sello: EL PRESIDENTE DEL TRIBUNAL REGIONAL
EN FRANKFURT AM MAIN
10. Firma: Por encargo: Simon



ADOLF WATZKE
Traductor Oficial
Res. 2433 Minjusticia

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

400145

2005 DIC 31 P 12:03

Adolf Watzke

COTA FIRMADA APECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPERA
LAS FUNCIONES INDICADAS

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.



CERTIFICACIÓN
SOCIEDADES

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.

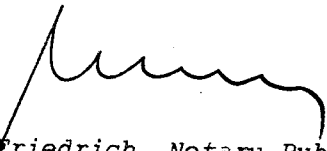
Firmado en _____ el _____ de _____ de _____.

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




Friedrich, Notary Public

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 22.05.06
7. durch den Herrn Präsidenten des Landgerichts
8. unter Nr. 91 Ea A 4735
9. Siegel/Stempel

10. Unterschrift

i.A. Sim



[Traducción Oficial del Inglés]

Certificación

Compañías

El suscrito, Klaus Peter Friedrich certifica que las firma que aparecen anteriormente, en las que se lee Elmar-Michael Wein y Dieter Breuer son auténticas; que los firmantes ocupan en la actualidad los cargos de Apoderado y Signatario Autorizado respectivamente de la compañía Sanofi Aventis Deutschland GmbH; que ellos se encuentran autorizados para otorgar este poder y que la mencionada compañía existe, cumple con su objeto social y está organizada en Frankfurt am Main de conformidad con las Leyes Alemanas.

Yo conozco todos los hechos arriba mencionados por haber examinado personalmente los respectivos documentos, de lo cual doy testimonio.

Firmado en

Frankfurt am Main

El día de hoy, 19 de Mayo de 2006

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



[Apostilla en Alemán fechada el 22.05.06 que legaliza la firma del Notario Friedrich bajo el No. 91 Ea A 4735]

M. Méndez S.
JOSE MIGUEL MENDEZ

Traductor Oficial

Res. 911 de Mayo 1988 MINJUSTICIA

[illegible header text]

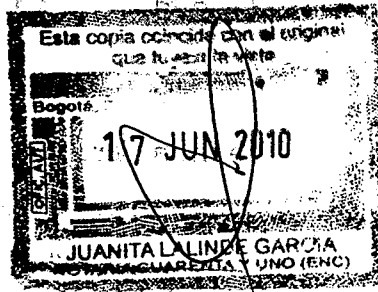
[illegible text]

[illegible text]

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2006 JUN 18 A 10:59

JEFE DE COORDINACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

196277
Figueroa Ronder
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

(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 2009/087081 A2

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

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2009/000017

(22) Internationales Anmeldedatum:

6. Januar 2009 (06.01.2009)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

10 2008 003 568.8	9. Januar 2008 (09.01.2008)	DE
61/044,659	14. April 2008 (14.04.2008)	US
10 2008 025 008.2	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).

(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:

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektronischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Internationalen 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 following features: a) the B chain end consists of an amidated basic amino acid residue such as lysine or arginine amide; b) the N-terminal amino acid residue of the insulin A chain is a lysine or arginine radical; c) the amino acid position A8 is occupied by a histidine radical; d) the amino acid position A21 is occupied by a glycine radical; and e) one or more substitutions and/or additions of negatively charged amino acid residues are carried out in the positions A5, A15, A18, B-1, B0, B1, B2, B3 and B4.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft neue Insulinanaloge mit basalem Zeit- / Wirkungsprofil, die durch die Merkmale charakterisiert sind, dass a) das B - Kettenende aus einem amidierten basischen Aminosäurerest wie Lysin bzw. Argininamid besteht, b) zudem der N-terminale Aminosäurerest der Insulin A - Kette ein Lysin- oder Argininrest ist, c) die Aminosäureposition A8 durch einen Histidinrest besetzt wird, d) die Aminosäureposition A21 durch einen Glycinrest besetzt wird, und e) eine oder mehrere Substitutionen und/oder Additionen negativ geladener Aminosäurereste in den Positionen A5, A15, A18, B-1, B0, B1, B2, B3 und B4 erfolgt ist.

WO 2009/087081 A2

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.

- 10 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
- 15 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
- 30

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 hauptsächliche Ziel bei der Gestaltung

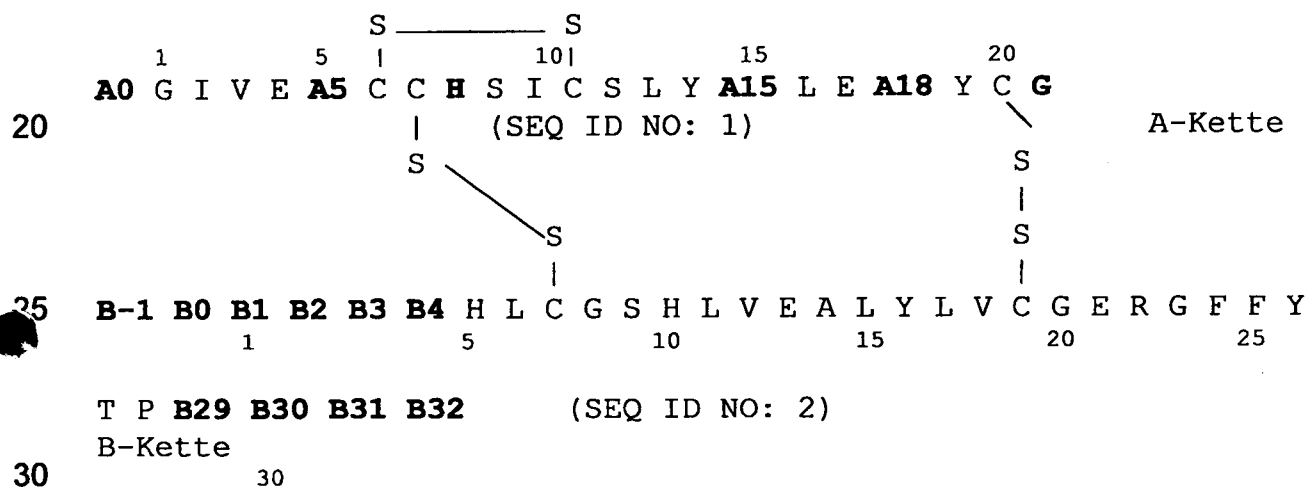
neuer Insulinanaloge sehen Kohn et al. daher in der Addition von positiv geladenen Aminosäuren zur Aminosäuresequenz von Humaninsulin zwecks Erhöhung des isoelektrischen Punktes von $pI = 5,6$ in den neutralen Bereich.

- 5 Diesem Ziel bei der Gestaltung neuer Insulinanaloge entgegengerichtet ist die Substitution neutraler Aminosäuren in humanem Insulin durch saure Aminosäuren und / oder die Addition von sauren Aminosäuren, da solch eine Substitution und / oder Additionen den Effekt der Einführung positiv geladener Aminosäuren zumindest teilweise aufhebt. Es wurde nun aber überraschend gefunden, dass solche
- 10 Insulinanaloge 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-Kettenende liegt die Carboxylgruppe der endständigen Aminosäure in ihrer
- 15 amidierten Form vor, und
- der N-terminale Aminosäurerest der Insulin A-Kette ein Lysin- oder Argininrest ist, und
 - die Aminosäureposition A8 durch einen Histidinrest besetzt wird, und
 - die Aminosäureposition A21 durch einen Glycinrest besetzt wird, und
- 20 • zwei Substitutionen neutraler Aminosäuren durch saure Aminosäuren, zwei Additionen negativ geladener Aminosäurereste oder je eine solche Substitution und eine solche Addition jeweils in den Positionen A5, A15, A18, B-1, B0, B1, B2, B3 und B4 erfolgt sind.
- 25 Während die ersten drei genannten Merkmale durch Einführen positiver Ladungen bzw. der Ausschaltung negativer Ladungen tendenziell Beiträge zu einer Erhöhung des pI – Wertes eines entsprechenden Insulinanaloges liefern, haben die letztgenannten Substitutionen und / oder Additionen negativ geladener Aminosäurereste den gegenteiligen Effekt und liefern Beiträge zu einer Erniedrigung
- 30 des pI – Werts. Überraschenderweise haben gerade die oben beschriebenen Insulinanaloge die gewünschten vorteilhaften Zeit - / Wirkungsprofile. Die pI – Werte dieser Verbindungen sind niedriger als die der Verbindung 18 aus Kohn et al. (Arg (A0), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – Humaninsulin), weisen aber nichtsdestotrotz dabei einen verzögerten Wirkeintritt und eine längere Wirkdauer, d.h. einen extrem

flachen und lang andauernden, gleichmäßigen Wirkungsverlauf 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, obwohl im Gegensatz dazu die verzögerte Wirkung von Insulin

5 Glargin in der Ratte nicht eindeutig beobachtbar ist. In Figur 1 ist die hypoglykämische Wirkung der erfindungsgemäßen Verbindung YKL205 verglichen mit der von Insulin Glargin dargestellt. Ähnliche Ergebnisse werden im Hund erhalten (siehe Figur 2). Damit sind neue Basalinsuline bereitgestellt worden, die deutlich weniger häufig appliziert werden müssen. Neben diesen beschriebenen
10 pharmakokinetischen Vorteilen weisen die erfindungsgemäßen Analoga gegenüber Insulin Glargin deutlich bessere Eigenschaften in pharmakologischer Hinsicht wie z.B. Rezeptorspezifität und in vitro Mitogenität auf. Ferner zeigen die beanspruchten Insuline auch in physikalisch - chemischer Hinsicht Vorteile.

15 Gegenstand der Erfindung ist somit ein Insulinanalogon der Formel I



wobei

A0 Lys oder Arg;

A5 Asp, Gln oder Glu;

A15 Asp, Glu oder Gln;

A18 Asp, Glu oder Asn;

B-1 Asp, Glu oder eine Aminogruppe;

5 B0 Asp, Glu oder eine chemische Bindung;

B1 Asp, Glu oder Phe;

B2 Asp, Glu oder Val;

10

B3 Asp, Glu oder Asn;

B4 Asp, Glu oder Gln;

15 B29 Lys oder einer chemischen Bindung;

B30 Thr oder einer chemischen Bindung;

B31 Arg, Lys oder einer chemischen Bindung;

20

B32 Arg-Amid, Lys-Amid oder einer Aminogruppe

entspricht, wobei zwei Aminosäurereste der Gruppe enthaltend A5, A15, A18, B-1, B0, B1, B2, B3 und B4 gleichzeitig und unabhängig voneinander Asp oder Glu entsprechen.

25

Insbesondere sind Gegenstände der Erfindung Insulinanaloga wie oben ausgeführt, bei denen unabhängig voneinander A0 Arg entspricht, oder wobei A5 Glu entspricht, oder wobei A15 Glu entspricht, oder wobei A18 Asp entspricht, oder wobei B-1 einer Aminogruppe entspricht, oder wobei B0 Glu entspricht, oder wobei B1 Asp entspricht, oder wobei B2 Val entspricht, oder wobei B3 Asp entspricht, oder wobei B4 Glu entspricht, oder wobei B29 Lys entspricht, oder wobei B30 Thr entspricht, oder wobei B31 Arg oder Lys entspricht.

30

Besonders bevorzugter Gegenstand der Erfindung ist ein Insulinanalogon ausgewählt aus einer Gruppe enthaltend:

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂
Humaninsulin,

5 Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂

10 Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Glu(A5), Glu (A15), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Glu (A15), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂
Humaninsulin,

15 Arg (A0), His(A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His(A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂

20 Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂
Humaninsulin,

25 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His(A8), Gly (A21), Asp (B3), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂

30 Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂
Humaninsulin,

5 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂

10 Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂
Humaninsulin,

15 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂

20 Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂
Humaninsulin,

25 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂

30 Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B30), Arg (B31) – NH₂
Humaninsulin,

5 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B30), Lys (B31) – NH₂
Humaninsulin.

Durch die Angabe des Begriffs "Humaninsulin" in den Bezeichnungen der genannten
Insulinanaloga wird Bezug auf die Aminosäuresequenzen der A- und B-Kette von
10 Humaninsulin genommen und alle Abweichungen (Additionen, Substitutionen,
Deletionen) davon sind in einer gegebenen Bezeichnung eines Insulinanalogons
angegeben.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines
15 Insulinanalogons wie oben genannt, insbesondere 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..

20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Verwendung eines Insulinanalogons
wie oben beschrieben zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von
Diabetes, insbesondere von Diabetes Typ I oder Typ II. Ebenfalls ist Gegenstand der
Erfindung eine Verwendung eines Insulinanalogons wie oben beschrieben zur
25 Herstellung eines Medikaments zur Unterstützung der beta –Zellregeneration

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

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

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

5 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Formulierung wie oben beschrieben, wobei das Insulinanalogon wie oben beschrieben in kristalliner und/oder amorpher Form vorhanden ist.

10 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.

15 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine DNA kodierend für einen Vorläufer eines Insulinanalogons wie oben beschrieben, oder für die A-Kette oder B-Kette eines Insulinanalogons wie oben beschrieben.

20 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.

25 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Präproinsulinanalogon, dadurch gekennzeichnet, dass das C-Peptid an seinem N-Terminus den Aminosäurerest Arginin und an seinem C-Terminus zwei Argininreste oder einen Argininrest und einen Lysinrest trägt, wobei in letzterem Falle der Lysinrest den eigentlichen C-Terminus bildet.

30 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.

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,

- 5 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

- 10 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),
15 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.

20

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.

- 25 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-(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,
30 H-Asn-(Glu)₅ des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]Exendin-4(1-39) -NH₂,
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,
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,
5 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,
10 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,
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,
15 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,
20 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,
25 oder ein pharmakologisch tolerierbares Salz davon.

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.

30

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

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.

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 Entwicklung befinden, verabreicht werden. Dabei ist es dem Fachmann klar, dass dazu auch entsprechend formulierte Mischungen aus schnellwirksamen und erfindungsgemäßigem 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) 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 enthalten. 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.

- 5 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
- 10 pankreatischen Betazellen aus entsprechenden Stammzellen eingeleitet wird. All diese 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
- 15 Diabetes.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Arzneimittel, das ein erfindungsgemäßes Insulinanalogon 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 vorzugsweise ein geeignetes Isotonisierungsmittel, ein geeignetes Konservierungsmittel und gegebenenfalls einen
- 30 geeigneten Puffer, sowie vorzugsweise auch eine bestimmte Zinkionen-Konzentration, 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.

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

Als Puffersubstanzen, insbesondere zur Einstellung eines pH-Wertes zwischen etwa 4,0 und 8,5 können z.B. Natriumacetat, Natriumcitrat, Natriumphosphat etc. verwendet werden. Ansonsten sind zur Einstellung des pH-Wertes auch
10 physiologisch unbedenkliche verdünnte Säuren (typischerweise HCl) bzw. Laugen (typischerweise NaOH) geeignet.

Wenn die Zubereitung einen Zinkgehalt besitzt, ist ein solcher von 1 bis 2 mg/ml, insbesondere von 1 µg/ml bis 200 µg Zink/ml bevorzugt.

15 Über den Zusatz von Zn 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 und so eine individuelle Einstellung des Patienten erlauben. Eine andere Möglichkeit ergibt sich durch den Einsatz eines
20 „Zweikammer – Insulin – Device“, das die Applikation einer Formulierung mit schnellem Wirkeintritt und / oder langsamem flachen Wirkeintritt je nach Lebenssituation erlaubt.

Zwecks Variation des Wirkstoffprofils der erfindungsgemäßen Zubereitung kann
25 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, oder direkt GLP-1 entsprechen, zugemischt werden. Solche
30 Arzneimittel (Zubereitungen) sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

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

Die erfindungsgemäßen Insulinanaloge 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

- 5 Wirtszellsysteme finden dabei Bakterien, Hefen und Pflanzen bzw. 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
- 10 kleinen Ausschnitt der für die rekombinante 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 –
- 15 Sequenzen, die die Herstellung der 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
- 20 V. Klasse Chlorophyceae, Organismen der 2. Abteilung 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
5 umgewandelt werden, die in Position A0 Lysin oder Arginin umfasst und am C-terminalen Ende der B - Kette Lysin oder Arginin trägt.

Liegen die erfindungsgemäßen Proinsuline nach intrazellulärer Expression in Bakterien als Einschlusskörper oder löslich vor, müssen diese Vorstufen durch in
10 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.

15

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
20 führen können, die in ihre Abfolge vorher nicht publiziert wurden. Verfahren, die zur Reinigung der erfindungsgemäßen Analoga führen sind somit ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

25

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
30 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 „Analoge“ von Proteinen bezeichnet. Dabei kann es sich bei den hinzugefügten und / oder ersetzten Aminosäureresten auch um solche handeln, die nicht natürlich
5 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
10 bestimmter chemischer Gruppen an eine oder mehrere Aminosäuren bestehen.

Figurenlegende:

- Fig. 1: Blutzuckersenkende Wirkung von neuen Insulinanaloga in Ratten
15 Fig. 2: Blutzuckersenkende Wirkung von neuen Insulinanaloga im Hund
Fig. 3: Blutzuckersenkende Wirkung von YKL205 im Hund
Fig. 4: Zinkabhängigkeit der hypoglykämischen Wirkung von YKL205 im Hund

Die folgenden Beispiele sollen den Erfindungsgedanken illustrieren, ohne dabei
20 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.

25 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:

30

pint3580_glya21rev

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

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

5

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.

10

arg_cjunc_rev

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

15

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 /

20

pint3580_glya21rev in einer dritten PCR eingesetzt. Das Produkt dieser Reaktion wird nach gelektrophoretischer Auftrennung des Reaktionsgemisches gereinigt und mit den Restriktionsenzymen Sal1 / Nco1 nach Angaben des Herstellers in ein und derselben Reaktion verdaut, das Reaktionsgemisch gelektrophoretisch aufgetrennt und das die Proinsulinsequenz kodierende DNA – Fragment isoliert. Das Fragment

25

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

30

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

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

Die Konstruktion erfolgt wie in Beispiel 1 beschrieben über 3 Polymerase

- 5 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

10

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

pint3580_Ha8rev

- 15 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
20 Primerpaar Tir/ pint3580_Ha8rev und PCR2 mit dem Primerpaar pint3580_Ha8f/ pint3580_glya21rev durchgeführt. In PCR3 wird das Primerpaar Tir/ pint3580_glya21rev eingesetzt. Template ist dabei ein Gemisch der Reaktionsprodukte von PCR1 und PCR2. Richtige Plasmide erhalten die Bezeichnung pINT3581.

25

Beispiel 3: Konstruktion des Plasmides pINT3582 kodierend für His (A8), Glu (A5), Gly (A21) – 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 inseriert. Verwendet werden die Primer Tir und pint3580_glya21rev. Zwei weitere Primer werden synthetisiert:

pint3581_Ea5f

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

pint3581_Ea5rev

5

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.

10 Template ist DNA des Plasmides pINT3581. Richtige Plasmide erhalten die Bezeichnung pINT3582.

Beispiel 4: Konstruktion des Plasmides pINT3583 kodierend für His (A8), Asp (A18),
15 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 Nco1 / Sal1 geöffnete pINT91d Vektor DNA insertiert. Verwendet wird der Primer Tir.

20 Ein weiterer Primer wird synthetisiert:

pint3580_Da18rev

5' CAAAGGTCGACTATTAGCCGCAGTAGTCCTCCAGCTGGTAGAGGGAG 3'
25 (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 erhalten die Bezeichnung pINT3583.

30

Beispiel 5: Konstruktion des Plasmides pINT3584 kodierend für His (A8), Glu (A5) 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 Nco1 / Sal1 geöffnete pINT91d Vektor DNA inseriert. Verwendet wird der Primer Tir .
 pint3580_Da18rev (Bsp.4). Template ist DNA des Plasmides pINT3582. Richtige
 5 Plasmide erhalten die Bezeichnung pINT3584. Das von dem Plasmid kodierte Prä -
 Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205-1, die nach Amidierung mit
 Argininamid entsteht und die folgende Struktur beschreibt:

10 Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Asp(A18), Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32)-NH₂ –
 Humaminsulin

Entsprechende Amidierung mit Lysinamid führt zur Verbindung YKL205-1b:

15 Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Asp (A18), Gly(A21), Arg (B31), Lys (B32)-NH₂ –
 Humaninsulin

Beispiel 6: Konstruktion des Plasmides pINT3585 kodierend für His (A8), Glu (A15),
 Gly (A21) – Präproinsulin

20

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

25

pint3580_Ea15rev

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

30

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.

Beispiel 7: Konstruktion des Plasmides pINT3586 kodierend für His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21) – Präproinsulin

Die Konstruktion erfolgt abweichend von Beispiel 1 über nur eine Polymerase

- 5 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:

pint3585_Ea15_Da18rev

10

5'- CAAAGGTCGACTATTAGCCGCAGTAGTCCTCCAGCTCGTAGAGGGAGCAG
ATGCTG -3' (SEQ ID NO: 12)

- 15 Das Codon, für Glutaminsäure in Position 15 der A- Kette und Asparaginsäure in Position A18 der A- Kette ist jeweils fett herausgestellt. Template ist DNA des Plasmides pINT3581. Richtige Plasmide erhalten die Bezeichnung pINT3586. Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205, die nach Amidierung mit Argininamid entsteht und die folgende Struktur beschreibt:

- 20 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ - Humaninsulin

- 25 Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205b, die nach Amidierung mit Lysinamid entsteht und die folgende Struktur beschreibt:

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – Humaninsulin

30

Beispiel 8: Konstruktion des Plasmides pINT3587kodierend für Glu (A5), His (A8), Glu (A15), 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 Nco1 / Sal1 geöffnete pINT91d Vektor DNA inseriert. Verwendet wird der Primer Tir und pint3580_Ea15rev gemäß Beispiel 6. Template ist DNA des Plasmides pINT3582. Richtige Plasmide erhalten die Bezeichnung pINT3587. Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205 -2, die nach Amidierung mit Argininamid entsteht und die folgende Struktur beschreibt:

10 Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin

Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205 -2b, die nach Amidierung mit Lysinamid entsteht und die folgende Struktur beschreibt:

15 Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – Humaninsulin

20 Beispiel 9: Konstruktion des Plasmides pINT3588 kodierend für His (A8), Gly (A21), Asp (B3)- 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 inseriert. Verwendet werden die Primer Tir und pint3580_glya21rev. Zwei weitere Primer werden synthetisiert:

pint3581_Db3f

30 5'- GCACGATTTGTGGACCAGCACCTGTGCGGC -3' (SEQ ID NO: 13)

pint3581_Db3rev

5'- CACAGG TGCTGGTCCA CAAATCGTGC CGAATTTC -3' (SEQ ID NO: 14)

Das Codon, das für Asparaginsäure in Position 3 der Insulin B- 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 Bezeichnung pINT3588.

Beispiel 10: Konstruktion des Plasmides pINT3589 kodierend für Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Asp (B3)- Präproinsulin

Führt man die Reaktionen wie in Beispiel 9 beschrieben durch, verwendet aber in PCR1 und PCR2 DNA des Plasmides pINT3582 als Template, so gelangt man zu Plasmid pINT3589.

Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205-3, die nach Amidierung mit Argininamid entsteht und die folgende Struktur beschreibt:

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin

Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205-3b, die nach Amidierung mit Lysinamid entsteht und die folgende Struktur beschreibt:

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – Humaninsulin

Beispiel 11: Konstruktion des Plasmides pINT3590 kodierend für His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3) - Präproinsulin

Führt man die Reaktionen wie in Beispiel 9 beschrieben durch, verwendet aber in PCR1 und PCR2 DNA des Plasmides pINT3585 als Template, so gelangt man zu

Plasmid pINT3590. Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205-4, die nach Amidierung mit Argininamid entsteht und die folgende Struktur beschreibt:

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ –

5 Humaninsulin

Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205-4b, die nach Amidierung mit Lysinamid entsteht und die folgende Struktur beschreibt:

10

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ –
Humaninsulin

15 Beispiel 12: Konstruktion des Plasmides pINT3591 kodierend für His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3)- Präproinsulin

Führt man die Reaktionen wie in Beispiel 9 beschrieben durch, verwendet aber in PCR1 und PCR2 DNA des Plasmides pINT3586 als Template, so gelangt man zu

20 Plasmid pINT3591. Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205-5, die nach Amidierung mit Argininamid entsteht und folgende Struktur beschreibt:

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ –

25 Humaninsulin

Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205-5b, die nach Amidierung mit Lysinamid entsteht und die folgende Struktur beschreibt:

30

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ –
Humaninsulin

Beispiel 13: Konstruktion des Plasmides pINT3592 kodierend für His (A8), Gly (A21), Asp (B3)- Glu (B4) - 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_Db3_Eb4f

5'- GCACGATTTGTGGACGAGCACCTGTGCGGCTC -3' (SEQ ID NO: 15)

pint3581_Db3_Eb4rev

5'- CGCACAGG TGCTCGTCCA CAAATCGTGC CGAATTTC -3' (SEQ ID NO: 16)

Das Codon, das für Asparaginsäure in Position 3 und Glutaminsäure in Position 4 der Insulin B- Kette kodiert, ist jeweils fett herausgestellt. Die Konstruktion wird wie in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt. Template ist DNA des Plasmides pINT3581.

Richtige Plasmide erhalten die Bezeichnung pINT3592. Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205-6, die nach Amidierung mit Argininamid entsteht und die folgende Struktur beschreibt:

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin

Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205-6b, die nach Amidierung mit Lysinamid entsteht und die folgende Struktur beschreibt:

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – Humaninsulin

Beispiel 14: Konstruktion des Plasmides pINT3593 kodierend für His (A8), Gly (A21), Glu (B4) - 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_Eb4f

10

5'- ACGATTTGTGAACGAGCACCTGTGCGGCTC -3' (SEQ ID NO: 17)

pint3581_Eb4rev

15 5'- CGCACAGG TGCTCGTTCA CAAATCGTGC CGAATTTC -3' (SEQ ID NO: 18)

Das Codon, das für Glutaminsäure 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.

20

Beispiel 15: Konstruktion des Plasmides pINT3594 kodierend für Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B4) - Präproinsulin.

25

Führt man die Reaktionen wie in Beispiel 9 beschrieben durch, verwendet aber in PCR1 und PCR2 DNA des Plasmides pINT3582 als Template, so gelangt man zu Plasmid pINT3594.

30 Das Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205-7, die nach Amidierung mit Argininamid entsteht und die folgende Struktur beschreibt:

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin.

Das Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205-7b, die nach Amidierung mit Lysinamid entsteht und die folgende Struktur beschreibt:

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ –

5 Humaninsulin

Beispiel 16: Konstruktion des Plasmides pINT3595 kodierend für His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4) - Präproinsulin.

10

Führt man die Reaktionen wie in Beispiel 9 beschrieben durch, verwendet aber in PCR1 und PCR2. DNA des Plasmides pINT3585 als Template, so gelangt man zu Plasmid pINT3595. Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205-8, die nach Amidierung mit Argininamid entsteht und die

15 folgende Struktur beschreibt:

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin

20 Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205-8b, die nach Amidierung mit Lysinamid entsteht und die folgende Struktur beschreibt:

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ –

25 Humaninsulin

Beispiel 17: Konstruktion des Plasmides pINT3596 kodierend für His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4)- Präproinsulin

30

Führt man die Reaktionen wie in Beispiel 9 beschrieben durch, verwendet aber in PCR1 und PCR2 DNA des Plasmides pINT3586 als Template, so gelangt man zu Plasmid pINT3596. Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für

die Verbindung YKL205-9, die nach Amidierung mit Argininamid entsteht und die folgende Struktur beschreibt:

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ –

5 Humaninsulin

Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205-9b, die nach Amidierung mit Lysinamid entsteht und die folgende Struktur beschreibt:

10

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ –
Humaninsulin

15 Beispiel 18: Konstruktion des Plasmides pINT3597 kodierend für His (A8), Gly (A21),
Glu (B0) -Präproinsulin

Die Konstruktion erfolgt über 2 Polymerase Kettenreaktionen. Verwendet wird der Primer pint3580_glya21rev. Zwei weitere Primer werden synthetisiert:

20

pint3581_Eb0f1

5'- CAACAGGAA ATTCGGCACG AGAGTTTGTG AACCAGCACC TGTG-3' (SEQ
ID NO: 19)

25

pint3581_Eb01f2

5'- TATCGA CCAT GG CAACAACA TCAACAGGAA ATTCGGCACG AGAG-3'
(SEQ ID NO: 20)

30

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.

PCR1 wird mit dem Primerpaar pint3581_Eb-1f2 / pint3580_glya21rev. Template für

- 5 PCR2 ist das Produkt aus PCR1. PCR2 wird mit dem Primerpaar pint3581_Eb-1f2 / pint3580_glya21rev durchgeführt. Das Produkt aus PCR2 übereckt die vollständige Präproinsulinsequenz. Das Produkt der zweiten Reaktion wird nach Nco1/ Sal1 Spaltung in die Nco1 / Sal1 geöffnete pINT91d Vektor DNA inseriert. Richtige Plasmide erhalten die Bezeichnung pINT3597. Ersetzt man das Codon für
- 10 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.

- 15 Beispiel 19: Konstruktion des Plasmides pINT3598 kodierend für Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B0) - Präproinsulin

Führt man die Reaktionen wie in Beispiel 18 beschrieben durch, verwendet aber in PCR1 DNA des Plasmides pINT3582 als Template, so gelangt man zu Plasmid

20 pINT3598. Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205-10, die nach Amidierung mit Argininamid entsteht und die folgende Struktur beschreibt:

- 25 Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin

Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205-10b, die nach Amidierung mit Lysinamid entsteht und die folgende Struktur beschreibt:

30

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – Humaninsulin

Beispiel 20: Konstruktion des Plasmides pINT3599 kodierend für His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0) - Präproinsulin

Führt man die Reaktionen wie in Beispiel 18 beschrieben durch, verwendet aber in
5 PCR1 DNA des Plasmides pINT3585 als Template, so gelangt man zu Plasmid pINT3599. Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205-11, die nach Amidierung mit Argininamid entsteht und die folgende Struktur beschreibt:

10 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin

Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205-11b, die nach Amidierung mit Lysinamid entsteht und die folgende Struktur
15 beschreibt:

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – Humaninsulin

20

Beispiel 21: Konstruktion des Plasmides pINT3600 kodierend für His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0) - Präproinsulin

Führt man die Reaktionen wie in Beispiel 18 beschrieben durch, verwendet aber in
25 PCR1 DNA des Plasmides pINT3586 als Template, so gelangt man zu Plasmid pINT3600. Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205-12, die nach Amidierung mit Argininamid entsteht und die folgende Struktur beschreibt:

30 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin

Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205-12b, die nach Amidierung mit Lysinamid entsteht und die folgende Struktur beschreibt:

- 5 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – Humaninsulin

- 10 Beispiel 22: Konstruktion des Plasmides pINT3601 kodierend für His (A8), Gly (A21), Asp (B1) - Präproinsulin

Die Konstruktion erfolgt über 2 Polymerase Kettenreaktionen. Verwendet wird der Primer pint3580_glya21rev. Zwei weitere Primer werden synthetisiert:

- 15 pint3581_Db1f1

5'-CAACAGGAA ATTCGGCACG AGACGTG AACCAGCACC TGTGCG-3' (SEQ ID NO: 21)

- 20 pint3581_Db1f2

5'-TATCGA CCAT GG CAACAACA TCAACAGGAA ATTCGGCACG AGAC-3' (SEQ ID NO: 22)

- 25 Dabei überlappen sich die beiden Primer partial. Pint3581_Db-1f2 enthält eine NcoI – Erkennungssequenz. Diese ist unterstrichen dargestellt. Das Codon, das für Asparaginsäure in Position 1 der B- Kette kodiert, ist jeweils fett herausgestellt. Template für PCR1 ist DNA des Plasmides pINT3581. PCR1 wird mit dem Primerpaar pint3581_Db1f1 / pint3580_glya21rev durchgeführt. Template für PCR2 ist das Produkt aus PCR1. PCR2 wird mit dem Primerpaar pint3581_Db1f2 /
30 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 pINT3601.

Beispiel 23: Konstruktion des Plasmides pINT3602 kodierend für Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Asp (B1) - Präproinsulin

Führt man die Reaktionen wie in Beispiel 22 beschrieben durch, verwendet aber in
5 PCR1 DNA des Plasmides pINT3582 als Template, so gelangt man zu Plasmid pINT3602. Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205-13, die nach Amidierung mit Argininamid entsteht und die folgende Struktur beschreibt:

10 Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin

Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205-13b, die nach Amidierung mit Lysinamid entsteht und die folgende Struktur
15 beschreibt:

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – Humaninsulin

20

Beispiel 24: Konstruktion des Plasmides pINT3603 kodierend für His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1) - Präproinsulin

Führt man die Reaktionen wie in Beispiel 22 beschrieben durch, verwendet aber in
25 PCR1 DNA des Plasmides pINT3585 als Template, so gelangt man zu Plasmid pINT3603. Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205-14, die nach Amidierung mit Argininamid entsteht und die folgende Struktur beschreibt:

30 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin

Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205-14b, die nach Amidierung mit Lysinamid entsteht und die folgende Struktur beschreibt:

- 5 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – Humaninsulin

- 10 Beispiel 25: Konstruktion des Plasmides pINT3604 kodierend für His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1) - Präproinsulin

- 15 Führt man die Reaktionen wie in Beispiel 22 beschrieben durch, verwendet aber in PCR1 DNA des Plasmides pINT3586 als Template, so gelangt man zu Plasmid pINT3604. Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205-15, die nach Amidierung mit Argininamid entsteht und die folgende Struktur beschreibt:

- 20 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin

Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205-15b, die nach Amidierung mit Lysinamid entsteht und die folgende Struktur beschreibt:

- 25 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – Humaninsulin

- 30 Beispiel 26: Konstruktion des Plasmides pINT3605 kodierend für His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1) - Präproinsulin

Die Konstruktion erfolgt über 2 Polymerase Kettenreaktionen. Verwendet wird der Primer pint3580_glya21rev und der in Beispiel 18 beschriebenen Primer pint3581_Eb01f2. Synthetisiert wird der Primer pint3597_Db1f:

5'-CAACAGGAA ATTCGGCACG AGAGGACGTG AACCAGCACC TGTGC-3' (SEQ ID NO: 23)

Das Codon, das für Glutaminsäure in Position 0 und das für Asparaginsäure jeweils am Anfang der B- Kette kodiert, ist jeweils fett herausgestellt. Template für PCR1 ist DNA des Plasmides pINT3597. PCR1 wird mit dem Primerpaar pint3597_Db1f/ pint3580_glya21rev. Template für PCR2 ist das Produkt aus PCR1. PCR2 wird mit dem Primerpaar pint3581_Eb1f2 / pint3580_glya21rev durchgeführt. Das Produkt aus PCR2 überdeckt die vollständige Präproinsulinsequenz. Das Produkt der zweiten Reaktion wird nach Nco1/ Sal1 Spaltung in die Nco1 / Sal1 geöffnete pINT91d Vektor DNA inseriert. Richtige Plasmide erhalten die Bezeichnung pINT3605. Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205-16, die nach Amidierung mit Argininamid entsteht und die folgende Struktur beschreibt:

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – Humaninsulin

Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205-16b, die nach Amidierung mit Lysinamid entsteht und die folgende Struktur beschreibt:

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – Humaninsulin

Beispiel 27: Konstruktion des Plasmides pINT3606 kodierend für His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), desThr (B30) – Präproinsulin

Die Konstruktion erfolgt wie in Beispiel 1 und 2 beschrieben über 3 Polymerase Kettenreaktionen. Verwendet werden die Primer Tir und pint3580_glya21rev. Zwei weitere Primer werden synthetisiert:

desB30f

5'-TTCTACACACCCAAGCGCGATGTTCTCAGGTGG-3' (SEQ ID NO: 24)

desB30rev

5

5'-AGG AACATCGCGC TTGGGTGTGT AGAAGAAGC-3' (SEQ ID NO: 25)

Template für PCR1 und PCR2 ist DNA des Plasmides pINT3586. PCR1 wird mit dem Primerpaar desB30f / pint3580_glya21rev und PCR2 wird mit dem Primerpaar Tir / desB30rev Template durchgeführt. Als Template für PCR3 wird ein äquimolares Gemisch der Produkte aus PCR1 und PCR2 verwendet. Die Reaktion wird mit dem Primerpaar Tir/ pint3580_glya21rev durchgeführt. Das Produkt aus PCR3 überdeckt die vollständige Präproinsulinsequenz. Das Produkt der dritten Reaktion wird nach Nco1/ Sal1 Spaltung in die Nco1 / Sal1 geöffnete pINT91d Vektor DNA insertiert.

Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205-17, die nach Amidierung mit Argininamid entsteht und die folgende Struktur beschreibt:

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B30), Arg (B31) – NH₂ – Humaninsulin

Das von dem Plasmid kodierte Prä - Proinsulin ist Vorstufe für die Verbindung YKL205-17b, die nach Amidierung mit Lysinamid entsteht und die folgende Struktur beschreibt:

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B30), Lys (B31) – NH₂ – Humaninsulin

Beispiel 28: Expression der Proinsulinderivate

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

Beispiel 29: Faltung der Proinsulinderivate

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

Beispiel 30: Enzymatische Prozessierung der gefalteten Präproinsulin zu der 2 –

- 5 kettigen Arg(A0) – Insulinvorstufe, deren C - terminales B-Kettenende durch Lysin oder Arginin charakterisiert ist.

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

Beispiel 31: Herstellung eines Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) - NH₂- Humaninsulins

15

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
20 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- Humaninsulin. Nach Zusatz von Trypsininhibitorlösung erfolgt die Reinigung des amidierten Analogs in Analogie zu US 5,656,722.

25

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

30

Beispiel 32: Formulierung der amidierten Insulinderivate

Um die erfindungsgemäßen Insulinderivate auf ihre biologisch, pharmakologischen und physikalisch chemischen Eigenschaften zu testen, wurde von den Verbindungen

50
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 Zinkchlorid) aufgelöst.

5 Als Lösungsmedium wurden folgende Zusammensetzungen verwendet:

a) 1 mM Salzsäure

b) 1 mM Salzsäure, 5 $\mu\text{g/mL}$ Zink (als Zinkchlorid oder Salzsäure zugesetzt)

c) 1 mM Salzsäure, 10 $\mu\text{g/mL}$ Zink (als Zinkchlorid oder Salzsäure zugesetzt)

d) 1 mM Salzsäure, 15 $\mu\text{g/mL}$ Zink (als Zinkchlorid oder Salzsäure zugesetzt)

10 e) 1 mM Salzsäure, 30 $\mu\text{g/mL}$ Zink (als Zinkchlorid oder Salzsäure zugesetzt)

f) 1 mM Salzsäure, 80 $\mu\text{g/mL}$ Zink (als Zinkchlorid oder Salzsäure zugesetzt)

g) 1 mM Salzsäure, 120 $\mu\text{g/mL}$ Zink (als Zinkchlorid oder Salzsäure zugesetzt)

Hierzu wurde von dem gefriergetrockneten Material zunächst eine um etwa 30%

15 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 mit 80 $\mu\text{g/mL}$ Zink aufgefüllt. Falls erforderlich, wurde dabei der pH-Wert auf $3,5 \pm 0,1$

20 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 der erfindungsgemäßen Insulinderivate wurde keine Optimierung der

25 Formulierungen, z.B. hinsichtlich eines Zusatzes isotonischer Agentien, Konservierungsmittel oder Puffersubstanzen, vorgenommen.

Beispiel 33: Evaluierung der blutzuckersenkenden Wirkung von neuen

30 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
5 eingesetzte erfindungsgemäße Insulinanalogon zu einem deutlich verzögerten Wirkeintritt und einer längeren, gleichmäßigen Wirkdauer führt.

Beispiel 34: Evaluierung der blutzuckersenkenden Wirkung von neuen 10 Insulinanaloga im Hund

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.
15 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 (vgl. Fig. 2), dass das eingesetzte erfindungsgemäße Insulinanalogon zu einem deutlich verzögerten Wirkeintritt und einer längeren, gleichmäßigen Wirkdauer führt.

Beispiel 35: Evaluierung der blutzuckersenkenden Wirkung am Hund bei 20 zweifach erhöhter Dosis

Die blutzuckersenkende Wirkung von ausgewählten neuen Insulinanaloga wird in männlichen, gesunden, normoglykämischen Beaglehunden geprüft. Männlichen Tieren wird eine Dosis von 6 nmol/kg und 12nmol/kg eines Insulinanalogons subkutan injiziert. Unmittelbar vor der Injektion des Insulinanalogons und in
25 regelmäßigen Abständen bis zu achtundvierzig Stunden nach der Injektion werden den Tieren Blutproben entnommen und darin der Blutzuckergehalt bestimmt.
30 Das Experiment zeigt deutlich (vgl. Fig. 3), dass das eingesetzte erfindungsgemäße Insulinanalogon dosisabhängig wirkt, dass aber trotz zweifach erhöhter Dosis der Wirkungsverlauf flach verläuft, d.h. kein ausgeprägter Tiefpunkt (Nadir) beobachtet wird. Daraus lässt sich ableiten, dass die erfindungsgemäßen Insuline im Vergleich

zu bekannten Verzögerungsinsulinen zu deutlich weniger hypoglykämischen Ereignissen führen.

5 **Beispiel 36: Evaluierung der blutzuckersenkenden Wirkung am Hund bei verschiedenen Zinkkonzentrationen in der Formulierung**

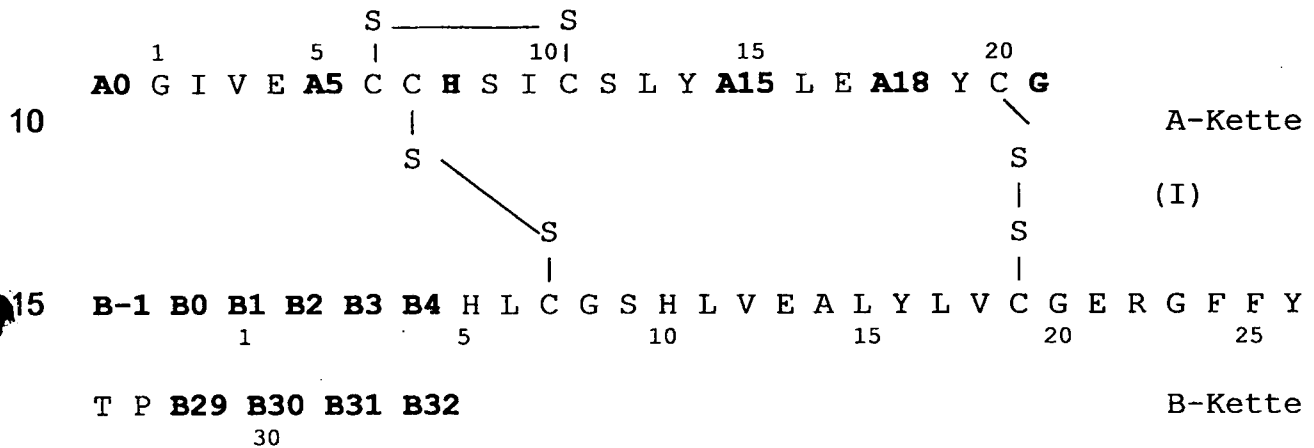
Die Experimente wurden, wie in Beispiel 35 beschrieben, durchgeführt. Figur 4 zeigt das Ergebnis. Danach lässt sich die Zeit – Wirkungskurve des erfindungsgemäßen
10 Insulinanalogons durch den Gehalt an Zinkionen in der Formulierung bei gleicher Insulinkonzentration in der Weise beeinflussen, dass man bei null oder geringem Zinkgehalt einen schnellen Wirkungseintritt beobachtet und die Wirkung über 24 Stunden anhält, während bei höherem Zinkgehalt ein flacher Wirkungseintritt beobachtet wird und die Insulinwirkung deutlich länger als 24 Stunden anhält.

DE2008/001 WO

Dr. OL

Patentansprüche:

5 1. Insulinanalogon der Formel I



B4 Asp, Glu oder Gln;

B29 Lys oder einer chemischen Bindung;

5 B30 Thr oder einer chemischen Bindung;

B31 Arg, Lys oder einer chemischen Bindung;

B32 Arg-Amid, Lys-Amid oder einer Aminogruppe

10

entspricht, wobei zwei Aminosäurereste der Gruppe enthaltend A5, A15, A18, B-1, B0, B1, B2, B3 und B4 gleichzeitig und unabhängig voneinander Asp oder Glu entsprechen.

15 2. Insulinanalogon gemäß Anspruch 1, wobei A0 Arg entspricht.

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

20 4. Insulinanalogon gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, wobei A15 Glu entspricht.

5. Insulinanalogon gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, wobei A18 Asp entspricht.

25

6. Insulinanalogon gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, wobei B-1 einer Aminogruppe entspricht.

30 7. Insulinanalogon gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, wobei B0 Glu entspricht.

8. Insulinanalogon gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, wobei B1 Asp entspricht.

9. Insulinanalogon gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, wobei B2 Val 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 B29 Lys entspricht.

13. Insulinanalogon gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, wobei B30 Thr entspricht.

14. Insulinanalogon gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, wobei B31 Arg oder Lys entspricht.

15. Insulinanalogon gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, wobei B32 Arg –NH₂ oder Lys-NH₂ entspricht.

16. Insulinanalogon gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, ausgewählt aus einer Gruppe enthaltend:

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂

Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂

Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂

Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂

Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Glu(A5), Glu (A15), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂

Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Glu (A15), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His(A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂
Humaninsulin,

5 Arg (A0), His(A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂

10 Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂
Humaninsulin,

15 Arg (A0), His(A8), Gly (A21), Asp (B3), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂

20 Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂
Humaninsulin,

25 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂

30 Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂
Humaninsulin,

5 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂
Humaninsulin,

10 Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂
Humaninsulin,

15 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂
Humaninsulin,

20 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂
Humaninsulin,

25 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B30), Arg (B31) – NH₂
Humaninsulin,

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B30), Lys (B31) – NH₂
Humaninsulin.

30 17. Verfahren zur Herstellung eines Insulinanalogons gemäß einem der
Ansprüche 1 bis 16.

18. Verfahren gemäß Anspruch 17, 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.

19. Verwendung eines Insulinanalogons gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16
5 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Diabetes Mellitus.

20. Verwendung gemäß Anspruch 19 in einem Verfahren zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Diabetes Mellitus Typ I oder Typ II oder zur therapeutischen Unterstützung der beta –Zellregeneration.

10

21. Arzneimittel enthaltend ein Insulinanalog gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16 und/oder physiologisch verträgliche Salze davon.

15

22. Formulierung des Insulinanalogons gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16, wobei die Formulierung in wässriger Form enthaltend das gelöste Insulinanalogon vorliegt.

20

23. Formulierung des Insulinanalogons gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16, wobei die Formulierung in Form von Pulver vorliegt.

24. Formulierung gemäß Anspruch 23, wobei das Insulinanalogon gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16 in kristalliner und/oder amorpher Form vorhanden ist.

25

25. Formulierung des Insulinanalogons gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16, wobei die Formulierung in Form einer Suspension vorliegt.

26. Formulierung des Insulinanalogons gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16, wobei die Formulierung zusätzlich ein chemisches Chaperon enthält.

30

27. DNA kodierend für einen Vorläufer eines Insulinanalogons gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16.

28. DNA kodierend für die A-Kette eines Insulinanalogons gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16.

29. DNA kodierend für die B-Kette eines Insulinanalogons gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16.

30. Vektor enthaltend eine DNA nach einem oder mehreren der Ansprüche 27 bis 29.

31. Wirtsorganismus enthaltend eine DNA nach einem oder mehreren der Ansprüche 27 bis 29 oder einen Vektor gemäß Anspruch 30.

32. Präproinsulinanalogon, dadurch gekennzeichnet, dass das C-Peptid an seinem N-Terminus den Aminosäurerest Arginin und an seinem C-Terminus zwei Argininreste oder einen Argininrest und einen Lysinrest trägt, wobei in letzterem Falle der Lysinrest den eigentlichen C-Terminus bildet.

33. Formulierung nach einem oder mehreren der Ansprüche 22 bis 26, 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.

34. Formulierung nach Anspruch 33, bei dem zusätzlich Exendin-4 enthalten ist.

35. Formulierung gemäß Anspruch 33, 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.

36. Formulierung gemäß Anspruch 33, 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.

5

37. Formulierung gemäß Anspruch 36, bei denen an die C-Termini der Analoga von Exendin-4 das Peptid -Lys₆-NH₂ angefügt ist.

38. Formulierung gemäß Anspruch 33, bei dem ein Analogon von Exendin-4

10 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,

15 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,

20 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,

25 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,

30 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,

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,
 5 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.

10

39. Formulierung nach Anspruch 33, 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.

15

40. Wässrige Formulierung des Insulinanalogons gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16, die kein oder weniger als 15 µg/ml Zink enthält.

41. Wässrige Formulierung des Insulinanalogons gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16, die kein oder weniger als 15 µg/ml bis 2 mg/ml Zink enthält.

20

42. Formulierung gemäß Anspruch 41, wobei 200 µg/ml Zink enthalten sind.

Fig. 1

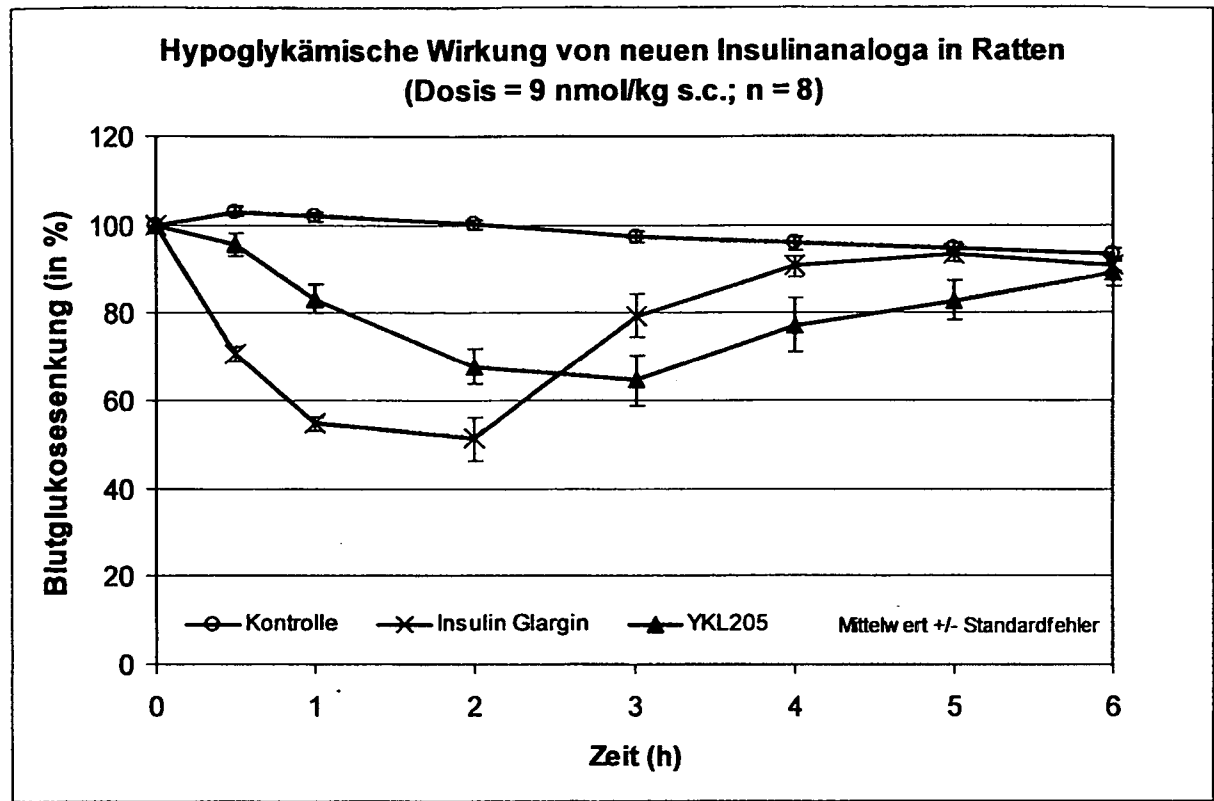


Fig. 2

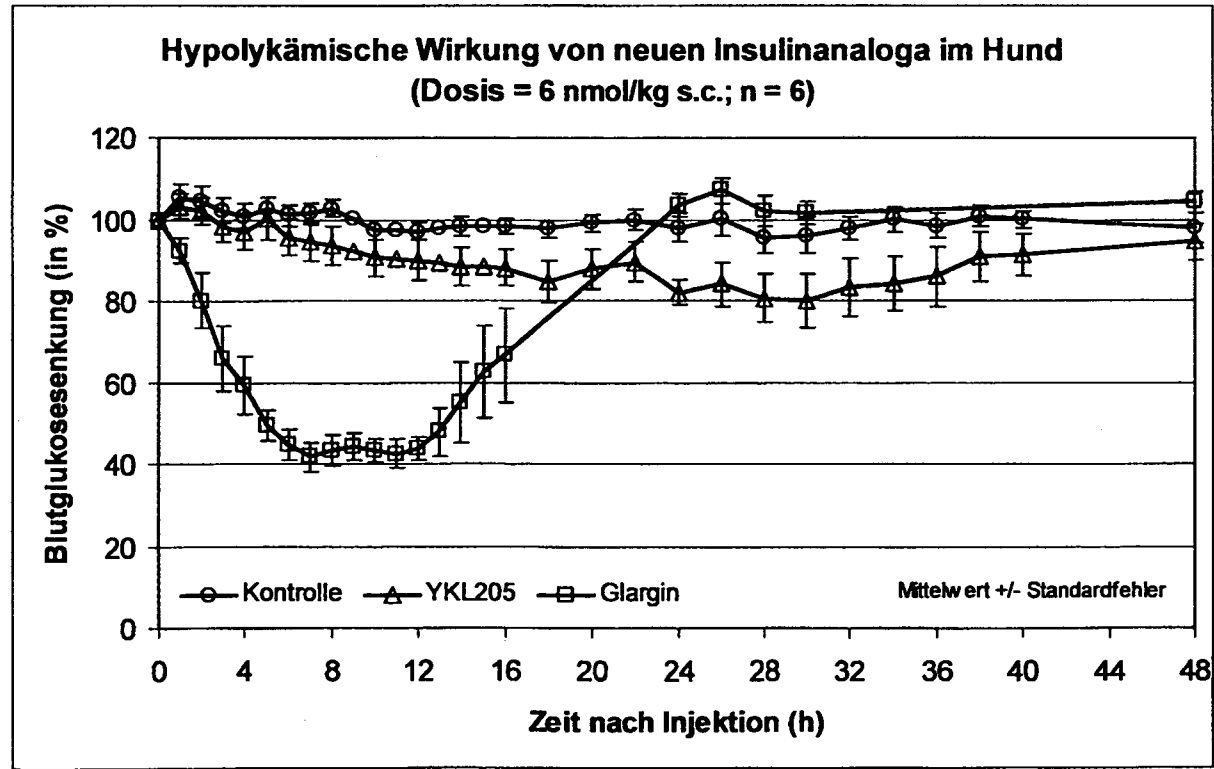


Fig. 3

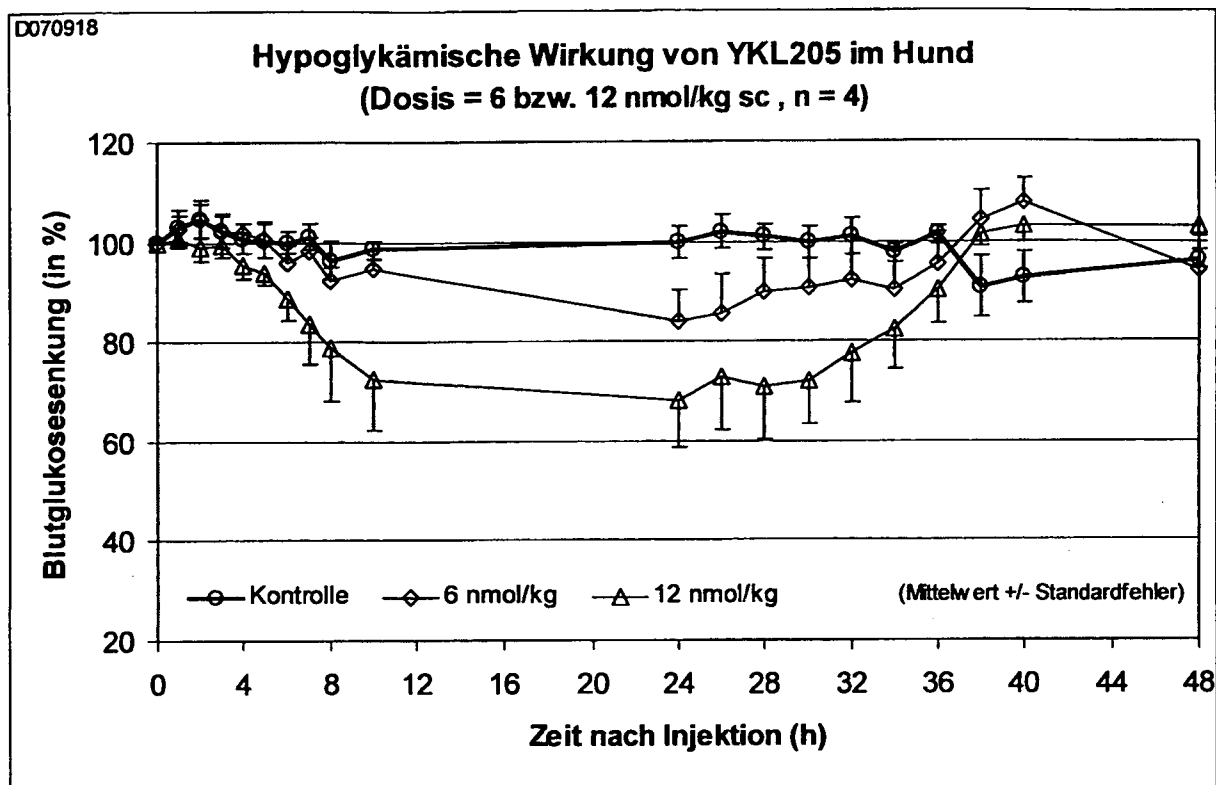
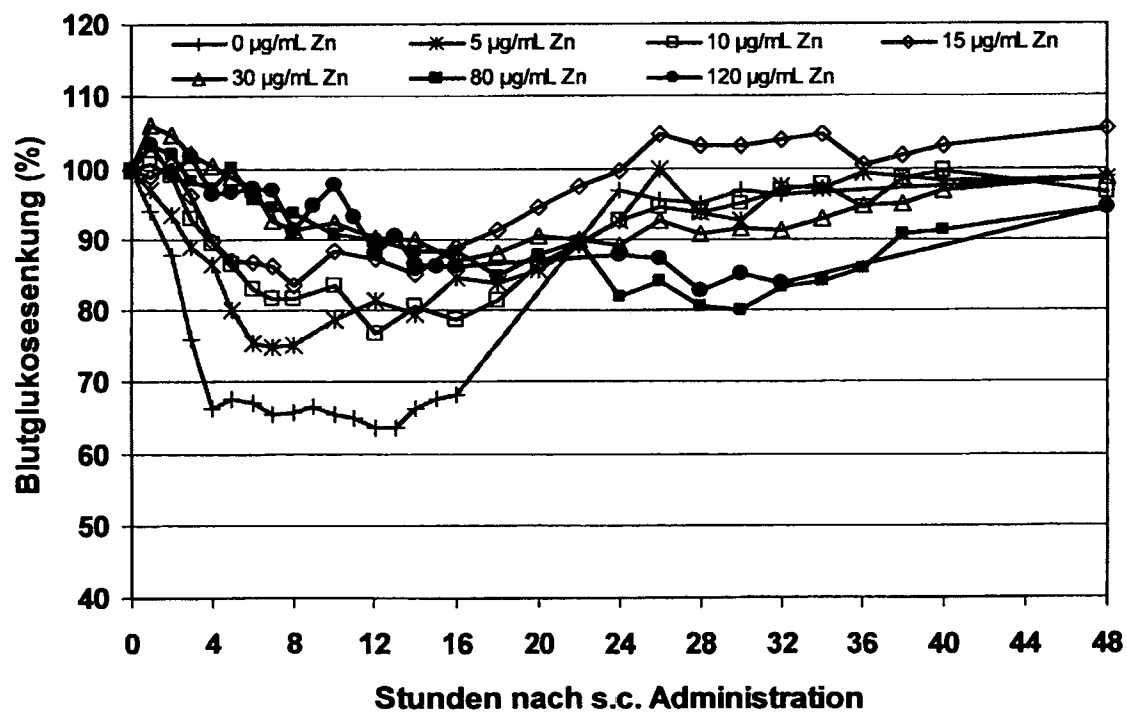


Fig. 4

5

Zinkabhängigkeit der hypoglykämischen Wirkung von YKL205 im Hund
(Dosis = 6 nmol/kg s.c.; n = 5-6)



Nuevos derivados de insulina con perfil tiempo/acción extremadamente retardado

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

5 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 insulina. Ahora hay disponibles diferentes insulinas con propiedades farmacológicas específicas. En la
10 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, son insulinas lentas, insulina de depósito o, si no, insulina basal. Los ingredientes activos en muchos de estos productos de insulina son
15 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.

 La política de la terapia con insulina intensificada intenta disminuir el riesgo
20 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 de desarrollar nuevas insulinas basales mejoradas consiste en minimizar el número de sucesos
25 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 minimiza claramente el riesgo de una breve hipoglucemia e, incluso, se hace posible una administración sin ingesta previa de
30 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 minimiza una variabilidad específica para el paciente y una variabilidad específica para el día. Así, el perfil farmacocinético de una insulina basal ideal debería
35 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 en 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 arginamida, y
- el residuo aminoácido N-terminal de la cadena de insulina A es un residuo lisina o

arginina, y

- la posición A8 del aminoácido está ocupada por un residuo histidina, y
- la posición A21 del aminoácido está ocupada por un residuo glicina, es decir, en el residuo aminoácido de carácter básico en el extremo de la cadena B el grupo carboxilo del aminoácido terminal está presente en su forma amidada, y
- existen dos sustituciones de aminoácidos neutros por aminoácidos de carácter ácido, dos adiciones de residuos aminoácidos cargados negativamente, o una de dichas sustituciones y una de dichas adiciones, respectivamente, en las posiciones A5, A15, A18, B-1, B0, B1, B2, B3 y B4.

10 Mientras que los tres primeros rasgos mencionados tienden, a través de la introducción de cargas positivas o de la eliminación de cargas negativas, a contribuir en el incremento del pl de un correspondiente análogo de insulina, las sustituciones y/o adiciones de residuos aminoácidos cargados negativamente, mencionadas en
15 último lugar, tienen el efecto opuesto y contribuyen a reducir el pl. De forma sorprendente, precisamente los análogos de insulina descritos tienen los perfiles tiempo/acción ventajosos deseados. Los valores pl de estos compuestos son más bajos que el del compuesto 18 de Kohn et al. (Arg (A0), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) insulina humana), pero, no obstante, muestran, además, una aparición retardada de la acción y una duración de la acción más prolongada, es decir un perfil de acción
20 uniforme, extremadamente plano y de larga duración. Así, se minimiza claramente el riesgo de sucesos hipoglucémicos. La demora es tan acusada que, sorprendentemente, es posible detectar el efecto, incluso en experimentos con modelos en ratas, a pesar de que la acción retardada de la insulina glargina no puede observarse, en contraposición, de modo inequívoco en ratas. La figura 1 muestra el
25 efecto hipoglucémico del compuesto YKL205 de la invención, comparado con el de la insulina glargina. Resultados similares se obtienen en perros (véase la figura 2). 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 propiedades claramente mejores, en
30 comparación con la insulina glargina en aspectos farmacológicos tales como, por ejemplo, especificidad para el receptor y mitogenicidad in vitro. Las insulinas reivindicadas muestran también ventajas en aspectos físico-químicos.

Así, la invención se refiere a un análogo de insulina de la fórmula I

La invención se refiere, de manera particularmente preferible, a un análogo de insulina, seleccionado del grupo que comprende:

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,

5 Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,

10 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Glu (A15), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Glu (A15), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,

15 Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,

20 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,

25 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,

30 Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,

35 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,

- Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,
- 5 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,
- 10 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,
- 15 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,
- 20 Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,
- 25 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,
- 30 Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,
- 35 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B30), Arg (B31) – NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B30), Lys (B31) – 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 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 ha mencionado antes, en particular 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 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, en particular de diabetes de tipo I o tipo II. De igual modo, la invención se refiere al uso de un análogo de insulina según se describe antes, para la fabricación de un medicamento para ayudar a la regeneración de células beta.

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

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 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 la forma de un polvo.

La invención se refiere, además, a una formulación según se describe antes, en que el análogo de insulina según se describe antes está presente en forma cristalina y/o amorfa.

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 chaperona química.

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

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 dos residuos arginina o un residuo arginina y un residuo lisina en su extremo C, y en este último caso el residuo lisina forma el extremo C real.

La invención se refiere, además, a una formulación según se describe antes, que comprende, adicionalmente, también un péptido similar al glucagón 1 (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 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 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), 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), 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 antes, en la que 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,
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,
5 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,
H- des Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵]exendina-4(1-39)-NH₂,
10 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,
H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
15 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,
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,
20 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,

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,
25 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,
H-(Lys)₆- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Met(O)¹⁴, Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-
NH₂,
30 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.

La invención se refiere, además, a una formulación según se describe antes que comprende, adicionalmente, Arg³⁴, Lys²⁶ (N^ε(γ-glutamil(N^α-hexadecanoíl))) GLP-1
35 (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 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 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 pancreáticas a partir de células madre se inicia mediante la administración de factores de diferenciación. 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.

La invención se refiere, además, a un producto farmacéutico que comprende un análogo de insulina 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 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 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.

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.

Si la preparación tiene un contenido en zinc, se da preferencia a una de 1 a 2 mg/ml, en particular de 1 µg/ml a 200 µg de zinc/ml.

El perfil de acción de los análogos de insulina de la invención puede verse
5 influenciado de manera satisfactoria, sorprendentemente, al añadir Zn. Esto permite que las preparaciones 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 y, así, permitan una estabilización individual del paciente. Surge otra posibilidad a través del uso de un
10 "dispositivo de insulina de dos cámaras" que permite administrar una formulación con una rápida aparición de la acción y/o una aparición lenta gradual de la acción, dependiendo de la situación vital.

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
15 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) o que corresponde directamente a GLP-1. La invención se refiere, igualmente, a productos farmacéuticos (preparaciones) de este tipo.

Concentraciones de ingrediente activo preferidas son aquellas que
20 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.
25 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
30 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,
35 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.

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 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.

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 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 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 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 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 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:

Fig. 1: efecto reductor de glucosa en sangre de nuevos análogos de insulina en ratas

Fig. 2: efecto reductor de glucosa en sangre de nuevos análogos de insulina en perros

Fig. 3: efecto reductor de glucosa en sangre de YKL205 en perros

Fig. 4: dependencia de zinc del efecto hipoglucémico de YKL205 en perros

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.

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 que

tiene propiedades particulares. Se sintetizan tres secuencias de cebador:

pint3580_glya21rev

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

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.

10

arg_cjuncf

5'-GTCCCTGCAGC**GT**CGCGGCATCGTGGAGCAG-3' (SEQ ID NO: 4)

15

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

20

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

25

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.

30

35

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.

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

10 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

15 5'-AGCAGTGCTGCC**AC**AGCATCTGCTCCCTCTAC-3' (SEQ ID NO: 6)

pint3580_Ha8rev

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

25 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.

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

35 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 5'GCATCGTGGAG**GAG**TGCTGCCACAGCATCTG 3' (SEQ ID NO: 8)

pint3581_Ea5rev

5'-CTGT GGCAGCA**CTC** CTCCACGATG CCGCGACG-3' (SEQ ID NO: 9)

10

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.

15

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

20

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

25

5' CAAAGGTCGACTATTAGCCGCAGTAG**TC**CTCCAGCTGGTAGAGGGAG 3' (SEQ ID NO: 10)

30

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.

Ejemplo 5: Construcción del plásmido pINT3584 que codifica His (A8), Glu (A5), Asp (A18), Gly (A21) – preproinsulina

35

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 . pint3580_Da18rev (ej. 4). El molde es ADN del plásmido pINT3582. Los plásmidos correctos se denominan pINT3584. La preproinsulina
 5 codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL205-1, el cual resulta después de la amidación con argininamida y describe la siguiente estructura:

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana

10

La correspondiente amidación con lisinamida conduce al compuesto YKL205-1b:

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina
 15 humana

Ejemplo 6: Construcción del plásmido pINT3585 que codifica His (A8), Glu (A15), Gly (A21) – preproinsulina

20

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:

25

pint3580_Ea15rev

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

30

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

35

Ejemplo 7: Construcción del plásmido pINT3586 que codifica His (A8), Glu (A15), 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:

5

pint3585_Ea15_Da18rev

5'- CAAAGGTCGACTATTAGCCGCAGTAGTCCTCCAGCTCGTAGAGGGAGCAG
ATGCTG -3' (SEQ ID NO: 12)

10

El codón para ácido glutámico en la posición 15 de la cadena A y para ácido aspártico en la posición A18 de la cadena A queda resaltado mediante negrillas en cada caso. El molde es ADN del plásmido pINT3581. Los plásmidos correctos se denominan pINT3586. La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL205, el cual resulta después de la amidación con argininamida y describe la siguiente estructura:

15

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ –
insulina humana

20

La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL205b, el cual resulta después de la amidación con lisinamida y describe la siguiente estructura:

25

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ –
insulina humana

Ejemplo 8: Construcción del plásmido pINT3587 que codifica Glu (A5), His (A8), Glu (A15), Gly (A21) – preproinsulina

30

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 utilizan los cebadores Tir y pint3580_Ea15rev mostrados en el ejemplo 6. El molde es ADN del plásmido pINT3582. Los plásmidos correctos se denominan pINT3587. La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL205-2, el

35

cual resulta después de la amidación con argininamida y describe la siguiente estructura:

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ –
5 insulina humana

La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL205-2b, el cual resulta después de la amidación con lisinamida y describe la siguiente estructura:

10

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ –
insulina humana

Ejemplo 9: Construcción del plásmido pINT3588 que codifica His (A8), Gly (A21), Asp
15 (B3) – 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
20 Nco1 / Sal1. Se utilizan los cebadores Tir y pint3580_glya21rev. Se sintetizan dos cebadores adicionales:

pint3581_Db3f

25 5'- GCACGATTTGTGG**G**ACCAGCACCTGTGCGGC -3' (SEQ ID NO: 13)

pint3581_Db3rev

30 5'- CACAGG TGCTGG**T**CCA CAAATCGTGC CGAATTTC -3' (SEQ ID NO: 14)

El codón que codifica ácido aspártico 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.

35

Ejemplo 10: Construcción del plásmido pINT3589 que codifica Glu (A5), His (A8), Gly

(A21), Asp (B3) – preproinsulina

Llevando a cabo las reacciones según se describe en el ejemplo 9, pero utilizando ADN del plásmido pINT3582 como molde en las PCR1 y PCR2 se obtiene el
5 plásmido pINT3589.

La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL205-3, el cual resulta después de la amidación con argininamida y describe la siguiente estructura:

10 Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – insulina humana

La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL205-3b, el cual resulta después de la amidación con lisinamida y describe la
15 siguiente estructura:

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – insulina humana

20 Ejemplo 11: Construcción del plásmido pINT3590 que codifica His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3) – preproinsulina

Llevando a cabo las reacciones según se describe en el ejemplo 9, pero utilizando ADN del plásmido pINT3585 como molde en las PCR1 y PCR2 resulta el
25 plásmido pINT3590. La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL205-4, el cual resulta después de la amidación con argininamida y describe la siguiente estructura:

30 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – insulina humana

La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL205-4b, el cual resulta después de la amidación con lisinamida y describe la
35 siguiente estructura:

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ –

insulina humana

Ejemplo 12: Construcción del plásmido pINT3591 que codifica His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3) – preproinsulina

5

Llevando a cabo las reacciones según se describe en el ejemplo 9, pero utilizando ADN del plásmido pINT3586 como molde en las PCR1 y PCR2 se obtiene el plásmido pINT3591. La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL205-5, el cual resulta después de la amidación con argininamida y describe la siguiente estructura:

10

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – insulina humana

15

La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL205-5b, el cual resulta después de la amidación con lisinamida y describe la siguiente estructura:

20

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – insulina humana

Ejemplo 13: Construcción del plásmido pINT3592 que codifica His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Glu (B4) – 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 de 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:

30

pint3581_Db3_Eb4f

5'-GCACGATTTGTGG**ACGAG**CACCTGTGCGGCTC-3' (SEQ ID NO: 15)

35

pint3581_Db3_Eb4rev

5'- CGCACAGG TGCTCGTCCA CAAATCGTGC CGAATTTC -3' (SEQ ID NO: 16)

El codón que codifica ácido aspártico en la posición 3 y ácido glutámico en la posición 4 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 pINT3592. La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL205-6, el cual resulta después de la amidación con argininamida y describe la siguiente estructura:

10

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – insulina humana

La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL205-6b, el cual resulta después de la amidación con lisinamida y describe la siguiente estructura:

15

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – insulina humana

20

Ejemplo 14: 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:

30

pint3581_Eb4f

5'- ACGATTTGTGAAC**GAG**CACCTGTGCGGCTC -3' (SEQ ID NO: 17)

pint3581_Eb4rev

35

5'- CGCACAGG TGCTCGTTCA CAAATCGTGC CGAATTTC -3' (SEQ ID NO: 18)

El codón que codifica ácido glutámico 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.

5

Ejemplo 15: Construcción del plásmido pINT3594 que codifica Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B4) – preproinsulina

10 Llevando a cabo las reacciones según se describe en el ejemplo 9, pero utilizando ADN del plásmido pINT3582 como molde en las PCR1 y PCR2 se obtiene el plásmido pINT3594.

La proinsulina es el precursor del compuesto YKL205-7, el cual resulta después de la amidación con argininamida y describe la siguiente estructura:

15 Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – insulina humana

La proinsulina es el precursor del compuesto YKL205-7b, el cual resulta después de la amidación con lisinamida y describe la siguiente estructura:

20

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – insulina humana

25 Ejemplo 16: Construcción del plásmido pINT3595 que codifica His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4) – preproinsulina

Llevando a cabo las reacciones según se describe en el ejemplo 9, pero utilizando ADN del plásmido pINT3585 como molde en las PCR1 y PCR2 se obtiene el plásmido pINT3595. La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL205-8, el cual resulta después de la amidación con argininamida y describe la siguiente estructura:

30

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – insulina humana

35

La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto

YKL205-8b, el cual resulta después de la amidación con lisinamida y describe la siguiente estructura:

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ –
5 insulina humana

Ejemplo 17: Construcción del plásmido pINT3596 que codifica His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4) – preproinsulina

10 Llevando a cabo las reacciones según se describe en el ejemplo 9, pero utilizando ADN del plásmido pINT3586 como molde en las PCR1 y PCR2 se obtiene el plásmido pINT3596. La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL205-9, el cual resulta después de la amidación con argininamida y describe la siguiente estructura:

15 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – insulina humana

La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto
20 YKL205-9b, el cual resulta después de la amidación con lisinamida y describe la siguiente estructura:

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ –
insulina humana

25 Ejemplo 18: 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.
30 Se utiliza el cebador pint3580_glya21rev. Se sintetizan dos cebadores adicionales:

pint3581_Eb0f1

5'- CAACAGGAA ATTCGGCACG AGAGTTTGTG AACCAGCACC TGTG-3' (SEQ ID
35 NO: 19)

pint3581_Eb01f2

5'- TATCGA CCAT GG CAACAACA TCAACAGGAA ATTCGGCACG AGAG-3' (SEQ ID NO: 20).

5

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.

10

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 de Nco1 / Sal1, en el ADN del vector pINT91d abierto con Nco1 / Sal1. Los plásmidos correctos se denominan pINT3597. 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.

15

20

Ejemplo 19: Construcción del plásmido pINT3598 que codifica Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B0) – preproinsulina

25

Llevando a cabo las reacciones según se describe en el ejemplo 18, pero utilizando ADN del plásmido pINT3582 como molde en las PCR1 y PCR2 se obtiene el plásmido pINT3598. La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL205-10, el cual resulta después de la amidación con argininamida y describe la siguiente estructura:

30

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – insulina humana

35

La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL205-10b, el cual resulta después de la amidación con lisinamida y describe la siguiente estructura:

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – insulina humana

5 Ejemplo 20: Construcción del plásmido pINT3599 que codifica His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0) – preproinsulina

Llevando a cabo las reacciones según se describe en el ejemplo 18, pero utilizando ADN del plásmido pINT3585 como molde en la PCR1 se obtiene el plásmido pINT3599. La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL205-11, el cual resulta después de la amidación con argininamida y describe la siguiente estructura:

15 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – insulina humana

La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL205-11b, el cual resulta después de la amidación con lisinamida y describe la siguiente estructura:

20 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – insulina humana

Ejemplo 21: Construcción del plásmido pINT3600 que codifica His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0) – preproinsulina

25

Llevando a cabo las reacciones según se describe en el ejemplo 18, pero utilizando ADN del plásmido pINT3586 como molde en la PCR1 se obtiene el plásmido pINT3600. La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL205-12, el cual resulta después de la amidación con argininamida y describe la siguiente estructura:

30

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – insulina humana

35

La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL205-12b, el cual resulta después de la amidación con lisinamida y describe la

siguiente estructura:

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ –
insulina humana

5

Ejemplo 22: Construcción del plásmido pINT3601 que codifica His (A8), Gly (A21),
Asp (B1) – preproinsulina

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

pint3581_Db1f1

5'-CAACAGGAA ATTCGGCACG AGACGTG AACCAGCACC TGTGCG-3' (SEQ ID
15 NO: 21)

pint3581_Db1f2

5'-TATCGA CCAT GG CAACAACA TCAACAGGAA ATTCGGCACG AGAC-3' (SEQ
20 ID NO: 22)

En este caso, existe un solapamiento parcial de los dos cebadores.
Pint3581_Db-1f2 contiene una secuencia de reconocimiento de NcoI. Ésta se
representa subrayada. El codón que codifica ácido aspártico en la posición 1 de la
25 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_Db1f1 / 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_Db1f2 /
pint3580_glya21rev. El producto de la PCR2 cubre la secuencia completa de la
30 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 pINT3601.

Ejemplo 23: Construcción del plásmido pINT3602 que codifica Glu (A5), His (A8), Gly
35 (A21), Asp (B1) – preproinsulina

Llevando a cabo las reacciones según se describe en el ejemplo 22, utilizando ADN del plásmido pINT3582 como molde en la PCR1 se obtiene el plásmido pINT3602. La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL205-13, el cual resulta después de la amidación con argininamida y describe la
5 siguiente estructura:

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – insulina humana

10 La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL205-13b, el cual resulta después de la amidación con lisinamida y describe la siguiente estructura:

Arg (A0), Glu (A5), His (A8), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – insulina
15 humana

Ejemplo 24: Construcción del plásmido pINT3603 que codifica His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1) – preproinsulina

20 Llevando a cabo las reacciones según se describe en el ejemplo 22, utilizando ADN del plásmido pINT3585 como molde en la PCR1 se obtiene el plásmido pINT3603. La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL205-14, el cual resulta después de la amidación con argininamida y describe la siguiente estructura:

25 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – insulina humana

La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto
30 YKL205-14b, el cual resulta después de la amidación con lisinamida y describe la siguiente estructura:

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – insulina humana

35

Ejemplo 25: Construcción del plásmido pINT3604 que codifica His (A8), Asp (A18),

Gly (A21), Asp (B1) – preproinsulina

Llevando a cabo las reacciones según se describe en el ejemplo 22, pero utilizando ADN del plásmido pINT3586 como molde en la PCR1 se obtiene el plásmido pINT3604. La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL205-15, el cual resulta después de la amidación con argininamida y describe la siguiente estructura:

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ –
insulina humana

La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL205-15b, el cual resulta después de la amidación con lisinamida y describe la siguiente estructura:

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ –
insulina humana

Ejemplo 26: Construcción del plásmido pINT3605 que codifica His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1) – preproinsulina

La construcción tiene lugar mediante 2 reacciones en cadena de la polimerasa. Se utilizan el cebador pint3580_glya21rev y el cebador pint3581_Eb01f2 descritos en el ejemplo 18. Se sintetiza el cebador pint3597_Db1f:

5'-CAACAGGAA ATTCGGCACG **AGAGGACGTG** AACCAGCACC TGTGC-3' (SEQ ID NO: 23)

El codón que codifica ácido glutámico en la posición 0 y que codifica ácido aspártico en cada caso al comienzo de la cadena B queda resaltado mediante negrillas en cada caso. El molde para la PCR1 es ADN del plásmido pINT3597. La PCR1 se lleva a cabo con el par de cebadores pint3597_Db1f/ 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_Eb1f2 / 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 / Sal1, en el ADN del vector pINT91d abierto

con Nco1 / Sal1. Los plásmidos correctos se denominan pINT3605. La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL205-16, el cual resulta después de la amidación con argininamida y describe la siguiente estructura:

- 5 Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – insulina humana

La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL205-16a, el cual resulta después de la amidación con lisinamida y describe la
10 siguiente estructura:

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ – insulina humana

- 15 Ejemplo 27: Construcción del plásmido pINT3606 que codifica His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), desThr (B30) – preproinsulina

La construcción tiene lugar según se describe en los ejemplos 1 y 2 mediante 3 reacciones en cadena de la polimerasa. Se utilizan los cebadores Tir y
20 pint3580_glya21rev. Se sintetizan dos cebadores adicionales:

desB30f

5'-TTCTACACACCCAAGCGCGATGTTCTCAGGTGG-3' (SEQ ID NO: 24)

25

desB30rev

5'-AGG AACATCGCGC TTGGGTGTGT AGAAGAAGC-3' (SEQ ID NO: 25)

- 30 El molde para la PCR1 y la PCR2 es ADN del plásmido pINT3586. La PCR1 se lleva a cabo con el par de cebadores desB30f/ pint3580_glya21rev y la PCR2 se lleva a cabo con el par de cebadores Tir/ desB30rev molde. El molde utilizado para la PCR3 es una mezcla equimolar de los productos de la PCR1 y la PCR2. La reacción se lleva a cabo con el par de cebadores Tir/ pint3580_glya21rev. El producto de la PCR3 cubre
35 la secuencia completa de la preproinsulina. 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. La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL205-17, el cual resulta después de la amidación con argininamida y describe la siguiente estructura:

- 5 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B30), Arg (B31) – NH₂ –
insulina humana

- 10 La preproinsulina codificada por el plásmido es el precursor del compuesto YKL20517b, el cual resulta después de la amidación con lisinamida y describe la
siguiente estructura:

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B30), Lys (B31) – NH₂ –
insulina humana

- 15 Ejemplo 28: 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.

- 20 Ejemplo 29: Plegamiento de los derivados de proinsulina

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

- 25 Ejemplo 30: Tratamiento enzimático de la preproinsulina plegada para dar el precursor Arg(A0) – insulina de 2 cadenas, cuyo extremo C-terminal de la cadena B se caracteriza por lisina o arginina

- 30 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 caso emplear la variante de tripsina descrita en el documento WO 2007/031187 A1.

- 35 Ejemplo 31: Preparación de una Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – insulina humana

Independientemente del posicionamiento de los aminoácidos de carácter ácido adicionales, se lleva a cabo una reacción estándar como sigue: Se 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
5 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 produce la formación de >60% de Arg (A0), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ – insulina humana. La adición de solución de inhibidor de tripsina va seguida por la purificación del análogo amidado en
10 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 contiene 366 g/L de lisinamida en solución forma el material de partida.

15 Ejemplo 32: 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 los compuestos como sigue: el derivado de insulina de la invención se disolvió con una
20 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).

Como medio disolvente se utilizaron las siguientes composiciones:

- a) ácido clorhídrico 1 mM
- b) ácido clorhídrico 1 mM, 5 $\mu\text{g/ml}$ de zinc (añadido en forma de cloruro de zinc o ácido
25 clorhídrico)
- c) ácido clorhídrico 1 mM, 10 $\mu\text{g/ml}$ de zinc (añadido en forma de cloruro de zinc o ácido clorhídrico)
- d) ácido clorhídrico 1 mM, 15 $\mu\text{g/ml}$ de zinc (añadido en forma de cloruro de zinc o ácido clorhídrico)
- 30 e) ácido clorhídrico 1 mM, 30 $\mu\text{g/ml}$ de zinc (añadido en forma de cloruro de zinc o ácido clorhídrico)
- f) ácido clorhídrico 1 mM, 80 $\mu\text{g/ml}$ de zinc (añadido en forma de cloruro de zinc o ácido clorhídrico)
- g) ácido clorhídrico 1 mM, 120 $\mu\text{g/ml}$ de zinc (añadido en forma de cloruro de zinc o
35 ácido clorhídrico)

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 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 µg/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 ± 5 µM, la solución acabada se 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.

Ejemplo 33: Evaluación del efecto reductor de glucosa en sangre de nuevos análogos de insulina en ratas

15

El efecto reductor de glucosa en sangre de nuevos análogos de insulina seleccionados se testa en ratas Wistar machos sanas normoglucémicas. 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.

25

Ejemplo 34: 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 (véase la fig. 2) 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.

Ejemplo 35: Evaluación del efecto reductor de glucosa en sangre en perros con una dosis incrementada dos veces

- 5 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 y 12 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
- 10 de hasta 48 horas después de la inyección, y se determina en ellas el contenido de glucosa en sangre. El experimento muestra claramente (véase la fig. 3) que el análogo de insulina de la invención empleado tiene un efecto dependiente de la dosis, pero que, a pesar de haberse incrementado la dosis dos veces, el perfil de acción es plano, es decir, no se observa punto bajo (nadir) pronunciado alguno. De ello se puede
- 15 deducir que las insulinas de la invención conducen a un número claramente menor de sucesos hipoglucémicos en comparación con las insulinas lentas conocidas.

Ejemplo 36: Evaluación del efecto reductor de glucosa en sangre en perros con diferentes concentraciones de zinc en la formulación

20

- Los experimentos se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 35. La figura 4 muestra el resultado. De acuerdo con ello, la curva de efecto-tiempo del análogo de insulina de la invención puede verse influenciada por el contenido en iones zinc en la formulación con la misma concentración de insulina, de tal modo que se
- 25 observa una rápida aparición de la acción con un contenido de zinc cero o bajo, y el efecto se mantiene durante 24 horas, mientras que se observa una aparición gradual de la acción con un contenido de zinc más alto, y el efecto de la insulina se mantiene claramente durante más de 24 horas.

30

4. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que A15 corresponde a Glu.
- 5 5. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que A18 corresponde a Asp.
6. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que B-1 corresponde a un grupo amino.
- 10 7. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que B0 corresponde a Glu.
8. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que B1 corresponde a Asp.
- 15 9. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que B2 corresponde a Val.
10. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que B3 corresponde a Asp.
- 20 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 B29 corresponde a Lys.
- 25 13. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que B30 corresponde a Thr.
- 30 14. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que B31 corresponde a Arg o Lys.
15. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que B32 corresponde a Arg-NH₂ o Lys-NH₂.
- 35

16. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, seleccionado de un grupo que comprende:

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,

5 Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,

10 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Glu (A15), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Glu (A15), Gly (A21), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,

15 Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,

20 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,

25 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,

30 Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Asp (B3), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,

35 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,

- Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,
- 5 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B4), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,
- 10 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,
- 15 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Glu (B0), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,
- 20 Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,
- 25 Arg (A0), His (A8), Glu (A15), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,
- 30 Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,
- Arg (A0), His (A8), Gly (A21), Glu (B0), Asp (B1), Arg (B31), Lys (B32) – NH₂ insulina humana,
- 35 Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B30), Arg (B31) – NH₂ insulina humana,

Arg (A0), His (A8), Asp (A18), Gly (A21), Asp (B3), Arg (B30), Lys (B31) – NH₂ insulina humana.

5 17. Un procedimiento para preparar un análogo de insulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

10 18. El procedimiento según la reivindicación 17, en el 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 acoplamiento con argininamida en presencia de una enzima con actividad de tripsina, y el análogo de insulina se aísla.

19. El uso de un análogo de insulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, para la fabricación de un medicamento para tratar diabetes mellitus.

15 20. El uso según la reivindicación 19 en un procedimiento para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de diabetes mellitus de tipo I o tipo II o para asistir terapéuticamente en la regeneración de células beta.

20 21. Un producto farmacéutico que comprende un análogo de insulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 y/o sus sales fisiológicamente aceptables.

25 22. Una formulación del análogo de insulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en que la formulación está en una forma acuosa que comprende el análogo de insulina disuelto.

23. Una formulación del análogo de insulina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en que la formulación está en forma de un polvo.

30 24. La formulación según la reivindicación 23, en que el análogo de insulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 está presente en forma cristalina y/o amorfa.

25. Una formulación del análogo de insulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en que la formulación está en forma de una suspensión.

35 26. Una formulación del análogo de insulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en que la formulación comprende, adicionalmente, una chaperona química.

27. ADN que codifica un precursor de un análogo de insulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.
28. ADN que codifica la cadena A de un análogo de insulina según cualquiera de las
5 reivindicaciones 1 a 16.
29. ADN que codifica la cadena B de un análogo de insulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.
- 10 30. Un vector que comprende un ADN según una o más de las reivindicaciones 27 a 29.
31. Un organismo hospedante que comprende un ADN según una o más de las reivindicaciones 27 a 29 o un vector según la reivindicación 30.
15
32. Un análogo de preproinsulina, en donde el péptido C porta el residuo aminoácido arginina en su extremo N y dos residuos arginina o un residuo arginina y un residuo lisina en su extremo C, y en este último caso el residuo lisina forma el extremo C real.
- 20 33. La formulación según una o más de las reivindicaciones 22 a 26, 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.
34. La formulación según la reivindicación 33, que comprende, adicionalmente,
25 exendina-4.
35. La formulación según la reivindicación 33, en donde un análogo de exendina-4 se selecciona de un grupo que comprende
H-desPro³⁶-exendina-4-Lys₆-NH₂,
30 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.
36. La formulación según la reivindicación 33, en donde un análogo de exendina-4 se
35 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),
 desPro³⁶ [Met(O)¹⁴, IsoAsp²⁸]exendina-4 (1-39),
 desPro³⁶ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-2 (1-39),
 5 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)
 o una sal farmacológicamente tolerable de los mismos.
- 10 37. La formulación según la reivindicación 36, en que el péptido -Lys₆-NH₂ está fijado a los extremos C de los análogos de exendina-4.
38. La formulación según la reivindicación 33, en donde un análogo de exendina-4 se selecciona de un grupo que comprende
- 15 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,
 des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
- 20 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,
 H- des Asp²⁸ Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵]exendina-4(1-39)-NH₂,
- 25 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,
 H-Asn-(Glu)₅- des Pro³⁶, Pro³⁷, Pro³⁸ [Trp(O₂)²⁵, Asp²⁸]exendina-4(1-39)-(Lys)₆-NH₂,
- 30 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,
 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,
- 35 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,

- 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,
 5 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,
 10 o una sal farmacológicamente tolerable de los mismos.

39. La formulación según la reivindicación 33, que, adicionalmente, comprende Arg³⁴,
 Lys²⁶ (N^ε(γ-glutamil(N^α-hexadecanoil))) GLP-1 (7-37) [liraglutida] o una sal
 farmacológicamente tolerable de la misma.

15

40. Una formulación acuosa del análogo de insulina según cualquiera de las
 reivindicaciones 1 a 16, que comprende nada de zinc o menos de 15 µg/ml de zinc.

41. Una formulación acuosa del análogo de insulina según cualquiera de las
 20 reivindicaciones 1 a 16, que comprende nada de zinc o menos de 15 µg/ml a 2 mg/ml
 de zinc.

42. La formulación según la reivindicación 41, en que el contenido de zinc es
 200 µg/ml.

25

Resumen

NUEVOS DERIVADOS DE INSULINA CON PERFIL TIEMPO/ACCIÓN
EXTREMADAMENTE RETARDADO

5

La invención se refiere a nuevos análogos de insulina con un perfil de tiempo/acción basal que se caracterizan por los rasgos de que a) el extremo de la cadena B consiste en un residuo aminoácido de carácter básico, amidado, tal como lisina o argininamida, b) el residuo de aminoácido N-terminal de la cadena A de la insulina es un residuo lisina o arginina, c) la posición A8 del aminoácido está ocupada por un residuo histidina, d) la posición A21 del aminoácido está ocupada por un residuo glicina, y e) se efectúan una o más sustituciones y/o adiciones de residuos aminoácidos negativamente cargados en las posiciones A5, A15, A18, B-1, B0, B1, B2, B3 y B4.

10

Fig. 1

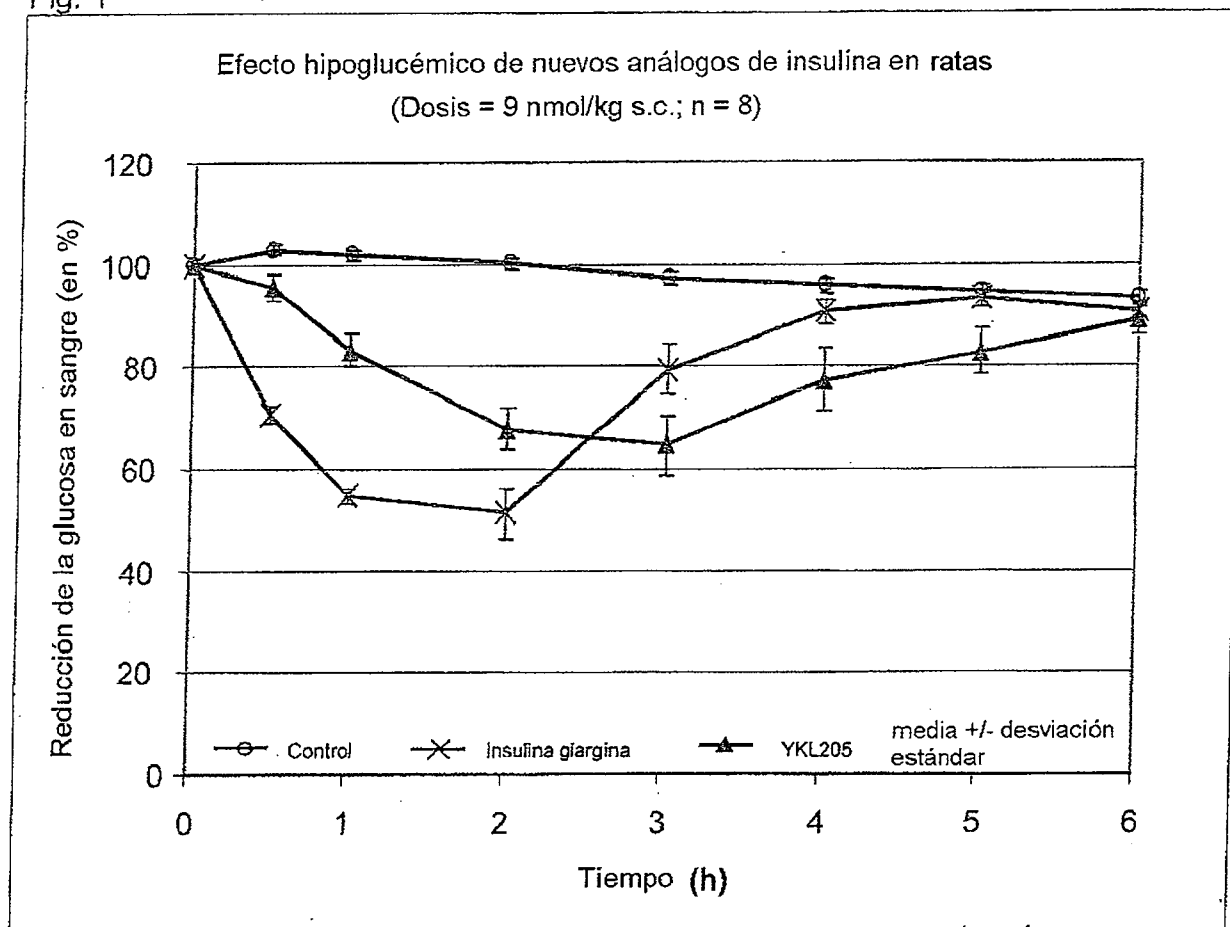


Fig. 2

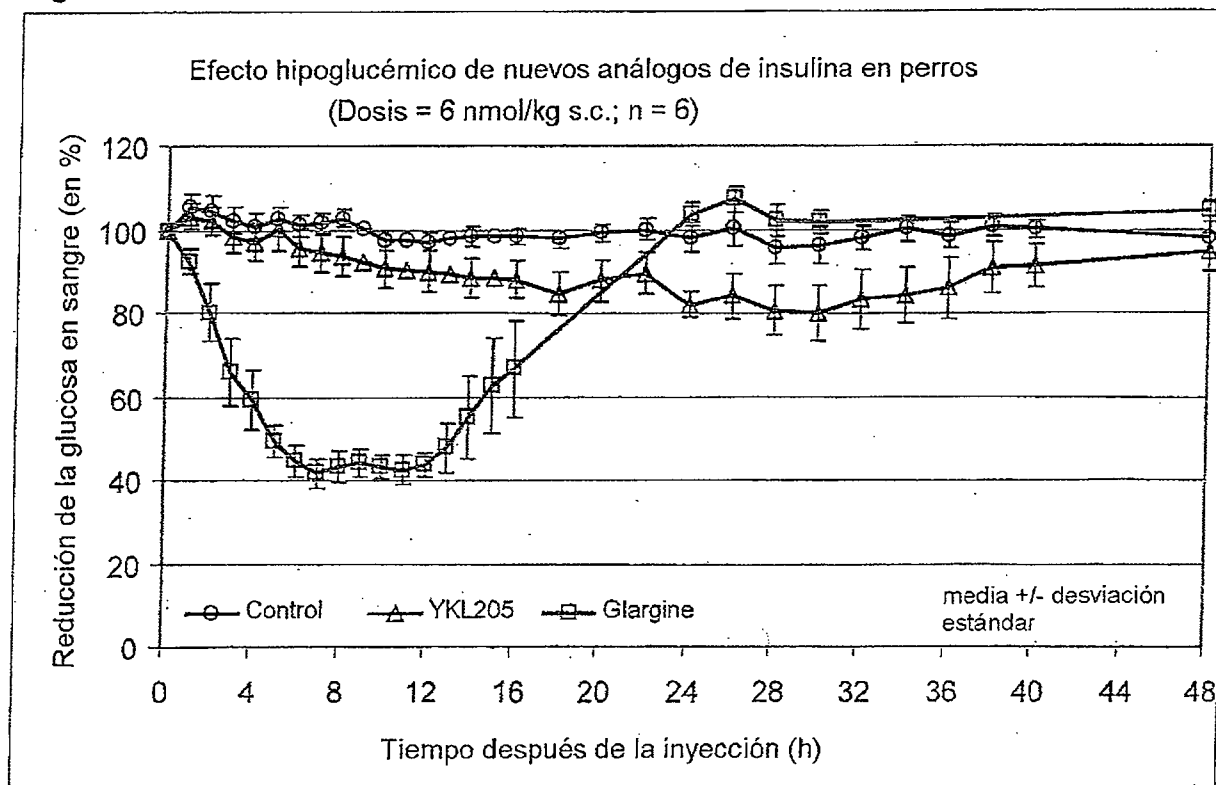


Fig. 3

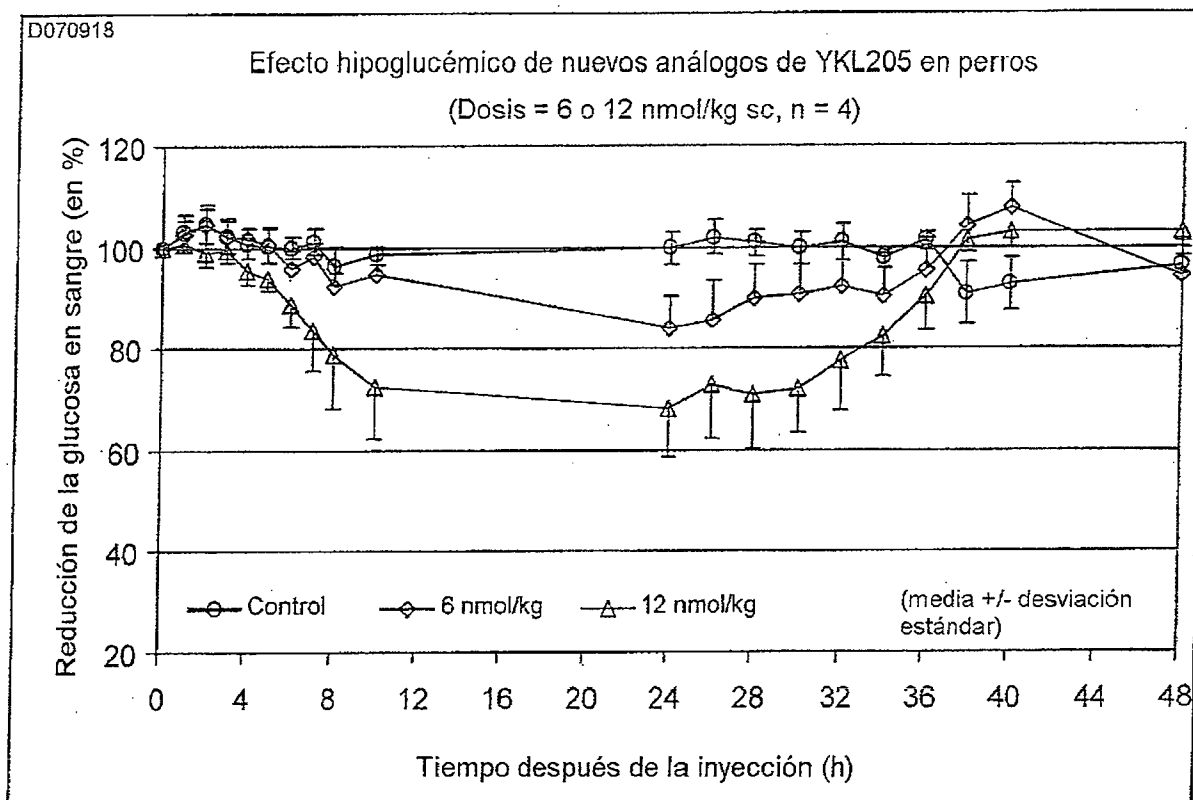
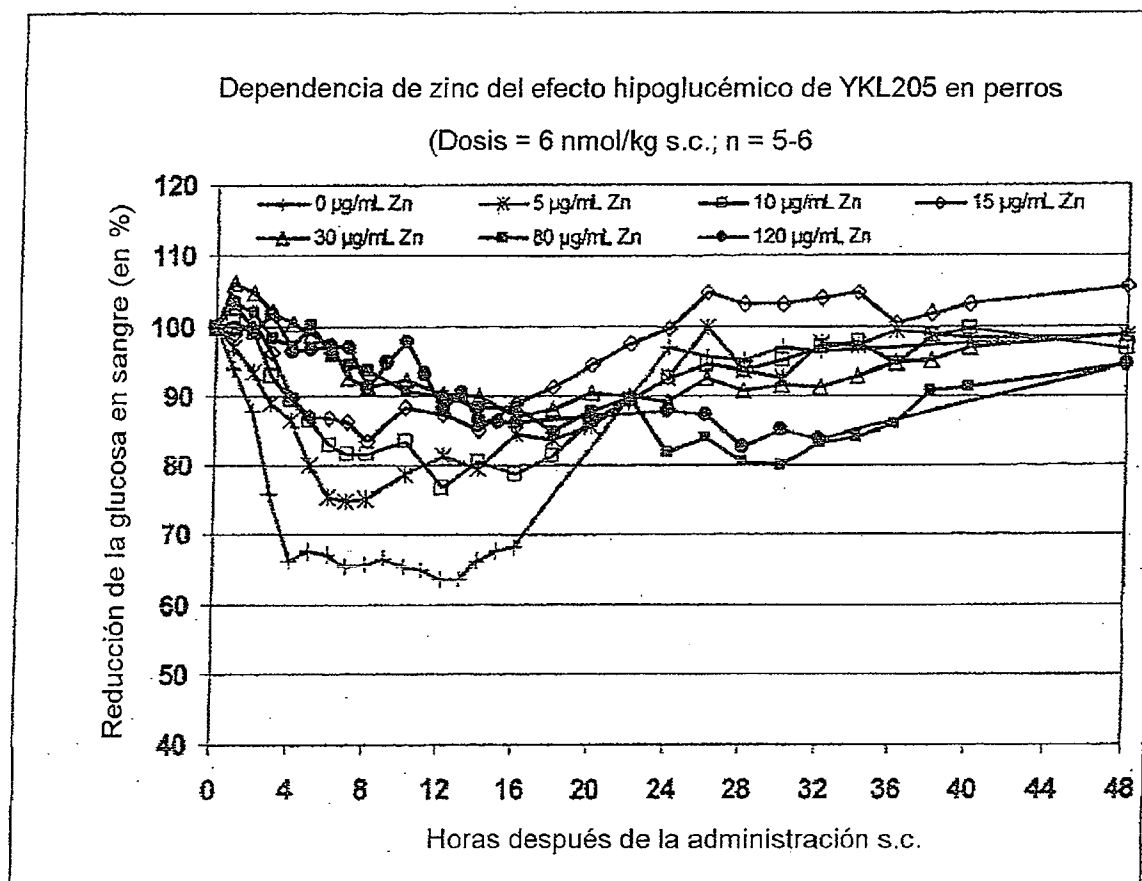


Fig. 4





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

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

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional:

(71) Solicitante(s) **SANOFI-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)	País
		10 2008 003 568.8		09/01/2008		DE
		61/044.659		14/04/2008		US
		10 2008 025 008.2		24/05/2008		DE

(85) Fecha inicio fase nacional:

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: **06/01/2009**
N° de solicitud **PCT/EP2009/000017**

(87)

Publicación internacional

Fecha: **16/07/2009**

N° publicación: **WO 2009/087081 A2**

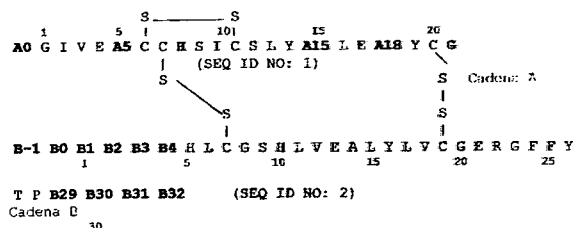
(54) Título: **NUEVOS DERIVADOS DE INSULINA CON PERFIL TIEMPO/ACCION EXTREMADAMENTE RETARDADO**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT

(21) N° de solicitud:		(51) int. Cl.:	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) SANOI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH	
(30) Prioridad	(31) N° Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	10 2008 003 568.8	09/01/2008	DE
	61/044.659	14/04/2008	US
	10 2008 025 008.2	24/05/2008	DE
		(72) Inventor(es) PAUL HABERMANN GERHARD SEIPKE ROLAND KURRLE Y OTROS	
		(74) Apoderado: DR. LUIS PATIÑO LEYVA	
(85)	Fecha límite 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 2009/087081 A2
	N° de solicitud PCT/EP2009/000017		
(54) Título: NUEVOS DERIVADOS DE INSULINA CON PERFIL TIEMPO/ACCION EXTREMADAMENTE RETARDADO			

Reivindicación(es):

1. Un análogo de insulina de la fórmula I



en que

- A0 corresponde a Lys o Arg;
A5 corresponde a Asp, Glu o Glu;
A15 corresponde a Asp, Glu o Glu;
A18 corresponde a Asp, Glu o Asn;
B-1 corresponde a Asp, Glu o un grupo amino;
B0 corresponde a Asp, Glu o un enlace químico;
B1 corresponde a Asp, Glu o Phe;
B2 corresponde a Asp, Glu o Val;
B3 corresponde a Asp, Glu o Asn;
B4 corresponde a Asp, Glu o Glu;
B29 corresponde a Lys 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, Lys-amida o un grupo amino,
- en que dos residuos aminoácidos del grupo que comprende A5, A15, A18, B-1, B0, B1, B2, B3 y B4 corresponden, simultánea e independientemente uno de otro, a Asp o Glu.

2. El análogo de insulina según la reivindicación 1, en que A0 corresponde a Arg.

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

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

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

6. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que B-1 corresponde a un grupo amino.

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

8. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que B1 corresponde a Asp.

9. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que B2 corresponde a Val.

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 B29 corresponde a Lys.

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

14. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que B31 corresponde a Arg o Lys.

15. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, en que B32 corresponde a Arg-NH₂ o Lys-NH₂.

16. El análogo de insulina según una o más de las reivindicaciones precedentes, seleccionado de un grupo que comprende:
Arg (A0), His (A8), Glu (A5), Asp (A18), Gly (A21), Arg (B31), Arg (B32) – NH₂ insulina humana,

...



Nº. 10-079133- -00000-0000

Fecha: 2010-06-30 15:23:19 Dep. 2020 DIR.NUEVASOR
Tra. 11 PATENTEIYH Evs: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 111



LISTA DE CHEQUEO
ADMISION A TRAMITE - NUEVAS CREACIONES

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 ☐