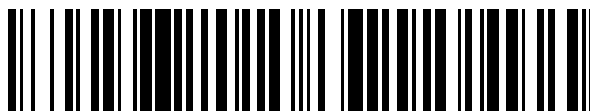


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 636**

51 Int. Cl.:

C07K 14/62 (2006.01)

C12N 15/17 (2006.01)

A61K 38/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2009 E 09803678 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015 EP 2318432**

54 Título: **Insulina estabilizada por halógenos**

30 Prioridad:

31.07.2008 US 85212 P

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

01.12.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

WEISS, MICHAEL

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 552 636 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Insulina estabilizada por halógenos

5 Referencia cruzada con la solicitud relacionada

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos n.º 61/085.212 presentada el 31 de julio de 2008.

10 Declaración con respecto a la investigación o al desarrollo patrocinado por el gobierno federal

La presente invención se realizó con el respaldo del gobierno según los acuerdos cooperativos adjudicados por los Institutos Nacionales de Salud con los números de concesión DK40949 y DK074176. El gobierno de Estados Unidos puede tener ciertos derechos sobre la invención.

15 Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a análogos polipeptídicos que son resistentes a la degradación térmica. Más particularmente, la presente invención se refiere a análogos de insulina termo-estabilizados. Aún más particularmente, la presente invención se refiere a análogos de insulina que se estabilizan química y térmicamente por la incorporación de un elemento de flúor, cloro o bromo en un aminoácido del análogo de insulina. Estos elementos se clasifican como *halógenos* y se distinguen de los constituyentes habituales de las proteínas por su radio atómico, electronegatividad, distribución estereoeléctrica de cargas parciales y efectos transmitidos en las propiedades estereoeléctricas de átomos adyacentes en una molécula.

25 La obtención técnica de proteínas ultra-estables, incluyendo agentes y vacunas terapéuticos, pueden tener amplios beneficios sociales en regiones del mundo en desarrollo en las que la electricidad y la refrigeración no están disponibles de un modo uniforme. Un ejemplo de una proteína terapéutica susceptible a la degradación térmica es la insulina. El reto planteado por su degradación química y física se agudiza por la epidemia pendiente de diabetes mellitus en África y Asia. Debido a que las tasas de degradación química de los análogos de insulina se correlacionan de forma inversa con sus estabildades relativas, el diseño de formulaciones ultra-estables puede potenciar la seguridad y la eficacia de la terapia de reemplazo de insulina en dichas regiones con problemas.

35 La utilidad de las sustituciones fluorosas en moléculas orgánicas pequeñas se conoce en la química médica. Los grupos funcionales fluorados son críticos para la eficacia de dichas moléculas pequeñas ampliamente recetadas como *atorvastatina* (Liptor™), un inhibidor de la biosíntesis del colesterol y *clorhidrato de fluoxetina* (Prozac™), un inhibidor de la recaptación de serotonina selectivo usado en el tratamiento de la depresión y otros trastornos afectivos. Aunque el radio atómico del flúor es similar al del hidrógeno, sus grandes efectos inductores modifican las propiedades estereoeléctricas de estos fármacos, potenciando a su vez sus actividades biológicas. Consideraciones similares de química orgánica física conciernen a la incorporación de átomos halógenos mayores tales como cloro y bromo. La molécula pequeña *montelukast sódico* (Singulair™) es un inhibidor de leucotrienos cuyas propiedades farmacéuticas se potencian por la incorporación covalente de un átomo de cloro.

45 La atención se ha centrado previamente en el uso de cadenas laterales alifáticas con fluoración múltiple (tales como trifluoro- γ -CF₃-Val, trifluoro- δ -CF₃-Val, trifluoro- δ -CF₃-Ile, hexafluoro- $\gamma_{1,2}$ -CF₃-Val, y hexafluoro- $\delta_{1,2}$ -CF₃-Leu) para maximizar el aumento de hidrofobicidad asociado con esta modificación. Un ejemplo se proporciona por la estabilización de un modelo de motivo α -helicoidal, el superenrollamiento homodimérico. Sus cadenas alifáticas interfaciales se sustituyeron simultáneamente por análogos de trifluoro, creando un núcleo fluoroso cuya estabilidad está potenciada en 0,3-2,0 kcal/mol. El grado de estabilización por átomo de flúor es < 0,1 kcal/mol. Se ha conseguido una estabilización más notable por átomo de flúor en un dominio α -helicoidal no relacionado mediante la sustitución de una única Phe interna por pentafluoro-Phe (F₅-Phe)¹ ($\Delta\Delta G_u$ 0,6 kcal/mol por cada cinco átomos de flúor). Se produce estabilización solamente en una posición específica en la proteína, lo que sugiere que su mecanismo requiere un ambiente espacial particular. La estructura de un dominio modificado con F₅-Phe relacionado es idéntica a la del dominio no modificado. La estabilización estructural, sin embargo, es solamente una parte de los requisitos para un polipéptido biológicamente activo. También debe mantenerse al menos una parte significativa de la actividad.

60 Una bibliografía exhaustiva describe el uso de marcadores de flúor en proteínas como sondas ¹⁹F-RMN. Mientras que dichos marcadores se consideran ampliamente no alteradores, las aplicaciones de aminoácidos fluorados en la ingeniería proteica busca aprovechar sus propiedades fisicoquímicas alteradas. Los estudios de un pliegue α -helicoidal modelo (el subdominio de cabezal de villina) que contiene sustituciones F₅-Phe individuales han demostrado que si y en qué medida dicha modificación puede afectar a la estabilidad proteica depende en detalle del ambiente estructural. De hecho, la estabilidad aparente de este pliegue modelo se potenció por una sustitución F₅-Phe solamente en uno de los siete sitios ensayados en el núcleo. Debería observarse sin embargo, que este efecto de estabilización se demostró solamente en un análogo polipeptídico no convencional que contiene un átomo

de azufre en la cadena principal cerca del sitio de fluoración; en las manos de los inventores la misma sustitución de F₅-Phe en el subdominio de cabezal de villina con cadena principal de polipéptido nativo no tiene ningún efecto en su estabilidad. Por lo tanto, hasta donde saben los inventores, no se han presentado previamente datos auténticos que demuestren la potenciación de la estabilidad proteica debido a halogenación de un resto aromático en una proteína de otro modo nativa. Estas observaciones sugieren que un ambiente hidrófobo en general no asegure en sí mismo que la modificación sea estabilizante. Debido a que los interiores proteicos se estabilizan con frecuencia por interacciones aromática-aromática con una dependencia específica de distancia y angular, un subconjunto de sustituciones de F₅-Phe estabilizantes pueden adoptar geometrías de perfluoroarilo/arilo particularmente favorables. Dichas interacciones surgen de la distribución asimétrica de cargas parciales en estos sistemas aromáticos. La modulación de las propiedades químicas, físicas y biológicas de las proteínas por la incorporación específica de sitio de átomos de cloro y bromo en aminoácidos modificados están menos caracterizadas en la bibliografía científica que los efectos anteriores de incorporación de átomos de flúor.

Las cadenas laterales aromáticas pueden interactuar en una diversidad de interacciones débilmente polares, que no implican solamente anillos aromáticos cercanos sino también otras fuentes de potencial electrostático positivo o negativo. Los ejemplos incluyen grupos carbonilo y amida de cadena principal en enlaces peptídicos.

La administración de insulina se ha establecido desde hace mucho tiempo como un tratamiento para diabetes mellitus. La insulina es una proteína globular pequeña que desempeña un papel central en el metabolismo en vertebrados. La insulina contiene dos cadenas, una cadena A, que contiene 21 restos y una cadena B que contiene 30 restos. La hormona se almacena en la célula β pancreática como un hexámero estabilizado con Zn²⁺, pero actúa como un monómero libre de Zn²⁺ en el torrente sanguíneo. La insulina es el producto de un precursor monocatenario, proinsulina, en el que una región de conexión (35 restos) une el resto C terminal de la cadena B (resto B30) con el resto N terminal de la cadena A (Fig. 1A). Aunque la estructura de la proinsulina no se ha determinado, una diversidad de pruebas indica que consiste en un núcleo de tipo insulina y péptido de conexión desordenado (Fig. 1B). Se cree que la formación de tres enlaces disulfuro específicos (A6-A11, A7-B7, y A20-B19; Figs. 1A y 1B) está acoplada al plegamiento oxidativo de proinsulina en el retículo endoplásmico (RE) rugoso. La proinsulina se ensambla para formar hexámeros coordinados por Zn²⁺ solubles poco después de la exportación del RE al aparato de Golgi. La digestión endoproteolítica y conversión a insulina se produce en gránulos secretores inmaduros seguida de condensación morfológica. Se han visualizado matrices cristalinas de hexámeros de insulina de cinc dentro de gránulos de almacenamiento maduros por microscopía electrónica (ME).

Se han investigado sustituciones de aminoácidos en insulina con respecto a efectos en la estabilidad termodinámica y la actividad biológica. No se ha observado ninguna relación uniforme entre la estabilidad y la actividad. Aunque algunas sustituciones que potencian la estabilidad termodinámica también potencian la unión con el receptor de insulina, otras sustituciones que potencian la estabilidad impiden dicha unión. Los efectos de la sustitución de Thr^{A8} por varios otros aminoácidos se han investigado en insulina humana de tipo silvestre y en el contexto de una insulina modificada técnicamente se ha presentado un monómero que contiene tres sustituciones no relacionadas en la cadena B (His^{B10} → Asp, Pro^{B28} → Lys, y Lys^{B29} → Pro). También se conocen en la técnica ejemplos de sustituciones que aceleran o retardan el ciclo temporal de absorción. Dichas sustituciones (tales como Asp^{B28} en Novalog® y [Lys^{B28}, Pro^{B29}] en Humalog®) pueden asociarse y con frecuencia se asocian con una fibrilación más rápida y peor estabilidad física. De hecho, se ha ensayado una serie de diez análogos de insulina humana con respecto a susceptibilidad a fibrilación, incluyendo Asp^{B28}-insulina y Asp^{B10}-insulina. Se ha descubierto que los diez son más susceptibles a fibrilación a pH 7,4 y 37 °C que la insulina humana. Las diez sustituciones se localizaron en diversos sitios en la molécula de insulina y probablemente se asocien con una amplia variación de cambios en la estabilidad termodinámica clásica. Aunque se ha observado una serie de efectos, no existe ninguna correlación entre la actividad y la estabilidad termodinámica.

La insulina es una proteína globular pequeña que es altamente susceptible a síntesis y semisíntesis química, lo que facilita la incorporación de cadenas laterales no convencionales. La insulina contiene tres restos de fenilalanina (posiciones B1, B24, y B25) y una tirosina estructuralmente similar en la posición B26. Conservado entre insulinas de vertebrados y factores de crecimiento de tipo insulina, el anillo aromático de Phe^{B24} se empaqueta contra (pero no dentro de) el núcleo hidrófobo para estabilizar la estructura supersecundaria de la cadena B. Phe^{B24} queda en la superficie de unión a receptor clásica y se ha propuesto que dirige un cambio en la conformación en la unión con el receptor. Phe^{B25} se proyecta desde la superficie del monómero de insulina mientras que Tyr^{B26} se empaqueta cerca de las cadenas laterales alifáticas (Ile^{A2}, Val^{A3} y Val^{B12}) en un borde del núcleo. Se ha propuesto que el cambio conformacional relacionado con B24 permite que Phe^{B25} y Tyr^{B26} entren en contacto con distintos dominios del receptor de insulina.

Du, H., *et al.* (2008), Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 40: 133-139 desvelan análogos de insulina con B24 Phe o B25 Phe reemplazados por bifenilalanina (Bip). Los resultados mostraron que la insulina B25 Bip tiene 139 % de la actividad de unión a receptor y 50 % de actividad biológica *in vivo*, mientras que la insulina B24 Bip está inactiva, en comparación con la insulina nativa, lo que sugiere que B24 Phe es crucial para la actividad de insulina.

El documento WO 03/053339 A2 (Eli Lilly) desvela moléculas de insulina en las que la cadena A en el extremo N terminal se ha extendido con dos restos de aminoácidos, A-1 y A0, en las que la cadena B se ha extendido en el

extremo N terminal con dos restos de aminoácidos, B-1 y B0, en las que los restos de aminoácidos en las posiciones, B28, B29 y B39 pueden sustituirse, y en las que el grupo ϵ -amino de Lys en la posición B28 o B29 está unido covalentemente con el grupo α -carboxilo de un aminoácido con carga positiva para formar un derivado de aminoácido Lys-N ϵ .

5 Zakova, L., *et al.*, *Biochemistry*, 2004, 43 (8), pp 2323-2331 desvela análogos de insulina que contienen una única sustitución de aminoácidos en la posición B26 y/o N-metilación única del péptido B23-24, B24-25 o B25-26, y en los que el extremo C terminal de la cadena B se acorta en cuatro aminoácidos. Los análogos presentan cambios notables en la actividad biológica.

10 Mirmira RG y Tager HS., *J Biol Chem*. 15 abril 1989; 264(11): 6349-54 investiga el papel de la cadena lateral B24 de fenilalanina en la dirección de la interacción de insulina con su receptor, mediante el reemplazo de PheB24 por diversos aminoácidos L y D.

15 Raghavendra G. Mirmira y Howard S. Tager., *Biochemistry* 1991 30 (33), 8222-8229 desvela análogos de insulina en los que PheB25 se reemplazó por ciclohexil-Ala, Tyr, *p*-nitro-, *p*-fluoro-, *p*-yodo-, o *p*-amino-Phe. Los hallazgos se analizan con respecto a un modelo para interacciones de insulina-receptor en la membrana celular en el que la cadena lateral de posición B25 define el borde del contacto intermolecular.

20 Mirmira RG *et al.*, *J Biol Chem* 1991; 266(3): 1428-1436 desvela análogos de insulina en los que cada uno de los restos en B24-B26 se reemplaza con Tyr, D-Tyr con sus homólogos diiodados. Cuando se realizan sustituciones en las posiciones B24 y B25, se realizó una sustitución adicional en B26, por la que Tyr se reemplazó con Phe para conservar el número habitual de tirosinas en insulina. Se dice que los hallazgos, tomados junto con otros hallazgos, enfatizan que los restos Phe^{B24} y Phe^{B25} y el enlace peptídico entre Tyr^{B26} y Thr^{B27} participan de manera importante en la determinación de los atributos estructurales de insulina que afectan a la afinidad de las interacciones insulina-receptor.

25 Duckworth, WC *et al.*, *J Biol Chem* 1988; 263(4): 1826-1833 desvela el uso de [¹²⁵I]yodo-(B26)insulina marcada para identificar varios sitios de escisión en la cadena B de insulina producidos por la degradación de insulina mediante insulina proteasa y mediante hepatocitos aislados.

30 La presente teoría de la fibrilación proteica plantea que el mecanismo de fibrilación sucede mediante un estado intermedio parcialmente plegado, que a su vez se agrega para formar un núcleo amiloidogénico. En esta teoría, es posible que las sustituciones de aminoácidos que estabilizan el estado nativo puedan estabilizar o no el estado intermedio parcialmente plegado y pueden aumentar o no (o reducir) la barrera de energía libre entre el estado nativo y el estado intermedio. Por lo tanto, la teoría actual indica que la tendencia de una sustitución de aminoácidos dada en la molécula de insulina a aumentar o reducir el riesgo de fibrilación es altamente impredecible.

35 La fibrilación, que es una grave preocupación en la fabricación, el almacenamiento y el uso de insulina y análogos de insulina para el tratamiento de la diabetes, se potencia con mayor temperatura, menor pH, agitación, o la presencia de urea, guanidina, co-disolvente de etanol o superficies hidrófobas. Las regulaciones farmacológicas de Estados Unidos actuales requieren que la insulina se descarte si se produce fibrilación a un nivel de uno por ciento o más. Debido a que la fibrilación se potencia a temperaturas más altas, los individuos diabéticos deben mantener de forma óptima la insulina refrigerada antes de su uso. La fibrilación de insulina o un análogo de insulina puede ser una preocupación particular para pacientes diabéticos que utilizan una bomba de insulina externa, en la que se inyectan pequeñas cantidades de insulina o análogo de insulina al cuerpo del paciente a intervalos regulares. En dicho uso, la insulina o el análogo de insulina no se mantiene refrigerado dentro del aparato de bomba y la fibrilación de insulina puede dar como resultado el bloqueo del catéter usado para inyectar la insulina o el análogo de insulina en el cuerpo, dando como resultado potencialmente fluctuaciones de niveles de glucosa en sangre impredecibles o incluso hiperglucemia peligrosa. Al menos un informe reciente ha indicado que la insulina lispro (un análogo en el que los restos B28 y B29 se intercambian en relación con sus posiciones en la insulina humana de tipo silvestre; nombre comercial Humalog®) puede ser particularmente susceptible a la fibrilación y obstrucción resultante de catéteres de bombas de insulina.

55 La fibrilación de insulina es una preocupación aún mayor en bombas de insulina implantables, en las que la insulina estaría contenida dentro del implante durante 1-3 meses a alta concentración y a temperatura fisiológica (es decir 37 °C), en lugar de a temperatura ambiente como con una bomba externa. Adicionalmente, la agitación provocada por movimiento normal también tendería a acelerar la fibrilación de la insulina. A pesar del potencial aumentado de fibrilación de insulina, las bombas de insulina implantables aún son objeto de esfuerzos de investigación, debido a las ventajas potenciales de dichos sistemas. Estas ventajas incluyen el suministro intraperitoneal de insulina al sistema circulatorio portal, que imita el suministro fisiológico normal de insulina más estrechamente que la inyección subcutánea, que proporciona insulina al paciente mediante el sistema circulatorio sistémico. El suministro intraperitoneal proporciona una absorción más rápida y uniforme de la insulina en comparación con la inyección subcutánea, que puede proporcionar absorción y degradación variables de un sitio de inyección a otro. La administración de insulina mediante una bomba implantable también proporciona potencialmente conveniencia aumentada al paciente. Mientras que los intentos de evitar la fibrilación, tal como mediante adición de un

tensioactivo al depósito, han proporcionado alguna mejora, estas mejoras se han considerado hasta la fecha insuficientes para permitir el uso fiable de una bomba de insulina implantada en pacientes diabéticos fuera de ensayos clínicos estrictamente controlados.

- 5 Como se ha observado anteriormente, el mundo en desarrollo se enfrenta a un reto con respecto al almacenamiento, suministro y uso seguro de fármacos y vacunas. Este reto complica el uso de formulaciones de insulina sensibles a temperatura en regiones de África y Asia que carecen de acceso uniforme a electricidad y refrigeración, un reto que probablemente se agudice por la epidemia pendiente de diabetes en el mundo en desarrollo. La insulina muestra un aumento de la tasa de degradación de 10 veces o más por cada 10 °C de aumento de temperatura por encima de 25 °C, y las directrices requieren almacenamiento a temperaturas <30 °C y preferentemente con refrigeración. A temperaturas mayores la insulina experimenta tanto degradación química (cambios en su estructura covalente tales como la formación de ácido isoaspártico, reordenamiento de enlaces disulfuro y formación de polímeros covalentes) como degradación física (agregación no nativa y fibrilación).
- 10
- 15 Se han descrito sustituciones de aminoácidos en insulina que estabilizan la proteína pero aumentan su unión con el receptor de insulina (RI) y su unión cruzada con el receptor homólogo para factores de crecimiento de tipo insulina (IGFR) de tal modo que confieran un riesgo de carcinogénesis. Un ejemplo conocido en la técnica se proporciona por la sustitución de His^{B10} por ácido aspártico. Aunque la insulina Asp^{B10} muestra propiedades farmacéuticas favorables con respecto a la estabilidad y farmacocinética, sus propiedades de unión a receptor potenciadas se asociaron con tumorigénesis en ratas Sprague-Dawley. Aunque hay muchas sustituciones potenciales en las cadenas A o B que pueden introducirse en insulina Asp^{B10} o análogos relacionados para reducir su unión con RI e IGFR a niveles similares a los de la insulina humana, dichas sustituciones alteran en general la estabilidad de la insulina (o análogos de insulina) y aumentan su susceptibilidad a degradación química y física. Sería deseable descubrir un método de modificación de la insulina y de análogos de insulina que permitieran el "ajuste" de las afinidades de unión al receptor potenciando al mismo tiempo la estabilidad y resistencia a fibrilación. Dichas aplicaciones requerirían un conjunto de modificaciones estabilizantes que reduzcan la unión con RI e IGFR en diverso grado para compensar la carcinogenicidad potencial de análogos que son súper activos en sus propiedades de unión al receptor.
- 20
- 25
- 30 Por lo tanto, existe la necesidad de análogos de insulina que se estabilicen por la incorporación de un aminoácido no convencional que contenga un átomo halógeno como un grupo funcional no convencional manteniendo al mismo tiempo al menos una parte de la actividad biológica del análogo.

Sumario de la invención

- 35 Por lo tanto, es un aspecto de la presente invención proporcionar un análogo de insulina que proporcione mayor estabilidad por sustitución de halógenos en un aminoácido, en el que el análogo mantiene después al menos una parte de actividad biológica de la insulina o el análogo de insulina no halogenado correspondiente.
- 40 En general, la presente invención proporciona un análogo de insulina que comprende un polipéptido de cadena B que incorpora una fenilalanina monohalogenada en la posición B24. En otra realización la fenilalanina monohalogenada es *orto*-monofluoro-fenilalanina, *orto*-monobromo-fenilalanina u *orto*-monocloro-fenilalanina. En otra realización, el análogo de insulina es un análogo de insulina de mamífero, tal como un análogo de insulina humana. En un conjunto particular de realizaciones el polipéptido de cadena B comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N° 4-8 y polipéptidos que tienen tres o menos sustituciones de aminoácidos adicionales de los mismos.
- 45
- También se proporciona un método para incorporar una fenilalanina monohalogenada en la posición B24 de un polipéptido de cadena B de un análogo de insulina, siendo la fenilalanina monohalogenada una fenilalanina fluorada, comprendiendo el método expresar un ácido nucleico que codifica el análogo de insulina, en el que la fenilalanina monohalogenada se codifica por un codón de terminación, en el que el ácido nucleico se expresa junto con un ARNt supresor y una ARNt sintetasa correspondiente que incorpora el aminoácido no convencional en respuesta al codón de terminación.
- 50
- 55 La invención también proporciona un análogo de insulina de la invención para su uso como medicamento. Dichos análogos encuentran su utilidad en un método para tratar a un paciente. El método comprende administrar una cantidad fisiológicamente eficaz de un análogo de insulina o una sal fisiológicamente aceptable del mismo al paciente, en el que el análogo de insulina o una sal fisiológicamente aceptable del mismo contiene un polipéptido de cadena B que incorpora una fenilalanina monohalogenada en la posición B24.
- 60

Breve descripción de las varias vistas de los dibujos

- 65 La FIG. 1A es una representación esquemática de la secuencia de proinsulina humana que incluye las cadenas A y B y la región de conexión mostrada con sitios de escisión dibásicos flanqueantes (círculos rellenos) y péptido C (círculos abiertos).

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

La FIG. 1C es una representación esquemática de la secuencia de insulina humana que indica la posición del resto B24 en la cadena B.

La FIG. 1D es un modelo en lazo de un monómero de insulina que muestra el resto aromático de Phe^{B24} en relación con los tres enlaces disulfuro. Se muestran las cadenas laterales adyacentes de Leu^{B15} (flecha) y Phe^{B24}. Las cadenas A y B se muestran de otro modo en gris claro y gris oscuro, respectivamente, y los átomos de azufre de cisteínas como círculos.

La FIG. 1E es un modelo de relleno de espacios de insulina que muestra la cadena lateral de Phe^{B24} dentro de un bolsillo en el borde de un núcleo hidrófobo.

La FIG. 2A es una representación de pentafluoro-fenilalanina (F₅-Phe).

La FIG. 2B es una representación de *orto*-monofluoro-fenilalanina (2F-Phe).

La FIG. 2C es una representación de *meta*-monofluoro-fenilalanina (3F-Phe).

La FIG. 2D es una representación de *para*-monofluoro-fenilalanina (4F-Phe).

La FIG. 3 es un conjunto de cuatro espectros de dicroísmo circular (DC) para las longitudes de onda de UV lejano. Panel A: DKP-insulina (línea negra continua) y 2F-Phe^{B24}-DKP-insulina (□); Panel B: DKP-insulina (línea negra continua) y 3F-Phe^{B24}-DKP-insulina (▲); Panel C: DKP-insulina (línea negra continua) y 4F-Phe^{B24}-DKP-insulina (▼); Panel D: DKP-insulina (línea negra continua) y F₅-Phe^{B24}-DKP-insulina (●).

La FIG. 4 es un conjunto de cuatro gráficas para estudios de desnaturalización de guanidina detectada por DC. Panel A: DKP-insulina (línea negra continua) y 2F-Phe^{B24}-DKP-insulina (□); Panel B: DKP-insulina (línea negra continua) y 3F-Phe^{B24}-DKP-insulina (▲); Panel C: DKP-insulina (línea negra continua) y 4F-Phe^{B24}-DKP-insulina (▼); Panel D: DKP-insulina (línea negra continua) y F₅-Phe^{B24}-DKP-insulina (●).

La FIG. 5 es una gráfica que muestra los resultados de estudios de unión a receptor de análogos de insulina. Las actividades relativas se determinan por ensayo de unión competitiva en el que se desplaza insulina humana marcada con ¹²⁵I unida a receptor aumentando las concentraciones de DKP-insulina (■) o sus análogos: pentafluoro-Phe^{B24} (▲), 2F-Phe^{B24} (▼), 3F-Phe^{B24} (◆) y 4F-Phe^{B24} (●).

La FIG. 6 es una gráfica que muestra los resultados de estudios de unión a receptor de análogos de insulina. Las actividades relativas se determinan por ensayo de unión competitiva en la que la insulina humana marcada con ¹²⁵I unida a receptor se desplaza por concentraciones crecientes de KP-insulina (■) o sus análogos: 2Br-Phe^{B24}-KP-insulina (▲), 2Cl-Phe^{B24}-KP-insulina (▼), 2FPhe^{B24}-KP-insulina (◆), y 4F-Phe^{B24}-KP-insulina (●). El ensayo empleó la isoforma B del receptor de insulina e insulina humana ¹²⁵I-Tyr^{A14} como indicador.

La FIG. 7A es una gráfica para estudios de desnaturalización de guanidina detectada por DC de insulina humana (línea continua), KP-insulina (línea discontinua; "parental"), análogos de KP-insulina que contienen sustitución monofluorosa de 2F-Phe^{B24}-KP-insulina (▲), 3FPhe^{B24}-KP-insulina (■), y 4F-Phe^{B24}-KP-insulina (○).

La FIG. 7B es una gráfica para estudios de desnaturalización de guanidina detectada por DC de insulina humana (línea continua), KP-insulina (línea discontinua; "parental"), 2-Cl-Phe^{B24}-KP-insulina (▼) y 2-Br-Phe^{B24}-KP-insulina (Δ).

La FIG. 8A es un espectro de ¹H-RNM para análogos de DKP-insulina que compara sustituciones de flúor en las posiciones 2, 3 y 4 de Phe^{B24} en relación con DKP-insulina, registrado a 700 MHz a 32 °C y pD 7,0.

La FIG. 8B es un espectro de RMN para análogos de KP-insulina que compara sustituciones de flúor, bromo y cloro en la posición 2 de Phe^{B24} en relación con KP-insulina, registrado a 700 MHz a 32 °C y pD 7,0.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un análogo de insulina que proporciona mayor estabilidad por sustitución de halógenos en un aminoácido, en el que el análogo mantiene después al menos una parte de la actividad biológica de la insulina o el análogo de insulina no halogenado correspondiente. Particularmente, la presente invención proporciona análogos de insulina que proporcionan mayor estabilidad por sustitución de un único halógeno en un aminoácido, en el que el análogo mantiene después al menos una parte de la actividad biológica de la insulina o del análogo de insulina no halogenado correspondiente. En un ejemplo, la presente invención proporciona un análogo de insulina que proporciona mayor estabilidad por sustitución de flúor, cloro o bromo en un aminoácido, en el que el análogo mantiene después al menos una parte de la actividad biológica de la insulina o el análogo de insulina no halogenado correspondiente. Una aplicación potencial es aumentar la estabilidad química y física de un análogo de insulina manteniendo al mismo tiempo una parte de su actividad biológica; otra aplicación es calibrar las propiedades de unión a receptor de un análogo de insulina para no exceder la de la insulina humana. Para estos fines, la presente invención proporciona análogos de insulina que contienen un resto de fenilalanina (Phe) monohalogenada como una sustitución en la posición B24.

La presente invención no se limita, sin embargo, a insulina humana y sus análogos. También se prevé que estas sustituciones pueden realizarse en insulinas animales tales como insulinas porcinas, bovinas, equinas y caninas, por medio de ejemplos no limitantes.

Además, a la vista de la similitud entre las insulinas humanas y animales, y el uso en el pasado de insulinas animales en pacientes diabéticos humanos, también se prevé que pueden introducirse otras modificaciones menores en la secuencia de insulina, especialmente las sustituciones consideradas "conservativas". Por ejemplo, pueden realizarse sustituciones adicionales de aminoácidos dentro de grupos de aminoácidos con cadenas laterales

similares, sin alejarse de la presente invención. Estos incluyen los aminoácidos hidrófobos neutros: alanina (Ala o A), valina (Val o V), leucina (Leu o L), isoleucina (Ile o I), prolina (Pro o P), triptófano (Trp o W), fenilalanina (Phe o F) y metionina (Met o M). De forma similar, los aminoácidos polares neutros pueden sustituirse entre sí dentro de su grupo de glicina (Gly o G), serina (Ser o S), treonina (Thr o T), tirosina (Tyr o Y), cisteína (Cys o C), glutamina (Glu o Q), y asparagina (Asn o N). Se considera que los aminoácidos básicos incluyen lisina (Lys o K), arginina (Arg o R) e histidina (His o H). Los aminoácidos ácidos son ácido aspártico (Asp o D) y ácido glutámico (Glu o E). A no ser que se indique de otro modo o siempre que sea obvio a partir del contexto, debería considerarse que los aminoácidos indicados en el presente documento son aminoácidos L. En un ejemplo, el análogo de insulina de la presente invención contiene tres o menos sustituciones conservativas distintas de las sustituciones de Phe monohalogenada de la presente invención. En otro ejemplo, el análogo de insulina de la presente invención contiene una o menos sustituciones conservativas distintas de las sustituciones de Phe monohalogenada de la presente invención.

Como se usa en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones, diversos aminoácidos en la insulina o un análogo de insulina pueden indicarse por el resto de aminoácido en cuestión, seguido de la posición del aminoácido, opcionalmente en superíndice. La posición del aminoácido en cuestión incluye la cadena A o B de insulina en la que se localiza la sustitución. Por lo tanto, Phe^{B24} indica una fenilalanina en el vigésimo cuarto aminoácido de la cadena B de insulina, mientras que en Phe^{B25} indica una fenilalanina en el vigésimo quinto aminoácido de la cadena B de insulina, y Phe^{B26} indica una sustitución de tirosina por fenilalanina en el aminoácido vigésimo sexto aminoácido de la cadena B de insulina. Un aminoácido fluorado puede indicarse con el prefijo "F-", un aminoácido bromado puede indicarse con el prefijo "Br-" y un aminoácido clorado puede indicarse con el prefijo "Cl-". Por lo tanto, la fenilalanina fluorada puede abreviarse "F-Phe", la fenilalanina clorada puede abreviarse "Cl-Phe" y la fenilalanina bromada puede abreviarse "Br-Phe". En el caso de fenilalanina, la posición de los sustituyentes halógenos o sustituyentes en la cadena lateral de fenilo puede indicarse adicionalmente por el número del carbono con el que se une el halógeno. Por lo tanto, *orto*-monofluoro-fenilalanina (mostrada en la Fig. 2B) se abrevia "2F-Phe", *meta*-monofluoro-fenilalanina (mostrada en la Fig. 2C) se abrevia "3F-Phe" y *para*-monofluoro-fenilalanina (mostrada en la Fig. 2D) se abrevia 4F-Phe. Pentafluoro-fenilalanina (mostrada en la Fig. 2A) se abrevia como "F₅-Phe". De forma similar, *orto*-monobromo-fenilalanina puede abreviarse "2Br-Phe", *orto*-monocloro-fenilalanina puede abreviarse "2Cl-Phe".

La fenilalanina en B24 es un aminoácido invariante en insulina funcional y contiene una cadena lateral aromática. La importancia biológica de Phe^{B24} en insulina se indica por una mutación clínica (Ser^{B24}) que provoca diabetes mellitus humana. Como se ilustra en las Figs. 1D y 1E, y sin desear quedar ligado a la teoría, se cree que Phe^{B24} se empaqueta en el borde de un núcleo hidrófobo en la superficie de unión a receptor clásica. Los modelos se basan en un promotor cristalográfico (molécula 1 de 2-Zn; identificador de Banco de Datos de Proteínas 4INS). Dentro de la hebra β C-terminal de la cadena B (restos B24-B28), Phe^{B24} está adyacente a la hélice α central (restos B9-B19). Una cara y borde del anillo aromático quedan dentro de un bolsillo superficial definido por Leu^{B15} y Cys^{B19}; la otra cara y borde se exponen a disolvente (Fig. 1E). Este bolsillo está rodeado en parte por los grupos carbonilo y amida de cadena principal y crea de este modo un ambiente electrostático complejo y asimétrico. Se proporcionan los efectos del sustituyente casi simétrico tetrafluoro-fenilalanina (F₅-Phe^{B24}) (con sus interacciones generales de fluorarilo-arilo e hidrofobicidad potenciadas); (Fig. 2A) con los de análogos "desequilibrados" que contienen sustituciones *orto*-, *meta*- o *para*-fluorosas individuales (designados 2F-Phe, 3F-Phe, o 4F-Phe, Figs. 2B-2D, respectivamente) en la estabilidad de insulina.

Se cree que Phe^{B25} queda en la superficie del monómero de insulina y en estructuras en solución se proyecta hacia disolvente con menos organización estructural que la de Phe^{B24}. Su importancia biológica se indica de modo similar por una mutación clínica (Leu^{B25}) que provoca diabetes humana. Tyr^{B26}, como Phe^{B24}, queda en el borde del núcleo hidrófobo donde se empaqueta cerca de los restos no polares Ile^{A2}, Val^{A3} y Val^{B12}. Los estudios de fotorreticulación sugieren que cada una de las cadenas laterales de los restos B24, B25 y B26 entra en contacto con el receptor de insulina. En dímeros y hexámeros de restos de insulina, se cree que los restos B24-B26 y los restos relacionados simétricamente B24'-B26' participan en una lámina β antiparalela intermolecular. Se cree que las cadenas laterales aromáticas en estas posiciones estabilizan el empaquetamiento entre monómeros en esta interfaz de lámina β.

Se prevé que las sustituciones de la presente invención pueden realizarse en cualquiera de varios análogos de insulina existentes. Por ejemplo, las sustituciones de fenilalanina monohalogenada (X-Phe) proporcionadas en el presente documento pueden realizarse en análogos de insulina tales como insulina Lispro, insulina Aspart, otras insulinas modificadas o análogos de insulina, o dentro de diversas formulaciones farmacéuticas, tales como insulina regular, insulina NPH, insulina lente o insulina ultralente, además de insulina humana. La insulina Aspart contiene una sustitución de Asp^{B28} y se vende como Novalog® mientras que la insulina Lispro contiene sustituciones de Lys^{B28} y Pro³²⁹ y se conoce y se vende con el nombre Humalog®. Estos análogos se describen en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.149.777 y 5.474.978. Ambos de estos análogos se conocen como insulinas de acción rápida.

También puede introducirse una sustitución de Phe monohalogenada en B24 en análogos de insulina humana que, aunque no se han usado previamente de forma clínica, aún se usan experimentalmente, tales como DKP insulina, descrita en más detalle posteriormente, o mini-proinsulina, un análogo de proinsulina que contiene un enlazador dipeptídico (Ala-Lys) entre las partes de cadena A y cadena B de la insulina en lugar de la región de conexión de 35 aminoácidos normal entre el resto C terminal de la cadena B y el resto N terminal de la cadena A. La incorporación

de restos aromáticos halogenados en la posición B24 en DKP-insulina (u otros análogos de insulina que contienen Asp^{B10} o que muestran afinidades de unión a receptor mayores que las de insulina humana) pueden reducir sus afinidades de unión al receptor para que sean similares a o estén por debajo de las de insulina humana y de este modo permitir potencialmente su uso clínico. De esta manera también puede reducirse la unión cruzada de análogos de insulina con el IGFR mitogénico.

La secuencia de aminoácidos de proinsulina humana se proporciona, para fines comparativos, como SEC ID N° 1.

SEC ID N° 1 (proinsulina)

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

La secuencia de aminoácidos de la cadena A de insulina humana se proporciona como SEC ID N° 2.

SEC ID. N° 2 (cadena A)

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

La secuencia de aminoácidos de la cadena B de insulina humana se proporciona como SEC ID N° 3.

SEC ID N° 3 (cadena B)

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

La secuencia de aminoácidos de una cadena B de insulina humana se modifica con una sustitución de una Phe monohalogenada en la posición B24. Un ejemplo de dicha secuencia se proporciona como SEC ID N° 4, en la que Xaa puede ser Tyr o Phe. El halógeno usado en cualquiera de estas sustituciones puede ser flúor, cloro o bromo, por ejemplo.

SEC ID N° 4

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Xaa-Thr-Pro-Lys-Thr [Xaa es Tyr o Phe]

También se prevé que las sustituciones de la presente invención también pueden combinarse con sustituciones de análogos de insulina previamente conocidos. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de un análogo de la cadena B de insulina humana que contiene las sustituciones Lys^{B28} Pro^{B29} de insulina lispro (Humalog®), en la que también puede introducirse la sustitución de Phe monohalogenada, se proporciona como SEC ID N° 5. De forma similar, la secuencia de aminoácidos de un análogo de la cadena B de insulina humana que contiene la sustitución de Asp^{B28} de insulina aspart, en la que también puede introducirse la sustitución de F-Phe^{B24}, se proporciona como SEC ID N° 6.

SEC ID N° 5

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Xaa-Thr-Lys-Pro-Thr [Xaa es Tyr o Phe]

SEC ID N° 6

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Xaa-Thr-Asp-Lys-Thr [Xaa es Tyr o Phe]

La sustitución de F-Phe^{B24} también puede introducirse en combinación con otras sustituciones de análogos de insulina tales como análogos de insulina humana que contiene sustituciones de His en los restos A4, A8 y/o B1 como se describe en más detalle en la Publicación de Solicitud Internacional relacionada n.º WO 2007/081824 y la Solicitud de Estados Unidos n.º 2009/0304814. Por ejemplo, la sustitución de F-Phe^{B24} puede estar presente con sustituciones [His^{A4}, His^{A8}] y/o His^{B1} en un análogo de insulina o análogo de proinsulina que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N° 7.

SEC ID N° 7

R1-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-R2-Thr-R3-R4-Thr-Xaa₀₋₃₅-Gly-Ile-Val-R5-Gln-Cys-Cys-R6-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn;

en la que R1 es His o Phe, en la que R2 es Tyr o Phe, R3 es Pro, Lys, o Asp; en la que R4 es Lys o Pro; en la que R5 es His o Glu; en la que R6 es His o Thr, y en la que Xaa₀₋₃₅ es 0-35 de cualquier aminoácido o una rotura en la cadena de aminoácidos;

y en la que además está presente al menos una sustitución seleccionada del grupo de las siguientes sustituciones de aminoácidos:

R1 es His; y
 R6 es His; y
 R5 y R6 juntos son His.

5 También puede introducirse una sustitución de Phe monohalogenada en B24 en un análogo de insulina monocatenario como se desvela en la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos relacionada n.º 60/828.153.

10 Se introdujeron sustituciones de flúor dentro de un monómero de insulina modificado técnicamente de alta actividad, designado DKP-insulina, que contiene las sustituciones Asp^{B10} (D), Lys^{B28} (K) y Pro^{B29} (P). Se cree que estas tres sustituciones en la superficie de la cadena B impiden la formación de dímeros y hexámeros. El uso de un monómero modificado técnicamente evita los efectos de confusión de autoensamblaje en los ensayos de estabilidad. La estructura de DKP-insulina se asemeja estrechamente a un protómero cristalográfico. La secuencia del polipéptido de cadena B para DKP insulina se proporciona como SEC ID N° 8, en la que Xaa es Tyr o Phe.

15 SEC ID N° 8 (Secuencia de cadena B de DKP)
 Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-Asp-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Xaa-Thr-Lys-Pro-Thr

20 Se prepararon análogos de DKP-insulina por semi-síntesis catalizada por tripsina y se purificaron por cromatografía líquida de alto rendimiento (Mirmira, R.G., y Tager, H.S., 1989. J. Biol. Chem. 264: 6349-6354.). Este protocolo emplea (i) un octapéptido sintético que representa los restos (N)-GF*FYTKPT (incluyendo el resto modificado (F*) y sustituciones "KP" (subrayado); SEC ID N° 9) y (ii) análogo truncado *des*-octapéptido [B23-B30]-Asp^{B10}-insulina (SEC ID N° 16). Debido a que el octapéptido difiere de la secuencia de B23-B30 de tipo silvestre (GFFYTPKT; SEC ID N° 10) por intercambio de Pro^{B28} y Lys^{B29} (en cursiva), no se requiere protección del grupo amino-ε de lisina durante el tratamiento con tripsina. Brevemente, se disolvieron *des*-octapéptido (15 mg) y octapéptido (15 mg) en una mezcla de dimetilacetamida/1,4-butanodiol/Tris acetato 0,2 M (pH 8) que contiene acetato cálcico 10 mM y ácido etilendiamin tetra-acético (EDTA) 1 mM (35:35:30, v/v, 0,4 ml). El pH final se ajustó a 7,0 con 10 µl de N-metilmorfolina. La solución se enfrió a 12 °C, y se añadieron 1,5 mg de TPCK-tripsina y se incubó durante 2 días a 12 °C. Se añadieron 1,5 mg adicional de tripsina después de 24 h. La reacción se acidificó con ácido trifluoroacético 0,1 % y se purificó por HPLC de fase inversa preparatoria (C4). La espectrometría de masas usando desorción/ionización por láser asistida por matriz tiempo de vuelo (MALDI-TOF; Applied Biosystems, Foster City, CA) en cada caso dio valores esperados (no mostrados). El protocolo general para síntesis de fase sólida es como describe (Merrifield *et al.*, 1982. Biochemistry 21: 5020-5031). Se obtuvieron análogos de fenilalanina protegidos por 9-fluoren-9-il-metoxi-carbonilo (F-moc) de Chem-Impex International (Wood Dale, IL).

35 Se obtuvieron espectros de dicroísmo circular (DC) a 4 °C y 25 °C usando un espectropolarímetro Aviv (Weiss *et al.*, Biochemistry 39: 15429-15440). Las muestras contenían DKP-insulina aproximadamente 25 µM o análogos en fosfato potásico 50 mM (pH 7,4); las muestras se diluyeron a 5 µM para estudios de desnaturalización inducida por guanidina a 25 °C. Para extraer energías libres de desplegamiento, se ajustaron las transiciones de desnaturalización por mínimos cuadráticos no lineales a un modelo de dos estados como se describe en Sosnick *et al.*, Methods Enzymol. 317: 393-409. Brevemente, los datos de DC $\theta(x)$, donde x indica la concentración de desnaturalizante, se ajustaron por un programa de mínimos cuadráticos no lineal de acuerdo con

45
$$\theta(x) = \frac{\theta_A + \theta_B e^{(-\Delta G_{H_2O}^0 - mx)/RT}}{1 + e^{(-\Delta G_{H_2O}^0 - mx)/RT}}$$

en la que x es la concentración de guanidina y en la que θ_A y θ_B son valores de línea basal en los estados nativo y desplegado.

50 Las líneas basales se aproximaron por las líneas pre- y post-transición $\theta_A(x) = \theta_A^{H_2O} + m_A x$ y $\theta_B(x) = \theta_B^{H_2O} + m_B x$. Los valores de m obtenidos al ajustar las transiciones de desplegamiento variantes son menores que el valor de m obtenido al ajustar la curva de desplegamiento de tipo silvestre. Para ensayar si esta diferencia y el cambio aparente en ΔG_u resultan de una incapacidad para medir la señal DC desde el estado completamente desplegado, se realizaron simulaciones en las que los datos se extrapolaron a valores de DC constantes a mayores concentraciones de guanidina; esencialmente se obtuvieron estimaciones idénticas de ΔG_u y m.

60 La actividad relativa se define como la relación de análogo frente a insulina humana de tipo silvestre requerida para desplazar el 50 por ciento de ¹²⁵I-insulina humana unida específicamente. Se empleó una preparación de membrana placentaria humana que contenía el receptor de insulina (RI) como se conoce en la técnica. Se incubaron

fragmentos de membrana (0,025 mg de proteína/tubo) con insulina humana marcada con ^{125}I (aprox. 30.000 cpm) en presencia de concentraciones seleccionadas de análogo no marcado durante 18 horas a 4 °C en un volumen final de 0,25 ml de Tris-HCl 0,05 M y albúmina de suero bovino 0,25 por ciento (p/v) a pH 8. Después de la incubación, las mezclas se diluyen con 1 ml de tampón helado y se centrifugan (10.000 g) durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante se retira después por aspiración, y el sedimento de membrana se recuenta con respecto a radiactividad. Los datos se corrigen para unión no específica (cantidad de radiactividad que permanece en la membrana asociada en presencia de insulina humana 1 μM). En todos los ensayos el porcentaje de indicador unido en ausencia de ligando de competición fue menor del 15 % para evitar artefactos de empobrecimiento de ligandos. Se realizó un ensayo de unión a receptor de insulina adicional para controlar los cambios en la actividad durante el transcurso de la incubación del análogo de insulina a 37 °C usando una captura de anticuerpo de placa de microtitulación como se conoce en la técnica. Se incubaron placas de tira de microtitulación (Nunc Maxisorb) durante una noche a 4 °C con IgG AU5 (100 μl /pocillo de 40 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato). Los datos de unión se analizaron por un modelo secuencial de dos sitios. Se empleó un ensayo de anticuerpo de placas de microtitulación correspondientes usando el receptor de IGF de Tipo I para evaluar la unión cruzada con este receptor homólogo.

Los espectros de diroísmo circular (DC) de ultravioleta lejano de los análogos fluorados individualmente son esencialmente idénticos a los del análogo parental (Fig. 3); se observa una ligera distorsión en el espectro del análogo de F₅-Phe^{B24} (Fig. 3, Panel D). Las estabildades y actividades de unión a receptor de los análogos se proporcionan en la Tabla 1. Se introdujeron restos de B24 modificados dentro del contexto de DKP-insulina. Los valores de actividad mostrados se basan en la relación de constantes de disociación de receptor-hormona en relación con la insulina humana; la actividad de insulina humana es por lo tanto 1,0 por definición. Los errores típicos en los valores de actividad fueron en general menores del 25 %. Se estimaron las energías libres de desplegamiento (ΔG_u) a 25 % basándose en un modelo de dos estados como se extrapoló hasta concentración desnaturalizante cero. El tiempo de retardo indica el tiempo (en días) requerido para el inicio de la fibrilación de proteínas con agitación suave a 37 °C en solución salina tamponada con fosfato sin cinc (pH 7,4).

Tabla 1

análogo	Actividades y Estabildades de Análogos de Insulina				
	actividad	ΔG_u (kcal/mol)	C_{mid} (M)	m (kcal mol ⁻¹ M ⁻¹)	tiempo de retardo
DKP-insulina	2,42	4,0 ± 0,1	5,6 ± 0,1	0,70 ± 0,01	12,4 ± 2,5
F ₅ -Phe ^{B24} -DKP	0,013	4,8 ± 0,1	5,8 ± 0,1	0,84 ± 0,02	17,7 ± 2,1
2F-Phe ^{B24} -DKP	0,37	4,9 ± 0,1	5,8 ± 0,1	0,85 ± 0,02	16,0 ± 0,1
3F-Phe ^{B24} -DKP	1,02	3,8 ± 0,1	5,5 ± 0,2	0,70 ± 0,02	17,7 ± 3,7
4F-Phe ^{B24} -DKP	0,43	3,9 ± 0,1	5,6 ± 0,2	0,70 ± 0,02	11,0 ± 1,6

La sustitución de Phe^{B24} por F₅-Phe aumenta la estabilidad de DKP-insulina en 0,8 ± 0,1 kcal/mol a 25 °C (Fig. 4, Panel D). A pesar de dicho efecto favorable en la estabilidad, la actividad del análogo es insignificante (< 1 % de afinidad de unión a receptor en relación con análogo parental; Tabla 1 y Fig. 5). Esta alteración es más notable que la observada habitualmente en la sustitución de un único aminoácido convencional. Por el contrario, los análogos sustituidos individualmente conservan cada uno actividad significativa: *orto* (37 % en relación con insulina humana), *meta* (100 %) y *para* (43 %). Dichas actividades están cada una por encima del umbral del 10 % (correspondiente a una constante de disociación de receptor-hormona de < 1 nM) generalmente predictivo de eficacia terapéutica. Además, mientras que los análogos de insulina 3F-Phe^{B24} y 4F-Phe^{B24} no son más estables (y posiblemente son ligeramente menos estables) que el análogo parental (Fig. 4 y Tabla 1), 2F-Phe^{B24}-DKP-insulina es al menos tan estable como el análogo de F₅-Phe (ΔG_u 0,9 ± 0,1 kcal/mol). Las estabildades físicas de los análogos se evaluaron por triplicado durante la incubación en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 60 μM a pH 7,4 a 34 °C con agitación suave. Las muestras se observaron durante 20 días o hasta que se observaron señales de precipitación o escarchado del vial de vidrio. Los análogos de F₅-, 2F- y 3F-Phe^{B24}-DKP-insulina (pero no 4F-Phe^{B24}-DKP-insulina) muestran cada uno un aumento en el tiempo de retardo (en relación con el análogo parental) antes de la aparición de la fibrilación de proteínas (Tabla 1). Por lo tanto la sustitución de un único átomo de flúor es capaz de aumentar la estabilidad de un análogo de insulina monomérico con retención de actividad reducida pero clínicamente significativa; la modificación también puede extender el tiempo de retardo antes de la fibrilación de proteínas con agitación suave a pH 7,4 y 37 °C.

Mientras que la sustitución de F₅-Phe^{B24} es altamente estabilizante, este análogo de insulina esencialmente no tiene actividad biológica. Notablemente, la modificación regioespecífica 2F-Phe^{B24} es igualmente estabilizante conservando al mismo tiempo afinidad sustancial (aunque reducida) por el receptor de insulina.

También se introdujeron sustituciones de flúor, esencialmente como se ha descrito anteriormente con la excepción de fenilalanina *orto*-, *meta*-, *para*- y penta-fluorada que se introducía en las posiciones B24, B25 y B26 en insulina lispro (es decir, un análogo de insulina que también contiene las sustituciones Lys^{B28}, Pro^{B29} (vendido con el nombre Humalog®)). Los análogos que contienen sustituciones de fenilalanina *orto*-, *meta*-, *para*- y penta-fluorada en la posición B24 se designan 2F-Phe^{B24}-KP-insulina, 3F-Phe^{B24}-KP-insulina, 4F-Phe^{B24}-KP-insulina, F₅-Phe^{B24}-KP-insulina, respectivamente. Los análogos que contienen sustituciones de fenilalanina *orto*-, *meta*-, *para*- y penta-fluorada en la posición B25 se designan 2F-Phe^{B25}-KP-insulina, 3F-Phe^{B25}-KP-insulina, 4F-Phe^{B25}-KP-insulina, F₅-

Phe^{B25}-KP-insulina, respectivamente. Los análogos que contienen sustituciones de fenilalanina *orto*-, *meta*-, *para*- y penta-fluorada en la posición B26 (que sustituyen tirosina) se designan 2F-Phe^{B26}-KP-insulina, 3F-Phe^{B26}-KP-insulina, 4F-Phe^{B26}-KP-insulina, F₅-Phe^{B26}-KP-insulina, respectivamente. Adicionalmente, se sustituyó con *orto*-bromo y *orto*-cloro fenilalanina en insulina lispro en la posición B24. Estos análogos se designan 2Br-Phe^{B24}-KP-insulina y 2Cl-Phe^{B24}-KP-insulina, respectivamente. Las designaciones de análogos respectivos de KP-insulina y DKP-insulina se abrevian en las tablas y figuras como KP y DKP con "insulina" omitido para mayor brevedad.

Más específicamente, para sustituciones de fenilalanina halogenada en B24, se usaron un octapéptido sintético que representaba los restos (N)-GF*FYTKPT (resto de fenilalanina halogenado indicado como "F*" y sustituciones "KP" (subrayado); SEC ID N° 9) y análogo truncado *des*-octapéptido[B23-B30]-insulina (tipo silvestre en la posición B10; SEC ID N° 17). Para sustituciones de fenilalanina fluorada en B25, se usaron un octapéptido sintético que representaba los restos (N)-GFF*YTKPT (fenilalanina fluorada indicada de nuevo como "F*" y sustituciones "KP" (subrayado); SEC ID N° 9) y análogo truncado *des*-octapéptido[B23-B30]-insulina (tipo silvestre en la posición B10; SEC ID N° 17). Para sustituciones de fenilalanina fluorada en B26, se usaron un octapéptido sintético que representaba los restos (N)-GFFF*TKPT (fenilalanina fluorada indicada de nuevo como "F*" y sustituciones "KP" (subrayado); SEC ID N° 18) y análogo truncado *des*-octapéptido[B23-B30]-insulina (tipo silvestre en la posición B10; SEC ID N° 17). De forma similar, para sustituciones de cloro- y bromo-fenilalanina en B24 (2Cl y 2Br), se usaron un octapéptido sintético que representaba los restos (N)-GF*FYTKPT (resto de fenilalanina halogenada indicado como "F*" y sustituciones "KP" (subrayado); SEC ID N° 9) y análogo truncado *des*-octapéptido[B23-B30]-insulina (tipo silvestre en la posición B10; SEC ID N° 17). Típicamente, se disolvieron *des*-octapéptido (15 mg) y octapéptido (15 mg) en una mezcla de dimetilacetamida/1,4-butandiol/Tris acetato 0,2 M (pH 8) que contenía acetato cálcico 10 mM y ácido etilendiamin tetra-acético (EDTA) 1 mM (35:35:30 v/v, 04, ml). El pH final se ajustó a 7,0 con 10 µl de N-metilmorfolina. La solución se enfrió a 12 °C, y se añadieron 1,5 mg de TPCK-tripsina y se incubaron durante 2 días a 12 °C. Se añadieron 1,5 mg adicionales de tripsina después de 24 h. La reacción se acidificó con ácido trifluoroacético 0,1 % y se purificó por HPLC (C4) de fase inversa. La espectrometría de masas usando desorción/ionización por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF; Applied Biosystems, Foster City, CA) en cada caso proporcionó valores esperados. La actividad relativa y las constantes de disociación se determinaron como se ha descrito anteriormente.

Los datos resultantes se presentan en la Tabla 2 para sustitución de una fenilalanina fluorada en la posición B24 de insulina. Para fines de comparación, se ensayaron insulina de tipo silvestre y 2F-Phe^{B24}-DKP-insulina en las mismas condiciones a 37 °C. Los datos para ensayo a 37 °C se presentan posteriormente en la Tabla 3. Los datos para sustituciones de fenilalanina fluorada en las posiciones B24, B25 y B26 y fenilalanina bromo- y cloro- sustituida en un fondo de análogo de insulina lispro se presentan posteriormente en la Tabla 4.

Tabla 2
Estabilidad y Actividad de Phe^{B24}-DKP

Muestra	ΔG_u (Kcal/mol)	$\Delta\Delta G_u$ (Kcal/mol)	C_{mid} (M Gu-HCl)	m (Kcal/mol/M)	unión a receptor
DKP-insulina	4,3 ± 0,06	/	5,4 ± 0,1	0,80 ± 0,01	161
2F-Phe ^{B24} -DKP	4,9 ± 0,1	0,6	5,8 ± 0,1	0,85 ± 0,02	37
3F-Phe ^{B24} -DKP	3,8 ± 0,1	-0,5	5,5 ± 0,2	0,70 ± 0,02	102
4F-Phe ^{B24} -DKP	3,9 ± 0,1	-0,4	5,6 ± 0,2	0,70 ± 0,02	43
F5-Phe ^{B24} -DKP	4,84 ± 0,1	0,54	5,8 ± 0,1	0,85 ± 0,02	1

Tabla 3
Estabilidad y Actividad de Insulina y Phe^{B24}-DKP-insulina [37 °C].

Muestra	ΔG_u (Kcal/mol)	$\Delta\Delta G_u$ (Kcal/mol)	C_{mid} (M Gu-HCl)	m (Kcal/mol/M)	unión a receptor
insulina wt	2,4 ± 0,10	-	4,1 ± 0,17	0,57 ± 0,06	100
2F-Phe ^{B24} -DKP	3,1 ± 0,1	0,7	4,9 ± 0,1	0,64 ± 0,03	

Tabla 4
Estabilidad y Actividad del Análogo de Phe Halogenada de Insulina Lispro

Muestra de receptor	ΔG_u (Kcal/mol)	$\Delta\Delta G_u$ (Kcal/mol)	C_{mid} (M Gu-HCl)	m (Kcal/mol/M)	unión
KP-insulina	3,0 ± 0,06	/	4,5 ± 0,1	0,61 ± 0,01	92
2F-Phe ^{B24} -KP	3,8 ± 0,1	1,0 ± 0,16	4,9 ± 0,1	0,76 ± 0,02	17
3F-Phe ^{B24} -KP	3,0 ± 0,1	0,2 ± 0,16	4,5 ± 0,15	0,67 ± 0,02	12
4F-Phe ^{B24} -KP	2,75 ± 0,1	0,05 ± 0,16	4,4 ± 0,1	0,62 ± 0,02	32
F ₅ -Phe ^{B24} -KP	3,8 ± 0,1	1,0 ± 0,16	5,0 ± 0,1	0,76 ± 0,01	0,04
2F-PheB25-KP	3,3 ± 0,1	0,5 ± 0,16	4,3 ± 0,2	0,76 ± 0,03	15
3F-PheB25-KP	2,9 ± 0,1	0,1 ± 0,16	4,5 ± 0,2	0,65 ± 0,02	41
4F-PheB25-KP	2,9 ± 0,1	0,1 ± 0,16	4,5 ± 0,1	0,65 ± 0,01	78
F ₅ -PheB25-KP	2,9 ± 0,1	0,1 ± 0,16	4,5 ± 0,2	0,65 ± 0,03	0,4

Estabilidad y Actividad del Análogo de Phe Halogenada de Insulina Lispro

Muestra de receptor	ΔG_u (Kcal/mol)	$\Delta\Delta G_u$ (Kcal/mol)	C_{mid} (M Gu-HCl)	m (Kcal/mol/M)	unión
2F-PheB26-KP	1,7 ± 0,1	-1,1 ± 0,16	4,0 ± 0,2	0,43 ± 0,03	0,1
3F-PheB26-KP	3,3 ± 0,1	0,5 ± 0,16	4,86 ± 0,2	0,69 ± 0,03	17
4F-PheB26-KP	3,7 ± 0,1	0,9 ± 0,16	4,9 ± 0,2	0,75 ± 0,02	13
F5-PheB26-KP	3,6 ± 0,2	0,8 ± 0,26	4,7 ± 0,26	0,76 ± 0,04	3
2Br-Phe ^{B24} -KP	3,6 ± 0,05	0,8 ± 0,11	4,8 ± 0,1	0,75 ± 0,01	31
2Cl-Phe ^{B24} -KP	3,8 ± 0,06	1,0 ± 0,12	4,9 ± 0,1	0,77 ± 0,01	36

También se presentan en la Fig. 6 datos de unión a receptor para análogos de insulina lispro por desplazamiento competitivo. El ensayo empleó la isoforma-B del receptor de insulina y ¹²⁵I-Tyr^{A14}-insulina humana como indicador.

5 Los análogos de insulina lispro que contenían fenilalanina cloro o bromo sustituida en B24 (2Cl-Phe^{B24}-KP-insulina y 2Br-Phe^{B24}-KP-insulina, respectivamente) se ensayaron con respecto a la capacidad para reducir el azúcar en sangre en ratas diabéticas en comparación con insulina lispro no halogenada (KP). Se hizo diabéticas con estreptozotocina a ratas Lewis macho (aproximadamente 250 g de peso corporal). Se purificaron análogo de insulina lispro, 2Cl-Phe^{B24}-KP-insulina y 2Br-Phe^{B24}-KP-insulina por HPLC, se secaron en polvo, y se disolvieron en diluyente de insulina (Eli Lilly Corp). Se inyectaron a las ratas por vía subcutánea en el momento = 0 20 µg o 6,7 µg de análogo de insulina en 100 µl de diluyente. Se obtuvo sangre de la punta cortada de la cola en el momento 0 y cada 10 minutos hasta 90 minutos. Se midió la glucosa en sangre usando un medidor Hypoguard Advance Micro-Draw. Los cambios de concentración de glucosa en sangre (en miligramos (mg) por decalitro (dl) por hora (h)) se enumeran en las Tablas 5 y 6 (estos estudios se realizaron con diferentes conjuntos de ratas y por lo tanto muestran diferencias en la respuesta farmacodinámica de línea basal a inyecciones de control de KP-insulina; líneas superiores en cada tabla).

Tabla 5

Niveles de glucosa en sangre en respuesta a análogos halogenados de insulina Lispro

Muestra	Análogo de insulina (µg)	Δ Glucosa en Sangre (mg/dl/h)
KP-insulina	20	191 +/- 20
KP-insulina	6,7	114 +/- 15
2Cl-Phe ^{B24} -KP	20	194 +/- 26
2Cl-Phe ^{B24} -KP	6,7	179 +/- 30
2Br-Phe ^{B24} -KP	20	224 +/- 39
2Br-Phe ^{B24} -KP	6,7	189 +/- 13

20

Tabla 6

Niveles de glucosa en sangre en respuesta a análogos de insulina halogenados

Muestra	Análogo de insulina (µg)	Δ Glucosa en sangre (mg/dl/h)
KP-insulina	6,7	164 +/- 20
2F-Phe ^{B24} -DKP	6,7	180 +/- 8
2F-Phe ^{B24} -KP	6,7	131 +/- 16
4F-Phe ^{B26} -KP	6,7	164 +/- 17

25

30

Como se ha visto en las Tablas 5 y 6, los análogos de insulina que contienen fenilalanina halogenada fueron iguales o mayores en potencia que la insulina lispro (Humalog®) con la excepción de 2F-Phe^{B24}-KP-insulina. La potencia de un análogo de insulina 2F-Phe^{B24} puede restaurarse a la de KP-insulina mediante la inclusión de la sustitución de Asp^{B10} en el análogo de 2F-Phe^{B24}-KP-insulina (línea 2 de la Tabla 6). Adicionalmente, la presencia de una fenilalanina monohalogenada en la posición B24 aumenta el tiempo de retardo de fibrilación entre tres veces y cuatro veces; por lo tanto, mientras que la KP-insulina en las condiciones experimentales anteriores muestra un tiempo de retardo de aproximadamente 3 días, la sustitución de Phe^{B24} por 2F-Phe^{B24}, 2Cl-Phe^{B24}, o 2Br-Phe^{B24} extiende el tiempo de retardo hasta entre 10-12 días. Estas modificaciones también aumentan la estabilidad termodinámica (como se exploró por desnaturalización de guanidina) entre 0,5 y 1 kcal/mol (Tabla 4).

35

40

Las constantes de disociación (K_d) se determinaron como se describe en Whittaker y Whittaker (2005. J. Biol. Chem. 280: 20932-20936), por un ensayo de desplazamiento competitivo usando ¹²⁵I-Tyr^{A14}-insulina (proporcionada amablemente por Novo-Nordisk) y el receptor de insulina purificado y solubilizado (isoforma B) en un ensayo de captura de anticuerpos de placa de microtitulación con modificación menor; se marcaron receptores transfectados en su extremo C terminal por una repetición triple del epítipo FLAG (DYKDDDDK; SEC ID N° 11) y se recubrieron placas de microtitulación por anticuerpo monoclonal anti-FLAG M2 (Sigma). El porcentaje de indicador unido en ausencia de ligando de competición fue menor del 15 % para evitar artefactos de empobrecimiento de ligandos. Los datos de unión se analizaron por regresión no lineal usando un modelo de competición heterólogo (Wang, 1995, FEBS Lett. 360: 111-114) para obtener constantes de disociación.

Tabla 7

Unión cruzada de análogos de insulina con el receptor de IGF		
proteína	K _d (nM)	relación a insulina
IGF-I	0,037 ± 0,003	260
insulina humana	9,6 ± 0,3	1
KP-insulina	10,6 ± 1	1
Asp ^{B10} -insulina	4,2	2
Arg ^{B31} , Arg ^{B32} , Gly ^{A21} -insulina	3,1	3
DKP-insulina	1,6 ± 0,1	6
2F-Phe ^{B24} -KP	34	< 0,3
2Br-Phe ^{B24} -KP	10,1	1
2Cl-Phe ^{B24} -KP	9,6	1
2F-Phe ^{B24} -DKP	9,2	1

5 Las mediciones de unión cruzada de análogos de insulina seleccionados con el receptor de IGF se resumen en la Tabla 7. La insulina humana en estas condiciones se une con IGFR-260 veces menos estrechamente que con IGF-I. La unión cruzada de Asp^{B10}-insulina aumenta el doble mientras que la unión cruzada por un análogo en uso clínico amplio, Arg^{B31}, Arg^{B32}, Gly^{A21}-insulina (insulina glargineTM; LantusTM), aumenta el triple. Dicho aumento de la unión cruzada con IGFR es indeseable ya que el tratamiento de las ratas Sprague-Dawley con Asp^{B10}-insulina se asocia con una incidencia aumentada de tumores mamarios mientras que los estudios clínicos recientes sugieren la posibilidad de que el uso humano de Lantus confiera un aumento dependiente de la dosis en el riesgo de diversos cánceres. (La secuencia de IGF-I contiene Glu en la posición B10, similar en carga negativa a Asp^{B10}. Aunque sin desear quedado ligado a la teoría, se cree que la unión cruzada por Lantus aumenta por los dos restos básicos en el extremo C terminal de la cadena B. Debido a que IGF-I también contiene Lys en la posición B28 y Pro en la posición B29, es posible que KP-insulina pueda mostrar un pequeño aumento en la unión cruzada pero los datos anteriores no son suficientemente precisos para establecerlo). DKP-insulina muestra un aumento seis veces en la unión cruzada de IGFR. De forma significativa, este aumento se contrarresta por una sustitución de *orto*-monofluoro en B24: 2F-Phe^{B24}-DKP-insulina muestra el mismo nivel bajo de unión cruzada que la insulina humana de tipo silvestre. Su potencia hipoglucémica en ratas diabéticas también es igual que la de insulina humana (Tabla 6). Debido que 2F-Phe^{B24}-DKP-insulina es monomérica incluso a concentraciones proteicas > 0,5 mM, este análogo tiene por lo tanto utilidad potencial como una formulación de insulina de acción ultra-rápida y ultra-estable para uso clínico. Los afinidades de unión cruzada de 2Cl-Phe^{B24}-KP-insulina y 2Br-Phe^{B24}-KP-insulina también tienen un nivel bajo similar al de insulina humana. Estos análogos también son completamente activos en ratas diabéticas (Tabla 5).

25 Se determinaron los espectros de DC para insulina humana, KP-insulina (lispro) y análogos de insulina de Phe^{B24} halogenada como se ha descrito anteriormente. Se proporciona desnaturalización de proteína detectada por DC en función de la concentración de clorhidrato de guanidina en las Figs. 7A y 7B. La Fig. 7A proporciona una comparación de insulina humana (línea continua) y KP-insulina (línea discontinua; "parental") con análogos de KP-insulina que contienen sustitución monofluorosa de Phe^{B24} en la posición 2, 3 o 4 (triángulos rellenos, cuadrados rellenos y círculos abiertos, respectivamente). La Fig. 7B proporciona una comparación de insulina humana (línea continua) y KP-insulina (línea discontinua; "parental") con análogos que contienen una modificación 2-Cl o 2-Br de Phe^{B24} (triángulos invertidos rellenos y triángulos abiertos, respectivamente). Se han proporcionado anteriormente parámetros termodinámicos inferidos en la Tabla 4. El desplegamiento fraccional se controló por la elipticidad residual media a 222 nm a 25 °C.

35 Se han obtenido estructuras de RMN de análogos de insulina seleccionados para demostrar que las sustituciones de halógenos se acomodan bien en insulina y no provocan alteraciones conformacionales transmitidas. Se proporcionan espectros de ¹H-RMN en las Figs. 8A y 8B. La estructura de RMN de 2Cl-Phe^{B24}-KP-insulina como un monómero en solución es por lo tanto similar a la de KP-insulina; de forma similar, la estructura de RMN de 2F-Phe^{B24}-DKP-insulina (también como un monómero en solución) es similar a la de DKP-insulina. El análisis cualitativo de los espectros de RMN de 2F-Phe^{B24}-KP-insulina y de 2Br-Phe^{B24}-KP-insulina indican de forma similar estructuras de tipo nativo.

45 Se han determinado las estructuras cristalinas de 2F-Phe^{B24}-KP-insulina y 4F-Phe^{B24}-KP-insulina como hexámeros estabilizados por cinc en presencia del conservante fenol (datos no mostrados). Las estructuras son similares a las previamente indicadas para KP-insulina como un hexámero estabilizado por cinc en presencia de fenol. En cada caso la conformación del hexámero es T₃R₃^f que contiene dos iones de cinc axiales y tres moléculas de fenol unidas. Se observa fácilmente la densidad electrónica para los átomos de halógeno. La estructura de las superficies formadoras de dímeros y trímeros se conserva en los análogos halogenados, lo que sugiere que pueden obtenerse formulaciones farmacéuticas similares a las empleadas para KP-insulina y otros análogos de insulina de acción rápida.

El análogo de insulina de la invención encuentra utilidad en un método para tratar a un paciente, que comprende administrar un análogo de insulina sustituido con monohalógeno al paciente. En un ejemplo, el análogo de insulina sustituido con halógeno es un análogo de insulina que contiene fenilalanina sustituida con halógeno, tal como una

fenilalanina fluoro, cloro o bromo sustituida. En un ejemplo particular la fenilalanina sustituida con halógeno es 2F-Phe^{B24}. En otro ejemplo, el análogo de insulina sustituido con halógeno contiene adicionalmente una o más sustituciones en otra parte en la molécula de insulina diseñadas para alterar la tasa de acción del análogo en el cuerpo. En otro ejemplo más, el análogo de insulina se administra por una bomba de insulina externa o implantable. Un análogo de insulina de la presente invención también puede contener otras modificaciones, tales como una unión entre el extremo C terminal de la cadena B y el extremo N terminal de la cadena A como se describe más completamente en la publicación de Solicitud Internacional relacionada N.º WO 2008/043033.

Una composición farmacéutica puede comprender dichos análogos de insulina y que pueden incluir opcionalmente cinc. Pueden incluirse iones de cinc en dicha composición a un nivel de una relación molar de entre 2,2 y 3,0 por hexámero del análogo de insulina. En dicha formulación, la concentración del análogo de insulina típicamente estaría entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 3 mM; pueden usarse concentraciones de hasta 3 mM en el depósito de una bomba de insulina. Pueden formularse modificaciones de análogos de insulina en el momento de la comida como se describe para (a) formulaciones "regulares" de Humulin™ (Eli Lilly and Co.), Humalog™ (Eli Lilly and Co.), Novalin™ (Novo-Nordisk), y Novalog™ (Novo-Nordisk) y otras formulaciones de insulina de acción rápida aprobadas actualmente para su uso humano, (b) formulaciones "NPH" de los análogos de insulina anteriores y otros, y (c) mezclas de dichas formulaciones.

Los excipientes pueden incluir glicerol, glicina, otros tampones y sales y conservantes antimicrobianos tales como fenol y *meta*-cresol; se sabe que estos últimos conservantes potencian la estabilidad del hexámero de insulina. Dicha composición farmacéutica puede usarse para tratar a un paciente que tiene diabetes mellitus u otra afección médica administrando una cantidad fisiológicamente eficaz de la composición al paciente.

También se describe en el presente documento un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que codifica un análogo de insulina que contiene una secuencia que codifica al menos una cadena B de insulina con una fenilalanina fluorada en la posición B24. Esto puede conseguirse mediante la introducción de un codón de terminación (tal como el codón ámbar, TAG) en la posición B24 junto con un ARNt supresor (un supresor de ámbar cuando se use un codón ámbar) y una ARNt sintetasa correspondiente, que incorpora un aminoácido no convencional en un polipéptido en respuesta al codón de terminación, como se ha descrito previamente (Furter, 1998, Protein Sci. 7:419-426; Xie *et al.*, 2005, Methods. 36: 227-238). La secuencia particular puede depender del uso con el codón preferido de una especie en la que se introduzca la secuencia de ácido nucleico. El ácido nucleico también puede codificar otras modificaciones de insulina de tipo silvestre. La secuencia de ácido nucleico puede codificar una secuencia de cadena A o B modificada que contiene una sustitución o extensión no relacionada en otra parte del polipéptido o análogos de proinsulina modificados. El ácido nucleico también puede ser una parte de un vector de expresión, y ese vector puede insertarse en una célula hospedadora tal como una célula hospedadora procarionta como una línea celular de *E. coli*, o una línea celular eucariota tal como cepa o línea celular de *S. cerevisiae* o *Pichia pastoris*.

Por ejemplo, se prevé que pueden sintetizarse genes sintéticos para dirigir la expresión de un polipéptido de cadena B en levadura de *Pichia pastoris* y otros microorganismos. La secuencia de nucleótidos de un polipéptido de cadena B que utiliza un codón de terminación en la posición B24 para el fin de incorporar una fenilalanina monohalogenada en esa posición puede ser una de las siguientes o variantes de las mismas:

(a) con Preferencias Codónicas Humanas:

TTTGTGAACCAACACCTGTGCGGCTCACACCTGGTGAAGCTCTCTACCTAGTGTGC
GGGGAACGAGGCTAGTTCTACACACCCAAGACC (SEC ID N° 12)

(b) con Preferencias Codónicas de *Pichia*:

TTTGTTAACCAACATTTGTGTGGTTCTCATTGGTTGAAGCTTTGTACTTGGTTTGTG
GTGAAAGAGGTTAGTTTTACTCCAAAGACT (SEC ID N° 13)

De forma similar, un ADNc de pro-insulina de longitud completa que tenga preferencias codónicas humanas y que utilice un codón de terminación en la posición B24 para el fin de incorporar una fenilalanina halogenada en esa posición puede tener la secuencia de SEC ID N° 14.

TTTGTGAACC AACACCTGTG CGGCTCACAC CTGGTGAAG CTCTCTACCT
AGTGTGCGGG GAACGAGGCT AGTTCTACAC ACCCAAGACC CGCCGGGAGG
CAGAGGACCT GCAGGTGGGG CAGGTGGAGC TGGGCGGCGG CCCTGGTGCA
GGCAGCCTGC AGCCCTTGGC CCTGGAGGGG TCCCTGCAGA AGCGTGGCAT
TGTGGAACAA TGCTGTACCA GCATCTGCTC CCTCTACCAG CTGGAGAACT

ACTGCAACTA G

(SEC ID N° 14)

De forma similar, un ADNc de pro-insulina humana de longitud completa que utilice un codón de terminación en la posición B24 para el fin de incorporar una fenilalanina halogenada en esa posición y que tenga codones preferidos por *P. pastoris* puede tener la secuencia de SEC ID N° 15.

TTTGTTAACC AACATTTGTG TGGTTCTCAT TTGGTTGAAG CTTTGTACTT
GGTTTGTGGT GAAAGAGGTT AGTTTTACAC TCCAAAGACT AGAAGAGAAG
CTGAAGATTT GCAAGTTGGT CAAGTTGAAT TGGGTGGTGG TCCAGGTGCT
GGTTCTTTGC AACCATTTGGC TTTGGAAGGT TCTTTGCAA AGAGAGGTAT
TGTTGAACAA TGTTGTACTT CTATTTGTTC TTTGTACCAA TTGGAAAAC
ACTGTA ACTA A

(SEC ID N° 15)

Se desvela en el presente documento una secuencia de nucleótidos de un polipéptido de cadena B que utiliza un codón de terminación en la posición B25 para el fin de incorporar una fenilalanina halogenada en esa posición, y puede ser una de las siguientes o variantes de las mismas:

(b) con Preferencias Codónicas Humanas:

TTTGTGAACCAACACCTGTGCGGCTCACACCTGGTGAAGCTCTCTACCTAGTGTGC
GGGGAACGAGGCTTCTAGTACACACCCAAGACC

(SEC ID N° 19)

(b) con Preferencias Codónicas de *Pichia*:

TTTGTTAACCAACATTTGTGTGGTTCTCATTTGGTTGAAGCTTTGTACTTGGTTTGTG
GTGAAAGAGGTTTTTAGTACACTCCAAAGACT

(SEC ID N° 20)

Un ADNc de pro-insulina humana de longitud completa que tenga preferencias codónicas humanas y que utilice un codón de terminación en la posición B25 para el fin de incorporar una fenilalanina halogenada tal como una fenilalanina fluorada en esa posición puede tener la secuencia de SEC ID N° 21.

TTTGTGAACC AACACCTGTG CGGCTCACAC CTGGTGAAG CTCTCTACCT
AGTGTGCGGG GAACGAGGCT TCTAGTACAC ACCCAAGACC CGCCGGGAGG
CAGAGGACCT GCAGGTGGGG CAGGTGGAGC TGGGCGGCGG CCCTGGTGCA
GGCAGCCTGC AGCCCTTGGC CCTGGAGGGG TCCCTGCAGA AGCGTGGCAT
TGTTGAACAA TGCTGTACCA GCATCTGCTC CCTCTACCAG CTGGAGAACT
ACTGCAACTA G

(SEC ID N° 21)

De forma similar, un ADNc de pro-insulina humana de longitud completa que utiliza un codón de terminación en la posición B25 para el fin de incorporar una fenilalanina halogenada tal como una fenilalanina fluorada en esa posición y que tiene codones preferidos por *P. pastoris* puede tener la secuencia de SEC ID N° 22.

TTTGTTAACC AACATTTGTG TGGTTCTCAT TTGGTTGAAG CTTTGTACTT
GGTTTGTGGT GAAAGAGGTT TTTAGTACAC TCCAAAGACT AGAAGAGAAG
CTGAAGATTT GCAAGTTGGT CAAGTTGAAT TGGGTGGTGG TCCAGGTGCT
GGTTCTTTGC AACCATTTGGC TTTGGAAGGT TCTTTGCAA AGAGAGGTAT
TGTTGAACAA TGTTGTACTT CTATTTGTTC TTTGTACCAA TTGGAAAAC
ACTGTA ACTA A

(SEC ID N° 22)

De forma similar, una secuencia de nucleótidos de un polipéptido de cadena B que utiliza un codón de terminación en la posición B26 para el fin de incorporar una fenilalanina halogenada en esa posición puede ser una de las siguientes o variantes de las mismas:

(c) con Preferencias Codónicas Humanas:

TTTGTGAACCAACACCTGTGCGGCTCACACCTGGTGAAGCTCTCTACCTAGTGTGC

GGGGAACGAGGCTTCTTCTAGACACCCAAGACC

(SEC ID N° 23)

(b) con Preferencias Codónicas de *Pichia*:

5 TTTGTTAACCAACATTTGTGTGGTTCTCATTGGTTGAAGCTTTGTACTTGGTTTGTG
GTGAAAGAGGTTTTTTTTAGACTCCAAAGACT

(SEC ID N° 24)

10 Un ADNc de pro-insulina de longitud completa que tiene preferencias codónicas humanas y que utiliza un codón de terminación en la posición B26 para el fin de incorporar una fenilalanina halogenada en esa posición puede tener la secuencia de SEC ID N° 25.

TTTGTGAACC AACACCTGTG CGGCTCACAC CTGGTGAAG CTCTCTACCT
AGTGTGCGGG GAACGAGGCT TCTTCTAGAC ACCCAAGACC CGCCGGGAGG
CAGAGGACCT GCAGGTGGGG CAGGTGGAGC TGGGCGGCGG CCCTGGTGCA
GGCAGCCTGC AGCCCTGGC CCTGGAGGGG TCCCTGCAGA AGCGTGGCAT
TGTGGAACAA TGCTGTACCA GCATCTGCTC CCTCTACCAG CTGGAGAACT
ACTGCAACTA G

(SEC ID N° 25)

15 De forma similar, un ADNc de pro-insulina humana de longitud completa que utiliza un codón de terminación en la posición B26 para el fin de incorporar una fenilalanina halogenada en esa posición y que tiene codones preferidos por *P. pastoris* puede tener la secuencia de SEC ID N° 26.

TTTGTTAACC AACATTTGTG TGGTTCTCAT TTGGTTGAAG CTTTGTACTT
GGTTTGTGGT GAAAGAGGTT TTTTTAGAC TCCAAAGACT AGAAGAGAAG
CTGAAGATTT GCAAGTTGGT CAAGTTGAAT TGGGTGGTGG TCCAGGTGCT
GGTTCTTTGC AACCATTGGC TTTGGAAGGT TCTTTGCAAA AGAGAGGTAT
20 TGTGGAACAA TGTTGTACTT CTATTGTTT TTTGTACCAA TTGGAAA
ACTGTA ACTA A

(SEC ID N° 26)

Otras variantes de estas secuencias, que codifican la misma secuencia polipeptídica, son posibles, dados los sinónimos en el código genético.

25 Basándose en la divulgación anterior, debería ser evidente ahora que los análogos de insulina sustituidos con monohalógeno llevarán a cabo los objetos expuestos anteriormente en el presente documento. Concretamente, estos análogos de insulina muestran estabilidad termodinámica potenciada, resistencia a fibrilación y potencia en la reducción de los niveles de glucosa en sangre. Los análogos de insulina que contienen fenilalanina sustituida con monohalógeno también tienen reactividad cruzada reducida para el factor de crecimiento de tipo insulina (IGFR).

30 La siguiente bibliografía se cita para demostrar que los métodos de ensayo y análisis descritos en el presente documento se entenderán por un experto habitual en la materia.

35 Furter, R., 1998, Expansion of the genetic code: Site-directed p-fluoro-phenylalanine incorporation in *Escherichia coli*. Protein Sci. 7:419-426.

Merrifield, R.B., Vizioli, L.D., y Boman, H.G. 1982. Synthesis of the antibacterial peptide cecropin A (1-33). Biochemistry 21: 5020-5031.

40 Mirmira, R.G., y Tager, H.S. 1989. Role of the phenylalanine^{B24} side chain in directing insulin interaction with its receptor: Importance of main chain conformation. J. Biol. Chem. 264: 6349-6354.

Sosnick, T.R., Fang, X., y Shelton, V.M. 2000. Application of circular dichroism to study RNA folding transitions. Methods Enzymol. 317: 393-409.

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

50 Weiss, M.A., Hua, Q.X., Jia, W., Chu, Y.C., Wang, R.Y., y Katsoyannis, P.G. 2000. Hierarchical protein "un-design": insulin's intrachain disulfide bridge tethers a recognition α -helix. Biochemistry 39: 15429-15440.

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

Xie, J. y Schultz, P.G. 2005. An expanding genetic code. Methods. 36: 227-238.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad Case de Western Reserve

10

<120> INSULINA ESTABILIZADA POR HALÓGENOS

<130> 200512.00075

15

<150> US 61/085.212

<151> 31-07-2008

<160> 26

20

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 86

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25

<400> 1

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

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

Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys
50 55 60

Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
65 70 75 80

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
85

30

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35

<400> 2

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn
20

40

<210> 3

<211> 30

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

5
 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
 20 25 30

<210> 4
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(26)
 <223> Una Phe está halogenada

15

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26)..(26)
 <223> Xaa es Tyr o Phe

20

<400> 4

25
 Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Xaa Thr Pro Lys Thr
 20 25 30

<210> 5
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(26)
 <223> Una Phe está halogenada

35

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26)..(26)
 <223> Xaa es Tyr o Phe
 <400> 5

40

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Xaa Thr Lys Pro Thr
 20 25 30

45

<210> 6
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

50

<220>

- <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(26)
 <223> Una Phe está halogenada
- 5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26)..(26)
 <223> Xaa es Tyr o Phe
- 10 <400> 6
- Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15
- Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Xaa Thr Asp Lys Thr
 20 25 30
- 15 <210> 7
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
- 20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa es His o Phe
- 25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(26)
 <223> Una Phe está halogenada
- 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26)..(26)
 <223> Xaa es Tyr o Phe
- 35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa es Pro, Lys o Asp
- 40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa es Lys o Pro
- 45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (31)..(65)
 <223> Pueden estar presentes cualesquiera de 0-35 restos o una rotura en la cadena de aminoácidos.
- 50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31)..(65)
 <223> El resto en cualquiera de las posiciones 31-65 puede ser cualquier resto de aminoácido; no se implica ninguna información relativa con respecto a la frecuencia relativa de restos alternativos.
- 55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (69)..(69)
 <223> Xaa es His o Glu
- 60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (73)..(73)

<223> Xaa es His o Thr

<400> 7

Xaa Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Xaa Thr Xaa Xaa Thr Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60

Xaa Gly Ile Val Xaa Gln Cys Cys Xaa Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln
65 70 75 80

Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
85

5

<210> 8

<211> 30

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(26)

15 <223> Una Phe está halogenada

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (26)..(26)

20 <223> Xaa es Tyr o Phe

<400> 8

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser Asp Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Xaa Thr Lys Pro Thr
20 25 30

25

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

30 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(3)

35 <223> Una Phe está halogenada

<400> 9

Gly Phe Phe Tyr Thr Lys Pro Thr
1 5

ES 2 552 636 T3

<210> 10
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(3)
 <223> Una Phe está halogenada
 10
 <400> 10
 Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
 1 5
 15
 <210> 11
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 11
 25
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5
 30
 <210> 12
 <211> 90
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 12
 tttgtgaacc aacacctgtg cggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60
 gaacgaggct agttctacac acccaagacc 90
 35
 <210> 13
 <211> 90
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 13
 tttgtaacc aacatttgtg tggttctcat ttggttgaag ctttgtactt ggtttgtggt 60
 gaaagagggt agttttacac tccaaagact 90
 45
 <210> 14
 <211> 261
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 14
 50
 55

ES 2 552 636 T3

tttgtgaacc aacacctgtg cggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60
 gaacgaggct agttctacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg 120
 caggtggagc tgggcggcgg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180
 tccctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcatctgctc cctctaccag 240
 ctggagaact actgcaacta g 261

5 <210> 15
 <211> 261
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 15

tttgtaacc aacatttgtg tggttctcat ttggttgaag ctttgtactt ggtttgtggt 60
 gaaagagggt agttttacac tccaaagact agaagagaag ctgaagattt gcaagttggt 120
 caagttgaat tgggtggtgg tccaggtgct ggttctttgc aaccattggc tttggaaggt 180
 tctttgcaaa agagaggtat tgttgaacaa tgttgtactt ctatttggtc tttgtaccaa 240
 ttggaaaact actgtaacta a 261

15 <210> 16
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 16

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser Asp Leu Val Glu Ala Leu Tyr

1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg
 20

25 <210> 17
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 17

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

Leu Val Cys Gly Glu Arg
 20

35 <210> 18
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 552 636 T3

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 5 <223> Phe está halogenada

 <400> 18

 Gly Phe Phe Phe Thr Lys Pro Thr
 1 5
 10
 <210> 19
 <211> 90
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 19

 tttgtgaacc aacacctgtg cggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60
 gaacgaggct tctagtacac acccaagacc 90
 20
 <210> 20
 <211> 90
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 20

 tttgttaacc aacatttgtg tggttctcat ttggttgaag ctttgtactt ggtttgtggt 60
 30 gaaagagggt tttagtacac tccaaagact 90
 35
 <210> 21
 <211> 261
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 21

 tttgtgaacc aacacctgtg cggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg 60
 gaacgaggct tctagtacac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcagggtgggg 120
 cagggtggagc tgggcggcgg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg 180
 tccctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcatctgctc cctctaccag 240
 ctggagaact actgcaacta g 261
 40
 <210> 22
 <211> 261
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 22
 50

ES 2 552 636 T3

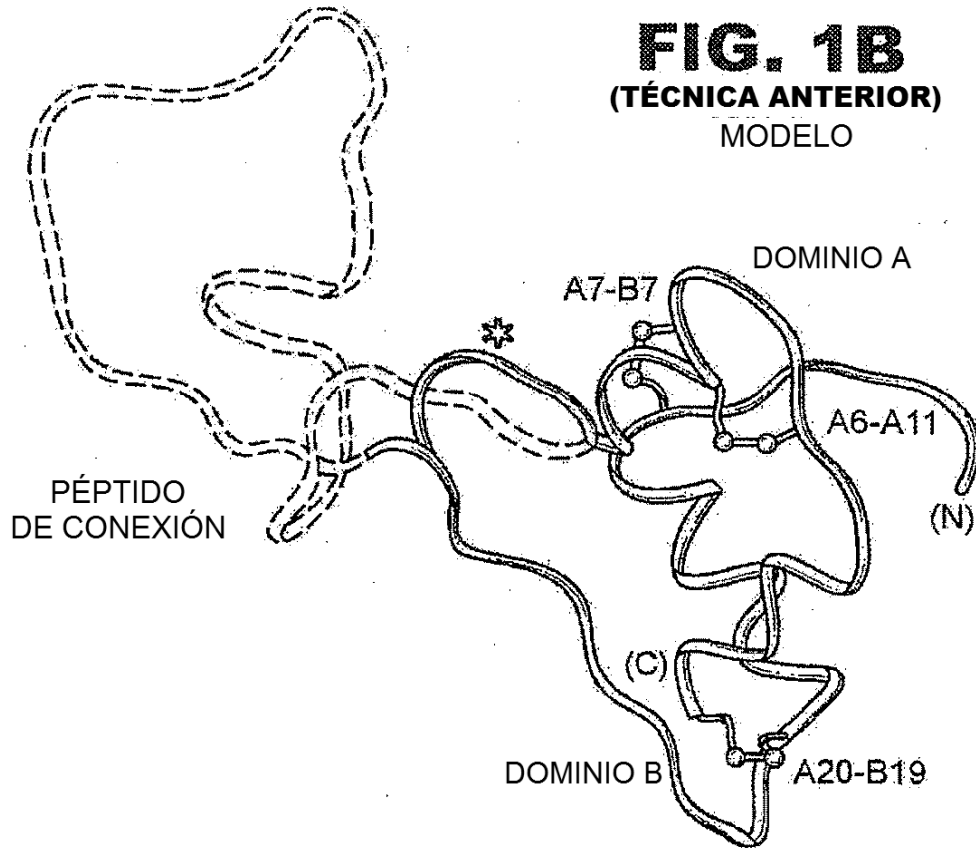
	tttgtaacc aacatttggtg tggttctcat ttggttgaag ctttgtactt ggtttgtggt	60
	gaaagagggtt tttagtagac tccaaagact agaagagaag ctgaagattt gcaagttggt	120
	caagttgaat tgggtggtgg tccaggtgct ggttctttgc aaccattggc tttggaaggt	180
	tctttgcaaa agagaggtat tgttgaacaa tgttgtactt ctatttggtc tttgtaccaa	240
	ttggaaaact actgtaacta a	261
5	<210> 23 <211> 90 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 23	
10	tttgtgaacc aacacctgtg cggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg	60
	gaacgaggct tcttctagac acccaagacc	90
15	<210> 24 <211> 90 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 24	
25	tttgtaacc aacatttggtg tggttctcat ttggttgaag ctttgtactt ggtttgtggt	60
	gaaagagggtt ttttttagac tccaaagact	90
30	<210> 25 <211> 261 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 25	
35	tttgtgaacc aacacctgtg cggctcacac ctggtggaag ctctctacct agtgtgcggg	60
	gaacgaggct tcttctagac acccaagacc cgccgggagg cagaggacct gcaggtgggg	120
	caggtggagc tgggcggcgg ccctggtgca ggcagcctgc agcccttggc cctggagggg	180
	tccctgcaga agcgtggcat tgtggaacaa tgctgtacca gcatctgctc cctctaccag	240
	ctggagaact actgcaacta g	261
40	<210> 26 <211> 261 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Construcción sintética	
	<400> 26	

ES 2 552 636 T3

tttgtaacc	aacatttg	tggttctcat	ttggttgaag	ctttgtactt	ggtttgggt	60
gaaagaggtt	tttttagac	tccaaagact	agaagagaag	ctgaagattt	gcaagttggt	120
caagttgaat	tgggtggtg	tccaggtgct	ggttctttgc	aaccattggc	tttgggaaggt	180
tctttgcaaa	agagaggtat	tgttgaacaa	tgttgtactt	ctatttgttc	tttgtaccaa	240
ttgaaaact	actgtaacta	a				261

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un análogo de insulina que comprende un polipéptido de cadena B que incorpora una fenilalanina monohalogenada en la posición B24.
2. El análogo de insulina de la reivindicación 1, en el que la fenilalanina monohalogenada es *orto*-monofluoro-fenilalanina, *orto*-monobromo-fenilalanina u *orto*-monocloro-fenilalanina.
- 10 3. El análogo de insulina de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el análogo es un análogo de una insulina de mamífero.
4. El análogo de insulina de la reivindicación 3, en el que el análogo es un análogo de insulina humana.
- 15 5. El análogo de insulina de la reivindicación 3, en el que el polipéptido de cadena B comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N° 4-8, en el que el aminoácido en la posición B26 es Tyr, y polipéptidos que tienen tres o menos sustituciones de aminoácidos adicionales de los mismos.
- 20 6. Un método para incorporar una fenilalanina monohalogenada en la posición B24 de un polipéptido de cadena B de un análogo de insulina, siendo la fenilalanina monohalogenada una fenilalanina fluorada, comprendiendo el método expresar un ácido nucleico que codifica el análogo de insulina, en el que la fenilalanina monohalogenada está codificada por un codón de terminación, en el que el ácido nucleico se expresa junto con un ARNt supresor y una ARNt sintetasa correspondiente que incorpora el aminoácido no convencional en respuesta al codón de terminación.
- 25 7. El método de la reivindicación 6, en el que el codón de terminación es la secuencia de ácido nucleico TAG.
8. El método de la reivindicación 7, en el que el ácido nucleico comprende la secuencia de una cualquiera de SEC ID N°: 12-15.
- 30 9. El método de una de las reivindicaciones 6, 7 u 8, en el que el ácido nucleico es una parte de un vector de expresión.
10. El método de la reivindicación 9, en el que el vector de expresión se inserta en una célula hospedadora.
- 35 11. Un análogo de insulina o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, en el que el análogo de insulina o sal fisiológicamente aceptable del mismo contiene un polipéptido de cadena B que incorpora una fenilalanina monohalogenada en la posición B24, para su uso como un medicamento.
- 40 12. El análogo de insulina o una sal fisiológicamente aceptable del mismo de la reivindicación 11, en el que la fenilalanina monohalogenada es *orto*-monofluoro-fenilalanina, *orto*-monobromo-fenilalanina u *orto*-monocloro-fenilalanina.
- 45 13. El análogo de insulina o una sal fisiológicamente aceptable del mismo de la reivindicación 12, en el que el polipéptido de cadena B comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N° 4-8, en el que el aminoácido en la posición B26 es Tyr, y polipéptidos que tienen tres o menos sustituciones de aminoácidos adicionales de los mismos.



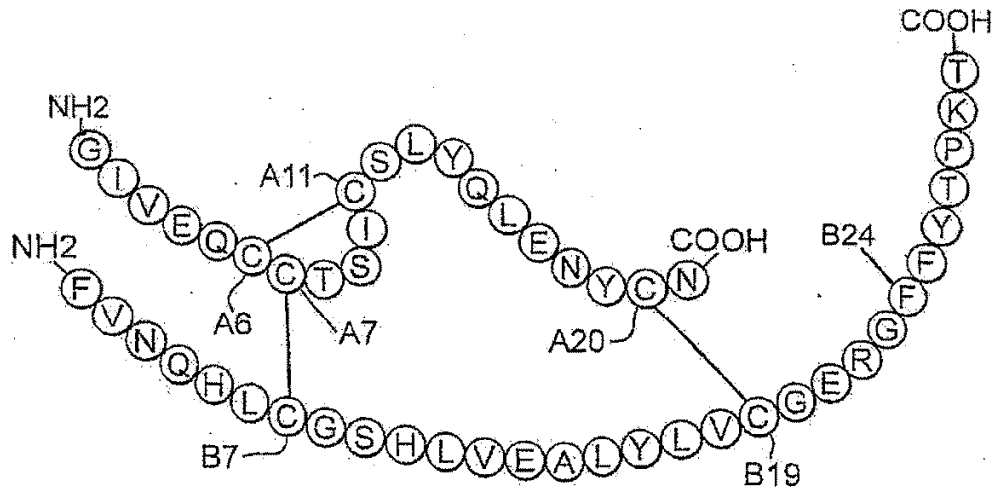


FIG. 1C

(TÉCNICA ANTERIOR)

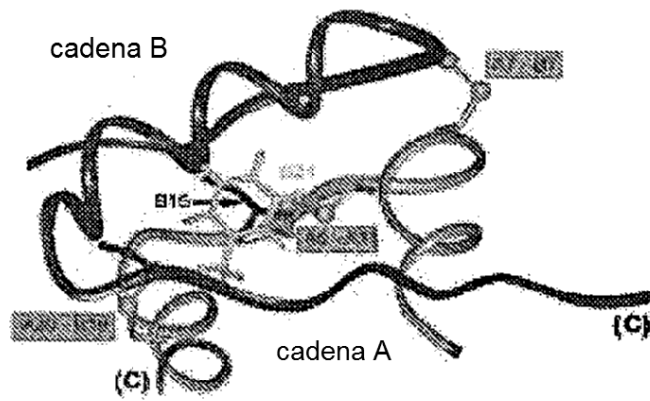


FIG. 1D

(TÉCNICA ANTERIOR)

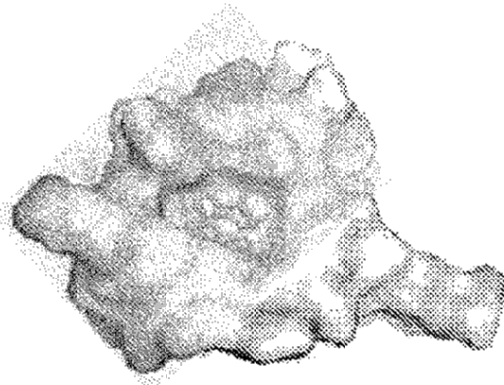


FIG. 1E

(TÉCNICA ANTERIOR)

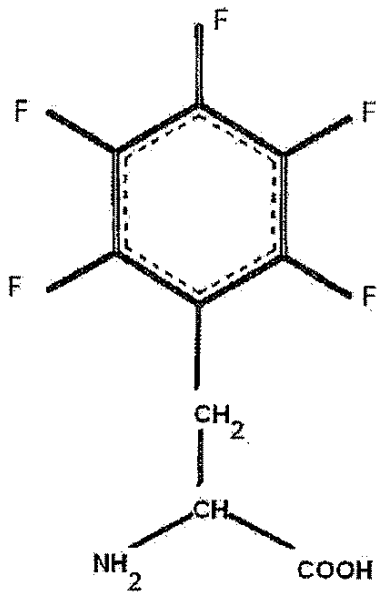


FIG. 2A

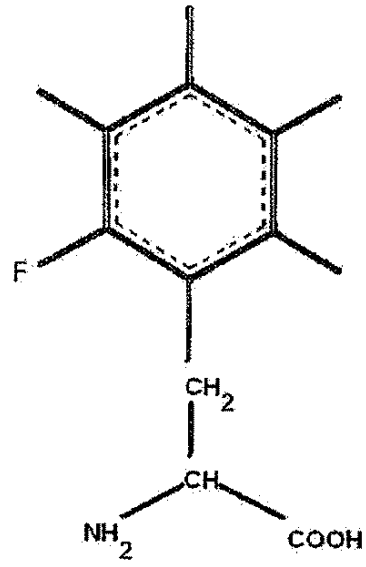


FIG. 2B

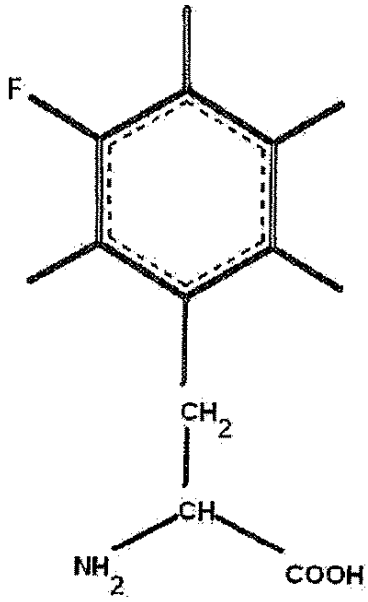


FIG. 2C

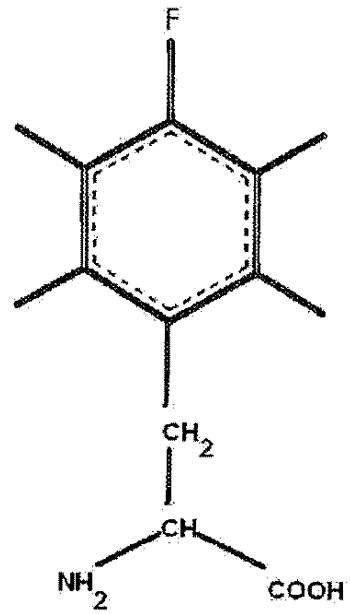


FIG. 2D

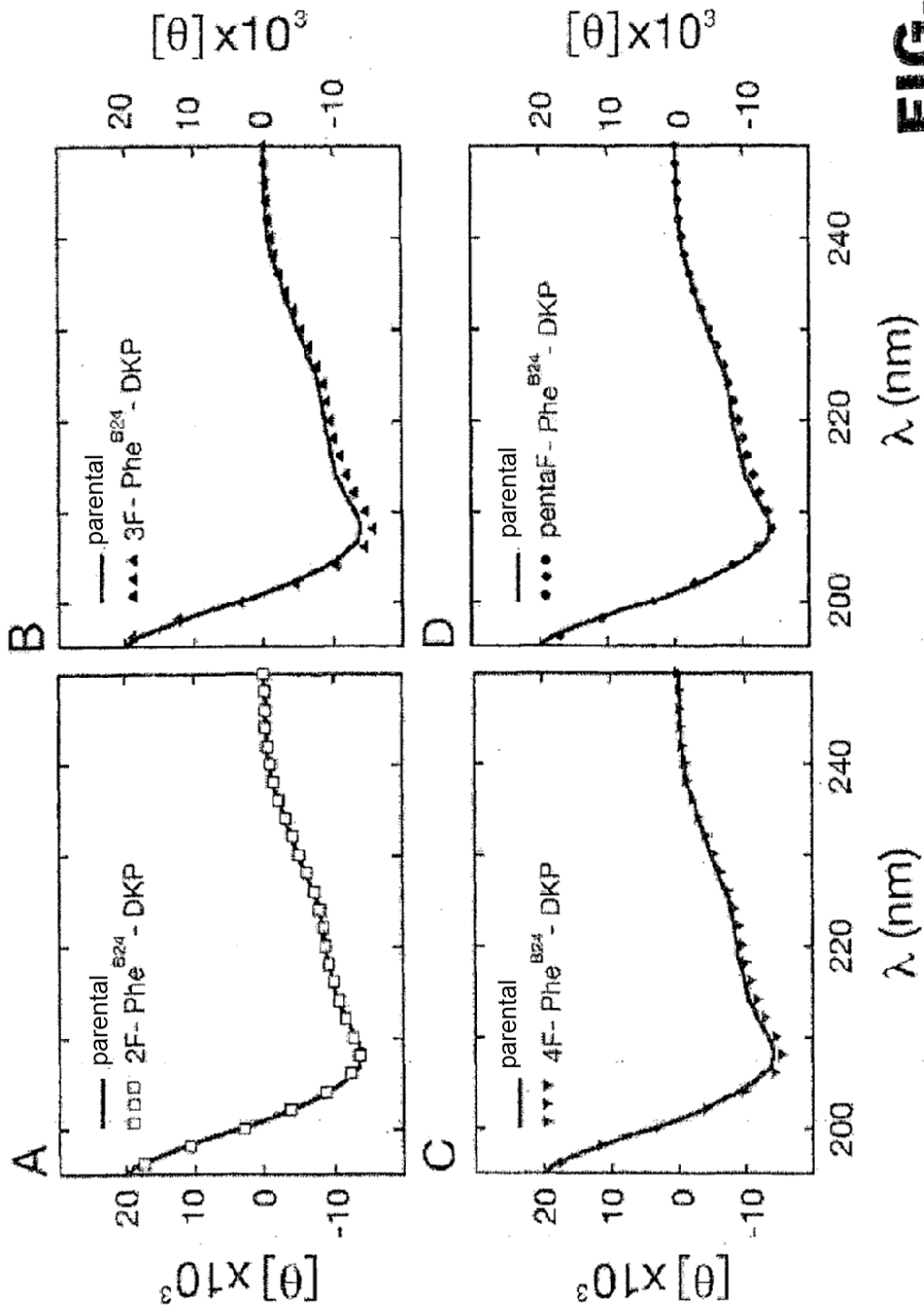


FIG. 3

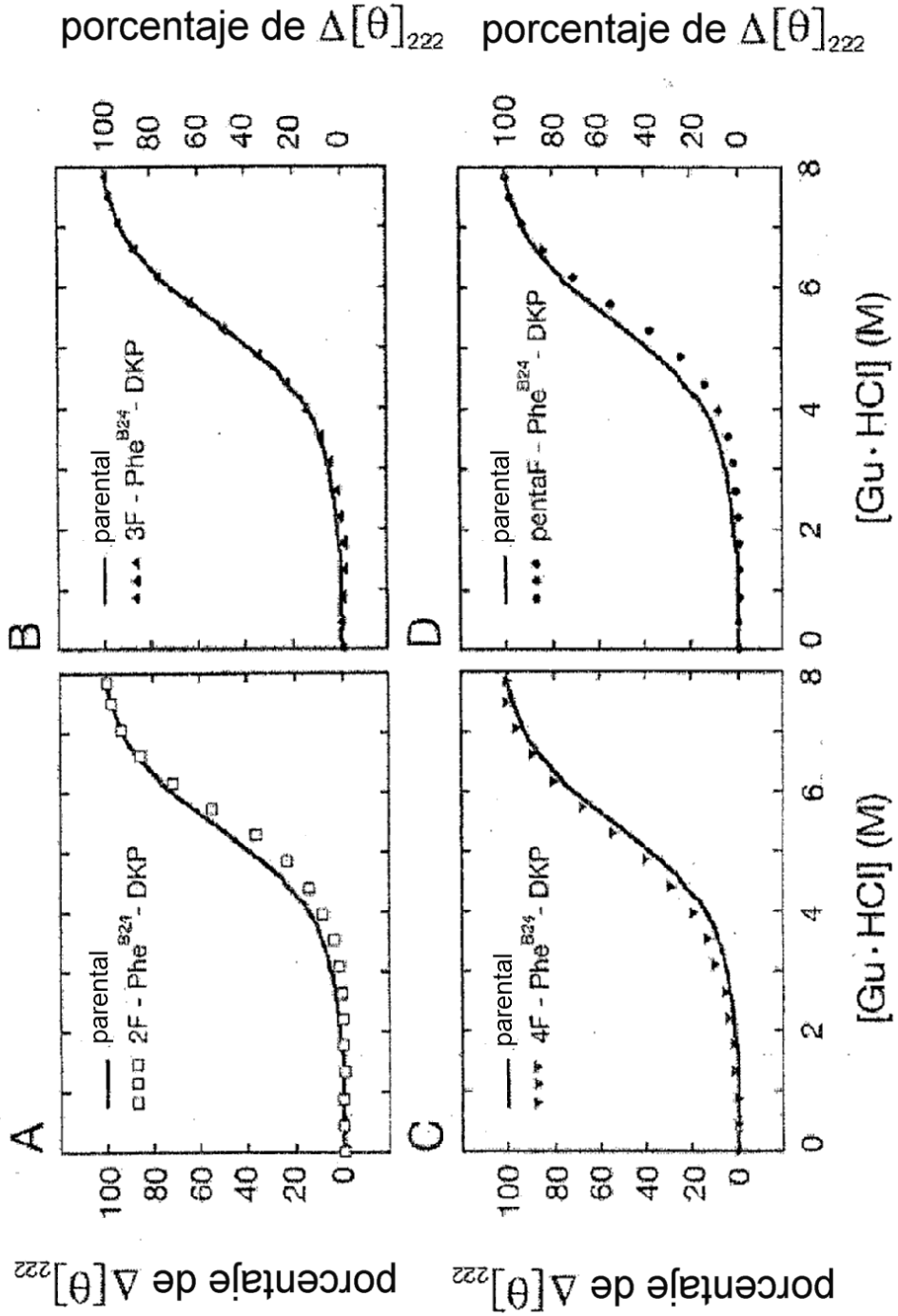


FIG. 4

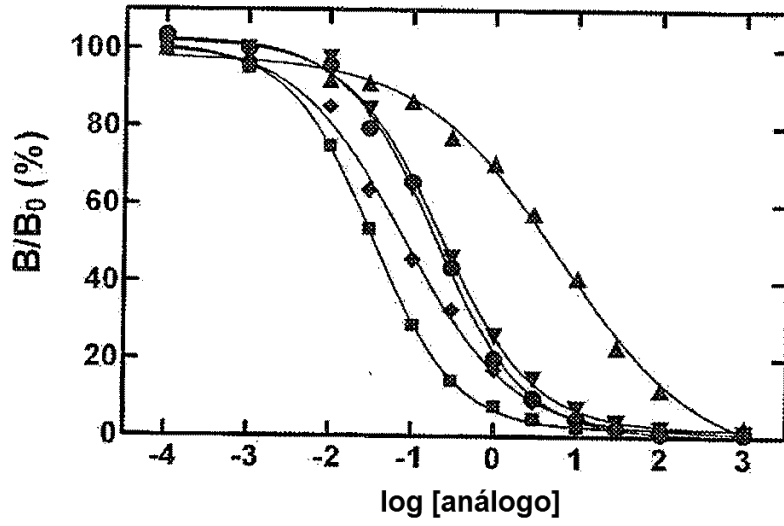


FIG. 5

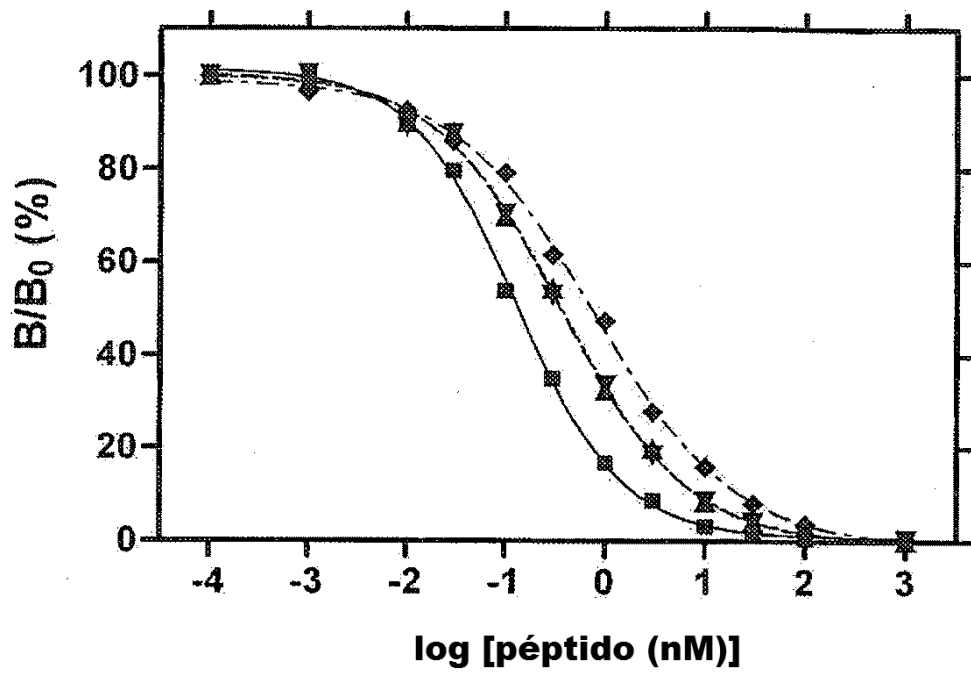


FIG. 6

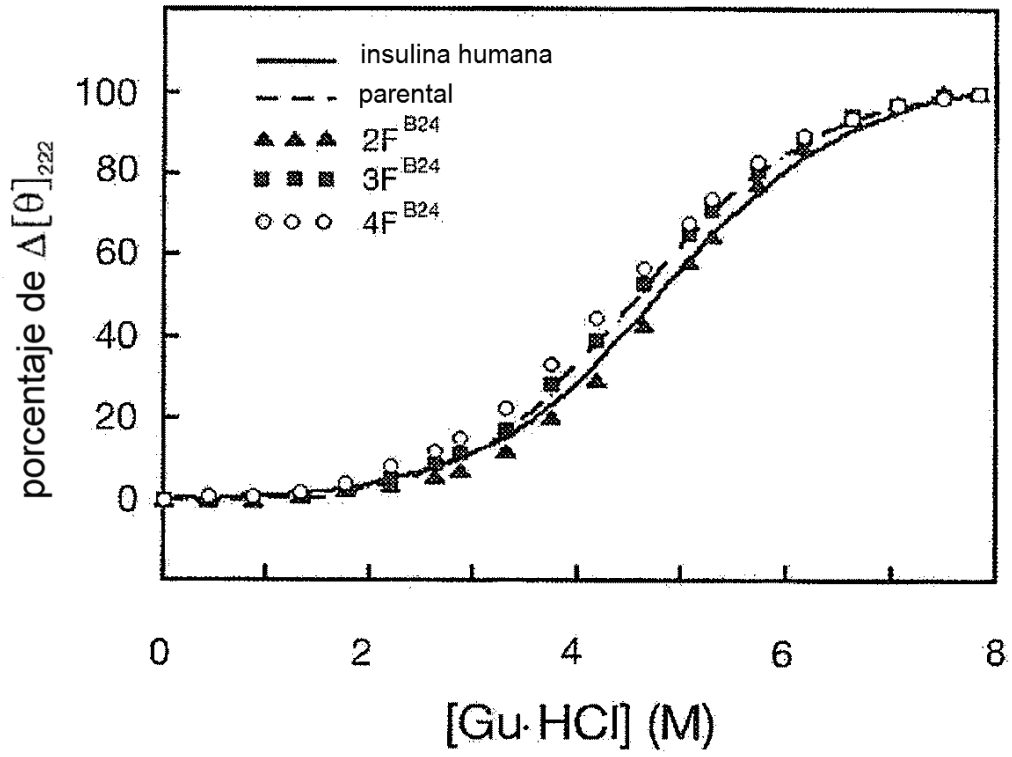
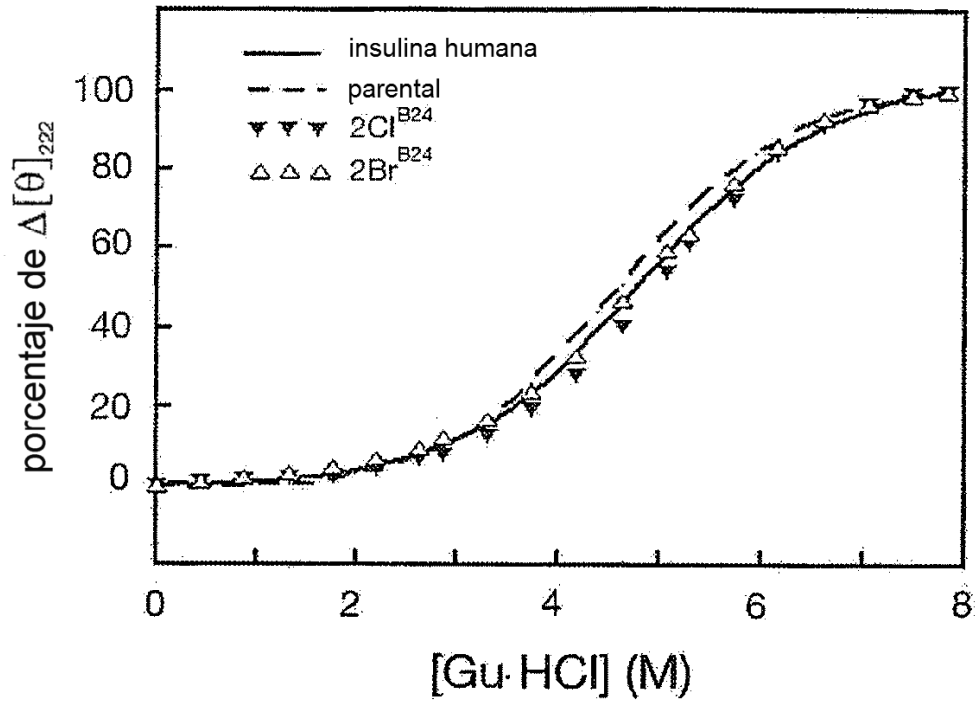


Fig. 7A

**Fig. 7B**

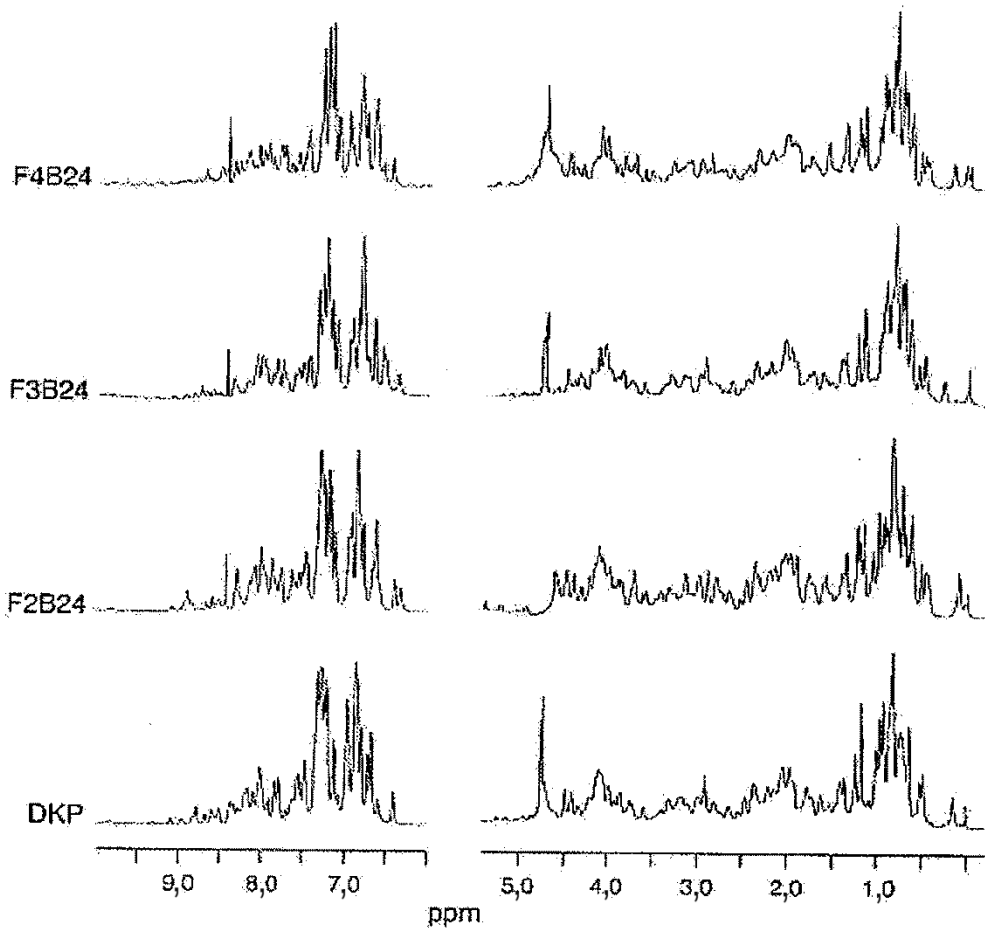


Fig. 8A

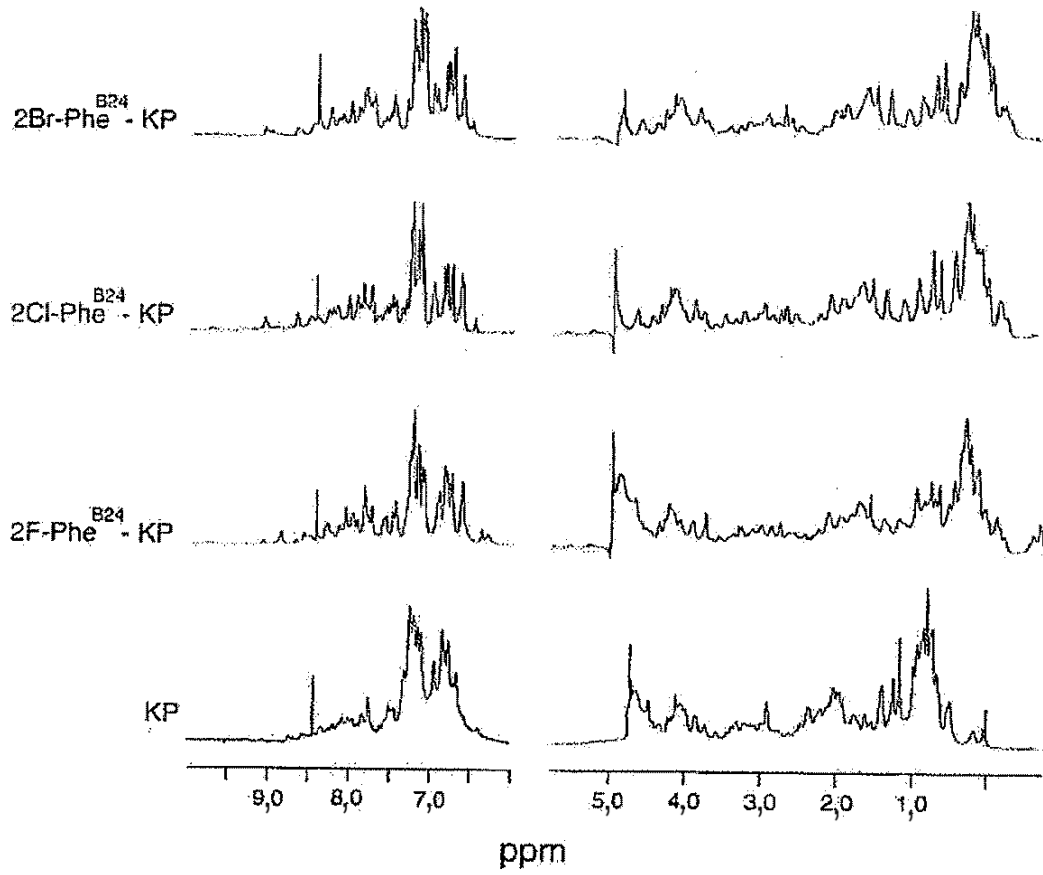


Fig. 8B