



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 321 439**

51 Int. Cl.:
C07K 14/605 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06114553 .8**
96 Fecha de presentación : **01.06.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1695983**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.08.2006**

54 Título: **Análogos del péptido-1 similar a glucagón.**

30 Prioridad: **16.06.2000 US 212171 P**
13.10.2000 US 240349 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.06.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.06.2009

73 Titular/es: **Eli Lilly & Company**
Lilly Corporate Center
Indianapolis, Indiana 46285, US

72 Inventor/es: **Glaesner, Wolfgang y**
Millican, Rohn

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

DESCRIPCIÓN

Análogos del péptido-1 similar a glucagón.

5 El péptido 1 similar a glucagón (GLP-1) es un péptido de 37 aminoácidos que es secretado por las células L del intestino en respuesta a la ingestión de alimento. Se ha descubierto que estimula la secreción de insulina (acción insulínica) provocando, de este modo, la captación de glucosa por las células y un descenso de los niveles séricos de glucosa (véase, por ejemplo, Mojsov, S., *Int. J. Peptide Protein Research*, 40:333-343 (1992)). Sin embargo, el GLP-1(1-37) es poco activo y la atención se ha centrado en análogos truncados denominados compuestos GLP, que son
10 biológicamente mucho más activos que GLP-1. Los ejemplos incluyen GLP-1(7-37), GLP-1(7-36)NH₂, Gly⁸-GLP-1(7-37)OH y Ser³⁴-GLP-1(7-37)OH. Debido a su capacidad para estimular la secreción de insulina, los compuestos GLP se muestran muy prometedores como agentes para el tratamiento de la diabetes, la obesidad y dolencias relacionadas.

15 Los compuestos GLP-1 pueden encontrarse en al menos dos formas diferentes. La primera forma es fisiológicamente activa y se disuelve fácilmente en solución acuosa a pH fisiológico (7,4). Por el contrario, la segunda forma tiene poca o ninguna actividad insulínica y es sustancialmente insoluble en agua a pH 7,4. Desafortunadamente, la forma inactiva se produce fácilmente cuando las soluciones acuosas de GLP-1 se agitan, se exponen a superficies hidrófobas o tienen grandes interfases aire/agua. La tendencia a convertirse en la forma insoluble complica considerablemente la producción de cantidades comerciales de compuestos GLP-1 activos; las operaciones de mezcla o el
20 movimiento continuo a través de una bomba son operaciones comunes en los procesos de producción en masa y estas operaciones causan agitación, interfases agua/aire y/o contacto con superficies hidrófobas que dan lugar a la forma insoluble. La conversión en la forma inactiva también puede tener lugar durante el almacenamiento o tras la administración a un paciente, complicando adicionalmente el uso de estos compuestos como fármacos. Por tanto, hay una gran necesidad de análogos de GLP-1 biológicamente activos que se conviertan menos fácilmente en la forma insoluble
25 que los compuestos GLP-1 disponibles actualmente.

Ahora se ha descubierto que varios análogos de GLP-1 con modificaciones en una o más de las siguientes posiciones: 11, 12, 16, 22, 23, 24, 26, 27, 30, 33, 34, 35, 36 ó 37, muestran un descenso apreciable de su propensión a la agregación en comparación con GLP-1(7-37)OH.

30 Muchos de estos análogos mantienen una activación del receptor de GLP-1 que es comparable, y en algunos casos mayor, a la de los compuestos GLP-1 conocidos, tales como GLP-1(7-37)OH y Val⁸-GLP-1(7-37)OH. Por ejemplo, el tiempo de agregación de Val⁸-Glu²²-GLP(7-37)OH es más de veinte veces mayor y la activación del receptor de GLP-1 es aproximadamente el 25% mayor que la de GLP-1(7-37)OH. Basándose en estos descubrimientos, en este documento se describen nuevos compuestos GLP-1 y procedimientos de tratamiento de uso de los nuevos compuestos GLP-1.

Una realización de la presente invención es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la fórmula I (SEQ ID N°: 1):

40
His-Xaa₈-Glu-Gly-Xaa₁₁-Xaa₁₂-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-
Ser-Tyr-Leu-Glu-Glu-Xaa₂₃-Xaa₂₄-Ala-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Phe-
45 Ile-Ala-Xaa₃₁-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-R
fórmula I (SEQ ID NO: 1)

50 en la que:

Xaa₈ es: Gly, Val;

55 Xaa₁₁ es: Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys, o His;

Xaa₁₂ es: His, Trp, Phe, o Tyr;

Xaa₁₆ es: Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu, o Ala;

60 Xaa₂₃ es: His, Asp, Lys, Glu, o Gln;

Xaa₂₄ es: Glu, His, Ala, o Lys;

65 Xaa₂₆ es: Asp, Lys, Glu, o His;

Xaa₂₇ es: Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg, o Lys;

ES 2 321 439 T3

Xaa₃₀ es: Ala, Glu, Asp, Ser, o His;

Xaa₃₃ es: Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly, o Glu;

5 Xaa₃₄ es: Glu, Lys, o Asp;

Xaa₃₅ es: Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His, o Glu;

10 Xaa₃₆ es: Arg, Glu, o His;

R es: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, -NH₂, Gly, Gly-Pro, o Gly-Pro-NH₂, o está suprimido.

15 Otra realización de la presente invención es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la fórmula II (SEQ ID N°: 2):

His-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Xaa₁₂-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-
20 Ser-Tyr-Leu-Glu-Glu-Xaa₂₃-Ala-Ala-Xaa₂₆-Glu-Phe-
Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Val-Lys-Xaa₃₅-Arg-R
fórmula II (SEQ ID NO: 2)

25 en la que:

Xaa₈ es: Gly, Val;

30 Xaa₁₂ es: His, Trp, Phe, o Tyr;

Xaa₁₆ es: Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu, o Ala;

35 Xaa₂₃ es: His, Asp, Lys, Glu, o Gln;

Xaa₂₆ es: Asp, Lys, Glu, o His;

Xaa₃₀ es: Ala, Glu, Asp, Ser, o His;

40 Xaa₃₅ es: Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His, o Glu;

R es: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, -NH₂, Gly, Gly-Pro, o Gly-Pro-NH₂, o está suprimido.

45 Otra realización de la presente invención es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la fórmula III (SEQ ID N°: 3):

His-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-
50 Tyr-Leu-Glu-Glu-Xaa₂₃-Ala-Ala-Lys-Xaa₂₇-Phe-Ile-
Xaa₃₀-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-R
55 formula III (SEQ ID NO: 3)

en la que:

60 Xaa₈ es: Gly, Val;

Xaa₂₃ es: His, Asp, Lys, Glu, o Gln;

Xaa₂₇ es: Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg, o Lys

65 Xaa₃₀ es: Ala, Glu, Asp, Ser, o His;

R es: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, -NH₂, Gly, Gly-Pro, o Gly-Pro-NH₂, o está suprimido.

ES 2 321 439 T3

El compuesto GLP-1 de la presente invención estimula el receptor de GLP-1 en un sujeto en necesidad de la estimulación del receptor de GLP-1. El compuesto GLP-1 descrito en el presente documento se administra al sujeto en una cantidad eficaz.

5 Todavía otra realización de la presente invención es los compuestos GLP-1 descritos en el presente documento para uso en la estimulación del receptor de GLP-1 en un sujeto en necesidad de la estimulación del receptor de GLP-1.

10 Los compuestos GLP-1 de la presente invención mantienen la capacidad de activación del receptor de GLP-1 y, además, tienen menor propensión a agregarse en comparación con otros compuestos GLP-1. Como resultado, las soluciones de estos compuestos pueden agitarse con una conversión mínima en la forma inactiva insoluble. Esta ventaja simplifica en gran medida el procedimiento de producción. Además, se espera que tenga lugar una pequeña o ninguna agregación *in vivo* tras la administración a los pacientes, aumentado de este modo la actividad y minimizando la posibilidad de reacciones adversas. Además, estos compuestos GLP-1 son resistentes a la degradación con la 15 diaminopeptidasa IV y se unen a cinc, y por tanto, se cree que proporcionar un tiempo de acción *in vivo* prolongado.

La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos de Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID N°: 5), Val⁸-Asp²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 6), Val⁸-Arg²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 7) y Val⁸-Lys²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 8).

20 La Figura 2 muestra las secuencias de aminoácidos de Gly⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 9), Gly⁸-Asp²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 10), Gly⁸-Arg²²-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 11) y Gly⁸-Lys²²-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 12).

25 La Figura 3 muestra las secuencia de aminoácidos de Val⁸-Glu³⁰-GLP-1 (7-37) OH (SEQ ID NO: 13), Gly⁸-Glu³⁰-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 14), Val⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 15), y Gly⁸-His³⁷-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 16).

30 La Figura 4 muestra las secuencia de aminoácidos de Val⁸-Glu²²-Ala²⁷-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 17) y Val⁸-Lys²²-Glu²³-GLP-1 (7-37)OH (SEQ ID NO: 18).

Un compuesto GLP-1 es un polipéptido que tiene entre aproximadamente venticinco y aproximadamente treinta y nueve aminoácidos de origen natural o de origen no natural y tiene suficiente homología con GLP-1(7-37)OH de manera que muestra actividad insulínica. Los ejemplos de aminoácidos de origen no incluyen α -metil aminoácidos (por ejemplo, α -metil alanina), D-aminoácidos, aminoácidos de tipo histidina (por ejemplo, 2-amino-histidina, β -hidroxi-histidina, homohistidina, α -fluorometil-histidina y α -metil-histidina), aminoácidos que tienen un metileno extra en la cadena lateral ("homo" aminoácidos) y aminoácidos en los que el grupo funcional de ácido carboxílico en la cadena lateral se reemplaza con un grupo de ácido sulfónico (por ejemplo, ácido cisteico). Preferiblemente, sin embargo, los compuestos GLP-1 compounds de la presente invención comprenden solamente aminoácidos de origen 40 natural excepto si se indica específicamente de otra manera en el presente documento.

Un compuesto GLP-1 típicamente comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de GLP-1(7-37)OH, un análogo de GLP-1 (7-37)OH, un fragmento de GLP-1(7-37)OH o un fragmento de un análogo de GLP-1 (7-37)OH. GLP-1(7-37)OH tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19:

45
7His-Ala-Glu-¹⁰Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-¹⁵Asp-Val-Ser-Ser-
50 Tyr-²⁰Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-²⁵Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-³⁰Ala-
Trp-Leu-Val-Lys-³⁵Gly-Arg-³⁷Gly
(SEQ ID NO: 19)

55 Habitualmente en la técnica, al extremo amino terminal de GLP-1(7-37)OH se le ha asignado el número de resto 7 y al extremo carboxilo terminal, número 37. Los otros aminoácidos del polipéptido se numeran consecutivamente, como se muestra en la SEQ ID N°: 19. Por ejemplo, la posición 12 es fenilalanina y la posición 22 es glicina. Cuando no se especifica, el extremo C-terminal está en la forma carboxilo tradicional.

60 Un "fragmento de GLP-1" es un polipéptido obtenido después de la ruptura de uno o más aminoácidos del extremo N y / o extremo C de GLP-1(7-37)OH o un análogo de GLP-1(7-37)OH. La nomenclatura usada para describir GLP-1 (7-37) OH incluye a los fragmentos de GLP-1. Por ejemplo, GLP-1(9-36)OH significa un fragmento de GLP-1 obtenido mediante la ruptura de dos aminoácidos del extremo N y un aminoácido del extremo C. Los aminoácidos en el fragmento se designan por el mismo número que el correspondiente aminoácido en GLP-1(7-37)OH. Por ejemplo, el ácido glutámico N-terminal en GLP-1(9-36)OH está en la posición 9; la posición 12 está ocupada por fenilalanina; y la posición 22 está ocupada por glicina, como en GLP-1(7-37)OH.

“El compuesto GLP-1” también incluye polipéptidos en los que uno o más aminoácidos se han añadido al extremo N y / o extremo C de GLP-1(7-37)OH o sus fragmentos. Los compuestos GLP-1 de este tipo tienen hasta aproximadamente treinta y nueve aminoácidos. Los aminoácidos en el compuesto GLP-1 “extendido” se designan por el mismo número que el aminoácido correspondiente en GLP-1(7-37)OH. Por ejemplo, el aminoácido de extremo N de un compuesto GLP-1 obtenido mediante la adición de aminoácidos al N-terminal de GLP-1(7-37)OH está en la posición 5; y el aminoácido de extremo C de un compuesto GLP-1 obtenido mediante la adición de un aminoácido al C-terminal de GLP-1 (7-37)OH está en la posición 38. De este modo, la posición 12 está ocupada por fenilalanina y la posición 22 está ocupada por glicina en ambos de estos compuestos GLP-1 “extendidos”, como en GLP-1(7-37)OH. Los aminoácidos 1-6 de un compuesto GLP-1 extendido son preferiblemente los mismos que o una sustitución conservadora del aminoácido en la posición correspondiente de GLP-1(1-37)OH. Los aminoácidos 38-45 de un compuesto GLP-1 extendido son preferiblemente los mismos que o una sustitución conservadora del aminoácido en la posición correspondiente de glucagón o exendina-4.

Un “análogo de GLP-1” tiene analogía suficiente con GLP-1(7-37)OH o un fragmento de GLP-1(7-37)OH de manera que el análogo tiene actividad insulínica. Preferiblemente, un análogo de GLP-1 tiene la secuencia de aminoácidos de GLP-1(7-37)OH o un fragmento del mismo, modificado de manera que en uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos difieren del aminoácido en la posición correspondiente de GLP-1(7-37)OH o el fragmento de GLP-1(7-37)OH. En la nomenclatura usada en el presente documento para designar los compuestos de GLP-1, el aminoácido sustituyente y su posición está indicada antes de la estructura precursora. Por ejemplo, Glu²²-GLP-1(7-37)OH designa un compuesto GLP-1 en el que la glicina encontrada normalmente en la posición 22 de GLP-1(7-37)OH se ha reemplazado con ácido glutámico; Val⁸-Glu²²-GLP-1(7-37)OH designa un compuesto GLP-1 en el que alanina normalmente se encuentra en la posición 8 y glicina normalmente se encuentra en la posición 22 de GLP-1(7-37)OH se han reemplazado con valina y ácido glutámico, respectivamente.

El extremo N de un compuesto GLP-1 está en general no sustituido pero también puede estar alquilado o acilado (preferiblemente C1-C20). El extremo C puede estar no sustituido, como es el caso de GLP-1(7-37)OH, amidado con -NH₂, -NHR o NRR' o esterificado con -OR". R y R' son independientemente grupos alquilo o acilo (preferiblemente C1-C20). R" es un alquilo (C1-C20). GLP-1(7-36)NH₂ es un ejemplo de “un compuesto GLP amidado”. Preferiblemente, los compuestos GLP-1 de la presente invención tienen un extremo C que está no sustituido o sustituido con -NH₂.

Es preferible que los compuestos GLP-1 de la presente invención tienen 6 o menos cambios comparado con los aminoácidos correspondientes en GLP-1(7-37)OH nativo. Los análogos más preferidos tienen 5 o menos cambios comparado con los aminoácidos correspondientes en GLP-1(7-37)OH o tienen 4 o menos cambios comparado con los aminoácidos correspondientes en GLP-1(7-37)OH nativo. Incluso es más preferible que estos análogos tienen 3 o menos cambios comparado con los aminoácidos correspondientes en GLP-1(7-37)OH nativo. Los más preferible es que estos análogos tengan 2 o menos cambios comparado con los aminoácidos correspondientes en GLP-1(7-37)OH nativo.

Se ha encontrado que estas sustituciones reducen la propensión de los compuestos GLP-1 a agregar y generar la forma insoluble. Los compuestos GLP-1 de la presente invención en general agregan al menos aproximadamente 5 veces menos rápidamente que GLP-1(7-37)OH cuando se establece, por ejemplo, mediante el ensayo de agregación descrito en el Ejemplo 3, preferiblemente al menos 20 veces menos rápidamente, más preferiblemente al menos 40 veces menos rápidamente, más preferiblemente al menos aproximadamente 50 veces menos rápidamente, incluso más preferiblemente aproximadamente 60 veces menos rápidamente, e incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 65 veces menos rápidamente. Preferiblemente, los compuestos GLP-1 descritos en el presente documento son análogos de GLP-1(7-36)NH₂ o GLP-1 (7-37)OH.

Preferiblemente, los compuestos GLP-1 de la presente invención tienen cero, uno, dos, o tres aminoácidos además de los aminoácidos en las posiciones 8 y 22 que se diferencian del aminoácido en la posición correspondiente de GLP-1(7-37)OH o un fragmento de GLP-1(7-37)OH. En un ejemplo, uno o más de los aminoácidos en las posiciones 7, 21 y 27 del compuesto GLP-1 se difencian del aminoácido correspondiente en GLP-1(7-37)OH o un fragmento de GLP-1(7-37)OH, además de los aminoácidos en las posiciones 8 y 22.

Preferiblemente, solamente las posiciones 7, 8 y 22 se diferencian del aminoácido en la posición correspondiente de GLP-1(7-37)OH (o su fragmento). Se espera que otros compuestos GLP-1 mejorados con reducción de las propiedades de agregación se puedan obtener a partir de los compuestos GLP-1 conocidos, biológicamente activos reemplazando glicina en la posición 22 y preferiblemente alanina en la posición 8 de estos compuesto con un aminoácido adecuado, como se describe en el presente documento. Los compuestos GLP-1 conocidos biológicamente activos se describen en la Patente de Estados Unidos nº 5.977.071 de Hoffmann, *et al.*, Patente de Estados Unidos Nº 5.545.618 de Buckley, *et al.*, Adelhorst, *et al.*, J. Biol. Chem. 269: 6275 (1994).

Una “sustitución conservadora” es el reemplazo de un aminoácido por otro aminoácido que tiene la misma carga electrónica neta y aproximadamente el mismo tamaño y forma. Los aminoácidos con las cadenas laterales de aminoácidos alifáticos o alifáticos sustituidas tienen aproximadamente el mismo tamaño cuando el número total de carbonos y heteroátomos en sus cadenas laterales difieren en no más de aproximadamente cuatro. Tienen aproximadamente la misma forma cuando el número de ramas en sus cadenas laterales se diferencian en no más de uno. Los aminoácidos con grupos fenilo o fenilo sustituido en sus cadenas laterales se consideran que tienen aproximadamente el mismo

ES 2 321 439 T3

tamaño y forma. Se enumeran a continuación cinco grupos de aminoácidos. El reemplazo de un aminoácido en el compuesto GLP-1 con otro aminoácido de los mismos grupos da como resultado una sustitución conservadora:

Grupo I: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, cisteína, y aminoácidos de origen no natural con cadenas laterales alifáticas sustituidas de C1-C9 alifático o C1-C4 hidroxilo (cadenas lineales o de una sola cadena).

Grupo II: ácido glutámico, ácido aspártico y aminoácidos de origen no natural con cadenas laterales alifáticas de C1-C4 sustituidas (no ramificadas o un punto de ramificación).

Grupo III: lisina, ornitina, arginina y aminoácidos de origen no natural con cadenas laterales alifáticas amina o guanidino C1-C4 sustituidos (no ramificadas o un punto de ramificación).

Grupo IV: glutamina, asparagina aminoácidos de origen no natural con cadenas laterales alifáticas amida C1-C4 sustituidas (no ramificadas o un punto de ramificación).

Grupo V: fenilalanina, fenilglicina, tirosina y triptófano.

Excepto que se especifique de otra manera en el presente documento, las sustituciones conservadoras se realizan preferiblemente con aminoácidos de origen natural.

Según se usa en este documento, la expresión “compuesto GLP-1” también incluye sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en este documento. Un compuesto GLP-1 de esta invención puede poseer un grupo suficientemente ácido, un grupo suficientemente básico o ambos grupos funcionales y, por consiguiente, reaccionan con cualquiera de las diversas bases inorgánicas y ácidos inorgánicos y orgánicos para formar una sal. Los ácidos habitualmente empleados para formar sales de adición de ácido son ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos, tales como ácido p-toluensulfónico, ácido metanosulfónico, ácido oxálico, ácido p-bromofenilsulfónico, ácido carbónico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido acético y similares. Los ejemplos de estas sales incluyen sulfato, piro sulfato, bisulfato, sulfito, bisulfito, fosfato, monohidrogenofosfato, dihidrogenofosfato, metafosfato, pirofosfato, cloruro, bromuro, yoduro, acetato, propionato, decanoato, caprilato, acrilato, formato, isobutirato, caproato, heptanoato, propiolato, oxalato, malonato, succinato, suberato, sebacato, fumarato, maleato, butino-1,4-dioato, hexino-1,6-dioato, benzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, ftalato, sulfonato, xilenosulfonato, fenilacetato, fenilpropionato, fenilbutirato, citrato, lactato, gamma-hidroxibutirato, glicolato, tartrato, metanosulfonato, propanosulfonato, naftaleno-1-sulfonato, naftaleno-2-sulfonato, mandelato y similares.

Las sales de adición de base incluyen aquellas derivadas de bases inorgánicas, tales como hidróxidos de amonio o metales alcalinos o alcalinoterreos, carbonatos, bicarbonatos y similares. Estas bases útiles para la preparación de las sales de esta invención incluyen, por tanto, hidróxido sódico, hidróxido de potasio, hidróxido amónico, carbonato de potasio y similares.

Los compuestos GLP-1 pueden usarse para tratar a sujetos con una amplia variedad de enfermedades y dolencias. Se cree que los compuestos GLP-1, incluyendo los de la presente invención, ejercen sus efectos biológicos actuando sobre un receptor denominado el “receptor de GLP-1” (véase la Patente de EE.UU. N° 5.670.360 de Thorrens). Los sujetos con enfermedades y/o dolencias que responden favorablemente a la estimulación del receptor de GLP-1 o a la administración de compuestos GLP-1 pueden tratarse, por tanto, con los compuestos GLP-1 de la presente invención. Se dice que estos sujetos “necesitan tratamiento con compuestos GLP-1” o “necesitan la estimulación del receptor de GLP-1”. Se incluyen los sujetos con diabetes no insulino dependiente, diabetes insulino dependiente, ictus (véase el documento WO 00/16797 de Efendic), infarto de miocardio (véase el documento WO 98/08531 de Efendic), obesidad (véase el documento WO 98/19698 de Efendic), cambios catabólicos postquirúrgicos (véase la Patente de EE.UU. N° 6.006.753 de Efendic), dispepsia funcional y síndrome del intestino irritable (véase el documento WO 99/64060 de Efendic). También se incluyen sujetos que requieren tratamiento profiláctico con un compuesto GLP-1, por ejemplo, sujetos con riesgo de desarrollar diabetes no insulino dependiente (véase el Documento WO 00/07617). Los sujetos con alteración de la tolerancia a la glucosa o con alteración de glucosa en ayunas, sujetos cuyo peso corporal es aproximadamente un 25% superior al peso corporal normal para la altura y constitución del sujeto, sujetos con una pancreatomectomía parcial, sujetos que tiene uno o ambos padres con diabetes no insulino dependiente, sujetos que han tenido diabetes gestacional y sujetos que han tenido pancreatitis aguda o crónica tienen riesgo de desarrollar diabetes no insulino dependiente.

Una “cantidad eficaz” de un compuesto GLP-1 es la cantidad que da lugar a un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado sin causar efectos secundarios no aceptables cuando se administra a un sujeto que necesita la estimulación del receptor de GLP-1. Un “efecto terapéutico deseado” incluye uno o más de los siguientes: 1) una mejora de los síntomas asociados con la enfermedad o dolencia; 2) un retraso en la aparición de los síntomas asociados con la enfermedad o afección; 3) aumento de la longevidad en comparación con la ausencia del tratamiento; y 4) mejor calidad de vida en comparación con la ausencia del tratamiento. Por ejemplo, una “cantidad eficaz” de un compuesto GLP-1 para el tratamiento de la diabetes es la cantidad que daría lugar a un mejor control de la concentración de glucosa en sangre que en ausencia del tratamiento, dando lugar por tanto, a un retraso de la aparición de las complicaciones diabéticas, tales como retinopatía, neuropatía o enfermedad renal. Una “cantidad eficaz” de un compuesto GLP-1 para la prevención

de la diabetes es la cantidad que retrasaría, en comparación con la ausencia de tratamiento, la aparición de niveles elevados de glucosa en sangre que requieran tratamiento con fármacos antihipoglucémicos tales como sulfonilureas, tiazolidinedionas, insulina y/o biguanidinas.

- 5 Una "cantidad eficaz" del compuesto GLP-1 administrado a un sujeto también dependerá del tipo y gravedad de la enfermedad y de las características del sujeto, tal como estado general de salud, edad, sexo, peso corporal y tolerancia a fármacos. El experto en la materia será capaz de determinar las dosis apropiadas dependiendo de estos y otros factores. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto GLP-1 puede oscilar de aproximadamente 0,01 mg por día a aproximadamente 1.000 mg por día para un adulto. Preferiblemente, la dosis oscila de aproximadamente 0,1 mg por día a aproximadamente 100 mg por día, más preferiblemente de aproximadamente 1,0 mg/día a aproximadamente 10 mg/día.

- 15 Los compuestos GLP-1 de la presente invención pueden administrarse por ejemplo por vía oral, mediante administración nasal, inhalación o por vía parenteral. La administración parenteral puede incluir, por ejemplo, administración sistémica, tal como mediante inyección intramuscular, intravenosa, subcutánea o intraperitoneal. Los compuestos GLP-1 pueden administrarse al sujeto junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable como parte de una composición farmacéutica para tratar las enfermedades descritas anteriormente. La composición farmacéutica puede ser una solución o, si se administra por vía parenteral, una suspensión del compuesto GLP-1 o una suspensión del compuesto GLP-1 formando complejo con un catión metálico divalente, como se describe a continuación. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden contener ingredientes inertes que no interaccionen con el péptido o con derivados del péptido. Pueden emplearse técnicas de formulación farmacéutica convencionales, tales como las que se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Los vehículos farmacéuticamente aceptables para la administración parenteral incluyen, por ejemplo, agua estéril, solución salina fisiológica, solución salina bacteriostática (solución salina que contiene aproximadamente alcohol bencílico al 0,9% mg/ml), solución salina tamponada con fosfato, solución de Hank, lactato de Ringer y similares. Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, trehalosa, sorbitol y manitol.

- 30 Un "sujeto" es un mamífero, preferiblemente un humano, pero también puede ser un animal, por ejemplo, animales de compañía (por ejemplo, perros, gatos y similares), animales de granja (por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, caballos y similares) y animales de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, cobayas y similares).

- 35 Los compuestos GLP-1 de la presente invención pueden formar complejos con un catión metálico divalente adecuado. Los complejos con metales divalentes de los compuestos GLP-1 generalmente son insolubles en solución acuosa de pH aproximadamente fisiológico. Por tanto, estos complejos pueden administrarse por vía subcutánea como suspensiones y muestran una velocidad de liberación *in vivo* disminuida, prolongando, de este modo, el tiempo de acción del compuesto. Los ejemplos de cationes metálicos divalentes adecuados incluyen Zn^{++} , Mn^{++} , Fe^{++} , Ca^{++} , Co^{++} , Cd^{++} , Ni^{++} y similares. El preferido es el Zn^{++} .

- 40 Para obtener los complejos entre los compuestos GLP-1 de la presente invención y un catión metálico divalente, se disuelve un compuesto GLP-1 en un tampón adecuado y en presencia de una sal metálica. La mezcla se deja incubar a temperatura ambiente para permitir que el complejo precipite. Los tampones adecuados son aquellos que mantienen el pH de la mezcla en un intervalo de pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 9,0 y que no interfiera con la reacción de formación del complejo. Los ejemplos incluyen tampones fosfato, tampones acetato, tampones citrato y tampones de Goode, por ejemplo HEPES, Tris y Tris acetato. Las sales metálicas adecuadas son aquellas en las que el metal es adecuado para la formación del complejo. Los ejemplos de sales de cinc adecuadas incluyen cloruro de cinc, acetato de cinc, óxido de cinc y sulfato de cinc. Preferiblemente, se proporciona una sal catiónica metálica divalente, tal como cloruro de cinc en exceso para proporcionar una proporción molar de hasta aproximadamente 50 molécula de catión metálico divalente por cada molécula de compuesto GLP-1.

- 50 La "actividad insulínica" se refiere a la estimulación de la secreción de insulina en respuesta a niveles elevados de glucosa causando, de este modo, la captación de glucosa por las células y disminuyendo los niveles de glucosa en el suero. La actividad insulínica puede evaluarse por procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo el uso de experimentos *in vivo* y ensayos *in vitro* que miden la actividad de unión al receptor de GLP-1 o la activación del receptor, por ejemplo, ensayos que emplean células del islote pancreático o células de insulinoma, como se describe en el documento EP 619.322 de Gelfand y col y en la Patente de EE.UU. N° 5.120.712, respectivamente.

- 60 Los compuestos GLP-1 de la presente invención puede prepararse usando procedimientos convencionales de técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida. Hay sintetizadores de péptidos disponibles en el mercado, por ejemplo, Applied Biosystems en Foster City, CA. Los reactivos para la síntesis en fase sólida están disponibles en el mercado, por ejemplo, de Midwest Biotech (Fishers, IN). Pueden usarse sintetizadores de péptidos en fase sólida según las instrucciones de los fabricantes para bloquear los grupos que intervienen, protegiendo el aminoácido que va a reaccionar, uniendo, separando y protegiendo los aminoácidos que no han reaccionado.

- 65 Típicamente, un aminoácido protegido con α -N-carbamoylo y el aminoácido del extremo N-terminal de la cadena peptídica en crecimiento en una resina se unen a temperatura ambiente en un disolvente inerte, tal como dimetilformamida, N-metilpirrolidona o cloruro de metileno en presencia de agentes de conjugación, tales como dicitohexilcarbodiimida y 1-hidroxibenzotriazol y una base, tal como diisopropilammina. El grupo protector α -N-carbamoylo se retira de la resina peptídica resultante usando un reactivo como ácido trifluoroacético o piperidina, y la reacción

de conjugación se repite añadiendo a la cadena peptídica el siguiente aminoácido N-prottegido deseado. Los grupos amino protegidos adecuados son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Green y Wuts, “*Protecting Groups in Organic Synthesis*”, John Wiley e Hijos, 1991. Los ejemplos incluyen t-butiloxycarbonilo (tBoc) y fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc).

Los péptidos también se sintetizan usando protocolos convencionales automatizados de síntesis en fase sólida usando t-butoxicarbonilo o fluorenilmetoxycarbonil-aminoácidos con la protección adecuada de la cadena lateral. Tras completar la síntesis, los péptidos se escinden del soporte en fase sólida con la desprotección simultánea de la cadena lateral usando procedimientos convencionales de fluoruro de hidrógeno. A continuación, los péptidos en bruto se purifican adicionalmente usando cromatografía en fase inversa en columnas Vydac C18 usando gradientes de acetonitrilo en ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1%. Para retirar el acetonitrilo, los péptidos se liofilizan a partir de una solución que contiene TFA al 0,1%, acetonitrilo y agua. La pureza puede verificarse mediante cromatografía analítica en fase inversa. La identidad de los péptidos puede verificarse mediante espectrometría de masas. Los péptidos pueden solubilizarse en tampones acuosos a pH neutro.

La invención se ilustra mediante los ejemplos siguientes que de ningún modo pretenden ser limitantes.

Ejemplo 1

Preparación de los compuestos GLP-1 de la presente invención mediante química de t-Boc en fase sólida

Se colocaron aproximadamente 0,5-0,6 gramos (0,38-0,45 mmoles) de resina Boc Gly-PAM en un recipiente de reacción convencional de 60 ml y se realizaron dobles acoplamiento en un sintetizador de péptidos Applied Biosystems ABI430A. Los siguientes aminoácidos con cadena lateral protegida (cartuchos de 2 mmoles de aminoácidos Boc) se obtuvieron de Midwest Biotech (Fishers, IN) y se usaron en la síntesis:

Arg-Tosilo (TOS), éster de Asp- δ -ciclohexilo (CHXL), éster de Glu- δ -ciclohexilo (CHXL), His-benciloximetilo (BOM), Lys-2-clorobencilcarbonilo (2Cl-Z), Met-sulfóxido (O), éster de Ser-O-bencilo (OBzl), éster de Thr-O-bencilo (OBzl), Trp-formilo (CHO) y Tyr-2-bromobenciloxycarbonilo (2Br-Z) y resina Boc Gly PAM. El ácido trifluoroacético (TFA), di-isopropiletil-amina (DIEA), hidroxibenzotriazol (HOBt) 0,5 M en DMF y diciclohexilcarbodiimida (DCC) 0,5 M en diclorometano, se obtuvieron de PE-Applied Biosystems (Foster City, CA). La dimetilformamida (DMF-Burdick y Jackson) y el diclorometano (DCM-Mallinkrodt) se obtuvieron de Mays Chemical Co. (Indianápolis, IN).

Los dobles acoplamiento convencionales se realizaron usando anhídridos o ésteres de HOBt simétricos, formados ambos usando DCC. Un segundo grupo de dobles acoplamiento (sin desprotección por TFA) se desarrollaron en Trp31, Thr13 y Thr11. Al finalizar las síntesis, se retiró el grupo Boc del extremo N-terminal y la resinas peptídico se trataron con piperidina al 20% en DMF para desformilar la cadena lateral del Trp. Tras lavar con DCM, las resinas se transfirieron a un recipiente de reacción de TEFLON y se secaron al vacío.

Para los análogos que contenían Met, se realizó una reducción en la resina usando TFA/sulfuro de dimetilo (DMS) al 10%/HCl concentrado al 2%. Las escisiones se hicieron conectando los recipientes de reacción a un equipo de HF (ácido fluorhídrico) (Peninsula Laboratories). Se añadió 1 ml de m-cresol por gramo de resina y se condensaron 10 ml de HF (obtenido de AGA, Indianápolis, IN) en el recipiente enfriado previamente. Se añadió 1 ml de DMS por gramo de resina cuando estaba presente la metionina. Las reacciones se agitaron durante una hora en un baño con hielo y el HF se retiró al vacío. Los restos se resuspendieron en éter etílico y los sólidos se filtraron y lavaron con éter. Cada péptido se extrajo en ácido acético acuoso y se liofilizó o cargó directamente en una columna en fase inversa.

Las purificaciones se realizaron en una columna VYDAC C18 de 2,2 x 25 cm en tampón A (ácido trifluoroacético al 0,1% en agua, B: TFA al 0,1% en acetonitrilo). Se aplicó un gradiente del 20% al 90% de B en un HPLC (Waters) durante 120 minutos a 10 ml/minuto mientras que se controlaba la absorbancia UV a 280 nm (4,0 A) y se recogían fracciones de un minuto. Las fracciones apropiadas se mezclaron, congelaron y liofilizaron. Los productos liofilizados se analizaron por HPLC (METASIL AQ C18 de 0,46 x 15 cm) y por espectrometría de masas MALDI.

Ejemplo 2

Preparación de los compuestos GLP-1 de la presente invención mediante química de F-Moc en fase sólida

Aproximadamente 114 mg (50 mmoles) de resina FMOC Gly WANG (obtenida de NovaBiochem, La Jolla, CA) se colocaron en cada pocillo programado del bloque de reacción de 96 pocillos y se realizaron conjugaciones dobles en un sintetizador de péptidos Advanced ChemTech 396. Los análogos con una amida en el extremo C-terminal se prepararon usando 75 mg (50 μ moles) de resina Rink Amide AM (NovaBiochem, La Jolla, CA).

Los siguientes aminoácidos FMOC se obtuvieron de Advanced ChemTech (Louisville, KY), NovaBiochem (La Jolla, CA) y Midwest BioTech (Fishers, IN): Arg-2,2,4,6,7-pentametilhidrobenzofuran-5-sulfonilo (Pbf), Asn-tritilo (Trt), éster de Asp- β -t-butilo (tBu), éster de Glu- δ -t-butilo (tBu), Gln-tritilo (Trt), His-tritilo (Trt), Lys-t-butiloxycarbonilo (Boc), éster de Ser-t-butilo (OtBu), éster de Thr-t-butilo (OtBu), Trp-t-butiloxycarbonilo (Boc), éster de Tyr-t-butilo (OtBu).

ES 2 321 439 T3

Los disolventes dimetilformamida (DMF-Burdick y Jackson), N-metil pirrolidona (NMP-Burdick y Jackson), diclorometano (DCM-Mallinkrodt) se obtuvieron de Mays Chemical Co. (Indianápolis, IN).

El hidroxibenzotrizol (HIBt), di-isopropilcarbodiimida (DIC), di-isopropiletilamina (DIEA) y piperidina (Pip) se obtuvieron de Aldrich Chemical Co (Milwaukee, WI).

Todos los aminoácidos se disolvieron en HOBt 0,45 M en NMP y se realizaron acoplamientos activados con DIC/HOBt de 50 minutos después de 20 minutos de desprotección usando Pip al 20%/DMF. Cada resina se lavó con DMF después de las desprotecciones y de las acoplamientos. Después del último acoplamiento y desprotección, las resinas peptídico se lavaron con DCM y se secaron al vacío en el bloque de reacción.

Con el ensamblaje del bloque de reacción/escisión en su lugar, se añadieron 2 ml de reactivo K en cada pocillo y la reacción de escisión se mezcló durante 2 horas [Reactivo K = 0,75 g de fenol, 0,5 ml de tioanisol, 0,25 ml de etaneditiol, 0,5 ml de agua por 10 ml de ácido trifluoroacético (TFA), todos obtenidos de Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI]. Se añadieron 40 ml de éter etílico a los filtrados de TFA y los precipitados se centrifugaron 2 minutos a 2.000 rpm. Los sobrenadantes se decantaron, los sedimentos se resuspendieron en 40 ml de éter, se centrifugaron y decantaron de nuevo, se secaron en atmósfera de nitrógeno y a continuación, al vacío.

Se disolvieron de 0,3-0,6 mg de cada producto en 1 ml de TFA al 0,1%/acetonitrilo (ACN) y se analizaron 20 μ l en HPLC [METASIL AQ C18 de 0,46 x 15 cm, 1ml/min, 45°C, 214 nM (0,2 A), A =TFA al 0,1%, B= TFA al 0,1%/ACN al 50%. Gradiente = 50% de B a 90% de B en un periodo de 30 minutos).

Las purificaciones se realizaron en una columna VYDAC C18 de 2,2 x 25 cm en tampón A (ácido trifluoroacético al 0,1% en agua, B: TFA al 0,1% en acetonitrilo). Se aplicó un gradiente de 20% a 90% de B en un equipo de HPLC (Waters) en 120 minutos a 10 ml/minuto mientras que se controlaba la absorbancia UV a 280 nm (4,0 A) y se recogieron fracciones de 1 minuto. Las fracciones apropiadas se mezclaron, congelaron y liofilizaron. Los productos desecados se analizaron por HPLC (METASIL AQ C18 de 0,46 x 15 cm) y espectrometría de masas MALDI.

Ejemplo 3

Ensayo de agregación de GLP

Los péptidos GLP de esta invención se analizaron respecto a su potencial para agregarse en solución. En general, los péptidos en solución se agitaron a temperatura elevada en un tampón adecuado mientras se registraba la turbidez a 350 nm en función del tiempo. El tiempo hasta el comienzo de la agregación se midió para cuantificar el potencial de una molécula GLP determinada para agregarse en estas condiciones agresivas.

Protocolo

En primer lugar, se disolvió un compuesto GLP-1 en condiciones alcalinas (pH 10,5) durante 30 minutos para disolver cualquier material agregado previamente. A continuación, el pH de la solución se ajustó a 7,4 y se filtró. Específicamente, se disolvieron 4 mg de un compuesto GLP-1 liofilizado en 3 ml de fosfato 10 mM/citrato 10 mM. El pH se ajustó a 10,0-10,5 y se mantuvo durante 30 minutos. La solución se ajustó con HCl a pH 7,4 y se filtró a través de un filtro adecuado, por ejemplo un filtro de jeringa Millex GV (Millipore Corporation, Bedford, MA). A continuación, esta solución se diluyó hasta una muestra final que contenía 0,3 mg/ml de proteína en citrato 10 mM, fosfato 10 mM, NaCl 150 mM y ajustado a un pH de 7,4 a 7,5. La muestra se incubó a 37°C en una cubeta de cuarzo. La turbidez de la solución se midió cada cinco minutos a 350 nm en un espectrofotómetro AVIV modelo 14DS W-VIS (Lakewood, NJ). La solución se agitó 30 segundos antes y durante la medida usando una barra de agitación magnética de Starna Cells, Inc. (Atascadero, CA). Un aumento en la DO a 350 nm indica agregación del péptido GLP. El tiempo de agregación se aproximaba a la intersección del ajuste lineal de la fase de crecimiento previo y crecimiento según el procedimiento de Drake (Arvinte T, Cudd A y Drake AF. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 6415-6422).

La cubeta se limpió entre experimentos con una solución de jabón cáustico (por ejemplo, Contrad-70).

Los resultados de los compuestos GLP-1 de la presente invención se presentan en la Tabla 1 como el tiempo en horas necesario para la agregación de un compuesto. Como puede verse, los compuestos de la presente invención muestran un tiempo de agregación muy incrementado respecto a los compuestos GLP-1 conocidos en la técnica previa.

Ejemplo 4

Activación del receptor de GLP-1 con GLP-1 Compuestos de la presente invención

La capacidad de los compuestos GLP-1 de la presente invención para activar el receptor de GLP-1 se evaluó usando ensayos *in vitro* tales como los descritos en el documento EP 619.322 de Gelfand y col., y la Patente de EE.UU. N° 5.120.712, respectivamente. La actividad de estos compuestos en relación con la actividad de GLP-1(7-37) OH se presenta en la Tabla 1. Como puede verse en estos resultados, generalmente la actividad de los compuestos GLP-1 de la presente invención es aproximadamente tan buena o mejor que la del GLP-1(7-37)OH.

ES 2 321 439 T3

TABLA 1

5	Compuesto GLP-1	Tiempo de agregación en horas	Activación del receptor de GLP-1
10	GLP-1(7-37)OH*	1	1,0
	Val ⁸ -GLP-1(7-37)OH*	0,9 ± 0,2 (n = 6)	0,47
15	Gly ⁸ -His ¹¹ -GLP-1(7-37)OH*	9+	0,282
	Val ⁸ -Ala ¹¹ -GLP-1(7-37)OH*	10	0,021
	Val ⁸ -Lys ¹¹ -GLP-1(7-37)OH*	13	0,001
20	Val ⁸ -Tyr ¹² -GLP-1(7-37)OH*	6	0,81
	Val ⁸ -Glu ¹⁶ -GLP-1(7-37)OH*	12	0,047
	Val ⁸ -Ala ¹⁶ -GLP-1(7-37)OH*	16	0,112
25	Val ⁸ -Tyr ¹⁶ -GLP-1(7-37)OH*	5	1,175
	Val ⁸ -Lys ²⁰ -GLP-1(7-37)OH*	5	0,33
30	Gln ²² -GLP-1(7-37)OH*	7	0,42
	Val ⁸ -Ala ²² -GLP-1(7-37)OH*	19	0,56
	Val ⁸ -Ser ²² -GLP-1(7-37)OH*	22	0,50
35	Val ⁸ -Asp ²² -GLP-1(7-37)OH*	>90	0,40
	Val ⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	72	1,29
	Val ⁸ -Lys ²² -GLP-1(7-37)OH*	100, 54	0,58
40	Val ⁸ -Pro ²² -GLP-1(7-37)OH*	>75	0,01
	Val ⁸ -His ²² -GLP-1(7-37)OH*	>75	0,14
45	Val ⁸ -Lys ²² -GLP-1(7-36)NH ₂ *	24	0,53
	Val ⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-36)NH ₂	>65	1,0
	Gly ⁸ -Glu ²² -GLP-1(7-37)OH	19	1,07
50	Val ⁸ -Glu ²³ -GLP-1(7-36)OH*	65	0,28
	Val ⁸ -Lys ²³ -GLP-1(7-37)OH*	>45	0,18
	Val ⁸ -His ²⁴ -GLP-1(7-37)OH*	3	0,007

ES 2 321 439 T3

	Val ⁸ -Lys ²⁴ -GLP-1(7-37)OH*	22	0,02
5	Ala ⁸ -His ²⁶ -GLP-1(7-37)OH*	>24	0,8
	Ala ⁸ -Glu ²⁶ -GLP-1(7-37)OH*	>24	0,7
	Val ⁸ -His ²⁷ -GLP-1(7-37)OH*	10	0,37
10	Val ⁸ -Ala ²⁷ -GLP-1(7-37)OH*	2	0,47
	Gly ⁸ -Glu ³⁰ -GLP-1(7-37)OH*	>40	0,29
	Val ⁸ -Glu ³⁰ -CLP-1(7-37)OH*	30	0,29
15	Val ⁸ -Asp ³⁰ -GLP-1(7-37)OH*	>45	0,15
	Val ⁸ -Ser ³⁰ -GLP-1(7-37)OH*	8	0,19
	Val ⁸ -His ³⁰ -GLP-1(7-37)OH*	13	0,19
20	Val ⁸ -Glu ³³ -GLP-1(7-37)OH*	>70	0,039
	Val ⁸ -Ala ³³ -GLP-1(7-37)OH*	20	0,1
25	Val ⁸ -Gly ³³ -GLP-1(7-37)OH*	9	0,01
	Val ⁸ -Glu ³⁴ -GLP-1(7-37)OH*	>40+	0,17
	Val ⁸ -Pro ³⁵ -GLP-1(7-37)OH*	14	0,094
30	Val ⁸ -His ³⁵ -GLP-1(7-37)OH*	>45,30	0,41
	Val ⁸ -Glu ³⁵ -GLP-1(7-37)OH*	63	0,15
	Val ⁸ -Glu ³⁶ -GLP-1(7-37)OH*	>45	0,11
35	Val ⁸ -His ³⁶ -GLP-1(7-37)OH*	8	0,22
	Val ⁸ -His ³⁷ -GLP-1(7-37)OH*	>40	0,33
	Val ⁸ -Leu ¹⁶ -Glu ²⁶ -GLP-1(7-37)OH*	>20	0,23
40	Val ⁸ -Lys ²² -Glu ³⁰ -GLP-1(7-37)OH*	4	0,37
	Val ⁸ -Lys ²² -Glu ²³ -GLP-1(7-37)OH*	>30	0,35
45	Val ⁸ -Glu ²² -Gln ²³ -GLP-1(7-37)OH*	>20	0,47
	Val ⁸ -Glu ²² -Ala ²⁷ -GLP-1(7-37)OH*	>45	1,02
	Val ⁸ -Glu ²² -Lys ²³ -GLP-1(7-37)OH*	>65	1,43
50	Val ⁸ -Lys ³³ -Val ³⁴ -GLP-1(7-37)OH*	22	0,08
	Val ⁸ -Lys ³³ -Asn ³⁴ -GLP-1(7-37)OH*	>48	0,09
	Val ⁸ -Gly ³⁴ -Lys ³⁵ -GLP-1(7-37)OH*	27	0,034
55	Val ⁸ -Gly ³⁶ -Pro ³⁷ -GLP-1(7-37)NH ₂	2	0,53

* Tiempo de agregación determinado a 30°C

* Enumerado solamente para propósitos de ilustración

Ejemplo 5

Precipitación con cinc de los compuestos GLP-1

5 Los compuestos GLP-1 individuales se prepararon como se describen en los Ejemplos 1 ó 2. Se disolvieron 3 mg de una molécula individual de GLP liofilizada en 3 ml de tampón HEPES 0,1 M, pH 10,5. A continuación, el pH de la solución resultante se ajustó a entre 10,0 y 10,5 con NaOH 0,2 N. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y después la solución se ajustó a un pH de 7,4 con HCl 0,2 N. La solución se filtró a través de un filtro de jeringa apropiado, por ejemplo, un filtro de jeringa de Millex GV (Millipore Corporation, Bedford, MA) y se estimó la concentración del compuesto GLP-1 midiendo la absorción a 280 nm en un espectrofotómetro, por ejemplo, un Beckman DU460. La concentración de proteína se ajustó a continuación a 200 μ M en HEPES pH 7,4.

15 Las soluciones de GLP-1 filtradas (100 μ l) se diluyeron en una placa de ELISA (por ejemplo, Falcon Microtest™ 96) con 100 μ l de HEPES 0,1 M pH 7,4 que contenían diversos niveles de cloruro de cinc, dando lugar a una solución de 200 μ l que contenía diversos niveles de cloruro de cinc y 100 μ M de compuestos GLP-1. Estas soluciones se incubaron a temperatura ambiente (22°C) durante 18 horas y a continuación se centrifugaron, por ejemplo, en una centrífuga Jouan CR412 con adaptadores para microplacas. Después de la centrifugación, 150 μ l de los sobrenadantes se transfirieron a continuación a una placa de microvaloración de ELISA detectables por absorbancia UV (por ejemplo, placa Costar UV) y la D.O. a 280 nm se determinó en un lector de microplacas (por ejemplo, Molecular Devices SPECTRAMax PLUS, SOFTmax PRO). En la Tabla 2 se muestran los resultados de un experimento. Los valores de A_{280} son el resultado de dos determinaciones independientes.

TABLA 2

Relación molar Zn/GLP- 1	A280 de GLP- 1(7- 37)OH	A280 de Gly ⁸ - GLP- 1(7- 37)OH	A280 de Val ⁸ - Glu ²² GLP -1(7- 37)OH	A280 de Val ⁸ - Gln ²² GLP -1(7- 37)OH	A280 de Val ⁸ - Glu ²² GLP -1(7- 37)OH	A280 de Val ⁸ - Ala ²² GLP -1(7- 37)OH
0	0,337	0,32	0,3	0,290	0,295	0,289
0,3	0,318	0,166	0,27	0,390	0,291	0,202
0,5	0,329	0,151	0,26	0,123	0,292	0,107
0,7	0,253	0,156	0,124	0,076	0,293	0,104
1	0,148	0,119	0,06	0,074	0,26	0,110
2	0,092	0,089	0,025	0,095	0,078	0,110
3	0,081	0,085	0,021	0,095	0,052	0,104
5	0,074	0,078	0,019	0,097	0,035	0,119

TABLA 2 (continuación)

Relación molar Zn/GLP- 1	A280 de Val ⁸ - Ser ²² - GLP-1 (7- 37)OH	A280 de Val ⁸ -Phe ²² - GLP-1(7- 37)OH	A280 de Val ⁸ - Pro ²² GLP- 1 (7- 37)OH	A280 de Val ⁸ - Lys ²² GLP- 1(7-37)OH	A280 de Val ⁸ - Asp ²² GLP- 1(7-37)OH
0	0,2855	0,31	0,2595	0,299	0,288
0,3	0,2805	0,1485	0,2455	0,0825	0,2785
0,5	0,2665	0,1165	0,2325	0,0905	0,2845
0,7	0,1825	0,1015	0,219	0,1195	0,287
1	0,149	0,1265	0,1905	0,1225	0,291
2	0,0935	0,092	0,1695	0,1675	0,184
3	0,101	0,061	0,1615	0,1475	0,1485
5	0,0615	0,00795	0,171	0,142	0,1675

Estos resultados muestran que se requieren sólo cantidades pequeñas de cinc para formar complejos y precipitar una porción significativa de diversos compuestos GLP-1 a partir de estas soluciones diluidas.

Equivalentes

Aunque esta invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencia a las realizaciones descritas, entenderán los expertos en la técnica que se pueden realizar diversos cambios en la forma y detalles en el presente documento sin salirse del ámbito de la invención como se define en las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto GLP-1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la fórmula 1 (SEQ ID N° 1)

His-Xaa₈-Glu-Gly-Xaa₁₁-Xaa₁₂-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-
Ser-Tyr-Leu-Glu-Glu-Xaa₂₃-Xaa₂₄-Ala-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Phe-
Ile-Ala-Xaa₃₁-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-R
fórmula I (SEQ ID NO: 1)

en la que:

Xaa₈ es: Gly o Val;

Xaa₁₁ es: Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys, o His;

Xaa₁₂ es: His, Trp, Phe, o Tyr;

Xaa₁₆ es: Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu, o Ala;

Xaa₂₃ es: His, Asp, Lys, Glu, Gln o Arg;

Xaa₂₄ es: Glu, Arg, Ala, o Lys;

Xaa₂₆ es: Trp, Tyr, Phe, Asp, Lys, Glu, o His;

Xaa₂₇ es: Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg, o Lys;

Xaa₃₀ es: Ala, Glu, Asp, Ser, o His;

Xaa₃₃ es: Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly, o Glu;

Xaa₃₄ es: Glu, Lys, o Asp;

Xaa₃₅ es: Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His, o Glu;

Xaa₃₆ es: Thr, Ser, Asp, Trp, Tyr, Phe, Arg, Glu, o His;

R es: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, -NH₂, Gly, Gly-Pro, o Gly-Pro-NH₂, o está suprimido.

2. El compuesto GLP-1 de la reivindicación 1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la fórmula II (SEQ ID N° 2).

His-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Xaa₁₂-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-
Ser-Tyr-Leu-Glu-Glu-Xaa₂₃-Ala-Ala-Xaa₂₆-Glu-Phe-
Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Val-Lys-Xaa₃₅-Arg-R
fórmula II (SEQ ID NO: 2)

en la que:

Xaa₈ es: Gly o Val;

Xaa₁₂ es: His, Trp, Phe, o Tyr;

Xaa₁₆ es: Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu, o Ala;

Xaa₂₂ es: Glu;

Xaa₂₃ es: His, Asp, Lys, Glu, o Gln;

Xaa₂₆ es: Asp, Lys, Glu, o His;

5 Xaa₃₀ es: Ala, Glu, Asp, Ser, o His;

Xaa₃₅ es: Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His, o Glu;

10 R es: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, -NH₂, Gly, Gly-Pro, o Gly-Pro-NH₂, o está suprimido.

3. El compuesto GLP-1 de la reivindicación 2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la fórmula III (SEQ ID N°: 3):

15 His-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-
Tyr-Leu-Glu-Glu-Xaa₂₃-Ala-Ala-Lys-Xaa₂₇-Phe-Ile-
20 Xaa₃₀-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-R
fórmula III (SEQ ID NO: 3)

en la que:

25 Xaa₈ es: Gly o Val;

Xaa₂₂ es:Glu;

30 Xaa₂₃ es: His, Asp, Lys, Glu, o Gln;

Xaa₂₇ es: Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg, o Lys

35 Xaa₃₀ es: Ala, Glu, Asp, Ser, o His;

R es: Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, -NH₂, Gly, Gly-Pro, o Gly-Pro-NH₂, o está suprimido.

40 4. El compuesto GLP-1 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que no más de 6 aminoácidos en el compuesto GLP-1 difiere del aminoácido correspondiente en el compuesto GLP-1(7-37)OH o GLP-1(7-36)NH₂.

5. El compuesto GLP-1 de la reivindicación 4 en el que no más de 5 aminoácidos en el compuesto GLP-1 difiere del aminoácido correspondiente en GLP-1 (7-37)OH o GLP-1(7-36)NH₂.

45 6. El compuesto GLP-1 de la reivindicación 5 en el que no más de 4 aminoácidos en el compuesto GLP-1 difiere del aminoácido correspondiente en GLP-1(7-37)OH o GLP-1(7-36)NH₂.

7. El compuesto GLP-1 de la reivindicación 6 en el que no más de 3 aminoácidos en el compuesto GLP-1 difiere del aminoácido correspondiente en GLP-1(7-37) OH o GLP-1(7-36)NH₂.

50 8. El compuesto GLP-1 de la reivindicación 7 en el que no más de 2 aminoácidos en el compuesto GLP-1 difiere del aminoácido correspondiente en GLP-1(7-37) OH o GLP-1(7-36)NH₂.

55 9. El compuesto GLP-1 de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para uso como un medicamento.

10. El compuesto GLP-1 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para uso en el tratamiento de diabetes no insulino dependiente.

60 11. El compuesto GLP-1 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para uso en el tratamiento pofiláctico de diabetes no insulino dependiente.

12. El compuesto GLP-1 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para uso en el tratamiento de obesidad, apoplejía, infarto de miocardio, cambios catabólicos después de la cirugía, o síndrome de intestino irritable.

65

Fig. 1

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

Val⁸-Glu²²-GLP-1 (7-37)OH

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

Val⁸-Asp²²-GLP-1 (7-37)OH

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

Val⁸-Arg²²-GLP-1 (7-37)OH

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

Val⁸-Lys²²-GLP-1 (7-37)OH

Fig. 2

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

Gly⁸-Glu²²-GLP-1 (7-37) OH

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

Gly⁸-Asp²²-GLP-1 (7-37) OH

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

Gly⁸-Arg²²-GLP-1 (7-37) OH

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

Gly⁸-Lys²²-GLP-1 (7-37) OH

Fig. 3

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

Val⁸-Glu³⁰-GLP-1 (7-37)OH

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

Gly⁸-Glu³⁰-GLP-1 (7-37)OH

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

Val⁸-His³⁷-GLP-1 (7-37)OH

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

Gly⁸-His³⁷-GLP-1 (7-37)OH

Fig. 4

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

Val⁸-Glu²²-Ala²⁷-GLP-1 (7-37) OH

His-Val-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-
Leu-Glu-Lys-Glu-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-
Val-Lys-Gly-Arg-His

Val⁸-Lys²²-Glu²³-GLP-1 (7-37) OH

ES 2 321 439 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Eli Lilly and Company
- 5 <120> ANÁLOGOS DEL PEPTÍDO 1 SIMILAR A GLUCAGÓN
<130> X-13989 EP
<160> 53
<170> PatentIn versión 3.0
- 10 <210> 1
<211> 31
<212> PROT
<213> Artificial
- 15 <220>
<223> construcción sintética
<220>
- 20 <221> VARIANTE
<222> (2).. (2)
<223> el Xaa de la posición 2 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser o Thr;
<220>
- 25 <221> VARIANTE
<222> (5).. (5)
<223> el Xaa de la posición 5 es Asp, Glu, Arg, Thr, Ala, Lys o His;
<220>
- 30 <221> VARIANTE
<222> (6).. (6)
<223> el Xaa de la posición 6 es His, Trp, Phe o Tyr;
<220>
- 35 <221> VARIANTE
<222> (10).. (10)
<223> el Xaa de la posición 10 es Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu o Ala;
<220>
- 40 <221> VARIANTE
<222> (16).. (16)
<223> el Xaa de la posición 16 es Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, Cys o Ácido Cisteico;
<220>
- 45 <221> VARIANTE
<222> (17).. (17)
<223> el Xaa de la posición 17 es His, Asp, Lys, Glu, Gln o Arg;
<220>
- 50 <221> VARIANTE
<222> (18).. (18)
<223> el Xaa de la posición 18 es Glu, His, Ala o Lys;
<220>
- 55 <221> VARIANTE
<222> (20).. (20)
<223> el Xaa de la posición 20 es Trp, Tyr, Phe, Asp, Lys, Glu o His;
<220>
- 60 <221> VARIANTE
<222> (21).. (21)

ES 2 321 439 T3

- <223> el Xaa de la posición 21 es Ala, Glu, His, Phe, Tyr, Trp, Arg o Lys;
 <220>
 <221> VARIANTE
- 5 <222> (25).. (25)
 <223> el Xaa de la posición 25 es Ala, Glu, Asp, Ser o His;
 <220>
 <221> VARIANTE
- 10 <222> (27).. (27)
 <223> el Xaa de la posición 27 es Asp, Arg, Val, Lys, Ala, Gly o Glu;
 <220>
 <221> VARIANTE
- 15 <222> (28).. (28)
 <223> el Xaa de la posición 28 es Glu, Lys o Asp;
 <220>
- 20 <221> VARIANTE
 <222> (29).. (29)
 <223> el Xaa de la posición 29 es Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His o Glu;
 <220>
- 25 <221> VARIANTE
 <222> (30).. (30)
 <223> el Xaa de la posición 30 es Thr, Ser, Asp, Trp, Tyr, Phe, Arg, Glu o His;
 <220>
- 30 <221> VARIANTE
 <222> (31).. (31)
 <223> el Xaa de la posición 31 es Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, -NH₂, Gly, Gly-Pro o Gly-Pro-NH₂, o está suprimido;
 <400> 1
- 40
- | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | His | Xaa | Glu | Gly | Xaa | Xaa | Thr | Ser | Asp | Xaa | Ser | Ser | Tyr | Leu | Glu | Xaa |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Xaa | Xaa | Ala | Xaa | Xaa | Phe | Ile | Xaa | Trp | Leu | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa |
| | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | |
- 45
- <210> 2
 <211> 31
- 50 <212> PROT
 <213> Artificial
 <220>
- 55 <223> construcción sintética
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2).. (2)
- 60 <223> el Xaa de la posición 2 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser o Thr;
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6).. (6)
- 65 <223> el Xaa de la posición 6 es His, Trp, Phe o Tyr;
 <220>

ES 2 321 439 T3

- <221> VARIANTE
 <222> (10).. (10)
 <223> el Xaa de la posición 10 es Leu, Ser, Thr, Trp, His, Phe, Asp, Val, Glu o Ala;
- 5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (16).. (16)
- 10 <223> el Xaa de la posición 16 es Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, Cys o Ácido Cisteico;
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (17).. (17)
- 15 <223> el Xaa de la posición 17 es His, Asp, Lys, Glu o Gln;
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (20).. (20)
- 20 <223> el Xaa de la posición 20 es Asp, Lys, Glu o His;
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (24).. (24)
- 25 <223> el Xaa de la posición 24 es Ala, Glu, Asp, Ser o His;
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (29).. (29)
- 30 <223> el Xaa de la posición 29 es Thr, Ser, Lys, Arg, Trp, Tyr, Phe, Asp, Gly, Pro, His o Glu;
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (31).. (31)
- 35 <223> el Xaa de la posición 31 es Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, -NH₂, Gly, Gly-Pro o Gly-Pro-NH₂, o está suprimido;
- 40 <400> 2
- 45 **His Xaa Glu Gly Thr Xaa Thr Ser Asp Xaa Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa**
1 5 10 15
- Xaa Ala Ala Xaa Glu Phe Ile Xaa Trp Leu Val Lys Xaa Arg Xaa**
20 25 30
- 50 <210> 3
 <211> 31
 <212> PROT
- 55 <213> Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 <220>
- 60 <221> VARIANTE
 <222> (2).. (2)
 <223> el Xaa de la posición 2 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser o Thr;
- 65 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (16).. (16)

ES 2 321 439 T3

<223> el Xaa de la posición 16 es Gly, Asp, Glu, Gln, Asn, Lys, Arg, Cys o Ácido Cisteico;

 $\langle 200 \rangle$

<221> VARIANTE

5 $\langle 222 \rangle$ (17).. (17)

<223> el Xaa de la posición 17 es His, Asp, Lys, Glu o Gln;

 $\langle 200 \rangle$

<221> VARIANTE

10 $\langle 222 \rangle$ (21).. (21)

<223> el Xaa de la posición 21 es Ala, Glu, His, Phe, Try, Trp, Arg o Lys;

 $\langle 220 \rangle$

15 <221> VARIANTE

$\langle 222 \rangle$ (24).. (24)

<223> el Xaa de la posición 24 es Ala, Glu, Asp, Ser o His;

 $\langle 220 \rangle$

20 <221> VARIANTE

 $\langle 222 \rangle$ (31).. (31)

<223> el Xaa de la posición 31 es Lys, Arg, Thr, Ser, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, His, -NH2, Gly, Gly-Pro o Gly-Pro-NH2, o está suprimido;

25

 $\langle 400 \rangle$ 3

30 His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa
1 5 10 15

Xaa Ala Ala Lys Xaa Phe Ile Xaa Trp Leu Val Lys Gly Arg Xaa
20 25 30

35

<210> 4

<211> 31

<212> PROT

40 <213> Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> construcción sintética

 $\langle 220 \rangle$

45 <221> VARIANTE

 $\langle 222 \rangle$ (1).. (1)

<223> el Xaa de la posición 1 es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, beta-hidroxi-histidina, homohistidina, alfa-fluorometil-histidina o alfa-metil-histidina;

50

 $\langle 220 \rangle$

<221> VARIANTE

 $\langle 222 \rangle$ (2).. (2)

55 <223> el Xaa de la posición 2 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser o Thr;

 $\langle 220 \rangle$

<221> VARIANTE

$\langle 222 \rangle$ (16).. (16)

⁶⁰ <223> el Xaa de la posición 16 es Asp, Glu, Gln, Asp, Lys, Arg o Cys;

 $\langle 200 \rangle$

<221> VARIANTE

65 $\langle 222 \rangle$ (31).. (31)

<223> el Xaa de la posición 31 es -NH₂ o Gly;

ES 2 321 439 T3

<400> 4

```

5      Xaa Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa
      1          5          10          15
      Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Xaa
          20          25          30

```

10 <210> 5

<211> 31

<212> PROT

<213> Artificial

15 <220>

<223> construcción sintética

20 <400> 5

```

25      His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
      1          5          10          15
      Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
          20          25          30

```

<210> 6

30 <211> 31

<212> PROT

<213> Artificial

35 <220>

<223> construcción sintética

<400> 6

```

40      His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Asp
      1          5          10          15
      Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
          20          25          30

```

<210> 7

<211> 31

50 <212> PROT

<213> Artificial

<220>

55 <223> construcción sintética

<400> 7

```

60      His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Arg
      1          5          10          15
      Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
          20          25          30

```

65 <210> 8

<211> 31

ES 2 321 439 T3

<212> PROT

<213> Artificial

<220>

5 <223> construcción sintética

<400> 8

10 His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Lys
1 5 10 15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
15 20 25 30

<210>9

<211> 31

20 <212> PROT

<213> Artificial

<220>

25 <223> construcción sintética

<400> 9

30 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
1 5 10 15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
35 20 25 30

<210> 10

<211> 31

<212> PROT

40 <213> Artificial

<220>

<223> construcción sintética

45 <400> 10

50 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Asp
1 5 10 15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

55 <210> 11

<211> 31

<212> PROT

<213> Artificial

60 <220>

<223> construcción sintética

65

ES 2 321 439 T3

<400> 11

5 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Arg
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

10 <210> 12

<211> 31

<212> PROT

15 <213> Artificial

<220>

<223> construcción sintética

20 <400> 12

25 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Lys
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

30 <210> 13

<211> 31

<212> PROT

<213> Artificial

35 <220>

<223> construcción sintética

40 <400> 13

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

45 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 14

50 <211> 31

<212> PROT

<213> Artificial

<220>

55 <223> construcción sintética

<400> 14

60 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

65

<210> 15

<211> 31

ES 2 321 439 T3

<212> PROT

<213> Artificial

<220>

5 <221> construcción sintética

<400> 15

10 His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

15 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg His
20 25 30

<210> 16

<211> 31

<212> PROT

20 <213> Artificial

<220>

<223> construcción sintética

25 <400> 16

30 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg His
20 25 30

<210> 17

35 <211> 31

<212> PROT

<213> Artificial

40 <220>

<223> construcción sintética

<400> 17

45 His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
1 5 10 15

50 Gln Ala Ala Lys Ala Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg His
20 25 30

<210> 18

<211> 31

55 <212> PROT

<213> Artificial

<220>

60 <223> construcción sintética

65

ES 2 321 439 T3

<400> 18

5 His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Lys
1 5 10 15

Glu Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg His
20 25 30

10 <210> 19

<211> 31

<212> PROT

<213> *Homo sapiens*

15

<400> 19

20 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

25 <210> 20

<211> 31

<212> PROT

<213> Artificial

30

<220>

<223> construcción sintética

<400> 20

35

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
1 5 10 15

40 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 21

<211> 31

45

<212> PROT

<213> Artificial

<220>

50 <223> construcción sintética

<400> 21

55 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Asp
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

60 <210> 22

<211> 31

<212> PROT

<213> Artificial

65

<220>

<223> construcción sintética

ES 2 321 439 T3

<400> 22

```

5      His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Arg
      1          5          10          15

      Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
              20          25          30

```

10 <210> 23

<211> 31

<212> PROT

15 <213> Artificial

<220>

<223> construcción sintética

20 <400> 23

```

25      His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Lys
      1          5          10          15

      Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
              20          25          30

```

<210> 24

30 <211> 31

<212> PROT

<213> Artificial

35 <220>

<223> construcción sintética

<220>

<221> VARIANTE

40 <222> (16) .. (16)

<223> el Xaa de la posición 16 es ácido cisteico

<400> 24

```

45      His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa
      1          5          10          15

50      Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
              20          25          30

```

<210> 25

55 <211> 31

<212> PROT

<213> Artificial

<220>

60 <223> construcción sintética

<220>

<221> VARIANTE

65 <222> (16) .. (16)

<223> el Xaa de la posición 16 es ácido cisteico

ES 2 321 439 T3

<400> 25

5 His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

10 <210> 26

<211> 31

<212> PROT

15 <213> Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<220>

20 <221> VARIANTE

<222> (16) .. (16)

<223> el Xaa de la posición 16 es ácido cisteico

25 <400> 26

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa

30 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

35 <210> 27

<211> 30

<212> PROT

40 <213> Artificial

<220>

<223> construcción sintética

45 <400> 27

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
1 5 10 15

50 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 28

55 <211> 30

<212> PROT

<213> Artificial

<220>

60 <223> construcción sintética

65

ES 2 321 439 T3

<400> 28

5 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Asp
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

10 <210> 29

<211> 30

<212> PROT

<213> Artificial

15 <220>

<223> construcción sintética

<400> 29

20

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Arg
1 5 10 15

25 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 30

<211> 30

30

<212> PROT

<213> Artificial

<220>

35 <223> construcción sintética

<400> 30

40 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Lys
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

45 <210> 31

<211> 30

<212> PROT

50 <213> Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<220>

55 <221> VARIANTE

<222> (16) .. (16)

<223> el Xaa de la posición 16 es ácido cisteico

60 <400> 31

65 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

ES 2 321 439 T3

<210> 32
 <211> 30
 <212> PROT
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 10 <400> 32

 His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
 1 5 10 15
 15 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 20 25 30
 <210> 33
 20 <211> 30
 <212> PROT
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 33
 30 His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Asp
 1 5 10 15
 35 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 20 25 30
 <210> 34
 <211> 30
 40 <212> PROT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 45 <400> 34

 50 His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Arg
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 20 25 30
 55 <210> 35
 <211> 30
 <212> PROT
 60 <213> Artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 65

ES 2 321 439 T3

<400> 35

```

5      His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Lys
      1          5          10          15

      Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
          20          25          30

```

10 <210> 36

<211> 30

<212> PROT

15 <213> Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<220>

20 <221> VARIANTE

<222> (16) .. (16)

<223> el Xaa de la posición 16 es ácido cisteico

25 <400> 36

```

30      His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa
      1          5          10          15

      Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
          20          25          30

```

35 <210> 37

<211> 30

<212> PROT

<213> Artificial

40 <220>

<223> construcción sintética

<400> 37

45

```

      His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
      1          5          10          15

```

```

50      Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
          20          25          30

```

<210> 38

<211> 30

55 <212> PROT

<213> Artificial

<220>

60 <223> construcción sintética

65

ES 2 321 439 T3

<400> 38

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Asp
1      5      10      15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20      25      30

```

<210> 39

<211> 30

<212> PROT

<213> Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 39

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Arg
1      5      10      15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20      25      30

```

<210> 40

<211> 30

<212> PROT

<213> Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 40

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Lys
1      5      10      15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20      25      30

```

<210> 41

<211> 30

<212> PROT

<213> Artificial

<220>

<223> construcción sintética

<220>

<221> VARIANTE

<222> (16) .. (16)

<223> el Xaa de la posición 16 es ácido cisteico

<400> 41

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Xaa
1      5      10      15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20      25      30

```

ES 2 321 439 T3

<210> 42

<211> 31

<212> PROT

5 <213> Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> construcción sintética

10 $\langle 400 \rangle$ 42

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Lys Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

20 <210> 43

<211> 31

<212> PROT

<213> Artificial

25 $\langle 220 \rangle$

<223> construcción sintética

<400> 43

30

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Ala Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 44

40 <211> 31

<212> PROT

<213> Artificial

 $\langle 220 \rangle$

⁴⁵ <223> construcción sintética

<400> 44

50

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 45

<211> 31

60 <212> PROT

<213> Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> construcción sintética

65

ES 2 321 439 T3

<400> 45

5 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Glu Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

10 <210> 46

<211> 31

<212> PROT

<213> Artificial

15 <220>

<223> construcción sintética

20 <400> 46

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

25 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys His Arg Gly
20 25 30

<210> 47

30 <211> 31

<212> PROT

<213> Artificial

<220>

35 <223> construcción sintética

<400> 47

40 His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

45 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg His
20 25 30

<210> 48

<211> 31

50 <212> PROT

<213> Artificial

<220>

<223> construcción sintética

55 <400> 48

60 His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
1 5 10 15

Lys Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

65 <210> 49

<211> 31

ES 2 321 439 T3

<212> PROT

<213> Artificial

<220>

5 <223> construcción sintética

<400> 49

10

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
1 5 10 15

15

Lys Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 50

<211> 31

20 <212> PROT

<213> Artificial

<220>

25 <223> construcción sintética

<400> 50

30

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Ala Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

35

<210> 51

<211> 31

<212> PROT

40 <213> Artificial

<220>

<223> construcción sintética

45

<400> 51

50

His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Gly Lys Arg Gly
20 25 30

<210> 52

55 <211> 31

<212> PROT

<213> Artificial

60 <220>

<223> construcción sintética

65

ES 2 321 439 T3

<400> 52

5 His Val Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg His
20 25 30

10 <210> 53

<211> 31

<212> PROT

15 <213> Artificial

<220>

<223> construcción sintética

20 <400> 53

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

25 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg His
20 25 30

30

35

40

45

50

55

60

65