



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 335 211**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/605 (2006.01)

C07K 14/62 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

A61K 38/26 (2006.01)

A61K 38/28 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **04739039 .8**

(96) Fecha de presentación : **18.08.2004**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1664108**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2006**

(54) Título: **Separación de polipéptidos comprendiendo un aminoácido racemizado.**

(30) Prioridad: **21.08.2003 DK 2003 01196**
27.08.2003 US 498250 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.03.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.03.2010

(73) Titular/es: **NOVO NORDISK A/S**
Novo Allé
2880 Bagsvaerd, DK

(72) Inventor/es: **Hansen, Thomas Budde;**
Kidal, Steffen y
Kornbeck, Camilla

(74) Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 335 211 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

Separación de polipéptidos comprendiendo un aminoácido racemizado.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de purificación de proteína. En particular, la invención se refiere a un método para separar polipéptidos donde un aminoácido es racemizado.

10 **Antecedentes de la invención**

Los polipéptidos están siendo usados cada vez más como medicamentos para el tratamiento de enfermedades en todas las principales áreas de terapia. El tratamiento de la diabetes por administración crónica de insulina ha sido practicada durante más de 80 años, y usos terapéuticos de polipéptidos en trastornos del crecimiento y cáncer también han sido practicados durante muchos años.

Procesos económicos para la producción a gran escala de polipéptidos con una pureza suficientemente alta para usos terapéuticos son cruciales para que las terapias adicionales basadas en polipéptidos alcancen el mercado masivo y para que las terapias existentes se vuelvan mucho más usadas.

Los polipéptidos para aplicaciones terapéuticas deben ser altamente purificados para ser eficaces y para proporcionar la certeza de no provocar eventos adversos al administrarse a pacientes. Varias fases de tratamiento usadas en la síntesis y purificación de polipéptidos son conocidas por causar la racemización de uno o más residuos de aminoácidos en el polipéptido objetivo. Normalmente, estas condiciones son pH extremos y temperaturas altas, p. ej. valores de pH encima de pH 12 (Senderoff *et al.* J. Pharm. Sci. 87, 183-189 (1998)). Las variantes de polipéptidos que tienen un residuo de aminoácido racemizado son capaces de separación e identificación por técnicas analíticas del estado de la técnica. Estas variantes son indeseables en polipéptidos para uso terapéutico debido a preocupaciones de toxicidad y porque éstas pueden tener actividad diferente que el polipéptido deseado. No obstante, es un desafío serio el hecho de separar estos polipéptidos cercanamente relacionados en la escala preparatoria, es decir, durante la producción industrial.

La purificación de un polipéptido de una mezcla es una fase que es normalmente usada varias veces durante el proceso de fabricación global para un polipéptido terapéutico. La cromatografía de intercambio de iones es frecuentemente aplicada en las fases de separación temprana y en bruto, mientras que la cromatografía en fase líquida de alta presión de fase inversa (RP-HPLC) es el método preferido para la separación industrial de alta resolución de polipéptidos relacionados en las fases de purificación finales. RP-HPLC ha demostrado ser versátil para la purificación a gran escala de muchos polipéptidos pero el proceso es relativamente caro y tiene capacidad limitada.

Stueber W. *et al.* (Int. J. Peptide Protein Res., 22, 277-283 (1983)) expone la purificación del péptido de insulina bovina B₂₀₋₃₀ por cromatografía de intercambio de iones usando una elución de gradiente con acetato amónico y Senderoff *et al.* (J. Pharm. Sci., 87, 183-186 (1998)) expone la purificación de GLP-1 por cromatografía de intercambio de cationes.

Hemos descubierto sorprendentemente un proceso de intercambio de iones que puede separar los dos polipéptidos variando el resultado cuando la racemización de un residuo de aminoácido ha tomado posición. El método es capaz de operación a gran escala y proporciona una fase de purificación económica con alta capacidad.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Cromatograma de AU₂₈₀ versus tiempo (min) de una separación. Pico n°. 1 es la variante D-his, D-His⁷ Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎, Pico n°. 2 es Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎.

Figura 2. Cromatograma de AU₂₈₀ versus tiempo (min) de una separación. Tanto D-His⁷ Arg³⁴Lys²⁶N^εE(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1_(7,37) como Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎ eluye el pico en su mayor parte. La variante D-His es altamente concentrada en el borde delantero del pico principal y puede ser separada con pérdida baja de rendimiento por fraccionamiento o corte del pico.

Figura 3. Cromatograma de AU₂₁₅ versus volumen (ml) de una separación. Pico n°. 1 contiene la variante L-His de Exendina-4, Pico n°. 2 contiene la variante D-His de Exendina-4.

60 **Definiciones**

La siguiente es una definición detallada de los términos usados en la especificación.

El término “tampón” como se utiliza en este caso se refiere a un compuesto químico que reduce la tendencia del pH de una solución tal como soluciones cromatográficas a cambiar con el tiempo como ocurriría en caso contrario. Los tampones incluyen los ejemplos siguientes no limitativos: acetato sódico, carbonato sódico, citrato sódico, glicilglicina, glicina, histidina, lisina, fosfato sódico, borato, tris-hidroximetil-aminometano, etanolamina y sus mezclas derivadas.

El término “modificador orgánico” como se utiliza en este caso se refiere a un mineral orgánico que se añade a soluciones cromatográficas. Modificadores orgánicos pueden ser alcoholes monohídricos, alcoholes polihídricos al igual que nitritos y cetonas. Ejemplos no limitativos de modificadores orgánicos son metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, t-butanol, hexilenglicol (4-metil-2,4-pentanodiol), neopentil alcohol (2,2-dimetol-1,3- propanodiol), acetonitrilo, acetona y úrea.

El término “polipéptido” como se utiliza en este caso significa un compuesto compuesto por al menos cinco aminoácidos constituyentes conectados por enlaces peptídicos. Los aminoácidos constituyentes pueden ser del grupo de los aminoácidos codificados por el código genético y pueden ser aminoácidos naturales que no son codificados por el código genético, al igual que los aminoácidos sintéticos. Aminoácidos naturales que no son codificados por el código genético son p. ej. hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ornitina, fosfoserina, D-alanina y D-glutamina. Aminoácidos sintéticos comprenden aminoácidos fabricados por síntesis química, es decir D-isómeros de los aminoácidos codificados por el código genético tal como D-alanina y D-leucina, Aib (ácido α -aminoisobutírico), Abu (ácido α -aminobutírico), Tle (terc-butilglicina), y β -alanina. Un polipéptido puede comprender una única cadena peptídica o puede comprender más de una cadena peptídica, tal como p. ej. insulina humana donde dos cadenas son conectadas por enlaces disulfuro.

El término “péptido tipo glucagón” como se utiliza en este caso se refiere a las exendinas y péptidos homólogos además del glucagón que son derivados del gen de preproglucagón, es decir péptido 1 de tipo glucagón (GLP-1), péptido 2 de tipo glucagón (GLP-2), y oxintomodulina (OXM) al igual que análogos y derivados de los mismos. Los péptidos derivados del gen de preproglucagón son glucagón, péptido 1 de tipo glucagón (GLP-1), péptido 2 de tipo glucagón (GLP-2) y oxintomodulina (OXM). Las exendinas que se encuentran en el monstruo de Gila son homologas a GLP-1 y también ejercen un efecto insulínico. Ejemplos de exendinas son exendina-4 y exendina-3.

Los péptidos de tipo glucagón tienen las secuencias siguientes (SEC ID Nos. 1-6):

	1	5	10	15	20	25	30	35	
Glucagon	HSQGT		FTSDY	SKYLD	SRRAQ	DFVQW	LMNT		
GLP-1	HAEGT		FTSDV	SSYLE	GQAAK	EFIAW	LVKGR	G	
GLP-2	HADGS		FSDEM	NTILD	NLAAR	DFINW	LIQTK	ITD	
Exendina-4	HGEGT		FTSDL	SKQME	EEAVR	LFIEW	LKNGG	PSSGA	PPPS-NH2
Exendina-3	HSDGT		FTSDL	SKQME	EEAVR	LFIEW	LKNGG	PSSGA	PPPS-NH2
OXM	HSQGT		FTSDY	SKYLD	SRRAQ	DFVQW	LMDTK	RNKNN	IA

El término “análogo” como se utiliza en este caso en referencia a un péptido significa un péptido modificado donde uno o más residuos de aminoácidos del péptido han sido sustituidos por otros residuos de aminoácidos y/o donde uno o más residuos de aminoácidos han sido deletados del péptido y/o donde uno o más residuos de aminoácidos han sido deletados del péptido y/o donde uno o más residuos de aminoácidos han sido añadidos al péptido. Esta adición o eliminación de residuos de aminoácidos puede tener lugar en el N-terminal del péptido y/o en el C-terminal del péptido. Dos sistemas diferentes y simples son frecuentemente usados para describir los análogos: por ejemplo Arg³⁴-GLP-1(7-37) o K34R-GLP-1(7-37) designa un análogo de GLP-1 donde la lisina que se origina de forma natural en la posición 34 ha sido sustituida con arginina (abreviatura estándar de una sola letra para aminoácidos usados según la nomenclatura de IUPAC-IUB).

El término “derivado” como se utiliza en este caso en relación con un péptido parental significa una proteína parental químicamente modificada o un derivado análogo, donde al menos un sustituyente no está presente en la proteína parental o un análogo de la misma, es decir una proteína parental que ha sido modificada de forma covalente. Modificaciones típicas son amidas, carbohidratos, grupos alquilo, grupos acilo, ésteres, PEGilaciones y similares. Un ejemplo de un derivado de GLP-1(7-37) es Arg³⁴, Lys²⁶N^ε(γ -Glu(N^α-hexadecanoil)))-GLP-1(7-37).

El término “un fragmento del mismo” como se utiliza en este caso en relación con un péptido significa cualquier fragmento del péptido que tiene al menos el 20% de los aminoácidos del péptido parental. Así, para albúmina de suero humano un fragmento comprenderá al menos 117 aminoácidos puesto que la albúmina de suero humano tiene 585 aminoácidos. En una forma de realización el fragmento tiene al menos el 35% de los aminoácidos del péptido parental. En otra forma de realización el fragmento tiene al menos el 50% de los aminoácidos del péptido parental. En otra forma de realización el fragmento tiene al menos el 75% de los aminoácidos del péptido parental.

ES 2 335 211 T3

El término “variante” como se utiliza en este caso en relación con un péptido significa un péptido modificado es decir un análogo del péptido parental, un derivado del péptido parental o un derivado de un análogo del péptido parental.

5 El término “péptido GLP-1” como se utiliza en este caso significa GLP-1(7-37), un análogo de GLP-1(7-37), un derivado de GLP-1(7-37) o un derivado de un análogo de GLP-1(7-37).

10 El término “péptido GLP-2” como se utiliza en este caso significa GLP-2(1-33), un análogo de GLP-2, un derivado de GLP 2(1-33) o un derivado de un análogo de GLP-2(1-33).

El término “péptido de exendina-4” como se utiliza en este caso significa exendina-4(1-39), un análogo de exendina-4, un derivado de exendina-4 o un derivado de un análogo de exendina-4.

15 El término “compuesto de exendina-4 estable” como se utiliza en este caso significa una exendina-4(1-39) químicamente modificada, es decir un análogo o un derivado que muestra una semivida de eliminación del plasma *in vivo* de al menos 10 horas en el hombre, según está determinado por el método siguiente. El método para determinación de la semivida de eliminación del plasma de un compuesto de exendina-4 en el hombre es: el compuesto es disuelto en un tampón isotónico, pH 7.4, PBS o cualquier otro tampón adecuado. La dosis es inyectada periféricamente, preferiblemente en el músculo abdominal o muslo superior. Se toman muestras de sangre para determinar de compuesto activo a intervalos frecuentes, y durante una duración suficiente para cubrir la parte de eliminación terminal (p. ej. Predosis, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 24 (día 2), 36 (día 2), 48 (día 3), 60 (día 3), 72 (día 4) y 84 (día 4) horas post dosis). La determinación de la concentración del compuesto activo es realizada como se describe en Wilken *et al.*, Diabetologia 43(51): A143, 2000. Los parámetros farmacocinéticos derivados se calculan a partir de los datos de concentración-tiempo para cada sujeto individual usando métodos no compartimentales, usando el software comercialmente disponible WinNonlin versión 2.1 (Pharsight, Cary, NC, USA). La constante de nivel de eliminación terminal se estima por regresión loglineal en la parte loglineal terminal de la curva de concentración-tiempo, y se usa para calcular la semivida de eliminación. El término “péptido tipo glucagón protegido con DPP-IV” como se utiliza en este caso significa un péptido de tipo glucagón que es químicamente modificado en comparación con el péptido natural para volverse dicho péptido de tipo glucagón más resistente a la dipeptidil aminopeptidasa-4 peptidasa (DPP-IV) del plasma.

30 El término “compuesto de exendina-4 inmunomodulado” como se utiliza en este caso significa un péptido de exendina-4 que es un análogo o un derivado de exendina-4(1-39) que tiene una respuesta inmunitaria reducida en seres humanos en comparación con exendina-4(1-39). El método para evaluación de la respuesta inmunitaria es medir la concentración de anticuerpos reactivos al compuesto de exendina-4 después de 4 semanas de tratamiento del paciente.

El término “péptido de insulina” como se utiliza en este caso significa un péptido que es bien insulina humana o una insulina humana químicamente modificada, tal como un análogo o un derivado.

40 El término “insulina humana” como se utiliza en este caso significa la hormona humana cuya estructura y propiedades son conocidas. La insulina humana tiene dos cadenas polipeptídicas que se conectan por puentes de disulfuro entre residuos de cisteína, es decir la A-cadena y la B-cadena. La A-cadena es un péptido de 21 aminoácidos y la B-cadena es un péptido de 30 aminoácidos, las dos cadenas que se conectan por tres puentes disulfuro: una entre las cisteínas en posición 6 y 11 de la A-cadena, la segunda entre la cisteína en posición 7 de la A-cadena y la cisteína en posición 7 de la B-cadena, y la tercera entre la cisteína en posición 20 de la A-cadena y la cisteína en posición 19 de la B-cadena.

50 El término “producto polipeptídico” como se utiliza en este caso significa el producto de péptido purificado que debe ser usado para la producción de una composición farmacéutica. Así, el producto polipeptídico es normalmente obtenido como el producto de la fase de purificación final, de secado o de acondicionamiento. El producto puede ser cristales, precipitado, solución o suspensión. El producto polipeptídico es también conocido en la técnica como la sustancia del medicamento, es decir el ingrediente activo farmacéutico.

55 El término “punto isoelectrico” como se utiliza en este caso significa el valor de pH donde la carga neta global de una macromolécula tal como un polipéptido es cero. En polipéptidos pueden haber muchos grupos cargados, y en el punto isoelectrico la suma de todas estas cargas es cero. A un pH encima del punto isoelectrico la carga neta global del polipéptido será negativa, mientras que a valores de pH debajo del punto isoelectrico la carga neta global del polipéptido será positiva.

60 El término “farmacéuticamente aceptable” como se utiliza en este caso significa adecuado para aplicaciones farmacéuticas normales, es decir que no dan lugar a eventos adversos en pacientes etc.

El término “excipiente” como se utiliza en este caso significa los compuestos químicos que son normalmente añadidos a composiciones farmacéuticas, p. ej. tampones, agentes de tonicidad, conservantes y similares.

65 El término “cantidad eficaz” como se utiliza en este caso significa una dosificación que es suficiente para ser eficaz para el tratamiento del paciente comparado con ningún tratamiento.

El término “composición farmacéutica” como se utiliza en este caso significa un producto que comprende un compuesto activo o un derivado de sal junto con excipientes farmacéuticos tal como tampón, conservante, y opcionalmente un modificador de tonicidad y/o un estabilizador. Así una composición farmacéutica es también conocida en la técnica como una fórmula farmacéutica.

El término “tratamiento de una enfermedad” como se utiliza en este caso significa el tratamiento y cuidado de un paciente que ha desarrollado la enfermedad, condición o trastorno. El propósito del tratamiento es combatir la enfermedad, condición o trastorno. El tratamiento incluye la administración de los compuestos activos para eliminar o controlar la enfermedad, condición o trastorno al igual que para aliviar los síntomas o complicaciones asociados a la enfermedad, condición o trastorno.

Descripción de la invención

En un primer aspecto la presente invención se refiere a un método para separar dos polipéptidos que tienen una racemización de un único aminoácido, A(X) y A(X*), donde

X es un L-aminoácido,

A(X) es un polipéptido que comprende el aminoácido X,

X* es el D-isómero de X,

A(X*) es un polipéptido que comprende el aminoácido X* pero por el contrario idéntico a A(X), dicho método caracterizado por ser un proceso de cromatografía de intercambio de iones que comprende la elución mediante el aumento de la concentración de sal a un pH que es no superior a aproximadamente 1 unidad de pH de una pKa de X bajo las condiciones de elución.

El polipéptido objetivo y la impureza que comprende un residuo de aminoácido racemizado son eluidos y separados por una fase isocrática, asintótica o de aumento lineal en la concentración de sal del eluyente, o en combinaciones de estas. La pKa de X puede ser evaluada por valores de pKa tabulados para residuos de aminoácidos (ver p. ej. Creighton T.E., “Proteins. Structures and Molecular Properties” página 6, 2ª ed. W.H. Freeman and Company, N.Y (1993)). La pKa de X puede también ser evaluada por algoritmos implementados por ordenador conocidos en la técnica que tienen en cuenta los efectos de residuos de aminoácidos colindantes en la pKa de X. Otra posibilidad de determinar la pKa de X es realizar estudios de RMN de la proteína donde se incorpora X. Es conocido que valores de pKa pueden ser influidos por la composición de la solución, p. ej. la presencia de un modificador orgánico puede cambiar la pKa de un residuo de aminoácido.

La cromatografía de intercambio de iones es un proceso de separación ampliamente aplicado donde la separación es conseguida basándose en cargas soportadas por moléculas de soluto. En cromatografía de intercambio de iones el principio de separación más importante es interacciones iónicas entre la fase estacionaria y las moléculas solubles que son separadas.

En el modo normal de cromatografía de intercambio de iones un ciclo completo comprende

- a) equilibrado con un tampón de equilibrado para llevar la columna a un estado donde se prepara para un ciclo,
- b) aplicación de la muestra que lleva el producto,
- c) una fase de lavado opcional donde la fase estacionaria cromatográfica con el producto unido es lavada,
- d) elución cuando la concentración de sal aumentada provoca el decrecimiento de la afinidad del producto hacia la fase estacionaria de la cromatografía y el producto deja la columna en el eluato de la columna cromatográfica, y
- e) una regeneración opcional donde se intenta despojar la fase estacionaria cromatográfica de las impurezas restantes usando una solución de regeneración.

Durante la fase de elución (d) la separación de diferentes polipéptidos es obtenida recolectando el eluato de la columna en varios pools. Mediante la recogida apropiada de estos pools, p. ej. por medición de la AU₂₈₀ (es decir, la absorbencia a 280 nm) o la conductividad, cada uno de estos pools contienen predominantemente ciertos polipéptidos. Así, separación se consigue recolectando estos pools o la parte del eluyente que contiene predominantemente el polipéptido deseado.

La solución de equilibrado y la muestra para aplicación pueden contener o no el modificador orgánico. El modificador orgánico podría ser pero no está limitado a cualquier alcohol alifático monohídrico (metanol, etanol, propanoles y butanoles) o un alcohol polihídrico tal como hexilenglicol o alcohol neopentílico. Componentes de sal para cualquier sección de la purificación cromatográfica puede ser cualquier sal incluyendo pero sin limitarse a: NaCl, KCl, NH₄Cl, CaCl₂, acetato sódico, acetato potásico, acetato amónico etc. cualquier componente de tampón puede ser usado incluyendo pero sin limitarse a: tampones cítricos, tampones de fosfato, tampones de borato, tampones de car-

ES 2 335 211 T3

bonato, tampones de acetato, tampones de amonio, tampones de glicina, tampones de tris-hidroximetil amino metano, tampones de ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico etc. Una gama amplia de resinas para cambiar iones cromatográficas son aplicables, incluyendo pero sin limitarse a Mono Q (Amersham Biosciences), Source 15Q o 30Q (Amersham Biosciences), Poros 20HQ o 50HQ (Perspective Biosystems), Toyopearl Q650S (Toso Haas) y otros.

En una forma de realización de la presente invención el método es para separar dichos polipéptidos en la escala preparatoria.

En otra forma de realización de la presente invención la elución se realiza a un pH que es sustancialmente el mismo que el pH usado para la unión. No obstante, también es posible realizar la unión, es decir aplicación de la muestra, a la columna a un pH que no es el mismo que el pH usado para la elución. La unión a un pH que es diferente del pH usado para la elución implica por tanto que se realice un ajuste del pH en la columna.

En otra forma de realización de la presente invención la elución de los polipéptidos se realiza a un pH que es no mayor de aproximadamente 0.75 unidades de pH de una pKa de X bajo las condiciones de elución. En otra forma de realización de la presente invención la elución de los polipéptidos se realiza a un pH que es no mayor de aproximadamente 1.0 unidades de pH de una pKa de X bajo las condiciones de elución. En otra forma de realización de la presente invención la elución de los polipéptidos se realiza a un pH que es no mayor de aproximadamente 0.5 unidades de pH de una pKa de X bajo las condiciones de elución. En otra forma de realización de la presente invención la elución de los polipéptidos se realiza a un pH que es no mayor de aproximadamente 0.25 unidades de pH de una pKa de X bajo las condiciones de elución.

En una forma de realización de la presente invención la elución se realiza a un pH que es superior al punto isoelectrico de dichos polipéptidos. En otra forma de realización de la presente invención la elución se realiza a un pH que es inferior al punto isoelectrico de dichos polipéptidos.

En otra forma de realización de la presente invención el polipéptido tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 10 kDa.

En otra forma de realización de la presente invención el polipéptido tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 8 kDa.

En otra forma de realización de la presente invención el polipéptido tiene un peso molecular en la gama de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 10 kDa.

En otra forma de realización de la presente invención el eluyente comprende un modificador orgánico.

En otra forma de realización de la presente invención el eluyente comprende un modificador orgánico en una concentración suficiente para mantener dichos polipéptidos solubles.

En otra forma de realización de la presente invención el modificador orgánico es etanol.

En otra forma de realización de la presente invención el modificador orgánico es 2-propanol.

En otra forma de realización de la presente invención el modificador orgánico es acetonitrilo.

En otra forma de realización de la presente invención el modificador orgánico es seleccionado del grupo que consiste en metanol, 1-propanol y hexilenglicol.

En otra forma de realización de la presente invención el modificador orgánico es alcohol neopentílico.

En otra forma de realización de la presente invención la concentración del modificador orgánico es de aproximadamente el 10% hasta aproximadamente el 80%, tal como de aproximadamente el 20% hasta aproximadamente el 70%, o de aproximadamente el 30% hasta aproximadamente el 65%.

En otra forma de realización de la presente invención la sal es seleccionada del grupo que consiste en cloruro sódico, sulfato sódico, acetato sódico, cloruro potásico, sulfato potásico, y acetato potásico.

En otra forma de realización de la presente invención X es el N-terminal o el residuo de aminoácido C-terminal.

En otra forma de realización de la presente invención X es L-histidina.

En otra forma de realización de la presente invención X es un análogo de aminoácido de histidina.

En otra forma de realización de la presente invención X es seleccionado del grupo que consiste en desamino-histidina, 2-amino-histidina, β -hidroxi-histidina, homohistidina, α -fluorometil-histidina y α -metil-histidina.

En otra forma de realización de la presente invención X es el residuo de aminoácido N-terminal.

ES 2 335 211 T3

En otra forma de realización de la presente invención X es L-fenilalanina.

En otra forma de realización de la presente invención X es L-lisina.

5 En otra forma de realización de la presente invención X es L-arginina.

En otra forma de realización de la presente invención X es ácido L-aspartico.

10 En otra forma de realización de la presente invención X es L-asparagina

En otra forma de realización de la presente invención X es ácido L-glutámico.

En otra forma de realización de la presente invención X es L-glutamina.

15 En otra forma de realización de la presente invención X es ácido L- γ -carboxiglutámico.

En otra forma de realización de la presente invención el polipéptido es un péptido de tipo glucagón.

20 En otra forma de realización de la presente invención el polipéptido es glucagón, un análogo de glucagón, un derivado de glucagón o un derivado de un análogo de glucagón.

En otra forma de realización de la presente invención el péptido de tipo glucagón es GLP-1, un análogo de GLP-1, un derivado de GLP-1 o un derivado de un análogo de GLP-1.

25 En otra forma de realización de la presente invención el análogo de GLP-1 es seleccionado del grupo que consiste en Arg³⁴-GLP-1(7-37), Gly⁸-GLP-1(7-36)-amida, Gly⁸-GLP-1(7-37), Val⁸-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸-GLP-1(7-37), Val⁸Asp²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸Asp²²-GLP-1(7-37), Val⁸Glu²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸Lys²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸Lys²²-GLP-1(7-37), Val⁸Lys²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸Lys²²-GLP-1(7-37), Val⁸His²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸His²²-GLP-1(7-37), Val⁸Trp¹⁹Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸Glu²²Val²⁵-GLP-1(7-37), Val⁸Tyr¹⁶Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸Trp¹⁸Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸Leu¹⁶Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸Tyr¹⁸Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸Glu²²His³⁷-GLP-1(7-37), Val⁸Glu²²Ile³³-GLP-1(7-37), Val⁸Trp¹⁶Glu²²Val²⁵Ile³³-GLP-1(7-37), Val⁸Trp¹⁶Glu²²Ile³³-GLP-1(7-37), Val⁸Trp¹⁶Glu²²Val²⁵Ile³³-GLP-1(7-37), Val⁸Trp¹⁶Glu²²Val²⁵-GLP-1(7-37), análogos y derivados de cualquiera de estos.

35 En otra forma de realización de la presente invención el derivado de GLP-1 o un derivado de un análogo de GLP-1 tiene un residuo de lisina, tal como una lisina, donde un sustituyente lipofílico se fija opcionalmente por medio de un separador al grupo epsilon amino de dicha lisina.

40 En otra forma de realización de la presente invención el sustituyente lipofílico tiene de 8 a 40 átomos de carbono, preferiblemente de 8 a 24 átomos de carbono, p. ej. 12 a 18 átomos de carbono.

En otra forma de realización de la presente invención el separador está presente y se selecciona de un aminoácido, p. ej. beta-Ala, L-Glu, o aminobutiroilo.

45 En otra forma de realización de la presente invención el péptido de tipo glucagón es un péptido de tipo glucagón protegido con DPPIV.

50 En otra forma de realización de la presente invención el péptido de tipo glucagón es un péptido de tipo glucagón estable en plasma.

En otra forma de realización de la presente invención el péptido de tipo glucagón es un derivado de un análogo de GLP-1 que es Arg³⁴Lys²⁶(N^ε(γ -Glu(N^α-hexadecanoil)))-GLP-1(7-37).

55 En otra forma de realización de la presente invención el péptido de tipo glucagón es un péptido de GLP-1 que tiene de 22 a 40 residuos de aminoácidos, preferible de 26 a 36 residuos de aminoácidos, incluso más preferible de 29 a 33 residuos de aminoácidos.

60 En una forma de realización de la presente invención el péptido de tipo glucagón es GLP-2, un análogo GLP-2, un derivado de GLP-2 o un derivado de un análogo de GLP-2.

En otra forma de realización de la presente invención el derivado de GLP-2 o un derivado de un análogo de GLP-2 tiene un residuo de lisina, tal como una lisina, donde un sustituyente lipofílico opcionalmente por medio de un separador se fija al grupo epsilon amino de dicha lisina.

65 En otra forma de realización de la presente invención el sustituyente lipofílico tiene de 8 a 40 átomos de carbono, preferiblemente de 8 a 24 átomos de carbono, p. ej. 12 a 18 átomos de carbono.

ES 2 335 211 T3

En otra forma de realización de la presente invención el separador está presente y se selecciona de un aminoácido, p. ej. beta-Ala, L-Glu, aminobutiroilo.

En otra forma de realización de la presente invención el péptido de tipo glucagón tiene de 27 a 39 residuos de aminoácidos, preferible de 29 a 37 residuos de aminoácidos, incluso más preferible de 31 a 35 residuos de aminoácidos.

En otra forma de realización de la invención el péptido de tipo glucagón es Lys¹⁷ Arg³⁰-GLP-2(1-33) o Arg³⁰ Lys¹⁷N^ε (β-Ala(N^ε-hexadecanoil))GLP-2(1-33).

En otra forma de realización de la presente invención el péptido de tipo glucagón es Gly²-GLP-2(1-33).

En una forma de realización de la presente invención el péptido de tipo glucagón es exendina-4, un análogo de exendina-4, un derivado de exendina-4, o un derivado de un análogo de exendina-4.

En otra forma de realización de la presente invención el péptido de tipo glucagón es exendina-4.

En otra forma de realización de la presente invención el derivado de exendina-4 o derivado de un análogo de exendina-4 es un péptido acilado o un péptido pegilado.

En otra forma de realización de la presente invención el péptido de tipo glucagón es un compuesto de exendina-4 estable.

En otra forma de realización de la presente invención el péptido de tipo glucagón es un compuesto de exendina-4 protegido con DPP-IV.

En otra forma de realización de la presente invención el péptido de tipo glucagón es un compuesto de exendina-4 inmunomodulado.

En otra forma de realización de la presente invención el derivado de exendina-4 o derivado de un análogo de exendina-4 tiene un residuo de lisina, tal como una lisina, donde un sustituyente lipofílico se fija opcionalmente por medio de un separador al grupo epsilon amino de dicha lisina.

En otra forma de realización de la presente invención el sustituyente lipofílico tiene de 8 a 40 átomos de carbono, preferiblemente de 8 a 24 átomos de carbono, p. ej. 12 a 18 átomos de carbono.

En otra forma de realización de la presente invención el separador está presente y se selecciona de un aminoácido, p. ej. beta-Ala, L-Glu, o aminobutiroilo.

En otra forma de realización de la presente invención el péptido de tipo glucagón es un péptido de exendina-4 que tiene de 30 a 48 residuos de aminoácidos, de 33 a 45 residuos de aminoácidos, preferible de 35 a 43 residuos de aminoácidos, incluso más preferible de 37 a 41 residuos de aminoácidos.

En una forma de realización de la invención el péptido de GLP-2 se selecciona de la lista que consiste en: K30R-GLP-2(1-33); S5K-GLP-2(1-33); S7K-GLP-2(1-33); D8K-GLP-2(1-33); E9K-GLP-2(1-33); M10K-GLP-2(1-33); N11 K-GLP-2(1-33); T12K-GLP-2(1-33); I113K-GLP-2(1-33); L14K-GLP-2(1-33); D15K-GLP-2(1-33); N16K-GLP-2(1-33); L17K-GLP-2(1-33); A18K-GLP-2(1-33); D21K-GLP-2(1-33); N24K-GLP-2(1-33); Q28K-GLP-2(1-33); S5K/K30R-GLP-2(1-33); S7K/K30R GLP-2(1-33); D8K/K30R-GLP-2(1-33); E9K/K30R-GLP-2(1-33); M10K/K30R-GLP-2(1-33); N11K/K30R-GLP-2(1-33); T12K/K30R-GLP-2(1-33); I13K/K30R-GLP-2(1-33); L14K/K30R-GLP-2(1-33); D15K/K30R-GLP-2(1-33); N16K/K30R-GLP2(1-33); L17K/K30R-GLP-2(1-33); A18K/K30R-GLP-2(1-33); D21K/K30R-GLP-2(1-33); N24K/K30R-GLP-2(1-33); Q28K/K30R-GLP-2(1-33); K30R/D33K-GLP-2(1-33); D3E/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/S5K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/S7K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/D8K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/E9K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/M10K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/N11K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/T12K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/I13K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/L14K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/D15K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/N16K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/L17K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/A18K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/D21K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/N24K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/Q28K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); y derivados de los mismos.

En una forma de realización de la invención el derivado de GLP-2 es seleccionado del grupo que consiste en

S5K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);

S7K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);

D8K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);

E9K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);

ES 2 335 211 T3

M10K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 N11K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 5 T12K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 H3K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 L14K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 10 D15K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 N16K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 15 L17K(3-(octanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 L17K(3-(nonanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 L17K(3-(decanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 20 L17K(3-(undecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 L17K(3-(dodecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 25 L17K(3-(tridecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 L17K(3-(tetradecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 L17K(3-(pentadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 30 L17K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 L17K(3-(heptadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 35 L17K(3-(octadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 L17K(3-(nonadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 L17K(3-(eicosanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 40 L17K((S)-4-carboxi-4-(octanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K((S)-4-carboxi-4-(nonanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 45 L17K((S)-4-carboxi-4-(decanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K((S)-4-carboxi-4-(undecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K((S)-4-carboxi-4-(dodecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 50 L17K((S)-4-carboxi-4-(tridecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K((S)-4-carboxi-4-(tetradecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 55 L17K((S)-4-carboxi-4-(pentadecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K((S)-4-carboxi-4-(hexadecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K((S)-4-carboxi-4-(heptadecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 60 L17K((S)-4-carboxi-4-(octadecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K((S)-4-carboxi-4-(nonadecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 65 L17K((S)-4-carboxi-4-(eicosanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K(4-(octanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);

ES 2 335 211 T3

L17K(4-(nonanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K(4-(decanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 5 L17K(4-(undecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K(4-(dodecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K(4-(tridecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 10 L17K(4-(tetradecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K(4-(pentadecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 15 L17K(4-(hexadecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K(4-(heptadecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K(4-(octadecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 20 L17K(4-(nonadecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 L17K(4-(eicosanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
 25 A18K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 D21K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 N24K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 30 Q28K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
 S5K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 35 S7K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 D8K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 E9K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 40 M10K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 N11 K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 45 T12K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 I13K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L14K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 50 D15K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 N16K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 55 L17K(3-(octanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K(3-(nonanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K(3-(decanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 60 L17K(3-(undecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K(3-(dodecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 65 L17K(3-(tridecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
 L17K(3-(tetradecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);

ES 2 335 211 T3

- L17K(3-(pentadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
- L17K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
- 5 L17K(3-(heptadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
- L17K(3-(octadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
- 10 L17K(3-(nonadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
- L17K(3-(eicosanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
- L17K((S)-4-carboxi-4-(octanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
- 15 L17K((S)-4-carboxi-4-(nonanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
- L17K((S)-4-carboxi-4-(decanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
- 20 L17K((S)-4-carboxi-4-(undecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
- L17K((S)-4-carboxi-4-(dodecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
- L17K((S)-4-carboxi-4-(tridecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
- 25 L17K((S)-4-carboxi-4-(tetradecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
- L17K((S)-4-carboxi-4-(pentadecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
- 30 L17K((S)-4-carboxi-4-(hexadecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
- L17K((S)-4-carboxi-4-(heptadecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
- L17K((S)-4-carboxi-4-(octadecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
- 35 L17K((S)-4-carboxi-4-(nonadecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
- L17K((S)-4-carboxi-4-(eicosanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
- L17K(4-(octanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
- 40 L17K(4-(nonanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
- L17K(4-(decanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
- 45 L17K(4-(undecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
- L17K(4-(dodecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
- L17K(4-(tridecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
- 50 L17K(4-(tetradecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
- L17K(4-(pentadecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
- 55 L17K(4-(hexadecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
- L17K(4-(heptadecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
- L17K(4-(octadecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
- 60 L17K(4-(nonadecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
- L17K(4-(eicosanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
- 65 A18K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
- D21 K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);

ES 2 335 211 T3

N24K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);

Q28K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);

5 D3E/S5K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

D3E/S7K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

D3E/D8K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

10 D3E/E9K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

D3E/M10K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

15 D3E/N11 K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

D3E/T12K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

D3E/I13K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

20 D3E/L14K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

D3E/D15K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

25 D3E/N16K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

D3E/L17K(3-(octanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

D3E/L17K(3-(nonanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

30 D3E/L17K(3-(decanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

D3E/L17K(3-(undecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

35 D3E/L17K(3-(dodecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

D3E/L17K(3-(tridecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

D3E/L17K(3-(tetradecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

40 D3E/L17K(3-(pentadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

D3E/L17K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

45 D3E/L17K(3-(heptadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

D3E/L17K(3-(octadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

D3E/L17K(3-(nonadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

50 D3E/L17K(3-(eicosanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(octanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

55 D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(nonanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(decanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(undecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

60 D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(dodecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(tridecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

65 D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(tetradecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(pentadecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

ES 2 335 211 T3

D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(hexadecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(heptadecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

5 D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(octadecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(nonadecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

10 D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(eicosanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

D3E/L17K(4-(octanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

D3E/L17K(4-(nonanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

15 D3E/L17K(4-(decanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

D3E/L17K(4-(undecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

D3E/L17K(4-(dodecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

20 D3E/L17K(4-(tridecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

D3E/L17K(4-(tetradecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

25 D3E/L17K(4-(pentadecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

D3E/L17K(4-(hexadecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

30 D3E/L17K(4-(heptadecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

D3E/L17K(4-(octadecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

D3E/L17K(4-(nonadecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

35 D3E/L17K(4-(eicosanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

D3E/A18K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

40 D3E/D21 K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

D3E/N24K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33); y

D3E/Q28K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33).

45 Métodos para la preparación de GLP-2, análogos de los mismos al igual que derivados de GLP-2 pueden ser encontrados en p. ej. WO 99/43361 y WO 00/55119.

50 En otra forma de realización de la invención el péptido de tipo glucagón es un análogo insulínico de exendina 4(1-39), p. ej. Ser²Asp³-exendina-4(1-39) donde los residuos de aminoácidos en posición 2 y 3 han sido sustituidos con serina y ácido aspártico, respectivamente (este análogo particular también es conocido en la técnica como exendina-3).

55 En otra forma de realización de la invención el péptido de tipo glucagón es un derivado de exendina-4 donde el sustituyente introducido se selecciona de amidas, carbohidratos, grupos alquilo, ésteres y sustituyentes lipofílicos. Un ejemplo de unos derivados insulínicos de exendina-4(1-39) y análogos de los mismos es Tyr³¹-exendina-4(1-31)-amida.

60 En otra forma de realización de la invención el péptido de tipo glucagón es un compuesto de exendina-4 estable. En otra forma de realización de la invención el péptido de tipo glucagón es un compuesto de exendina-4 protegido con DPP-IV. En otra forma de realización de la invención el péptido de tipo glucagón es un compuesto de exendina-4 inmunomodulado.

65 Métodos para la preparación de exendina-4, análogos de los mismos al igual que derivados de exendina-4 pueden ser encontrados en p. ej. WO 99/43708, WO 00/41546 y WO 00/55119.

El péptido parental de tipo glucagón puede ser producido por síntesis de péptidos, p. ej. síntesis de péptidos de fase sólida usando química Fmoc o Boc u otras técnicas bien establecidas. El péptido parental de tipo glucagón puede

también ser producido por un método que comprende el cultivo de una célula huésped que contiene una secuencia de ADN que codifica el polipéptido y capaz de expresar el polipéptido en un medio nutritivo adecuado bajo condiciones que permiten la expresión del péptido, después de lo cual el péptido resultante es recuperado del cultivo.

5 El medio usado para el cultivo de las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para dejar crecer las células huéspedes, tal como medios mínimos o complejos que contienen suplementos apropiados. Medios adecuados son disponibles de proveedores comerciales o pueden ser preparados según recetas publicadas (p. ej. en catálogos de la Colección Americana de Cultivos Tipo). El péptido producido por las células puede luego ser recuperado del medio de cultivo por procedimientos convencionales incluyendo la separación de las células huéspedes del medio por
10 centrifugado o filtración, precipitación de los componentes proteínicos del sobrenadante o filtrado mediante una sal, p. ej. sulfato de amonio, purificación por una variedad de procedimientos cromatográficos, p. ej. cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad, o similar, dependiendo del tipo de péptido en cuestión.

15 La secuencia de ADN que codifica el péptido parental puede de manera adecuada ser de origen genómico o ADNc, por ejemplo obtenido preparando una biblioteca genómica o de ADNc y seleccionando secuencias de ADN que codifican para todo o parte del péptido por hibridación usando sondas de oligonucleótidos sintéticas conforme a técnicas estándar (ver, por ejemplo, Sambrook, J, Fritsch, EF y Maniatis, T, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989). La secuencia de ADN que codifica el péptido puede también ser preparada sintéticamente por métodos estándar establecidos, p. ej. el método de fosfoamidita descrito por Beaucage y Caruthers, *Tetrahedron Letters* 22 (1981), 1859-1869, o el método descrito por Matthes *et al.*, *EMBO Journal* 3 (1984), 801-805. La secuencia de ADN puede también ser preparada por reacción en cadena de polimerasa usando cebadores específicos, por ejemplo como se describe en US 4,683,202 o Saiki *et al.*, *Science* 239 (1988), 487-491.

25 La secuencia de ADN puede ser insertada en cualquier vector que puede convenientemente ser sometido a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector frecuentemente dependerá de la célula huésped en la que debe ser introducido. Así, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, p. ej. un plásmido. De forma alternativa, el vector puede ser uno que, introducido en una célula huésped, es integrado en el genoma de la
30 célula huésped y replicado con el(los) cromosoma(s) en que ha sido integrado.

El vector es preferiblemente un vector de expresión donde la secuencia de ADN que codifica el péptido es operativamente enlazado a segmentos adicionales requeridos para la transcripción del ADN, tal como un promotor. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección y puede ser derivado de genes que codifican proteínas bien homologas o heterólogas a la célula huésped. Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción del ADN que codifica el péptido de la invención en una variedad de células huéspedes son bien conocidos en la técnica, cf. por ejemplo Sambrook *et al.*, *supra*.
35

La secuencia de ADN que codifica el péptido puede también, si fuera necesario, ser operativamente conectada a un
40 terminador adecuado, señales de poliadenilación, secuencias potenciadoras transcripcionales, y secuencias potenciadoras traduccionales. El vector recombinante de la invención puede además comprender una secuencia de ADN que permite que el vector se replique en la célula huésped en cuestión.

El vector puede también comprender un marcador seleccionable, p. ej. un gen cuyo producto complementa un defecto en la célula huésped o uno que confiere resistencia a un medicamento, p. ej. ampicilina, canamicina, tetraciclina, cloranfenicol, neomicina, higromicina o metotrexato.
45

Para dirigir un péptido parental de la presente invención en la vía secretora de las células huéspedes, una secuencia señal secretora (también conocida como una secuencia líder, secuencia prepro o secuencia pre) puede ser proporcionada en el vector recombinante. La secuencia señal secretora se une a la secuencia de ADN que codifica el péptido en el marco de lectura correcto. Secuencias señal secretoras son comúnmente situadas en 5' a la secuencia de ADN que codifica el péptido. La secuencia señal secretora puede ser aquella normalmente asociada con el péptido o puede ser de un gen que codifica otra proteína segregada.
50

Los procedimientos usados para enlazar secuencias de ADN que codifican para el presente péptido, el promotor y opcionalmente el terminador y/o secuencia señal secretora, respectivamente, y para insertarlas en vectores adecuados conteniendo la información necesaria para la replicación, son conocidos por expertos en la técnica (cf., por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra*).
55

La célula huésped en la que se introduce la secuencia de ADN o el vector recombinante puede ser cualquier célula que sea capaz de producir el péptido presente e incluye bacterias, levadura, hongos y células eucarióticas superiores. Ejemplos de células huéspedes adecuadas bien conocidas y usadas en la técnica son, sin limitación, *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, o líneas celulares mamíferas BHK o CHO.
60

Composiciones farmacéuticas que contienen un péptido de tipo glucagón purificado según la presente invención normalmente contienen diferentes excipientes farmacéuticos, tales como conservantes, agentes isotónicos y surfactantes. La preparación de composiciones farmacéuticas es bien conocida por el experto en la materia. Para conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.
65

Composiciones farmacéuticas que contienen un péptido de tipo glucagón purificado según la presente invención pueden ser administradas parenteralmente a pacientes en necesidad de este tratamiento. La administración parenteral puede ser realizada por inyección subcutánea, inyección intramuscular, o inyección intravenosa mediante una jeringa, opcionalmente una jeringa tipo pluma. De forma alternativa la administración puede ser realizada por infusión, p. ej. usando una bomba de infusión.

La presente invención se ilustra con mayor detalle por los ejemplos siguientes que, no obstante, no están destinados para ser interpretados como limitando el alcance de protección. Las características descritas en la descripción precedente y en los ejemplos siguientes pueden, tanto separadamente como en cualquier combinación de los mismos, ser materiales para realizar la invención en formas diversas de la misma.

Ejemplos

Ejemplo 1

Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ fue expresado en levadura (*S. Cerevisiae*) por tecnología recombinante convencional como se describe en otro lugar (WO 98/08871). Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ en el caldo de fermentación fue luego purificado por cromatografía en fase inversa convencional y posteriormente precipitado al pH isoelectrico del péptido, es decir a pH 5.4. El precipitado fue aislado por centrifugado. Después de otra fase de purificación de RP-LC y precipitación isoelectrica, el péptido Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ fue acilado como se describe en WO 00/55119 para dar el derivado de GLP-1 Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎.

Una mezcla de 0,5 g/l de Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎ a pH 8.0 fue preparada. La pureza del polipéptido fue aprox. 90% (aprox. 5% de variante D-His, D-His⁷Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎, donde la histidina en posición 7, es decir el N-terminal del péptido fue racemizado a un residuo de D-histidina, y 5% de otras impurezas). La mezcla es purificada usando cromatografía de intercambio de aniones.

0.005 volumen de columna (CV) de la mezcla fue aplicado a una columna de intercambio de aniones de 1 ml Mono Q (Amersham Biosciences) equilibrada con 10 CV de 20 mM de Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 8.0. La columna fue lavada con 3 CV de solución de equilibrado, y la elución fue realizada con dos gradientes de sal lineales, el primer gradiente de 0-20 mM de NaCl, 20 mM de Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 8.0 sobre 20 CV, seguido del segundo gradiente de 20-50 mM de NaCl, 20 mM de Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 8.0 sobre 10 CV. El flujo fue 40 CV/h y la temperatura 25°C en todo el experimento.

Durante el experimento el eluyente de la columna fue fraccionado y cada una de las fracciones fueron analizadas para el contenido de D-His⁷Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎ y Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎, respectivamente.

Los datos mostraron que la variante D-His del péptido eluyó antes que el Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎, y las dos formas del péptido pudieron ser así separadas.

Ejemplo 2

Una mezcla de 2.0 g/l (γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎ a pH 8 fue preparada como se describe en el ejemplo 1.

0.6 CV de la mezcla fue aplicada a una columna de intercambiado de aniones de 4.7 ml Poros 20HQ (Perseptive Biosystems) equilibrada con 5 CV de 20 mM de Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 8.0. La columna fue lavada con 6 CV de solución de equilibrado, y la elución fue realizada con dos gradientes de sal lineales, el primer gradiente de 0-50 mM de NaCl, 20 mM de Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 8.0 sobre 12 CV, seguido del segundo gradiente de 50-80 mM de NaCl, 20 mM de Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 8.0 sobre 20 CV. El flujo fue 90 CV/h y la temperatura 40°C en todo el experimento.

Durante el experimento el eluyente de la columna fue fraccionado y cada una de las fracciones fueron analizadas para el contenido de D-His⁷Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎ y Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎, respectivamente.

Los datos mostraron que la variante D-His del péptido eluyó antes que el Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎, y las dos formas del péptido pudieron así ser separadas.

Ejemplo 3

Una mezcla de 0.5 g/l de Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎ a pH 8.0 es preparada como se describe en el ejemplo 1.

ES 2 335 211 T3

0.1 CV de la mezcla se aplica a una columna de intercambio de aniones de 1 ml Mono Q (Amersham Biosciences) equilibrada con 10 CV 20 mM de Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 8.0. La columna es lavada con 3 CV de solución de equilibrado, y la elución se realiza con dos gradientes de sal lineales, el primer gradiente de 0-20 mM de NaCl, 20 mM de HEPES, 63% (p/p) etanol, pH 8.0 sobre 20 CV, seguido del segundo gradiente de 20-50 mM de NaCl, 20 mM de HEPES, 63% (p/p) etanol, pH 8.0 sobre 10 CV. El flujo es 20 CV/h y la temperatura 25°C en todo el experimento.

Durante el experimento el eluyente de la columna es fraccionado y cada una de las fracciones se analizan para el contenido de D-His⁷Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎ y Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎, respectivamente.

Los datos muestran que la variante D-His del péptido eluyó antes que el Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎, y las dos formas del péptido pudieron así ser separadas.

Ejemplo 4

Una mezcla de 0,5 g/l de Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-exadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎ a pH 8.0 es preparada como se describe en el ejemplo 1.

0.1 CV de la mezcla se aplica a una columna de intercambio de aniones de 1 ml Mono Q (Amersham Biosciences) equilibrada con 10 CV de 20 mM Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 8.0. La columna se lava con 3 CV solución de equilibrado, y la elución se realiza con dos gradientes sal lineales, el primer gradiente de 0-20 mM de NaCl, 20 mM de Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 8.0 sobre 20 CV, seguido del segundo gradiente de 20-50 mM de NaCl, 20 mM Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 8.0 sobre 10 CV. El flujo es 80 CV/h y la temperatura 25°C en todo el experimento.

Durante el experimento el eluyente de la columna es fraccionado y cada una de las fracciones se analiza para el contenido de D-His⁷Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎ y Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎, respectivamente.

Los datos muestran que la variante D-His del péptido eluyó antes que el Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎, y las dos formas del péptido pudieron así ser separadas.

Ejemplo 5

Una mezcla de 0.5 g/l de Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎, a pH 8.0 es preparada como se describe en el ejemplo 1.

0.1 CV de la mezcla se aplica a una columna de intercambio de aniones de 1 ml Mono Q (Amersham Biosciences) equilibrada con 10 CV de 20 mM de Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 8.0. La columna se lava con 3 CV de solución de equilibrado, y la elución fue realizada con dos gradientes de sal lineales, el primer gradiente de 0-20 mM de acetato sódico, 20 mM de Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 8.0 sobre 20 CV, seguido de un segundo gradiente de 20-50 mM de CH₃COOH, 20 mM de Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 8.0 sobre 10 CV. El flujo es 40 CV/h y la temperatura 25°C en todo el experimento.

Durante el experimento el eluyente de la columna es fraccionado y cada una de las fracciones se analiza para el contenido de D-His⁷Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎ y Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎, respectivamente.

Los datos muestran que la variante D-His del péptido eluyó antes que el Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎, y las dos formas del péptido pudieron así ser separadas.

Ejemplo 6

Una mezcla de 0,5 g/l de Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎ a pH 8.0 fue preparada como se describe en el ejemplo 1.

0.1 CV de la mezcla fue aplicada a una columna de intercambio de aniones de 1 ml Mono Q (Amersham Biosciences) equilibrada con 10 CV de 20 mM de Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 8.0. La columna fue lavada con 3 CV de solución de equilibrado, y la elución fue realizada con dos gradientes de sal lineales, el primer gradiente de 0-10 mM de Na₂SO₄, 20 mM Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 8.0 sobre 20 CV, seguido del segundo gradiente de 10-25 mM de Na₂SO₄, 20 mM de Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 8.0 sobre 10 CV. El flujo fue 40 CV/h y la temperatura 25°C en todo el experimento.

ES 2 335 211 T3

Durante el experimento el eluyente de la columna fue fraccionado y cada una de las fracciones fueron analizadas para el contenido de D-His⁷Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎ y Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎, respectivamente.

- 5 Los datos mostraron que la variante D-His del péptido eluyó antes que el Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎, y las dos formas del péptido pudieron así ser separadas.

Ejemplo 7

- 10 Una mezcla de 2.0 g/l (γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎ a pH 8 fue preparada como se describe en el ejemplo 1. La muestra fue posteriormente adicionada con aproximadamente un tercer D-His⁷Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎.

- 15 0.015 volumen de columna (CV) de la mezcla fue aplicado a una columna de intercambio de aniones de 1 ml Mono Q (Amersham Biosciences) equilibrada con 5 CV de 20 mM de Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 8.0. La elución fue realizada con dos gradientes de sal lineales, el primer gradiente de 0-20 mM de NaCl, 20 mM de Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 8.0 sobre 12 CV, seguido del segundo gradiente de 20-50 mM de NaCl, 20 mM de Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 8.0 sobre 8 CV. El flujo fue 48 CV/h y la temperatura 25°C en todo el experimento. El cromatograma se muestra en la figura 1.

Ejemplo 8

- 25 Una mezcla de 4.5 g/l de (γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎ a pH 8 fue preparada como se describe en el ejemplo 1.

- 30 0.7 CV de la mezcla fue aplicada a una columna de intercambio de aniones de 152 ml Source 30Q (Amersham Biosciences) equilibrada con 6 CV de 20 mM de Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 8.0. La columna fue lavada con 2 CV de solución de equilibrado, y la elución fue realizada con dos gradientes de sal lineales, el primer gradiente de 0-23 mM de NaCl, 20 mM de Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 8.0 sobre 12 CV, seguido del segundo gradiente de 23-30 mM de NaCl, 20 mM de Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 8.0 sobre 20 CV. El flujo fue 20 CV/h y la temperatura 25°C en todo el experimento.

- 35 Durante el experimento el eluyente de la columna fue fraccionado y cada una de las fracciones fueron analizadas para el contenido de D-His⁷Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎ y Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎, respectivamente.

- 40 Los datos mostraron que su variante D-His del péptido eluyó antes que el Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎, y las dos formas del péptido pudieron así ser separadas.

Ejemplo 9

- 45 Una mezcla de 5.0 g/l de (γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎ a pH 8 fue preparada como se describe en el ejemplo 1.

- 50 0.6 CV de la mezcla fue aplicada a una columna de intercambio de aniones de 11.8 ml Source 30Q (Amersham Biosciences) equilibrada con 5 CV de 20 mM de Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 7.5. La columna fue lavada con 1 CV de solución de equilibrado, y la elución fue realizada con dos gradientes de sal lineales, el primer gradiente de 0-20 mM de NaCl, 20 mM de Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 7.5 sobre 12 CV, seguido del segundo gradiente de 20-40 mM de NaCl, 20 mM de Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 7.5 sobre 20 CV. El flujo fue 20 CV/h y la temperatura 25°C en todo el experimento.

- 55 Durante el experimento el eluyente de la columna fue fraccionado y cada una de las fracciones fueron analizadas para el contenido de D-His⁷Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎ y Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎, respectivamente.

- 60 Los datos mostraron que la variante D-His del péptido eluyó antes que el Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎, y las dos formas del péptido pudieron así ser separadas.

Ejemplo 10

- 65 Una mezcla de 5.0 g/l de (γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎, a pH 8 fue preparada como se describe en el ejemplo 1.

ES 2 335 211 T3

0.6 CV de la mezcla fue aplicada a una columna de intercambio de aniones de 11.8 ml Source 30Q (Amersham Biosciences) equilibrada con 5 CV 20 mM de Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 7.0. La columna fue lavada con 1 CV de solución de equilibrado, y la elución fue realizada con dos gradientes de sal lineales, el primer gradiente de 0-15 mM de NaCl, 20 mM Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 7.0 sobre 12 CV, seguido del segundo gradiente de 15-40 mM de NaCl, 20 mM de Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 7.0 sobre 20 CV. El flujo fue 20 CV/h y la temperatura 25°C en todo el experimento.

Durante el experimento el eluyente de la columna fue fraccionado y cada una de las fracciones fueron analizadas para el contenido de D-His⁷Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎ y Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎, respectivamente.

Los datos mostraron que su variante D-His del péptido eluyó antes que el Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎, y las dos formas del péptido pudieron así ser separadas.

Ejemplo 11

Una mezcla de 5.0 g/l de (γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎ a pH 8 fue preparada como se describe en el ejemplo 1.

0.6 CV de la mezcla fue aplicada a una columna de intercambio de aniones de 11.8 ml Source 30Q (Amersham Biosciences) equilibrada con 5 CV de 20 mM de Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 8.5. La columna fue lavada con 1 CV de solución de equilibrado, y la elución fue realizada con dos gradientes de sal lineales, el primer gradiente de 0-20 mM de NaCl, 20 mM Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 8.5 sobre 12 CV, seguido del segundo gradiente de 20-40 mM de NaCl. 20 mM de Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 8.5 sobre 20 CV. El flujo fue 20 CV/h y la temperatura 25°C en todo el experimento.

Durante el experimento el eluyente de la columna fue fraccionado y cada una de las fracciones fueron analizadas para el contenido de D-His⁷Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1_(7,37) y Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1_(3,37), respectivamente. Los datos mostraron que la variante D-His del péptido eluyó antes que el Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎, y las dos formas del péptido pudieron así ser separadas.

Ejemplo 12

L-His¹-Exendina-4 y D-His¹-Exendina-4 fue preparado por síntesis de fase sólida. Una mezcla de los dos fue preparada disolviendo los péptidos en 10 mM de Tris-hidroximetil amino-metano a pH 9.2 a una concentración de 1 g/l.

1 CV de esta mezcla fue cargada a una columna de intercambio de aniones de 1 ml Mono-Q (Amersham Biosciences) equilibrada con 10 CV 10 mM de Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 7.0. La columna fue lavada con 1 CV 10 mM Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 7.0, y la elución fue realizada isocráticamente con 10 mM de Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 7.0 sobre 20 CV. El flujo fue 138 CV/h y la temperatura fue 25°C en todo el experimento.

La elución (figura 3) muestra que la forma L-His de Exendina-4 eluyó antes que la forma D-His de Exendina 4, y las dos formas del péptido podrían así ser separadas.

Ejemplo 13

L17K, K30R-GLP2₍₁₋₃₃₎ fue expresado en levadura (*S. Cerevisiae*) por tecnología convencional recombinante de una manera similar a como se describe en WO 98/08871 para péptidos de GLP-1. L17K, K30R-GLP2₍₁₋₃₃₎ en el caldo de fermentación fue luego purificado por intercambio de aniones convencional y cromatografía en fase inversa y posteriormente precipitado al pH isoelectrico del péptido, es decir a pH 4. El precipitado fue aislado por centrifugado. D-His-L17K, K30R-GLP2₍₁₋₃₃₎ fue preparado por síntesis de fase sólida.

Una mezcla de los dos fue preparada disolviendo los péptidos en 10 mM de Tris-hidroximetil amino-metano a pH 9.2 a una concentración de 1 g/L.

1 CV de esta mezcla fue cargada a una columna de intercambio de aniones de 1 ml Mono-Q (Amersham Biosciences) equilibrada con 5 CV 20 mM de Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 7.0. La columna fue lavada con 1 CV 20 mM de Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, pH 7.0, y la elución fue como un gradiente sobre 20 CV de 0 a 63 mM de NaCl en 20 mM de Tris-hidroximetil amino-metano, 63% (p/p) etanol, a pH 7.0. El flujo fue 138 CV/h y la temperatura fue 25°C en todo el experimento.

La elución mostró que la forma D-His de L17K, K30R-GLP2₍₁₋₃₃₎ eluyó antes que la forma L-his de L17K, K30R-GLP2₍₁₋₃₃₎, y las dos formas del péptido pudieron así ser separadas.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citada por el solicitante ha sido recopilada exclusivamente para la información del lector. No forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 9943361 A [0099]
- WO 0055119 A [0099][0103][0117]
- WO 9943708 A [0103]
- WO 0041546 A [0103]
- US 4683202 A [0106]
- WO 9808871 A [0117][0162]

Bibliografía distinta de patentes citada en la descripción

- Senderoff *et al. J. Pharm. Sci.*, 1998, vol. 87, 183-189 [0004]
- Stueber W. *et al. Int. J. Peptide Protein Res.*, 1983, vol. 22, 277-283 [0006]
- Senderoff *et al. J. Pharm. Sci.*, 1998, vol. 87, 183-186 [0006]
- Creighton T.E. *Proteins. Structures and Molecular Properties* W.H. *Freeman and Company* 1993. 6-[0036]
- Sambrook, J. Fritsch, EF Maniatis, T *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press* 1989. [0106]
- Beaucage Caruthers *Tetrahedron Letters*, 1981, vol. 22, 1859-1869 [0106]
- Matthes *et al. EMBO Journal*, 1984, vol. 3, 801-805 [0106]
- Saiki *et al. Science*, 1988, vol. 239, 487-491 [0106]
- Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* 1995. [0114].

REIVINDICACIONES

1. Método para separar las dos formas de un polipéptido que tiene una única racemización de aminoácido, donde las dos formas de un polipéptido que tiene una única racemización de aminoácido son A(X) y A(X*), donde
X es un L-aminoácido,
A(X) es un polipéptido que comprende el aminoácido X,
X* es el D-isómero de X,
A(X*) es un polipéptido que comprende el aminoácido X* pero por el contrario idéntico a A(X), dicho método **caracterizado** por el hecho de ser un proceso de cromatografía de intercambio de iones comprendiendo la elución mediante el aumento de la concentración de sal a un pH que es no mayor de 1 unidad de pH de una pKa de X bajo las condiciones de elución.
2. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho método es para separar dichos polipéptidos en la escala preparatoria.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la elución se realiza a un pH que es sustancialmente el mismo que el pH usado para la unión.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la unión de los polipéptidos se realiza a un pH que es no mayor de aproximadamente 0.5 unidades de pH de una pKa de X bajo las condiciones de elución.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha elución se realiza a un pH que es superior al punto isoeléctrico de dichos polipéptidos.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho polipéptido tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 10 kDa.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el eluyente comprende un modificador orgánico.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el eluyente comprende un modificador orgánico en una concentración suficiente para mantener dichos polipéptidos solubles.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, donde dicho modificador orgánico es etanol.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, donde dicho modificador orgánico es 2-propanol.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, donde dicho modificador orgánico es acetonitrilo.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, donde dicho modificador orgánico es seleccionado del grupo que consiste en metanol, 1-propanol y hexilenglicol.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7-12, donde la concentración de dicho modificador orgánico es de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 80%, tal como de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 70%, o de aproximadamente el 30% a aproximadamente el 65%.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha sal es seleccionada del grupo que consiste en cloruro sódico, sulfato de sodio, acetato sódico, cloruro potásico, sulfato potásico, y acetato potásico.
15. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde X es el residuo de aminoácido N-terminal o el C-terminal.
16. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde X es L-histidina.
17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, donde X es un análogo de aminoácido de histidina.
18. Método según la reivindicación 17, donde X es seleccionado del grupo que consiste en desamino-histidina, 2-amino-histidina, β -hidroxi-histidina, homohistidina, α -fluorometil-histidina y α -metil-histidina.
19. Método según la reivindicación 17 o 18, donde X es el residuo de aminoácido N-terminal.
20. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, donde X es L-fenilalanina.

ES 2 335 211 T3

21. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho polipéptido es un péptido de tipo glucagón.

22. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho polipéptido es glucagón, un análogo de glucagón, un derivado de glucagón o un derivado de un análogo de glucagón.

23. Método según la reivindicación 21, donde dicho polipéptido es GLP-1, un análogo de GLP-1, un derivado de GLP-1 o un derivado de un análogo de GLP-1.

24. Método según la reivindicación 23, donde dicho análogo de GLP-1 es seleccionado del grupo que consiste en Arg³⁴-GLP-1(7-37), Gly⁸-GLP-1(7-36)-amida, Gly⁸-GLP-1(7-37), Val⁸-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸-GLP-1(7-37), Val⁸Asp⁵²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸Asp²²-GLP-1(7-37), Val⁸Glu²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸Lys²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸Lys²²-GLP-1(7-37), Val⁸Arg²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸Arg²²-GLP-1(7-37), Val⁸His²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸His²²-GLP-1(7-37), Val⁸Trp¹⁹Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸Glu²²Val²⁵-GLP-1(7-37), Val⁸Tyr¹⁶Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸Trp¹⁶Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸Leu¹⁶Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸Tyr¹⁸Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸Glu²²His³⁷-GLP-1(7-37), Val⁸Glu²²Ile³³-GLP-1(7-37), Val⁸Trp¹⁶Glu²²Val²⁵Ile³³-GLP-1(7-37), Val⁸Trp¹⁶Glu²²Ile³³-GLP-1(7-37), Val⁸Glu²²Val²⁵Ile³³-GLP-1(7-37), Val⁸Trp¹⁶Glu²²Val²⁵-GLP-1(7-37), análogos y derivados de cualquiera de estos.

25. Método según la reivindicación 23, donde dicho derivado de GLP-1 o un derivado de un análogo de GLP-1 tiene un residuo de lisina, tal como una lisina, donde un sustituyente lipofílico se fija opcionalmente por medio de un separador al grupo epsilon amino de dicha lisina.

26. Método según la reivindicación 25, donde dicho sustituyente lipofílico tiene de 8 a 40 átomos de carbono, preferiblemente de 8 a 24 átomos de carbono, p. ej. 12 a 18 átomos de carbono.

27. Método según cualquiera de las reivindicaciones 25-26, donde dicho separador está presente y se selecciona de un aminoácido, p. ej. beta-Ala, L-Glu, o aminobutiroilo.

28. Método según cualquiera de las reivindicaciones 21-27, donde dicho péptido de tipo glucagón es un péptido tipo glucagón protegido con DPPIV.

29. Método según cualquiera de las reivindicaciones 21-28, donde dicho péptido de tipo glucagón es un péptido de tipo glucagón estable en plasma.

30. Método según la reivindicación 23, donde dicho derivado de un análogo de GLP-1 es Arg³⁴, Lys²⁶N^ε(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))-GLP-1(7-37).

31. Método según cualquiera de las reivindicaciones 22-30, donde dicho péptido de tipo glucagón tiene de 22 a 40 residuos de aminoácidos, preferible de 26 a 36 residuos de aminoácidos, incluso más preferible de 29 a 33 residuos de aminoácidos.

32. Método según la reivindicación 21, donde dicho péptido de tipo glucagón es GLP-2, un análogo de GLP-2, un derivado de GLP-2 o un derivado de un análogo de GLP-2.

33. Método según la reivindicación 32, donde dicho derivado de GLP-2 o un derivado de un análogo de GLP-2 tiene un residuo de lisina, tal como una lisina, donde un sustituyente lipofílico se fija opcionalmente por medio de un separador al grupo epsilon amino de dicha lisina.

34. Método según la reivindicación 33, donde dicho sustituyente lipofílico tiene de 8 a 40 átomos de carbono, preferiblemente de 8 a 24 átomos de carbono, p. ej. 12 a 18 átomos de carbono.

35. Método según cualquiera de las reivindicaciones 33-34, donde dicho separador está presente y se selecciona de un aminoácido, p. ej. beta-Ala, L-Glu, aminobutiroilo.

36. Método según cualquiera de las reivindicaciones 32-35, donde dicho péptido de tipo glucagón tiene de 27 a 39 residuos de aminoácidos, preferible de 29 a 37 residuos de aminoácidos, incluso más preferible de 31 a 35 residuos de aminoácidos.

37. Método según las reivindicaciones 21 o 32, donde dicho péptido de tipo glucagón es Lys¹⁷Arg³⁰-GLP-2(1-33) o Arg³⁰Lys¹⁷N^ε(β-Ala(N^α-hexadecanoil))GLP-2(1-33).

38. Método según las reivindicaciones 21 o 32, donde dicho péptido de tipo glucagón es Gly²-GLP-2(1-33).

39. Método según la reivindicación 21, donde dicho péptido de tipo glucagón es exendina-4, un análogo de exendina-4, un derivado de exendina-4, o un derivado de un análogo de exendina-4.

ES 2 335 211 T3

40. Método según la reivindicación 39, donde dicho péptido de tipo glucagón es exendina-4.

41. Método según la reivindicación 39, donde dicho péptido de tipo glucagón es ZP10, es decir HEGGTFTSDLSK QMEEEA VRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKK-NH₂.

42. Método según la reivindicación 39, donde dicho derivado de exendina-4 o derivado de un análogo de exendina-4 es un péptido adiado o un péptido pegilado.

43. Método según la reivindicación 39, donde dicho derivado de exendina-4 o derivado de un análogo de exendina-4 tiene un residuo de lisina, tal como una lisina, donde un sustituyente lipofílico opcionalmente por medio de un separador se fija al grupo epsilon amino de dicha lisina.

44. Método según la reivindicación 43, donde dicho sustituyente lipofílico tiene de 8 a 40 átomos de carbono, preferiblemente de 8 a 24 átomos de carbono, p. ej. 12 a 18 átomos de carbono.

45. Método según cualquiera de las reivindicaciones 43-44, donde dicho separador está presente y se selecciona de un aminoácido, p. ej. beta-Ala, L-Glu, o aminobutiroilo.

46. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-20, donde dicho polipéptido es un péptido de insulina.

47. Método según la reivindicación 46, donde dicho péptido de insulina es insulina humana, un análogo de insulina humana, un derivado de insulina humana o un derivado de un análogo de insulina humana.

48. Método según la reivindicación 47, donde dicho péptido de insulina es insulina humana.

49. Método según la reivindicación 47, donde dicho análogo de insulina humana es seleccionado del grupo que consiste en Asp^{B28}-insulina humana, Lys^{B28}Pro^{B29}-insulina humana, Lys^{B3}Glu^{B29}-insulina humana, Gly^{A21}Arg^{B31}Arg^{B32}-insulina humana, y des(B30) insulina humana.

50. Método según la reivindicación 47, donde dicho derivado de insulina humana o dicho derivado de un análogo de insulina humana tiene un residuo de lisina, tal como una lisina, donde un sustituyente lipofílico opcionalmente por medio de un separador se fija al grupo epsilon amino de dicha lisina.

51. Método según la reivindicación 50, donde dicho sustituyente lipofílico tiene de 8 a 40 átomos de carbono, preferiblemente de 8 a 24, por ejemplo 12-18.

52. Método según cualquiera de las reivindicaciones 50-51, donde dicho separador está presente y se selecciona de un aminoácido, por ejemplo. beta-Ala, L-Glu, aminobutiroilo.

53. Método según cualquiera de las reivindicaciones 50-52, donde dicho derivado de un análogo de insulina humana es N^{εB29}-Tetradecanoil des(B30) insulina humana o N^{εB29}-litocoloil-γ-glutamyl des(B30) insulina humana.

54. Método según cualquiera de las reivindicaciones 46-53, donde X es L-fenilalanina en la posición 1 en la B-cadena del péptido de insulina.

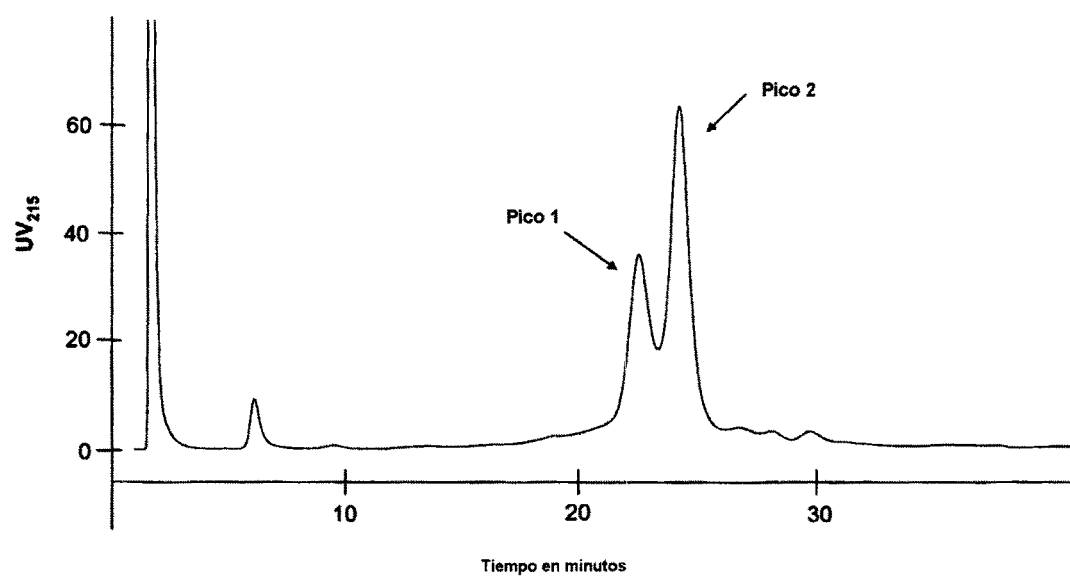


Figura 1

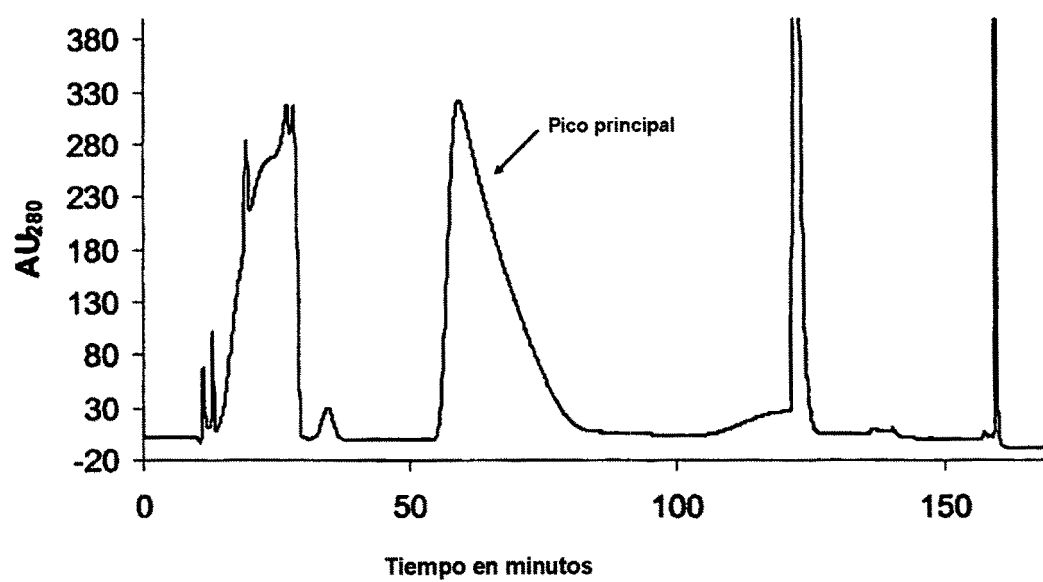


Figura 2

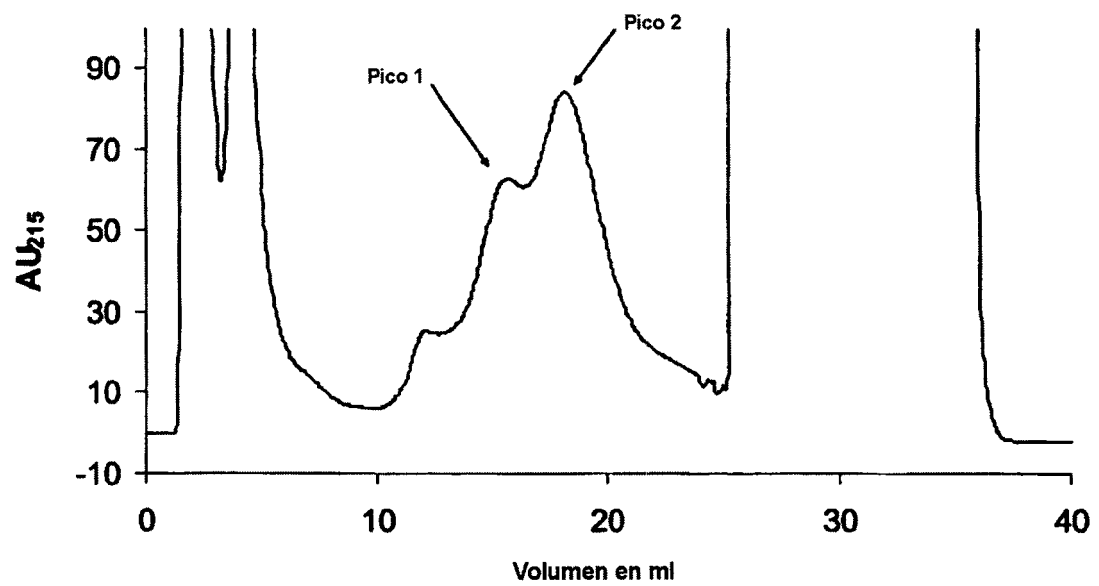


Figura 3

ES 2 335 211 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Novo Nordisk A/S

5 <120> Separación de polipéptidos que comprenden un aminoácido racemizado

<130> 6669.000-DK

10 <160> 8

<170> Versión de patentIn 3.1

15 <210> 1
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 1

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

	Arg	Arg	Ala	Gln	Asp	Phe	Val	Gln	Trp	Leu	Met	Asn	Thr			
				20					25							

30 <210> 2
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 2

40	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		

45 <210> 3
 <211> 33
 <212> PRT

50 <213> *homo sapiens*

<400> 3

55	His	Ala	Asp	Gly	Ser	Phe	Ser	Asp	Glu	Met	Asn	Thr	Ile	Leu	Asp	Asn
	1				5					10					15	

60	Leu	Ala	Ala	Arg	Asp	Phe	Ile	Asn	Trp	Leu	Ile	Gln	Thr	Lys	Ile	Thr
				20					25					30		

65	Asp															
----	-----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

<210> 4

ES 2 335 211 T3

<211> 39
 <212> PRT
 <213> Monstruo de Gila

5

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)

10

<223> Serina en la posición 39 es amidada

<400> 4

15

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

20

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

25

<210> 5
 <211> 39
 <212> PRT

30

<213> Monstruo de Gila
 <220>
 <221> MOD_RES

35

<222> (39)..(39)
 <223> Serina en la posición 39 es amidada

<400> 5

40

His Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

45

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

50

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 6

55

<211> 37
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

60

65

ES 2 335 211 T3

<400> 6

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

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr Lys Arg Asn
 20 25 30

Lys Asn Asn Ile Ala
 35

<210> 7

<211> 44

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (44)..(44)

<223> Lisina en la posición 44 es amidada

<400> 7

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

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

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys
 35 40

<210> 8

<211> 33

<212> PRT

<213> Constructo sintético

<400> 8

His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
 1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
 20 25 30

Asp