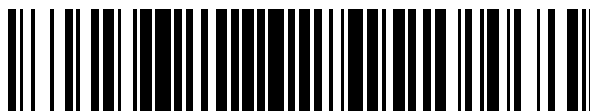


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 270**

51 Int. Cl.:
C07K 14/605 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04722142 .9**
96 Fecha de presentación: **19.03.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1605897**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.12.2005**

54 Título: **Compuestos de GLP-1 unidos a polietilenglicol**

30 Prioridad:
19.03.2003 US 456081 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.11.2012

73 Titular/es:
ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
LILLY CORPORATE CENTER
INDIANAPOLIS, IN 46285, US

72 Inventor/es:
DIMARCHI, RICHARD DENNIS;
GLAESNER, WOLFGANG;
MILLICAN, ROHN LEE, JUNIOR;
VICK, ANDREW MARK y
ZHANG, LIANSHAN

74 Agente/Representante:
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).

ES 2 390 270 T3

DESCRIPCIÓN

Compuestos de GLP-1 unidos a polietilenglicol.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a compuestos de GLP-1 unidos covalentemente a una o más moléculas de polietilenglicol o a un derivado del mismo y a composiciones relacionadas útiles en el tratamiento de afecciones o trastornos que se benefician de la disminución de la glucosa en sangre, la disminución de la ingesta de alimentos, la disminución del vaciado gástrico o intestinal o la disminución de la motilidad gástrica o intestinal.

Antecedentes de la invención

El péptido-1 similar al glucagón (GLP-1) induce numerosos efectos biológicos tales como estimulación de la secreción de insulina, inhibición de la secreción de glucagón, inhibición del vaciado gástrico, inhibición de la motilidad gástrica o la motilidad intestinal, potenciación de la utilización de glucosa e inducción de la pérdida de peso. Además, el GLP-1 puede actuar para prevenir el deterioro de las células β pancreáticas que se produce a medida que progresa la diabetes mellitus no dependiente de insulina (NIDDM). Una característica significativa de GLP-1 es su capacidad de estimular la secreción de insulina sin el riesgo asociado de hipoglucemia que se observa cuando se usa terapia con insulina o algunos tipos de terapias orales que actúan aumentando la expresión de insulina.

La utilidad de la terapia que implica péptidos de GLP-1 está limitada por el hecho de que el GLP-1 (1-37) es poco activo y los dos péptidos truncados naturales, GLP-1 (7-37)OH y GLP-1(736) NH₂, se aclaran rápidamente in vivo y tienen semividas extremadamente cortas in vivo. Se sabe que la dipeptidil-peptidasa IV (DPP-IV) producida de forma endógena inactiva los péptidos GLP-1 circulantes eliminando los residuos de histidina y de alanina en el extremo N y es una causa principal de la corta semivida in vivo.

Se han llevado a cabo varios enfoques para ampliar la semivida de eliminación de un péptido GLP-1 o reducir el aclaramiento del péptido del cuerpo al tiempo que se mantiene una actividad biológica. La patente de EE.UU. n° 5,705,483 enseña análogos del péptido de GLP-1 resistentes a la degradación por la DPP-IV mediante la incorporación de modificaciones en el extremo N del péptido. Un enfoque alternativo para extender la semivida de los péptidos de GLP-2 es la derivación, en la que los grupos acilo grandes que previenen el acceso de la DPP-IV al extremo N del péptido están unidos a varios aminoácidos de GLP-1 (véase la solicitud de patente internacional n° PCT/DK97/00340, presentada el 22 de agosto de 1997 titulada "Derivados de GLP-1 Publicada como documento WO98/08871, que reivindica beneficio de las solicitudes DK provisionales n° 0931/96 presentada el 30 de agosto de 1996, 1259/96 presentada el 8 de noviembre de 1996 y 1470/96 presentada el 20 de diciembre de 1996).

Análogos concretos de GLP-1 se describen en la solicitud de patente de EE.UU. N° de serie 60/346474 presentada el 8 de enero de 2002, y 60/405,097 presentada el 21 de agosto de 2002, ahora solicitud internacional n° PCT/US03/00001, presentada el 3 de enero de 2003, publicada como documento WO03/058203, todas tituladas "Análogos extendidos del péptido 1 similar al glucagón". Estas solicitudes describen análogos de GLP-1 (7-37)OH en los que varios aminoácidos, cuando se añaden al extremo C, dan análogos del péptido GLP-1 con una semivida extendida y menor aclaramiento que los de la molécula nativa. Además, en la solicitud de patente de EE.UU. n° de serie 60/314,573 presentada el 23 de agosto de 2001, ahora solicitud internacional n° PCT/US02/21325, presentada el 14 de agosto de 2002, publicada como documento WO03/018516, titulada "Análogos del péptido 1 similar al glucagón" describe análogos del péptido GLP-1 con potencia aumentada. La exendina-4 puede actuar en el receptor del GLP-1 in Vitro sobre ciertos tipos de células, incluidas las células secretoras de insulina. [Goke, y col., J. Biol. Chem., (1993) 268:19650-19655]. Moléculas de exendina PEGilada y agonistas de exendina concretas se describen en la solicitud internacional número PCT/US00/11814, publicada como WO00/66629.

Si bien varios enfoques han dado como resultado compuestos de GLP-1 con una semivida más larga o mayor potencia que la del GLP-1 nativo, se necesitan enfoques adicionales que puedan usarse solos o en combinación con enfoques conocidos para disminuir más el aclaramiento del compuesto de GLP-1 y aumentar la semivida del compuesto de GLP-1, optimizando así su capacidad para ser útil como agente terapéutico que se puede administrar un número mínimo de veces durante un período de tiempo prolongado. La unión covalente de una o más moléculas de polietilenglicol a un péptido pequeño biológicamente activo tal como GLP-1 o la exendina-4 plantea el riesgo de introducir características adversas tales como inestabilidad en la molécula y reducción de la bioactividad tan alta como para hacer que la molécula sea inadecuada para usar como agente terapéutico. No obstante, la presente invención se basa en el hallazgo de que la unión covalente de una o más moléculas de PEG a residuos concretos de un compuesto de GLP-1 tiene como resultado un compuesto de GLP-1 PEGilado biológicamente activo con una semivida extendida y menor aclaramiento en comparación con los del GLP-1 nativo o Val⁸-GLP-1 (o exendina-4 nativa para los péptidos de exendina-4 modificados de la invención).

Los compuestos de GLP-1 PEGilados de la invención tienen mayor utilidad como agente terapéutico, así como mayor comodidad de uso que el GLP-1 nativo porque conservan toda o una porción de la actividad biológica del GLP-1 nativo, aunque tienen una mayor semivida y/o menor aclaramiento en comparación con los del compuesto de GLP-1 nativo o los del Val⁸-GLP-1 (7-37)OH. El GLP-1 (7-37) tiene una semivida en suero de solo 3 a 5 minutos. El

GLP-1 (7-36) amida tiene un tiempo de acción de aproximadamente 50 minutos cuando se administra por vía subcutánea. Incluso los análogos y derivados del GLP-1 que son resistentes a la escisión con proteasa endógena no tienen semividas lo bastante largas para evitar repetidas administraciones durante un periodo de 24 horas. Los compuestos de GLP-1 PEGilados de la invención pueden tener una semivida superior a 24 horas, lo que permite menos administraciones del compuesto de GLP-1 PEGilado al tiempo que mantienen un nivel alto en sangre del compuesto durante un periodo de tiempo prolongado. Dichos compuestos de GLP-1 PEGilados se pueden usar terapéuticamente para tratar a sujetos con trastornos, incluidos, entre otros, diabetes, obesidad, anomalías gástricas y/o de la motilidad intestinal y anomalías del vaciado gástrico y/o intestinal, siendo una ventaja concreta que los compuestos de GLP-1 PEGilados de la invención requieren menos dosis durante un periodo de 24 horas, lo que aumenta la comodidad en un sujeto que necesite dicha terapia y la probabilidad de que el sujeto cumpla los requisitos de dosificación.

Sumario de la invención

La invención descrita en el presente documento proporciona compuestos de GLP-1 unidos covalentemente a una o más moléculas de polietilenglicol (PEG) o un derivado del mismo en el que cada PEG está unido a un aminoácido de Cys, lo que tiene como resultado compuestos de GLP-1 PEGilados con una semivida de eliminación de como mínimo una hora, preferentemente de como mínimo 3, 5, 7, 10, 15, 20 horas y, más preferentemente, de como mínimo 24 horas. Los compuestos de GLP-1 PEGilados de la presente invención tienen, preferentemente, un valor de aclaramiento de 200 ml/h/kg o menos, o, más preferentemente, 180, 150, 120, 100, 80, 60 ml/h/kg o menos, y, más preferentemente, menos de 50, 40 o 20 ml/h/kg.

De acuerdo con la presente invención se proporciona un compuesto de GLP-1 PEGilado que comprende la secuencia de aminoácidos de Fórmula IV (SEC ID N° 6)

Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Xaa₁₁-Xaa₁₂-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Xaa₁₉-Xaa₂₀-Glu-
Xaa₂₂-Xaa₂₃-Xaa₂₄-Xaa₂₅-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-
Xaa₃₆-Xaa₃₇-Xaa₃₈-Xaa₃₉-Xaa₄₀-Xaa₄₁-Xaa₄₂-Xaa₄₃-Xaa₄₄-Xaa₄₅-Xaa₄₆-Xaa₄₇

Formula IV (SEQ ID NO: 6)

en la que:

Xaa₇ es: L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, α-fluorometil-histidina o α-metil-histidina;

Xaa₈ es: Val;

Xaa₁₁ es: Thr;

Xaa₁₂ es: Phe, Trp o Tyr;

Xaa₁₆ es: Val, Trp, Ile, Leu, Phe, Tyr o Cys;

Xaa₁₈ es: Ser, Trp, Tyr, Phe, Lys, Ile, Leu, Val;

Xaa₁₉ es: Tyr, Trp o Phe;

Xaa₂₀ es: Leu, Phe, Tyr o Trp;

Xaa₂₂ es: Gly, Glu, Asp o Lys;

Xaa₂₃ es: Gln;

Xaa₂₄ es: Ala;

Xaa₂₅ es: Ala, Val, Ile o Leu;

Xaa₂₆ es: Lys;

Xaa₂₇ es: Glu, Ile o Ala;

Xaa₃₀ es: Ala o Glu;

Xaa₃₃ es: Val o Ile;

Xaa₃₄ es: Lys, Asp, Arg o Glu;

Xaa₃₅ es: Gly;

Xaa₃₆ es: Gly, Pro o Arg;

Xaa₃₇ es: Gly, Pro o Ser;

Xaa₃₈ es: Ser, Pro, His o Cys;

Xaa₃₉ es: Ser, Arg, Thr, Trp o Lys;

5 Xaa₄₀ es: Ser o Gly;

Xaa₄₁ es: Ala, Asp, Arg, Glu, Lys o Gly;

Xaa₄₂ es: Pro, Ala, NH₂ o está ausente;

Xaa₄₃ es: Pro, Ala, NH₂ o está ausente;

Xaa₄₄ es: Pro, Ala, Arg, Lys, His, NH₂ o está ausente;

10 Xaa₄₅ es: Ser, His, Pro, Lys, Arg, Cys, NH₂ o está ausente;

Xaa₄₆ es: His, Ser, Arg, Lys, Cys, NH₂ o está ausente; y

Xaa₄₇ es: His, Ser, Arg, Lys, NH₂ o está ausente;

y en la que:

15 2 o 1 residuos de Cys están unidos covalentemente a una molécula de PEG; y siempre que si , Xaa₄₃, Xaa₄₄, Xaa₄₅ o Xaa₄₆ está ausente, cada aminoácido cadena abajo está ausente; y a condición de que haya 2 o 1 Cys en la molécula.

Preferentemente, el compuesto de GLP-1 PEGilado de acuerdo con la presente invención no difiere de GLP-1 (7-37)OH en más de 3 aminoácidos dentro de los aminoácidos 7-37.

20 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un compuesto de GLP-1 PEGilado de acuerdo con la presente invención para usar como medicamento.

Preferentemente, el compuesto de GLP-1 PEGilado es para usar en el tratamiento de la diabetes no dependiente de insulina, la obesidad, ictus, infarto de miocardio, síndrome del intestino irritable o dispepsia funcional y, más preferentemente, para usar en el tratamiento de la diabetes no dependiente de insulina u obesidad.

25 Preferentemente, los polímeros de polietilenglicol ("PEG") usados en la invención tienen pesos moleculares entre 500 y 100.000 daltons, más preferentemente entre 20.000 y 60.000 daltons, más preferentemente entre 20.000 y 40.000 daltons, pueden ser moléculas lineales o ramificadas, y pueden ser derivados de polietilenglicol como se ha descrito en la técnica

30 La presente invención divulga un procedimiento de estimulación del receptor de GLP-1 en un sujeto que necesite dicha estimulación, en el que dicho procedimiento comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de GLP-1 PEGilado descrito en el presente documento. Los sujetos que necesitan dicha estimulación del receptor de GLP-1 incluyen aquéllos con diabetes no dependiente de insulina, hiperglucemia inducida por estrés, obesidad, trastornos de la motilidad gástrica y/o intestinal o del vaciado, incluidos, por ejemplo, síndrome del intestino irritable y dispepsia funcional.

Descripción detallada de la invención

35 El péptido 1 de tipo glucagón (GLP-1) es un péptido de 37 aminoácidos secretado por las células L del intestino en respuesta a la ingestión de alimento. En la técnica se han descrito numerosos análogos y derivados de GLP-1. La presente invención describe modificaciones de los compuestos de GLP-1 que dan como resultado una semivida de eliminación extendida y/o menor aclaramiento. La incorporación de 1 o 2 restos de cisteína en sitios particulares de aminoácidos del péptido proporciona un grupo tiol al que se puede unir covalentemente un polietilenglicol (PEG) o
40 un derivado de PEG, lo que tiene como resultado un compuesto de GLP-1 PEGilado con una semivida de eliminación extendida y/o menor aclaramiento. El GLP-1 (7-37)OH tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 1:

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28
Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Gly-Phe-

29 30 31 32 33 34 35 36 37
Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly (SEQ ID NO:1)

Con el término “polipéptido” o “péptido” como se usa en el presente documento se pretende indicar cualquier forma estructural (p. ej., forma primaria, secundaria o terciaria) de una secuencia de aminoácidos que comprende más de 5 restos de aminoácidos, que puede o no estar modificados adicionalmente (p. ej., acetilados, carboxilados, fosforilados, lipidados o acilados). El término “nativo” se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a una que se encuentra en la naturaleza. Con el término “nativo” se pretende abarcar las variantes alélicas del polipéptido en cuestión.

El término “aminoácido” se usa en la presente memoria descriptiva en su sentido más amplio e incluye aminoácidos naturales así como aminoácidos no naturales, incluidos variantes y derivados de aminoácidos. Un experto en la técnica reconocerá, en vista de esta amplia definición, que la referencia a un aminoácido en la presente memoria descriptiva incluye, por ejemplo, aminoácidos L proteogénicos naturales; aminoácidos D; aminoácidos químicamente modificados tales como variantes y derivados de aminoácidos; aminoácidos no proteogénicos naturales tales como norleucina, β -alanina, ornitina etc.; y compuestos sintetizados químicamente que tienen propiedades conocidas en la técnica como característicos de los aminoácidos. Ejemplos de aminoácidos no naturales incluyen α -metil aminoácidos (p. ej., (α -metil alanina), D-aminoácidos, aminoácidos similares a la histidina (p. ej., 2-amino-histidina, β -hidroxi-histidina, homohistidina, α -fluorometil-histidina y α -metil-histidina), aminoácidos que tienen un metileno adicional en la cadena lateral (aminoácidos “homo”) y aminoácidos en los que un grupo funcional de ácido carboxílico en la cadena lateral se sustituye con un grupo de ácido sulfónico (p. ej. ácido cisteico). Preferentemente, no obstante, los compuestos de GLP-1 de la presente invención sólo comprenden aminoácidos naturales, excepto si en la presente memoria descriptiva se proporcione específicamente lo contrario.

La expresión “compuesto de GLP-1”, como se usa en el presente documento, incluye GLP-1 nativo, [GLP-1 (7-37)OH o GLP-1 (7-36)NH₂], análogos de GLP-1, derivados de GLP-1, fragmentos biológicamente activos de GLP-1, GLP-1 extendido o un análogo o fragmento de un péptido de GLP-1 extendido (véase, por ejemplo, el documento WO03/058203), análogos de exendina-4 y derivados de exendina-4, que comprenden uno o dos restos Cys en posiciones concretas del péptido, como se ha descrito en el presente documento.

Como se realiza habitualmente en la técnica, al extremo amino del GLP-1 (7-37)OH nativo se le ha asignado un número de residuo 7 y al extremo carboxi, el número 37. Los otros aminoácidos en el polipéptido están numerados de forma consecutiva, como se muestra en la SEC ID N° 1. Por ejemplo, la posición 12 es fenilalanina y la posición 22 es glicina en la molécula nativa.

Un “fragmento de GLP-1” o “fragmento de un compuesto de GLP-1”, como se usa en el presente documento, es un polipéptido biológicamente activo obtenido tras el truncamiento de uno o más aminoácidos del extremo N y/o el extremo C de un compuesto de GLP-1. La nomenclatura usada para describir GLP-1 (7-37)OH se aplica a los fragmentos de GLP-1. Por ejemplo, GLP-1 (9-36)OH indica un fragmento de GLP-1 obtenido truncando dos aminoácidos del extremo N y un aminoácido del extremo C. Los aminoácidos en el fragmento se indican con el mismo número que el correspondiente aminoácido en GLP-1 (7-37)OH. Por ejemplo, el ácido glutámico N-terminal de 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.

Los compuestos de GLP-1 incluyen análogos de GLP-1 y análogos de exendina-4. Para que quede claro, “análogos de exendina-4”, como se incluye en los “compuestos de GLP-1” siempre tienen uno o dos restos de Cys. Preferentemente, un análogo de GLP-1 tiene la secuencia de aminoácidos de GLP-1 (7-37)OH o un péptido de GLP-1 extendido como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. n° 60/346474 presentada el 1 de agosto de 2002, o 60/405,097 presentada el 21 de agosto de 2002 publicada como documento WO03/058203, ambas tituladas “Análogos extendidos del péptido 1 similar a glucagón” o un fragmento del mismo, modificado de forma que 1, 2, 3, 4, 5 o 6 aminoácidos difieren del aminoácido en la correspondiente posición de GLP-1 (7-37)OH o un fragmento de GLP-1 (7-37)OH o modificado de forma que 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 aminoácidos difieren del aminoácido en la correspondiente posición de un péptido de GLP-1 extendido.

El término “PEGilado”, cuando se refiere a un compuesto de GLP-1 de la presente invención, se refiere a un compuesto de GLP-1 que está químicamente modificado mediante unión covalente de una o más moléculas de polietilenglicol o un derivado del mismo. Además, se pretende que el término “PEG” se refiera a polietilenglicol o a un derivado del mismo como los conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, las patentes U.S. n° 5.445.090; 5.900.461; 5.932.462; 6.436.386; 6.448.369; 6.437.025; 6.448.369; 6.495.659; 6.515.100 y 6.514.491). En los

compuestos de GLP-1 PEGilados de la presente invención, el PEG (o un derivado del mismo) está covalentemente unido a uno o más restos de cisteína del compuesto de GLP-1. Opcionalmente, las moléculas de PEG pueden estar unidas al compuesto de GLP-1 a través de una molécula ligadora o espaciadora (véanse las moléculas espaciadoras de ejemplo descritas en la patente de EE.UU. 6,268,343).

En la nomenclatura usada en el presente documento para designar compuestos de GLP-1, el aminoácido sustituyente y su posición se indican seguidas del nombre del péptido parental. Por ejemplo, Glu₂₂-GLP-1 (7-37)OH designa un compuesto de GLP-1 en el que la glicina normalmente encontrada en la posición 22 de GLP-1 (7-37)OH se ha sustituido con ácido glutámico; Val₈Glu₂₂-GLP-1 (7-37)OH (o V₈E₂₂-GLP-1 (7-37)OH) designa un compuesto de GLP-1 en el que la alanina normalmente encontrada en la posición 8 y la glicina normalmente encontrada en la posición 22 de GLP-1 (7-37)OH se han sustituido con valina y ácido glutámico, respectivamente. Val₈-exendina 4 designa un compuesto de GLP-1 en el que la serina normalmente encontrada en la posición 8 de la exendina 4 se ha sustituido con una valina. Preferentemente, los compuestos de GLP-1 de la invención tienen actividad insulínica.

“Actividad insulínica” se refiere a la capacidad para estimular la secreción de insulina en respuesta a niveles de glucosa elevados, lo que causa la captación de glucosa por las células y la disminución de los niveles de glucosa en plasma. La actividad insulínica se puede evaluar mediante procedimientos conocidos en la técnica, incluidos el uso de ensayos *in vivo* e *in vitro* que miden la actividad de unión del receptor de GLP-1 o la activación del receptor, por ejemplo, ensayos en los que se usan células de los islotes pancreáticos o células de insulinomas, como se describe en la patente EP 619.322, expedida a Gelfand y col., y la patente de EE.UU. nº 5.120.712, respectivamente. Rutinariamente la actividad insulínica en seres humanos se mide midiendo los niveles de insulina o los niveles de péptido C.

Para los fines de la presente invención se usa un ensayo de señalización de receptor de GLP-1 *in vitro* para determinar si un compuesto GLP-1 PEGilado de la presente invención presentará actividad insulínica *in vivo*. La actividad insulínica es una actividad que se puede usar para demostrar que el compuesto de GLP-1 PEGilado es biológicamente activo.

“Potencia *in vitro*”, tal como se usa en el presente documento, es la medida de la capacidad de un péptido para activar el receptor de GLP-1 en un ensayo basado en células. La potencia *in vitro* se expresa como la “CE₅₀”, que es la concentración eficaz de compuesto que tiene como resultado el 50% de la actividad en un experimento de respuesta a una única dosis. Para los fines de la presente invención, la potencia *in vitro* se determina usando un ensayo de fluorescencia que emplea células HEK-293 que expresan de forma estable el receptor de GLP-1 humano. Estas células HEK-293 tienen un vector de ADN integrado de forma estable que tiene un elemento de respuesta de AMPc (CRE) que guía la expresión del gen de la β -lactamasa (BLAM). La interacción de un compuesto de GLP-1 (o un agonista) con el receptor inicia una señal que da como resultado la activación del elemento de respuesta de AMPc y la posterior expresión de la β -lactamasa. El sustrato CCF2/AM de β -lactamasa que emite fluorescencia cuando es escindido por la β -lactamasa (PanVera LLC) se puede añadir después a las células que se han expuesto a una cantidad específica de agonista de GLP-1 para proporcionar una medida de la potencia del agonista del GLP-1. El ensayo se describe adicionalmente en Zlokarnik y col. (1998) Science 279:84-88. Los valores de CE₅₀ para los compuestos indicados en el Ejemplo 4 se determinaron usando el ensayo BLAM descrito en lo que antecede. Los valores relativos de la potencia *in vitro* se pueden establecer empleando Val₈-GLP-1(7-37)OH o GLP-1 nativo como control y asignando al control un valor de referencia de 100%.

El término “semivida en plasma” se refiere al tiempo en el cual la mitad de las moléculas relevantes circulan en plasma antes de su aclaramiento. Un término que se usa como alternativa es “semivida de eliminación”. Los términos “extendida” o “más prolongada” usados en el contexto de semivida en plasma o semivida de eliminación indican que existe un incremento estadísticamente significativo de la semivida de un compuesto de GLP-1 PEGilado respecto a la de la molécula de referencia (p. ej., la forma no PEGilada del péptido o del péptido nativo), como se determina en condiciones comparables. Preferentemente, un compuesto de GLP-1 PEGilado de la presente invención tiene una semivida de eliminación de como mínimo una hora, más preferentemente de como mínimo 3, 5, 7, 10, 15, 20 horas y, más preferentemente de como mínimo 24 horas. La semivida comunicada en el presente documento en el Ejemplo 5 es la semivida de eliminación; es lo que corresponde a la velocidad de eliminación terminal en regresión log-lineal. Los expertos en la técnica apreciarán que la semivida es un parámetro derivado que cambia como función del aclaramiento y del volumen de distribución.

El aclaramiento es la medida de la capacidad del cuerpo para eliminar un fármaco. A medida que el aclaramiento disminuye debido a, por ejemplo, modificaciones en un fármaco, cabría esperar que la semivida aumentara. No obstante, esta relación recíproca sólo es exacta cuando no hay cambios en el volumen de distribución. Una relación aproximada útil entre la semivida terminal log-lineal ($t_{1/2}$), el aclaramiento (C) y el volumen de distribución (V) viene dada por la ecuación: $t_{1/2} \approx 0.693 (V/C)$. El aclaramiento no indica cuánto fármaco se está eliminando sino el volumen de fluido biológico, como sangre o plasma, que tendría que estar completamente libre de fármaco para representar la eliminación. El aclaramiento se expresa en forma de volumen por unidad de tiempo. Los compuestos de GLP-1 PEGilados de la presente invención tienen, preferentemente, un valor de aclaramiento de 200 ml/h/kg o menos, o, más preferentemente, 180, 150, 120, 100, 80, 60 ml/h/kg o menos, y, más preferentemente, 50, 40 o 20 ml/h/kg o menos (véase el Ejemplo 5).

Una vez que se ha preparado y purificado un péptido para su uso en la invención, se modifica uniendo covalentemente al menos una molécula de PEG a los restos de Cys. Es difícil dotar a moléculas peptídicas o proteicas delicadas de nuevas propiedades adecuadas uniendo polímeros sin producir pérdida de su funcionalidad. En la técnica se han descrito una amplia variedad de procedimientos para conjugar covalentemente PEG y no se pretende que el procedimiento específico usado para la presente invención sea limitante (para un artículo de revisión, véase Roberts, M, y col. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54:459-476, 2002). La PEGilación de proteínas puede superar muchos de los problemas farmacológicos y toxicológicos/inmunológicos asociados con el uso de péptidos y proteínas como agentes terapéuticos. No obstante, para cualquier péptido individual no está claro si la forma PEGilada del péptido tendrá una pérdida significativa de la bioactividad en comparación con la forma no PEGilada del péptido.

La bioactividad de las proteínas PEGiladas puede efectuarse mediante factores tales como: i) el tamaño de la molécula de PEG; ii) los sitios de unión concretos; iii) el grado de modificación; iv) las condiciones de acoplamiento adversas; v) si se usa un ligador para la unión o si el polímero se une directamente; vi) generación de coproductos dañinos; vii) daños producidos por el polímero activado; o viii) retención de la carga. Según la reacción de acoplamiento usada, en concreto, la modificación polimérica de las citocinas ha tenido como resultado reducciones espectaculares de la bioactividad. [Francis, G.E., y col., (1998) *PEGylation of cytokines and other therapeutic proteins and peptides: the importance of biological optimization of coupling techniques*, *Intl. J. Hem.* 68:1-18].

Los compuestos de GLP-1 PEGilados de la presente invención tienen una actividad biológica *in vitro* que es al menos un 0,5 % de la del GLP-1 nativo o, más preferentemente, de la de Val⁸-GLP-1 (7-37)OH. Más preferentemente, el compuesto de GLP-1 PEGilado de la presente invención tiene una actividad biológica *in vitro* que es al menos un 1% o un 3 % de la del GLP-1 nativo o, más preferentemente, de la de Val⁸-GLP-1 (7-37)OH. Dicha actividad biológica se puede determinar mediante el ensayo de potencia *in vitro* como se describe en el presente documento (Ejemplo 4) o mediante otros ensayos de GLP-1 conocidos en la técnica. Aunque algunos compuestos de GLP-1 PEGilados de la invención pueden tener actividad biológica menor que la del GLP-1 nativo o de Val⁸-GLP-1 (7-37)OH medido en un ensayo concreto; esta disminución de la actividad se compensa por la semivida extendida del compuesto y/o menor valor de aclaramiento, e incluso puede ser una característica favorable para un compuesto de GLP-1 con una semivida de eliminación extendida.

También se contempla que las posiciones del péptido de GLP-1 que se ha encontrado que alojan un resto de cisteína sin eliminar actividad biológica pueden sustituirse con una cisteína en la posición análoga de la exendina-4 y tiene como resultado un análogo de la exendina 4 todavía capaz de unirse al receptor de GLP-1. No hay más de 2 o 1 aminoácido Cys por análogo de exendina 4 de la invención.

En su forma típica, el PEG es un polímero lineal con grupos hidroxilo terminales y tiene la fórmula HOCH₂CH₂-(CH₂CH₂O)_n-CH₂CH₂-OH, en la que n es de aproximadamente 8 a aproximadamente 4000. El hidrógeno terminal puede estar sustituido con un grupo protector tal como un grupo alquilo o alcohol. Preferentemente, el PEG tiene como mínimo un grupo hidroxilo, más preferentemente es un grupo hidroxilo terminal. Es este grupo hidroxilo el que preferentemente se activa para que reaccione con el péptido. Hay muchas formas de PEG útiles para la presente invención. En la técnica existen numerosos derivados de PEG que son adecuados para uso en la invención. (Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 5,445,090; 5,900,461; 5,932,462; 6,436,386; 6,448,369; 6,437,025; 6,448,369; 6,495,659; 6,515,100 y 6,514,491 y Zalipsky, S. *Bioconjugate Chem.* 6:150-165, 1995). La molécula de PEG unida covalentemente a los compuestos de GLP-1 de la presente invención no está limitada a ser de un tipo concreto. Preferentemente, el peso molecular del PEG es de 500-100.000 daltons y más preferentemente de 20.000-60.000 daltons y, muy preferentemente, de 20.000-40.000 daltons. El PEG puede ser lineal o ramificado y los compuestos de GLP-1 PEGilados de la invención pueden tener 1 o 2 moléculas de PEG unidas al péptido. Lo más preferentemente es que haya una molécula de PEG por molécula de compuesto de GLP-1 PEGilado. También se contempla que ambos extremos de la molécula de PEG pueden estar funcionalizados para reticular dos o más compuestos de GLP-1 juntos.

La presente invención proporciona compuestos de GLP-1 con una o más moléculas de PEG unidas covalentemente a los mismos. Un procedimiento para preparar los compuestos de GLP-1 PEGilados de la presente invención implica el uso de PEG-maleimida para unir directamente PEG a un grupo tiol del péptido. La introducción de una funcionalidad tiol se puede lograr añadiendo o insertando un resto Cys sobre o en el péptido en las posiciones descritas en lo que antecede. También se puede introducir una funcionalidad tiol en la cadena lateral del péptido (por ejemplo, acilación del grupo ε-amino de lisina de un ácido que contiene tiol). Un procedimiento de PEGilación de la presente invención utiliza la adición de Michael para formar un ligador tioéter estable. La reacción es altamente específica y tiene lugar en condiciones suaves en presencia de otros grupos funcionales. Se ha usado PEG maleimida como polímero reactivo para preparar conjugados de PEG-proteína bioactivos bien definidos. Es preferible que el procedimiento use un exceso molar de un compuesto de GLP-1 que contiene tiol en relación con PEG maleimida para guiar la reacción hasta que se complete. Preferentemente, las reacciones se realizan a un pH entre 4,0 y 9,0, a temperatura ambiente durante de 15 a 40 horas. El exceso de péptido que contiene tiol no PEGilado se separa fácilmente del producto PEGilado mediante procedimientos de separación convencionales. Las condiciones de ejemplo requeridas para la PEGilación de compuestos de GLP-1 se presentan en el Ejemplo 1. La PEGilación de cisteína se puede realizar usando PEG maleimida o PEG maleimida bifurcado.

Los compuestos de GLP-1 tienen diversas actividades biológicas. Por ejemplo, se ha descubierto que el GLP-1 estimula la liberación de insulina, de modo que produce que las células capten glucosa y se reduzcan los niveles de glucosa en suero [véase, por ejemplo, Mojsov, S., (1992) *Int. J. Peptide Protein Research*, 40:333]. El GLP-1 es particularmente prometedor como tratamiento de la diabetes mellitus no insulina dependiente (DMNID), ya que supone riesgo de hipoglucemia como los actuales tratamientos para la DMNID. El GLP-1 también se contempla como tratamiento de la obesidad, el síndrome del intestino irritable y la dispepsia funcional.

Se contempla que un uso de un compuesto de GLP-1 PEGilado de la presente invención incluye el uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes no dependiente de insulina, obesidad, ictus, infarto de miocardio, síndrome del intestino irritable o dispepsia funcional. La PEGilación de un compuesto de GLP-1 se puede combinar con otras modificaciones conocidas en la técnica para incrementar la semivida del GLP-1 (véase, por ejemplo, el documento WO03/058203) y, de este modo, incrementar la semivida del compuesto todavía más que la PEGilación sola o el otro procedimiento solo.

Como se usa en el presente documento, "compuesto de GLP-1" también incluye sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos que se describen en el presente documento. Un compuesto de GLP-1 de esta invención puede poseer grupos funcionales suficientemente ácidos, suficientemente básicos o ambos, y, de acuerdo con esto reaccionar con cualquiera de un número de bases inorgánicas, y ácidos inorgánicos y orgánicos, para formar una sal. Los ácidos de uso habitual para formar sales de adición de ácido son ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos, tales como ácido p-toluenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido oxálico, ácido p-bromofenil-sulfónico, ácido carbónico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido acético y similares. Ejemplos de sales ácidas adecuadas 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, butina-1,4-dioato, hexin-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.

Sales de adición de bases incluyen las derivadas de bases inorgánicas, tales como amoníaco o hidróxidos de metales alcalinos o alcalino térreos, carbonatos, bicarbonatos y similares. Por tanto, dichas bases útiles en la preparación de las sales de la presente invención incluyen hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidróxido amónico, carbonato potásico y similares.

Los compuestos de GLP-1 PEGilados de la presente invención son particularmente adecuados para administración parenteral, también se pueden liberar por vía oral, mediante administración nasal o mediante inhalación. La administración parenteral puede incluir, por ejemplo, administración sistémica tal como inyección intramuscular, intravenosa, subcutánea o intraperitoneal. Los compuestos de GLP-1 PEGilados se pueden administrarse al sujeto junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéutico aceptable como parte de una composición farmacéutica para tratar las enfermedades que se han comentado en lo que antecede. La composición farmacéutica puede ser una solución o, si se administra por vía parenteral, una suspensión del compuesto de GLP-1 o una suspensión del compuesto de GLP-1 en complejo con un catión de metal divalente tal como cinc. Vehículos farmacéuticos adecuados pueden contener ingredientes inertes que no interactúan con el péptido o derivado peptídico. Pueden emplearse técnicas de formulación farmacéutica estándar tales como las que se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Entre los vehículos farmacéuticos adecuados para administración parenteral se incluyen, por ejemplo, agua estéril, solución fisiológica salina, solución salina bacteriostática (solución salina que contiene 0,9% mg/ml de alcohol bencílico), solución salina tamponada con fosfato, solución de Hank, Ringer lactato y similares. Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, trehalosa, sorbitol y manitol.

Los compuestos de GLP-1 PEGilados de la invención pueden formularse para administración de modo que los niveles en plasma sanguíneo se mantienen dentro del intervalo eficaz durante prolongados periodos de tiempo. La principal barrera para una liberación oral eficaz del péptido es la mala biodisponibilidad debido a la degradación de los péptidos por los ácidos y las enzimas, la mala absorción a través de las membranas epiteliales y la transición de los péptidos a una forma insoluble tras la exposición al ambiente de pH ácido en el tracto digestivo. Los sistemas de liberación oral para los péptidos tales como los abarcados por la presente invención se conocen en la técnica. Por ejemplo, los compuestos de GLP-1 PEGilados se pueden encapsular usando microesferas y, después, se pueden liberar oralmente. Por ejemplo, los compuestos de GLP-1 PEGilados se pueden encapsular en microesferas compuestas por un polímero biodegradable, biocompatible disponible comercialmente, poli(lactida-co-glicólido)-COOH y aceite de oliva como carga. Véase Joseph y col. (2000) *Diabetologia* 43:1319-1328. Otros tipos de tecnología de microesfera también están disponibles comercialmente tales como Medisorb® y Prolease® polímeros biodegradables de Alkermes. Los polímeros Medisorb® se pueden producir con cualquiera de los isómeros de lactida. Las proporciones lactida:glicólico se pueden variar entre 0:100 y 100:0, lo que permite un amplio abanico de propiedades de polímero. Esto permite el diseño de sistemas de liberación y dispositivos implantables con tiempos de resorción variables entre semanas y meses. Emisphere también ha publicado numerosos artículos que tratan la tecnología de liberación oral para péptidos y proteínas. Por ejemplo, véase el documento WO 9528838 de Leone-

bay y col, que divulga vehículos específicos compuestos por aminoácidos modificados para facilitar la absorción.

Los compuestos de GLP-1 PEGilados descritos en el presente documento se pueden usar para tratar a sujetos con una amplia variedad de enfermedades y afecciones. Los compuestos de GLP-1 PEGilados abarcados por la presente invención ejercen sus efectos biológicos actuando en un receptor denominado "receptor de GLP-1" (véase Dillon y col. (1993) Cloning and Functional Expression of the Human Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1) Receptor, Endocrinology, 133:1907-1910). Los sujetos con enfermedades y/o afecciones que responden favorablemente a la estimulación del receptor de GLP-1 o a la administración de los compuestos de GLP-1 pueden, por tanto, ser tratados con los compuestos de GLP-1 PEGilados de la presente invención. Se dice que estos sujetos "necesitan tratamiento con compuestos de GLP-1" o "necesitan estimulación del receptor de GLP-1".

Se incluyen los sujetos con diabetes no dependiente de insulina, diabetes dependiente de insulina, 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 tras cirugía (véase la patente de EE.UU. nº 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 de GLP-1, por ejemplo sujetos en riesgo de desarrollar diabetes no dependiente de insulina (véase el documento WO 00/07617). Sujetos adicionales incluyen aquéllos con alteración de la tolerancia a la glucosa o alteración de la glucemia en ayunas, sujetos cuyo peso corporal es de aproximadamente el 25 % por encima del peso corporal normal para la altura del sujeto y su constitución corporal, sujetos con una pancreatectomía parcial, sujetos que tienen uno o más padres con diabetes no dependiente de insulina, sujetos que han sufrido diabetes gestacional y sujetos que han sufrido pancreatitis aguda o crónica tienen riesgo de desarrollar diabetes no dependiente de insulina.

Los compuestos de GLP-1 PEGilados de la presente invención se pueden usar para normalizar los niveles de glucosa en sangre, prevenir el deterioro de las células β pancreáticas, inducir la proliferación de las células β , estimula la transcripción del gen de la insulina, regular por aumento IDX1/PDX-1 u otros factores de crecimiento, mejorar la función de las células β , activar las células β durmientes, diferenciar las células en células β , estimular la replicación de las células β , inhibir la apoptosis de las células β , regular el peso corporal e inducir la pérdida de peso.

Una "cantidad eficaz" de un compuesto de GLP-1 PEGilado es la cantidad que tiene como resultado un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado sin causar efectos secundarios inaceptables cuando se administra a un sujeto que necesite la estimulación del receptor de GLP-1. Un "efecto terapéutico deseado" incluye uno o más de los siguientes: 1) una mitigación de el(los) síntoma(s) asociado(s) con la enfermedad o dolencia; 2) un retraso en el inicio de los síntomas asociados con la enfermedad o dolencia; 3) aumento de longevidad en comparación con la ausencia de tratamiento, y (4) mayor calidad de vida en comparación con la ausencia de tratamiento. Por ejemplo, una "cantidad eficaz" de un compuesto de GLP-1 PEGilado para el tratamiento de la diabetes es la cantidad que tendría como resultado un mayor control de la concentración de glucosa en sangre que en ausencia de tratamiento, lo que tiene como resultado un retraso en el inicio de complicaciones diabéticas tales como retinopatía, neuropatía o nefropatía. Una "cantidad eficaz" de compuesto de GLP-1 PEGilado para la prevención de la diabetes es la cantidad que retrasaría, en comparación con la ausencia de tratamiento, el inicio de niveles elevados de glucosa en sangre que requieren tratamiento con fármacos anti-hipoglucémicos tales como sulfonilureas, tiazolidinodionas, insulina y/o bisguanidinas.

Una "cantidad eficaz" del compuesto de GLP-1 PEGilado administrada a un sujeto también dependerá del tipo y gravedad de la enfermedad y de las características del sujeto, tal como estado de salud general, edad, sexo, peso corporal y tolerancia a los fármacos. Normalmente, los compuestos de GLP-1 PEGilados de la presente invención se administrarán de manera que los niveles en plasma estén en el intervalo de aproximadamente 5 picomoles/litro a aproximadamente 200 picomoles/litro. Se determinó que los niveles plasmáticos óptimos para Val⁸-GLP-1(7-37)OH eran de entre 30 picomoles/litro y aproximadamente 200 picomoles/litro.

Un intervalo de dosis típico para los compuestos de GLP-1 PEGilados de la presente invención variarán de aproximadamente 0,01 mg al día a aproximadamente 1000 mg al día para un adulto. Preferentemente, la dosificación varía de aproximadamente 0,1 mg al día a aproximadamente 100 mg al día, más preferentemente de aproximadamente 1,0 mg/día a aproximadamente 10 mg/día.

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

Los péptidos usados para generar los compuestos de GLP-1 PEGilados de la presente invención se pueden preparar usando procedimientos estándar de técnicas de síntesis de péptidos en fase de solución o fase sólida. Los sintetizadores peptídicos están disponibles comercialmente en, por ejemplo, Applied Biosystems in Foster City CA. Los reactivos para la síntesis de fase sólida están disponibles comercialmente en, por ejemplo, Midwest Biotech (Fishers, IN). Los sintetizadores peptídicos en fase sólida se pueden usar de acuerdo con las instrucciones del fabricante para bloquear los grupos de interferencia, proteger al aminoácido de la reacción, acoplamiento, desacoplamiento y con casquete de los aminoácidos sin reaccionar.

Normalmente, un aminoácido protegido con α -N-carbamoylo y el aminoácido en el extremo N de la cadena peptídica en crecimiento sobre una resina se acopla a temperatura ambiente en un disolvente inerte tal como dimetilformamida, N-metilpirrolidona o cloruro de metileno en presencia de agentes de acoplamiento tales como diciclohexilcarbodiimida y 1-hidroxibenzotriazol y una base tal como diisopropiletilamina. El grupo protector α -N-carbamoylo se elimina de la resina peptídica resultante usando un reactivo tal como ácido trifluoroacético o piperidina y la reacción de acoplamiento se repite con el siguiente aminoácido N-prottegido que se va a añadir a la cadena peptídica. Los grupos protectores de amina adecuados son bien conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Green y Wuts, "Protecting Groups in Organic Synthesis", John Wiley and Sons, 1991. Ejemplos incluyen t-butiloxicarbonilo (tBoc) y fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc).

Los péptidos también se sintetizan usando protocolos de síntesis de fase sólida estándar automáticos usando t-butoxicarbonil- o fluorenilmetoxicarbonil-alfa-aminoácidos con la protección adecuada de la cadena lateral. Tras la finalización de la síntesis, los péptidos se escinden del soporte de la fase sólida con desprotección simultánea de la cadena lateral usando procedimientos de fluoruro de hidrógeno convencionales. A continuación, los péptidos brutos se purifican adicionalmente usando cromatografía de fase inversa en columnas Vydac C18 usando gradientes de acetonitrilo en ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 %. Para eliminar el acetonitrilo, los péptidos se liofilizan en una solución que contienen TFA al 0,1 %, acetonitrilo y agua. La pureza se puede verificar mediante cromatografía analítica de fase inversa. La identidad de los péptidos se pueden verificar mediante espectrometría de masas. Los péptidos se pueden solubilizar en tampones acuosos a pH neutro.

La invención se ilustra con los ejemplos siguientes, que no deben interpretarse como limitantes de ningún modo.

Ejemplos

Ejemplo 1. PEGilación de análogos relacionados con GLP-1

Las reacciones de PEGilación se realizan en condiciones que permiten la formación de un enlace tioéter. Específicamente, el pH de la solución varía de aproximadamente 4 a 9 y las concentraciones de péptido que contiene tiol varían de un exceso 1 a 10 molar de la concentración de metoxi-PEG2-MAL. Normalmente las reacciones de PEGilación tienen lugar a temperatura ambiente. El péptido de GLP-1 PEGilado se aísla después usando cromatografía de intercambio iónico HPLC de fase inversa, o cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Los análogos de GLP-1 PEGilados se caracterizan usando técnicas analíticas de RP-HPLC, HPLC-SEC, SDS-PAGE y/o espectrometría de masas MALDI.

Los péptidos de GLP-1 que contienen tiol se hacen reaccionar con polietilenglicol-maleimida (PEG-maleimida) de 40 kDa para producir derivados con PEG unido por covalencia mediante un enlace tioéter. Por ejemplo, el péptido Cex-51-C ($V_8E_{22}I_{33}C_{45}$ GLP-1, 45 aa de longitud; 7,5 mg, 1,8 μ mol) se disuelve en 2 ml de tampón fosfato 200 mM que contiene EDTA 20 mM a pH 7,4. Después, la solución se purga con argón. A esta solución se añaden 40 mg de metoxi-PEG-MAL, un PEG maleimida lineal o bifurcado (lote PT-02B-10, Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, Alabama) (relación molar e PEG a péptido 0,55:1). La reacción se realiza durante 2 horas. Después, se purifican 25 mg del péptido PEGilado mediante RP-HPLC, caracterizado mediante HPLC de exclusión por tamaño y se analiza su actividad *in vitro*.

Ejemplo 2. Reacción de PEG-maleimida de 40 kDa con análogos de GLP

Los análogos de GLP-1, tales como $C_{16}E_{22}V_8GLP$ and V_8C_{38} , se pegilan de forma selectiva en el resto de cisteína introducido usando PEGm bifurcado de 40 kDa activado con maleimida (Shearwater Polymers, Inc.). Para la reacción de PEGilación, el péptido que se va a PEGilar se disuelve en tampón TRIS 100 mM a pH 8,0 y se añade un exceso molar 1,25 de PEGm de 40 kDa a granel. La reacción se deja agitar a temperatura ambiente durante 2-3 horas y después se dializa durante la noche (membrana de 7 kDa) contra citrato 10 mM, fosfato 10 mM, a pH 7,4 a aproximadamente 5 °C. Las moléculas de GLP PEGiladas se purifican mediante cromatografía de intercambio aniónico en una columna Mono-Q (Amersham Biosciences Corp, Piscataway, NJ) usando un gradiente de NaCl a pH neutro.

Ejemplo 3. Reacción de PEG-maleimida de 3,4 kDa-DSPE con análogos de GLP-1

Los análogos de GLP-1, tales como $C_{16}E_{22}V_8GLP-1$ y $V_8C_{38}GLP-1$, se pegilan de forma selectiva en el resto de cisteína introducido usando PEGm terminado de 3,4 kDa activado con maleimida con un lípido, diesteiroilfosfatidiletanolamina (DSPE) (Shearwater Polymers, Inc.). Para la reacción de PEGilación, el péptido se disuelve en tampón TRIS 100 mM a pH 8 y se añade un exceso molar 1,25 de PEG-maleimida de 3,4 kDa-DSPE. Se añade etanol absoluto a aproximadamente el 17 % para ayudar a solubilizar el PEG-maleimida de 3,4 kDa-DSPE. La reacción se deja agitar a temperatura ambiente durante 2-3 horas y después se dializa durante la noche (membrana de 7 kDa) contra citrato 10 mM, fosfato 10 mM, a pH 7,4 a aproximadamente 5 °C. El péptido PEGilado se purifica mediante cromatografía de intercambio aniónico en una columna Mono-Q (Amersham Biosciences Corp, Piscataway, NJ) usando un gradiente de NaCl a pH neutro.

Ejemplo 4- Ensayo de actividad *in vitro*

Se siembran células HEK-293 que expresan el receptor de GLP-1 humano, usando un sistema PanVera LLC CRE-BLAM a de 20.000 a 40.000 células/pocillo/100 µl de medio DMEM con FBS al 10 % en una placa de 96 pocillos revestidos con poli-d-lisina, negra, de fondo transparente. El día después de la siembra se retira el medio y se añaden 80 µl de medio DMEM sin plasma. El tercer día después de la siembra se añaden 20 µl de medio DMEM sin plasma con BSA al 0,5 % que contiene diferentes concentraciones del compuesto de GLP-1 PEGilado a cada pocillo para generar una curva de dosis-respuesta. En general se usan catorce diluciones que contienen el péptido PEGilado de 3 nanomolar a 30 nanomolar para generar una curva de respuesta a la dosis a partir de la cual se pueden determinar los valores de CE₅₀. Tras 5 horas de incubación con el péptido PEGilado se añaden 20 µl de sustrato de β-lactamasa (CCF2/AM, PanVera LLC) y se continúa la incubación durante 1 hora, momento en el cual se determina la fluorescencia en un citofluorímetro. El ensayo se describe adicionalmente en Zlokarnik y col. (1998), Science, 278:84-88. Los siguientes péptidos de GLP-1 PEGilados se analizaron como se ha descrito y tenían los valores de CE₅₀ indicados más adelante (con V8GLP-1 igual a 100%):

V ₈ C ₁₆ -3,4 kDa DPSE-PEG	4%
V ₈ -3,4 kDa PEG-FMOC	87%
V ₈ C ₃₈ -3,4 kDa DPSE-PEG	18%
V ₈ C ₃₈ -40 kDa PEG	3%
V ₈ E ₂₂ C ₁₆ -40 kDa PEG	0,7%
V ₈ E ₂₂ I ₃₃ C ₄₅ -40 kDa PEG (CEX-51)	9,4 +/- 1,5 % [n=5]

Ejemplo 5- Análisis farmacocinético del péptido GLP-1 derivatizado

Se administra un análogo de GLP-1 PEGilado (VgE₂₂I₃₃C₄₅-PEG de 40 kDa (PEGilado, CEX-51 C45-modificado)) por vías intravenosa (IV) o subcutánea (SC) a una dosis de 0,1 mg/kg a ratas SD macho. Se extrae sangre de los animales (2 ratas por punto de tiempo para IV, 3 ratas por punto de tiempo por SC) a varios tiempos entre 0 y 336 horas después de la administración de la dosis. El plasma se recoge de cada muestra y se analiza mediante radioinmunoensayo. Los parámetros farmacocinéticos se calculan usando procedimientos dependientes (datos IV) e independientes (datos SC) de modelo (WinNonlin Pro). Una representación de los parámetros farmacocinéticos se indican en la Tabla 1 que figura a continuación. Por administración IV, el análogo de GLP-1 PEGilado tiene una semivida de eliminación de aproximadamente 1,5 días, mientras que por administración SC el análogo de GLP-1 PEGilado tiene una semivida de eliminación de aproximadamente 1,3 días. No se asocian observaciones clínicas adversas con la administración IV o SC de 0,1 mg/kg de VgE₂₂I₃₃C₄₅-40 kDaPEG. Para el compuesto se observa una semivida de eliminación prolongada, un aclaramiento lento y una biodisponibilidad subcutánea alta (aproximadamente del 60 %).

Tabla 1

Compuesto	Vía	C _{máx} ^a (ng/ml)	T _{máx} ^b (d)	AUC _{0-∞} ^c (ng*h/ml)	t _{1/2} ^d (d)	CL/F ^e (ml/h/kg)	Vss/F ^f (ml/kg)	% F ^g
V ₈ E ₂₂ I ₃₃ C ₄₅ -	IV	1135	0,00 3	30293	1,5	3,3	161	
PEG de 40 kDa	SC	187	1-2	18128	1,3	5,5	256	60

(Cont.)

^aConcentración plasmática máxima observada.^b Tiempo de la concentración plasmática máxima observada.^cÁrea bajo la curva de concentración plasmática-tiempo medida desde 0 al infinito.^dSemivida de eliminación en días.^e Aclaramiento corporal total como función de la biodisponibilidad.^fVolumen de distribución en el equilibrio como función de la biodisponibilidad.^gPorcentaje de biodisponibilidad.

Cuando V₈-GLP (7-37)OH se administra por vía IV de forma similar a ratas Fischer 344 a una dosis de 10 µg/kg, se obtienen valores de semivida de eliminación y de aclaramiento profundamente diferentes, como se indica a continuación.

Aclaramiento: 1449 ml/h/kg

t_{1/2} (h): 0,05

Se administra un análogo de GLP-1 PEGilado (V₈E₂₂I₃₃C₄₅-PEG 40 kDa (PEGilado, CEX-51 C45-modificado)) por vías intravenosa (IV) o subcutánea (SC) a una dosis de 0,1 mg/kg a monos cinomolgos machos. Se extrae sangre de los animales a varios tiempos entre 0 y 336 horas después de la administración de la dosis. El plasma se recoge de cada muestra y se analiza mediante radioinmunoensayo. Los parámetros farmacocinéticos se calculan usando procedimientos dependientes (datos IV) e independientes (datos SC) de modelo (WinNonlin Pro). Una representación de los parámetros farmacocinéticos se indican en la Tabla 2 que figura a continuación. Por administración IV, el análogo de GLP-1 PEGilado tiene una semivida de eliminación de aproximadamente 59,5 horas, mientras que mediante administración SC el análogo de GLP-1 PEGilado tiene una semivida de eliminación de aproximadamente 61,6 horas.

Tabla 2.

IV							
Dosis (mg/kg)	Nº animal	C _{máx} ^a (ng/ml)	T _{máx} ^b (h)	AUC _{0-∞} ^c (ng*h/ml)	t _{1/2} ^d (h)	CL (ml/h/kg)	Vss (ml/kg)
0,1	I00473	1662	1,0	149279	59,5	0,67	57,5
	I00474	2282	4,0	130341	42,1	0,77	46,6
	I00477	2672	0,0	215992	76,8	0,46	51,3
	Mean	2205	1,7	165204	59,5	0,63	51,8
	SD	509	2,1	1244991	17,4	0,16	5,5
SC							
Dosis (mg/kg)	Nº animal	C _{máx} ^a (ng/ml)	T _{máx} ^b (h)	AUC _{0-∞} ^c (ng*h/ml)	t _{1/2} ^d (h)	CL/F ^e (ml/h/kg)	Vss/F ^f (ml-/kg)
0,1	I00478	657	72,0	113518	64,4	0,88	81,8
	I00480	976	48,0	138306	58,8	0,72	61,3
	Media	817	60,0	125912	61,6	0,8	71,6
^a Concentración plasmática máxima observada. ^b Tiempo de la concentración plasmática máxima observada. ^c Área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo medida desde 0 al infinito ^d Semivida de eliminación. ^e Aclaramiento corporal total como función de la biodisponibilidad. ^f Volumen de distribución como función de la biodisponibilidad. SD = Desviación estándar.							

Ejemplo 6- Análisis farmacodinámico del péptido GLP-1 derivatizado

Se administra un análogo de GLP-1 PEGilado (V₈E₂₂I₃₃C₄₅-PEG 40 kDa (PEGilado, CEX-51 C45-modificado)) por vías subcutánea (SC) a dosis de 3 nmol/kg (12,33 mg/kg = 0,62 µg (microgramos)/50 g ratón) o 10 nmol/kg (41 mg/kg = 2 µg (microgramos)/50 g ratón) a ratones C57BL/60laHsd-Lepob macho frente a un control de los vehículos. A los animales (6 ratones por punto de tiempo) se administra una única inyección de análogo de GLP-1 PEGilado o vehículo a las 11:00 de la mañana. Después, los ratones ayunan durante la noche y se realiza IPTGG (1 g de

ES 2 390 270 T3

dextrosa/kg i.p.). Se toman muestras repetidas para glucosa e insulina antes y después de la inyección de glucosa a 15, 30, 60, 90, y 120 minutos. Una representación de los parámetros farmacodinámicos se indican en las Tablas siguientes.

	AUC de glucosa vehículo	PEG 3 nmol	PEG 10 nmol
	85965,75	28206	29765,25
	58198,5	34884	22603,5
	60381	33291	48125,25
	73320,75	55793,25	54038,25
	71703	48422,25	25024,5
	72067,5	46707,75	24808,5
Media	70272,75	41217,38	34060,88
Error estándar	4100,657	4346,437	5519,325
Valor p		0,000659	0,000365

Cepa	Vehículo ID del ratón	GRP	Peso el Día 0	Glucosa el día 0	Glucosa real el día 0
ob/ob	MR	A	49,7	231,4	462,8
ob/ob	MS	A	46,9	260,5	521
ob/ob	MZ	A	48,5	206,3	412,6
ob/ob	NA	A	47,1	209,6	419,2
ob/ob	NI	A	46,8	180,3	360,6
ob/ob	NK	A	48,7	222	444
Media 47,95					436,7
Error estándar 0,48563					21,99944

GLP-1 PEG 3 nmol					
ob/ob	MO	C	49,4	187,1	374,2
ob/ob	MP	C	45,7	212,8	425,6
ob/ob	MT	C	53,3	253,5	507
ob/ob	NC	C	49,9	226	452
ob/ob	NE	C	50,3	247	494
ob/ob	NG	C	49,5	207,7	415,4
Media 49,6833					444,7
Error estándar 0,99144					20,46022

ES 2 390 270 T3

GLP-1 PEG 10 nmol					
ob/ob	MJ	D	49,3	259	518
ob/ob	ML	D	47,4	221,9	443,8
ob/ob	MU	D	46,4	232,6	465,2
ob/ob	MY	D	48,2	227,6	455,2
ob/ob	NB	D	51,5	185,7	371,4
ob/ob	ND	D	42,6	196,5	393
			Media 47,5667		441,1
			Error estándar 1,22384		21,50366

Vehículo		Tiempo 0 real glucosa	Tiempo 15 real glucosa	Tiempo 30 real glucosa	Tiempo 60 real glucosa	Tiempo 90 real glucosa	Tiempo 120 real glucosa
ID del ratón	Dosis						
MR	0,0994	124,8	566,7	772,9	869,1		668,4
MS	0,0938	83,4	299,1	568,8	759,3		204
MZ	0,097	130,5	468,6	597,9	609,3		383,4
NA	0,0942	247,2	577,2	612,3	623,4	528,9	699,3
NI	0,0936	174,6	469,2	628,2	635,4	506,1	687,6
NK	0,0974	267	563,4	649,8	662,7	495	572,4
Ave		171,25	490,7	638,15	693,2	510	535,85
Error estándar		29,711655596	43,2838538	28,99511166	41,42960294	9,978476838	82,05989581

GLP-1 PEG 3 nmol

MO	0,0988	70,2	206,4	325,2	240,9	214,2
MP	0,0914	96,6	386,7	408	295,2	196,5
MT	0,1066	84	308,7	369,6	273,3	247,2
NC	0,0998	156	481,2	521,7	532,8	389,7
NE	0,1006	158,7	453,6	531	287,1	518,7
NG	0,099	83,7	433,5	461,4	378,6	405,3
Media		108,2	378,35	436,15	334,65	328,6
Error estándar		15,91596683	42,33590084	33,90384197	43,80457168	52,57307296
Valor p		0,074622229	0,127534361	0,012940369	0,004544365	0,021860517

GLP-1 PEG 10 nmol											
MJ	0,0986	91,2	164,4	312,3	290,1	217,8					
ML	0,0948	68,1	318,6	285,3	152,1	135					
MU	0,0928	114,6	384,6	489,3	420,3	385,8					
MY	0,0964	186	531,6	606,3	447,3	363,3	347,1				
NB	0,103	92,4	354	261,6	151,5	210,6	117				
ND	0,0852	90,3	277,5	272,7	209,4	147	147,6				
Media		107,1	338,45	371,25	278,45	203,9	243,25				
Error estándar		16,88549674	49,69268055	58,24718448	53,42159208	72,14284441	43,7524685				
Valor p		0,049860093	0,06660094	0,013403998	0,002986998	0,040209038	0,018193438				
		0	15	30	60	90	120				
Vehículo	Media	171,25	490,7	638,15	693,2	510	535,85				
3 nmol	Media	108,2	378,35	436,15	334,65	339,2	328,6				
10 nmol	Media	107,1	338,45	371,25	278,45	203,9	243,25				

ES 2 390 270 T3

		Tiempo 0	Tiempo 15	Tiempo 30	Tiempo 60	Tiempo 90	Tiempo 120
Vehículo		Real	Real	Real	Real	Real	Real
ID del ratón	Dosis	Insulina	Insulina	Insulina	Insulina	Insulina	Insulina
MR	0,0994	2,7	2,7	2,7	2,7		3,3
MS	0,0938	12,3	3,6	2,7	2,7		6,9
MZ	0,097	2,7	2,7	2,7	2,7		5,1
NA	0,0942	6,3	2,7	2,7	2,7	3,3	3,6
NI	0,0936	3,3	2,7	2,7	2,7	2,7	3,3
NK	0,0974	5,4	2,7	2,7	2,7	3	4,2
Media		5,45	2,85	2,7	2,7	3	4,4
Error estándar		1,498832879	0,15	0	0	0,173205081	0,572712843

3 nmol											
GLP-1 PEG											
MO	0,0988	4,8	3,6	5,7	4,8					2,7	
MP	0,0914	5,7	16,5	12,6	8,7					9,6	
MT	0,1066	5,4	4,5	4,8	8,4					2,7	
NC	0,0998	70,8	59,4	69,9	24,6	32,7				30	
NE	0,1006	27,9	14,7	24,6	11,4	3843				25,2	
NG	0,099	12,6	13,8	10,8	12	6390				19,5	
Media		21,2	18,75	21,34	11,65	19,4				14,95	
Error estándar		10,54808039	8,42807807	10,1231418	2,793295545	6,650563886				4,764504171	
Valor p		0,198202864	0,11819731	0,0123985904	0,023885517	0,127758283				0,089610323	

GLP-1 PEG 10 nmol											
MJ	0,0986	39,3	16,5	13,5	31,2					13,5	
ML	0,0948	13,5	36,9	48	19,2					14,4	
MU	0,0928	32,4	13,8	15,6	12					12,3	
MY	0,0964	121,2	122,7	95,1	85,8	56,1				48,3	
NB	0,103	35,7	50,7	56,4	34,8	13,2				16,5	
ND	0,0852	70,5	56,7	63,9	21,3	10,8				7,5	
Media		52,1	49,55	48,75	34,05	26,7				18,75	
Error estándar		15,73130637	16,2621801	12,62063786	10,88735505	14,71631747				6,035768385	
Valor p		0,033003008	0,03509872	0,014767024	0,034608806	0,24535686				0,069087455	
		0	15	30	60	90				120	
Vehículo	Media	5,45	2,85	2,7	2,7	3				4,4	
3 nmol	Media	21,2	18,75	21,4	11,65	19,4				14,95	
10 nmol	Media	52,1	49,55	48,75	34,05	26,7				18,75	

Vehículo		Tiempo 0 real péptido C	Tiempo 15 real péptido C	Tiempo 30 real péptido C	Tiempo 60 real péptido C	Tiempo 90 real péptido C	Tiempo 120 real péptido C
ID del ratón	Dosis						
MR	0,0994	2127	1188	1167	1182		2736
MS	0,0938	3243	1875	1992	2709		5643
MZ	0,097	1857	1266	1392	1533		2916
NA	0,0942	3666	2571	2322	2082	1932	3051
NI	0,0936	2391	2178	1776	2181	2469	3777
NK	0,0974	2580	2517	2115	2577	2910	4695
Ave		2644	1932,5	1794	2044	2437	3803
Error estándar		280,3597689	245,7235235	180,3779366	241,5706936	282,7772975	471,6178538

3 nmol											
GLP-1 PEG											
MO	0,0988			2130	3492	2613				1989	
MP	0,0914	2472		5445	4632	4326				4248	
MT	0,1066	2577		2919	2802	4149				3027	
NC	0,0998	9663		10278		6759		7197		9849	
NE	0,1006	6726		5349	6747			3843		9855	
NG	0,099	5010		4812	3975	5670		6390		8337	
Media		5289,6		5155,5	4329,6	4703,4		5810		6217,5	
Error estándar		1234,320279		1163,8275	615,6346725	644,8310244		1010,714104		1447,410464	
Valor p		0,104283454		0,021669546	0,012956014	0,010105544		0,095491566		0,15910403	

10 nmol											
GLP-1 PEG											
MJ	0,0986	7200	3501	4296	10332					5901	
ML	0,0948	3687	8049	9627						4821	
MU	0,0928	5955		6300						7278	
MY	0,0964	16212	17643	13266	12423	11124				1194	
NB	0,103	8139	9174	11262	7170	4362				6954	
ND	0,0852	12162	8478	10785	4947	3867				4506	
Media		8892,5	9369	9256	8718	6451				6900,5	
Error estándar		1856,727996	2096,294409	1365,273526	1352,954914	2340,865438					
Valor p		0,015654599	0,025508262	0,001556618	0,035883718	0,263009115	0,082555028				
		0	15	30	60	90	120				
Vehículo	Media	2644	1932,5	1794	2044	2437	3803				
3 nmol	Media	5289,6	5155,5	4329,6	4703,4	5810	6217,5				
10 nmol	Media	8892,5	9369	9256	8718	6451	6900,5				

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Eli Lilly and Company

5 <120> Compuestos de GLP-1 unidos a polietilenglicol

<130> X-16020

<140> 60/456081

10 <141> 2003-03-19

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.2

15

<210> 1

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 1

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> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <400> 2

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
20 25 30

<210> 3

<211> 31

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

15 <223> Xaa en la posición 1 es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, α-fluorometil-histidina o α-metil-histidina

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

20 <223> Xaa en la posición 2 es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Ser o Thr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

25 <223> Xaa en la posición 5 es Thr o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

30 <223> Xaa en la posición 6 es Phe, Trp, Tyr o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa en la posición 10 es Val, Trp, Ile, Leu, Phe, Tyr o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

5 <222> (12)..(12)

<223> Xaa en la posición 12 es Ser, Trp, Tyr, Phe, Lys, Ile, Leu, o Val

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <222> (13)..(13)

<223> Xaa en la posición 13 es Tyr, Trp o Phe

<220>

<221> MISC_FEATURE

15 <222> (14)..(14)

<223> Xaa en la posición 14 es Leu, Phe, Tyr o Trp

<220>

<221> MISC_FEATURE

20 <222> (16)..(16)

<223> Xaa en la posición 16 es Gly, Glu, Asp, Lys o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

25 <222> (17)..(17)

<223> Xaa en la posición 17 es Gln o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

30 <222> (18)..(18)

<223> Xaa en la posición 18 es Ala o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

35 <222> (19)..(19)

<223> Xaa en la posición 19 es Ala, Val, Ile, Leu o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Xaa en la posición 20 es Lys o Cys

5

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> Xaa en la posición 21 es Glu, Ile, Ala o Cys

10

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> Xaa en la posición 24 es Ala, Glu o Cys

15

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (27)..(27)

<223> Xaa en la posición 27 es Val o Ile

20

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> Xaa en la posición 28 es Lys o Cys

25

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> Xaa en la posición 29 es Gly o Cys

30

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (30)..(30)

<223> Xaa en la posición 30 es Arg o Cys

35

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> xaa en la posición 31 es Gly, His, Cys, está ausente o es un residuo modificado

<220>

5 <221> MOD_RES

<222> (31)..(31)

<223> AMIDACIÓN

<400> 3

10

Xaa Xaa Glu Gly Xaa Xaa Thr Ser Asp Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Glu Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Ile Xaa Trp Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

<210> 4

<211> 31

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

20

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

25 <223> Xaa en la posición 1 es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, beta-hidroxi-histidina, homohistidina, alfa-fluorometil-histidina o alfa-metil-histidina

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

30 <223> Xaa en la posición 2 es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser o Thr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa en la posición 5 es Thr o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

5 <222> (6)..(6)

<223> Xaa en la posición 6 es Phe o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <222> (10)..(10)

<223> Xaa en la posición 10 es Val, Phe, Tyr, Trp o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

15 <222> (12)..(12)

<223> Xaa en la posición 12 es Ser, Tyr, Trp, Phe, Lys, Ile, Leu o Val

<220>

<221> MISC_FEATURE

20 <222> (13)..(13)

<223> Xaa en la posición 13 es Tyr o Phe

<220>

<221> MISC_FEATURE

25 <222> (16)..(16)

<223> Xaa en la posición 16 es Gly, Glu, Asp, Lys o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

30 <222> (17)..(17)

<223> Xaa en la posición 17 es Gln o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

35 <222> (18)..(18)

<223> Xaa en la posición 18 es Ala o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (19)..(19)

<223> Xaa en la posición 19 es Ala, Val, Ile, Leu o Cys

5

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Xaa en la posición 20 es Lys o Cys

10

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> Xaa en la posición 21 es Glu o Cys

15

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> Xaa en la posición 24 es Ala o Cys

20

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (27)..(27)

<223> Xaa en la posición 27 es Val o Ile

25

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> Xaa en la posición 28 es Lys o Cys

30

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> Xaa en la posición 29 es Gly o Cys

35

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (30)..(30)

<223> xaa en la posición 30 es Arg o Cys

<220>

5 <221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> Xaa en la posición 31 es Gly, Cys, está ausente o es un residuo modificado

<220>

10 <221> MOD_RES

<222> (31)..(31)

<223> AMIDACIÓN

<400> 4

15

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

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Ile Xaa Trp Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

<210> 5

<211> 44

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220> <223> Construcción sintética

25 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

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

30

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa en la posición 2 es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Ser o Thr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

5 <223> xaa en la posición 5 es Thr o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

10 <223> Xaa en la posición 6 es Phe, Trp, Tyr o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

15 <223> Xaa en la posición 10 es Val, Trp, Ile, Leu, Phe, Tyr o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

20 <223> Xaa en la posición 12 es Ser, Trp, Tyr, Phe, Lys, Ile, Leu o Val

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

25 <223> xaa en la posición 13 es Tyr, Trp o Phe

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

30 <223> Xaa en la posición 14 es Leu, Phe, Tyr o Trp

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

35 <223> Xaa en la posición 16 es Gly, Glu, Asp, Lys o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> Xaa en la posición 17 es Gln o Cys

5 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (18)..(18)

<223> Xaa en la posición 18 es Ala o Cys

<220>

10 <221> MISC_FEATURE

<222> (19)..(19)

<223> Xaa en la posición 19 es Ala, Val, Ile, Leu o Cys

<220>

15 <221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Xaa en la posición 20 es Lys o Cys

<220>

20 <221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> Xaa en la posición 21 es Glu, Ile, Ala o Cys

<220>

25 <221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> Xaa en la posición 24 es Ala, Glu o Cys

<220>

30 <221> MISC_FEATURE

<222> (27)..(27)

<223> Xaa en la posición 27 es Val o Ile

<220>

35 <221> MISC_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> Xaa en la posición 28 es Lys, Asp, Arg, Glu o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (29)..(29)

5 <223> Xaa en la posición 29 es Gly o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (30)..(30)

10 <223> Xaa en la posición 30 es Gly, Pro, Arg o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

15 <223> Xaa en la posición 31 es Gly, Pro, Ser o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (32)..(32)

20 <223> Xaa en la posición 32 es Ser, Pro, His o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (33)..(33)

25 <223> Xaa en la posición 33 es Ser, Arg, Thr, Trp, Lys o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (34)..(34)

30 <223> Xaa en la posición 34 es Ser, Gly o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (35)..(35)

35 <223> Xaa en la posición 35 es Ala, Asp, Arg, Glu, Lys, Gly o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (36)..(36)

<223> Xaa en la posición 36 es Pro, Ala, Cys, está ausente o es un residuo modificado

5 <220>

<221> MOD_RES

<222> (36)..(36)

<223> AMIDACIÓN

10 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (37)..(37)

<223> Xaa en la posición 37 es Pro, Ala, Cys, Está ausente o es un residuo modificado

15 <220>

<221> MOD_RES

<222> (37)..(37)

<223> AMIDACIÓN

20 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (38)..(38)

<223> Xaa en la posición 38 es Pro, Ala, Arg, Lys, His, Cys, Está ausente o es un residuo modificado

25 <220>

<221> MOD_RES

<222> (38)..(38)

<223> AMIDACIÓN

30 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (39)..(39)

<223> Xaa en la posición 39 es Ser, His, Pro, Lys, Arg, Gly, Cys, Está ausente o es un residuo modificado

35 <220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> AMIDACIÓN

<220>

<221> MISC_FEATURE

5 <222> (40)..(40)

<223> Xaa en la posición 40 es His, Ser, Arg, Lys, Pro, Gly, Cys, está ausente o es un residuo modificado

<220>

<221> MOD_RES

10 <222> (40)..(40)

<223> AMIDACIÓN

<220> <221> MISC_FEATURE

<222> (41)..(41)

15 <223> Xaa en la posición 41 es His, Ser, Arg, Lys, Cys, está ausente o es un residuo modificado

<220>

<221> MOD_RES

<222> (41)..(41)

20 <223> AMIDACIÓN

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (42)..(42)

25 <223> Xaa en la posición 42 es Gly, His, Cys, Está ausente o es un residuo modificado

<220>

<221> MOD_RES

<222> (42)..(42)

30 <223> AMIDACIÓN

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (43)..(43)

35 <223> Xaa en la posición 43 es Pro, His, Cys, está ausente o es un residuo modificado

<220>

<221> MOD_RES

<222> (43)..(43)

<223> AMIDACIÓN

5 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (44)..(44)

<223> Xaa en la posición 44 es Ser, His, Cys, está ausente o es un residuo modificado

10 <220>

<221> MOD_RES

<222> (44)..(44)

<223> AMIDACIÓN

15 <400> 5

Xaa	Xaa	Glu	Gly	Xaa	Xaa	Thr	Ser	Asp	Xaa	Ser	Xaa	Xaa	Xaa	Glu	Xaa
1				5					10					15	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Phe	Ile	Xaa	Trp	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
			20					25					30		
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa			
		35					40								

<210> 6

20 <211> 41

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Construcción sintética

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

30 <223> Xaa en la posición 1 es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, beta-hidroxi-histidina, homohistidina, alfa-fluorometil-histidina o alfa-metil-histidina

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa en la posición 2 es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Ser o Thr

5

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa en la posición 5 es Thr o Cys

10

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa en la posición 6 es Phe, Trp, Tyr o Cys

15

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa en la posición 10 es Val, Trp, Ile, Leu, Phe, Tyr o Cys

20

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Xaa en la posición 12 es Ser, Trp, Tyr, Phe, Lys, Ile, Leu, Val

25

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Xaa en la posición 13 es Tyr, Trp o Phe

30

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> Xaa en la posición 14 es Leu, Phe, Tyr o Trp

35

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa en la posición 16 es Gly, Glu, Asp, Lys o Cys

<220>

5 <221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> Xaa en la posición 17 es Gln o Cys

<220>

10 <221> MISC_FEATURE

<222> (18)..(18)

<223> Xaa en la posición 18 es Ala o Cys

<220>

15 <221> MISC_FEATURE

<222> (19)..(19)

<223> Xaa en la posición 19 es Ala, Val, Ile, Leu o Cys

<220>

20 <221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Xaa en la posición 20 es Lys o Cys

<220>

25 <221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> Xaa en la posición 21 es Glu, Ile, Ala o Cys

<220>

30 <221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> Xaa en la posición 24 es Ala, Glu o Cys

<220>

35 <221> MISC_FEATURE

<222> (27)..(27)

<223> Xaa en la posición 27 es Val o Ile

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (28)..(28)

5 <223> Xaa en la posición 28 es Lys, Asp, Arg, Glu o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (29)..(29)

10 <223> Xaa en la posición 29 es Gly o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (30)..(30)

15 <223> Xaa en la posición 30 es Gly, Pro, Arg o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

20 <223> Xaa en la posición 31 Gly, Pro, Ser o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (32)..(32)

25 <223> Xaa en la posición 32 es Ser, Pro, His o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (33)..(33)

30 <223> Xaa en la posición 33 es Ser, Arg, Thr, Trp, Lys o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (34)..(34)

35 <223> Xaa en la posición 34 es Ser, Gly o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (35)..(35)

<223> Xaa en la posición 35 es Ala, Asp, Arg, Glu, Lys, Gly o Cys

<220>

5 <221> MISC_FEATURE

<222> (36)..(36)

<223> Xaa en la posición 36 es Pro, Ala, Cys, Está ausente o es un residuo modificado

<220>

10 <221> MOD_RES

<222> (36)..(36)

<223> AMIDACIÓN

<220>

15 <221> MISC_FEATURE

<222> (37)..(37)

<223> Xaa en la posición 37 es Pro, Ala, Cys, está ausente o es un residuo modificado

<220>

20 <221> MOD_RES

<222> (37)..(37)

<223> AMIDACIÓN

<220>

25

<221> MISC_FEATURE

<222> (38)..(38)

<223> Xaa en la posición 38 es Pro, Ala, Arg, Lys, His, Cys, está ausente o es un residuo modificado

30 <220>

<221> MOD_RES

<222> (38)..(38)

<223> AMIDACIÓN

35 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (39)..(39)

ES 2 390 270 T3

<223> Xaa en la posición 39 es Ser, His, Pro, Lys, Arg, Cys, está ausente o es un residuo modificado

<220>

<221> MOD_RES

5 <222> (39)..(39)

<223> AMIDACIÓN

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <222> (40)..(40)

<223> Xaa en la posición 40 es His, Ser, Arg, Lys, Cys, está ausente o es un residuo modificado

<220>

<221> MOD_RES

15 <222> (40)..(40)

<223> AMIDACIÓN

<220>

<221> MISC_FEATURE

20 <222> (41)..(41)

<223> Xaa en la posición 41 es His, Ser, Arg, Lys, Cys, está ausente o es un residuo modificado

<220>

<221> MOD_RES

25 <222> (41)..(41)

<223> AMIDACIÓN

<400> 6

Xaa Xaa Glu Gly Xaa Xaa Thr Ser Asp Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Glu Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Ile Xaa Trp Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

30 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40

<210> 7

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Construcción sintética

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <222> (1)..(1)

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

<220>

15 <221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa en la posición 2 es Gly, Val, Leu, Ile, Ser o Thr

<220>

20 <221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa en la posición 5 es Thr o Cys

<220>

25 <221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa en la posición 6 es Phe o Cys

<220>

30 <221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa en la posición 10 es Val, Trp, Ile, Leu, Phe, Tyr o Cys

<220>

35 <221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa en la posición 16 es Gly, Glu, Asp, Lys o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

5 <223> Xaa en la posición 17 es Gln o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (18)..(18)

10 <223> Xaa en la posición 18 es Ala o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (19)..(19)

15 <223> Xaa en la posición 19 es Ala, val, Ile, Leu o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

20 <223> Xaa en la posición 20 es Lys o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

25 <223> Xaa en la posición 21 es Glu o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(24)

30 <223> Xaa en la posición 24 es Ala o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (27)..(27)

35 <223> Xaa en la posición 27 es Val o Ile

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> Xaa en la posición 28 es Lys, Asp, Arg, Glu o Cys

5 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> Xaa en la posición 29 es Gly o Cys

10 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (30)..(30)

<223> Xaa en la posición 30 es Gly, Pro, Arg o Cys

15 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> Xaa en la posición 31 es Gly, Pro, Ser o Cys

20 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (32)..(32)

<223> Xaa en la posición 32 es Ser, Pro, His o Cys

25 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (33)..(33)

<223> Xaa en la posición 33 es Ser, Arg, Thr, Trp, Lys o Cys

30 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (34)..(34)

<223> Xaa en la posición 34 es Ser, Gly o Cys

35 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (35)..(35)

<223> Xaa en la posición 35 es Ala, Asp, Arg, Glu, Lys, Gly o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

5 <222> (36)..(36)

<223> Xaa en la posición 36 es Pro, Ala o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <222> (37)..(37)

<223> Xaa en la posición 37 es Pro, Ala o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

15 <222> (38)..(38)

<223> Xaa en la posición 38 es Pro, Ala, Arg, Lys, His Cys, está ausente o es un residuo modificado

<220>

<221> MOD_RES

20 <222> (38)..(38)

<223> AMIDACIÓN

<220>

<221> MISC_FEATURE

25 <222> (39)..(39)

<223> Xaa en la posición 39 es Ser, His, Pro, Lys, Arg, Cys, está ausente o es un residuo modificado

<220>

<221> MOD_RES

30 <222> (39)..(39)

<223> AMIDACIÓN

<220>

<221> MISC_FEATURE

35 <222> (40)..(40)

<223> Xaa en la posición 40 es His, Ser, Arg, Lys, Cys, está ausente o es un residuo modificado

<220>

<221> MOD_RES

<222> (40)..(40)

<223> AMIDACIÓN

5

<220> <221> MISC_FEATURE

<222> (41)..(41)

<223> Xaa en la posición 41 es His, Ser, Arg, Lys, Cys, está ausente o es un residuo modificado

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (41)..(41)

<223> AMIDACIÓN

15

<400> 7

Xaa	Xaa	Glu	Gly	Xaa	Xaa	Thr	Ser	Asp	Xaa	Ser	Ser	Tyr	Lys	Glu	Xaa
1				5					10					15	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Phe	Ile	Xaa	Trp	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
			20					25					30		
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa						
		35						40							

<210> 8

20

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25

<223> Construcción sintética

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

30

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

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa en la posición 2 es Gly, val, Leu, Ile, Ser o Thr

5

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa en la posición 5 es Thr o Cys

10

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa en la posición 6 es Phe o Cys

15

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa en la posición 10 es Val orCys

20

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa en la posición 16 es Gly, Glu, Asp, Lys o Cys

25

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> Xaa en la posición 17 es Gln o Cys

30

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (18)..(18)

<223> Xaa en la posición 18 es Ala o Cys

35

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (19)..(19)

<223> Xaa en la posición 19 es Ala, val, Ile, Leu o Cys

<220>

5 <221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Xaa en la posición 20 es Lys o cys

<220>

10 <221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> Xaa en la posición 21 es Glu o Cys

<220>

15 <221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> Xaa en la posición 24 es Ala o Cys

<220>

20 <221> MISC_FEATURE

<222> (27)..(27)

<223> Xaa en la posición 27 es Val o Ile

<220>

25 <221> MISC_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> xaa en la posición 28 es Lys o Cys

<220>

30 <221> MISC_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> Xaa en la posición 29 es Gly o Cys

<220>

35 <221> MISC_FEATURE

<222> (30)..(30)

<223> Xaa en la posición 30 es Gly o Cys

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31)..(31)
 5 <223> Xaa en la posición 31 es Pro r Cys

 <220> <221> MISC_FEATURE
 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa en la posición 32 es Ser, Pro, His o Cys
 10
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (33)..(33)
 <223> Xaa en la posición 33 es Ser, Arg, Thr, Trp, Lys o Cys
 15
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (34)..(34)
 <223> Xaa en la posición 34 es Ser, Gly o Cys
 20
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (35)..(35)
 <223> Xaa en la posición 35 es Ala, Asp, Arg, Glu, Lys, Gly o Cys
 25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (36)..(36)
 <223> Xaa en la posición 36 es Pro, Ala o Cys
 30
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (37)..(37)
 <223> Xaa en la posición 37 es Pro, Ala o Cys
 35
 <220>
 <221> MISC_FEATURE

<222> (38)..(38)

<223> Xaa en la posición 38 es Pro, Ala, Arg, Lys, His, Cys, está ausente o es un residuo modificado

<220>

5 <221> MOD_RES

<222> (38)..(38)

<223> AMIDACIÓN

<220>

10 <221> MISC_FEATURE

<222> (39)..(39)

<223> Xaa en la posición 39 es Ser, His, Pro, Lys, Arg, Cys, está ausente o es un residuo modificado

<220>

15 <221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> AMIDACIÓN

<220>

20 <221> MISC_FEATURE

<222> (40)..(40)

<223> Xaa en la posición 40 es His, Ser, Arg, Lys, Cys, está ausente o es un residuo modificado

<220>

25 <221> MOD_RES

<222> (40)..(40)

<223> AMIDACIÓN

<220>

<221> MISC_FEATURE

30 <222> (41)..(41)

<223> Xaa en la posición 41 es His, Ser, Arg, Lys, Cys, está ausente o es un residuo modificado

<220>

<221> MOD_RES

35 <222> (41)..(41)

<223> AMIDACIÓN

<400> 8

Xaa Xaa Glu Gly Xaa Xaa Thr Ser Asp Xaa Ser Ser Tyr Lys Glu Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Ile Xaa Trp Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40

5 <210> 9

<211> 44

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> Construcción sintética

<220>

<221> MISC_FEATURE

15 <222> (5)..(5)

<223> Xaa en la posición 5 es Thr o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

20 <222> (6)..(6)

<223> Xaa en la posición 6 es Phe o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

25 <222> (10)..(10)

<223> Xaa en la posición 10 es val o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

30 <222> (16)..(16)

<223> Xaa en la posición 16 es Gly o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

5 <223> Xaa en la posición 17 es Gln o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (18)..(18)

10 <223> Xaa en la posición 18 es Ala o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (19)..(19)

15 <223> Xaa en la posición 19 es Ala o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

20 <223> Xaa en la posición 20 es Lys o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

25 <223> Xaa en la posición 21 es Glu o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(24)

30 <223> Xaa en la posición 24 es Ala o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (28)..(28)

35 <223> Xaa en la posición 28 es Lys o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> Xaa en la posición 29 es Gly o Cys

5 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (30)..(30)

<223> Xaa en la posición 30 es Gly o Cys

10 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> Xaa en la posición 31 es Pro o Cys

15 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (32)..(32)

<223> Xaa en la posición 32 es Ser, Pro, His o Cys

20 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (33)..(33)

<223> Xaa en la posición 33 es Ser, Arg, Thr, Trp, Lys o Cys

25 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (34)..(34)

<223> Xaa en la posición 34 es Ser, Gly o Cys

30 <220> <221> MISC_FEATURE

<222> (35)..(35)

<223> Xaa en la posición 35 es Ala, Asp, Arg, Glu, Lys, Gly o Cys

<220>

35 <221> MISC_FEATURE

<222> (36)..(36)

<223> Xaa en la posición 36 es Pro, Ala, Cys, está ausente o es un residuo modificado

<220>

<221> MOD_RES

<222> (36)..(36)

5 <223> AMIDACIÓN

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (37)..(37)

10 <223> Xaa en la posición 37 es Pro, Ala, Cys, está ausente o es un residuo modificado

<220>

<221> MOD_RES

<222> (37)..(37)

15 <223> AMIDACIÓN

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (38)..(38)

20 <223> Xaa en la posición 38 es Pro, Ala, Arg, Lys, His, Cys, está ausente o es un residuo modificado

<220>

<221> MOD_RES

<222> (38)..(38)

25 <223> AMIDACIÓN

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (39)..(39)

30 <223> Xaa en la posición 39 es Ser, His, Pro, Lys, Arg, Gly, Cys, está ausente o es un residuo modificado

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

35 <223> AMIDACIÓN

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (40)..(40)

<223> xaa en la posición 40 es His, Ser, Arg, Lys, Pro, Gly, Cys, está ausente o es un residuo modificado

5 <220>

<221> MOD_RES

<222> (40)..(40)

<223> AMIDACIÓN

10 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (41)..(41)

<223> Xaa en la posición 41 es His, Ser, Arg, Lys, Cys, está ausente o es un residuo modificado

15 <220>

<221> MOD_RES

<222> (41)..(41)

<223> AMIDACIÓN

20 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (42)..(42)

<223> Xaa en la posición 42 es Gly, His, Cys, está ausente o es un residuo modificado

25 <220>

<221> MOD_RES

<222> (42)..(42)

<223> AMIDACIÓN

30 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (43)..(43)

<223> Xaa en la posición 43 es Pro, His, Cys, está ausente o es un residuo modificado

35 <220>

<221> MOD_RES

<222> (43)..(43)

<223> AMIDACIÓN

<220>

<221> MISC_FEATURE

5 <222> (44)..(44)

<223> Xaa en la posición 44 es Ser, His, Cys, está ausente o es un residuo modificado

<220>

<221> MOD_RES

10 <222> (44)..(44)

<223> AMIDACIÓN

<400> 9

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 Gly Pro Xaa
20 25 30

15 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40

<210> 10

<211> 39

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

25 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa en la posición 1 es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, beta-hidroxi-histidina, homohistidina, alfa-fluorometil-histidina, alfa-metil-histidina, Arg, Tyr,

30

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa en la posición 2 es Gly, ser, Ala o Thr

<220>

5 <221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa en la posición 3 es Glu, Ala o Asp

<220>

10 <221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa en la posición 4 es Gly, Ala o Val

<220>

15 <221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa en la posición 5 es Thr, Cys o Ala

<220>

20 <221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa en la posición 6 es Phe, Cys, Ala o Tyr

<220>

25 <221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa en la posición 7 es Thr o Ser

<220>

30 <221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa en la posición 8 es Ser, Ala o Thr

<220>

35 <221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa en la posición 9 es Asp o Glu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

5 <223> Xaa en la posición 10 es Leu, Cys, Ala, Ile, Val o Met

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

10 <223> Xaa en la posición 11 es Ser o Ala

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

15 <223> xaa en la posición 12 es Lys o Ala

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

20 <223> Xaa en la posición 13 es Gln o Ala

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

25 <223> Xaa en la posición 14 es Met, Ala, Leu, Ile o val

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)

30 <223> Xaa en la posición 15 es Glu o Ala

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

35 <223> Xaa en la posición 16 es Glu, Cys o Ala

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> Xaa en la posición 17 es Glu, Cys o Ala

5 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (18)..(18)

<223> Xaa en la posición 18 es Ala o Cys

10 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (19)..(19)

<223> Xaa en la posición 19 es val, Cys o Ala

15 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> xaa en la posición 20 es Arg, Cys o Ala

20 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> Xaa en la posición 21 es Leu, Cys o Ala

25 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa en la posición 22 es Phe, Ala o Tyr

30 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (23)..(23)

<223> Xaa en la posición 23 es Ile, Val, Leu, Gly o Met

35 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> Xaa en la posición 24 es Glu, Cys, Ala o Asp

<220>

<221> MISC_FEATURE

5 <222> (25)..(25)

<223> Xaa en la posición 25 es Trp, Ala, Phe o Tyr

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <222> (26)..(26)

<223> Xaa en la posición 26 es Leu o Ala

<220>

<221> MISC_FEATURE

15 <222> (27)..(27)

<223> Xaa en la posición 27 es Lys o Ala

<220>

<221> MISC_FEATURE

20 <222> (28)..(28)

<223> Xaa en la posición 28 es Asn, Cys o Ala

<220>

<221> MISC_FEATURE

25 <222> (29)..(29)

<223> Xaa en la posición 29 es Gly o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

30 <222> (30)..(30)

<223> Xaa en la posición 30 es Gly o Cys

<220>

<221> MISC_FEATURE

35 <222> (31)..(31)

<223> xaa en la posición 31 es Pro o Cys

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa en la posición 32 es Ser, Cys, está ausente o es un residuo modificado
 5
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (32)..(32)
 <223> AMIDACIÓN
 10
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (33)..(33)
 <223> Xaa en la posición 33 es Ser, Cys, está ausente o es un residuo modificado
 15
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (33)..(33)
 <223> AMIDACIÓN
 20
 <220> <221> MISC_FEATURE
 <222> (34)..(34)
 <223> Xaa en la posición 34 es Gly, Cys, está ausente o es un residuo modificado
 25
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (34)..(34)
 <223> AMIDACIÓN
 30
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (35)..(35)
 <223> Xaa en la posición 35 es Ala, Cys, está ausente o es un residuo modificado
 35
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (35)..(35)

<223> AMIDACIÓN

<220>

<221> MISC_FEATURE

5 <222> (36)..(36)

<223> Xaa en la posición 36 es Pro, Cys, está ausente o es un residuo modificado

<220>

<221> MOD_RES

10 <222> (36)..(36)

<223> AMIDACIÓN

<220>

<221> MISC_FEATURE

15 <222> (37)..(37)

<223> Xaa en la posición 37 es Pro, Cys, está ausente o es un residuo modificado

<220>

<221> MOD_RES

20 <222> (37)..(37)

<223> AMIDACIÓN

<220>

<221> MISC_FEATURE

25 <222> (38)..(38)

<223> Xaa en la posición 38 es Pro, Cys, está ausente o es un residuo modificado

<220>

<221> MOD_RES

30 <222> (38)..(38)

<223> AMIDACIÓN

<220>

<221> MISC_FEATURE

35 <222> (39)..(39)

<223> Xaa en la posición 39 es Ser, Cys, está ausente o es un residuo modificado

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> AMIDACIÓN

5

<400> 10

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1				5					10					15		
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
			20					25					30			
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa										
			35													

10

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de GLP-1 PEGilado que comprende la secuencia de aminoácidos de Fórmula IV (SEC ID N° 6)

**Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Xaa₁₁-Xaa₁₂-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Xaa₁₉-Xaa₂₀-Glu-
Xaa₂₂-Xaa₂₃-Xaa₂₄-Xaa₂₅-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-
Xaa₃₆-Xaa₃₇-Xaa₃₈-Xaa₃₉-Xaa₄₀-Xaa₄₁-Xaa₄₂-Xaa₄₃-Xaa₄₄-Xaa₄₅-Xaa₄₆-Xaa₄₇**

Formula IV (SEQ ID NO: 6)

5

en la que:

Xaa₇ es: L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, α-fluorometil-histidina o α-metil-histidina;

Xaa₈ es: Val;

10

Xaa₁₁ es: Thr;

Xaa₁₂ es: Phe, Trp o Tyr;

Xaa₁₆ es: Val, Trp, Ile, Leu, Phe, Tyr o Cys;

Xaa₁₈ es: Ser, Trp, Tyr, Phe, Lys, Ile, Leu, Val;

Xaa₁₉ es: Tyr, Trp o Phe;

15

Xaa₂₀ es: Leu, Phe, Tyr o Trp;

Xaa₂₂ es: Gly, Glu, Asp o Lys;

Xaa₂₃ es: Gln;

Xaa₂₄ es: Ala;

Xaa₂₅ es: Ala, Val, Ile o Leu;

20

Xaa₂₆ es: Lys;

Xaa₂₇ es: Glu, Ile o Ala;

Xaa₃₀ es: Ala o Glu;

Xaa₃₃ es: Val o Ile;

Xaa₃₄ es: Lys, Asp, Arg o Glu;

25

Xaa₃₅ es: Gly;

Xaa₃₆ es: Gly, Pro o Arg;

Xaa₃₇ es: Gly, Pro o Ser;

Xaa₃₈ es: Ser, Pro, His o Cys;

Xaa₃₉ es: Ser, Arg, Thr, Trp o Lys;

30

Xaa₄₀ es: Ser o Gly;

Xaa₄₁ es: Ala, Asp, Arg, Glu, Lys o Gly;

Xaa₄₂ es: Pro, Ala, NH₂ o está ausente;

Xaa₄₃ es: Pro, Ala, NH₂ o está ausente;

Xaa₄₄ es: Pro, Ala, Arg, Lys, His, NH₂ o está ausente;

Xaa₄₅ es: Ser, His, Pro, Lys, Arg, Cys, NH₂ o está ausente;

Xaa₄₆ es: His, Ser, Arg, Lys, Cys, NH₂ o está ausente; y

Xaa₄₇ es: His, Ser, Arg, Lys, NH₂ o está ausente;

5

y en la que:

2 o 1 residuos de Cys están unidos covalentemente a una molécula de PEG; y a condición de que si , Xaa₄₂, Xaa₄₃, Xaa₄₄, Xaa₄₅ o Xaa₄₆ está ausente, cada aminoácido cadena abajo está ausente; y siempre que haya 2 o 1 Cys en la molécula.

10 2. Un compuesto de GLP-1 PEGilado de acuerdo con la reivindicación 1, a condición de que el compuesto de GLP-1 PEGilado no difiera de GLP-1 (7-37)OH en más de 3 aminoácidos dentro de los aminoácidos 7-37.

3. Un compuesto de GLP-1 PEGilado de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para su uso como medicamento.

15 4. Un compuesto de GLP-1 PEGilado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en el tratamiento de la diabetes no dependiente de insulina, la obesidad, el ictus, el infarto de miocardio, el síndrome del intestino irritable o la dispepsia funcional.

5. Un compuesto de GLP-1 PEGilado para usar de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en el que el medicamento se usa para tratar la diabetes no dependiente de insulina.

20 6. Un compuesto de GLP-1 PEGilado para usar de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el medicamento se usa para tratar la obesidad.