

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 772 223**

51 Int. Cl.:

C07K 14/575 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

A61K 47/54 (2007.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.06.2012 PCT/EP2012/060900**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.12.2012 WO12168432**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2012 E 12729418 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 2718316**

54 Título: **POLIPÉPTIDOS**

30 Prioridad:

10.06.2011 EP 11169405
13.06.2011 US 201161496113 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.07.2020

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)
Novo Allé
2880 Bagsværd, DK

72 Inventor/es:

SCHÄFFER, LAUGE;
KRUSE, THOMAS y
THØGERSEN, HENNING

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 772 223 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos

5 Campo de la invención

La invención se refiere a polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que es un análogo de la SEQ ID NO: 2 (pramlintida), composiciones farmacéuticas que comprenden estos polipéptidos y estos polipéptidos para su uso como medicamentos.

10

Antecedentes de la invención

Un número grande y creciente de personas sufre de diabetes mellitus y obesidad. La diabetes mellitus es un trastorno metabólico, en el cual la capacidad de utilizar glucosa se pierde parcial o completamente.

15

Varios regímenes de tratamiento se dirigen al exceso de glucosa en sangre, mientras que otros se centran principalmente en la reducción de peso. Los agentes antidiabéticos más eficientes usados para reducir la glucosa en sangre son la insulina y sus análogos. Se sabe desde hace mucho tiempo que cuando la insulina tradicional se usa para tratar la diabetes, se asocia con un aumento en el peso corporal. La insulina debe inyectarse por vía subcutánea hasta varias veces al día.

20

La diabetes tipo 2 generalmente se trata en las primeras fases con dieta y ejercicio. A medida que la condición progresa, se añaden varios agentes antidiabéticos orales. Los agentes inyectados tales como los análogos de GLP-1 también se pueden usar en esta etapa. En general, estos agentes son más eficientes en pacientes con células beta funcionales capaces de liberar insulina y amilina.

25

La amilina humana (SEQ ID No: 1) es un polipéptido de 37 aminoácidos de longitud que tiene propiedades fisicoquímicas que hacen que su uso como un fármaco sea problemático. En particular, tiene una tendencia a la fibrillogénesis, es decir, la formación de fibrillas, *in vitro* y/o *ex vivo* y se vuelve ineficaz debido a la precipitación. Además, la amilina es difícil de formular ya que es químicamente inestable y precipita a pH fisiológico. Por lo tanto, se formula en solución ácida.

30

La amilina humana se une a dos complejos receptores distintos. Estos dos complejos contienen el receptor de calcitonina más una proteína modificadora de la actividad del receptor, RAMP1 o RAMP3. A partir de la estrecha relación entre el receptor de calcitonina y el receptor de amilina, se puede esperar cierta reactividad cruzada con el receptor de calcitonina del agonista del receptor de amilina. Como un ejemplo, la pramlintida tiene cierta afinidad con el receptor de calcitonina pero es 14 veces más potente sobre el receptor de amilina.

35

El receptor de calcitonina se encuentra en muchos tejidos en todo el cuerpo y se cree que está involucrado en la regulación del metabolismo óseo. La calcitonina de salmón se vende actualmente con el nombre comercial Miacalcic®. El producto se usa contra la hipercalcemia, la osteoporosis (incluida la osteoporosis posmenopáusica y la osteoporosis relacionada con los glucocorticoides), la osteitis deformante (enfermedad de Pagets) y se administra una vez al día mediante inyección o por vía nasal. La calcitonina se une a receptores específicos en la membrana del esqueleto, los riñones y el sistema nervioso central (CNS). La vida media plasmática para la calcitonina de salmón es de aproximadamente 45 minutos.

40

45

Los polipéptidos con actividad en el receptor de calcitonina podrían ser útiles en el tratamiento de la hipercalcemia, osteoporosis, enfermedad de Pagets, obesidad o enfermedades relacionadas con la obesidad, así como también en la prevención de enfermedades relacionadas con la obesidad. Un inconveniente del tratamiento con las preparaciones de calcitonina usadas actualmente es que, debido a la corta vida media en plasma de la calcitonina de salmón, el fármaco debe administrarse varias veces al día y debe administrarse inmediatamente antes de una comida.

50

Los polipéptidos con doble actividad tanto en el receptor de calcitonina como en el receptor de amilina pueden ser ventajosos.

55

La pramlintida (SEQ ID No: 2) es un producto farmacéutico comercializado por Amylin Pharmaceuticals, como Symlin® para el tratamiento de la diabetes como un complemento de la insulina. La pramlintida es un agonista del receptor de amilina. Es aproximadamente 14 veces menos activo sobre el receptor de calcitonina.

60

La estructura química de la pramlintida se presenta a continuación y también en la Figura 1.

65



La pramlintida es químicamente inestable a pH neutro y, por lo tanto, se proporciona en una solución ácida. En comparación con la amilina humana, los aminoácidos en las posiciones 25, 28 y 29 en pramlintida se sustituyen con prolina. Esta modificación reduce la tendencia de la proteína a la fibrilogénesis. La pramlintida tiene una vida media en plasma muy corta y, por lo tanto, debe inyectarse dos o tres veces al día.

Los documentos WO2010046357 y WO2009034119 describen polipéptidos que comprenden análogos de amilina que tienen un residuo de unión a albúmina (llamados derivados de amilina en el mismo). Aunque estos polipéptidos con restos de unión a albúmina muestran propiedades farmacocinéticas (PK) o farmacodinámicas (PD) mejoradas en comparación con la pramlintida, aún pueden mostrar una estabilidad física pobre bajo ciertas condiciones.

El documento WO2011064282 se refiere a un proceso para fabricar polipéptidos en una cepa de levadura genéticamente modificada, que describe específicamente un precursor para crear un compuesto de Pramlintida con una amida C-terminal.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con la Fórmula (I):

Xaa₁-Cys- Xaa₃-Thr-Ala-Thr-Cys-Ala-Thr-Gln-Arg-Leu-Ala-Xaa₁₄-Phe-Leu- Xaa₁₇-Xaa₁₈-Ser-Ser- Xaa₂₁- Xaa₂₂- Phe-Gly- Pro- Xaa₂₆-Leu-Pro-Pro-Thr- Xaa₃₁-Val-Gly-Ser- Xaa₃₅-Thr-Pro

en donde

Xaa₁ se elimina o se selecciona independientemente de Ala, Cys, Glu, Gly, His, Arg, Ser y Lys;

Xaa₃ se selecciona independientemente de Gly, His, Arg, Ser y Asn;

Xaa₁₄ se selecciona independientemente de Glu;

Xaa₁₇ se selecciona independientemente de His, Arg, Lys y Val;

Xaa₁₈ se selecciona independientemente de Arg, Lys e His;

Xaa₂₁ se selecciona independientemente de Ala, Lys, Gln, Ser y Asn;

Xaa₂₂ se selecciona independientemente de Glu, Gln, Ser, Thr y Asn;

Xaa₂₆ se selecciona independientemente de Pro, Arg e Ile;

Xaa₃₁ se selecciona independientemente de Ser, Glu, Asp y Asn;

Xaa₃₅ se selecciona independientemente de His, Arg, Lys, Asp, Gln y Glu;

en donde el C-terminal del polipéptido es una amida;

y en donde el C-terminal puede, opcionalmente, derivarse;

y en donde el polipéptido es un agonista del receptor de amilina.

Opcionalmente, el polipéptido tiene una EC₅₀ en un ensayo de potencia del receptor de amilina humana, tal como el que se describe en la presente descripción, de aproximadamente 1800 pM o menos. Opcionalmente, el polipéptido tiene una EC₅₀ en un ensayo de potencia del receptor de calcitonina humana, tal como el que se describe en la presente descripción, de aproximadamente 1800 pM o menos. Opcionalmente, el polipéptido tiene una solubilidad a pH 4 de aproximadamente 100 μM o más en un ensayo de solubilidad, tal como el que se describe en la presente descripción. Opcionalmente, el polipéptido tiene una solubilidad a pH 7 de aproximadamente 100 μM o más en un ensayo de solubilidad, tal como el que se describe en la presente descripción. Opcionalmente, el polipéptido tiene una estabilidad física de aproximadamente 25 horas o más en el ensayo de fibrilogénesis (también denominado ensayo de fibrilación), tal como el que se describe en la presente descripción. Opcionalmente, el polipéptido tiene al menos un sustituyente unido a al menos uno de sus residuos de aminoácidos.

Al menos en algunas modalidades, los polipéptidos de la presente invención tienen una solubilidad incrementada.

Al menos en algunas modalidades, los polipéptidos de la presente invención tienen una estabilidad física incrementada.

Al menos en algunas modalidades, los polipéptidos de la presente invención tienen una solubilidad y estabilidad física incrementada.

Al menos en algunas modalidades, los polipéptidos de la presente invención muestran un perfil farmacocinético ventajoso y/o un perfil farmacológico ventajoso. Un ejemplo de un perfil farmacocinético ventajoso es un perfil de acción prolongada.

La presente invención también se refiere a formulaciones farmacéuticas que comprenden los mismos. La presente invención también se refiere a usos farmacéuticos de la misma. La presente invención también se refiere al suministro (tal como la administración) de la misma a pacientes que necesitan del tratamiento de la misma.

En otro aspecto, la invención comprende además una composición farmacéutica que comprende el polipéptido anterior.

En otro aspecto, la invención comprende además un proceso para preparar una composición farmacéutica que comprende el polipéptido anterior.

En otro aspecto, la invención comprende además el polipéptido anterior para uso como un medicamento.

Los polipéptidos de la presente invención son ventajosos ya que poseen una solubilidad y/o estabilidad física mejoradas.

Los ensayos adecuados usados para determinar la potencia en los receptores de amilina y calcitonina, así como también para determinar la solubilidad y la estabilidad física de los polipéptidos, se describen en la presente descripción. Por ejemplo, ver Ensayo (II), (IV) y (III) respectivamente.

La figura 1 presenta una estructura.

La figura 2 presenta una estructura.

La figura 3 presenta una estructura.

La figura 4 presenta una estructura.

Definiciones

El término "**amilina humana**", como se usa en la presente descripción, se refiere al polipéptido de amilina humana que tiene la secuencia como se representa en la SEQ ID NO: 1. El término incluye, pero no se limita a, una hormona polipeptídica humana de 37 aminoácidos referida como amilina, que en la naturaleza se cosecreta con insulina de las células β del páncreas. La amilina humana tiene la siguiente secuencia primaria de aminoácidos:

Lys-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Ala-Thr-Gln-Arg-Leu-Ala-Asn-Phe-Leu-Val-His-Ser-Ser-Asn-Asn-Phe-Gly-Ala-Ile-Leu-Ser-Ser-Thr-Asn-Val-Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr (**SEQ ID NO: 1**)

La amilina humana tiene un puente disulfuro entre los dos residuos de Cys y un grupo amida C-terminal. Esta estructura se muestra a continuación y también en la Figura 4.



En la presente descripción, SEQ ID No: 1 y amilina humana se pueden usar indistintamente.

El término "**pramlintida**", como se usa en la presente descripción, se refiere al polipéptido sintético que tiene la secuencia como se representa en la SEQ ID NO 2. La pramlintida tiene la siguiente secuencia primaria de aminoácidos:

Lys-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Ala-Thr-Gln-Arg-Leu-Ala-Asn-Phe-Leu-Val-His-Ser-Ser-Asn-Asn-Phe-Gly-Pro-Ile-Leu-Pro-Pro-Thr-Asn-Val-Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr (**SEQ ID NO: 2**)

La pramlintida tiene un puente disulfuro entre los dos residuos de Cys y un grupo amida C-terminal. Esta estructura se muestra a continuación y también en la Figura 1.



En la presente descripción, SEQ ID No: 2 y pramlintida humana se pueden usar indistintamente.

El término "**calcitonina**" significa calcitonina de salmón o calcitonina humana.

El término "**calcitonina de salmón**" o "**sCT**" significa la secuencia de proteína nativa de calcitonina de salmón como se describe en Niall y otros (1969), *Biochemistry vol 64*, Figura 2. La calcitonina de salmón es un polipéptido que consiste en 32 aminoácidos. Tiene un puente disulfuro entre el primer y el séptimo aminoácido en el extremo amino terminal de la cadena polipeptídica, siendo el puente disulfuro esencial para su actividad biológica y un grupo de prolinamida en el aminoácido carboxilo terminal.

El término "**calcitonina humana**" significa la secuencia de proteína nativa de calcitonina humana como se describe en Niall y otros (1969), *Biochemistry vol 64*, Figura 2. La calcitonina humana es un polipéptido que consiste en 32 aminoácidos. Tiene un puente disulfuro entre el primer y el séptimo aminoácido en el extremo amino terminal de la cadena polipeptídica, siendo el puente disulfuro esencial para su actividad biológica y un grupo de prolinamida en el aminoácido carboxilo terminal.

El término "**análogo de amilina**" o "**análogo de amilina**", como se usa en la presente descripción, se refiere a una variante de la SEQ ID NO: 1.

El término "**análogo de pramlintida**" o "**análogo de pramlintida**", como se usa en la presente descripción, se refiere a una variante de la SEQ ID NO: 2.

Por ejemplo, dichas variantes incluyen, pero no se limitan a, una o más sustituciones y/o una o más deleciones y/o una o más adiciones de cualquiera de los residuos de aminoácidos para cualquier aminoácido natural o no natural, aminoácidos sintéticos o peptidomiméticos y/o la unión de un sustituyente a cualquiera de los aminoácidos naturales o no naturales, aminoácidos sintéticos o peptidomiméticos en cualquier posición disponible.

La variante puede tener el mismo número de residuos de aminoácidos que la pramlintida (es decir, 37). Alternativamente, la variante puede comprender menos residuos de aminoácidos que la pramlintida. Alternativamente, la variante puede comprender más residuos de aminoácidos que la pramlintida. En algunas modalidades, la variante tiene el mismo número de residuos de aminoácidos que la pramlintida (es decir, 37). En algunas modalidades, la variante incluye sustituciones de cualquiera de los residuos de aminoácidos por cualquier aminoácido natural o no natural, aminoácidos sintéticos o peptidomiméticos y/o la unión de un sustituyente a cualquiera de los aminoácidos naturales o no naturales, aminoácidos sintéticos o peptidomiméticos en cualquier posición disponible.

El polipéptido puede comprender una o más sustituciones de aminoácidos. Por lo tanto, para algunas modalidades, el número de sustituciones de aminoácidos en el análogo de amilina puede ser al menos uno. Preferentemente, el número de sustituciones amino está entre uno y quince, con mayor preferencia entre uno y doce, con mayor preferencia entre uno y diez, con mayor preferencia entre uno y cinco, con mayor preferencia entre uno y tres.

El número de inserciones, adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos puede ser al menos 1, pero hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 inserciones, adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos pueden estar. La sustitución o adición puede ser con cualquier aminoácido natural o no natural, aminoácidos sintéticos, peptidomiméticos u otros compuestos químicos. La adición o deleción de residuos de aminoácidos puede tener lugar en el N-terminal del péptido y/o en el C-terminal del péptido.

Cuando se usa en la presente descripción el término "**aminoácido natural**" es un aminoácido (con los códigos habituales de tres letras & códigos de una letra entre paréntesis) seleccionados del grupo que consiste en: Glicina (Gly & G), prolina (Pro & P), alanina (Ala & A), valina (Val & V), leucina (Leu & L), isoleucina (Ile & I), metionina (Met & M), cisteína (Cys & C), fenilalanina (Phe & F), tirosina (Tyr & Y), triptófano (Trp & W), histidina (His & H), lisina (Lys & K), arginina (Arg & R), glutamina (Gln & Q), asparagina (Asn & N), ácido glutámico (Glu & E), ácido aspártico (Asp & D), serina (Ser & S) y treonina (Thr & T). Si, debido a errores de escritura, hay desviaciones de los códigos de uso común, se aplican los códigos de uso común. Los aminoácidos presentes en los polipéptidos de la presente invención son, preferentemente, aminoácidos que pueden codificarse por un ácido nucleico.

Si el análogo contiene más de 37 residuos de aminoácidos o menos de 37 residuos de aminoácidos, la persona experta aún puede alinear esa secuencia con la secuencia de pramlintida (SEQ ID No. 2) para determinar el número de ubicación del correspondiente respectivo residuo de aminoácido. Un programa de alineamiento adecuado es "needle", que es un alineamiento de Needleman-Wunsch. El algoritmo para el programa de alineamiento se describe en Needleman, S.B. y Wunsch, C.D., (1970), *Journal of Molecular Biology*, 48: 443-453.

En la secuencia de numeración de la SEQ ID No: 2, y de acuerdo con la práctica establecida en la técnica, al residuo de aminoácido en el N-terminal (Lys) se le asigna núm. 1 y los residuos de aminoácidos subsecuentes se numeran consecutivamente, terminando en el C-terminal con el núm. de tirosina asignado. 37. Por lo tanto, en general, cualquier referencia en la presente descripción al número de la posición de un residuo de aminoácido proporciona su ubicación en una secuencia de 37 aminoácidos; dicha secuencia de 37 aminoácidos siendo un análogo de pramlintida. Por ejemplo, una referencia a un análogo modificado en la posición 14 puede referirse a un análogo en donde se ha modificado el 14to residuo amino de los 37 aminoácidos en el análogo.

En otras palabras, la numeración de la secuencia de aminoácidos del análogo proporciona la posición de cada análogo con respecto a una secuencia de 37 aminoácidos, en donde la numeración es consecutiva y ascendente en la dirección del N-terminal al C-terminal.

Los análogos pueden describirse por referencia al número del residuo de aminoácido en pramlintida o amilina humana que se modifica, es decir, por su posición, y la naturaleza de la modificación. Los siguientes son ejemplos no limitantes de la nomenclatura apropiada de los análogos.

5 Por ejemplo:

[Pro37]-pramlintida designa un análogo de la SEQ ID No: 2 (pramlintida) en donde el cambio de pramlintida es la sustitución de Tyr en la posición 37 con Pro.

10 [Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida designa un análogo de la SEQ ID No: 2 (pramlintida), en el que la Asn en la posición 14 ha sido sustituida con Glu, la Val en la posición 17 ha sido sustituida con Arg, y la Tyr en la posición 37 ha sido sustituida con Pro.

15 Como un ejemplo adicional, des1 (o Des¹) con relación a un análogo de pramlintida se refiere a un análogo en el que se ha eliminado el aminoácido N-terminal, Lisina. Un análogo de pramlintida, donde se ha eliminado el aminoácido N-terminal, también se puede designar des 1 pramlintida.

20 [Pro25,Pro28,Pro29]-amilina humana designa un análogo de la SEQ ID NO: 1 (amilina humana) en donde las modificaciones de la amilina humana son que la Ala en la posición 25 y las Cys en las posiciones 28 y 29 han sido sustituidos con Pro. Este polipéptido es pramlintida. En consecuencia, se entenderá que la pramlintida es un análogo de la amilina humana. Por lo tanto, 'análogos de pramlintida' y 'análogos de amilina' pueden usarse indistintamente.

25 Como es evidente a partir de los ejemplos anteriores, los residuos de aminoácidos pueden identificarse por su nombre completo, su código de una letra y/o su código de tres letras. Estas tres maneras son completamente equivalentes.

30 Las expresiones "conforme a", "corresponde a", "una posición equivalente a" o "posición correspondiente", como se usa en la presente descripción, se pueden usar para caracterizar el sitio de modificación en un análogo de pramlintida por referencia a la SEQ ID No: 2. Las posiciones equivalentes o correspondientes se deducen fácilmente, por ejemplo por simple escritura e inspección visual; y/o puede usarse un programa estándar de alineamiento de proteínas o péptidos, tal como "needle" que se basa en un alineamiento de Needleman-Wunsch. El algoritmo se describe en Needleman, S.B. y Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48: 443-453, y el programa align por Myers y W. Miller en "Optimal Alignments in Linear Space" CABIOS (aplicaciones informáticas en las biociencias) (1988) 4:11-17. Para el alineamiento, puede usarse la matriz de puntuación predeterminada BLOSUM62 y la matriz de identidad predeterminada, y la penalización para el primer residuo en una interrupción puede fijarse en -10 y las penalizaciones para residuos adicionales en una interrupción en -0,5.

40 El polipéptido puede comprender uno o más sustituyentes en uno o más de los residuos de aminoácidos. Tales polipéptidos también pueden denominarse derivados de pramlintida o derivados de amilina.

45 El término "**sustituyente**", como se usa en la presente descripción, significa cualquier resto adecuado unido, en particular unido covalentemente, a un residuo de aminoácido, en particular a cualquier posición disponible en un residuo de aminoácido. Típicamente, el resto adecuado es un resto químico.

Para algunas modalidades el sustituyente comprende un enlazador.

50 Para algunas modalidades, el polipéptido tiene un sustituyente en un residuo de aminoácido, cuyo residuo de aminoácido es el residuo de aminoácido en el residuo N-terminal o el residuo de aminoácido es una Lisina.

Para algunas modalidades, el polipéptido tiene un sustituyente en el residuo de aminoácido N-terminal unido a través del grupo α (alfa)-amino del residuo de aminoácido N-terminal.

55 Para algunas modalidades, el residuo de aminoácido N-terminal es Lisina y el polipéptido tiene un sustituyente en el residuo de aminoácido N-terminal unido a través del grupo ϵ (épsilon)-amino del residuo amino de lisina.

Para algunas modalidades, el polipéptido se extiende mediante la adición de un residuo de lisina en el N-terminal y el polipéptido tiene un sustituyente en el resto de aminoácido N-terminal unido a través del grupo ϵ -amino del residuo amino de lisina.

60 Para algunas modalidades, el polipéptido se extiende mediante la adición de un residuo de aminoácido en el N-terminal y el polipéptido tiene un sustituyente en el residuo de aminoácido N-terminal unido a través del grupo α -amino del residuo de aminoácido N-terminal.

65 Como se usa en la presente descripción, el término "**hidrocarbilo**" se refiere a un grupo que comprende al menos carbono e hidrógeno que puede comprender opcionalmente uno o más sustituyentes adecuados. Los ejemplos de tales sustituyentes pueden incluir un grupo hidroxilo, alquilo, halo, alcoxi, haloalquilo, haloalcoxi, amino, aminoalquilo o

cíclico. Además de la posibilidad de que los sustituyentes sean un grupo cíclico, una combinación de sustituyentes puede formar un grupo cíclico. Si el grupo hidrocarbilo comprende más de un átomo de carbono, entonces esos átomos de carbono no necesitan estar necesariamente unidos entre sí. Por ejemplo, al menos dos de los átomos de carbono pueden estar unidos mediante un átomo o grupo adecuado. Por lo tanto, el grupo hidrocarbilo puede contener heteroátomos. Los heteroátomos adecuados serán evidentes para los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, azufre, nitrógeno, oxígeno, fósforo y silicio. En una modalidad, el grupo hidrocarbilo se selecciona del grupo que consiste en un grupo alquilo, un grupo alquenilo, un grupo alquinilo, un grupo arilo, un grupo heteroarilo o un grupo cicloalquilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido. Los ejemplos de tales sustituyentes pueden incluir un grupo hidroxilo, alquilo, halo, alcoxi, haloalquilo, haloalcoxi, amino, aminoalquilo o cicloalquilo.

Como se usa en la presente descripción, el término "**alquilo**" incluye tanto grupos alquilo saturados de cadena lineal como ramificados que pueden estar sustituidos (mono o poli) o no sustituidos. Preferentemente, el grupo alquilo es un grupo alquilo C₁₋₂₀, con mayor preferencia un C₁₋₁₅, con mayor preferencia un grupo alquilo C₁₋₁₀, con mayor preferencia un grupo alquilo C₁₋₈, con mayor preferencia un grupo alquilo C₁₋₆. Los grupos alquilo particularmente preferidos incluyen, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo, *n*-butilo, *sec*-butilo, *iso*-butilo, *tert*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, *n*-heptilo y *n*-octilo. Los sustituyentes adecuados incluyen, por ejemplo, un grupo hidroxilo, alquilo, halo, alcoxi, haloalquilo, haloalcoxi, amino, aminoalquilo o cicloalquilo.

Como se usa en la presente descripción, el término "**cicloalquilo**" se refiere a un grupo alquilo cíclico que puede estar sustituido (mono o poli) o no sustituido. Los sustituyentes adecuados incluyen, por ejemplo, un grupo hidroxilo, alquilo, halo, alcoxi, haloalquilo, haloalcoxi, amino, aminoalquilo o cicloalquilo.

Como se usa en la presente descripción, el término "**alquenilo**" se refiere a una cadena de carbono que contiene uno o más dobles enlaces carbono-carbono, que pueden ser ramificados o no ramificados, y sustituidos (mono o poli) o no sustituidos. Preferentemente el grupo alquenilo es un grupo alquenilo C₂₋₂₀, con mayor preferencia un grupo alquenilo C₂₋₁₅, con mayor preferencia un grupo alquenilo C₂₋₁₀, con mayor preferencia un grupo alquenilo C₂₋₈, o con mayor preferencia un grupo alquenilo C₂₋₆. Los sustituyentes adecuados incluyen, por ejemplo, un grupo hidroxilo, alquilo, halo, alcoxi, haloalquilo, haloalcoxi, amino, aminoalquilo o cicloalquilo.

Como se usa en la presente descripción, el término "**alquinilo**" se refiere a una cadena de carbono que contiene uno o más triples enlaces carbono-carbono, que pueden ser ramificados o no ramificados, y sustituidos (mono o poli) o no sustituidos. Preferentemente el grupo alquinilo es un grupo alquinilo C₂₋₂₀, con mayor preferencia un grupo alquinilo C₂₋₁₅, con mayor preferencia un grupo alquinilo C₂₋₁₀, con mayor preferencia un grupo alquinilo C₂₋₈, o con mayor preferencia un grupo alquinilo C₂₋₆. Los sustituyentes adecuados incluyen, por ejemplo, un grupo hidroxilo, alquilo, halo, alcoxi, haloalquilo, haloalcoxi, amino, aminoalquilo o cicloalquilo.

Como se usa en la presente descripción, el término "**arilo**" se refiere a un grupo aromático C₆₋₁₀ que puede estar sustituido (mono o poli) o no sustituido. Los ejemplos típicos incluyen fenilo y naftilo, etc. Los sustituyentes adecuados incluyen, por ejemplo, un grupo hidroxilo, alquilo, halo, alcoxi, haloalquilo, haloalcoxi, amino, aminoalquilo o cicloalquilo.

Como se usa en la presente descripción, el término "**heteroarilo**" se refiere a un grupo arilo como se definió anteriormente que contiene uno o más heteroátomos. Los heteroátomos adecuados serán evidentes para los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, azufre, nitrógeno, oxígeno, fósforo y silicio. Los sustituyentes adecuados incluyen, por ejemplo, un grupo hidroxilo, alquilo, halo, alcoxi, haloalquilo, haloalcoxi, amino, aminoalquilo o cicloalquilo.

El término "**enlazador**" como se usa en la presente descripción incluye sustituyentes adecuados que pueden unir un resto, tal como un resto químico, al polipéptido, tal como la cadena principal del polipéptido. Por lo tanto, el enlazador y el resto químico se convierten en un sustituyente juntos. El resto unido al enlazador puede ser cualquier resto adecuado. Los ejemplos incluyen un resto de unión a albúmina.

En una modalidad, el resto de unión a albúmina tiene de 6 a 40 átomos de carbono, de 8 a 26 átomos de carbono o de 14 a 22 átomos de carbono, por ejemplo 16, 17, 18, 19, 20 átomos de carbono.

En otra modalidad el resto de unión a albúmina es un grupo acilo seleccionado del grupo que comprende CH₃(CH₂)_rCO-, en donde r es un número entero de 4 a 38, preferentemente un número entero de 4 a 24, con mayor preferencia seleccionado del grupo que comprende CH₃(CH₂)₆CO-, CH₃(CH₂)₈CO-, CH₃(CH₂)₁₀CO-, CH₃(CH₂)₁₂CO-, CH₃(CH₂)₁₄CO-, CH₃(CH₂)₁₆CO-, CH₃(CH₂)₁₈CO-, CH₃(CH₂)₂₀CO- y CH₃(CH₂)₂₂CO-.

En una modalidad, el resto de unión a albúmina comprende un grupo que puede cargarse negativamente a pH 7,4.

En una modalidad, el resto de unión a albúmina comprende un grupo de ácido carboxílico, tal como HOOC(CH₂)_sCO-, en donde s es un número entero de 12 a 22. Preferentemente s es 16 o 18.

En una modalidad, el resto unido al enlazador es un resto de unión a albúmina.

Por ejemplo, el enlazador puede comprender uno o dos aminoácidos que en un extremo se unen al resto, tal como un resto de unión a albúmina, y en el otro extremo se unen a cualquier posición disponible en la cadena principal del polipéptido.

5 En algunas modalidades, el enlazador proporciona un puente o enlace entre un grupo amino en la cadena principal del polipéptido y un grupo acilo en el resto, tal como un resto de unión a albúmina. El enlazador puede estar unido o cerca del residuo de aminoácido N terminal. Preferentemente, el enlazador está unido al aminoácido en la posición 1 del análogo de pramlintida.

10 Otro ejemplo de un enlazador es una combinación de al menos un aminoácido y una amina.

En una modalidad, preferentemente la amina es el grupo OEG, en donde la fórmula de OEG se muestra a continuación:



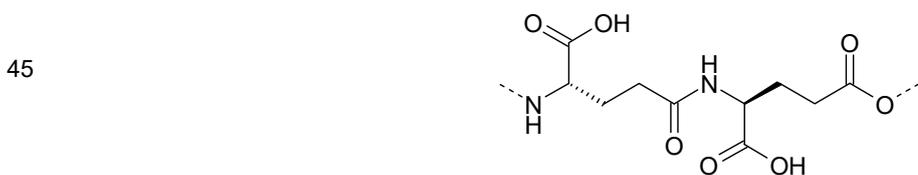
20 Para algunas modalidades, preferentemente el enlazador se selecciona del grupo que consiste en γ Glu, γ Glu- γ Glu, γ Glu- γ Glu- γ Glu, γ Glu- γ Glu- γ Glu- γ Glu, Glu, Glu-Glu, Glu- γ Glu, Glu-Arg, Glu-Glu-Arg, His, His-His, His- γ Glu, His-His- γ Glu, Gly, Gly- γ Glu, Ser, Ser- γ Glu, D-Arg-D-Arg, Arg, Arg-Arg, Arg-Arg- γ Glu, Ser-Ser-, Gly-Ser-Ser, Ser-Ser-, Gly-Ser-Ser- γ Glu, Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly and Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly- γ Glu, γ Glu-OEG, γ Glu-2xOEG y OEG, preferentemente el enlazador se selecciona de γ Glu, γ Glu- γ Glu, γ Glu-OEG, γ Glu-2xOEG y OEG, con mayor preferencia el enlazador es γ Glu- γ Glu.

25 El enlazador puede contribuir a y/o potenciar el efecto de unión del resto (por ejemplo, el resto de unión a albúmina), por ejemplo, un enlazador que comprende γ Glu puede potenciar el efecto de unión a albúmina del polipéptido.

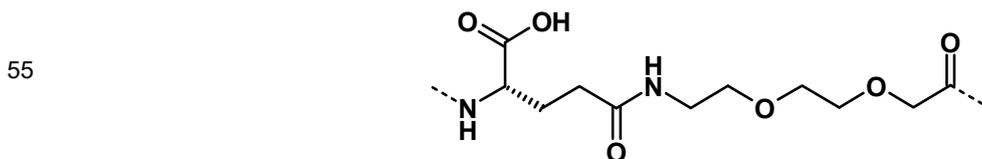
Al usar el término " **γ Glu "o" gGlu "o gammaGlu o gamma-L-Glu**" se entiende un aminoácido con la siguiente estructura (también se muestra en la Figura 2):



40 Al usar el término " **γ Glu- γ Glu**" se entiende un resto con la siguiente estructura:

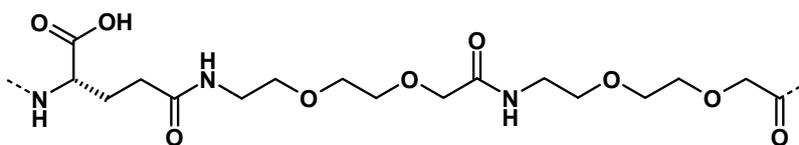


50 Al usar el término " **γ Glu-OEG**" se entiende un resto con la siguiente estructura:



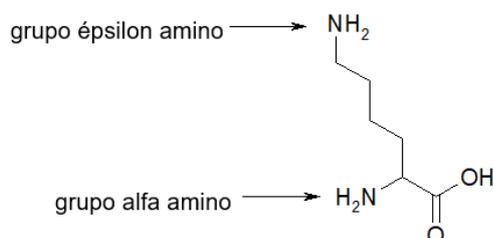
60 Al usar el término " **γ Glu-OEG-OEG**" se entiende un resto con la siguiente estructura:

65



El término "**grupo épsilon amino**" o "**grupo ϵ -amino**", como se usa en la presente descripción en relación con la lisina, se refiere al grupo amino en la 6^{ta} posición, usando las convenciones de numeración estándar de IUPAC.

El término "**grupo alfa amino**" o "**grupo α -amino**" se refiere al grupo amino en la 2^{da} posición, usando las convenciones de numeración estándar de IUPAC. Nos referimos a la siguiente estructura (también se muestra en la Figura 3).



El término "**resto de unión a albúmina**", como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier grupo químico capaz de unirse a la albúmina, es decir, tiene afinidad de unión a la albúmina. En una modalidad, el resto de unión a albúmina es un grupo acilo.

En algunas modalidades, preferentemente el resto de unión a albúmina es un grupo acilo seleccionado de:

(a) CH₃(CH₂)_rCO-, en donde r es un número entero de 4 a 24;

(b) HOOC(CH₂)_sCO-, en donde s es un número entero de 14 a 20, por ejemplo 16 o 18.

La "**afinidad de unión a la albúmina**" puede determinarse por varios métodos conocidos en la técnica. En un método, el compuesto a medir se radiomarca con, por ejemplo, ¹²⁵I o ³H y se incuban con albúmina inmovilizada (Kurtzhals y otros, Biochem.J., 312, 725-731 (1995)). Se calcula la unión del compuesto con relación a un estándar. En otro método, un compuesto relacionado se radiomarca y su unión a la albúmina inmovilizada, por ejemplo, en perlas de SPA, compete con una serie de diluciones del compuesto a medir. El valor EC₅₀ para la competencia es una medida de la afinidad del compuesto. En un tercer método, la afinidad o potencia del receptor de un compuesto se mide a diferentes concentraciones de albúmina, y el cambio en la afinidad o potencia relativa del compuesto en función de la concentración de albúmina refleja su afinidad por la albúmina.

Los polipéptidos de la presente invención exhiben buena potencia. El término "**potencia**" se usa para describir el efecto de un compuesto dado en ensayos donde se ha establecido una relación sigmoide entre la concentración logarítmica y el efecto de un compuesto. Además, la respuesta debe ser variable de 0 a 100 %. EC(concentración efectiva)₅₀ puede usarse para describir la concentración de un compuesto dado que produce una respuesta del 50 % en el ensayo, tal como en el ensayo funcional.

Los polipéptidos de la presente invención exhiben buena actividad. El término "**actividad**" se refiere a la capacidad de reducir el apetito y/o aumentar la saciedad. La actividad se puede medir por la capacidad de reducir el apetito como, por ejemplo, se describe en el Ensayo (I) en la presente descripción.

Los polipéptidos de la presente invención exhiben buena estabilidad física. El término "estabilidad física" de un polipéptido de acuerdo con la invención, o una formulación del mismo se refiere a la tendencia del polipéptido a no formar agregados biológicamente inactivos y/o insolubles como un resultado de exponer a estrés termo-mecánico y/o a la interacción con interfaces y superficies que son desestabilizantes, tales como superficies e interfaces hidrofóbicas. La estabilidad física de las formulaciones de polipéptidos acuosos puede evaluarse por medio de inspección visual, ensayo de fibrilación ThT (a veces denominado ensayo de fibrillogénesis ThT) y/o mediciones de turbidez como se describe en otra parte de la presente descripción. La inspección visual de las formulaciones se realiza en una luz nítida enfocada con un fondo oscuro. La turbidez de la formulación se caracteriza por una puntuación visual que clasifica el grado de turbidez, por ejemplo, en una escala de 0 a 3 (una formulación que no muestra turbidez corresponde a una puntuación visual de 0 y una formulación que muestra turbidez visual a la luz del día corresponde a una puntuación visual de 3). Una formulación se clasifica inestable físicamente con respecto a la agregación de proteínas, cuando muestra turbidez visual a la luz del día. Alternativamente, la turbidez de la formulación puede evaluarse mediante mediciones simples de turbidez bien conocidas por los expertos.

Los polipéptidos de la presente invención exhiben buena estabilidad química. El término "**estabilidad química**" de un polipéptido de acuerdo con la invención o de una formulación del mismo se refiere a la ausencia de cambios covalentes químicos en la estructura del polipéptido, evitando así la formación de productos de degradación química con una potencia potencialmente menor y/o propiedades inmunogénicas potencialmente aumentadas en comparación con la estructura del polipéptido original (nativo). Pueden formarse diversos productos de degradación química en dependencia del tipo y la naturaleza del polipéptido parental y del entorno al que se expone el polipéptido. La eliminación de la degradación química puede probablemente no evitarse completamente y a menudo se observan cantidades aumentadas de productos de degradación química durante el almacenamiento y el uso de las formulaciones polipeptídicas como es bien conocido por el experto en la técnica. La mayoría de los polipéptidos son propensas a la desamidación, un proceso en el que se hidroliza el grupo amida de la cadena lateral en residuos glutaminilo o asparaginilo para formar un ácido carboxílico libre. Otras rutas de degradación implican la formación de productos de transformación de alto peso molecular donde dos o más moléculas de polipéptidos se unen covalentemente entre sí mediante transamidación y/o interacciones disulfuro que conducen a la formación de productos de degradación de dímeros, oligómeros y polímeros unidos covalentemente (*Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern. T.J. & Manning M.C., Plenum Press, Nueva York 1992*). La oxidación (de, por ejemplo, residuos de metionina) puede mencionarse como otra variante de la degradación química. La estabilidad química de la formulación de polipéptidos puede evaluarse mediante la medición de la cantidad de productos de degradación química en diversos momentos después de la exposición a diferentes condiciones ambientales (a menudo la formación de productos de degradación puede acelerarse, por ejemplo, mediante el aumento de la temperatura). La cantidad de cada producto de degradación individual a menudo se determina por separación de los productos de degradación en dependencia del tamaño de la molécula y/o la carga mediante el uso de diversas técnicas de cromatografía (por ejemplo, SEC-HPLC y/o RP-HPLC).

El término "formulación estabilizada" se refiere a una formulación con estabilidad física aumentada, estabilidad química aumentada o estabilidad física y química aumentadas en comparación a una solución acuosa del polipéptido.

Descripción de la invención

La siguiente descripción de la invención incluye la descripción de modalidades y aspectos que no deben interpretarse como una descripción de la invención reivindicada. *per se*, pero que puede servir como ayuda adicional para comprender la invención reivindicada y sus modificaciones.

Aspectos generales

En la presente descripción se describen polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que es un análogo de la SEQ ID NO: 2 en donde:

- (a) dicho análogo comprende un residuo de prolina en la posición 37;
- (b) dicho análogo comprende un residuo de ácido glutámico en la posición 14;
- (c) dicho análogo comprende un residuo de histidina o arginina en la posición 17;

en donde la numeración de la secuencia de aminoácidos del análogo corresponde a la secuencia de numeración de aminoácidos de la SEQ ID No: 2; y

opcionalmente, el polipéptido tiene al menos un sustituyente unido a al menos uno de sus residuos de aminoácidos.

La presente invención se refiere a polipéptidos de acuerdo con la Fórmula (I):

Xaa₁-Cys-Xaa₃-Thr-Ala-Thr-Cys-Ala-Thr-Gln-Arg-Leu-Ala-Xaa₁₄-Phe-Leu-Xaa₁₇-Xaa₁₈-Ser-Ser-Xaa₂₁-Xaa₂₂-Phe-Gly-Pro-Xaa₂₆-Leu-Pro-Pro-Thr- Xaa₃₁-Val-Gly-Ser-Xaa₃₅-Thr-Pro;

Fórmula (I) (SEQ ID No: 3)

en donde

- Xaa₁ se elimina o se selecciona independientemente de Ala, Cys, Glu, Gly, His, Arg, Ser y Lys;
 - Xaa₃ se selecciona independientemente de Gly, His, Arg, Ser y Asn;
 - Xaa₁₄ se selecciona independientemente de Glu y Asn;
 - Xaa₁₇ se selecciona independientemente de His, Arg, Lys y Val;
 - Xaa₁₈ se selecciona independientemente de Arg, Lys e His;
 - Xaa₂₁ se selecciona independientemente de Ala, Lys, Gln, Ser y Asn;
 - Xaa₂₂ se selecciona independientemente de Glu, Gln, Ser, Thr y Asn;
 - Xaa₂₆ se selecciona independientemente de Pro, Arg e Ile;
 - Xaa₃₁ se selecciona independientemente de Ser, Glu, Asp y Asn;
 - Xaa₃₅ se selecciona independientemente de His, Arg, Lys, Asp, Gln y Glu;
- en donde el C-terminal del polipéptido es una amida;
- en donde el C-terminal puede derivarse opcionalmente; y

en donde el polipéptido es un agonista del receptor de amilina.

El polipéptido de la invención puede comprender un residuo en la posición 17 que es histidina o arginina, preferentemente arginina.

5 El polipéptido de la invención puede comprender un residuo en la posición 35 que se selecciona independientemente de cualquiera de histidina, asparagina, glutamina y ácido glutámico; preferentemente histidina, glutamina y asparagina; con mayor preferencia asparagina.

10 El polipéptido de la invención puede comprender un residuo de aminoácido en la posición 14 que es ácido glutámico y un residuo en la posición 17 que es arginina.

15 El polipéptido de la invención puede comprender al menos un sustituyente unido a al menos un residuo de aminoácido de dicho polipéptido. Este grupo sustituyente puede seleccionarse de cualquiera de los grupos sustituyentes presentados en la tabla 1. El grupo sustituyente puede estar unido al grupo α -amino del residuo de aminoácido N-terminal o a un residuo de Lys.

20 Un derivado del polipéptido de la invención puede comprender un enlazador γ Glu unido al N-terminal de dicho polipéptido y $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}$ o $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}$ - como el residuo de unión a albúmina, y puede tener una secuencia de polipéptidos que comprende:

- a. una Glu en la posición 14,
- b. una His o una Arg en la posición 17 y
- c. una Pro en la posición 37.

25 El polipéptido de la invención puede ser cualquiera de los polipéptidos presentados en la Tabla 9. El polipéptido puede ser N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14, Arg17, Pro37]-pramlintida. El polipéptido puede ser N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14, His17, Pro37]-pramlintida.

30 Algunas ventajas

Los polipéptidos de la presente invención pueden exhibir una estabilidad física mejorada.

35 Los polipéptidos de la presente invención pueden exhibir una solubilidad mejorada.

Los polipéptidos de la presente invención pueden exhibir tanto estabilidad física como solubilidad mejoradas.

Algunos aspectos preferidos

40 En la presente descripción se presentan ensayos adecuados para medir la unión y la potencia, la solubilidad y la estabilidad física del receptor de amilina humana (por ejemplo, véanse los Ensayos (II), (IV) y (III) respectivamente).

Preferentemente Xaa₁₄ es Glu.

45 Preferentemente Xaa₁₇ es His o Arg; con mayor preferencia Arg.

Preferentemente Xaa₃₅ es Asn o Gln; con mayor preferencia Asn

50 Preferentemente Xaa₁₄ es Glu y Xaa₁₇ es Arg.

Preferentemente Xaa₁₄ es Glu y Xaa₁₇ es His.

55 En una modalidad preferida, el polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es un análogo de la SEQ ID No: 2 es de la Fórmula (I) en donde:

- Xaa₁ es Lys;
- Xaa₃ es Asn;
- Xaa₁₄ es Glu
- Xaa₁₇ es His o Arg;
- Xaa₁₈ es His;
- 60 Xaa₂₁ es Asn;
- Xaa₂₂ es Asn;
- Xaa₂₆ es Ile;
- Xaa₃₁ es Asn;
- Xaa₃₅ es Asn.

65

En una modalidad preferida, el polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es un análogo de la SEQ ID No: 2 es de la Fórmula (I) en donde:

Xaa₁ se elimina o se selecciona independientemente de His, Arg y Lys;

Xaa₃ se selecciona independientemente de Gly, His y Asn;

5 Xaa₁₄ se selecciona independientemente de Glu y Asn;

Xaa₁₇ se selecciona independientemente de His, Arg y Val;

Xaa₁₈ se selecciona independientemente de Arg e His;

Xaa₂₁ se selecciona independientemente de Ser y Asn;

Xaa₂₂ es Asn;

10 Xaa₂₆ es Ile;

Xaa₃₁ se selecciona independientemente de Glu y Asn;

Xaa₃₅ se selecciona independientemente de His, Arg, Lys, Asp, Gln y Glu.

En una modalidad preferida, el polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es un análogo de la SEQ ID No: 2 es de la Fórmula (I) en donde:

Xaa₁ se elimina o se selecciona independientemente de Gly, His, Arg, Ser y Lys;

Xaa₃ se selecciona independientemente de His y Asn;

Xaa₁₄ se selecciona independientemente de Glu y Asn;

Xaa₁₇ se selecciona independientemente de His, Arg y Val;

20 Xaa₁₈ se selecciona independientemente de Arg e His;

Xaa₂₁ se selecciona independientemente de Gln, Ser y Asn;

Xaa₂₂ es Asn;

Xaa₂₆ se selecciona independientemente de Pro e Ile;

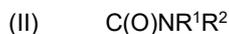
Xaa₃₁ es Asn;

25 Xaa₃₅ es Asn.

En una modalidad, el C-terminal puede derivarse.

En una modalidad, el C-terminal del polipéptido puede terminarse como un ácido o una amida. En un aspecto, el C-terminal del polipéptido es una amida.

En una modalidad, el C-terminal se deriva con una amida de la Fórmula (II):



en donde R¹ y R² se seleccionan independientemente de H y alquilo. Preferentemente R¹ y R² son ambos H.

En una modalidad, los polipéptidos de la presente invención pueden tener un sustituyente unido a cualquier posición disponible en uno o más de los residuos de aminoácidos. Los ejemplos de sustituyentes incluyen restos químicos directamente unidos a uno o más de los residuos de aminoácidos, o restos químicos indirectamente unidos a uno o más de los residuos de aminoácidos por medio de un enlazador. Los puntos de unión disponibles serán conocidos por la persona experta. Los ejemplos de puntos de unión disponibles incluyen el N-terminal del polipéptido, el C-terminal del polipéptido, un grupo épsilon-amino de un residuo de Lisina, el grupo hidroxilo de un residuo de serina, tirosina o treonina, el grupo amida de un residuo de asparagina o glutamina, el grupo carboxilo de un residuo de ácido aspártico o ácido glutámico, el grupo tiol de un residuo de cisteína. Preferentemente, el sustituyente se une al extremo N-terminal del polipéptido, o al grupo épsilon amino de un residuo de lisina.

En otra modalidad, el sustituyente se une al grupo amino N-terminal del polipéptido en donde el residuo de aminoácido N-terminal corresponde a la posición 1 del análogo de la SEQ ID No: 2.

En otra modalidad, el sustituyente se une al grupo épsilon amino de un residuo de lisina en la posición 1 del análogo de la SEQ ID No: 2.

En una modalidad, el sustituyente se selecciona de un grupo sustituyente hidrocarbilo, un grupo hidroxilo y un átomo de halógeno. Los ejemplos de átomos de halógeno adecuados incluyen F, Cl, Br e I. Preferentemente, el sustituyente es un grupo sustituyente hidrocarbilo.

En otra modalidad, el grupo sustituyente hidrocarbilo es un grupo alquilo, o un grupo de la Fórmula (III):



en donde

L es un enlazador;

n = 0 o 1

Y es un resto químico, como un resto de unión a albúmina.

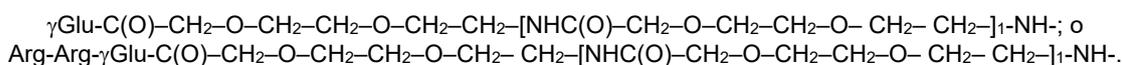
En una modalidad, el enlazador comprende de 1 a 10 aminoácidos. El enlazador puede comprender además aminas.

5 Los ejemplos de aminas adecuadas incluyen: $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_l-\text{O}-[\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}]_m-(\text{CH}_2)_p-[\text{NHC}(\text{O})-(\text{CH}_2)_i-\text{O}-[(\text{CH}_2)_n-\text{O}]_m-(\text{CH}_2)_p]-\text{NH}-$

en donde l, m, n y p independientemente son 1-7, y q es 0-5.

10 Por ejemplo, el enlazador puede comprender una amina seleccionada de: $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$; y $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-[\text{NHC}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-]_1-\text{NH}-$; y $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-[\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}]_7-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-$.

15 En otra modalidad, el enlazador es una combinación de residuos de aminoácidos y las aminas mencionadas anteriormente, por ejemplo:



20 En algunas modalidades, n = 1 y L se selecciona del grupo que consiste en γGlu , $\gamma\text{Glu}-\gamma\text{Glu}$, $\gamma\text{Glu}-\gamma\text{Glu}-\gamma\text{Glu}$, $\gamma\text{Glu}-\gamma\text{Glu}-\gamma\text{Glu}-\gamma\text{Glu}$, Glu , $\text{Glu}-\text{Glu}$, $\text{Glu}-\gamma\text{Glu}$, $\text{Glu}-\text{Arg}$, $\text{Glu}-\text{Glu}-\text{Arg}$, His , $\text{His}-\text{His}$, $\text{His}-\gamma\text{Glu}$, $\text{His}-\text{His}-\gamma\text{Glu}$, Gly , $\text{Gly}-\gamma\text{Glu}$, Ser , $\text{Ser}-\gamma\text{Glu}$, $\text{D-Arg}-\text{D-Arg}$, Arg , $\text{Arg}-\text{Arg}$, $\text{Arg}-\text{Arg}-\gamma\text{Glu}$, $\text{Ser}-\text{Ser}-\text{Gly}-\text{Ser}-\text{Ser}$, $\text{Ser}-\text{Ser}-\text{Gly}-\text{Ser}-\text{Ser}-\gamma\text{Glu}$, $\text{Ser}-\text{Ser}-\text{Gly}-\text{Ser}-\text{Ser}-\text{Gly}$ y $\text{Ser}-\text{Ser}-\text{Gly}-\text{Ser}-\text{Ser}-\text{Gly}-\gamma\text{Glu}$, $\gamma\text{Glu}-\text{OEG}$, $\gamma\text{Glu}-\text{OEG}-\text{OEG}$ y OEG .

25 En algunas modalidades, n = 1 y L se selecciona de γGlu , $\gamma\text{Glu}-\gamma\text{Glu}$, $\gamma\text{Glu}-\text{OEG}$, $\gamma\text{Glu}-\text{OEG}-\text{OEG}$ y OEG , con mayor preferencia el enlazador es $\gamma\text{Glu}-\gamma\text{Glu}$.

30 En otra modalidad, n = 0; en consecuencia, no hay enlazador entre los residuos de aminoácidos de la cadena principal del polipéptido y el resto químico, Y es decir, Y se une a una posición disponible en la cadena principal del polipéptido.

En una modalidad, Y es un resto de unión a albúmina.

35 En una modalidad, el resto de unión a albúmina es un grupo acilo.

Preferentemente, el resto de unión a albúmina es $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_s\text{CO}-$, en donde s es un número entero de 12 a 22. Con mayor preferencia, s es un número entero de 14 a 20, por ejemplo 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20. Con mayor preferencia s es de 16 a 18. Con mayor preferencia s es 18.

40 En una modalidad, el polipéptido comprende un enlazador γGlu unido al terminal N del análogo de amilina y $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}$ o $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$ como el residuo de unión a albúmina y donde la secuencia del análogo de amilina comprende Glu en la posición 14, His o Arg en la posición 17, His en la posición 35 o Pro en la posición 37 en comparación con la SEQ ID NO: 2.

45 En otra modalidad, el grupo sustituyente y/o grupo de la fórmula (III) se selecciona de los siguientes grupos presentados en la Tabla 1.

Tabla 1

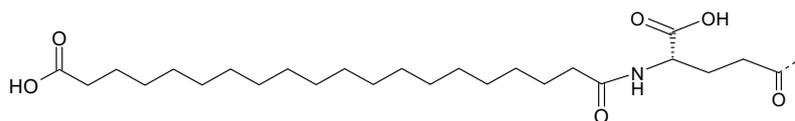
Abreviatura	Sustituyente
C20diácido	
C20diácido- γGlu	
C20diácido- $\gamma\text{Glu}-\gamma\text{Glu}$	

5	C20diácido- γ Glu- γ Glu- γ Glu	
10	C20diácido-OEG	
15	C20diácido- γ Glu-OEG	
20	C20diácido- γ Glu-OEG-OEG	
25	C18diácido- γ Glu	
30	C16diácido- γ Glu	
35	C14diácido- γ Glu	

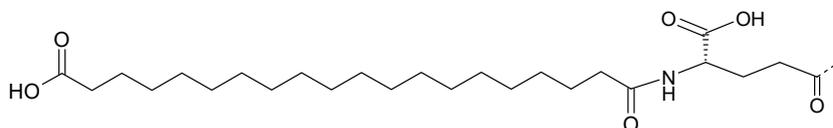
Preferentemente, los polipéptidos de la presente invención comprenden un sustituyente.

Preferentemente, los polipéptidos de la presente invención tienen un sustituyente unido al grupo amino N-terminal del polipéptido, en donde el residuo de aminoácido N-terminal corresponde a la posición 1 del análogo de la SEQ ID No: 2.

Preferentemente el sustituyente es:



Preferentemente el sustituyente



se une al grupo amino N-terminal del polipéptido.

Para las modalidades que comprenden un resto de unión a albúmina, los polipéptidos de la presente invención pueden exhibir un perfil farmacocinético prolongado y buenas propiedades farmacodinámicas. Por lo tanto, los polipéptidos de acuerdo con la presente invención no tienen que inyectarse con tanta frecuencia como los productos de amilina conocidos.

Además, los polipéptidos de la invención proporcionan una reducción en la ingesta de alimentos. La reducción en la ingesta de alimentos es superior a los productos de amilina conocidos.

En una modalidad, el resto de unión a albúmina se une no covalentemente a la albúmina. Preferentemente, el resto de unión a albúmina tiene una afinidad de unión a la albúmina hacia la albúmina sérica humana que está por debajo de aproximadamente 10 μ M o por debajo de aproximadamente 1 μ M.

La Tabla 2 presenta una lista de compuestos que tienen una solubilidad de más de 100 µM a pH 4.

Tabla 2

Ejemplo #	Nombre	EC ₅₀ del receptor de amilina humana (pM)	Solubilidad pH 4,0 (µM)
89	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[His1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	25,5	>200
90	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	32,5	>200
97	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Arg1,Pro37]-pramlintida	34	>200
88	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Gly1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	36	>200
166	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg18,Gln21,Ala25,Pro26,Ser28,Ser29,Pro37]-pramlintida	39	>200
143	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,Arg18,Pro37]-pramlintida	41,5	>200
96	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Arg1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	43	>200
121	N-alfa-(19-carboxinonadecanoil)-Glu-Glu-Arg-[Glu1,Pro37]-pramlintida	45	>200
102	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[Arg1,Glu14,Pro37]-pramlintida	49,5	>200
101	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[Arg1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	51,5	>200
92	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[His1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	52	>200
103	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[Arg1,Pro37]-pramlintida	52,5	>200
53	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	53	>200
91	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Gly1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	54	>200
86	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Pro37]-pramlintida	55	>200
130	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Gln21,Pro37]-pramlintida	55,5	>200
52	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	62	>200
106	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Ser1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	62,5	>200
122	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Pro37]-pramlintida	63	>200
168	N-alfa-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil]-[Glu14,His17,Lys21,Pro37]-pramlintida	71	>200
104	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[des1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	79,5	>200
145	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Lys11,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	80,5	>200
10	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu1,Glu14,His17,Arg18,Pro37]-pramlintida	82,3	>200
109	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,Pro37]-pramlintida	84,5	>200
108	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[des1,Glu14,Pro37]-pramlintida	88	>200
124	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	89,5	>200
170	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg18,Ser21,Ser22,Ser28,Ser29,Asp31,Asp35,Pro37]-pramlintida	90	>200

Ejemplo #	Nombre	EC ₅₀ del receptor de amilina humana (pM)	Solubilidad pH 4,0 (µM)
136	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida	91	>200
146	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Thr21,Pro37]-pramlintida	91	>200
84	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	92,5	>200
135	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Gln35,Pro37]-pramlintida	103	>200
19	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-His-[His1,Glu14,His17,Ala25,Pro26,Ser28,Ser29]-pramlintida	105,1	>200
139	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida	107,5	>200
82	N-alfa-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-Carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino]etoxi]etoxi]acetil]-[Glu1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	108,5	>200
137	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Gly1,Glu14,His17,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida	120,5	>200
123	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	136	>200
167	N-alfa-[2-(2-[2-[2-(2-[2-(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino]etoxi]etoxi]acetil]-[Glu14,His17,Glu21,Pro37]-pramlintida	203	>200
151	N-épsilon1-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Gln21,Ala25,Pro26,Ser28,Ser29,Pro37]-pramlintida	209	>200
161	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Gln21,Pro37]-pramlintida	232	>200
125	N-alfa-(19-carboxinonadecanoil)-Glu-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	288,5	>200
155	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Glu-[Arg1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	313	>200
162	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida	411	>200
157	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Glu-[Arg1,Glu14,Arg17,Gln21,Pro37]-pramlintida	465	>200
163	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln31,Gln35,Pro37]-pramlintida	1059	>200
158	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Glu-[Arg1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida	1129	>200
138	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu1,Glu14,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida	1512	>200
164	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln22,Gln31,Gln35,Pro37]-pramlintida	1713	>200
159	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Glu-[Arg1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln31,Gln35,Pro37]-pramlintida		>200
160	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Glu-[Arg1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln22,Gln31,Gln35,Pro37]-pramlintida		>200
169	N-alfa-[2-(2-[2-[2-(2-[2-(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino]etoxi]etoxi]acetil]-[Glu14,His17,Ala21,Pro37]-pramlintida		>200
171	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Ser21,Ser22,Pro23,Ala25,Pro26,Ser28,Ser29,Asp31,Asp35,Pro37]-pramlintida		>200
177	N-épsilon1-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida		>200

Ejemplo #	Nombre	EC ₅₀ del receptor de amilina humana (pM)	Solubilidad pH 4,0 (μM)
178	N-alfa-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi]etoxi]acetil-[Glu14,Ala21,His35,Pro37]-pramlintida		>200

Como se demostró en la sección de Ejemplos en la presente descripción, los polipéptidos presentados anteriormente tienen una solubilidad mayor o igual a 100 μM (micromolar) a pH 4.

En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen una solubilidad mayor o igual a 125 μM (micromolar) a pH 4.

En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen una solubilidad mayor o igual a 150 μM (micromolar) a pH 4.

En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen una solubilidad mayor o igual a 175 μM (micromolar) a pH 4.

En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen una solubilidad mayor o igual a 200 μM (micromolar) a pH 4.

En una modalidad, la solubilidad se mide en un ensayo de solubilidad, como se presenta en la presente descripción.

La Tabla 3 presenta una lista de compuestos que tienen una solubilidad de más de 100 μM a pH 7.

Tabla 3

Ejemplo #	Nombre	EC ₅₀ del receptor de amilina humana (pM)	Solubilidad pH 7,0 (μM)
89	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[His1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	25,5	>200
90	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	32,5	>200
97	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Arg1,Pro37]-pramlintida	34	>200
88	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Gly1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	36	>200
166	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg18,Gln21,Ala25,Pro26,Ser28,Ser29,Pro37]-pramlintida	39	>200
143	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,Arg18,Pro37]-pramlintida	41,5	165
96	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Arg1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	43	>200
102	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[Arg1,Glu14,Pro37]-pramlintida	49,5	>200
101	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[Arg1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	51,5	>200
92	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[His1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	52	>200
103	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[Arg1,Pro37]-pramlintida	52,5	199
53	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	53	>200
91	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Gly1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	54	>200
86	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Pro37]-pramlintida	55	>200
130	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Gln21,Pro37]-pramlintida	55,5	>200

Ejemplo #	Nombre	EC ₅₀ del receptor de amilina humana (pM)	Solubilidad pH 7,0 (µM)
52	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	62	>200
106	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Ser1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	62,5	>200
122	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Pro37]-pramlintida	63	>200
168	N-alfa-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino]etoxi)etoxi]acetil-[Glu14,His17,Lys21,Pro37]-pramlintida	71	>200
104	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[des1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	79,5	>200
145	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Lys11,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	80,5	>200
10	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu1,Glu14,His17,Arg18,Pro37]-pramlintida	82,3	>200
109	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,Pro37]-pramlintida	84,5	>200
108	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[des1,Glu14,Pro37]-pramlintida	88	>200
124	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	89,5	>200
170	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg18,Ser21,Ser22,Ser28,Ser29,Asp31,Asp35,Pro37]-pramlintida	90	>200
136	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida	91	>200
146	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Thr21,Pro37]-pramlintida	91	>200
84	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	92,5	>200
135	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Gln35,Pro37]-pramlintida	103	>200
139	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida	107,5	>200
82	N-alfa-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-Carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino]etoxi)etoxi]acetil-[Glu1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	108,5	>200
137	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Gly1,Glu14,His17,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida	120,5	>200
123	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	136	>200
167	N-alfa-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino]etoxi)etoxi]acetil-[Glu14,His17,Glu21,Pro37]-pramlintida	203	>200
151	N-épsilon1-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Gln21,Ala25,Pro26,Ser28,Ser29,Pro37]-pramlintida	209	>200
161	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Gln21,Pro37]-pramlintida	232	>200
125	N-alfa-(19-carboxinonadecanoil)-Glu-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	288,5	>200
155	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Glu-[Arg1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	313	>200
162	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida	411	>200
157	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Glu-[Arg1,Glu14,Arg17,Gln21,Pro37]-pramlintida	465	>200

Ejemplo #	Nombre	EC ₅₀ del receptor de amilina humana (pM)	Solubilidad pH 7,0 (μM)
163	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln31,Gln35,Pro37]-pramlintida	1059	>200
158	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Glu-[Arg1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida	1129	>200
138	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu1,Glu14,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida	1512	>200
164	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln22,Gln31,Gln35,Pro37]-pramlintida	1713	>200
159	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Glu-[Arg1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln31,Gln35,Pro37]-pramlintida		>200
160	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Glu-[Arg1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln22,Gln31,Gln35,Pro37]-pramlintida		>200
169	N-alfa-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino]etoxi)etoxi]acetil-[Glu14,His17,Ala21,Pro37]-pramlintida		>200
171	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Ser21,Ser22,Pro23,Ala25,Pro26,Ser28,Ser29,Asp31,Asp35,Pro37]-pramlintida		>200
177	N-épsilon1-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida		>200
178	N-alfa-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino]etoxi)etoxi]acetil-[Glu14,Ala21,His35,Pro37]-pramlintida		>200

Como se demostró en la sección de Ejemplos en la presente descripción, los polipéptidos presentados anteriormente tienen una solubilidad mayor o igual a 100 μM (micromolar) a pH 7.

En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen una solubilidad mayor o igual a 125 μM (micromolar) a pH 7.

En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen una solubilidad mayor o igual a 150 μM (micromolar) a pH 7.

En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen una solubilidad mayor o igual a 175 μM (micromolar) a pH 7.

En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen una solubilidad mayor o igual a 200 μM (micromolar) a pH 7.

En una modalidad, la solubilidad se mide en un ensayo de solubilidad, como se presenta en la presente descripción.

La Tabla 4 presenta una lista de compuestos que tienen una solubilidad de más de 100 μM a pH 4 y pH 7.

Tabla 4

Ejemplo #	Nombre	EC ₅₀ del receptor de amilina humana (pM)	Solubilidad pH 4,0 (μM)	Solubilidad pH 7,0 (μM)
89	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[His1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	25,5	>200	>200
90	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	32,5	>200	>200

Ejemplo #	Nombre	EC ₅₀ del receptor de amilina humana (pM)	Solubilidad pH 4,0 (μM)	Solubilidad pH 7,0 (μM)
89	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[His1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	25,5	>200	>200
90	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	32,5	>200	>200
97	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Arg1,Pro37]-pramlintida	34	>200	>200
88	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Gly1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	36	>200	>200
166	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg18,Gln21,Ala25,Pro26,Ser28,Ser29,Pro37]-pramlintida	39	>200	>200
143	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,Arg18,Pro37]-pramlintida	41,5	>200	165
96	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Arg1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	43	>200	>200
102	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[Arg1,Glu14,Pro37]-pramlintida	49,5	>200	>200
101	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[Arg1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	51,5	>200	>200
92	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[His1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	52	>200	>200
103	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[Arg1,Pro37]-pramlintida	52,5	>200	199
53	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	53	>200	>200
91	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Gly1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	54	>200	>200
86	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Pro37]-pramlintida	55	>200	>200
130	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Gln21,Pro37]-pramlintida	55,5	>200	>200
52	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	62	>200	>200
106	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Ser1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	62,5	>200	>200
122	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Pro37]-pramlintida	63	>200	>200
168	N-alfa-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi)etoxi]acetil]-[Glu14,His17,Lys21,Pro37]-pramlintida	71	>200	>200

Ejemplo #	Nombre	EC ₅₀ del receptor de amilina humana (pM)	Solubilidad pH 4,0 (µM)	Solubilidad pH 7,0 (µM)
42	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-Glu-[Glu14,His17]-pramlintida	73,9	>200	>200
104	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[des1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	79,5	>200	>200
145	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Lys11,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	80,5	>200	>200
10	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu1,Glu14,His17,Arg18,Pro37]-pramlintida	82,3	>200	>200
109	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,Pro37]-pramlintida	84,5	>200	>200
108	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[des1,Glu14,Pro37]-pramlintida	88	>200	>200
72	N-épsilon25-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-Carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil]-[Glu14,Ser21,Lys25]-pramlintida	89	>200	126
124	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	89,5	>200	>200
170	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg18,Ser21,Ser22,Ser28,Ser29,Asp31,Asp35,Pro37]-pramlintida	90	>200	>200
136	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida	91	>200	>200
146	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Thr21,Pro37]-pramlintida	91	>200	>200
84	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	92,5	>200	>200
135	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Gln35,Pro37]-pramlintida	103	>200	>200
139	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida	107,5	>200	>200
82	N-alfa-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-Carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil]-[Glu1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	108,5	>200	>200
137	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Gly1,Glu14,His17,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida	120,5	>200	>200
123	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	136	>200	>200
167	N-alfa-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil]-[Glu14,His17,Glu21,Pro37]-pramlintida	203	>200	>200

Ejemplo #	Nombre	EC ₅₀ del receptor de amilina humana (pM)	Solubilidad pH 4,0 (µM)	Solubilidad pH 7,0 (µM)
151	N-épsilon1-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Gln21,Ala25,Pro26,Ser28,Ser29,Pro37]-pramlintida	209	>200	>200
161	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Gln21,Pro37]-pramlintida	232	>200	>200
40	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-[His1,Glu14,His17]-pramlintida	248	>200	>200
125	N-alfa-(19-carboxinonadecanoil)-Glu-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	288,5	>200	>200
155	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Glu-[Arg1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	313	>200	>200
162	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida	411	>200	>200
157	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Glu-[Arg1,Glu14,Arg17,Gln21,Pro37]-pramlintida	465	>200	>200
163	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln31,Gln35,Pro37]-pramlintida	1059	>200	>200
158	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Glu-[Arg1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida	1129	>200	>200
138	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu1,Glu14,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida	1512	>200	>200
164	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln22,Gln31,Gln35,Pro37]-pramlintida	1713	>200	>200
159	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Glu-[Arg1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln31,Gln35,Pro37]-pramlintida		>200	>200
160	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Glu-[Arg1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln22,Gln31,Gln35,Pro37]-pramlintida		>200	>200
169	N-alfa-[2-(2-[2-[2-(2-{(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino] etoxi)etoxi]acetil]-[Glu14,His17,Ala21,Pro37]-pramlintida		>200	>200
171	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Ser21,Ser22,Pro23,Ala25,Pro26,Ser28,Ser29,Asp31,Asp35,Pro37]-pramlintida		>200	>200
177	N-épsilon1-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida		>200	>200
178	N-alfa-[2-(2-[2-[2-(2-{(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino] etoxi)etoxi]acetil]-[Glu14,Ala21,His35,Pro37]-pramlintida		>200	>200

Como se demostró en la sección de Ejemplos en la presente descripción, los polipéptidos presentados anteriormente tienen una solubilidad mayor o igual a 100 µM (micromolar) a pH 4 y pH 7.

5 En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen una solubilidad mayor o igual a 125 µM (micromolar) a pH 4 y pH 7.

En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen una solubilidad mayor o igual a 150 µM (micromolar) a pH 4 y pH 7.

10 En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen una solubilidad mayor o igual a 175 µM (micromolar) a pH 4 y pH 7.

En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen una solubilidad mayor o igual a 200 µM (micromolar) a pH 4 y pH 7.

15 En una modalidad, la solubilidad se mide en un ensayo de solubilidad, como se presenta en la presente descripción.

La Tabla 5 presenta una lista de compuestos que tienen una estabilidad física mayor o igual a 25 horas en un ensayo de fibrilgénesis.

20

Tabla 5

Ejemplo #	Nombre	EC ₅₀ del receptor de amilina humana (pM)	ThT pH 4,0 tiempo de retraso (h)	ThT pH 4,0 recuperación (%)
25				
30	89 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[His1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	25,5	>45	91
	90 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	32,5	>45	93
35	88 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Gly1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	36	>45	87
	96 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Arg1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	43	>45	92
40	101 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[Arg1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	51,5	>45	98
	53 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	53	>45	96,2
45	91 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Gly1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	54	29	0
	130 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Gln21,Pro37]-pramlintida	55,5	>45	93
50	52 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	62	>45	92,3
55	145 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Lys11,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	80,5	>45	91
60	124 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	89,5	>45	9,3
65	170 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg18,Ser21,Ser22,Ser28,Ser29,Asp31,Asp35,Pro37]-pramlintida	90	>45	94

Ejemplo #	Nombre	EC ₅₀ del receptor de amilina humana (pM)	ThT pH 4,0 tiempo de retraso (h)	ThT pH 4,0 recuperación (%)	
5					
10	136	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida	91	>45	100
15	146	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Thr21,Pro37]-pramlintida	91	>45	87
20	84	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	92,5	25,6	100
25	135	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Gln35,Pro37]-pramlintida	103	>45	100
30	137	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Gly1,Glu14,His17,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida	120,5	29	23
35	161	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Gln21,Pro37]-pramlintida	232	>45	96
40	162	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida	411	>45	98
45	163	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln31,Gln35,Pro37]-pramlintida	1059	>45	95
50	164	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln22,Gln31,Gln35,Pro37]-pramlintida	1713	>45	95
55	156	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Arg1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	66	>45	99

40 Como se demuestra en la sección de Ejemplos en la presente descripción, los polipéptidos presentados anteriormente tienen una estabilidad física de más de o igual a 25 horas en un ensayo de fibrilogénesis.

45 En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen una estabilidad física mayor o igual a 30 horas.

50 En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen una estabilidad física mayor o igual a 35 horas.

55 En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen una estabilidad física mayor o igual a 40 horas.

60 En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen una estabilidad física mayor o igual a 45 horas.

65 En una modalidad, la estabilidad física se mide en un ensayo de fibrilogénesis como se presenta en la presente descripción.

La Tabla 6 presenta una lista de compuestos que tienen un valor de EC₅₀ del receptor de amilina humana de 1800 pM (picomolar) o menos.

Tabla 6

Ejemplo #	Nombre	EC ₅₀ del receptor de amilina humana (pM)
89	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[His1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	25,5
90	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	32,5
97	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Arg1,Pro37]-pramlintida	34
88	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Gly1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	36
166	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg18,Gln21,Ala25,Pro26,Ser28,Ser29,Pro37]-pramlintida	39
143	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,Arg18,Pro37]-pramlintida	41,5
96	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Arg1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	43
121	N-alfa-(19-carboxinonadecanoil)-Glu-Glu-Arg-[Glu1,Pro37]-pramlintida	45
102	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[Arg1,Glu14,Pro37]-pramlintida	49,5
101	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[Arg1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	51,5
92	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[His1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	52
103	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[Arg1,Pro37]-pramlintida	52,5
53	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	53
91	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Gly1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	54
86	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Pro37]-pramlintida	55
130	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Gln21,Pro37]-pramlintida	55,5
52	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	62
45	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-His-His-[His1,Glu14,His17]-pramlintida	62,4
106	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Ser1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	62,5
122	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Pro37]-pramlintida	63
168	N-alfa-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino}etoxi)etoxi)acetilamino] etoxi}etoxi)acetil]-[Glu14,His17,Lys21,Pro37]-pramlintida	71
104	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[des1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	79,5
145	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Lys11,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	80,5
10	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu1,Glu14,His17,Arg18,Pro37]-pramlintida	82,3
109	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,Pro37]-pramlintida	84,5
108	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[des1,Glu14,Pro37]-pramlintida	88
124	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	89,5
170	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg18,Ser21,Ser22,Ser28,Ser29,Asp31,Asp35,Pro37]-pramlintida	90
136	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida	91

Ejemplo #	Nombre	EC ₅₀ del receptor de amilina humana (pM)
146	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Thr21,Pro37]-pramlintida	91
84	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	92,5
135	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Gln35,Pro37]-pramlintida	103
19	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-His-[His1,Glu14,His17,Ala25,Pro26,Ser28,Ser29]-pramlintida	105,1
139	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida	107,5
82	N-alfa-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-Carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino] etoxi)etoxi]acetil]-[Glu1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	108,5
137	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Gly1,Glu14,His17,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida	120,5
123	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	136
167	N-alfa-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino] etoxi)etoxi]acetil]-[Glu14,His17,Glu21,Pro37]-pramlintida	203
151	N-épsilon1-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Gln21,Ala25,Pro26,Ser28,Ser29,Pro37]-pramlintida	209
161	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Gln21,Pro37]-pramlintida	232
125	N-alfa-(19-carboxinonadecanoil)-Glu-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	288,5
155	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Glu-Arg-[Arg1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	313
162	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida	411
157	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Glu-Arg-[Arg1,Glu14,Arg17,Gln21,Pro37]-pramlintida	465
163	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln31,Gln35,Pro37]-pramlintida	1059
158	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Glu-Arg-[Arg1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida	1129
138	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu1,Glu14,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida	1512
164	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln22,Gln31,Gln35,Pro37]-pramlintida	1713
153	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-Arg-[Arg1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	43
154	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Arg17,Pro37]-pramlintida	53
156	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Arg1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	66
152	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Arg14,Arg17,Pro37]-pramlintida	129

Como se demuestra en la sección de Ejemplos en la presente descripción, los polipéptidos presentados anteriormente tienen un valor de EC₅₀ de amilina humana de 1800 pM (picomolar) o menos.

En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen un valor de EC₅₀ de amilina humana de 1500 pM (picomolar) o menos.

En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen un valor de EC₅₀ de amilina humana de 1200 pM (picomolar) o menos.

En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen un valor de EC₅₀ de amilina humana de 1000 pM (picomolar) o menos.

5 En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen un valor de EC₅₀ de amilina humana de 800 pM (picomolar) o menos.

En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen un valor de EC₅₀ de amilina humana de 600 pM (picomolar) o menos.

10 En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen un valor de EC₅₀ de amilina humana de 400 pM (picomolar) o menos.

En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen un valor de EC₅₀ de amilina humana de 200 pM (picomolar) o menos.

15 En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen un valor de EC₅₀ de amilina humana de 100 pM (picomolar) o menos.

20 En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen un valor de EC₅₀ de amilina humana de 75 pM (picomolar) o menos.

En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen un valor de EC₅₀ de amilina humana de 60 pM (picomolar) o menos.

25 En una modalidad, la EC₅₀ de amilina humana se mide en un ensayo como se presenta en la presente descripción.

La Tabla 7 presenta una lista de compuestos que tienen un valor de EC₅₀ del receptor de amilina humana de 1800 pM (picomolar) o menos.

30 Tabla 7

Ejemplo #	Nombre	EC ₅₀ del receptor de amilina humana (pM)	EC ₅₀ receptor de CTa humano (pM)
35 89	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-Gly-[His1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	25,5	39,5
40 90	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	32,5	47,5
40 97	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[Arg1,Pro37]-pramlintida	34	38,5
45 88	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[Gly1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	36	55
45 166	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg18,Gln21,Ala25,Pro26,Ser28,Ser29,Pro37]-pramlintida	39	34
45 143	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,Arg18,Pro37]-pramlintida	41,5	22
50 96	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[Arg1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	43	55
50 121	N-alfa-(19-carboxinadecanoil)-Glu-Glu-Arg-[Glu1,Pro37]-pramlintida	45	61,5
50 102	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-Gly-[Arg1,Glu14,Pro37]-pramlintida	49,5	50,5
55 101	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-Gly-[Arg1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	51,5	45,5
55 92	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-Gly-[His1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	52	49
55 103	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-Gly-[Arg1,Pro37]-pramlintida	52,5	75
60 53	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	53	79,7
60 91	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[Gly1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	54	52
65 86	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Pro37]-pramlintida	55	52,5

Ejemplo #	Nombre	EC ₅₀ del receptor de amilina humana (pM)	EC ₅₀ receptor de CTA humano (pM)
89	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[His1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	25,5	39,5
90	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	32,5	47,5
97	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Arg1,Pro37]-pramlintida	34	38,5
88	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Gly1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	36	55
166	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg18,Gln21,Ala25,Pro26,Ser28,Ser29,Pro37]-pramlintida	39	34
143	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,Arg18,Pro37]-pramlintida	41,5	22
96	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Arg1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	43	55
121	N-alfa-(19-carboxinonadecanoil)-Glu-Glu-Arg-[Glu1,Pro37]-pramlintida	45	61,5
102	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[Arg1,Glu14,Pro37]-pramlintida	49,5	50,5
101	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[Arg1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	51,5	45,5
92	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[His1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	52	49
103	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[Arg1,Pro37]-pramlintida	52,5	75
53	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	53	79,7
91	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Gly1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	54	52
86	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Pro37]-pramlintida	55	52,5
130	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Gln21,Pro37]-pramlintida	55,5	31,5
52	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	62	53,7
106	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Ser1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	62,5	70,5
122	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Pro37]-pramlintida	63	61
168	N-alfa-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi]etoxi]acetilamino]etoxi]etoxi]acetil]-[Glu14,His17,Lys21,Pro37]-pramlintida	71	85
104	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[des1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	79,5	106,5
145	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Lys11,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	80,5	83
10	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu1,Glu14,His17,Arg18,Pro37]-pramlintida	82,3	86,4
109	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,Pro37]-pramlintida	84,5	72,5
108	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[des1,Glu14,Pro37]-pramlintida	88	73,5
124	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	89,5	367
170	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg18,Ser21,Ser22,Ser28,Ser29,Asp31,Asp35,Pro37]-pramlintida	90	76
136	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida	91	45
146	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Thr21,Pro37]-pramlintida	91	59,5

Ejemplo #	Nombre	EC ₅₀ del receptor de amilina humana (pM)	EC ₅₀ receptor de CTa humano (pM)	
5	84	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1, Glu14, His17, Pro37]-pramlintida	92,5	67
10	135	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14, His17, Gln35, Pro37]-pramlintida	103	97
	139	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14, Gln21, Gln35, Pro37]-pramlintida	107,5	58,5
15	82	N-alfa-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-Carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi]etoxi]acetilamino]etoxi]etoxi]acetil]-[Glu1, Glu14, His17, Pro37]-pramlintida	108,5	288,5
	137	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu1, Glu14, His17, Gln21, Gln35, Pro37]-pramlintida	120,5	72
20	123	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1, Glu14, His17, Pro37]-pramlintida	136	377,5
	167	N-alfa-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi]etoxi]acetilamino]etoxi]etoxi]acetil]-[Glu14, His17, Glu21, Pro37]-pramlintida	203	113
25	151	N-épsilon1-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14, His17, Gln21, Ala25, Pro26, Ser28, Ser29, Pro37]-pramlintida	209	67,5
	161	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1, Glu14, Arg17, Gln21, Pro37]-pramlintida	232	1133
	125	N-alfa-(19-carboxinonadecanoil)-Glu-Glu-Arg-[Glu1, Glu14, His17, Pro37]-pramlintida	288,5	443
30	155	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Glu-[Arg1, Glu14, Arg17, Pro37]-pramlintida	313	526
	157	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Glu-[Arg1, Glu14, Arg17, Gln21, Pro37]-pramlintida	465	547
	158	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Glu-[Arg1, Glu14, Arg17, Gln21, Gln35, Pro37]-pramlintida	1129	1188
35	138	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu1, Glu14, Gln21, Gln35, Pro37]-pramlintida	1512	496,5
	153	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[Arg1, Glu14, Arg17, Pro37]-pramlintida	43	41
40	154	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Arg17, Pro37]-pramlintida	53	57
	156	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-[Arg1, Glu14, Arg17, Pro37]-pramlintida	66	168
45	152	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Arg14, Arg17, Pro37]-pramlintida	129	453

Como se demuestra en la sección de Ejemplos en la presente descripción, los polipéptidos presentados anteriormente tienen un valor de EC₅₀ de calcitonina humana de 1800 pM (picomolar) o menos.

50 En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen un valor de EC₅₀ de calcitonina humana de 1500 pM (picomolar) o menos.

En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen un valor de EC₅₀ de calcitonina humana de 1200 pM (picomolar) o menos.

55 En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen un valor de EC₅₀ de calcitonina humana de 1000 pM (picomolar) o menos.

60 En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen un valor de EC₅₀ de calcitonina humana de 800 pM (picomolar) o menos.

En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen un valor de EC₅₀ de calcitonina humana de 600 pM (picomolar) o menos.

65 En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen un valor de EC₅₀ de calcitonina humana de 400 pM (picomolar) o menos.

En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen un valor de EC₅₀ de calcitonina humana de 200 pM (picomolar) o menos.

5 En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen un valor de EC₅₀ de calcitonina humana de 100 pM (picomolar) o menos.

En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen un valor de EC₅₀ de calcitonina humana de 80 pM (picomolar) o menos.

10 En una modalidad, la EC₅₀ de calcitonina humana se mide en un ensayo como se presenta en la presente descripción.

15 La Tabla 8 presenta una lista de compuestos que tienen un valor de EC₅₀ del receptor de amilina humano de 1800 pM (picomolar) o menos, una solubilidad de 150 µM o más a pH 7 y una estabilidad física de 25 horas o más en un ensayo de fibrillogénesis.

Tabla 8

Ejemplo #	Nombre	EC ₅₀ del receptor de amilina humana (pM)	Solubilidad pH 7,0 (µM)	ThT pH 4,0 tiempo de retraso (h)
25	89 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-Gly-[His1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	25,5	>200	>45
	90 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	32,5	>200	>45
30	88 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[Gly1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	36	>200	>45
	96 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[Arg1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	43	>200	>45
35	101 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-Gly-[Arg1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	51,5	>200	>45
40	53 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	53	>200	>45
	91 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[Gly1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	54	>200	29
45	130 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Gln21,Pro37]-pramlintida	55,5	>200	>45
	52 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	62	>200	>45
50	145 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[Lys11,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	80,5	>200	>45
55	124 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	89,5	>200	>45
	170 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg18,Ser21,Ser22,Ser28,Ser29,Asp31,Asp35,Pro37]-pramlintida	90	>200	>45
60	136 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida	91	>200	>45
65	146 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Thr21,Pro37]-pramlintida	91	>200	>45

Ejemplo #	Nombre	EC ₅₀ del receptor de amilina humana (pM)	Solubilidad pH 7,0 (µM)	ThT pH 4,0 tiempo de retraso (h)	
5	84	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	92,5	>200	25,6
10	135	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Gln35,Pro37]-pramlintida	103	>200	>45
15	137	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Gly1,Glu14,His17,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida	120,5	>200	29
20	161	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Gln21,Pro37]-pramlintida	232	>200	>45
25	162	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida	411	>200	>45
30	163	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln31,Gln35,Pro37]-pramlintida	1059	>200	>45
35	164	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln22,Gln31,Gln35,Pro37]-pramlintida	1713	>200	>45

En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen un valor de EC₅₀ de amilina humana de 1800 pM (picomolar) o menos, y una solubilidad de más de 150 µM a pH 7, y una estabilidad física mayor o igual a 25 horas en un ensayo de fibrillogénesis.

En una modalidad, la EC₅₀ de amilina humana, la solubilidad a pH 7 y la estabilidad física se miden en los ensayos que se presentan en la presente descripción.

La Tabla 9 presenta una lista de compuestos que tienen un valor de EC₅₀ del receptor de amilina humano de 1800 pM (picomolar) o menos, una solubilidad de 200 µM o más a pH 7 y una estabilidad física de 45 horas o más en un ensayo de fibrillogénesis.

Tabla 9

Ejemplo #	Nombre	EC ₅₀ del receptor de amilina humana (pM)	Solubilidad pH 7,0 (µM)	Solubilidad pH 7,5 (µM)	ThT pH 4,0 tiempo de retraso (h)	
45	89	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[His1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	25,5	>200	>200	>45
50	90	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	32,5	>200	>200	>45
55	88	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Gly1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	36	>200	>200	>45
60						
65						

Ejemplo #	Nombre	EC ₅₀ del receptor de amilina humana (pM)	Solubilidad pH 7,0 (μM)	Solubilidad pH 7,5 (μM)	ThT pH 4,0 tiempo de retraso (h)
96	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Arg1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	43	>200	>200	>45
101	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[Arg1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	51,5	>200	>200	>45
53	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	53	>200	>200	>45
130	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Gln21,Pro37]-pramlintida	55,5	>200	>200	>45
52	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	62	>200	>200	>45
145	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Lys11,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida	80,5	>200	>200	>45
124	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida	89,5	>200	>200	>45
170	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg18,Ser21,Ser22,Ser28,Ser29,Asp31,Asp35,Pro37]-pramlintida	90	>200	>200	>45
136	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida	91	>200	>200	>45
146	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Thr21,Pro37]-pramlintida	91	>200	>200	>45
135	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Gln35,Pro37]-pramlintida	103	>200	>200	>45
161	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Gln21,Pro37]-pramlintida	232	>200	>200	>45

Ejemplo #	Nombre	EC ₅₀ del receptor de amilina humana (pM)	Solubilidad pH 7,0 (μM)	Solubilidad pH 7,5 (μM)	ThT pH 4,0 tiempo de retraso (h)
162	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida	411	>200	>200	>45
163	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln31,Gln35,Pro37]-pramlintida	1059	>200	>200	>45
164	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln22,Gln31,Gln35,Pro37]-pramlintida	1713	>200	>200	>45

En una modalidad, los polipéptidos descritos en la presente descripción tienen un valor de EC₅₀ de amilina humana de 1800 pM (picomolar) o menos, y una solubilidad de más de 200 μM a pH 7, y una estabilidad física mayor o igual a 45 horas en un ensayo de fibrillogénesis.

En una modalidad, la EC₅₀ de amilina humana, la solubilidad a pH 7 y la estabilidad física se miden en los ensayos que se presentan en la presente descripción.

Para algunas modalidades, el polipéptido descrito en la presente descripción tiene un perfil farmacocinético prolongado en comparación con la pramlintida medida por el Ensayo (IX) como se describe en la sección Ensayos.

Para algunas modalidades, el polipéptido descrito la presente descripción tiene una T_{1/2} en plasma de al menos 30 horas.

Para algunas modalidades, el polipéptido descrito la presente descripción tiene una T_{1/2} en plasma de al menos 40 horas.

Para algunas modalidades, el polipéptido descrito la presente descripción tiene una T_{1/2} en plasma de al menos 50 horas.

Para algunas modalidades, el polipéptido descrito la presente descripción tiene una T_{1/2} en plasma de al menos 60 horas.

Para algunas modalidades, el polipéptido descrito la presente descripción tiene una T_{1/2} en plasma de al menos 70 horas.

Para algunas modalidades, el polipéptido descrito la presente descripción tiene una T_{1/2} en plasma de al menos 75 horas.

Para algunas modalidades, el polipéptido descrito la presente descripción tiene una T_{1/2} en plasma de al menos 80 horas.

Para algunas modalidades, el polipéptido descrito la presente descripción tiene una T_{1/2} en plasma de al menos 85 horas.

Para algunas modalidades, el polipéptido descrito la presente descripción tiene una T_{1/2} en plasma de al menos 90 horas.

Para algunas modalidades, el polipéptido descrito la presente descripción tiene una T_{1/2} en plasma de al menos 95 horas.

Para algunas modalidades, el polipéptido descrito la presente descripción tiene una T_{1/2} en plasma de al menos 100 horas.

Proceso

5 La producción de polipéptidos tales como amilina o análogos de la misma es bien conocida en la técnica. Los polipéptidos de la invención pueden así producirse mediante síntesis clásica de polipéptidos, por ejemplo, síntesis de polipéptidos en fase sólida mediante el uso de química t-Boc o Fmoc u otras técnicas bien establecidas, véase, por ejemplo, Greene y Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, 1999. Los polipéptidos
10 pueden además producirse mediante un método que comprende cultivar una célula huésped que contiene una secuencia de ADN que codifica los polipéptidos y es capaz de expresar el polipéptido en un medio de nutrientes adecuado bajo condiciones que permiten la expresión del polipéptido. Para los polipéptidos que comprenden residuos de aminoácidos no naturales, la célula recombinante debe modificarse de manera que los aminoácidos no naturales se incorporen al polipéptido, por ejemplo mediante el uso de mutantes de ARNt.

Composiciones farmacéuticas

En un aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de acuerdo con la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones son adecuadas para
20 administración parenteral.

En una modalidad, el polipéptido está presente en la formulación a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml. En otro aspecto, el polipéptido está presente en la formulación a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml.

25 En otra modalidad, la formulación tiene un pH de 2,0 a 10,0. En otra modalidad, la formulación tiene un pH de 2,0 a 7,0. En otra modalidad, la formulación tiene un pH de 2,5 a 4,5. En otra modalidad, la formulación tiene un pH de 3,5 a 4,5.

30 Las composiciones farmacéuticas que contienen un polipéptido de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante técnicas convencionales, por ejemplo, como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences, 1985 o en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19^{ma} edición, 1995.

35 La formulación puede comprender, además, un sistema tampón, conservante(s), agente(s) de isotonicidad, agente(s) quelante(s), estabilizantes y/o tensioactivos. El uso de tales excipientes en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19^{ma} edición, 1995.

40 En una modalidad, la formulación farmacéutica es una formulación acuosa, es decir, una formulación que comprende agua. Tal formulación es típicamente una solución o una suspensión. En una modalidad adicional de la invención, la formulación farmacéutica es una solución acuosa.

El término "formulación acuosa" se define como una formulación que comprende al menos 50 % peso/peso de agua.

45 Igualmente, el término "solución acuosa" se define como una solución que comprende al menos 50 % p/p de agua y el término "suspensión acuosa" se define como una suspensión que comprende al menos 50 % p/p de agua.

50 En otra modalidad, la formulación farmacéutica es una formulación liofilizada, en la que el médico o el paciente añaden solventes y/o diluyentes antes del uso. En otra modalidad, la formulación farmacéutica es una formulación seca (por ejemplo, liofilizada o secada por atomización) lista para usar sin ninguna disolución previa.

55 Por el término "forma seca" se entiende la composición farmacéutica líquida o formulación que se seca ya sea por secado por congelación (es decir, liofilización; véase, por ejemplo, Williams y Polli (1984) J. Parenteral Sci. Technol. 38:48-59), secado por aspersión (véase Masters (1991) en Spray-Drying Handbook (5^{ta} ed; Longman Scientific and Technical, Essex, U.K.), pp. 491-676; Broadhead y otros (1992) Drug Devel. Ind. Pharm. 18:1169-1206; y Mumenthaler y otros (1994) Pharm. Res. 11:12-20), o secado al aire (Carpenter y Crowe (1988) Cryobiology 25:459-470; y Roser (1991) Biopharm. 4:47-53).

60 En una modalidad adicional, el tampón se selecciona del grupo que consiste en acetato, carbonato, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrógeno fosfato, hidrógeno fosfato, fosfato y tris(hidroximetil)-aminometano, bicina, tricina, ácido málico, ácido láctico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o sus mezclas. Cada uno de estos tampones específicos constituye una modalidad alternativa.

65 En otra modalidad, la formulación comprende, además, un conservante aceptable farmacéuticamente. En una modalidad adicional, la formulación comprende además un agente isotónico, por ejemplo, propilenglicol, manitol o glicerol. En una modalidad adicional, la formulación comprende, además, un agente quelante.

En otra modalidad, la formulación comprende, además, un estabilizante. El uso de un estabilizante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19^{ma} edición, 1995.

5 La formación de agregados por un polipéptido durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida puede afectar adversamente la actividad biológica de ese polipéptido, lo que resulta en la pérdida de la eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Además, la formación de agregados puede provocar otros problemas tales como el bloqueo de tubos, membranas, o bombas cuando la composición farmacéutica que contiene polipéptidos se administra mediante el uso de un sistema de infusión.

10 Las composiciones de la invención son composiciones farmacéuticas líquidas estabilizadas cuyos componentes con actividad terapéutica incluyen un polipéptido que posiblemente exhibe formación de agregados durante el almacenamiento en formulaciones farmacéuticas líquidas.

15 Por "formación de agregados" se entiende una interacción física entre las moléculas polipeptídicas que resulta en la formación de oligómeros, que pueden permanecer solubles, o grandes agregados visibles que precipitan de la solución.

20 Por "durante el almacenamiento" se entiende una composición o formulación farmacéutica líquida, que una vez preparada, no se administra inmediatamente a un sujeto. Por el contrario, después de la preparación, se empaca para su almacenamiento, ya sea en forma líquida, en estado congelado, o en forma seca para su posterior reconstitución en una forma líquida u otra forma adecuada para la administración a un sujeto.

25 Las composiciones farmacéuticas pueden comprender, además, una cantidad de una base de aminoácido suficiente para disminuir la formación de agregados por el polipéptido durante el almacenamiento de la composición.

30 Por "base de aminoácido" se entiende un aminoácido o una combinación de aminoácidos, donde cualquier aminoácido dado está presente en su forma de base libre o en su forma de sal. Cuando se usa una combinación de aminoácidos, todos los aminoácidos pueden presentarse en sus formas de base libre, todos pueden presentarse en sus formas de sal, o algunos pueden presentarse en sus formas de base libre, mientras otros se presentan en sus formas de sal. En una modalidad, los aminoácidos usados en la preparación de las composiciones son aquellos que portan una cadena lateral cargada, tales como arginina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico. Cualquier estereoisómero (es decir, L, D o sus mezclas) de un aminoácido particular (por ejemplo, metionina, histidina, imidazol, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina y sus mezclas) o combinaciones de estos estereoisómeros, puede presentarse en las composiciones farmacéuticas siempre que el aminoácido particular esté presente en su forma de base libre o en su forma de sal. En una modalidad, se usa el estereoisómero L. Las composiciones también pueden formularse con derivados de estos aminoácidos. Los derivados de arginina adecuados incluyen, por ejemplo, aminoguanidina, ornitina y N-monoetil L-arginina, los derivados de metionina adecuados incluyen etionina y butionina y los derivados de cisteína adecuados incluyen S-metil-L cisteína. Al igual que con los otros aminoácidos, los derivados de aminoácidos se incorporan en las composiciones ya sea en su forma de base libre o en su forma de sal. En otra modalidad, los aminoácidos o sus derivados de aminoácidos se usan en una concentración, que es suficiente para evitar o retrasar la agregación de la proteína.

45 En otra modalidad, la formulación comprende, además, un tensioactivo.

50 Es posible que puedan presentarse otros ingredientes en la formulación farmacéutica del polipéptido. Estos ingredientes adicionales pueden incluir agentes humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes de masa, modificadores de la tonicidad, agentes quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (por ejemplo, albúmina sérica humana, gelatina o proteínas) y un zwitterión (por ejemplo, un aminoácido tal como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Tales ingredientes adicionales, por supuesto, no deben afectar adversamente la estabilidad general de la formulación farmacéutica.

55 Las composiciones farmacéuticas que contienen un polipéptido de acuerdo con la presente invención pueden administrarse a un paciente que necesite dicho tratamiento en varios sitios, por ejemplo, en sitios tópicos, por ejemplo, sitios de la piel y las mucosas, en sitios que eluden la absorción, por ejemplo, administración en una arteria, en una vena, en el corazón y en sitios que implican absorción, por ejemplo, administración en la piel, debajo de la piel, en un músculo o en el abdomen.

60 La administración de composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención puede realizarse a través de varias vías de administración, por ejemplo, lingual, sublingual, bucal, en la boca, oral, en el estómago e intestino, nasal, pulmonar, por ejemplo, a través de los bronquiolos y alvéolos o su combinación, epidérmica, dérmica, transdérmica, vaginal, rectal, ocular, por ejemplo a través de la conjuntiva, uretral, y parenteral a pacientes que necesitan dicho tratamiento.

65 Las composiciones de la presente invención pueden administrarse en varias formas de dosificación, por ejemplo, como soluciones, suspensiones, emulsiones, microemulsiones, emulsiones múltiples, espumas, pomadas, pastas,

5 yesos, ungüentos, tabletas, tabletas recubiertas, enjuagues, cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina dura y cápsulas de gelatina blanda, supositorios, cápsulas rectales, gotas, geles, atomizadores, polvos, aerosoles, inhalantes, gotas para los ojos, ungüentos oftálmicos, enjuagues oftálmicos, pesarios vaginales, anillos vaginales, ungüentos vaginales, solución para inyección, soluciones transformadoras in situ, por ejemplo, gelificación in situ, colocación in situ, precipitación in situ, cristalización in situ, solución de infusión, e implantes.

10 Las composiciones de la invención pueden combinarse adicionalmente, o unirse a, por ejemplo, a través de interacciones covalentes, hidrófobas y electrostáticas, un portador farmacéutico, sistema de administración de fármaco y sistema de administración de fármaco avanzado para mejorar adicionalmente la estabilidad del derivado de un análogo de amilina del mismo, aumentar la biodisponibilidad, aumentar la solubilidad, disminuir los efectos adversos, lograr la cronoterapia bien conocida por los expertos en la técnica, y aumentar la obediencia del paciente o cualquiera de sus combinaciones.

15 Las composiciones de la presente invención son útiles en la formulación de sólidos, semisólidos, polvo y soluciones para la administración pulmonar del derivado de un análogo de amilina, mediante el uso de, por ejemplo, un inhalador de dosis fija, un inhalador de polvo seco y un nebulizador, todos ellos dispositivos bien conocidos por los expertos en la técnica.

20 Las composiciones de la actual invención son útiles en la formulación de sistemas de administración de fármacos de liberación controlada, sostenida, prolongada, retardada y lenta.

25 La administración parenteral puede realizarse por inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa similar a una lapicera. Alternativamente, la administración parenteral puede realizarse por medio de una bomba de infusión. Otra opción es una composición que puede ser una solución o suspensión para la administración del derivado de un análogo de amilina en la forma de un atomizador nasal o pulmonar. Como aún otra opción, las composiciones farmacéuticas que contienen el polipéptido de la invención también pueden adaptarse a la administración transdérmica, *por ejemplo*, mediante inyección sin aguja o desde un parche, opcionalmente un parche iontoforético, o administración transmucosal, *por ejemplo*, bucal.

30 El polipéptido de la invención pueden administrarse por vía pulmonar en un vehículo, como una solución, suspensión o polvo seco mediante el uso de cualquiera de los tipos conocidos de dispositivos adecuados para la administración pulmonar de fármacos. Los ejemplos de estos comprenden, pero no se limitan a, los tres tipos generales de generación de aerosoles para la administración de fármacos pulmonares, y pueden incluir nebulizadores de chorro o ultrasónicos, inhaladores de dosis fija o inhaladores de polvo seco (consultar Yu J, Chien YW. Pulmonary drug delivery: Physiologic and mechanistic aspects. Crit Rev Ther Drug Carr Sys 14(4) (1997) 395-453).

35 En una modalidad, la formulación farmacéutica que comprende el polipéptido es estable durante más de 6 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.

40 En otra modalidad, la formulación farmacéutica que comprende el polipéptido es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.

45 En otra modalidad, la formulación farmacéutica que comprende el derivado de un análogo de amilina es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de dos años de almacenamiento.

En otra modalidad la formulación farmacéutica que comprende el derivado de un análogo de amilina es estable durante más de 2 semanas de uso y durante más de dos años de almacenamiento.

50 En un aspecto, un proceso para preparar una composición farmacéutica que comprende el derivado de acuerdo con la invención comprende mezclar un derivado de acuerdo con la invención con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Indicaciones terapéuticas

55 En un aspecto, el polipéptido de acuerdo con la invención puede usarse como un medicamento.

60 En un aspecto el polipéptido de acuerdo con la invención puede usarse como un medicamento para el tratamiento o prevención de la hiperglucemia, diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, enfermedad coronaria y otros trastornos cardiovasculares, accidente cerebrovascular, síndrome del intestino irritable, dispepsia y úlceras gástricas.

En un aspecto, el polipéptido se usa para retrasar o prevenir la progresión de la enfermedad en la diabetes tipo 2.

65 En un aspecto, el polipéptido de acuerdo con la invención puede usarse como un medicamento para el tratamiento de o la prevención de la obesidad.

En un aspecto, el polipéptido de acuerdo con la invención puede usarse como un medicamento para el tratamiento de o la prevención de hipercalcemia, osteoporosis o osteitis deformante. En un aspecto, el polipéptido puede usarse como un medicamento para reducir el peso corporal. En un aspecto, el polipéptido puede usarse como un medicamento para el tratamiento o prevención de la obesidad, o como un medicamento para prevenir el aumento de peso corporal. En un aspecto, el polipéptido modifica la ingesta de alimentos, tal como reduce la ingesta de alimentos.

En un aspecto, el medicamento disminuye la ingesta de alimentos, disminuye la apoptosis de las células β , aumenta la función de las células β y la masa de las células β , y/o restaura la sensibilidad a la glucosa de las células β .

En un aspecto, el polipéptido de acuerdo con la invención puede usarse para la preparación de un medicamento.

En un aspecto el polipéptido puede usarse para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de la hiperglucemia, diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, enfermedad coronaria y otros trastornos cardiovasculares, accidente cerebrovascular, síndrome del intestino irritable, dispepsia y úlceras gástricas.

En un aspecto, el polipéptido puede usarse para la preparación de un medicamento para retrasar o prevenir la progresión de la enfermedad en la diabetes tipo 2.

En un aspecto, el polipéptido disminuye la ingesta de alimentos, disminuye la apoptosis de las células β , aumenta la función de las células β y la masa de las células β , y/o restaura la sensibilidad a la glucosa de las células β .

El tratamiento con un polipéptido de acuerdo con la presente invención puede combinarse, además, con una segunda o más sustancias activas farmacológicamente, por ejemplo, seleccionadas de agentes antidiabéticos, agentes antiobesidad, agentes reguladores del apetito, agentes antihipertensivos, agentes para el tratamiento y/o prevención de complicaciones resultantes de o asociadas con la diabetes y agentes para el tratamiento y/o prevención de complicaciones y trastornos resultantes o asociados con la obesidad. Ejemplos de estas sustancias farmacológicamente activas son: Insulina, derivado de insulina, análogos de insulina, GLP-1, derivados de GLP-1, análogos de GLP-1, derivados de oxintomodulina, sulfonilureas, biguanidas, meglitinidas, inhibidores de glucosidasa, antagonistas de glucagón, inhibidores de la DPP-IV (dipeptidil peptidasa-IV), inhibidores de enzimas hepáticas implicadas en la estimulación de la gluconeogénesis y/o glucogenólisis, moduladores de la captación de glucosa, compuestos que modifican el metabolismo lipídico tales como agentes antihiperlipidémicos como inhibidores de la HMG CoA (estatinas), compuestos que reducen la ingestión de alimentos, agonistas RXR y agentes que actúan sobre el canal de potasio dependiente de ATP de las β -células; colestiramina, colestipol, clofibrato, gemfibrozilo, lovastatina, pravastatina, simvastatina, probucol, dextrotiroxina, neteglinida, repaglinida; β -bloqueadores tales como alprenolol, atenolol, timolol, pindolol, propranolol y metoprolol, inhibidores de la ACE (enzima convertidora de angiotensina) tales como benazepril, captopril, enalapril, fosinopril, lisinopril, alatriopril, quinapril y ramipril, bloqueadores de los canales de calcio tales como nifedipina, felodipina, nifedipina, isradipina, nimodipina, diltiazem y verapamilo y α -bloqueadores tales como doxazosina, urapidilo, prazosina y terazosina; agonistas de CART (transcrito regulado por cocaína y anfetamina), antagonistas de NPY (neuropéptido Y), agonistas de MC4 (melanocortina 4), antagonistas de orexina, agonistas del TNF (factor de necrosis tumoral), agonistas del CRF (factor de liberación de corticotropina), antagonistas del CRF BP (proteína de unión al factor de liberación de corticotropina), agonistas de urocortina, agonistas β 3, agonistas de MSH (hormona estimulante de melanocitos), antagonistas de MCH (hormona concentradora de melanocitos), agonistas de CCK (colecistocinina), inhibidores de la recaptación de serotonina, inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina, compuestos mixtos de serotonina y noradrenérgicos, agonistas de 5HT (serotonina), agonistas de bombesina, antagonistas de galanina, hormona del crecimiento, compuestos de liberación de la hormona del crecimiento, agonistas de TRH (hormona liberadora de tireotropina), moduladores de UCP 2 o 3 (proteínas desacopladoras 2 o 3), agonistas de leptina, agonistas de DA (bromocriptina, doprexina), inhibidores de lipasa/amilasa, moduladores de RXR (receptor X retinoide), agonistas TR β ; antagonistas de histamina H3, gastrina y análogos de gastrina.

Debe entenderse que cualquier combinación adecuada de los polipéptidos de acuerdo con la invención con uno o más de los compuestos mencionados anteriormente y opcionalmente una o más sustancias activas farmacológicamente adicionales se consideran dentro del alcance de la presente invención. La presente invención se describirá ahora a modo de ejemplos.

EJEMPLOS

Los polipéptidos preparados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10

ES 2 772 223 T3

Ejemplo #	Nombre
1	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1, Glu14, His17, Arg18]-pramlintida
2	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1, Glu8, Glu14, His17, Arg18]-pramlintida
3	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[des1, Gly3, Glu14, His17, Arg18, Glu31, Gly35]-pramlintida
4	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[des1, Gly3, Glu14, His17, Arg18, Gln21, Gln22, Glu31, Gly35]-pramlintida
5	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu1, Glu14, His17, Arg18]-pramlintida
6	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1, Glu14, His17, Arg18, Ala25, Pro26, Ser28, Ser29]-pramlintida
7	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1, Glu14, His17, Arg18, Glu25, Ser28, Arg29]-pramlintida
8	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1, Glu14, His17, Arg18, Glu22, Ala25, Arg26, Ser28, Ser29]-pramlintida
9	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1, Glu14, His17, Arg18, Ser21, Ser22, Asp31, Asp35]-pramlintida
10	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu1, Glu14, His17, Arg18, Pro37]-pramlintida
11	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-His-[His1, Glu14, His17]-pramlintida
12	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-His-[His1, Glu14, Arg17]-pramlintida
14	N-épsilon21-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino] etoxi)etoxi)acetil]-[Arg1, Glu14, His17, Arg18, Lys21]-pramlintida
15	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1, Glu14, Arg18]-pramlintida
16	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1, Gly3, Glu14, His17, Arg18, Ser21, Ser22, Glu31, Glu35]-pramlintida
17	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-[His1, Glu14, His17]-pramlintida
18	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1, Glu14, His17]-pramlintida
19	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-His-[His1, Glu14, His17, Ala25, Pro26, Ser28, Ser29]-pramlintida
20	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-His-[His1, Glu14]-pramlintida
21	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-His-[His1, Glu14, His17, Arg35]-pramlintida
22	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-His-[His1, Arg3, Glu14, His17]-pramlintida
23	N-alfa-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino] etoxi)etoxi)acetil]-[His1, Glu14, His17, Arg18, Ala19, Thr20, Gln21, Glu22, Leu23]-pramlintida
24	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu1, Gly3, Glu14, Arg18, Ser21, Ser22, Ala25, Pro26, Ser28, Ser29, Glu31, Arg35]-pramlintida
25	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-[Arg1, Glu14, His17]-pramlintida
26	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-[Glu14, His17]-pramlintida
27	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14, His17]-pramlintida
28	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[des1, Glu14, His17]-pramlintida
29	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu1, Glu14, His17]-pramlintida
30	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu1, Glu14, His17, Arg18]-pramlintida
31	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-His-[His1, Glu14, His17, His35]-pramlintida
32	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-His-[His1, His3, Glu14, His17, His35]-pramlintida
33	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-His-[His1, His3, Glu14, His17, His29, His35]-pramlintida
34	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-His-[His1, Glu14, His17, His29, His35]-pramlintida
35	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-His-[His1, His3, Glu14, His17]-pramlintida
36	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-His-[His1, Glu14, His17, His29]-pramlintida
37	N-alfa-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino] etoxi)etoxi)acetil]-D-Arg-D-Arg-[Glu14, His17, Arg18]-pramlintida

Ejemplo #	Nombre
38	N-alfa-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)acetilamino] etoxi)etoxi)acetil]-D-Arg-D-Arg-[Glu14,His17,Arg18,Ala21,Ser35]-pramlintida
39	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-[Gly1,Glu14,His17]-pramlintida
40	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-[His1,Glu14,His17]-pramlintida
41	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Glu-[Glu14,His17]-pramlintida
42	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-Glu-[Glu14,His17]-pramlintida
43	N-alfa-[2-(2-[2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino] etoxi)etoxi)acetil]-[des1,Glu14,His17]-pramlintida
44	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-[His1,Glu14,His17]-pramlintida
45	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-His-His-[His1,Glu14,His17]-pramlintida
46	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17]-pramlintida
47	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-His-[His1,Glu14,His17]-pramlintida
48	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,His17]-pramlintida
49	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-[(S)-4-Carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]butiril]-[des1,Glu14,His17]-pramlintida
50	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg17]-pramlintida
51	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg17]-pramlintida
52	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Pro37]-pramlintida
53	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida
54	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu10,Glu14,His17]-pramlintida
55	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,His35]-pramlintida
56	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-[Glu14,His17,His35]-pramlintida
57	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg17,His35]-pramlintida
58	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-[Glu14,Arg17,His35]-pramlintida
59	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,His35]-pramlintida
60	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-Glu-[Glu14,His17,His35]-pramlintida
61	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg17,His35]-pramlintida
62	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-Glu-[Glu14,Arg17,His35]-pramlintida
63	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-His-[His1,Glu14,His17,Ser21,Glu35]-pramlintida
64	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Ala25,Pro26,Ser28,Ser29,His35]-pramlintida
65	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg17,Ala25,Pro26,Ser28,Ser29,His35]-pramlintida
66	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-[Glu14,His17,His35]-pramlintida
67	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-His-[Glu14,His17,His35]-pramlintida
68	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-[Glu14,Arg17,His35]-pramlintida
69	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-His-His-[Glu14,Arg17,His35]-pramlintida
70	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-His-[Glu14,His17,His35]-pramlintida
71	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-His-[Glu14,Arg17,His35]-pramlintida
72	N-épsilon25-[2-(2-[2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-Carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino] etoxi)etoxi)acetil]-[Glu14,Ser21,Lys25]-pramlintida
73	N-épsilon25-[2-(2-[2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-Carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino] etoxi)etoxi)acetil]-[Glu14,His17,Lys25]-pramlintida
74	N-épsilon21-[2-(2-[2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-Carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino] etoxi)etoxi)acetil]-[Glu14,His17,Lys21,Glu35]-pramlintida
75	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[des1,Glu14,His17,His35]-pramlintida
76	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,His17,His35]-pramlintida
77	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,His17,Arg18,His35]-pramlintida
78	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Arg18,His35]-pramlintida
79	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Arg18]-pramlintida

ES 2 772 223 T3

Ejemplo #	Nombre
80	N-épsilon17-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-Carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino] etoxi)etoxi]acetil]-[Glu14,Lys17]-pramlintida
81	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[Glu14,His17,His35]-pramlintida
82	N-alfa-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-Carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino] etoxi)etoxi]acetil]-[Glu1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida
83	N-épsilon17-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-Carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino] etoxi)etoxi]acetil]-[Glu14,Lys17,Ser21,Glu35]-pramlintida
84	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida
85	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Ser-[Glu14,His17,His35]-pramlintida
86	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Pro37]-pramlintida
87	N-épsilon1-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,His35]-pramlintida
88	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Gly1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida
89	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[His1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida
90	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida
91	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Gly1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida
92	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[His1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida
93	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His35]-pramlintida
94	N-épsilon1-[(S)-4-Carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,His35]-pramlintida
95	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Arg1,Glu14,His17,His35]-pramlintida
96	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Arg1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida
97	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Arg1,Pro37]-pramlintida
98	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Arg1,His35]-pramlintida
99	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[Arg1,His35]-pramlintida
100	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[Arg1,Glu14,His17,His35]-pramlintida
101	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[Arg1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida
102	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[Arg1,Glu14,Pro37]-pramlintida
103	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[Arg1,Pro37]-pramlintida
104	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[des1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida
105	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Gly1,Glu14,His17,His35]-pramlintida
106	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Ser1,Glu14,His17,Pro37]-pramlintida
107	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Ser1,Glu14,His17,His35]-pramlintida
108	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[des1,Glu14,Pro37]-pramlintida
109	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,Pro37]-pramlintida
110	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,Ser21,Ser28,Ser29,His35]-pramlintida
111	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1,Glu14,Arg17,Ser21,Ser28,Ser29,His35]-pramlintida
112	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Arg35]-pramlintida
113	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Lys35]-pramlintida
114	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,His36]-pramlintida
115	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,His34]-pramlintida
116	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,His32]-pramlintida
117	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Gln21,His35]-pramlintida
118	N-alfa-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino] etoxi)etoxi]acetil]-[Glu14,His17,Ser21,His35]-pramlintida
119	N-alfa-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino] etoxi)etoxi]acetil]-[His1,Glu14,His17,Ser21,His35]-pramlintida
120	N-alfa-[2-(2-[2-(2-[2-(S)-4-Carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino] etoxi)etoxi]acetil]-D-Arg-D-Arg-[Orn1,Glu14,His17,Arg18]-pramlintida
121	N-alfa-(19-carboxinonadecanoil)-Glu-Glu-Arg-[Glu1,Pro37]-pramlintida
122	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Pro37]-pramlintida

Ejemplo #	Nombre
123	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1, Glu14, His17, Pro37]-pramlintida
124	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1, Glu14, Arg17, Pro37]-pramlintida
125	N-alfa-(19-carboxinonadecanoil)-Glu-Glu-Arg-[Glu1, Glu14, His17, Pro37]-pramlintida
126	N-épsilon25-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-Carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino] etoxi)etoxi)acetil]-[Glu14, Lys25]-pramlintida
127	N-épsilon21-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino] etoxi)etoxi)acetil]-[Glu14, Lys21, Ser29, His35]-pramlintida
128	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14, His17, Asp21, His35]-pramlintida
129	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-[Glu14, His17, Gln21, His35]-pramlintida
130	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14, His17, Gln21, Pro37]-pramlintida
131	N-épsilon21-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino] etoxi)etoxi)acetil]-[Glu14, Lys21, Ser28, Ser29, His35]-pramlintida
132	N-épsilon21-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino] etoxi)etoxi)acetil]-[Glu14, Lys21, His35]-pramlintida
133	N-épsilon25-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino] etoxi)etoxi)acetil]-[Glu14, His17, Ser21, Lys25, Ser28, Ser29, His35]-pramlintida
134	N-épsilon25-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino] etoxi)etoxi)acetil]-[His17, His21, Lys25, Ser28, Ser29, His35]-pramlintida
135	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14, His17, Gln35, Pro37]-pramlintida
136	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14, His17, Gln21, Gln35, Pro37]-pramlintida
137	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Gly1, Glu14, His17, Gln21, Gln35, Pro37]-pramlintida
138	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu1, Glu14, Gln21, Gln35, Pro37]-pramlintida
139	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14, Gln21, Gln35, Pro37]-pramlintida
140	N-épsilon25-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino] etoxi)etoxi)acetil]-[His17, Lys25, Ser28, Ser29, His35]-pramlintida
141	N-épsilon21-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino] etoxi)etoxi)acetil]-[His17, Lys21, Ser28, His35]-pramlintida
142	N-épsilon25-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino] etoxi)etoxi)acetil]-[Glu14, His17, Lys25, Ser28, Ser29, His35]-pramlintida
143	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1, Glu14, Arg18, Pro37]-pramlintida
144	N-épsilon21-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino] etoxi)etoxi)acetil]-[Glu14, His17, Lys21, Ser28, His35]-pramlintida
145	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Lys11, Glu14, His17, Pro37]-pramlintida
146	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14, His17, Thr21, Pro37]-pramlintida
147	N-épsilon21-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino] etoxi)etoxi)acetil]-[Glu14, Lys21, Ser28, Arg29, His35]-pramlintida
148	N-épsilon21-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino] etoxi)etoxi)acetil]-[Glu14, His17, Lys21, Ser28, Ser29, His35]-pramlintida
149	N-épsilon1-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Arg-[Glu14, Arg17, His35, Pro37]-pramlintida
150	N-épsilon21-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino] etoxi)etoxi)acetil]-[Glu14, Arg18, Lys21, Ser28, Arg29, Arg35]-pramlintida

Ejemplo #	Nombre
151	N-épsilon1-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,His17,Gln21,Ala25,Pro26,Ser28,Ser29,Pro37]-pramlintida
152	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Arg14,Arg17,Pro37]-pramlintida
153	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[Arg1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida
154	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Arg17,Pro37]-pramlintida
155	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Glu-[Arg1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida
156	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-[Arg1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida
157	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Glu-[Arg1,Glu14,Arg17,Gln21,Pro37]-pramlintida
158	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Glu-[Arg1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida
159	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Glu-[Arg1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln31,Gln35,Pro37]-pramlintida
160	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Glu-[Arg1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln22,Gln31,Gln35,Pro37]-pramlintida
161	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Gln21,Pro37]-pramlintida
162	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln35,Pro37]-pramlintida
163	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln31,Gln35,Pro37]-pramlintida
164	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1,Glu14,Arg17,Gln21,Gln22,Gln31,Gln35,Pro37]-pramlintida
165	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Glu-[Glu1,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida
166	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg18,Gln21,Ala25,Pro26,Ser28,Ser29,Pro37]-pramlintida
167	N-alfa-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino] etoxi)etoxi)acetil]-[Glu14,His17,Glu21,Pro37]-pramlintida
168	N-alfa-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino] etoxi)etoxi)acetil]-[Glu14,His17,Lys21,Pro37]-pramlintida
169	N-alfa-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino] etoxi)etoxi)acetil]-[Glu14,His17,Ala21,Pro37]-pramlintida
170	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg18,Ser21,Ser22,Ser28,Ser29,Asp31,Asp35,Pro37]-pramlintida
171	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Ser21,Ser22,Pro23,Ala25,Pro26,Ser28,Ser29,Asp31,Asp35,Pro37]-pramlintida
172	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg17,Asp21,Pro37]-pramlintida
173	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg17,Asp35,Pro37]-pramlintida
174	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg17,Asp31,Pro37]-pramlintida
175	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg17,Asp22,Pro37]-pramlintida
176	N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Asp3,Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida
177	N-épsilon1-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14,Arg17,Pro37]-pramlintida
178	N-alfa-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino] etoxi)etoxi)acetil]-[Glu14,Ala21,His35,Pro37]-pramlintida

a potencia *in vitro* de los polipéptidos frente a los receptores de amilina y los receptores de calcitonina de ratas y humanos (como se describe en el Ensayo (II)) se muestra en la Tabla 11.

ES 2 772 223 T3

Tabla 11

Ejemplo #	EC ₅₀ del receptor de amilina de rata (pM)	EC ₅₀ del receptor de CTa de rata (pM)	EC ₅₀ del receptor de amilina humana (pM)	EC ₅₀ receptor de CTa humano (pM)
1	64,5	379	93,4	149,7
2			602	4300,5
3			164	222
4			253,3	284,3
5			353,5	1650
6			114,7	239,8
7			77,9	131
8			126,5	278,5
9	330,5	1734	211,6	207,6
10	374,5	806,5	82,3	86,4
11	88,5	962	85,3	208,3
12	82	6764	77,5	408,5
14			99,4	469
15			83	125
16			313	197,5
17	147	221	111,3	166,4
18	187	1165	130,7	125,5
19	132	824	105,1	309,7
20			150,6	740,2
21	133	1342	192	429,2
22	261	1288	98,5	157,2
23			385	492
24	4512	1753	1441,5	672
25			118,8	184
26	475,5	1393	130	214,1
27	188	539	121,4	106,8
28			179,1	259
29			377,4	656,6
30			174,2	753,4
31	200	1309	163,5	155,5
32	401	4873	603	543
33			1032,5	484
34			271,5	198
35			286	801,5
36			167	190,5
37	132	1890	83,2	641,9
38	233	4479	148,8	1109,7
39			253	432,5
40			248	439
41			402	798,5
42	134,5	2432,5	73,9	273,5
43			333,5	672
44			305,5	669
45			62,4	264,5
46	122	433	46,9	79,2
47			59	258
48	15	375	42,5	112
49			151	527
50			100,9	458,5
51			61	600
52	159,5	76	62	53,7
53	348	287	53	79,7
54			129,5	199,5
55	262	673	151,6	163,2
56	643	4974	299	352
57	510,5	2842,5	111	387
58	63	2233	116,5	605,5
59	23	148	56	60,5
60			101,5	168,5

ES 2 772 223 T3

Ejemplo #	EC ₅₀ del receptor de amilina de rata (pM)	EC ₅₀ del receptor de CTa de rata (pM)	EC ₅₀ del receptor de amilina humana (pM)	EC ₅₀ receptor de CTa humano (pM)
61	38	2360	67,5	334,5
62	281	17580	172	1073
63			558,5	631,5
64			153	94,5
65	1334	5353	217	341,5
66	305	656	182,5	210
67			96,5	114,5
68			93,5	430
69			101	614,5
70			58,5	99
71			79,5	946,5
72			89	100,5
73	52	167	38,5	45
74	504	2062	184	216
75			365,5	286
76	224	1043	121,5	85,5
77			66	110
78			68,5	96,5
79			56,5	77
80			455,5	4302,5
81			95,5	70,5
82			108,5	288,5
83			1748,5	8430
84	121	109	92,5	67
85			132,5	153
86			55	52,5
87	106	437	142	228
88	300	370	36	55
89	151	114	25,5	39,5
90	217	128	32,5	47,5
91			54	52
92			52	49
93	138	215	135,5	180
94			119,5	285,5
95			82	174,5
96	88	58	43	55
97			34	38,5
98			74,5	193
99			45	87,5
100			67,5	89,5
101	75	44	51,5	45,5
102			49,5	50,5
103			52,5	75
104			79,5	106,5
105			207,5	160,5
106			62,5	70,5
107			225	171
108			88	73,5
109			84,5	72,5
110			921	349
111			393,5	569,5
112			98	104
113			134	130
114			381,5	112,5
115			129	114,5
116			487	124
117			156	169
118			434,5	277
119			938	1076

ES 2 772 223 T3

Ejemplo #	EC ₅₀ del receptor de amilina de rata (pM)	EC ₅₀ del receptor de CTa de rata (pM)	EC ₅₀ del receptor de amilina humana (pM)	EC ₅₀ receptor de CTa humano (pM)
120	33	2569	29,5	690,5
121			45	61,5
122			63	61
123			136	377,5
124			89,5	367
125			288,5	443
126			76	101
127			1093,5	480,5
128			291	265,5
129			391	247,5
130			55,5	31,5
131			858	336
132			998,5	601
133			416	142
134			390	193,5
135			103	97
136			91	45
137			120,5	72
138			1512	496,5
139			107,5	58,5
140			198,5	114
141			482,5	889
142			301	110,5
143			41,5	22
144			625	347
145			80,5	83
146			91	59,5
147			540,5	229
148			1031	319
150			344	731,5
151			209	67,5
152			129	453
153			43	41
154			53	57
155			313	526
156			66	168
157			465	547
158			1129	1188
161			232	1133
162			411	2195
163			1059	3707
164			1713	3568
166			39	34
167			203	113
168			71	85
170			90	76

La solubilidad de los polipéptidos se probó como se describe en el Ensayo (IV) y los resultados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12

Ejemplo #	Solubilidad (µM)							
	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 6,5	pH 7,0	pH 7,5	pH 8,0
1	>200	>200	>200	52	16	15	58	138
3	>200	>200	68	>200	>200	>200	>200	>200
4	>200	120	0	42	82	146	183	190
5	>200	>200	62	164	181	>200	>200	>200
6	>200	163	168	12	4	7	18	48

ES 2 772 223 T3

Ejemplo #	Solubilidad (µM)							
	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 6,5	pH 7,0	pH 7,5	pH 8,0
7	>200	>200	13	69	32	42	89	155
8	178	93	2	1	1	1	1	3
9	>200	116	5	>200	>200	>200	>200	>200
10	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
11	>200	>200	>200	>200	44	29	157	>200
12	>200	>200	>200	>200	45	9	26	69
14	>200	>200	>200	192	102	13	7	47
15	>200	>200	10	1	1	10	56	134
16	179	80	1	34	12	104	122	129
17	>200	>200	>200	160	66	88	>200	>200
18	>200	>200	>200	>200	153	191	>200	>200
19	>200	>200	155	175	35	6	61	158
20	>200	>200	>200	6	0	1	13	73
21	>200	>200	>200	>200	87	0	0	1
22	>200	>200	>200	>200	57	2	1	3
25	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
26	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
27	>200	>200	>200	>200	174	160	>200	>200
28	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
29	>200	>200	107	>200	>200	>200	>200	>200
30	>200	>200	69	>200	>200	>200	>200	>200
31	>200	>200	>200	>200	8	0	10	65
32	>200	>200	>200	>200	6	0	6	55
33	>200	>200	>200	>200	17	0	0	16
34	>200	>200	>200	>200	4	0	0	13
35	>200	>200	194	17	0	0	9	66
36	>200	>200	>200	>200	14	0	2	60
37	>200	>200	>200	>200	124	198	>200	>200
38	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
39	>200	84	52	6	4	1	25	26
40	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
41	>200	118	1	1	1	1	1	4
42	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
43	>200	>200	194	176	195	>200	>200	>200
44	>200	>200	>200	21	20	52	>200	>200
45	>200	>200	>200	188	48	42	134	>200
46	>200	>200	>200	>200	>200	169	197	>200
47	>200	>200	>200	168	87	118	>200	>200
48	>200	>200	>200	>200	177	>200	>200	>200
49	>200	>200	27	>200	>200	>200	>200	>200
50	>200	>200	183	161	132	73	62	21
51	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
52	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
53	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
54	>200	>200	>200	100	150	>200	>200	>200
55	>200	>200	>200	>200	146	102,5	108,5	146
56	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
57	>200	>200	>200	>200	>200	>200	121	80
58	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
59	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
60	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
61	>200	>200	>200	>200	>200	81	50	48
62	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
63	>200	>200	>200	1	2	75	>200	>200
64	>200	>200	>200	>200	189	91	136	>200
65	>200	>200	>200	>200	>200	176	96	89
66	>200	>200	>200	>200	155	46	77	144
67	>200	>200	>200	>200	166	15	24	60
68	>200	>200	>200	>200	170	17	6	7

ES 2 772 223 T3

Ejemplo #	Solubilidad (µM)							
	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 6,5	pH 7,0	pH 7,5	pH 8,0
69	>200	>200	>200	>200	158	6	2	24
70	>200	>200	>200	>200	69	32	52	89
71	>200	>200	>200	>200	156	37	27	26
72	>200	>200	>200	168	130	126	165	>200
73	>200	>200	>200	>200	>200	155	169	>200
74	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
75	>200	>200	>200	>200	193	>200	>200	>200
76	>200	>200	>200	45	1	4	104	>200
77	>200	>200	>200	185	23	5	33	94
78	>200	>200	>200	>200	>200	122	92	79
79	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
80	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
81	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
82	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
83	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
84	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
85	>200	>200	>200	185	64	22	47	109
86	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
87	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
88	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
89	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
90	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
91	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
92	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
93	>200	>200	>200	>200	84	74	163	>200
94	>200	>200	>200	>200	>200	138	>200	>200
95	>200	>200	>200	>200	16	2	11	51
96	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
97	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
98	>200	>200	>200	85	1	1	1	1
99	>200	>200	>200	2	1	1	1	1
100	>200	>200	>200	>200	28	9	30	95
101	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
102	>200	>200	>200	>200	198	>200	>200	>200
103	>200	>200	>200	>200	>200	199	>200	>200
104	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
105	>200	>200	>200	>200	152	>200	>200	>200
106	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
107	>200	>200	>200	49	4	27	174	>200
108	>200	>200	>200	193	>200	>200	>200	>200
109	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
110	>200	>200	>200	1	1	1	1	1
111	>200	>200	>200	2	1	1	1	3
112	>200	>200	>200	>200	161	23	4	2
113	>200	>200	>200	>200	>200	>200	188	124
114	>200	>200	>200	>200	73	14	31	79
115	>200	>200	>200	>200	73	22	46	115
116	>200	>200	>200	>200	120	44	79	173
117	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
118	>200	>200	>200	>200	105	37	57	117
119	>200	>200	>200	32	3	13	114	>200
120	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	197
121	>200	>200	>200	155	127	54	157	117
122	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
123	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
124	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
125	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
127	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
128	>200	>200	>200	>200	114	140	>200	>200

ES 2 772 223 T3

Ejemplo #	Solubilidad (µM)							
	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 6,5	pH 7,0	pH 7,5	pH 8,0
129	>200	>200	>200	>200	194	>200	>200	>200
130	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
131	>200	172	150	25	27	6	4	3
132	>200	>200	>200	>200	198	142	169	>200
133	>200	>200	107	1	1	1	1	1
134	>200	>200	>200	3	1	2	3	2
135	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
136	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
137	>200	>200	>200	192	>200	>200	>200	>200
138	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
139	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
140	>200	>200	104	2	1	1	1	1
141	>200	>200	>200	84	3	2	1	1
142	>200	>200	185	118	1	1	1	1
143	>200	>200	>200	75	122	165	>200	>200
144	>200	>200	>200	47	2	1	1	1
145	>200	>200	>200	178	>200	>200	>200	>200
146	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
147	>200	>200	>200	1	1	1	1	1
148	>200	>200	>200	51	19	1	1	1
150	>200	>200	>200	>200	163	>200	>200	>200
151	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
155	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
157	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
158	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
159	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
160	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
161	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
162	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
163	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
164	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
166	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
167	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
168	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
169	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
170	>200	>200	186	>200	>200	>200	>200	188
171	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
177	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
178	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200

Los derivados de amilina se probaron para determinar la estabilidad física en el ensayo ThT (Ensayo (III)) y los datos se proporcionan en la Tabla 13.

Tabla 13

Ejemplo #	ThT pH 4,0 tiempo de retraso (h)	ThT pH 4,0 recuperación (%)
1	11	0
5	4,4	0
6	14	0
7	0	0
9	>45	57
11	7,4	3
12	>45	50
15	4,7	2
17	30,3	9
20	1,7	0
21	1	89
22	2,7	14
25	2,7	0
26	2	0

ES 2 772 223 T3

Ejemplo #	ThT pH 4,0 tiempo de retraso (h)	ThT pH 4,0 recuperación (%)
27	12,3	26
28	9,3	0
29	3	0
30	4,7	0
31	>45	94
32	>45	94
33	10	86
34	13	94
35	1,3	50
36	1,3	18
37	>45	87
38	>45	94
39	0	0
40	7	2
41	0	0
42	7,3	2
43	0	4
44	10,6	3
45	36,7	37
46	27,9	48,2
47	6	8
48	9	8
49	0	7
50	>45	85
51	28,7	73
52	>45	92,3
53	>45	96,2
54	23	42
55	37	90,6
56	16	35
57	>45	100
58	>45	97
59	>45	97
60	10	13
61	>45	100
62	30	53
63	2	100
64	6	8
65	>45	100
66	>45	92
67	>45	88
68	>45	93
69	>45	94
70	>45	85
71	>45	97
72	10,3	57
73	>45	100
74	>45	96
75	28	0
76	>45	100
77	>45	93
78	>45	100
79	16	35
80	3	7
81	24	50
82	14	27
83	>45	97
84	25.6	100
85	>45	100
86	5	3,4
87	25	85

ES 2 772 223 T3

Ejemplo #	ThT pH 4,0 tiempo de retraso (h)	ThT pH 4,0 recuperación (%)
88	>45	87
89	>45	91
90	>45	93
91	29	0
92	15,3	1,6
93	19	0
94	11,3	97
95	>45	89
96	>45	92
97	1,7	0
98	2,6	30
99	1,7	0
100	26	92
101	>45	98
102	3,1	2
103	1,3	2
104	23	3
105	26	48
106	9,7	2
107	19	24
108	2,7	0
109	6,3	2,4
110	1,7	0
111	>45	4
112	>45	100
113	>45	88
114	>45	89
115	>45	88
116	>45	92
117	>45	92
118	>45	81
119	>45	86
120	22	86
121	0,3	2,2
122	0,7	2,6
123	8,7	2,3
124	>45	9,3
125	19	2,3
126	10	0
127	6	15
128	>45	96
129	24	0
130	>45	93
131	0,3	18
132	>45	100
133	>45	37
134	>45	23
135	>45	100
136	>45	100
137	29	23
138	1,3	5
139	23,6	31
140	0	6
141	0	10
142	0	25
143	6	0
144	1,3	25
145	>45	91
146	>45	87
147	1	11
148	18	5

Ejemplo #	ThT pH 4,0 tiempo de retraso (h)	ThT pH 4,0 recuperación (%)
150	>45	83
151	9	68
156	>45	99
161	>45	96
162	>45	98
163	>45	95
164	>45	95
166	1,3	2
170	>45	94

Los derivados de amilina se probaron con respecto a su efecto en el ensayo de ingesta de alimentos (Ensayo (I)) y los resultados se muestran en la Tabla 14

Tabla 14

Ejemplo #	Ingesta de alimentos reducción 0-24 h 30 nmol/kg (%)	Ingesta de alimentos reducción 24-48 h 30 nmol/kg (%)	Ingesta de alimentos reducción 0-24 h 3 nmol/kg (%)	Ingesta de alimentos reducción 24-48 h 3 nmol/kg (%)
1	93	92	50	45
3			37	32
7			53	46
9			39	32
10			50	40
11	87	92		
12	70	45		
14			27	8
15			56	59
17			40	22
18			40	32
22			26	5
26			46	39
27			56	53
28			39	36
29			15	5
37			24	0
38			16	0
42			45	5
46			54	27
50			30	8
52			62	74
53			40	28
55	88	90	58	40
56			46	21
57			17	0
59			59	27
71			10	0
73			29	2
84			68	67
87			66	47
89			42	23
96			69	89
101			70	90
117			50	35
120			53	2

La vida media de los derivados de amilina de las invenciones se probó en mini cerdos como se describe en el Ensayo (IX) y los datos se proporcionan en la Tabla 15.

Tabla 15

Ejemplo #	PK minicerdos i.v. T1/2 (horas)
11	106
27	90
52	105
53	98
55	73
57	68
59	59
96	107

Abreviaturas

Algunas de las abreviaturas usadas en los Ejemplos son las siguientes:

Acm: acetamidometilo

HATU: (O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato)

HBTU: hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio

Fmoc: 9 H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilo

Boc: terc butiloxicarbonilo

Mtt: 4-metiltrilito

DCM: diclorometano

TIPS: triisopropilsilano

TFA: ácido trifluoroacético

NMP: 1-metil-pirrolidin-2-ona

HOAt: 1-Hidroxi-7-azabenzotriazol

DIC: Diisopropilcarbodiimida

Trt: trifenilmetilo

Ensayos

En los siguientes ejemplos, se hace referencia a los siguientes Ensayos:

Ensayo (I) - Protocolo experimental para probar la eficacia sobre el apetito mediante el uso de un modelo de rata alimentada *ad libitum*

Ensayo (II)a - Ensayo funcional - *Ensayo de receptor de calcitonina y amilina humana*

Ensayo (II)b - Ensayo funcional *Ensayos de receptor de calcitonina de rata y amilina de rata*

Ensayo (III) - Ensayos de fibrilación con tht para la evaluación de la estabilidad física de las formulaciones de proteínas

Ensayo (IV) - Determinación de la solubilidad

Ensayo (V) - Determinación de la unión al receptor de amilina humana

Ensayo (VI) - Determinación de la unión al receptor de amilina de rata

Ensayo (VII) - Determinación de la unión al receptor de calcitonina humana

Ensayo (VIII) - Determinación de la unión al receptor de calcitonina de rata

Ensayo (IX) - pk - Determinación de T $\frac{1}{2}$ en minicerdo

Ensayo (X) - pk - Determinación de T $\frac{1}{2}$ en rata

Ensayo (I) - Protocolo experimental para probar la eficacia sobre el apetito mediante el uso de un modelo de rata alimentada *ad libitum*

Se usan ratas Sprague Dawley (SD) de Taconic Europe, Dinamarca para los experimentos. Las ratas tienen un peso corporal de 200-250 g al comienzo del experimento. Las ratas llegan al menos 10-14 días antes del inicio del experimento para permitir la aclimatación a los entornos experimentales. Durante este período, los animales son manipulados al menos 2 veces. Después de la llegada, las ratas se alojan individualmente durante una semana en una fase de luz/oscuridad invertida (lo que significa que las luces están apagadas durante el día y encendidas durante la noche) durante dos semanas. Dado que las ratas normalmente son activas y comen la mayor parte de su

ingesta diaria de alimentos durante el período oscuro, las ratas se dosifican por la mañana justo antes de que se apaguen las luces. Esta configuración resulta en la variación de datos más baja y la sensibilidad de prueba más alta. El experimento se lleva a cabo en las jaulas caseras de las ratas y las ratas tienen acceso libre a alimentos y agua durante todo el período de aclimatación y el período del experimento. Cada dosis de derivado se prueba en un grupo de 5-8 ratas. Se incluye un grupo de vehículo de 6-8 ratas en cada conjunto de pruebas. Las ratas se dosifican una vez de acuerdo con el peso corporal con una solución de 0,01-3 mg/kg administrada por vía intraperitoneal (ip), oral (po) o subcutánea (sc). El tiempo de dosificación se registra para cada grupo. Después de la dosificación, las ratas son devueltas a sus jaulas caseras, donde después tienen acceso a comida y agua. El consumo de alimentos se registra individualmente de manera continua mediante el registro en línea o manualmente cada hora durante 7 horas, y luego después de 24 h y a veces de 48 h. Al final de la sesión experimental, los animales se sacrifican.

Los datos individuales se registran en hojas de Excel de Microsoft. Los valores atípicos se excluyen después de aplicar la prueba de evaluación estadística de Grubbs para valores atípicos, y el resultado se presenta gráficamente mediante el uso del programa GraphPad Prism.

Ensayo (II) - Ensayos funcionales

Ensayo (II)a - Ensayo de receptor de calcitonina y amilina humana

1. Esquema del ensayo de luciferasa

La activación de los receptores de calcitonina y amilina (coexpresión de receptor de calcitonina y proteínas modificadoras de la actividad del receptor (RAMP)) conduce a un aumento de las concentraciones intracelulares de AMPc. En consecuencia, la transcripción se activa por promotores que contienen múltiples copias del elemento de respuesta a AMPc (CRE). Por lo tanto, es posible medir la actividad de amilina mediante el uso de un gen reportero de luciferasa CRE introducido en las células BHK que también expresan receptores de calcitonina o amilina.

2. Construcción de la línea celular CRE-luc/receptor de calcitonina (a) y amilina 3(a).

Una línea celular BHK570 se transfectó de manera estable con el receptor de calcitonina humana y un gen reportero de luciferasa sensible a CRE. La línea celular se transfectó adicionalmente con RAMP-3, mediante el uso de métodos estándar. Esto convierte el receptor de calcitonina en un receptor de amilina 3(a). El metotrexato, la neomicina y la higromicina son marcadores de selección para la luciferasa, el receptor de calcitonina y RAMP-3, respectivamente.

3. Ensayos de luciferasa

Para realizar ensayos de actividad, se sembraron células BHK CRE-luc/receptor de amilina 3(a) o receptor de calcitonina (a) en placas de cultivo blancas de 96 pocillos a una densidad de aproximadamente 20 000 células/pocillo. Las células estaban en 100 µl de medio de crecimiento (DMEM con FBS al 10 %, Pen/Strep al 1 %, Na-piruvato 1 mM, Metotrexato 250 nM, Neomicina 500 µg/ml y Higromicina 400 µg/ml). Después de la incubación durante la noche a 37 °C y CO₂ al 5 %, el medio de crecimiento se reemplazó por 50 µl/pocillo de medio de ensayo (DMEM (sin rojo fenol), Glutamax™, FBS al 10 % y Hepes 10 mM, pH 7,4). Además, se añadieron 50 µl/pocillo de estándar o muestra en tampón de ensayo. Después de 3 horas de incubación a 37 °C y CO₂ al 5 %, el medio de ensayo con estándar o muestra se eliminó y se reemplazó por 100 µl/pocillo de PBS. Además, se añadió 100 µl/pocillo de LucLite™. Las placas se sellaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente, la luminiscencia se midió en un TopCounter (Packard) en modo SPC (conteo de fotones individuales).

Ensayo (II)b - Ensayos de receptor de calcitonina de rata y amilina de rata

esquema del ensayo de AMPc

La activación de los receptores de calcitonina y amilina (coexpresión de receptor de calcitonina y proteínas modificadoras de la actividad del receptor (RAMP)) conduce a un aumento de las concentraciones intracelulares de AMPc. Para cuantificar los niveles de AMPc en las células transfectadas transientemente, se usó el Ensayo de Activación de Adenil Ciclasa FlashPlate® de Perkin Elmer. El principio básico del Ensayo FlashPlate® es una competencia entre AMPc radiactivo y no radiactivo generado por las células para un número fijo de sitios de unión.

Construcción de células con receptor de calcitonina(a) de rata y amilina 3(a) de rata.

Las células BHK tk⁺ts 13 se transfectaron transitoriamente con receptor de calcitonina (a) o receptor de amilina 3 (a) de rata (receptor de calcitonina(a) de rata + RAMP3 de rata) mediante el uso de FuGENE® 6 (Roche), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Ensayo AMPc

24 horas después de la transfección transitoria, se añadieron las células (células con receptor de calcitonina(a) de rata o amilina 3(a) de rata) (100 000 células/pocillo) a las FlashPlates® de 96 pocillos con muestras o estándar en tampón de estimulación FlashPlate con IBMX y se incubaron durante 30 min. La mezcla de detección se creó de acuerdo con el protocolo del fabricante y se midió el centelleo después de 3 h de incubación en TopCounter™ (Packard).

Ensayo (III) - Ensayos de fibrilación con ThT para la evaluación de la estabilidad física de las formulaciones de proteínas

La estabilidad física baja de un polipéptido puede conducir a la formación de fibrillas de amiloide, que se observa como estructuras macromoleculares similares a hilo en la muestra, bien ordenadas, que eventualmente resultan en la formación de gel. Esto se ha medido tradicionalmente mediante inspección visual de la muestra. Sin embargo, ese tipo de medición es muy subjetiva y depende del observador. Por lo tanto, la aplicación de una sonda indicadora de molécula pequeña es mucho más ventajosa. La tioflavina T (ThT) es una sonda de este tipo y tiene una firma de fluorescencia distinta cuando se une a las fibrillas [Naiki y otros (1989) Anal. Biochem. 177, 244-249; LeVine (1999) Methods. Enzymol. 09, 274-284].

El curso temporal para la formación de fibrillas puede describirse mediante una curva sigmoidea con la siguiente expresión [Nielsen y otros (2001) Biochemistry 40, 6036-6046]:

$$F = f_i + m_i t + \frac{f_f + m_f t}{1 + e^{-[(t-t_0)/\tau]}} \quad \text{Ec. (1)}$$

Aquí, F es la fluorescencia de ThT en el tiempo t. La constante t_0 es el tiempo necesario para alcanzar el 50 % de fluorescencia máxima. Los dos parámetros importantes que describen la formación de la fibrilla son el tiempo de retraso calculado por $t_0 - 2\tau$ y la constante de tasa aparente $k_{app} = 1/\tau$.

La formación de un intermediario parcialmente plegado del polipéptido se sugiere como un mecanismo de iniciación general para la fibrilación. Algunos de esos intermediarios se nuclean para formar una plantilla sobre la cual los intermediarios posteriores pueden ensamblarse y se procede a la fibrilación. El tiempo de retraso corresponde al intervalo en el cual se construye la masa crítica de núcleos y la constante de tasa aparente es la tasa con la que se forma la propia fibrilla.

Preparación de la muestra

Las muestras se prepararon poco antes de cada ensayo. Cada composición de muestra se describe en cada ejemplo. El pH de la muestra se ajustó al valor deseado mediante el uso de las cantidades apropiadas de NaOH y HClO4 o HCl concentrados. La tioflavina T se añadió a las muestras a partir de una solución madre en H2O a una concentración final de 1 µM.

Las alícuotas de muestra de 200 µl se colocaron en una placa de microtitulación de 96 pocillos (Packard OptiPlate™-96, poliestireno blanco). Usualmente, se colocaron cuatro u ocho réplicas de cada muestra (que corresponden a una condición de prueba) en una columna de pocillos. La placa se selló con Scotch Pad (Qiagen).

Incubación y medición de fluorescencia

La incubación a una temperatura dada, la agitación y la medición de la emisión de fluorescencia de ThT se realizó en un lector de placas de fluorescencia Fluoroskan Ascent FL o un lector de placas (Thermo Labsystems). La temperatura se ajustó a 37 °C. La agitación orbital se ajustó a 960 rpm con una amplitud de 1 mm en todos los datos presentados. La medición de la fluorescencia se realizó mediante el uso de excitación a través de un filtro de 444 nm y la medición de la emisión a través de un filtro de 485 nm.

Cada ejecución se inició mediante la incubación de la placa a la temperatura del ensayo durante 10 min. La placa se midió cada 20 minutos por un período de tiempo deseado. Entre cada medición, la placa se agitó y se calentó como se describió.

Manejo de los datos

Los puntos de medición se guardaron en formato de Microsoft Excel para el procesamiento posterior y el dibujo y el ajuste de curvas se realizó mediante el uso de GraphPad Prism. La emisión de fondo a partir de ThT en ausencia de fibrillas fue insignificante. Los puntos de datos son típicamente una media de cuatro u ocho muestras y se muestran con barras de error de la desviación estándar. Solo los datos obtenidos en el mismo experimento (es decir las muestras en la misma placa) se presentan en el mismo gráfico asegurando una medida de formación de fibrillas relativa entre los experimentos.

El conjunto de datos puede ajustarse a Eq. (1). Sin embargo, dado que las curvas sigmodiales completas en este caso no siempre se logran durante el tiempo de medición, el grado de fibrilación se expresa como fluorescencia ThT tabulada como la media de las muestras y se muestra con la desviación estándar en varios puntos de tiempo.

5 Medición de concentraciones iniciales y finales

La concentración del polipéptido en cada una de las formulaciones probadas se midió tanto antes de la aplicación en el ensayo de fibrilación ThT ("Inicial") como después de completar la fibrilación ThT ("Después del ensayo ThT"). Las concentraciones se determinaron por métodos de HPLC inversa mediante el uso de un estándar de pramlintida como referencia. Antes de la medición después de la finalización, se recogieron 150 μ l de cada una de las réplicas y se transfirieron a un tubo Eppendorf. Estos se centrifugaron a 30 000 G durante 40 minutos. Los sobrenadantes se filtraron a través de un filtro de 0,22 μ m antes de la aplicación en el sistema de HPLC.

15 Ensayo (IV) - Determinación de la solubilidad

El polipéptido se disolvió en agua a \sim 500 nmol/ml y se mezcló 1:1 con una serie de tampones (glicilglicina 100 mM pH 3,0, glicilglicina 100 mM pH 4,0, glicilglicina 100 mM pH 5,0, bistrispropano 100 mM pH 6,0, bistrispropano 100 mM pH 6,5, bistrispropano 100 mM pH 7,0, bistrispropano 100 mM pH 7,5, bistrispropano 100 mM pH 8,0). Después de 18 horas a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron y la concentración del polipéptido se determinó por UPLC.

20 Ensayo (V) - Determinación de la unión al receptor de amilina humana

El ensayo de unión se realizó mediante el uso de perlas de ensayo de proximidad de centelleo (SPA) (RPNQ0001) de PerkinElmer y membranas celulares de las células Amilina 3(a)/CRE-luc (como se describió en el Ensayo (II)). Las membranas se prepararon de la siguiente manera; las células se lavaron con PBS y se incubaron con Verseno durante aproximadamente 5 minutos antes de la cosecha. Las células se lavaron con PBS y la suspensión celular se centrifugó durante 5 minutos a 1000 rpm. Las células se homogeneizaron (ultrathurrax) en un tampón que contenía Na-HEPES 20 mM y EDTA 10 mM (pH 7,4) y se centrifugaron a 20 000 rpm durante 15 minutos. El sedimento resultante se resuspendió, se homogeneizó y se centrifugó (20 000 rpm, 15 min) en un tampón que contenía Na-HEPES 20 mM y EDTA 0,1 mM (pH 7,4, tampón 2). El sedimento resultante se resuspendió en tampón 2 y se midió la concentración de proteína (ensayo de proteína BCA, Pierce). El homogenado se mantuvo frío durante todo el procedimiento. Las membranas se mantuvieron a -80 °C hasta su uso. El ensayo se realizó en un Optiplate de 384 pocillos (PerkinElmer) en un volumen total de 40 μ l. Las membranas se mezclaron con perlas de SPA. La concentración final de las membranas 35 ng/ μ L final y las perlas de SPA fue de 0,05 mg/pocillo. Los compuestos de prueba se disolvieron en DMSO y se diluyeron adicionalmente en tampón de ensayo (Hepes 50 mM, pH 7,4, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 5 mM, OA al 0,1 % y Tween20 al 0,02 %). El radioligando amilina I¹²⁵ de rata (NEX448 PerkinElmer) se disolvió en tampón de ensayo y se añadió al Optiplate a una concentración final de 50 pM/pocillo (aproximadamente 20 000 cpm/10 μ l). La mezcla final se incubó con agitación a 400 rpm durante 120 minutos a 25 °C antes de la centrifugación (1500 rpm, 10 minutos). Las muestras se analizaron en TopCounter™ (Packard). El IC₅₀ se calculó mediante el uso de (análisis de competencia de unión a un sitio) GraphPad Prism5 como una medida de afinidad del receptor.

45 Ensayo (VI) - Determinación de la unión al receptor de amilina de rata

El ensayo se realizó como se describió anteriormente (Ensayo (V) - Determinación de la unión al receptor de amilina humana) con la excepción de que usamos membranas preparadas a partir de células BHK tk'ts 13 que se transfectaron transitoriamente con el receptor de calcitonina de rata RAMP 3 en una relación equimolar (1:2). Las células BHK tk'ts 13 se transfectaron transitoriamente con el receptor de calcitonina de rata mediante el uso de FuGENE® 6 (Roche), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las células se cultivaron en DMEM con FBS al 10 % y Pen/Strep al 1 %. Aproximadamente 48 horas después de la transfección, se recogieron las células y se prepararon las membranas.

55 Ensayo (VII) - Determinación de la unión al receptor de calcitonina humana

El ensayo de unión se realizó mediante el uso de perlas de ensayo de proximidad de centelleo (SPA) (RPNQ0001) de PerkinElmer y membranas celulares preparadas a partir de una línea celular BHK tk'ts 13 que se transfectó de manera estable con el receptor de calcitonina humana y un gen reportero de luciferasa sensible a CRE. Las membranas se prepararon de la siguiente manera; las células se lavaron con PBS y se incubaron con Verseno durante aproximadamente 5 minutos antes de la cosecha. Las células se lavaron con PBS y la suspensión celular se centrifugó durante 5 minutos a 1000 rpm. Las células se homogeneizaron (Ulthurrax) en un tampón que contenía Na-HEPES 20 mM y EDTA 10 mM (pH 7,4) y se centrifugaron a 20 000 rpm durante 15 minutos. El sedimento resultante se resuspendió, se homogeneizó y se centrifugó (20 000 rpm, 15 min) en un tampón que contenía Na-HEPES 20 mM y EDTA 0,1 mM (pH 7,4, tampón 2). El sedimento resultante se resuspendió en tampón 2 y se midió la concentración de proteína (ensayo de proteína BCA, Pierce). El homogenado se mantuvo frío durante todo el procedimiento. Las membranas se mantuvieron a -80 °C hasta su uso. El ensayo se realizó en un Optiplate de 384

pocillos (PerkinElmer) en un volumen total de 40 μ l. Las membranas se mezclaron con perlas de SPA. La concentración final de las membranas 35 ng/ μ L final y la concentración final de las perlas de SPA fue de 0,05 mg/pocillo. Los compuestos de prueba se disolvieron en DMSO y se diluyeron adicionalmente en tampón de ensayo (Hepes 50 mM, pH 7,4, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 5 mM, OA al 0,1 % y Tween20 al 0,02 %). El radioligando calcitonina I¹²⁵ (NEX422 PerkinElmer) se disolvió en tampón de ensayo y se añadió al Optiplate a una concentración final de 75 pM/pocillo (aproximadamente 30 000 cpm/10 μ l). La mezcla final se incubó durante 120 con agitación a 400 rpm minutos a 25 °C antes de la centrifugación (1500 rpm, 10 minutos). Las muestras se analizaron en TopCounter™ (Packard). El IC₅₀ se calculó mediante el uso de (análisis de competencia de unión a un sitio) GraphPad Prism5 como una medida de afinidad del receptor.

Ensayo (VIII) - Determinación de la unión al receptor de calcitonina de rata

El ensayo se realizó como se describió anteriormente (Ensayo (VII) - Determinación de la unión al receptor de calcitonina humana) con la excepción de que usamos membranas preparadas a partir de células BHK tk'ts 13 que se transfectaron transitoriamente con el receptor de calcitonina de rata. Las células BHK tk'ts 13 se transfectaron transitoriamente con el receptor de calcitonina de rata mediante el uso de FuGENE® 6 (Roche), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las células se cultivaron en DMEM con FBS al 10 % y Pen/Strep al 1 %. Aproximadamente 48 horas después de la transfección, se recogieron las células y se prepararon las membranas.

Ensayo (IX) - pK - Determinación de T_{1/2} en minicerdo

T_{1/2} es la vida media terminal = ln2/ λ_2 de un compuesto en plasma. λ_2 es la constante de velocidad de primer orden asociada con la porción terminal (logarítmica lineal) de la curva de concentración plasmática-tiempo y se estima mediante regresión lineal del tiempo frente a la concentración logarítmica.

Los valores de t_{1/2} de los análogos de amilina de la invención se determinan mediante estudios farmacocinéticos en minicerdos Göttingen machos de Ellegaard Göttingen Minipigs ApS y se siguen los principios del cuidado de animales de laboratorio.

Se permitió un período de aclimatación de aproximadamente 6-10 días antes de que los animales ingresaran al estudio. Al comienzo del período de aclimatación, los minicerdos tenían alrededor de 5 a 12 meses de edad y en el intervalo de peso de 7-35 kg. Los minicerdos tenían dos catéteres venosos centrales insertados que se usaron para tomar muestras de sangre.

Los estudios se realizaron en una habitación para el animal que se iluminó para dar un ciclo de aproximadamente 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Los animales fueron alojados individualmente.

Los animales tuvieron acceso libre a agua para beber de calidad doméstica durante el estudio, pero se les sometió típicamente a ayuno desde la noche antes de la dosificación hasta aproximadamente 6-12 horas después de la dosificación. Los animales se pesaron al llegar y en los días de dosificación.

En los presentes estudios, las sustancias de prueba se administraron por vía subcutánea en dosis aproximadas de 2 nmol/kg. Los animales recibieron una única inyección subcutánea. La inyección subcutánea se administró en el lado derecho del cuello, aproximadamente a 5-7 cm de la oreja y a 7-9 cm del centro del cuello. Las inyecciones se administraron con un tapón de goma en la aguja, lo que permitió introducir aproximadamente 0,5 cm de la aguja. Cada sustancia de prueba se administró típicamente a tres, pero en algunos casos a dos o cuatro animales.

Se obtuvo un perfil completo de concentración plasmática-tiempo de cada animal, al emplear 12-16 puntos de muestreo. Por ejemplo, se recolectaron muestras de sangre de acuerdo con el siguiente programa:

Después de la administración subcutánea:

Predosis (0), 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168 y 240 horas después de la inyección.

En algunos casos, también se tomaron muestras de sangre adicionales hasta 288 horas después de la inyección.

En cada tiempo de toma de muestra, se extrajeron 0,5 a 2 ml de sangre de cada animal. Las muestras de sangre se tomaron a través del catéter venoso central.

Las muestras de sangre se recogieron en tubos de ensayo EDTA (es decir, Sarstedt Micro tubo 1,3 mL K3E). Las muestras de sangre se mantuvieron en hielo durante un máximo de 20 minutos antes de la centrifugación. El plasma se separó mediante centrifugación (es decir, a 4 °C, 10 min., 1500G) y se transfirió inmediatamente a tubos Micronic. Se transfirieron aproximadamente 200 μ l de plasma a cada tubo Micronic. El plasma se almacenó a -20 °C hasta que se analizó. Las muestras de plasma se evaluaron para determinar el contenido de amilina mediante el uso de un ensayo ELISA.

- Los perfiles de concentración plasmática-tiempo se analizaron mediante un análisis farmacocinético no compartimental (NCA) mediante el uso de WinNonlin Professional 5.0 (Pharsight Inc., Mountain View, CA, EE.UU.). NCA se realizó mediante el uso de los perfiles individuales de concentración plasmática-tiempo de cada animal. $T_{1/2}$ es la vida media terminal = $\ln 2/\lambda_z$ y se determinó a partir de λ_z , la constante de velocidad de primer orden asociada con la porción terminal (logarítmica lineal) de la curva, estimada por regresión lineal de tiempo frente a la concentración logarítmica.
- 5
- Ensayo ELISA de plasma para la cuantificación de amilina
- 10 El ELISA de amilina humana es un inmunoensayo tipo sándwich basado en anticuerpos monoclonales para determinar los niveles de amilina en el plasma humano. El anticuerpo de captura reconoce la amilina humana, ácido amilínico (amilina desamidada), un fragmento 1-20 de amilina, pero no amilina reducida. El anticuerpo de detección se une a la amilina humana reducida o no reducida, pero no al ácido amilínico, y forma complejo con estreptavidina-fosfatasa alcalina. El sustrato, fosfato de 4-metilumbeliferilo, se aplica al sándwich completo y la señal fluorescente, monitoreada a 355 nm/460 nm, es proporcional a la cantidad de amilina presente en la muestra.
- 15
- Método MS para la cuantificación de amilina
- Se diluyen 40 μ l de plasma con 120 μ l de EtOH al 66,67 % + HCOOH al 1 % y se mezclan. Se centrifuga durante 20 min. a 13 000 rpm, 4 °C. El sobrenadante se analiza mediante un método LC-MS en un Sciex API 3000 y se cuantifica con un estándar compuesto en plasma
- 20
- Ensayo (X) - pK - Determinación de $T_{1/2}$ en rata
- 25 $T_{1/2}$ es la vida media terminal = $\ln 2/\lambda_z$ de un compuesto en plasma. λ_z es la constante de velocidad de primer orden asociada con la porción terminal (logarítmica lineal) de la curva de concentración plasmática-tiempo y se estima mediante regresión lineal del tiempo frente a la concentración logarítmica.
- 30 Los valores de $T_{1/2}$ de los análogos de amilina de la invención se determinan mediante estudios farmacocinéticos en ratas macho Sprague Dawley, de Taconic Europe, y se siguen los principios del cuidado de animales de laboratorio.
- Se permitió un período de aclimatación de aproximadamente 7 días antes de que los animales ingresaran al estudio. Al comienzo del período de aclimatación, las ratas estaban en el intervalo de peso de 300-400 g. Las ratas tenían catéteres permanentes insertados en a. carotis que se utilizaron para tomar muestras de sangre.
- 35
- Los estudios se realizaron en una habitación para el animal que se iluminó para dar un ciclo de aproximadamente 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Los animales fueron alojados individualmente debido a los catéteres y tenían comida y agua a voluntad. Los animales se pesaron en los días de dosificación.
- 40 En los presentes estudios, las sustancias de prueba se administraron por vía subcutánea en dosis aproximadas de 20 nmol/kg. Los animales recibieron una única inyección subcutánea en el cuello mediante el uso de una aguja 25G con jeringa. Cada sustancia de prueba se administró típicamente a tres, pero en algunos casos a dos o cuatro animales.
- 45 Se obtuvo un perfil completo de concentración plasmática-tiempo de cada animal, al emplear 8-10 puntos de muestreo. Por ejemplo, se recolectaron muestras de sangre de acuerdo con el siguiente programa:
- Después de la administración subcutánea:
- 50 Predosis (0), 0,5, 1, 1,5, 2, 4, 6, 12, 24, 48 y 72 horas después de la inyección.
- En cada tiempo de toma de muestra, se extrajeron 0,08 a 0,10 ml de sangre de cada animal. Las muestras de sangre se tomaron a través del catéter.
- 55 Las muestras de sangre se colectaron en tubos de ensayo EDTA. Las muestras de sangre se mantuvieron en hielo durante un máximo de 20 minutos antes de la centrifugación. El plasma se separó mediante centrifugación (es decir, a 4 °C, 10 min., 1500G) y se transfirió inmediatamente a tubos Micronic placas de PCR. Aproximadamente 40 μ l de plasma se transfirieron y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. Las muestras de plasma se evaluaron para determinar el contenido de amilina mediante el uso de un ensayo ELISA.
- 60
- Los perfiles de concentración plasmática-tiempo se analizaron mediante un análisis farmacocinético no compartimental (NCA) mediante el uso de WinNonlin Professional 5.0 (Pharsight Inc., Mountain View, CA, EE.UU.). NCA se realizó mediante el uso de los perfiles individuales de concentración plasmática-tiempo de cada animal. $T_{1/2}$ es la vida media terminal = $\ln 2/\lambda_z$ y se determinó a partir de λ_z , la constante de velocidad de primer orden asociada con la porción terminal (logarítmica lineal) de la curva, estimada por regresión lineal de tiempo frente a la concentración logarítmica.
- 65

Preparaciones

Las secuencias de polipéptidos se prepararon de acuerdo con la síntesis de polipéptidos mencionada a continuación y los compuestos tal como se presentan en las Tablas (por ejemplo, la Tabla 10) se prepararon de acuerdo con la síntesis mencionada a continuación.

Un método de síntesis de polipéptidos fue mediante la química de Fmoc en un sintetizador de polipéptidos Liberty basado en microondas (CEM Corp., Carolina del Norte). La resina era Tentagel S RAM con una carga de aproximadamente 0,25 mmol/g o PAL-ChemMatrix con una carga de aproximadamente 0,43 mmol/g. La química de acoplamiento fue DIC/HOAt en NMP mediante el uso de soluciones de aminoácidos de 0,3 M en NMP y un exceso molar de 6-8 veces. Las condiciones de acoplamiento fueron de 5 minutos a 70 °C. La desprotección se realizó con piperidina al 5 % en NMP a 70 °C. Los aminoácidos protegidos usados fueron aminoácidos-Fmoc estándar (suministrados, por ejemplo, de Anaspec o Novabiochem) disueltos a 0,3 M en NMP que contiene HOAt 0,3 M.

Otro método de síntesis de polipéptidos fue mediante la química de Fmoc en un sintetizador de polipéptidos Prelude (Protein Technologies, Arizona). La resina era Tentagel S RAM con una carga de aproximadamente 0,25 mmol/g o PAL-ChemMatrix con una carga de aproximadamente 0,43 mmol/g. La química de acoplamiento fue DIC/HOAt en NMP mediante el uso de soluciones de aminoácidos de 0,3 M en NMP y un exceso molar de 6-8 veces. Las condiciones de acoplamiento fueron acoplamientos simples o dobles durante 1 o 2 horas a temperatura ambiente. La desprotección fue con piperidina al 20 % en NMP. Los aminoácidos protegidos usados fueron aminoácidos-Fmoc estándar (suministrados, por ejemplo, por Anaspec o Novabiochem) disueltos a 0,3 M en NMP que contiene HOAt a 0,3 M.

Otro método de síntesis de polipéptidos fue en un sintetizador de polipéptidos 433 de Applied Biosystems en una escala de 0,25 mmol o 1,0 mmol mediante el uso de los protocolos FastMoc UV suministrados por el fabricante que emplean acoplamientos mediados por HBTU o HATU en NMP, y monitoreo UV de la desprotección del grupo de protección Fmoc. La resina de partida usada para la síntesis de las amidas polipeptídicas fue la resina Rink-Amide. Los derivados de aminoácidos protegidos usados fueron aminoácidos-Fmoc estándar (suministrados de por ejemplo Anaspec, o Novabiochem) suministrado en cartuchos previamente pesados adecuados para el sintetizador ABI433A.

Cuando se deseaba una modificación química de una cadena lateral de lisina, la lisina se incorporó como Lys(Mtt) y el aminoácido N-terminal se incorporó a la secuencia como un aminoácido-Boc o, si el aminoácido N-terminal se incorporó como un aminoácido-Fmoc, el grupo Fmoc se eliminó y el N-terminal se protegió mediante tratamiento con 6 equivalentes de carbonato de Boc y 6 equivalentes de DIPEA en NMP durante 30 minutos. La resina se lavó con NMP y DCM y el grupo Mtt se eliminó mediante la suspensión de la resina en hexafluoroisopropanol puro durante 20 minutos seguido de lavado con DCM y NMP. La modificación química de la lisina se realizó mediante la adición de uno o más de los bloques de construcción enumerados a continuación mediante los mismos métodos usados para la síntesis de polipéptidos, es decir, mediante una o más etapas automatizadas en el Liberty o el ABI 433 o mediante una o más etapas manuales de acoplamiento a temperatura ambiente. Después de la síntesis la resina se lavó con DCM y se secó, y el polipéptido se escindió de la resina mediante un tratamiento de 2 horas con TFA/TIPS/agua (92,5/5/2,5 o 95/2,5/2,5) seguido por precipitación con 4 volúmenes de dietiléter, lavado adicional con dietiléter y secado. Si el polipéptido contenía cisteínas protegidas con grupos Acm, el polipéptido se redisolvió en agua a 2-5 mg/ml, el pH se ajustó a menos de 4 y el puente disulfuro se formó mediante tratamiento con 4 equivalentes de yodo (2 % p/v en metanol) durante 15 minutos. Alternativamente, el puente disulfuro se formó sobre la resina mediante el uso de Trt como el grupo protector para la cisteína y tratando con 10 equivalentes de yodo en NMP durante 1 hora. En este caso, el polipéptido bruto se purificó directamente después de la escisión y precipitación con éter dietílico.

Purificación: El polipéptido crudo se purificó por HPLC semipreparativa en una columna de 20 mm x 250 mm empacada con sílice C-18 de 5 µ o 7 µ. Las soluciones de polipéptidos se bombearon sobre la columna de HPLC y los polipéptidos precipitados se disolvieron en 5 ml de ácido acético al 50 % H₂O y diluido a 20 ml con H₂O e inyectado en la columna que luego se eluyó con un gradiente de 40-60 % de CH₃CN en 0,1 % TFA 10 ml/min durante 50 min a 40 °C. Se colectaron las fracciones que contenían el polipéptido. El polipéptido purificado se liofilizó después de la dilución del eluato con agua.

Para el análisis de las fracciones de HPLC y el análisis del producto final de RP-HPLC se realizó mediante el uso de detección UV a 214 nm y, por ejemplo, una columna de sílice Vydac 218TP54 de 4,6 mm x 250 mm 5 µ C-18 (The Separations Group, Hesperia, EE.UU.) y se eluyó a, por ejemplo, 1 ml/min a 42 °C. Muy a menudo se usó una de las cuatro condiciones de elución diferentes:

A1: Equilibración de la columna con un tampón que consiste en (NH₄)₂SO₄ 0,1 M, que se ajustó a pH 2,5 con H₂SO₄ concentrado y elución mediante un gradiente de 0 % a 60 % de CH₃CN en el mismo tampón durante 50 min.

B1: Equilibración de la columna con TFA/H₂O al 0,1 % y elución mediante un gradiente de 0 % CH₃CN/0,1 % de TFA/H₂O a 60 % de CH₃CN/0,1 % de TFA/H₂O durante 50 min.

B6: Equilibración de la columna con TFA/H₂O al 0,1 % y elución mediante un gradiente de 0 % CH₃CN/0,1 % de

TFA/H₂O a 90 % de CH₃CN/0,1 % de TFA/H₂O durante 50 min.

Alternativamente, el análisis de RP-HPLC se realizó mediante el uso de detección UV a 214 nm y una columna de sílice Symmetry300, 3,6 mm x 150 mm, 3,5 μm C-18 (Waters) que se eluyó a 1 ml/min a 42 °C.

5 B4: Equilibración de la columna con TFA/H₂O al 0,05 % y elución mediante un gradiente de 5 % CH₃CN/0,05 % de TFA/H₂O a 95 % de CH₃CN/0,05 % de TFA/H₂O durante 15 min.

La identidad del polipéptido se confirmó por MALDI-MS en un Bruker Microflex.

10 Los polipéptidos preparados se muestran en la Tabla 10 (presentada anteriormente):

Observaciones

15 Todos los encabezamientos y sub-encabezamientos se usan en la presente solo por conveniencia y no deben interpretarse como limitantes de la invención de ninguna manera.

20 El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ilustrativo (por ejemplo, “tal como”) proporcionado en la presente, está destinado meramente a ilustrar mejor la invención y no constituye una limitación sobre el alcance de la invención a menos que se indique de cualquier otra manera. Ningún lenguaje en la descripción debe interpretarse como que indica cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

25 SEQ ID NO: 1

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

30 SEQ ID NO: 2

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

35 SEQ ID NO: 3

Xaa₁-Cys- Xaa₃-Thr-Ala-Thr-Cys-Ala-Thr-Gln-Arg-Leu-Ala-Xaa₁₄-Phe-Leu- Xaa₁₇-Xaa₁₈-Ser-Ser- Xaa₂₁- Xaa₂₂- Phe-Gly- Pro- Xaa₂₆-Leu-Pro-Pro-Thr- Xaa₃₁-Val-Gly-Ser- Xaa₃₅-Thr-Pro

40 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novo Nordisk A/S

<120> Derivados de amilina

45 <130> 8537

<140> XXXXXX

<141> 2012-04-06

50 <160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

55 <210> 1

<211> 37

<212> PRT

<213> humana

60 <400> 1

Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15

65 Val His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Ser Thr Asn Val
20 25 30

ES 2 772 223 T3

Gly Ser Asn Thr Tyr
35

5 <210> 2
<211> 37
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

10 <220>
<223> péptido

<400> 2

15 Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
1 5 10 15

Val His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Pro Ile Leu Pro Pro Thr Asn Val
20 25 30

20 Gly Ser Asn Thr Tyr
35

25 <210> 3
<211> 37
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

30 <220>
<223> péptido

35 <220>
<221> Misc_Característica
<222> (1)..(1)
<223> Xaa1 se elimina o se selecciona independientemente de Ala, Cys, Glu,
Gly, His, Arg, Ser y Lys;

40 <220>
<221> Misc_Característica
<222> (3)..(3)
<223> Xaa3 se selecciona independientemente de Gly, His, Arg, Ser y Asn;

45 <220>
<221> Misc_Característica
<222> (17)..(17)
<223> Xaa17 se selecciona independientemente de His, Arg, Lys y Val;

50 <220>
<221> Misc_Característica
<222> (18)..(18)
<223> Xaa18 se selecciona independientemente de Arg, Lys y His;

55 <220>
<221> Misc_Característica
<222> (21)..(21)
<223> Xaa21 se selecciona independientemente de Ala, Lys, Gln, Ser y Asn;

60 <220>
<221> Misc_Característica
<222> (22)..(22)
<223> Xaa22 se selecciona independientemente de Glu, Gln, Ser, Thr y Asn;

65 <220>
<221> Misc_Característica
<222> (26)..(26)

ES 2 772 223 T3

<223> Xaa26 se selecciona independientemente de Pro, Arg y Ile;

<220>

<221> Misc_Característica

5 <222> (31)..(31)

<223> Xaa31 se selecciona independientemente de Ser, Glu, Asp y Asn;

<220>

<221> Misc_Característica

10 <222> (35)..(35)

<223> Xaa35 se selecciona independientemente de His, Arg, Lys, Asp y Glu;

<220>

<221> Misc_Característica

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

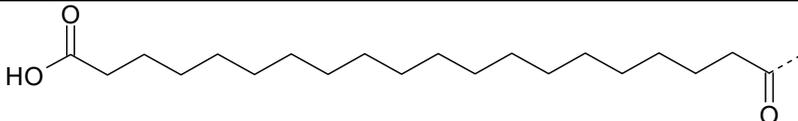
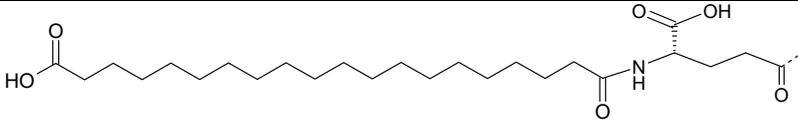
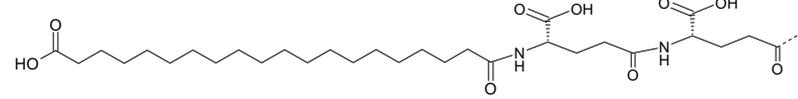
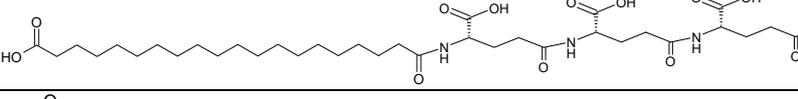
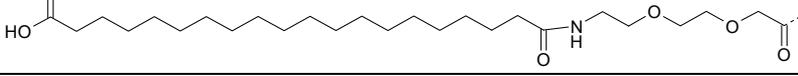
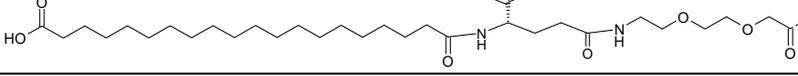
<223> Xaa37 se selecciona independientemente de Pro y Tyr;

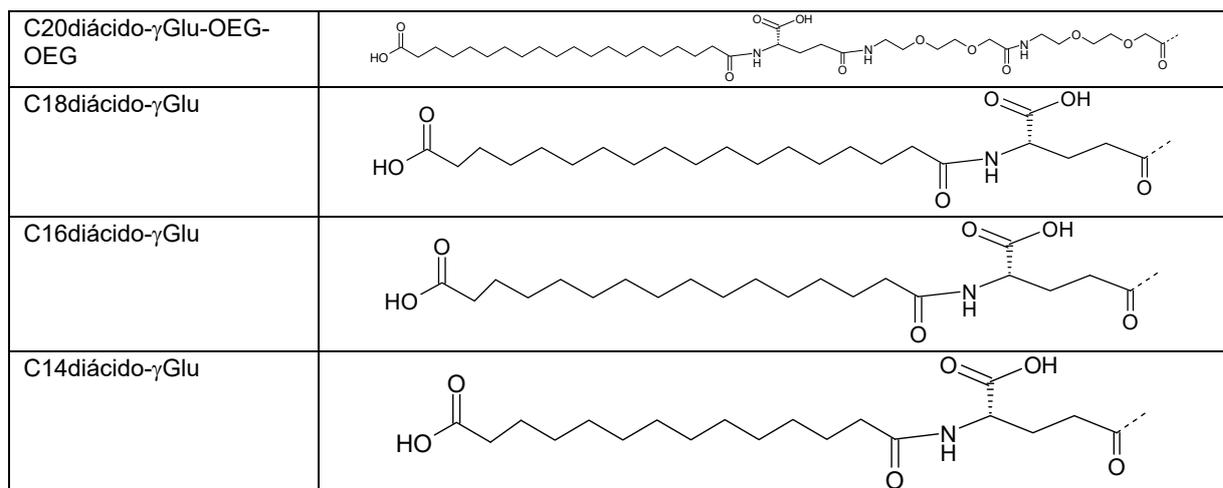
<400> 3

20		Xaa	Cys	Xaa	Thr	Ala	Thr	Cys	Ala	Thr	Gln	Arg	Leu	Ala	Glu	Phe	Leu
		1				5					10					15	
		Xaa	Xaa	Ser	Ser	Xaa	Xaa	Phe	Gly	Pro	Xaa	Leu	Pro	Pro	Thr	Xaa	Val
				20						25					30		
25		Gly	Ser	Xaa	Thr	Xaa											
				35													

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de acuerdo con la Fórmula (I):
 Xaa1-Cys-Xaa3-Thr-Ala-Thr-Cys-Ala-Thr-Gln-Arg-Leu-Ala-Xaa14-Phe-Leu- Xaa17-Xaa18-Ser-Ser- Xaa21-
 Xaa22- Phe-Gly-Pro-Xaa26-Leu-Pro-Pro-Thr- Xaa31-Val-Gly-Ser-Xaa35-Thr-Pro;
 en donde
 Xaa1 se elimina o se selecciona independientemente de Ala, Cys, Glu, Gly, His, Arg, Ser y Lys;
 Xaa3 se selecciona independientemente de Gly, His, Arg, Ser y Asn;
 Xaa14 es Glu;
 Xaa17 se selecciona independientemente de His, Arg, Lys y Val;
 Xaa18 se selecciona independientemente de Arg, Lys e His;
 Xaa21 se selecciona independientemente de Ala, Lys, Gln, Ser y Asn;
 Xaa22 se selecciona independientemente de Glu, Gln, Ser, Thr y Asn;
 Xaa26 se selecciona independientemente de Pro, Arg e Ile;
 Xaa31 se selecciona independientemente de Ser, Glu, Asp y Asn;
 Xaa35 se selecciona independientemente de His, Arg, Lys, Asp, Gln y Glu;
 en donde la numeración de la secuencia de aminoácidos corresponde a la secuencia de numeración de
 aminoácidos de la SEQ ID No: 2;
 en donde el C-terminal del polipéptido es una amida;
 en donde el C-terminal puede, opcionalmente, derivarse; y
 en donde el polipéptido es un agonista del receptor de amilina.
2. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende un residuo en la posición 17 que es histidina
 o arginina, preferentemente arginina.
3. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2 que comprende un residuo en la posición
 35 que se selecciona independientemente de cualquiera de histidina, asparagina, glutamina y ácido
 glutámico; preferentemente histidina, glutamina y asparagina.
4. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que comprende un residuo de
 aminoácido en la posición 14 que es ácido glutámico y un residuo en la posición 17 que es arginina.
5. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde al menos un sustituyente se
 une a al menos un residuo de aminoácido de dicho polipéptido.
6. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el grupo sustituyente se selecciona de cualquiera
 de los grupos sustituyentes presentados en la tabla a continuación:

Abreviatura	Sustituyente
C20diácido	
C20diácido-γGlu	
C20diácido-γGlu-γGlu	
C20diácido-γGlu-γGlu-γGlu	
C20diácido-OEG	
C20diácido-γGlu-OEG	



7. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde un sustituyente se une al grupo α -amino del residuo de aminoácido N-terminal o a un residuo de Lys.
8. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, seleccionado del grupo que consiste en cualquiera de los polipéptidos a continuación:
- N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[His1, Glu14, Arg17, Pro37]-pramlintida;
 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[His1, Glu14, Arg17, Pro37]-pramlintida;
 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Gly1, Glu14, Arg17, Pro37]-pramlintida;
 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Arg1, Glu14, His17, Pro37]-pramlintida;
 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Gly-[Arg1, Glu14, His17, Pro37]-pramlintida;
 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14, Arg17, Pro37]-pramlintida;
 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14, His17, Gln21, Pro37]-pramlintida;
 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14, His17, Pro37]-pramlintida;
 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Lys11, Glu14, His17, Pro37]-pramlintida;
 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1, Glu14, Arg17, Pro37]-pramlintida;
 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14, Arg18, Ser21, Ser22, Ser28, Ser29, Asp31, Asp35, Pro37]-pramlintida;
 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14, His17, Gln21, Gln35, Pro37]-pramlintida;
 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14, His17, Thr21, Pro37]-pramlintida;
 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14, His17, Gln35, Pro37]-pramlintida;
 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1, Glu14, Arg17, Gln21, Pro37]-pramlintida;
 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1, Glu14, Arg17, Gln21, Gln35, Pro37]-pramlintida;
 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1, Glu14, Arg17, Gln21, Gln31, Gln35, Pro37]-pramlintida;
 N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-Glu-Arg-[Glu1, Glu14, Arg17, Gln21, Gln22, Gln31, Gln35, Pro37]-pramlintida.
9. Un derivado del polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicho derivado comprende un enlazador γ Glu unido al N-terminal de dicho polipéptido y HOOC (CH₂)₁₈CO o HOOC(CH₂)₁₆CO- como el residuo de unión a albúmina, y en donde la secuencia del polipéptido comprende:
- a. una Glu en la posición 14,
 si. una His o una Arg en la posición 17 y
 C. una Pro en la posición 37.
10. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el polipéptido es: N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14, Arg17, Pro37]-pramlintida.
11. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el polipéptido es: N-alfa-[(S)-4-Carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butiril]-[Glu14, His17, Pro37]- pramlintida.
12. Un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para usar como un medicamento.
13. Un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para su uso en el tratamiento o prevención de la hiperglucemia, diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, enfermedad

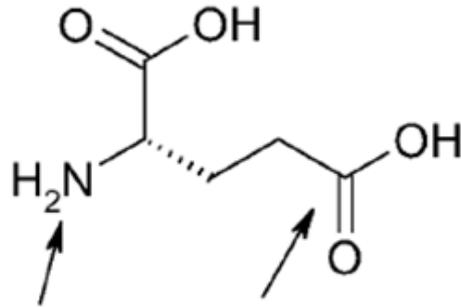
coronaria y otros trastornos cardiovasculares, accidente cerebrovascular, síndrome del intestino irritable, dispepsia y úlceras gástricas, hipercalcemia, osteoporosis y osteitis deformante.

- 5
14. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, y un excipiente aceptable farmacéuticamente.
 15. Un proceso para preparar una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14 que comprende mezclar un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11 con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Figura 1



Figura 2



el grupo α -nitrógeno y el grupo γ -carboxi forman los enlaces amida a los dos residuos vecinos

Figura 3

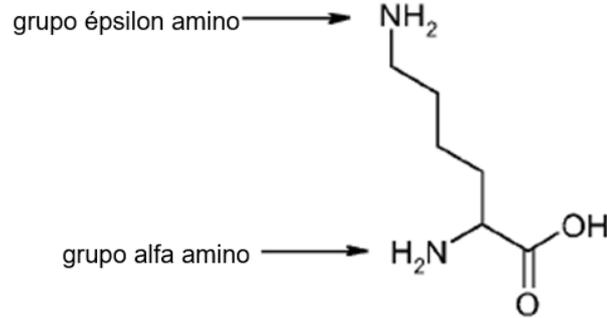


Figura 4

