

COMPUESTOS DE MIC-1 Y USOS DE ESTOS

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a compuestos de MIC-1 y al uso farmacéutico de estos.

5

INCORPORACIÓN COMO REFERENCIA DEL LISTADO DE SECUENCIAS

El listado de secuencias, titulado "LISTADO DE SECUENCIAS", es de 205.032 bytes, se creó el 23 de mayo de 2018 y se incorpora en la presente descripción como referencia.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La Citocina Inhibidora de Macrófagos-1 (MIC-1) se describió por primera vez en 1997 (Bootcov y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. Oct 1997) basado en experimentos que demostraban un aumento de expresión en macrófagos activados. MIC-1 se ha identificado posteriormente por otros y ha recibido varios nombres adicionales tales como factor de crecimiento transformante obtenido de placenta (PTGF-β), proteína morfogenética de hueso obtenida de placenta, factor de diferenciación del crecimiento 15 (GDF15), factor derivado de la próstata (PDF), gen activado con fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NAG-1) y PL74. MIC-1 es un miembro distante de la súper familia de TGF-beta, una familia de hormonas peptídicas implicadas en el crecimiento y la diferenciación celular. MIC-1 circula como un homodímero rico en cisteína con una masa molecular de 24.5 kDa. La MIC-1 humana de tipo silvestre tiene una semivida corta, lo que significa que el tratamiento con MIC-1ts requiere la administración diaria para mantener su eficacia.

15

20

La evidencia acumulada respalda la utilidad terapéutica de MIC-1 en trastornos metabólicos tales como obesidad y diabetes. Los datos de pacientes con cáncer avanzado demostraron que la pérdida de peso se correlaciona con los niveles circulantes de MIC-1 (Johnen y otros, Nat Med., Nov, 2007). Los ratones transgénicos que sobreexpresan MIC-1 ganan menos peso y grasa corporal tanto con una dieta normal baja en grasas como con una dieta alta en grasas (Macia y otros, PLoS One, Abril, 2012). Además, los ratones transgénicos que sobreexpresan MIC-1 alimentados con una dieta baja y alta en grasas, respectivamente, han mejorado la tolerancia a la glucosa en comparación con los animales de tipo silvestre con una dieta comparable.

25

30

El documento WO 2005099746 se refiere a un método para modular el apetito y/o el peso corporal mediante la administración de un agente modulador de MIC-1.

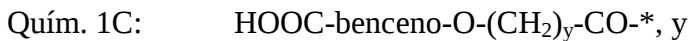
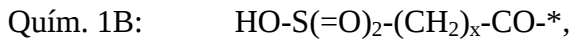
35 BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a compuestos de MIC-1 que comprenden un polipéptido MIC-1 con una extensión de aminoácidos en el N-terminal y un prolongador unido a la extensión de aminoácidos. En un aspecto, los compuestos de MIC-1 de la invención comprenden un polipéptido MIC-1 con una extensión de aminoácidos en el N-terminal y un prolongador unido a la extensión de aminoácidos, en donde la extensión de aminoácidos

40

comprende de 3 a 200 residuos de aminoácidos y el polipéptido MIC-1 con la extensión de aminoácidos tiene un pI calculado menor que 6.5.

En algunas modalidades, los compuestos de MIC-1 de la invención tienen una extensión de aminoácidos en el N-terminal con un residuo de cisteína, en donde el prolongador se une al residuo de cisteína. En estas modalidades el prolongador comprende, o consiste en al menos uno de cada uno de Quím. 1, Quím. 2, Quím. 3 y Quím. 4; en donde Quím. 1 se selecciona del grupo que consiste en:



en donde x es un número entero en el intervalo de 12-20,

en donde y es un número entero en el intervalo de 5-15;

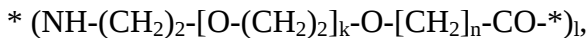
en donde Quím. 2 se selecciona del grupo que consiste en:



en donde m de Quím. 2 es un número entero en el intervalo de 1-5, y

k de Quím. 2 es un número entero en el intervalo de 0-4,

en donde Quím. 3 es

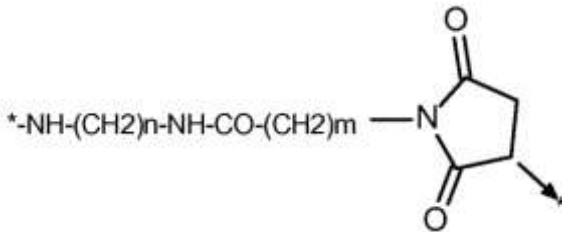
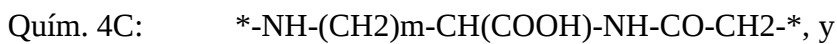
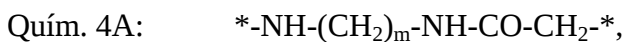


en donde k de Quím. 3 es un número entero en el intervalo de 1-10,

n es un número entero en el intervalo de 1-5, y

l es un número entero en el intervalo de 0-5;

en donde Quím. 4 se selecciona de



Quím. 4D:

en donde m de Quím. 4 es un número entero en el intervalo de 1-5 y n es un número entero en el intervalo de 2-6; y

en donde Quím. 1, Quím. 2, Quím. 3 y Quím. 4 se interconectan a través de enlaces amida, que conectan el extremo $^*-\text{NH}$ de un Quím. al extremo $\text{CO}-^*$ de otro Quím., y en donde

Quím. 4 se conecta al átomo de azufre del residuo de cisteína de la extensión de aminoácidos.

Un asterisco (*) en una fórmula química indica un punto de unión.

En algunas modalidades, los compuestos de MIC-1 de la invención comprenden una
5 extensión en el N-terminal que tiene un exceso de residuos de aminoácidos ácidos (Ácido aspártico y/o Ácido glutámico) de al menos 3, 4, 5 o 6 en comparación con el número de residuos de aminoácidos básicos (Lisina, Arginina y/o Histidina).

En algunas modalidades de la invención los compuestos de MIC-1 comprenden extensiones
10 en el N-terminal compuestas por residuos de aminoácidos seleccionados entre el grupo que consiste en A, C, E, G, P, S, T, Q, N y D, en donde la extensión de aminoácidos comprende al menos tres residuos de aminoácidos E y/o D.

En algunas modalidades los compuestos de MIC-1 de la invención comprenden un polipéptido MIC-1 que muestra al menos 85 %, 90 %, 95 % o 98 % de identidad de secuencia con respecto a MIC-1 de SEQ ID NO:1.

15 En algunas modalidades los compuestos de MIC-1 de la invención comprenden un polipéptido MIC-1 que comprende una delección de los primeros tres residuos (MIC-1-Δ1-3) o una delección de asparagina 3 (des-N3) en comparación con MIC-1 de SEQ ID NO:1.

En una modalidad particular de la invención el compuesto de MIC-1 comprende un polipéptido MIC-1 y una extensión de aminoácidos en el N-terminal con una secuencia de
20 aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 87, 90, 92, 93, 94, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 108, 109, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 164, 288, 289, 290, 291 o 292.

En un aspecto, los compuestos de MIC-1 de la invención han mantenido la potencia del receptor de MIC-1 y la eficacia in vivo en la disminución de la ingesta de alimentos y del peso corporal. Estos compuestos de MIC-1 pueden usarse por lo tanto para el tratamiento
25 de trastornos metabólicos tales como obesidad, diabetes, enfermedades cardiovasculares como dislipidemia y arteriosclerosis y otros trastornos tales como esteatohepatitis y nefropatía diabética.

En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de MIC-1 de la invención o una sal, amida o éster farmacéuticamente aceptable
30 de este, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto, la invención proporciona un compuesto de MIC-1 para el uso en la prevención y/o el tratamiento de un trastorno metabólico, en donde el trastorno metabólico es obesidad, diabetes tipo 2, dislipidemia o nefropatía diabética.

En un aspecto, la invención proporciona un compuesto de MIC-1 de la invención para el
35 uso en la prevención y/o el tratamiento de dislipidemia, arteriosclerosis, esteatohepatitis no alcohólica o nefropatía diabética.

En un aspecto, los compuestos de MIC-1 de la invención tienen una exposición al plasma prolongada, es decir una semivida prolongada en comparación con la MIC-1 humana de tipo silvestre.

En un aspecto los compuestos de MIC-1 de la invención tienen una solubilidad mejorada. En un aspecto, los compuestos de MIC-1 de la invención tienen una estabilidad química mejorada.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: La expresión de polipéptidos MIC-1 con extensiones en N con bloques de construcción de 12-meros individuales. Todas las células se cultivaron en TB a 37 °C y se indujo la expresión de proteínas mediante la adición de IPTG 0.5 mM después que se alcanzó una DO600 de 1.0. Las células se cosecharon después de toda la noche y el nivel de expresión se comprobó mediante la aplicación del lisado total en SDS-PAGE. La MIC-1 humana de tipo silvestre (MIC-1) se aplicó como el control positivo.

Figura 2: La expresión de polipéptidos MIC-1 con extensiones en N con bloques de construcción de 12-meros dobles. Todas las células se cultivaron en TB a 37 °C y se indujo la expresión de proteínas mediante la adición de IPTG 0.5 mM después que se alcanzó una DO600 de 1.0. Las células se cosecharon después de toda la noche y el nivel de expresión se comprobó mediante la aplicación del lisado total en SDS-PAGE. MIC-1 se aplicó como el control positivo.

Figura 3: a) Comparación de los niveles de expresión entre polipéptidos MIC-1 con extensiones en N que inician con 12-mero- (4+2+_), - (4+4+_) y - (4+3+_). Cabe señalar que el grupo que porta 12-mero-(4+3_) y el constructo indicado por el punto contienen M57L en la secuencia del polipéptido MIC-1. b) los efectos de los 12-meros extendidos sobre el nivel de expresión. Además, el punto de datos más bajo en el grupo de 3.6 es el polipéptido MIC-1 que contiene M57L. En esta figura, “1.6 último” representa TSTEEG, “2.6” representa TSESAT, “3.6” representa TSTEPS y “4.6” representa SEPATS.

Figura 4: SDS-PAGE de representantes que portan 12mer-(4+2+_), 12mer-(4+3+_)+M57L, 12mer-(tres repeticiones) y 12mer-(cuatro repeticiones). T: proteína total, S: fracción soluble, P: sedimento celular (cuerpo de inclusión).

Figura 5: Polipéptidos MIC-1 con mutaciones en secuencia. En esta figura, la secuencia del polipéptido MIC-1 es MIC-1 Δ1-3. T: proteína total, S: fracción soluble, P: sedimento celular (cuerpo de inclusión).

Figura 6: Cambio del peso corporal en el tiempo durante el estudio farmacodinámico (PD) en cerdos. 01: Compuesto 01; 05: Compuesto 05

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La invención se refiere a compuestos de MIC-1 que comprenden un polipéptido MIC-1 con una extensión de aminoácidos en el N-terminal y un prolongador unido a la extensión de aminoácidos.

En un aspecto, los compuestos de MIC-1 de la invención comprenden un polipéptido MIC-1 una extensión de aminoácidos en el N-terminal y un prolongador unido a la extensión de aminoácidos, en donde la extensión de aminoácidos comprende de 3 a 200 residuos de

aminoácidos y el polipéptido MIC-1 y la extensión de aminoácidos juntos tienen un pI calculado menor que 6.5.

Los compuestos de MIC-1 de la invención son biológicamente activos. Por ejemplo, son potentes, mantienen una eficacia completa en comparación con MIC-1 y, además, tienen un perfil de exposición al plasma prolongado, es decir, tienen una semivida prolongada. La combinación particular de potencia y semivida larga es conveniente.

MIC-1

El término “MIC-1” como se usa en la presente descripción significa Citocina Inhibidora de Macrófagos-1 (MIC-1), también conocida como Factor de Diferenciación de Crecimiento 15 (GDF-15), proteína morfogenética de hueso obtenida de placenta (PLAB) y gen activado con fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NAG-1). MIC-1 se sintetiza como una proteína precursora de homodímero intracelular de 62 kDa que posteriormente se escinde mediante una proteasa de tipo furina en un homodímero de 24.5 kDa. La secuencia del MIC-1 humano de tipo silvestre en toda su longitud está disponible en la base de datos UNIPROT con número de acceso. Q99988. La secuencia precursora de 308 aminoácidos incluye un péptido señal (aminoácidos 1-29), un propéptido (aminoácidos 30-196) y una secuencia monomérica de MIC-1 (aminoácidos 197-308). La secuencia monomérica de MIC-1 de 112 aminoácidos se incluye en la presente descripción como SEQ ID NO:1. El monómero de MIC-1 contiene nueve residuos de cisteína que dan lugar a la formación de 4 enlaces disulfuro intracatenarios y un enlace disulfuro intracatenario para crear un homodímero de 24.5 kDa unido covalentemente. Se ha descrito una mutación de origen natural que corresponde a H6D en la secuencia monomérica de MIC-1 (SEQ ID NO:1).

El término “compuesto de MIC-1”, como se usa en la presente descripción, se refiere a un compuesto que comprende un polipéptido MIC-1, una extensión de aminoácidos en el N-terminal y un prolongador. El compuesto de MIC-1 se encuentra típicamente en la forma de un homodímero.

El término “polipéptido MIC-1” como se usa en la presente descripción se refiere a la secuencia monomérica de MIC-1 humana de la SEQ ID NO:1 o un análogo de esta. Las referencias numéricas con respecto a residuos particulares de MIC-1, si no se indica de cualquier otra manera, se refieren a la secuencia monomérica de 112 aminoácidos (es decir, el residuo 1 es Alanina (A1) y el residuo 112 es Isoleucina (I112)).

El término “análogo de MIC-1”, o “análogo de MIC-1” como se usa en la presente descripción se refiere a un polipéptido MIC-1, el cual es una variante aminoacídica de la secuencia monomérica de MIC-1 de SEQ ID NO:1. En otras palabras, un análogo de MIC-1 es un polipéptido MIC-1 en el cual se han cambiado un número de residuos de aminoácidos cuando se compara con MIC-1 humana (SEQ ID NO: 1). Estos cambios pueden representar, independientemente, una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos.

Los análogos de MIC-1 pueden describirse como referencia al residuo de aminoácido que se cambia, al número del residuo de aminoácido (es decir la posición correspondiente en la

secuencia monomérica de MIC-1 (SEQ ID NO:1)), y al cambio (por ejemplo el residuo de aminoácido al que cambia).

En un aspecto, el análogo de MIC-1 es una variante funcional de la MIC-1 de SEQ ID NO:1. En un aspecto de la invención, los análogos de MIC-1 muestran al menos 85 %, 90 % o 95 % de identidad de secuencia con respecto a MIC-1 de SEQ ID NO:1. Como un ejemplo de un método para la determinación de la identidad de secuencia entre dos análogos se alinean los dos péptidos H6D MIC-1 y MIC-1 de SEQ ID NO:1. La identidad de secuencia del análogo de MIC-1 H6D en relación con MIC-1 de SEQ ID NO:1 viene dada por el número de residuos idénticos alineados dividido por el número total de residuos alineados en MIC-1 de SEQ ID NO:1. En consecuencia, en el ejemplo la identidad de secuencia en porcentaje es $(112-1)/112 \times 100$. En la determinación de la identidad de secuencia de un análogo de MIC-1, no se incluye la extensión de aminoácidos en el N-terminal. Un programa de alineamiento adecuado puede analizarse con un programa de alineamiento "Needle" adecuado, que es un alineamiento de Needleman-Wunsch. El algoritmo para este programa de alineamiento se describe en Needleman, S.B. y Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48: 443-453.

En otro aspecto de la invención, los análogos de MIC-1 comprenden menos de 15, 10 o 5, modificaciones de aminoácidos (sustituciones, deleciones, adiciones (incluidas inserciones) y cualquier combinación de estas) en relación con MIC-1 humana de SEQ ID NO:1. El término "modificación de aminoácidos" usado en toda esta solicitud se usa con el significado de una modificación a un aminoácido en comparación con la MIC-1 monomérica (SEQ ID NO:1). Esta modificación puede ser el resultado de una deleción de un aminoácido, adición de un aminoácido, sustitución de un aminoácido con otro o un sustituyente unido covalentemente a un aminoácido del péptido.

Sustituciones: En un aspecto los aminoácidos pueden sustituirse mediante sustitución conservativa. El término "sustitución conservativa" como se usa en la presente descripción denota que uno o más aminoácidos se reemplazan por otro residuo biológicamente similar. Los ejemplos incluyen sustitución de residuos de aminoácidos con características similares, por ejemplo aminoácidos pequeños, aminoácidos ácidos, aminoácidos polares, aminoácidos básicos, aminoácidos hidrófobos y aminoácidos aromáticos.

En un aspecto los aminoácidos pueden sustituirse mediante una sustitución no conservativa. El término "sustitución no conservativa" como se usa en la presente descripción denota que uno o más aminoácidos se reemplazan por otro aminoácido que tiene características diferentes. Los ejemplos incluyen sustitución de un residuo de aminoácido básico con un residuo de aminoácido ácido, sustitución de un residuo de aminoácido polar con un residuo de aminoácido aromático, etc. En un aspecto, la sustitución no conservativa es la sustitución de un aminoácido codificado por otro aminoácido codificado que tiene características diferentes. En un aspecto, los análogos de MIC-1 pueden comprender sustituciones de uno o más aminoácidos no naturales y/o no aminoácidos, por ejemplo, miméticos de aminoácidos, en la secuencia de MIC-1.

En un aspecto de la invención, la asparagina en la posición correspondiente a la posición 3 de la secuencia monomérica de MIC-1 (SEQ ID NO:1) se sustituye con serina (N3S), ácido glutámico (N3E), alanina (N3A) o glutamina (N3Q). En un aspecto de la invención, la asparagina en la posición correspondiente a la posición 3 de la secuencia monomérica de MIC-1 humana (SEQ ID NO:1) se sustituye con ácido glutámico (N3E).

En un aspecto de la invención, la arginina en la posición correspondiente a la posición 2 de la secuencia monomérica de MIC-1 humana (SEQ ID NO:1) se ha sustituido con alanina (R2A), y la asparagina en la posición correspondiente a la posición 3 de la secuencia monomérica de MIC-1 humana (SEQ ID NO:1) se ha sustituido con ácido glutámico (N3E).

En un aspecto de la invención, la arginina en la posición correspondiente a la posición 2 de la secuencia monomérica de MIC-1 humana (SEQ ID NO:1) se ha sustituido con ácido glutámico (R2E), y la asparagina en la posición correspondiente a la posición 3 de la secuencia monomérica de MIC-1 humana (SEQ ID NO:1) se ha sustituido con serina (N3S).

Deleciones y Truncamientos: En un aspecto, los análogos de MIC-1 de la invención pueden tener uno o más residuos de aminoácidos delecionados de la secuencia de aminoácidos de MIC-1 (SEQ ID NO:1), solos o junto con una o más inserciones o sustituciones.

Los análogos de MIC-1 con deleciones de aminoácidos pueden describirse por “des”, en referencia al residuo de aminoácido que se delecciona, y seguido por el número del aminoácido deleccionado (es decir la posición correspondiente en la MIC-1 monomérica (SEQ ID NO:1)). En algunas modalidades de la invención, la asparagina en la posición correspondiente a la posición 3 de MIC-1 monomérica humana (SEQ ID NO:1) se delecciona (MIC-1 des-N3, SEQ ID NO:2). En algunas modalidades de la invención, la alanina en la posición correspondiente a la posición 1 de MIC-1 monomérica humana (SEQ ID NO:1) se delecciona (MIC-1, des-A1).

Los análogos de MIC-1 con un truncamiento de uno o más residuos de aminoácidos en el N o C terminal pueden describirse por “MIC-1-Δ” y en referencia al(a los) número(s) de los residuos de aminoácidos delecionados (es decir la posición correspondiente en la MIC-1 monomérica (SEQ ID NO:1)). En algunas modalidades de la invención, los primeros tres residuos (A1, R2, N3) en el N terminal se deleccionan (MIC-1-Δ1-3, SEQ ID NO:3).

Inserciones: En un aspecto, los análogos de MIC-1 de la invención tienen uno o más residuos de aminoácidos insertados en la secuencia de aminoácidos de MIC-1 humana, solos o junto con una o más deleciones y/o sustituciones.

En un aspecto, los análogos de MIC-1 de la invención incluyen inserciones de uno o más aminoácidos no naturales y/o no aminoácidos en la secuencia de MIC-1.

El término “proteína” o “polipéptido”, como se usa, por ejemplo, en la presente invención, se refiere a un compuesto que comprende una serie de aminoácidos interconectados mediante enlaces amida (o peptídicos).

Los aminoácidos son moléculas que contienen un grupo amina y un grupo ácido carboxílico y, opcionalmente, uno o más grupos adicionales, frecuentemente referidos como una cadena lateral.

El término "aminoácido" incluye aminoácidos codificados (o proteinogénicos o naturales) (entre ellos los 20 aminoácidos estándar), así como también aminoácidos no codificados (o no proteinogénicos o no naturales). Los aminoácidos codificados son los que se incorporan naturalmente en las proteínas. Los aminoácidos estándar son los codificados por el código genético. Los aminoácidos no codificados no se encuentran en las proteínas, o no se producen por la maquinaria celular estándar (por ejemplo, pueden haberse sometido a modificaciones postraduccionales). En lo que sigue, debe entenderse que todos los aminoácidos de las proteínas MIC-1 para los cuales no se indica el isómero óptico significan el isómero L (a menos que se especifique de cualquier otra manera).

Como es evidente a partir de lo anterior, los residuos de aminoácidos pueden identificarse mediante su nombre completo, su código de una letra y/o su código de tres letras. Estas tres maneras son totalmente equivalentes. Para conveniencia del lector, los códigos de aminoácidos de una y tres letras se proporcionan a continuación:

Glicina: G y Gly; Prolina: P y Pro; Alanina: A y Ala; Valina: V y Val; Leucina: L y Leu; Isoleucina: I e Ile; Metionina: M y Met; Cisteína: C y Cys; Fenilalanina: F y Phe; Tirosina: Y y Tyr; Triptófano: W y Trp; Histidina: H e His; Lisina: K y Lys; Arginina: R y Arg; Glutamina: Q y Gin; Asparagina: N y Asn; Ácido Glutámico: E y Glu; Ácido Aspártico: D y Asp; Serina: S y Ser; y Treonina: T y Thr.

Extensión de aminoácidos en el N-terminal

Los compuestos de MIC-1 de la invención comprenden una extensión de aminoácidos en el N-terminal.

El término "extensión de aminoácidos en el N-terminal" como se usa en la presente descripción, significa que el N-terminal del polipéptido MIC-1 se une al C-terminal de la extensión de aminoácidos en el N-terminal a través de un enlace peptídico. Los términos "extensión de aminoácidos en el N-terminal", "extensión en el N-terminal", y "extensión en N" en la presente descripción significan lo mismo y se usan indistintamente. En una modalidad, el compuesto de la invención comprende la secuencia monomérica de MIC-1 humana (SEQ ID NO:1) con una extensión de aminoácidos unida al N-terminal, es decir la Alanina en la posición 1 (A1) a través de un enlace peptídico.

En algunas modalidades de la invención, la extensión de aminoácidos en el N-terminal es de hasta 200 residuos de aminoácidos de longitud. En una modalidad particular de la invención la extensión de aminoácidos en el N-terminal tiene de 3 a 36 residuos de aminoácidos.

En un aspecto de la invención, la extensión de aminoácidos en el N-terminal tiene un exceso de residuos de aminoácidos ácidos (Ácido aspártico y/o Ácido glutámico) de al menos 3, 4, 5 o 6 en comparación con el número de residuos de aminoácidos básicos (Lisina, Arginina y/o Histidina). Un "exceso" de residuos de aminoácidos ácidos significa

que el número de residuos ácidos excede el número de residuos básicos. Un valor definido del exceso de residuos de aminoácidos ácidos se calcula como el número de residuos ácidos menos el número de residuos básicos.

La metionina es el aminoácido inicial para la expresión de proteínas en células procariotas (por ejemplo bacterias, por ejemplo, E.coli). En algunas modalidades de la invención, la Metionina inicial se elimina de la proteína durante la expresión de proteínas. Por lo tanto, la Metionina inicial no se incluye en la secuencia de la extensión en N del compuesto de MIC-1. Sin embargo, una persona experta en la técnica conoce que se requiere el codón de inicio, que codifica la Metionina inicial, para el inicio de la traducción de proteínas y debería incorporarse justo delante de la secuencia de nucleótidos para la expresión de proteínas sin excepción.

Mientras tanto, puede entenderse que aquellos compuestos de MIC-1 con extensiones en N que tienen la Metionina inicial también caen dentro del alcance de la invención.

Prolongador

Los compuestos de MIC-1 de la invención comprenden un prolongador. El prolongador se une covalentemente a un residuo de aminoácido específico del polipéptido MIC-1 o de la extensión de aminoácidos en el N-terminal.

El término “prolongador” se refiere a las propiedades de conferir una exposición al plasma extendida (“porción que extiende la semivida”) y se entiende que en la presente descripción se refiere a un grupo químico unido a funcionalidades de cadena de sitio de aminoácido tales como -SH, -OH, -COOH, -CONH₂, -NH₂ que puede aumentar la semivida circulatoria in vivo de MIC-1 cuando se conjuga a la MIC-1. Los ejemplos de prolongadores incluyen pero no se limitan a: ácidos grasos y derivados de estos, hidroxialquil almidón (HAS), por ejemplo, hidroxietil almidón (HES), polietilenglicol (PEG), poli(Glyx-Sery)_n (HAP), ácido hialurónico (HA), polímeros de heparosano (HEP), polímeros a base de fosforilcolina (polímero de PC), fleximers, dextrana, ácidos polisiálicos (PSA), un dominio Fc, transferrina, albúmina, péptidos similares a elastina, secuencias amino no estructuradas y repetidas (por ejemplo, polímeros XTEN), péptidos de unión a albúmina, un péptido CTP y cualquier combinación de estos.

En algunas modalidades de la invención, el prolongador es capaz de formar asociaciones no covalentes con la albúmina, lo que aumenta de esta manera el tiempo de exposición a sangre/plasma del compuesto de MIC-1, y además tiene el efecto de prolongar el tiempo de acción del compuesto de MIC-1, debido al hecho de que la asociación del compuesto de MIC-1 y la albúmina se desintegra solo lentamente para liberar el ingrediente farmacéutico activo.

En algunas modalidades, los prolongadores que comprenden ácidos grasos de la invención son capaces de formar asociaciones no covalentes con la albúmina y de esta manera prolongar la semivida en plasma del compuesto de MIC-1 en comparación con la MIC-1 humana de tipo silvestre.

En algunas modalidades de la invención, el prolongador se une covalentemente a un residuo de cisteína de la extensión de aminoácidos en el N-terminal del polipéptido MIC-1. En una modalidad, el prolongador comprende un grupo haloacetamida, que reacciona con el grupo tiol de un residuo de cisteína, bajo la formación de un enlace covalente de azufre-carbono (este proceso se refiere como Cys-alquilación) que también se refiere como un enlace tioéter. En otra modalidad, el prolongador comprende un grupo maleimida, que reacciona con el grupo tiol de un residuo de cisteína, bajo la formación de un enlace covalente de azufre-carbono.

En algunas modalidades de la invención, el prolongador se une covalentemente al aminoácido N-terminal de la extensión de aminoácidos en el N-terminal.

Prolongador que comprende ácido graso

En un aspecto de la invención, el prolongador comprende, o consiste en, al menos uno de cada uno de Quím. 1, Quím. 2, Quím. 3 y Quím. 4:

en donde Quím. 1 se selecciona del grupo que consiste en:

- 15 Quím. 1A: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-^*$,
 Quím. 1B: $\text{HO-S(=O)}_2-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-^*$,
 Quím. 1C: $\text{HOOC-benceno-O}-(\text{CH}_2)_y-\text{CO}-^*$, y
 Quím. 1D: $(1\text{H-tetrazol-5-il})-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-^*$,

en donde x es un número entero en el intervalo de 12-20,

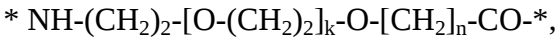
20 en donde y es un número entero en el intervalo de 5-15;

en donde Quím. 2 se selecciona del grupo que consiste en:

- Quím. 2A: $^*-\text{NH-CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}-^*$,
 Quím. 2B: $^*-\text{NH-S(=O)}_2-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}-^*$, y
 Quím. 2C: $^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{ciclohexano}-\text{CO}-^*$,

25 en donde m de Quím. 2 es un número entero en el intervalo de 1-5.

en donde Quím. 3 es



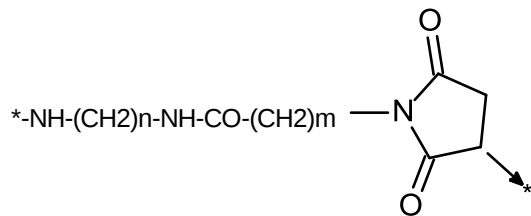
en donde k de Quím. 3 es un número entero en el intervalo de 1-10,

n es un número entero en el intervalo de 1-5; y

30 en donde Quím. 4 se selecciona de

- Quím. 4A: $^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-^*$,
 Quím. 4B: $^*-\text{NH-CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-^*$,
 Quím. 4C: $^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}(\text{COOH})-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-^*$, y

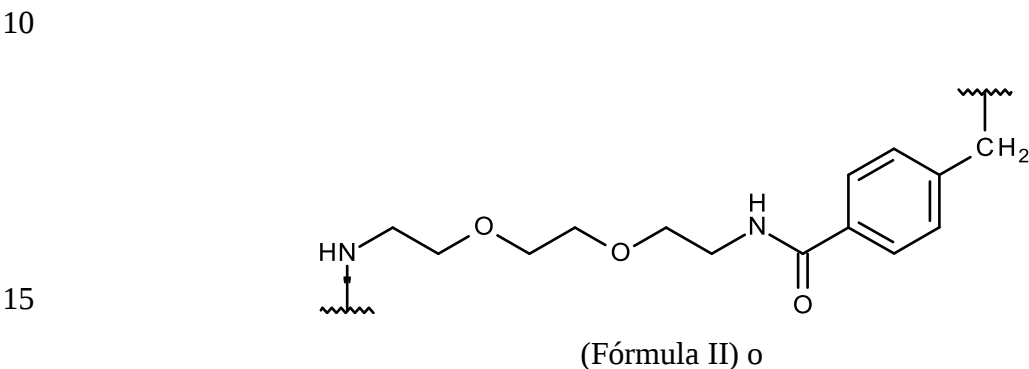
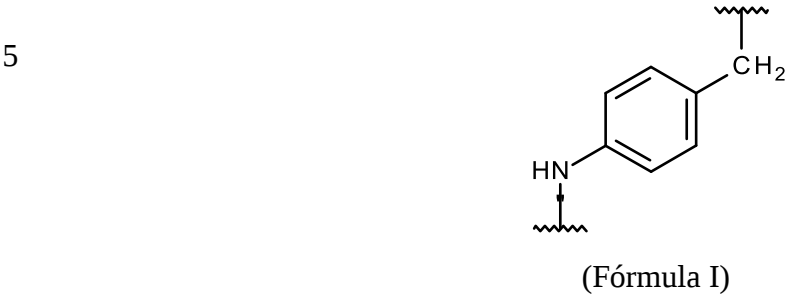
35



Quím. 4D:

40

en donde m de Quím. 4 es un número entero en el intervalo de 1-5 y n es un número entero en el intervalo de 2-6 o en donde Quím. 4 se selecciona del grupo que consiste en Fórmula I, II o III:



en donde Quím. 1, Quím. 2, Quím. 3 y Quím. 4 se interconectan a través de enlaces amida, que conectan el extremo *-NH de un Quím. al extremo CO-* de otro Quím.

25 En algunas modalidades, el prolongador de la invención comprende un Quím. 1, un Quím. 4, y uno o más de Quím. 2 y Quím. 3. Como un ejemplo no limitante, el prolongador consiste en un elemento Quím. 1, dos elementos Quím. 2, dos elementos Quím. 3 y un elemento Quím. 4.

Los elementos Quím. 2 y Quím. 3 tienen ambos un extremo -NH- y CO- que les permite
30 unirse por enlaces amida entre sí y a -CO- o -NH- de Quím. 1 o Quím. 4. Quím. 4 tiene un extremo -NH- (capaz de formar un enlace amida con Quím. 2 o Quím. 3). Quím. 4 tiene, además, un extremo -NH-CO-CH₂-, que en la forma sin reaccionar es una haloacetamida capaz de reaccionar con el grupo tiol de un residuo de cisteína, o un extremo (-N*-CO-CH₂-CH**-CO), el paréntesis representa una estructura cíclica, que en la forma sin
35 reaccionar es una maleimida capaz de reaccionar con el grupo tiol de la cisteína; o un aldehído capaz de reaccionar con el grupo amino N-terminal en una reacción de alquilación reductora.

La longitud de la cadena de carbonos de Quím.1 definida por x o y puede variar de 12-20 para x y 5-15 para y. Pueden favorecerse versiones más cortas o largas para diferentes tipos
40 de prolongadores. En una modalidad particular de Quím. 1A, *(CH₂)_x-* se refiere a un

alquileo lineal en el que x es un número entero en el intervalo de 12-20, tal como 14-18 o tal como 16.

Este Quím. 1 puede referirse brevemente como diácido C18, es decir un ácido graso dicarboxílico con 18 átomos de carbono. Cuando x=16 la estructura de este elemento
5 enlazador corresponde a Quím. 1a: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{16}-\text{CO}-^*$.

En modalidades adicionales Quím. 1 se selecciona del grupo que consiste en:

Quím. 1a: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{16}-\text{CO}-^*$,

Quím. 1b: $\text{HO-S(=O)}_2-(\text{CH}_2)_{15}-\text{CO}-^*$

Quím. 1c: $\text{HOOC-benceno-O}-(\text{CH}_2)_9-\text{CO}-^*$, y

10 Quím. 1d: $(1\text{H-tetrazol-5-il})-(\text{CH}_2)_{15}-\text{CO}-^*$,

En modalidades adicionales Quím. 2 se selecciona del grupo que consiste en:

Quím. 2a: $^*-\text{NH-CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-^*$,

Quím. 2b: $^*-\text{NH-S(=O)}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{CO}-^*$ y

Quím. 2c: $^*-\text{NH-CH}_2\text{-ciclohexano-CO}-^*$.

15 En un aspecto de la invención, el prolongador se une a un residuo de cisteína; y el prolongador comprende, o consiste en, al menos uno de cada uno de Quím. 1, Quím. 2, Quím. 3 y Quím. 4;

en donde Quím. 1 se selecciona del grupo que consiste en:

Quím. 1A: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-^*$,

20 Quím. 1B: $\text{HO-S(=O)}_2-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-^*$,

Quím. 1C: $\text{HOOC-benceno-O}-(\text{CH}_2)_y-\text{CO}-^*$, y

Quím. 1D: $(1\text{H-tetrazol-5-il})-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-^*$,

en donde x es un número entero en el intervalo de 12-20,

en donde y es un número entero en el intervalo de 5-15;

25 en donde Quím. 2 se selecciona del grupo que consiste en:

Quím. 2A: $^*-(\text{NH-CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_m-\text{CO})_k^*$,

Quím. 2B: $^*-(\text{NH-S(=O)}_2-(\text{CH}_2)_m-\text{CO})_k^*$, y

Quím. 2C: $^*-(\text{NH}-(\text{CH}_2)_m\text{-ciclohexano-CO})_k^*$,

en donde m de Quím. 2 es un número entero en el intervalo de 1-5, y

30 k es un número entero en el intervalo de 0-4,

en donde Quím. 3 es

$^*(\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{-[O}-(\text{CH}_2)_2\text{]}_k\text{-O-[CH}_2\text{]}_n\text{-CO-}^*)_l$,

en donde k de Quím. 3 es un número entero en el intervalo de 1-10,

n es un número entero en el intervalo de 1-5, y

35 l es un número entero en el intervalo de 0-5;

en donde Quím. 4 se selecciona de

Quím. 4A: $^*-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m\text{-NH-CO-CH}_2\text{-}^*$, y

Quím. 4B: $^*-\text{NH-CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_m\text{-NH-CO-CH}_2\text{-}^*$,

en donde m de Quím. 4 es un número entero en el intervalo de 1-5; y

en donde Quím. 1, Quím. 2, Quím. 3 y Quím. 4 se interconectan a través de enlaces amida, que conectan el extremo *-NH de un Quím. al extremo CO-* de otro Quím., y en donde el extremo CH₂-* de Quím. 4 se conecta al átomo de azufre del residuo de cisteína de la extensión de aminoácidos.

5 En un aspecto de la invención, el prolongador se une a un aminoácido N-terminal, y comprende, o consiste en, al menos uno de cada uno de Quím. 1, Quím. 2, Quím. 3 y Quím. 4;

en donde Quím. 1 se selecciona del grupo que consiste en:

- 10 Quím. 1A: HOOC-(CH₂)_x-CO-*,
Quím. 1B: HO-S(=O)₂-(CH₂)_x-CO-*,
Quím. 1C: HOOC-benceno-O-(CH₂)_y-CO-*, y
Quím. 1D: (1H-tetrazol-5-il)-(CH₂)_x-CO-*

en donde x es un número entero en el intervalo de 12-20,

en donde y es un número entero en el intervalo de 5-15;

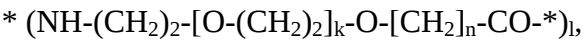
15 en donde Quím. 2 se selecciona del grupo que consiste en:

- Quím. 2A: *-(NH-CH(COOH)-(CH₂)_m-CO)_k*,
Quím. 2B: *-(NH-S(=O)₂-(CH₂)_m-CO)_k*, y
Quím. 2C: *-(NH-(CH₂)_m-ciclohexano-CO)_k*,

en donde m de Quím. 2 es un número entero en el intervalo de 1-5, y

20 k es un número entero en el intervalo de 0-4,

en donde Quím. 3 es

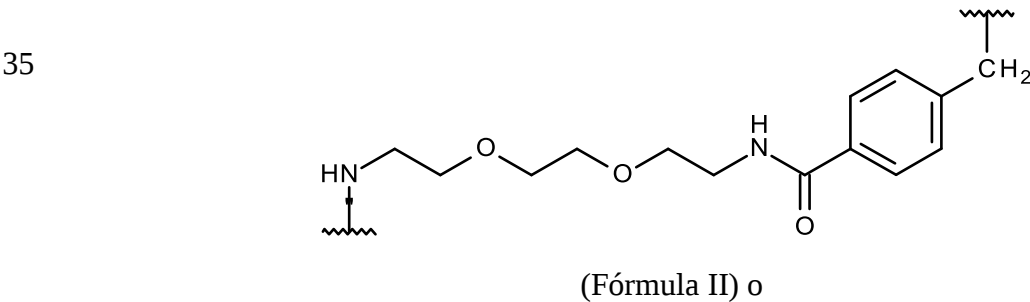
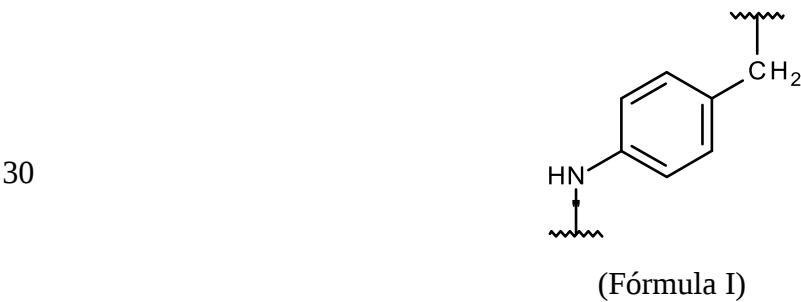


en donde k de Quím. 3 es un número entero en el intervalo de 1-10,

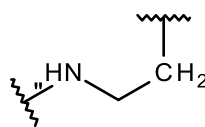
n es un número entero en el intervalo de 1-5, y

25 l es un número entero en el intervalo de 0-5;

en donde Quím. 4 se selecciona del grupo que consiste en Fórmula I, II o III:



40



(Fórmula III).

5

en donde Quím. 1, Quím. 2, Quím. 3 y Quím. 4 se interconectan a través de enlaces amida, que conectan el extremo *-NH de un Quím. al extremo CO-* de otro Quím., y en donde el extremo CH₂-* de Quím. 4 se conecta al grupo alfa-amino del N-terminal de la extensión de aminoácidos.

10 La nomenclatura es como es habitual en la técnica, por ejemplo, en las fórmulas anteriores *-CO-* se refiere a carbonilo (*-C(=O)-*). Benceno se refiere a la estructura de anillo que en Quím. 1C se sustituye en C1 y C3 o C4 por -O-(CH₂)_x-* y -COOH, respectivamente. HO-S(=O)₂-* describe un grupo ácido sulfónico.

15 Los compuestos/prolongadores de la invención pueden existir en formas estereoisoméricas diferentes que tienen la misma fórmula molecular y secuencia de átomos enlazados, pero que difieren solamente en la orientación tridimensional de sus átomos en el espacio. El estereoisomerismo de los compuestos/prolongadores ejemplificados de la invención se indica en la sección experimental, en los nombres así como en las estructuras, mediante el uso de la nomenclatura estándar. A menos que se indique de cualquier otra manera la invención se refiere a todas las formas estereoisoméricas de los compuestos/prolongadores reivindicados.

20

Punto isoelectrico (pI)

El pI calculado del polipéptido MIC-1 con una extensión de aminoácidos en el N-terminal se define como el pH en el cual la carga neta calculada del polipéptido MIC-1 con la extensión en N es cero. La carga calculada del polipéptido MIC-1 con la extensión en N como una función del pH se obtiene mediante el uso de los valores de pKa de los residuos de aminoácidos descritos en la Tabla 1 y el método descrito por B. Skoog y A. Wichman (Trends in Analytical Chemistry, 1986, vol. 5, páginas 82-83). El pKa de la cadena lateral de la cisteína (Cys) solo se incluye en el cálculo de la carga para cisteínas con un grupo sulfhidrilo libre. Como un ejemplo el valor de pI calculado de la MIC-1 humana de tipo silvestre como el homodímero es 8.8.

25

30

Como se describe en la presente descripción, los cálculos del pI en polipéptidos MIC-1 con extensiones en N se realizan en los homodímeros.

Tabla 1: pKa de los residuos de aminoácidos usados para calcular el pI. Los valores de pKa son los descritos en “Correlation of Electrophoretic Mobilities from Capillary Electrophoresis with Physicochemical Properties of Proteins and Peptides por Rickard EC, Strohl MM, Nielsen RG. Analytical Biochemistry 1991, vol 197, páginas 197-207”.

35

	N-terminal	C-Terminal	Cadena lateral
Asp	8.6	2.75	3.5
Asn	7.3	2.75	-
Thr	8.2	3.2	-
Ser	7.3	3.2	-
Glu	8.2	3.2	4.5
Gln	7.7	3.2	-
Pro	9	3.2	-
Gly	8.2	3.2	-
Ala	8.2	3.2	-
Val	8.2	3.2	-
Cys	7.3	2.75	10.3
Met	9.2	3.2	-
Ile	8.2	3.2	-
Leu	8.2	3.2	-
Tyr	7.7	3.2	10.3
Phe	7.7	3.2	-
Lys	7.7	3.2	10.3
His	8.2	3.2	6.2
Trp	8.2	3.2	-
Arg	8.2	3.2	12.5

Propiedades funcionales

En un aspecto, los compuestos de MIC-1 de la invención tienen buenas propiedades biofísicas.

- 5
- Los compuestos de MIC-1 de la invención son biológicamente activos. Por ejemplo son potentes, se unen y activan al complejo receptor de MIC-1. Además, los compuestos de MIC-1 exhiben una exposición al plasma prolongada definida como una semivida más larga. Por ejemplo, los compuestos de MIC-1 tienen una semivida en plasma notablemente más larga cuando se administran por vía i.v. a rata y/o minicerdos en comparación con MIC-1 (SEQ ID NO: 1). La combinación particular de la potencia del receptor mantenida y la semivida en plasma larga puede ser muy conveniente.
- 10

Actividad in vitro.

En un aspecto, los compuestos de la invención han mantenido la potencia del receptor de MIC-1 en relación con MIC-1 humana (SEQ ID NO:1). La potencia y la eficacia del receptor pueden medirse en células de mamífero transfectadas con receptor de MIC-1 humano (hGFRAL, tipo receptor alfa de la familia de GDNF) y su correceptor de señalización hRET (receptor tirosina-proteína cinasa protooncogénico Ret). La activación

15

con compuestos de MIC-1 del complejo receptor se mide mediante la fosforilación de cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) como se describe en el Ejemplo 6.

Como se describe en la presente descripción la potencia y la eficacia del receptor se mide en compuestos de MIC-1 como homodímeros.

5 Actividad biológica in vivo.

En un aspecto los compuestos de la invención son potentes in vivo, lo cual puede determinarse como se conoce en la técnica en cualquier modelo animal adecuado.

La rata Sprague Dawley no obesa es un ejemplo de un modelo animal adecuado y los cambios en la ingesta de alimentos pueden determinarse en tales ratas in vivo, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 14. En un aspecto los compuestos de la invención inhiben in vivo la ingesta de alimentos en ratas Sprague Dawley no obesas.

Semivida en plasma in vivo

En un aspecto los compuestos de MIC-1 de la invención tienen prolongador y tienen una semivida en plasma in vivo extendida, que puede determinarse en un estudio farmacocinético in vivo adecuado.

La exposición al plasma extendida puede determinarse como la semivida en plasma ($T_{1/2}$) después de la administración i.v. a animales tales como ratas o minicerdos.

En algunas modalidades, los compuestos de MIC-1 de la invención tienen una semivida en plasma después de la administración i.v. a una rata de al menos 10 horas, con mayor preferencia entre 25-50 horas, o con la máxima preferencia al menos 50 horas, determinada como se describe en el Ejemplo 16.

En algunas modalidades, los compuestos de MIC-1 de la invención tienen una semivida en plasma después de la administración i.v. a minicerdos de al menos 50 horas, con mayor preferencia entre 50-200 horas, incluso con mayor preferencia al menos 200 horas o con la máxima preferencia al menos 300 horas, determinada como se describe en el Ejemplo 17.

De acuerdo con un tercer aspecto, los compuestos de la invención tienen prolongador y al mismo tiempo mantienen la potencia in vivo. La combinación particular de potencia mantenida y semivida en plasma larga puede ser muy conveniente.

Solubilidad.

El MIC-1 humano de tipo silvestre es una proteína hidrófoba, con un pI calculado de 8.8 en base al homodímero. En consecuencia, el MIC-1 de tipo silvestre solo puede solubilizarse a aproximadamente 0.5 mg/ml en sistemas de tampón acuoso de pH neutro. La baja solubilidad de MIC-1 dificulta significativamente sus propiedades de formulación farmacéutica y su uso terapéutico, por lo tanto el desarrollo de un compuesto de MIC-1 con solubilidad mejorada mejoraría en gran medida la utilidad terapéutica.

En un aspecto, los polipéptidos MIC-1 con una extensión en N de la invención tienen una solubilidad mejorada (es decir, son más solubles) en relación con MIC-1 humana de SEQ ID NO:1.

Como se describe en la presente descripción, la solubilidad se mide como se describe en el Ejemplo 4.

En determinadas modalidades, los polipéptidos MIC-1 con una extensión en N de la invención tienen una solubilidad de al menos 1 mg/ml en tampón Tris a pH 8.0. En otras modalidades, los polipéptidos MIC-1 con una extensión en N de la invención tienen una solubilidad de al menos 5 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 30 mg/ml o al menos 40 mg/ml en tampón Tris a pH 8.0.

La adición de un prolongador para preparar un compuesto de MIC-1 no altera notablemente la solubilidad mejorada de medida para los polipéptidos MIC-1 correspondientes con una extensión en N (Ejemplo 12).

Como se describe en la presente descripción, la solubilidad se mide en compuestos de MIC-1 y polipéptidos MIC-1 con una extensión en N como homodímeros.

Estabilidad

La secuencia de MIC-1 humana de tipo silvestre es químicamente inestable y varios residuos de la secuencia de aminoácidos podrían modificarse durante el almacenamiento, incluida la desamidación de la asparagina en la posición 3 (N3) y la oxidación de las metioninas M43, M57 y M86. La inestabilidad química de determinados residuos podría afectar las propiedades farmacéuticas por lo que el desarrollo de compuestos de MIC-1 estables químicamente sería otra parte importante de la fabricación de un compuesto terapéutico MIC-1.

En un aspecto, los compuestos de la invención tienen una estabilidad química mejorada en relación con MIC-1 humana de SEQ ID NO:1.

El término “estabilidad química” se refiere a cambios químicos en la estructura polipeptídica que conduce a la formación de productos de degradación química que tienen potencialmente una actividad biológica reducida, solubilidad disminuida y/o efecto inmunogénico aumentado en comparación con el polipéptido intacto. La estabilidad química puede evaluarse mediante la medición de la cantidad de productos de degradación química en diversos puntos de tiempo después de la exposición a diferentes condiciones ambientales, por ejemplo mediante SEC-HPLC, y/o RP-HPLC.

En algunas modalidades de la invención, determinados residuos de la secuencia monomérica de MIC-1 (SEQ ID NO:1) se modifican, por ejemplo, mediante sustitución para aumentar la estabilidad química de los compuestos de MIC-1. Para evitar la desamidación, N3 se deleciona o se sustituye con otros aminoácidos, por ejemplo, E o Q. Para disminuir la oxidación, la metionina se sustituye con otros aminoácidos, por ejemplo E o L.

Inmunogenicidad

En un aspecto, los compuestos de MIC-1 de la invención tienen bajo riesgo de inmunogenicidad.

Procesos de producción

Los polipéptidos MIC-1 con una extensión de aminoácidos en el N-terminal de la presente invención pueden producirse por medio de la tecnología de proteínas recombinantes conocida por las personas expertas en la técnica. En general, las secuencias de ácido

nucleico que codifican las proteínas de interés o variantes funcionales de estas se modifican de modo que codifiquen el polipéptido MIC-1 con una extensión en N deseado. Esta secuencia modificada después se inserta en un vector de expresión, que a su vez se transforma o se transfecta en las células huésped de expresión.

- 5 El constructo de ácido nucleico que codifica el polipéptido MIC-1 con una extensión en N puede ser adecuadamente de origen genómico, de ADNc o sintético. Las alteraciones de la secuencia de aminoácidos se logran mediante la modificación del código genético mediante técnicas bien conocidas.

La secuencia de ADN que codifica el polipéptido MIC-1 con una extensión en N
10 generalmente se inserta en un vector recombinante que puede ser cualquier vector, el cual puede someterse convenientemente a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector dependerá frecuentemente de la célula huésped en la que este va a introducirse. Por lo tanto, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la
15 replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica junto con el(los) cromosoma(s) en el(los) que se ha integrado.

El vector es preferentemente un vector de expresión en el que la secuencia de ADN que codifica el polipéptido MIC-1 con una extensión en N se une operativamente a segmentos
20 adicionales requeridos para la transcripción del ADN. El término, “unido operativamente” indica que los segmentos se disponen de manera que funcionen en concierto para los fines previstos, por ejemplo, la transcripción inicia en un promotor y continúa a través de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido hasta que termina dentro de un terminador.

Por lo tanto, los vectores de expresión para el uso en la expresión del polipéptido MIC-1
25 con una extensión en N comprenderán un promotor capaz de iniciar y dirigir la transcripción de un gen o ADNc clonado. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN, que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección y puede derivarse de genes que codifican proteínas ya sean homólogas o heterólogas a la célula huésped.

30 Además, los vectores de expresión para la expresión del polipéptido MIC-1 con una extensión en N también comprenderán una secuencia terminadora, una secuencia reconocida por una célula huésped para terminar la transcripción. La secuencia terminadora se une operativamente al 3' terminal de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido. Cualquier terminador que sea funcional en la célula huésped de elección puede
35 usarse en la presente invención.

La expresión del polipéptido MIC-1 con una extensión en N puede dirigirse a la expresión intracelular en el citosol de la célula huésped o puede dirigirse a la vía secretora para la expresión extracelular en el medio de crecimiento.

La expresión intracelular es la vía predeterminada y requiere un vector de expresión con
40 una secuencia de ADN que comprende un promotor seguido de la secuencia de ADN que

codifica el polipéptido MIC-1 con una extensión en N seguida de un terminador.

Para dirigir la secuencia del polipéptido MIC-1 con una extensión en N a la vía secretora de las células huésped, se necesita una secuencia señal de secreción (también conocida como péptido señal o una presecuencia) como una extensión de la secuencia de MIC-1. Una
5 secuencia de ADN que codifica el péptido señal se une al extremo 5' de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido MIC-1 con una extensión en N en el marco de lectura correcto. El péptido señal puede ser el asociado normalmente con la proteína o puede ser de un gen que codifica otra proteína secretada.

Los procedimientos usados para ligar las secuencias de ADN que codifican el polipéptido
10 MIC-1 con una extensión en N, el promotor, el terminador y/o la secuencia señal de secreción, respectivamente, y para insertarlos en vectores adecuados que contienen la información necesaria para la replicación, son bien conocidos por las personas expertas en la técnica (consultar, por ejemplo, Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989).

15 La célula huésped en la que se introduce la secuencia de ADN que codifica el polipéptido MIC-1 con una extensión en N puede ser cualquier célula que sea capaz de expresar el polipéptido MIC-1 con una extensión en N ya sea intracelularmente o extracelularmente. El polipéptido MIC-1 con una extensión en N puede producirse mediante el cultivo de una célula huésped que contiene una secuencia de ADN que codifica el polipéptido MIC-1 con
20 una extensión en N y que es capaz de expresar el polipéptido MIC-1 con una extensión en N en un medio nutriente adecuado en condiciones que permiten la expresión del polipéptido MIC-1 con una extensión en N. Los ejemplos no limitantes de células huésped adecuadas para la expresión de polipéptido MIC-1 con extensión en N son: *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, así como también líneas celulares de riñón embrionario humano (HEK), de riñón de Hámster Bebé (BHK) o de ovario de hámster chino (CHO). Si se necesitan modificaciones postraduccionales, las células huésped adecuadas incluyen levadura, hongos, insectos y células eucariotas superiores tales como células de mamíferos.

Una vez que el polipéptido MIC-1 con una extensión en N se ha expresado en un organismo huésped puede recuperarse y purificarse hasta la calidad requerida mediante
30 técnicas convencionales. Los ejemplos no limitantes de tales técnicas de recuperación y purificación convencionales son centrifugación, solubilización, filtración, precipitación, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC), Cromatografía Líquida de Fase Inversa -Alta Resolución (RP-HPLC), filtración en gel y liofilización.

35 Los ejemplos de expresión recombinante y purificación de proteínas MIC-1 pueden encontrarse, por ejemplo, en Cordingley y otros, *J. Virol.* 1989, 63, páginas 5037-5045; Birch y otros, *Protein Expr Purif.*, 1995, 6, páginas 609-618 y en el documento WO2008/043847.

Los ejemplos de expresión microbiana y purificación de proteínas MIC-1 pueden
40 encontrarse en por ejemplo Chich y otros *Anal. Biochem.* 1995, 224, páginas 245-249 y

Xin y otros, Protein Expr. Purif. 2002, 24, páginas 530-538.

Los ejemplos específicos de métodos para preparar una serie de polipéptidos MIC-1 con una extensión en N de la invención se incluyen en la parte experimental.

Cuerpo de inclusión y expresión de proteínas

- 5 Los polipéptidos MIC-1 con una extensión de aminoácidos en el N-terminal pueden expresarse en bacterias tales como E. coli. En el contexto de la presente invención, la producción de proteínas a gran escala de los polipéptidos MIC-1 con una extensión en N podría necesitar el uso de cuerpos de inclusión (IB) ya que esto representa un enfoque ventajoso para controlar la recuperación del proceso, la pureza de la proteína, la
- 10 degradación por proteasas y la estabilidad general de la proteína. Esto se vuelve particularmente importante para la producción de proteínas a gran escala. De importancia crítica para la calidad de los IB es el equilibrio de solubilidad de los polipéptidos MIC-1 con una extensión N parcialmente controlado por el pI calculado y la formación de IB.

Modo de administración

- 15 La ruta de administración puede ser cualquier ruta que transporte eficazmente un compuesto de esta invención al lugar deseado o apropiado en el cuerpo, tal como por vía parenteral, por ejemplo, por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa. Alternativamente, un compuesto de esta invención puede administrarse por vía oral, pulmonar, rectal, transdérmica, bucal, sublingual o nasal.
- 20 La cantidad de un compuesto de esta invención a administrar, la determinación de con qué frecuencia administrar un compuesto de esta invención, y la elección de qué compuesto o compuestos de esta invención administrar, opcionalmente junto con otro agente farmacéuticamente activo, se decide en consulta con un profesional que esté familiarizado con el tratamiento de la obesidad y los trastornos relacionados.

- 25 Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención o una sal, amida o éster farmacéuticamente aceptable de este y un excipiente farmacéuticamente aceptable pueden prepararse como se conoce en la técnica.

- El término "excipiente" se refiere, en un sentido amplio, a cualquier componente aparte
- 30 del/de los ingrediente/s terapéutico/s activo/s. El excipiente puede ser una sustancia inerte, una sustancia inactiva, y/o una sustancia no activa medicinalmente.

El excipiente puede servir para diversos fines, por ejemplo como portador, vehículo, diluyente, auxiliar para tabletas, y/o para mejorar la administración, y/o la ingesta de la sustancia activa.

- 35 En la técnica se conoce la formulación de ingredientes farmacéuticamente activos con diversos excipientes, véase por ejemplo Remington: The Science and Practice of Pharmacy (por ejemplo 19^{na} edición (1995) y cualquiera de las ediciones posteriores).

Tratamiento de combinación

- El tratamiento con un compuesto de acuerdo con la presente invención puede combinarse,
- 40 además, con una o más sustancias farmacológicamente activas, por ejemplo, seleccionadas

de agentes antiobesidad, agentes reguladores del apetito, y agentes para el tratamiento y/o prevención de complicaciones y trastornos que resultan de o se asocian con la obesidad.

Indicaciones farmacéuticas

En un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de la invención, para el uso
5 como un medicamento.

En modalidades particulares, el compuesto de la invención puede usarse para los siguientes tratamientos médicos:

(i) Prevención y/o tratamiento de trastornos alimentarios, tales como obesidad, por ejemplo, mediante la disminución de la ingesta de alimentos, la reducción del peso corporal, la
10 supresión del apetito y/o la inducción de la saciedad.

(ii) Prevención y/o tratamiento de hiperglicemia, resistencia a insulina y/o tolerancia alterada a la glucosa.

(iii) Prevención y/o tratamiento de dislipidemia.

En algunas modalidades la invención se refiere a un método para el manejo del peso. En
15 algunas modalidades la invención se refiere a un método para la reducción del apetito. En algunas modalidades la invención se refiere a un método para la reducción de la ingesta de alimentos.

En general, todos los sujetos que padecen de obesidad se considera que también padecen de sobrepeso. En algunas modalidades la invención se refiere a un método para el tratamiento
20 o la prevención de la obesidad. En algunas modalidades la invención se refiere al uso de los compuestos de MIC-1 de la invención para el tratamiento o prevención de la obesidad. En algunas modalidades el sujeto que padece de obesidad es un ser humano, tal como un ser humano adulto o un ser humano en edad pediátrica (incluidos infantes, niños, y adolescentes). El índice de masa corporal (BMI) es una medida de la grasa corporal basada
25 en la altura y el peso. La fórmula para el cálculo es $BMI = \text{peso en kilogramos} / \text{altura en metros}^2$. Un sujeto humano que padece de obesidad tiene un BMI de ≥ 30 ; este sujeto también puede referirse como obeso. En algunas modalidades el sujeto humano que padece de obesidad tiene un BMI de ≥ 35 o un BMI en el intervalo de ≥ 30 a < 40 . En algunas modalidades la obesidad es obesidad grave u obesidad mórbida, en donde el sujeto humano
30 tiene un BMI de ≥ 40 .

En algunas modalidades la invención se refiere a un método para el tratamiento o prevención del sobrepeso, opcionalmente en la presencia de al menos una comorbilidad relacionada con el peso. En algunas modalidades la invención se refiere al uso de los compuestos de MIC-1 de la invención para el tratamiento o prevención del sobrepeso,
35 opcionalmente en la presencia de al menos una comorbilidad relacionada con el peso.

En algunas modalidades el sujeto que padece de sobrepeso es un ser humano, tal como un ser humano adulto o un ser humano en edad pediátrica (incluidos infantes, niños, y adolescentes). En algunas modalidades un sujeto humano que padece de sobrepeso tiene un BMI de ≥ 25 , tal como un BMI de ≥ 27 . En algunas modalidades a sujeto humano que
40 padece de sobrepeso tiene un BMI en el intervalo de 25 a < 30 o en el intervalo de 27 a < 30 .

En algunas modalidades la comorbilidad relacionada con el peso se selecciona del grupo que consiste en hipertensión, diabetes (tal como diabetes tipo 2), dislipidemia, colesterol alto, y apnea obstructiva del sueño.

En algunas modalidades la invención se refiere a un método para la reducción del peso corporal. En algunas modalidades la invención se refiere al uso de los compuestos de MIC-1 de la invención para la reducción del peso corporal. Un ser humano que va a someterse a la reducción del peso corporal de acuerdo con la presente invención tiene un BMI de ≥ 25 , tal como un BMI de ≥ 27 o un BMI de ≥ 30 . En algunas modalidades el ser humano que va a someterse a la reducción del peso corporal de acuerdo con la presente invención tiene un BMI de ≥ 35 o un BMI de ≥ 40 .

En algunas modalidades la invención se refiere a un método para el tratamiento o prevención de enfermedades cardiovasculares como arteriosclerosis y otros trastornos tales como esteatohepatitis y nefropatía diabética.

Los artículos "un" y "una" se usan en la presente descripción para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un polipéptido MIC-1" significa un polipéptido MIC-1 o más de un polipéptido MIC-1.

Un asterisco (*) en una fórmula química indica un punto de unión.

MODALIDADES PARTICULARES

La invención se describe adicionalmente mediante las siguientes modalidades no limitantes de la invención:

1. Un compuesto de MIC-1 que comprende un polipéptido MIC-1 con una extensión de aminoácidos en el N-terminal y un prolongador, en donde el prolongador se une a la extensión de aminoácidos.
2. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 1, en donde el compuesto es un homodímero.
3. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con las modalidades 1 o 2, en donde la extensión de aminoácidos en el N-terminal comprende un residuo de cisteína, y en donde el prolongador se une a la extensión de aminoácidos en el residuo de cisteína.
4. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 3, en donde el prolongador comprende, o consiste en, al menos uno de cada uno de Quím. 1, Quím. 2, Quím. 3 y Quím. 4;

en donde Quím. 1 se selecciona del grupo que consiste en:

Quím. 1A: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_x\text{-CO-}^*$,

Quím. 1B: $\text{HO-S(=O)}_2-(\text{CH}_2)_x\text{-CO-}^*$,

Quím. 1C: $\text{HOOC-benceno-O}-(\text{CH}_2)_y\text{-CO-}^*$, y

Quím. 1D: $(1\text{H-tetrazol-5-il})-(\text{CH}_2)_x\text{-CO-}^*$

en donde x es un número entero en el intervalo de 12-20,

en donde y es un número entero en el intervalo de 5-15;

en donde Quím. 2 se selecciona del grupo que consiste en:

Quím. 2A: $^{*}-(\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_m-\text{CO})_k^{*}$,

Quím. 2B: $^{*}-(\text{NH}-\text{S}(=\text{O})_2-(\text{CH}_2)_m-\text{CO})_k^{*}$, y

Quím. 2C: $^{*}-(\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{ciclohexano}-\text{CO})_k^{*}$,

en donde m de Quím. 2 es un número entero en el intervalo de 1-5, y

5 k es un número entero en el intervalo de 0-4,

en donde Quím. 3 es

$^{*}(\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-[\text{O}-(\text{CH}_2)_2]_k-\text{O}-[\text{CH}_2]_n-\text{CO}-^{*})_l$,

en donde k de Quím. 3 es un número entero en el intervalo de 1-10,

n es un número entero en el intervalo de 1-5, y

10 l es un número entero en el intervalo de 0-5;

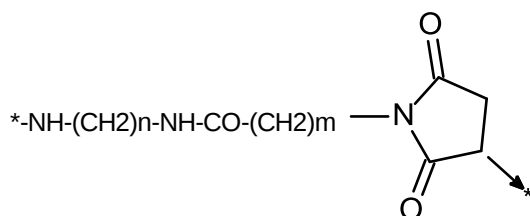
en donde Quím. 4 se selecciona de

Quím. 4A: $^{*}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-^{*}$, y

Quím. 4B: $^{*}-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_m-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-^{*}$,

Quím. 4C: $^{*}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}(\text{COOH})-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-^{*}$, y

15



20

Quím. 4D:

en donde m de Quím. 4 es un número entero en el intervalo de 1-5 y n es un número entero en el intervalo de 2-6; y

en donde Quím. 1, Quím. 2, Quím. 3 y Quím. 4 se interconectan a través de enlaces amida, que conectan el extremo $^{*}-\text{NH}$ de un Quím. al extremo $\text{CO}-^{*}$ de otro Quím., y en donde el extremo CH_2-^{*} de Quím. 4 se conecta a un átomo de azufre del residuo de cisteína de la extensión de aminoácidos.

25

5. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con las modalidades 1 o 2, y en donde el prolongador se une al aminoácido N-terminal de la extensión de aminoácidos.

6. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 5, en donde el prolongador comprende, o consiste en, al menos uno de cada uno de Quím. 1, Quím. 2, Quím. 3 y Quím. 4;

30

en donde Quím. 1 se selecciona del grupo que consiste en:

Quím. 1A: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-^{*}$,

Quím. 1B: $\text{HO}-\text{S}(=\text{O})_2-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-^{*}$,

35

Quím. 1C: $\text{HOOC}-\text{benceno}-\text{O}-(\text{CH}_2)_y-\text{CO}-^{*}$, y

Quím. 1D: $(1\text{H-tetrazol-5-il})-(\text{CH}_2)_x-\text{CO}-^{*}$

en donde x es un número entero en el intervalo de 12-20,

en donde y es un número entero en el intervalo de 5-15;

en donde Quím. 2 se selecciona del grupo que consiste en:

40

Quím. 2A: $^{*}-(\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-(\text{CH}_2)_m-\text{CO})_k^{*}$,

Quím. 2B: $^{*}-(\text{NH}-\text{S}(=\text{O})_2-(\text{CH}_2)_m-\text{CO})_k^{*}$, y

Quím. 2C: $^{*}-(\text{NH}-(\text{CH}_2)_m-\text{ciclohexano}-\text{CO})_k^{*}$,

en donde m de Quím. 2 es un número entero en el intervalo de 1-5, y

k es un número entero en el intervalo de 0-4,

5 en donde Quím. 3 es

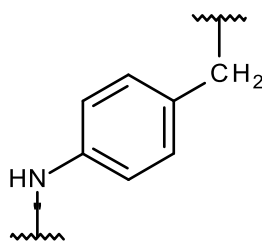
$^{*}(\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-[\text{O}-(\text{CH}_2)_2]_k-\text{O}-[\text{CH}_2]_n-\text{CO}-^{*})_l$,

en donde k de Quím. 3 es un número entero en el intervalo de 1-10,

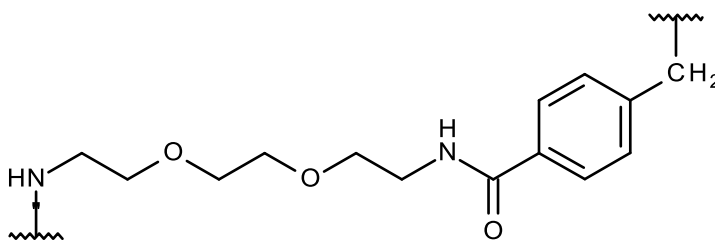
n es un número entero en el intervalo de 1-5, y

l es un número entero en el intervalo de 0-5;

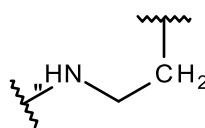
10 en donde Quím. 4 se selecciona del grupo que consiste en Fórmula I, II o III:



(Fórmula I)



(Fórmula II) o



(Fórmula III).

en donde Quím. 1, Quím. 2, Quím. 3 y Quím. 4 se interconectan a través de enlaces amida,

30 que conectan el extremo $^{*}-\text{NH}$ de un Quím. al extremo $\text{CO}-^{*}$ de otro Quím., y en donde el extremo CH_2-^{*} de Quím. 4 se conecta al grupo amino del N-terminal de la extensión de aminoácidos.

7. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 4 y 6, en donde Quím. 1 se selecciona del grupo que consiste en:

35 Quím. 1a: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{16}-\text{CO}-^{*}$,

Quím. 1b: $\text{HO}-\text{S}(=\text{O})_2-(\text{CH}_2)_{15}-\text{CO}-^{*}$

Quím. 1c: $\text{HOOC}-\text{benceno}-\text{O}-(\text{CH}_2)_9-\text{CO}-^{*}$, y

Quím. 1d: $(1\text{H-tetrazol-5-il})-(\text{CH}_2)_{15}-\text{CO}-^{*}$.

8. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 4, 6 y 7 en donde

40 Quím. 2 se selecciona del grupo que consiste en:

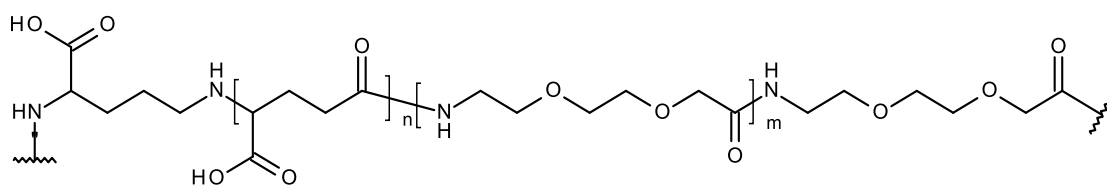
Quím. 2a: $^*\text{-NH-CH(COOH)-(CH}_2)_2\text{-CO-}^*$,

Quím. 2b: $^*\text{-NH-S(=O)}_2\text{-(CH}_2)_3\text{-CO-}^*$ y

Quím. 2c: $^*\text{-NH-CH}_2\text{-ciclohexano-CO-}^*$.

9. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 4, 6 y 7, en donde

5 Quím. 2-Quím. 3 es la siguiente Fórmula IV:



10

(Fórmula IV)

donde n es de 0-3 y m es 0-3

10. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 4 y 7-9, en donde Quím. 4 se selecciona del grupo que consiste en:

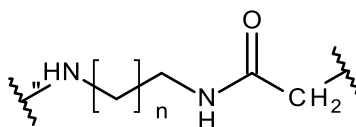
15

Quím. 4a: $^*\text{-NH-(CH}_2)_2\text{-NH-CO-CH}_2\text{-}^*$ y

Quím. 4b: $^*\text{-NH-CH(COOH)-(CH}_2)_4\text{-NH-CO-CH}_2\text{-}^*$.

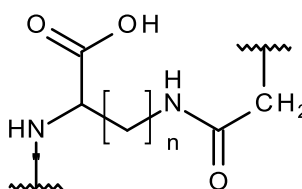
11. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 4 y 7-9, en donde Quím. 4 se selecciona del grupo que consiste en Fórmula V, VI o VII:

20



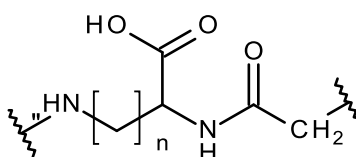
(Fórmula V)

25



(Fórmula VI)

30

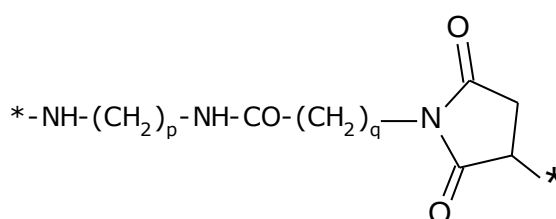


(Fórmula VII)

35 donde n es 1-4.

12. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 4 y 7-9, en donde Quím.

40



10

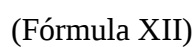
15

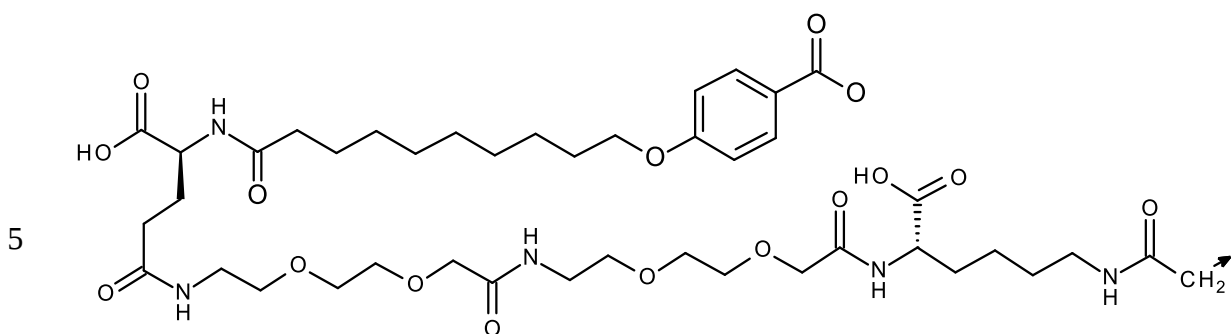
20

25



35





(Fórmula XIII).

- 10 14. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-3 y 5, en donde el prolongador se selecciona del grupo que consiste en: ácidos grasos biocompatibles y derivados de estos, hidroxí alquil almidón (HAS), por ejemplo, hidroxí etil almidón (HES), polietilenglicol (PEG), poli (Glyx-Sery)_n (HAP), ácido hialurónico (HA), polímeros de heparosano (HEP), polímeros a base de fosforilcolina (polímero de PC), fleximers, 15 dextrana, ácidos polisiálicos (PSA), un dominio Fc, transferrina, albúmina, péptidos similares a elastina, polímeros XTEN, péptidos de unión a albúmina, un péptido CTP y cualquier combinación de estos.
15. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde el polipéptido MIC-1 con la extensión de aminoácidos tiene un pI calculado menor 20 que 6.5.
16. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 15, en donde el pI calculado es menor que 6.1.
17. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 15, en donde el pI calculado es menor que 6.0.
- 25 18. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 15, en donde el pI calculado es menor que 6.4, 6.3, 6.2, 6.1, 6.0, 5.9, 5.8, 5.7, 5.6, 5.5, 5.4, 5.3, o 5.2, 5.1, o 5.0, 4.9, 4.8, 4.7, 4.6, 4.5, 4.4, 4.3, 4.2, 4.1 o 4.0.
19. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 15, en donde el pI calculado es mayor que 4.7.
- 30 20. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 15, en donde el pI calculado es mayor que 4.8.
21. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 15, en donde el pI calculado es mayor que 4.9.
22. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 15, en donde el pI calculado es 35 mayor que 5.0.
23. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 15, en donde el pI calculado es mayor que 5.1.
24. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 15, en donde el pI calculado se encuentra en el intervalo de 6.5-3.0, 6.5-3.5, 6.5-4.0, 6.1-3.0, 6.1-3.5, 6.1-4.0, 6.1-4.7, 6.1-

- 4.9, 6.1-5.0, 6.1-5.1, 6.0-3.0, 6.0-3.5, 6.0-4.0, 5.9-3.0, 5.9-3.5, 5.9-4.0, 5.9-5.0, 5.9-5.1, 5.8-3.0, 5.8-3.5, 5.8-4.0, 5.8-5.1, 5.8-5.2, 5.5-3.0, 5.5-3.5, 5.5-4.0 o 5.0-4.0.
25. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 15, en donde el pI calculado se encuentra en el intervalo de 5.8-5.2.
- 5 26. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la extensión de aminoácidos comprende de 3 a 200 residuos de aminoácidos.
27. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la extensión de aminoácidos se encuentra en el intervalo de 3-100, 3-50, 3-40, 3-30, 5-100, 5-50, 5-40, 5-30, 10-100, 10-50, 10-40, 10-30, 3-36, 3-30, 3-25, 3-24, 3-12, 4-36, 4-30, , 4-24, 4-12, 5-36, 5-30, 5-24, 5-12, 6-36, 6-30, 6-24, 6-12, 7-36, , 7-30, 7-24, 7-12, 8-36, 8-30, 8-24, 8-12, 30-36, 32-36, 30-34 o 30-32 residuos de aminoácidos de longitud.
- 10 28. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la extensión de aminoácidos se encuentra en el intervalo de 3-36 o 30-32 residuos de aminoácidos de longitud.
- 15 29. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la extensión de aminoácidos tiene un exceso de residuos de aminoácidos ácidos (Ácido aspártico o Ácido glutámico) de al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 en comparación con el número de residuos de aminoácidos básicos (Lisina, Arginina o Histidina).
30. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la extensión de aminoácidos comprende al menos 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 % o 75 % de exceso de residuos de aminoácidos ácidos (Ácido aspártico o Ácido glutámico) en comparación con el número de residuos de aminoácidos básicos (Lisina o Arginina o Histidina).
- 20 31. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 30, en donde la extensión de aminoácidos comprende al menos 10 % de residuos de aminoácidos ácidos.
- 25 32. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 30, en donde la extensión de aminoácidos comprende al menos 15 % de residuos de aminoácidos ácidos.
33. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 11, en donde la extensión de aminoácidos comprende al menos 25 % de residuos de aminoácidos ácidos.
- 30 34. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-33, en donde la extensión de aminoácidos está compuesta por residuos de aminoácidos seleccionados entre el grupo que consiste en A, C, E, G, P, S, T, Q, N y D y en donde la extensión de aminoácidos comprende al menos tres residuos de aminoácidos E y/o D.
- 35 35. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 34, en donde la extensión de aminoácidos está compuesta por los residuos de aminoácidos A, C, E, G, P, S y T.
36. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 35, en donde la extensión de aminoácidos comprende al menos tres E y al menos una P.
37. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 36, en donde la extensión de aminoácidos comprende al menos 6 Ser, 4 Pro, 4 Gly, 4 Thr, 4 Glu y 2 Ala.

38. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 37, en donde la extensión de aminoácidos comprende dos de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SPAGSPTSTEEG, TSESATPESGPG, TSTEPSEGSAPG y SEPATSGSETPG, y en donde uno de los aminoácidos de la extensión de aminoácidos se reemplaza con cisteína.
- 5 39. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 38, en donde la extensión de aminoácidos comprende, además, 6-8 aminoácidos consecutivos de SPAGSPTSTEEG, TSESATPESGPG, TSTEPSEGSAPG o SEPATSGSETPG, tales como los primeros 6-8 residuos de aminoácidos, los últimos 6-8 residuos o los 6-8 residuos internos, y en donde uno de los aminoácidos de la extensión de aminoácidos se reemplaza con cisteína.
- 10 40. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 3-39, en donde la cisteína se ubica en cualquier posición de la extensión de aminoácidos en el extremo N-terminal.
41. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 40, en donde la distancia entre el residuo de cisteína de la extensión en el N-terminal y el aminoácido N-terminal del polipéptido MIC-1 es al menos 1, 3, 5, 10, 15, 19, 23, 26, 29 o 32 aminoácidos (incluido el residuo de cisteína de la extensión en el N-terminal, pero sin incluir el aminoácido N-terminal del polipéptido MIC-1).
- 15 42. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 40, en donde la distancia entre el residuo de cisteína de la extensión en el N-terminal y el aminoácido N-terminal del polipéptido MIC-1 es al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 o 32 aminoácidos (incluido el residuo de cisteína de la extensión en el N-terminal, pero sin incluir el aminoácido N-terminal del polipéptido MIC-1).
43. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 42, en donde la distancia entre el residuo de cisteína de la extensión en el N-terminal y el aminoácido N-terminal del polipéptido MIC-1 es 26-29 aminoácidos (incluido el residuo de cisteína de la extensión en el N-terminal, pero sin incluir el aminoácido N-terminal del polipéptido MIC-1).
- 25 44. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la extensión de aminoácidos inicia con S.
45. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la extensión de aminoácidos inicia con SE.
- 30 46. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la extensión de aminoácidos inicia con SEP.
47. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la extensión de aminoácidos comprende una o más de las siguientes secuencias
- 35 SEPATCGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS (SEQ ID NO: 223),
 SEPATSGCETPGTSESATPESGPGTSTEPS (SEQ ID NO: 224),
 SEPCTSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG (SEQ ID NO: 225),
 SEPCTSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS (SEQ ID NO: 240),
 SEPCTSGSETPGTSESATPESGPGTSTE (SEQ ID NO: 241),
 40 SEPCTSGSETPGTSESATPESGPG (SEQ ID NO: 242),

SEPCTSGSETPGTSESATPES (SEQ ID NO: 243),
 SEPCTSGSETPG (SEQ ID NO: 244),
 SEPCTSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSP (SEQ ID NO: 245),
 SEPCTSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSP (SEQ ID NO: 246),
 5 SEPCTSGSETPGTSTEPESGSAPGSPAGSP (SEQ ID NO: 247),
 SEPCTSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESAT (SEQ ID NO: 248),
 SEPCTSGSETPGTSESATPESGPGTSESAT (SEQ ID NO: 249),
 SEPCTSGSETPGTSTEPESGSAPGTSESAT (SEQ ID NO: 250),
 SEPCTSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPE (SEQ ID NO: 251),
 10 SEPCTSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPE (SEQ ID NO: 252),
 SEPCTSGSETPGTSTEPESGSAPGTSTEPE (SEQ ID NO: 253),
 SEPCTSGSETPGSPAGSPTSTEEGSEPATS (SEQ ID NO: 254),
 SEPCTSGSETPGTSESATPESGPGSEPATS (SEQ ID NO: 255),
 SEPCTSGSETPGTSTEPESGSAPGSEPATS (SEQ ID NO: 256),
 15 SEPCTSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEEG (SEQ ID NO: 257),
 SEPCTSGSETPGTSESATPESGPGTSTEEG (SEQ ID NO: 258),
 SEPCTSGSETPGTSTEPESGSAPGTSTEEG (SEQ ID NO: 259),
 SEPCTSGSETPGSPAGSPTSTEEGPESGPG (SEQ ID NO: 260),
 SEPCTSGSETPGTSESATPESGPGPESGPG (SEQ ID NO: 261),
 20 SEPCTSGSETPGTSTEPESGSAPGPESGPG (SEQ ID NO: 262),
 SEPCTSGSETPGSPAGSPTSTEEGSGSAPG (SEQ ID NO: 263),
 SEPCTSGSETPGTSESATPESGPGSGSAPG (SEQ ID NO: 264),
 SEPCTSGSETPGTSTEPESGSAPGSGSAPG (SEQ ID NO: 265),
 SEPCTSGSETPGSPAGSPTSTEEGGSETPG (SEQ ID NO: 266),
 25 SEPCTSGSETPGTSESATPESGPGGSETPG (SEQ ID NO: 267),
 SEPCTSGSETPGTSTEPESGSAPGGSETPG (SEQ ID NO: 268),
 SEPCTSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG (SEQ ID NO: 269),
 SEPCTSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG (SEQ ID NO: 270),
 SEPCTSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPESGSAPG (SEQ ID NO: 271),
 30 SEPCTSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEG (SEQ ID NO: 272),
 SEPCTSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG (SEQ ID NO: 273),
 SEPCTSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPESGSAPG (SEQ ID NO: 274),
 SEPCTSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG (SEQ ID NO: 275),
 SEPCTSGSETPGTSTEPESGSAPGSPAGSPTSTEEG (SEQ ID NO: 276),
 35 SEPCTSGSETPGTSTEPESGSAPGTSESATPESGPG (SEQ ID NO: 277),
 SEPCTSGSETPGTSTEPESGSAPGTSTEPESGSAPG (SEQ ID NO: 278),
 SEPCTSGSETPGTSTEPESGSAPGSEPATSGSETPG (SEQ ID NO: 279),
 SEPCTSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG (SEQ ID NO: 280),
 SEPCTSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG (SEQ ID NO: 281),
 40 SEPCTSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPESGSAPG (SEQ ID NO: 282),

- SEPCTSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPG (SEQ ID NO: 283),
 GPCEGPSEGPSEGPSEGPSEGPSEGPSE (SEQ ID NO: 284),
 GECPGEQPGEQPGEQPGEQPGEQPGEQP (SEQ ID NO: 285),
 PACEEEDDPDGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 286),
 5 PDECTEEETEGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 287),
 SEPATCGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG (SEQ ID NO: 226),
 SEPATSCSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG (SEQ ID NO: 227),
 SEPACSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG (SEQ ID NO: 229),
 SEPATSGCSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG (SEQ ID NO: 230),
 10 SEPATSGSECPGTSESATPESGPGTSTEPSEG (SEQ ID NO: 231),
 SEPATSGSETPCTSESATPESGPGTSTEPSEG (SEQ ID NO: 232),
 SEPATSGSETPGTCESESATPESGPGTSTEPSEG (SEQ ID NO: 233),
 SEPATSGSETPGTSECATPESGPGTSTEPSEG (SEQ ID NO: 234),
 SEPATSGSETPGTSESACPESGPGTSTEPSEG (SEQ ID NO: 235),
 15 SEPATSGSETPGTSESATPECGPGTSTEPSEG (SEQ ID NO: 236),
 SEPATSGSETPGTSESATPESCPGTSTEPSEG (SEQ ID NO: 237),
 SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSCEPSEG (SEQ ID NO: 238),
 SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPCEG (SEQ ID NO: 239).
48. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-2 y 5-33 en
 20 donde la extensión de aminoácidos está compuesta por residuos de aminoácidos
 seleccionados entre el grupo que consiste en A, E, G, P, S, T, D, N y Q en donde la
 extensión de aminoácidos comprende al menos tres residuos de aminoácidos E y/o D.
49. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en
 donde la extensión de aminoácidos está compuesta por residuos de aminoácidos
 25 seleccionados entre el grupo que consiste en A, E, G, P, S, T, Q y D, en donde la extensión
 de aminoácidos comprende al menos tres residuos de aminoácidos E y/o D.
50. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 48 o 49, en donde la extensión de
 aminoácidos comprende al menos tres E y al menos una P.
51. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 50, en donde la extensión de
 30 aminoácidos comprende, además, S, G, T y A.
52. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 51, en donde la extensión de
 aminoácidos comprende 6 Ser, 4 Pro, 4 Gly, 4 Thr, 4 Glu y 2 Ala.
53. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 51, en donde la extensión de
 aminoácidos comprende dos secuencias seleccionadas del grupo que consiste en
 35 SPAGSPTSTEEG, TSESATPESGPG, TSTEPSEGSAPG y SEPATSGSETPG.
54. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 53, en donde la extensión de
 aminoácidos comprende, además, 6-8 aminoácidos consecutivos de SPAGSPTSTEEG,
 TSESATPESGPG, TSTEPSEGSAPG o SEPATSGSETPG, tales como los primeros 6-8
 residuos de aminoácidos, los últimos 6-8 residuos o los 6-8 residuos internos.

55. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 48 a 54, en donde la extensión de aminoácidos inicia con S.
56. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 55, en donde la extensión de aminoácidos inicia con SE.
- 5 57. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 56, en donde la extensión de aminoácidos inicia con SEP.
58. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-2 y 5-33, en donde la extensión de aminoácidos comprende una o más de las siguientes secuencias
- 10 SPAGSP (SEQ ID NO:4), TSESAT (SEQ ID NO:5), TSTEPE (SEQ ID NO:6), SEPATS (SEQ ID NO:7), TSTEEG (SEQ ID NO:8), PESGPG (SEQ ID NO:9),
- SGSAPG (SEQ ID NO:10), GSETPG (SEQ ID NO:11),
- SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG (SEQ ID NO:12),
- SEPATSGSETPGTSESATPESGPG (SEQ ID NO:13),
- SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPG (SEQ ID NO:14),
- 15 SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSP (SEQ ID NO:15),
- SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSP (SEQ ID NO:16),
- SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGSPAGSP (SEQ ID NO:17),
- SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESAT (SEQ ID NO:18),
- SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESAT (SEQ ID NO:19),
- 20 SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGTSESAT (SEQ ID NO:20),
- SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPE (SEQ ID NO:21),
- SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPE (SEQ ID NO:22),
- SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGTSTEPE (SEQ ID NO:23),
- SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSEPATS (SEQ ID NO:24),
- 25 SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATS (SEQ ID NO:25),
- SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGSEPATS (SEQ ID NO:26),
- SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEEG (SEQ ID NO:27),
- SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEEG (SEQ ID NO:28),
- SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGTSTEEG (SEQ ID NO:29),
- 30 SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGPESGPG (SEQ ID NO:30),
- SEPATSGSETPGTSESATPESGPGPESGPG (SEQ ID NO:31),
- SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGPESGPG (SEQ ID NO:32),
- SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSGSAPG (SEQ ID NO:33),
- SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSGSAPG (SEQ ID NO:34),
- 35 SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGSGSAPG (SEQ ID NO:35),
- SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGGSETPG (SEQ ID NO:36),
- SEPATSGSETPGTSESATPESGPGGSETPG (SEQ ID NO:37),
- SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGGSETPG (SEQ ID NO:38),
- SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS (SEQ ID NO:70),
- 40 SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG (SEQ ID NO:71),

SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG (SEQ ID NO:39),
 SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG (SEQ ID NO:40),
 SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPESGSAPG (SEQ ID NO:41),
 SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEG (SEQ ID NO:42),
 5 SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG (SEQ ID NO:43),
 SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPESGSAPG (SEQ ID NO:44),
 SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG (SEQ ID NO:45),
 SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGSPAGSPTSTEEG (SEQ ID NO:46),
 SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGTSESATPESGPG (SEQ ID NO:47),
 10 SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGTSTEPESGSAPG (SEQ ID NO:48),
 SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGSEPATSGSETPG (SEQ ID NO:49),
 SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG (SEQ ID NO:50),
 SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG (SEQ ID NO:51),
 SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPESGSAPG (SEQ ID NO:52),
 15 SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPG (SEQ ID NO:53),
 GEPS (SEQ ID NO:118), GPSE (SEQ ID NO:119), GPES (SEQ ID NO:120), GSPE (SEQ
 ID NO:121), GSEP (SEQ ID NO:122), GEPQ (SEQ ID NO:123), GEQP (SEQ ID
 NO:124), GPEQ (SEQ ID NO:125), GPQE (SEQ ID NO:126), GQEP (SEQ ID NO:127) o
 GQPE (SEQ ID NO:128), PEDEETPEQE (SEQ ID NO:129), PDEGTEEETE (SEQ ID
 20 NO:130), PAAEEEDDPD (SEQ ID NO:131), AEPDEDPQSED (SEQ ID NO:132),
 AEPDEDPQSE (SEQ ID NO:133), AEPEEQEED (SEQ ID NO:134), AEPEEQEE (SEQ
 ID NO:135), GGGG (SEQ ID NO:136), GSGS (SEQ ID NO:137), GGSS (SEQ ID
 NO:138) y SSSG (SEQ ID NO:139).

59. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-2 y 5-33, en
 25 donde la extensión de aminoácidos comprende una o más de las siguientes secuencias
 SPAGSP, TSESAT, TSTEPE, SEPATS, TSTEEG, PESGPG, SGSAPG, GSETPG,
 SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG, SEPATSGSETPGTSESATPESGPG,
 SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPG, SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSP,
 SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSP,
 30 SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGSPAGSP,
 SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESAT,
 SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESAT,
 SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGTSESAT,
 SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPE,
 35 SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPE,
 SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGTSTEPE,
 SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSEPATS,
 SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATS,
 SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGSEPATS,
 40 SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEEG,

SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEEG,
 SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGTSTEEG
 SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGPESGPG,
 SEPATSGSETPGTSESATPESGPGPESGPG,
 5 SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGPESGPG,
 SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSGSAPG,
 SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSGSAPG,
 SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGSGSAPG,
 SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGGSETPG,
 10 SEPATSGSETPGTSESATPESGPGGSETPG,
 SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGGSETPG
 SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG,
 SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG,
 SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPESGSAPG,
 15 SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEG,
 SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG,
 SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPESGSAPG,
 SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG,
 SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGSPAGSPTSTEEG,
 20 SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGTSESATPESGPG,
 SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGTSTEPESGSAPG,
 SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGSEPATSGSETPG,
 SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG,
 SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG,
 25 SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPESGSAPG,
 SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPG,
 GEPQ, GEPS, GGGS, GSGS, GGSS y SSSG.

60. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-2 y 5-33, en
 donde la extensión de aminoácidos comprende cualquier combinación de cualquiera de 2-6
 30 de las siguientes secuencias SPAGSP, TSESAT, TSTEPE, SEPATS, TSTEEG, PESGPG,
 SGSAPG, GSETPG, GEPQ, GEPS, GGGS, GSGS, GGSS y SSSG.

61. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-2 y 5-33, en
 donde la extensión de aminoácidos comprende una o más de las siguientes secuencias
 GEPS, GPSE, GPES, GSPE, GSEP, GEPQ, GEQP, GPEQ, GPQE, GQEP, GQPE, GGGS,
 35 GSGS, GGSS y SSSG.

62. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 61, en donde la extensión de
 aminoácidos comprende cualquier combinación de 2-9 de las siguientes secuencias GEPS,
 GPSE, GPES, GSPE, GSEP, GEPQ, GEQP, GPEQ, GPQE, GQEP, GQPE, GGGS, GSGS,
 GGSS y SSSG.

63. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-2 y 5-33, en donde la extensión de aminoácidos comprende una o más de las siguientes secuencias GEPS, GPSE, GPES, GSPE, GSEP, GGGs, GSGs, GGSS y SSSG.
64. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 63, en donde la extensión de aminoácidos comprende cualquier combinación de 2-9 de las siguientes secuencias GEPS, GPSE, GPES, GSPE, GSEP, GGGs, GSGs, GGSS y SSSG.
65. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 64, en donde la extensión de aminoácidos comprende una o más de las siguientes secuencias GEPSGEPSGEPSGEPSGEPS (SEQ ID NO:140), GPSEGPSEGPSEGPSEGPSE (SEQ ID NO:141), GPESGPESGPESGPESGPES (SEQ ID NO:142), GSPEGSPEGSPEGSPEGSPE (SEQ ID NO:143) y GSEPGSEPGSEPGSEPGSEP (SEQ ID NO:144).
66. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-2 y 5-33, en donde la extensión de aminoácidos comprende una o más de las siguientes secuencias GEPQ, GEQP, GPEQ, GPQE, GQEP, GQPE, GGGs, GSGs, GGSS y SSSG.
67. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 66, en donde la extensión de aminoácidos comprende cualquier combinación de 2-9 de las siguientes secuencias GEPQ, GEQP, GPEQ, GPQE, GQEP, GQPE, GGGs, GSGs, GGSS y SSSG.
68. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 67, en donde la extensión de aminoácidos comprende una o más de las siguientes secuencias GEPQGEPQGEPQGEPQGEPQ (SEQ ID NO:145), GEQPGEQPGEQPGEQPGEQP (SEQ ID NO:146), GPEQGPEQGPEQGPEQGPEQ (SEQ ID NO:147), GPQEGPQEGPQEGPQEGPQE (SEQ ID NO:148), GQEPGQEPGQEPGQEPGQEP (SEQ ID NO:149) y GQPEGQPEGQPEGQPEGQPE (SEQ ID NO:150).
69. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-2 y 5-33, en donde la extensión de aminoácidos comprende una o más de las siguientes secuencias PEDEETPEQE, PDEGTEEETE, PAAEEEDDPD, AEPDEDPQSED, AEPDEDPQSE, AEPEEQEED, y AEPEEQEE, GGGs, GSGs, GGSS y SSSG.
70. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-2 y 5-33, en donde la extensión de aminoácidos comprende cualquier combinación de dos a tres de las siguientes secuencias PEDEETPEQE, PDEGTEEETE, PAAEEEDDPD, AEPDEDPQSED, AEPDEDPQSE, AEPEEQEED, AEPEEQEE y AEEAEEAEEAEEAEE.
71. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-2 y 5-33, en donde la extensión de aminoácidos comprende una o más de las siguientes secuencias SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:162, SEQ ID NO:181, SEQ ID NO:182, SEQ ID NO:183, SEQ ID NO:184, SEQ ID NO:185, SEQ ID NO:186, SEQ ID NO:187, SEQ ID NO:188, SEQ ID NO:189, SEQ ID NO:190, SEQ ID NO:191, SEQ ID NO:192, SEQ ID NO:193, SEQ ID NO:194 y SEQ ID NO:195.

72. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la extensión de aminoácidos comprende 1-3 residuos de aminoácidos de alanina en el N-terminal.
73. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en
5 donde la extensión de aminoácidos comprende 1-4 residuos de aminoácidos de glicina y serina en el C-terminal.
74. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la extensión de aminoácidos comprende una secuencia de (Gly-Ser)_n o de (Ser-Gly)_n en el C-terminal, en donde n es un número entero entre 1-8.
- 10 75. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la extensión de aminoácidos comprende GGGS, GSGS, GGSS o SSSG en el C-terminal.
76. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde el polipéptido MIC-1 muestra al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 15 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con respecto a MIC-1 de tipo silvestre (SEQ ID NO:1).
77. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 70, en donde el polipéptido MIC-1 muestra al menos 95 % de identidad de secuencia con respecto a MIC-1 de tipo silvestre (SEQ ID NO:1).
- 20 78. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-70, en donde el polipéptido MIC-1 tiene un máximo de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 modificaciones de aminoácidos en comparación con MIC-1 de SEQ ID NO:1.
79. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-72, en donde el polipéptido MIC-1 tiene un máximo de 7, 6, 5, 4, 3 o 2 modificaciones de aminoácidos 25 en comparación con MIC-1 de SEQ ID NO:1.
80. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes en donde el polipéptido MIC-1 comprende una o más de las siguientes sustituciones P11E, H18E, R21E, A30E, M43L, M43E, A47E, R53E, A54E, M57E, M57L, H66E, R67E, L68E, K69E, A75E, A81E, P85E, M86F, M86L, Q90E, T92E, L105E, K107E, K69R, 30 K107R y K91R en comparación con MIC-1 de tipo silvestre (SEQ ID NO:1).
81. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes en donde el polipéptido MIC-1 comprende una o más de las siguientes sustituciones R2S, R2A, R2E, N3S, N3E, N3A, N3T, N3P, N3G, N3V, N3H, N3Y o N3Q en comparación con MIC-1 de SEQ ID NO:1.
- 35 82. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes en donde el polipéptido MIC-1 comprende una delección de N3 (des-N3) en comparación con MIC-1 de SEQ ID NO:1.
83. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes en donde el polipéptido MIC-1 comprende una sustitución M57E o M57L en comparación con 40 MIC-1 de SEQ ID NO:1.

84. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes en donde el polipéptido MIC-1 comprende una sustitución M86L o M86F en comparación con MIC-1 de SEQ ID NO:1.
85. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 84 en donde el polipéptido MIC-1 comprende, además, una sustitución Q90E o T92E en comparación con MIC-1 de SEQ ID NO:1.
86. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes en donde el polipéptido MIC-1 comprende una sustitución H66E en comparación con MIC-1 de SEQ ID NO:1.
87. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes en donde el polipéptido MIC-1 comprende una sustitución R67E en comparación con MIC-1 de SEQ ID NO:1.
88. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes en donde el polipéptido MIC-1 comprende una delección de los primeros 3, 4, 5 o 6 residuos en comparación con MIC-1 de SEQ ID NO:1.
89. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes en donde el polipéptido MIC-1 comprende una delección de los primeros 3 residuos en comparación con MIC-1 de SEQ ID NO:1.
90. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-75, en donde el polipéptido MIC-1 tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO:154 (M43L/des-N3).
91. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-75, en donde el polipéptido MIC-1 tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO:155 (M43L/ Δ1-3).
92. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-75, en donde el polipéptido MIC-1 tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO:156 (M57E/H66E/des-N3).
93. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-75, en donde el polipéptido MIC-1 tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO:157 (M57L/ Δ1-3).
94. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-75, en donde el polipéptido MIC-1 tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO:158 (M57L/des-N3).
95. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-75, en donde el polipéptido MIC-1 tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO:159 (M86L/ Δ1-3).
96. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-75, en donde el polipéptido MIC-1 tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO:160 (M86L/des-N3) o la SEQ ID NO:222 (M57L, M86L/des-N3).
97. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-75, en donde el polipéptido MIC-1 tiene una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO:1.

98. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde el polipéptido MIC-1 y la extensión de aminoácidos en el N-terminal juntos comprenden una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 164,

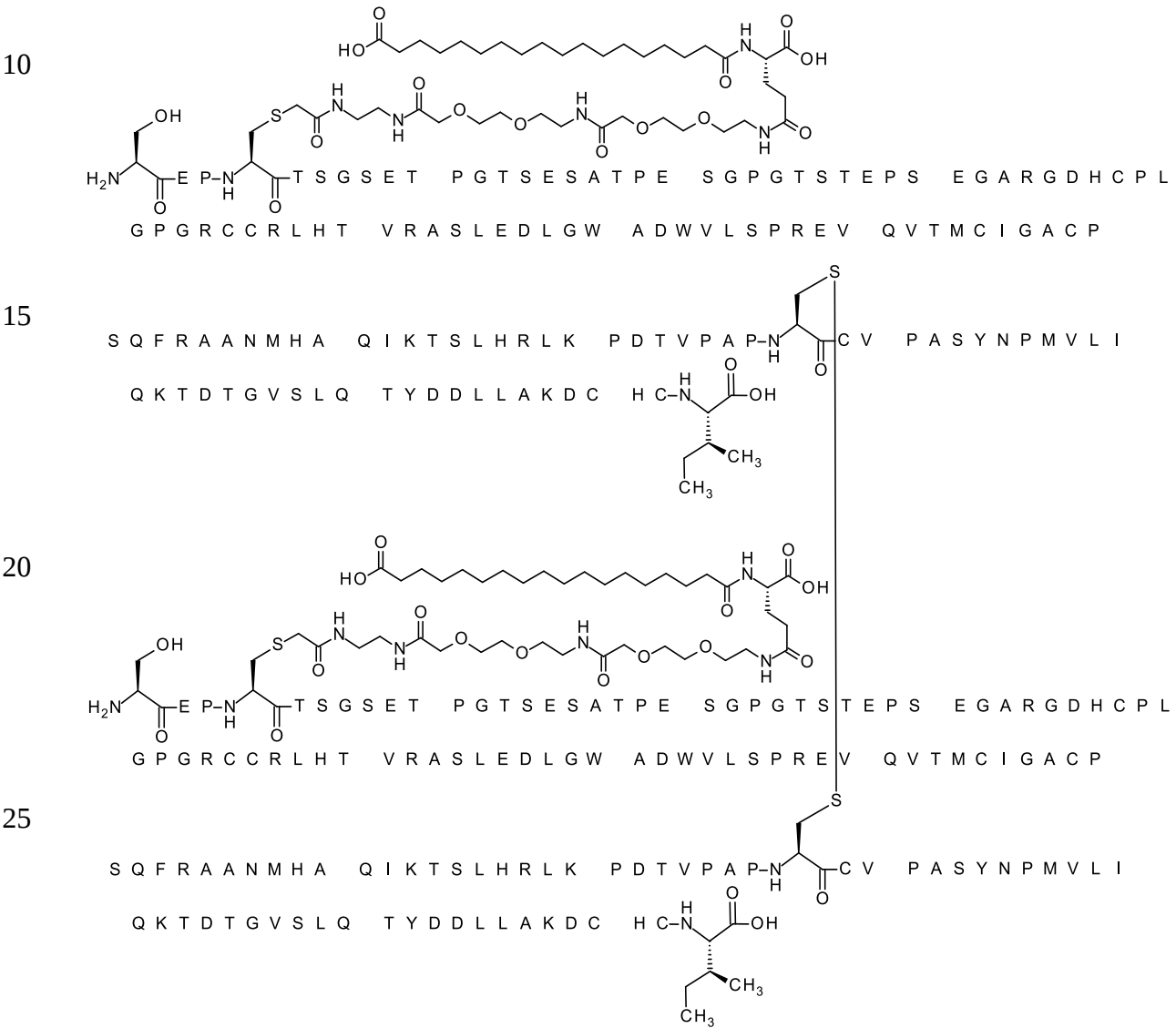
10 SEPCTSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGARGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDL
GWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPAS
YNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 288),
SEPATSCSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGARGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDL
GWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANLHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPAS
15 YNPLVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 289),
SEPCTSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGARGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDL
GWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANLHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPAS
YNPLVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 290),
SEPATCGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGARGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLED
20 LGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPA
SYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 291),
SEPATSGSETPGTSESACPESEGPGTSTEPSEGARGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLED
LGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANLHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPA
SYNPLVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 292),
25 SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPCEGARGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLED
LGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANLHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPA
SYNPLVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 293),
SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLS
PREVQVTMCIGACPSQFRAANEHAQIKTSLERLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQK
30 TDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 294),
SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGARGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLED
LGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANLHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPA
SYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 295),
SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSARGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLG
35 WADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANLHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASY
NPLVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 296),
SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGARGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLED
LGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPA
SYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 297),

SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSARGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLG
 WADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVAPCCVPASY
 NPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 298),
 SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSARGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLG
 5 WADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVAPCCVPASY
 NPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 299),
 SAPATSGSATPGSAPATSGSATPGGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVL
 SPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVAPCCVPASYNPMVLIQ
 KTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 300),
 10 SEPCTSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSARGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLG
 WADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVAPCCVPASY
 NPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 301),
 SEPATCGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSARGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLG
 WADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVAPCCVPASY
 15 NPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 302),
 SEPATSGCETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGARGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLED
 LGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANLHAQIKTSLHRLKPDTVAPCCVPA
 SYNPLVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 303),
 SEPATSGSECPGTSESATPESGPGTSTEPSEGARGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLED
 20 LGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANLHAQIKTSLHRLKPDTVAPCCVPA
 SYNPLVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 304),
 SEPATSGSETPCTSESATPESGPGTSTEPSEGARGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDL
 GWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANLHAQIKTSLHRLKPDTVAPCCVPAS
 YNPLVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 305),
 25 SEPATSGSETPGTCESATPESGPGTSTEPSEGARGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLED
 LGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANLHAQIKTSLHRLKPDTVAPCCVPA
 SYNPLVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 306),
 SEPATSGSETPGTSECATPESGPGTSTEPSEGARGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLED
 LGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANLHAQIKTSLHRLKPDTVAPCCVPA
 30 SYNPLVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 307),
 SEPATSGSETPGTSESATPECGPGTSTEPSEGARGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLED
 LGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANLHAQIKTSLHRLKPDTVAPCCVPA
 SYNPLVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 308),
 SEPATSGSETPGTSESATPESCPGTSTEPSEGARGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDL
 35 GWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANLHAQIKTSLHRLKPDTVAPCCVPAS
 YNPLVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 309),
 SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSCEPSEGARGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLED
 LGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANLHAQIKTSLHRLKPDTVAPCCVPA
 SYNPLVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 310),

EEAEADDDDKESGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCI
GACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQT
YDDLAKDCHCI (SEQ ID NO: 311) o

SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGARGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLED
5 LGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANLHAQIKTSLHRLRPDTVPAPCCVPA
SYNPLVLIQRDTGTGVSLQTYDDLARDCHCI (SEQ ID NO: 312).

99. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 1 con una de las siguientes
Fórmulas:

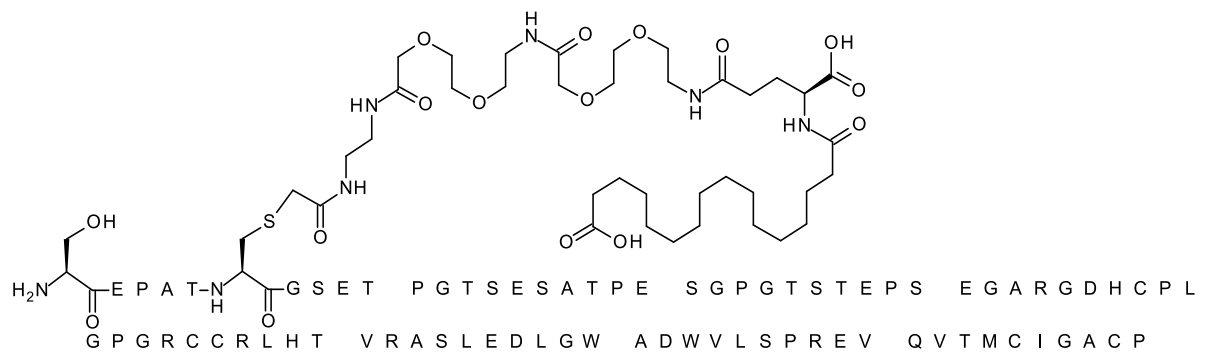


(Fórmula 01)

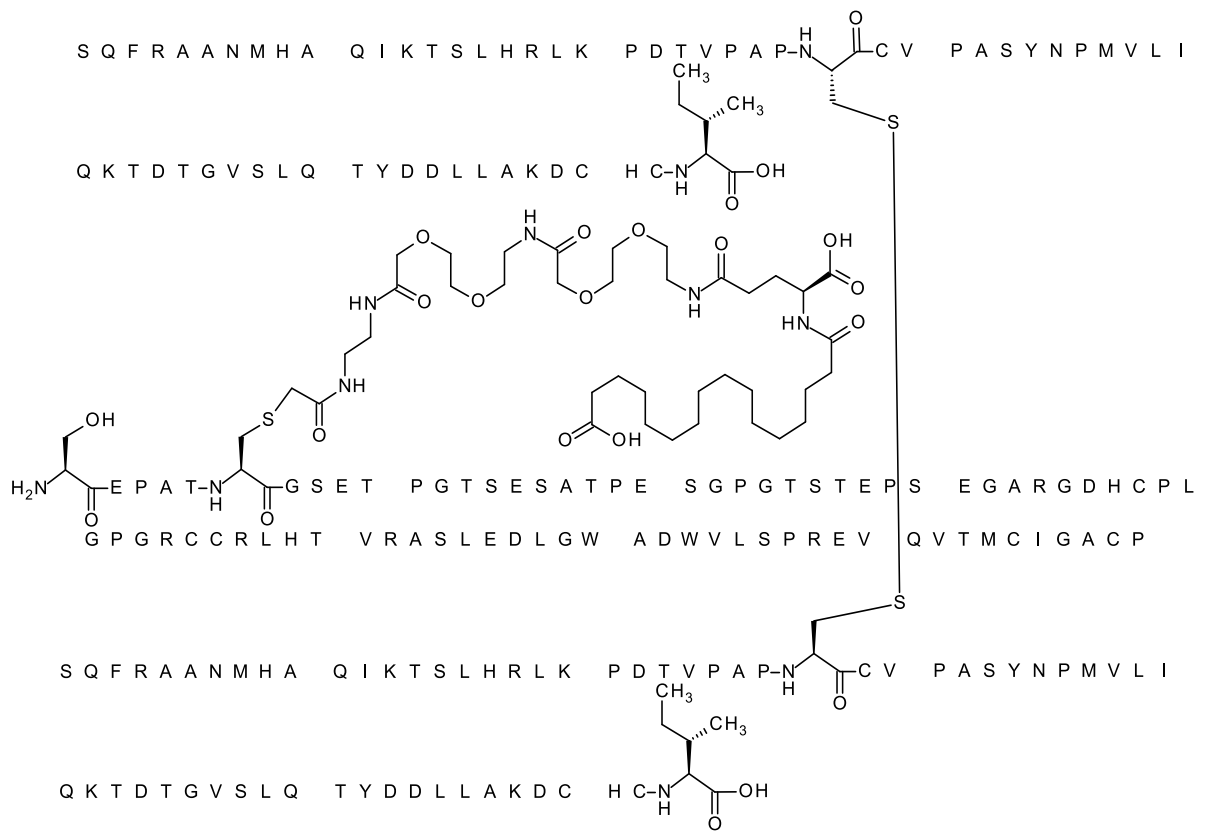
35

40

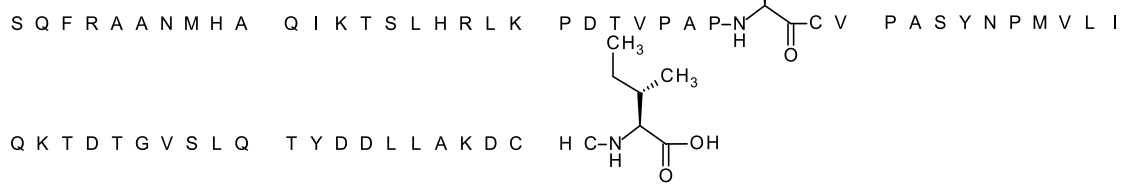
5



10



20



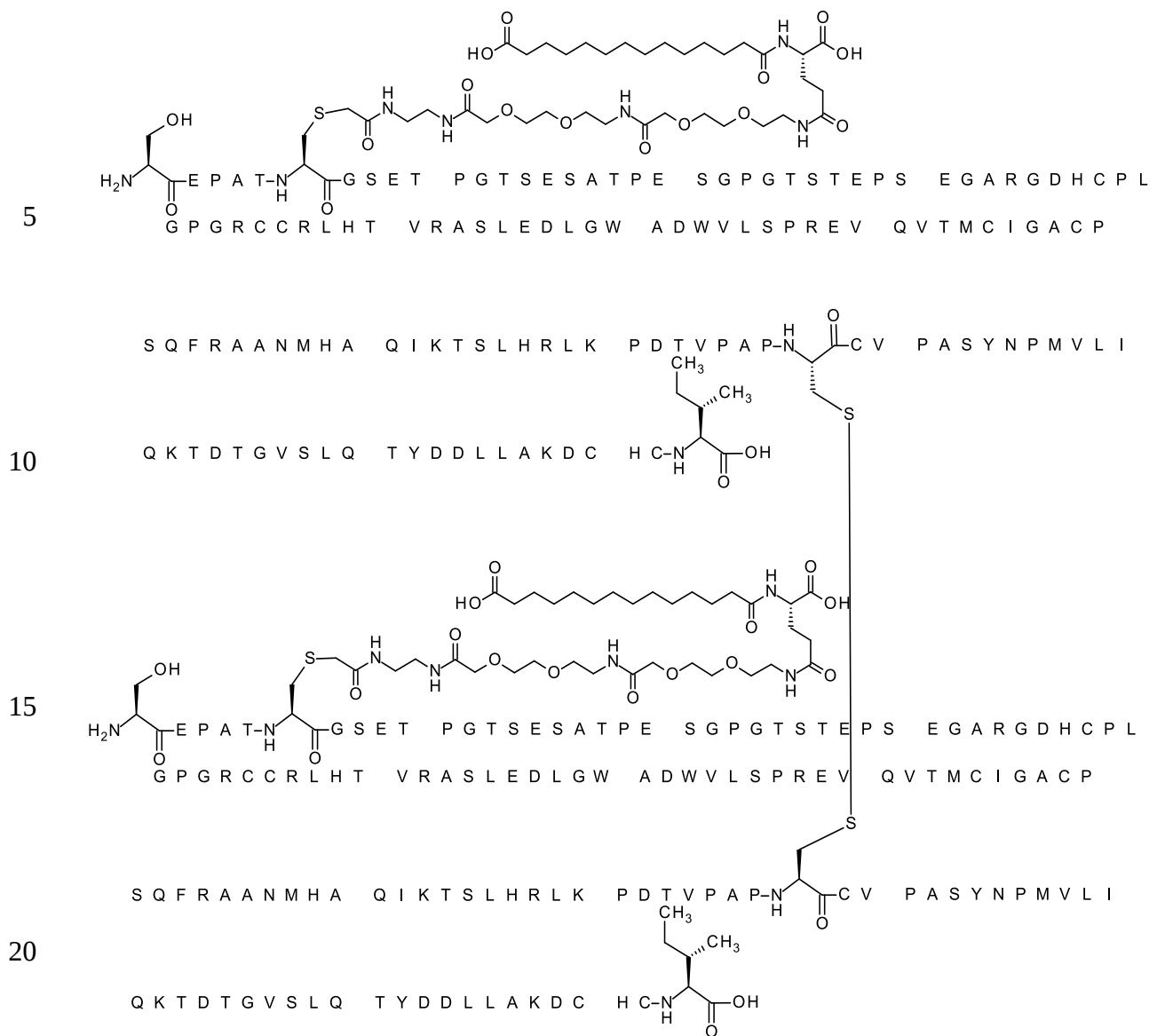
(Fórmula 03)

25

30

35

40



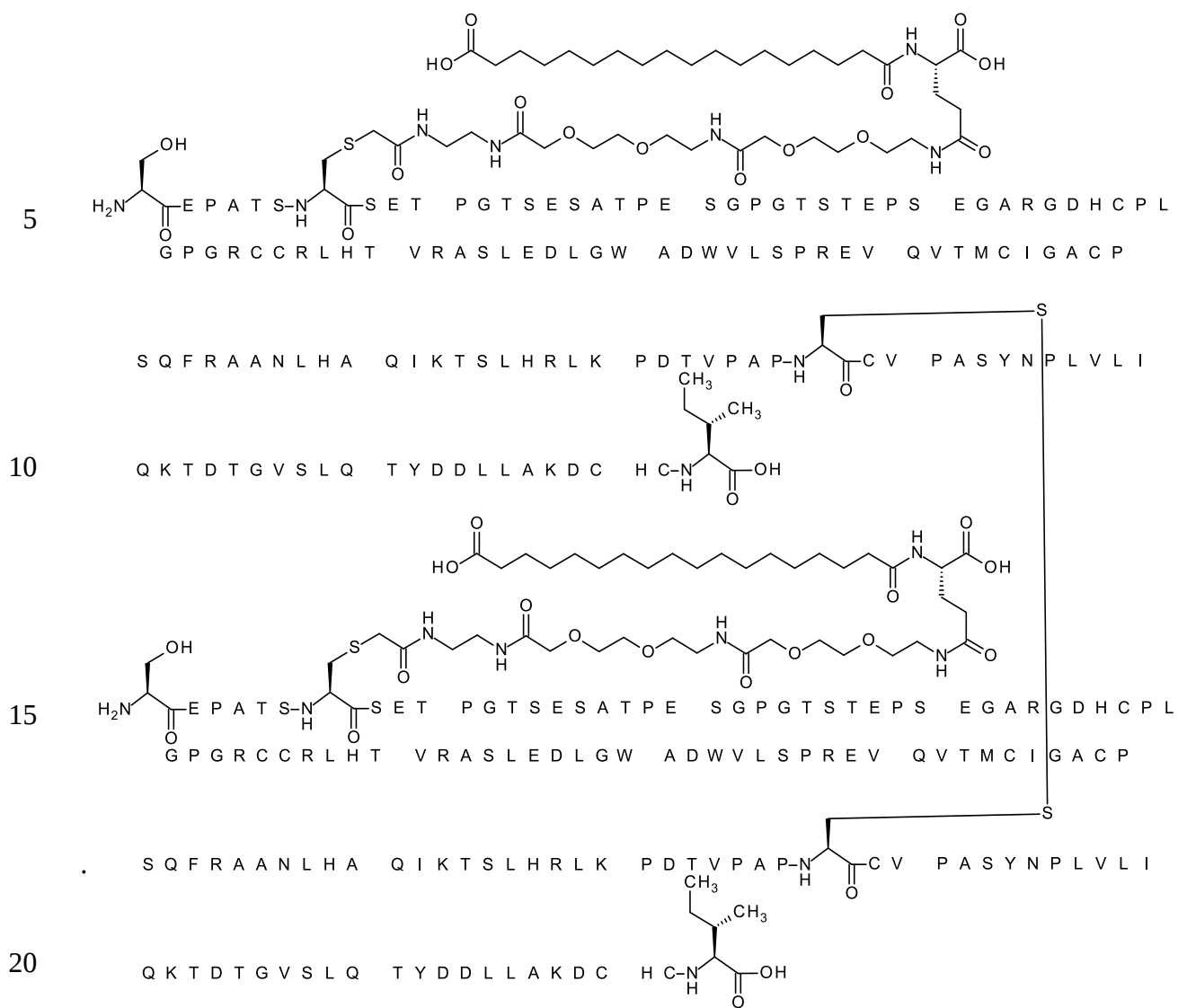
(Fórmula 04)

25

30

35

40



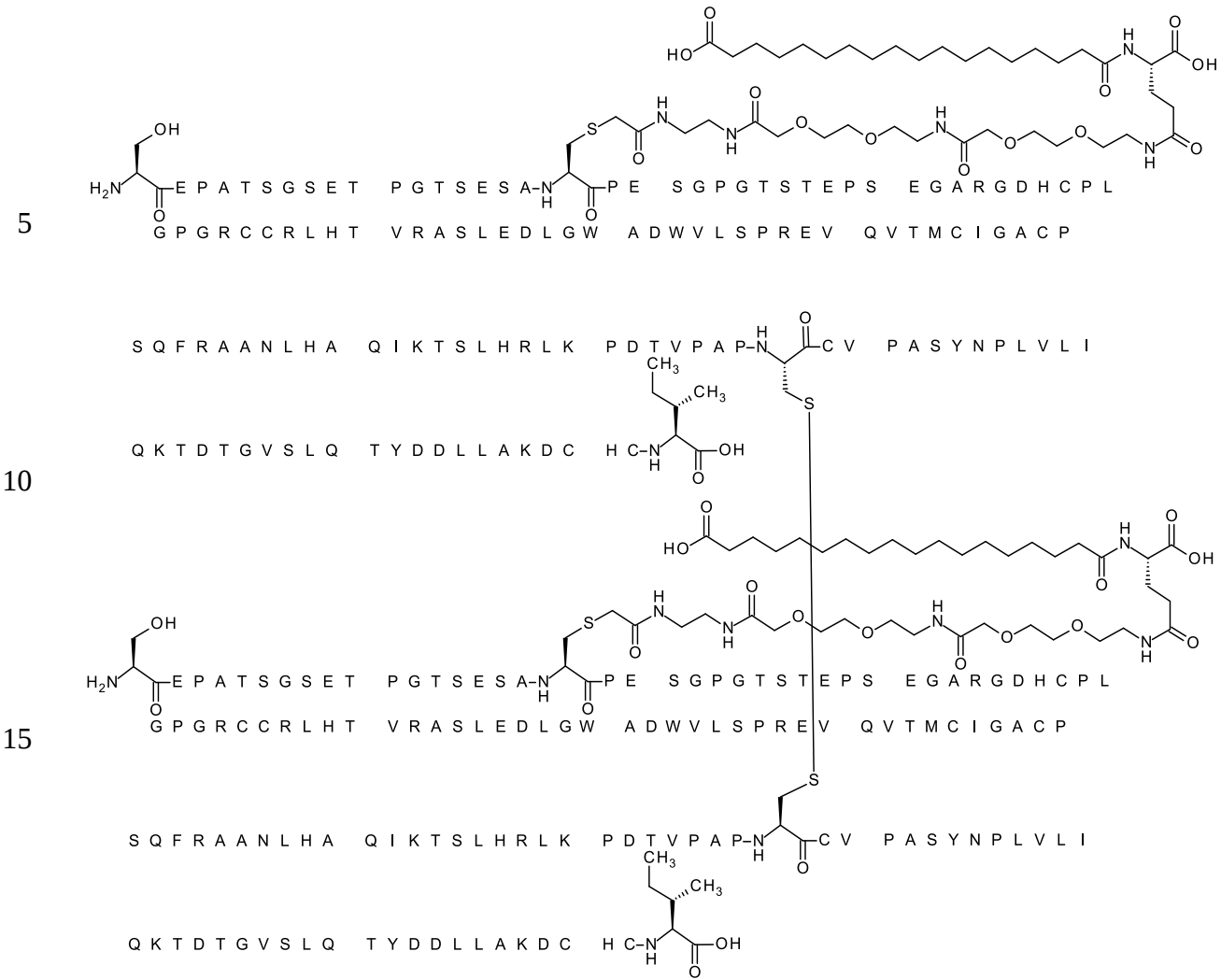
(Fórmula 05)

25

30

35

40



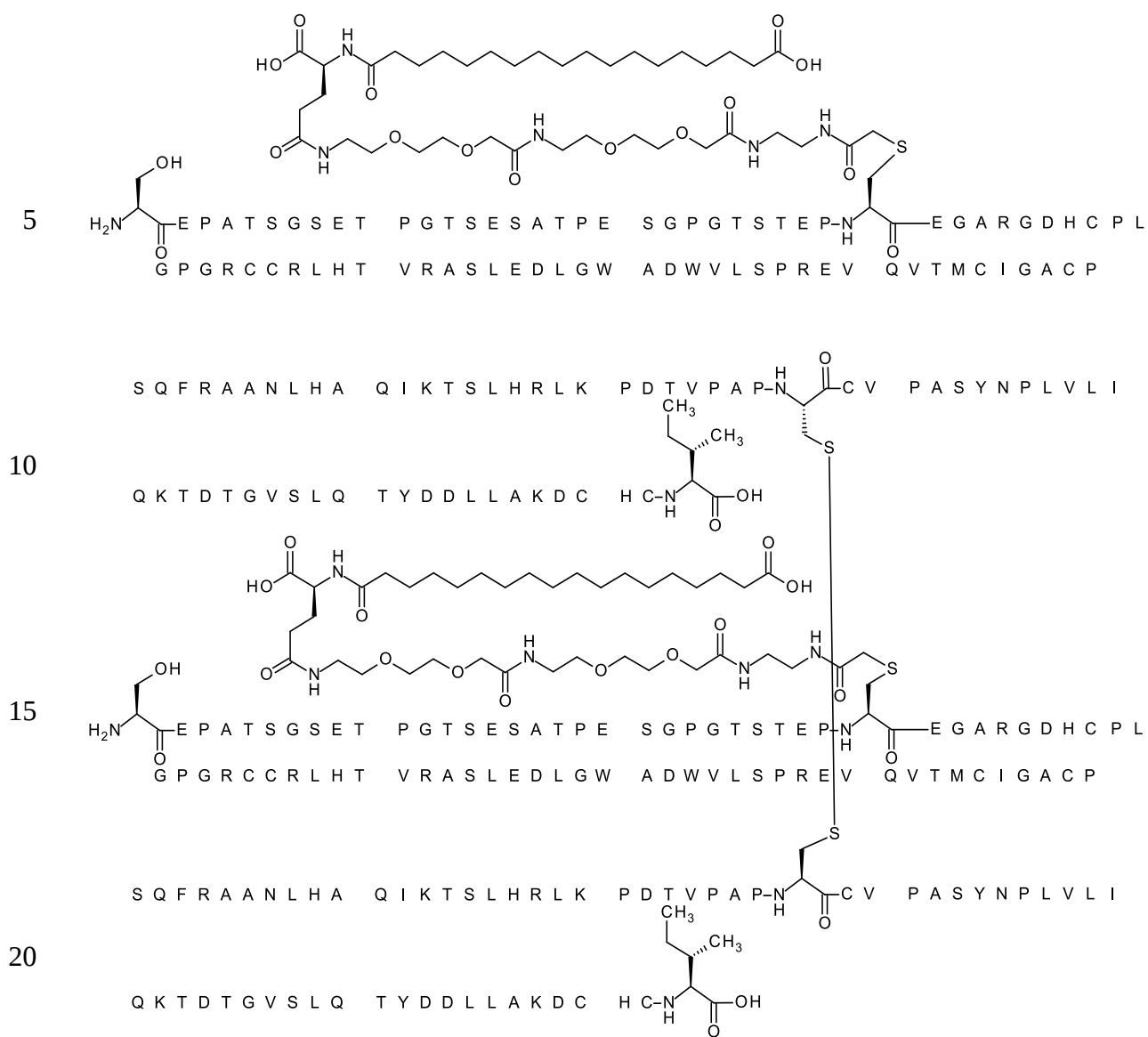
(Fórmula 07)

25

30

35

40



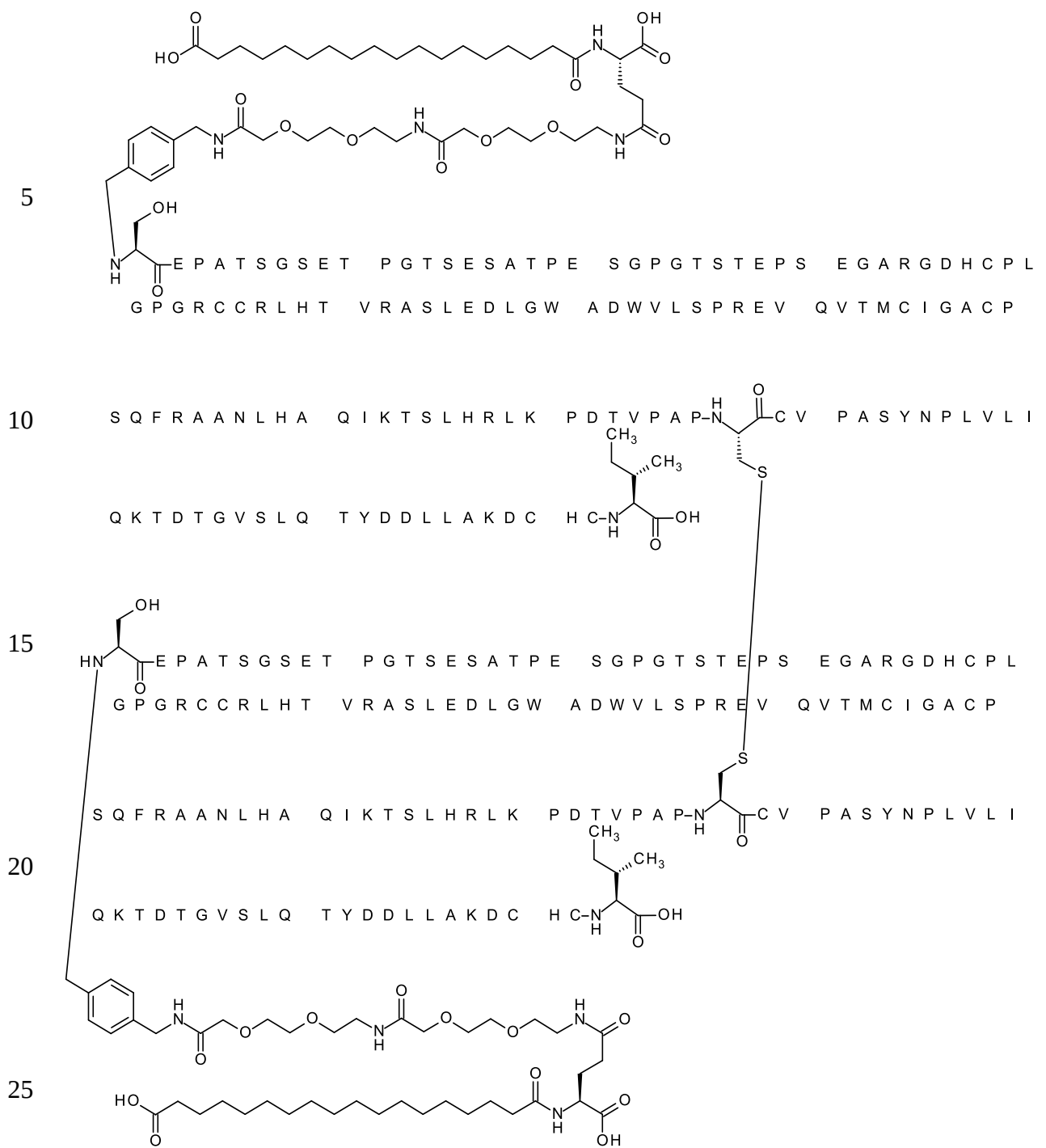
(Fórmula 08)

25

30

35

40

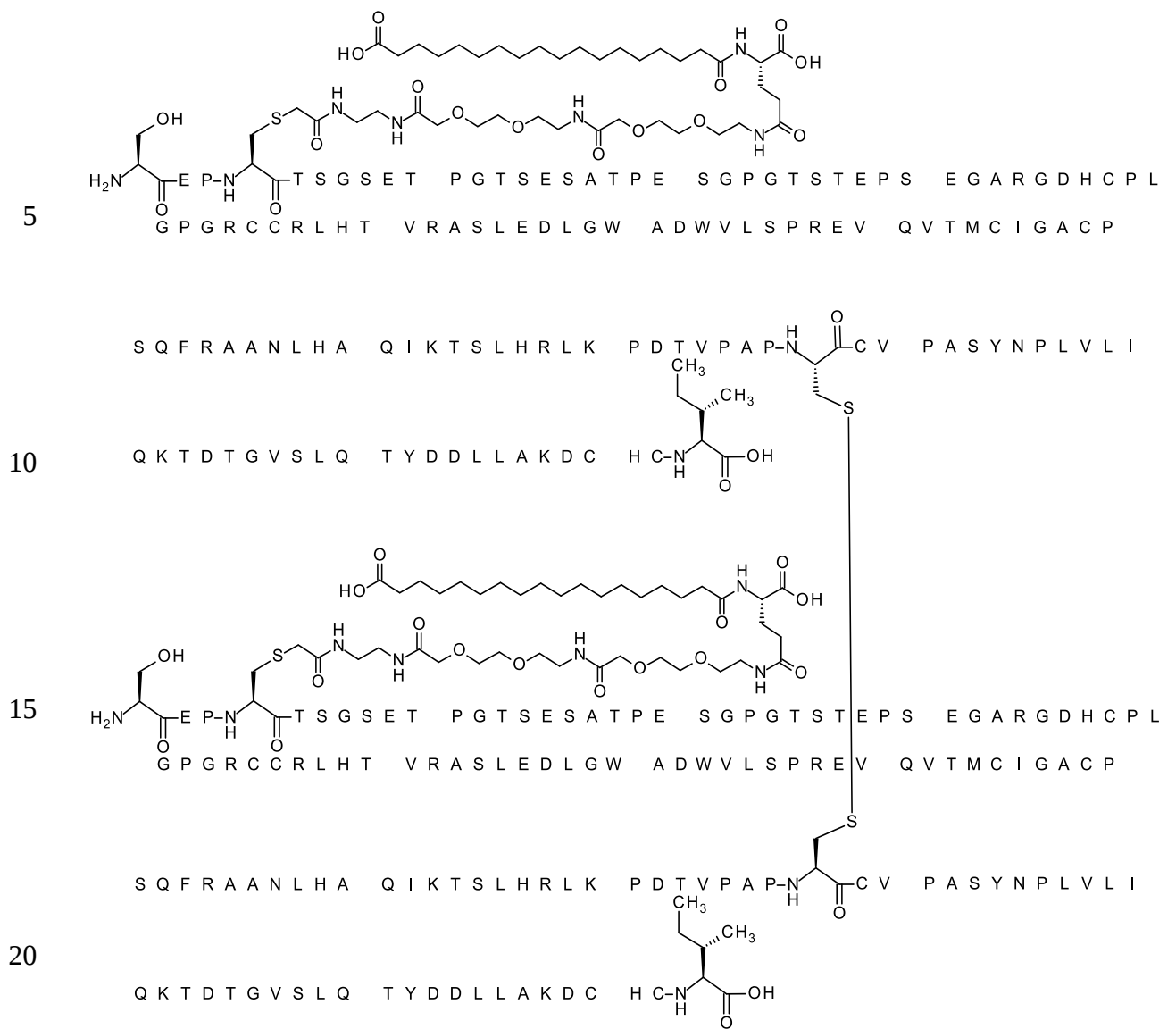


(Fórmula 10)

30

35

40



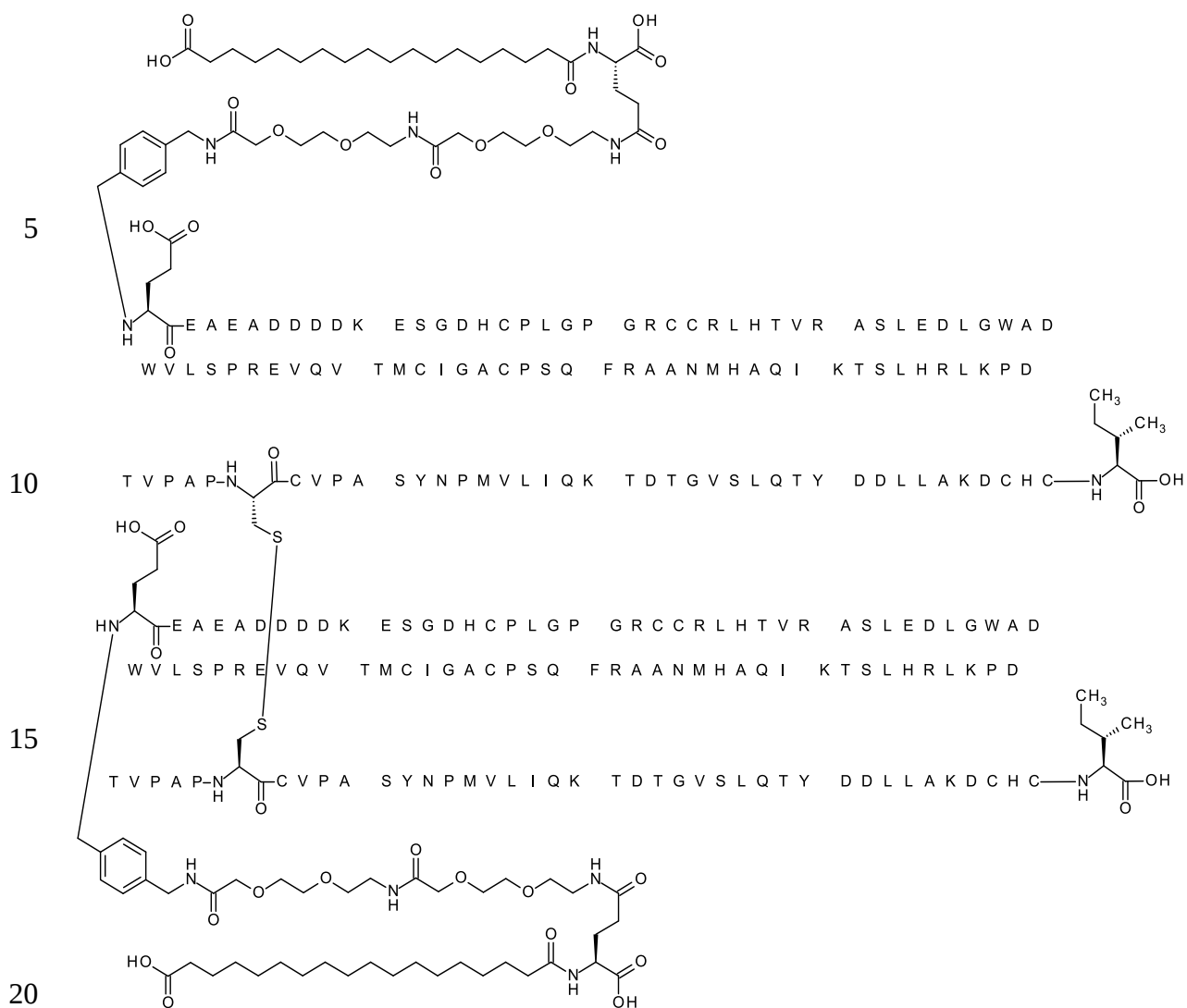
(Fórmula 11)

25

30

35

40



(Fórmula 12)

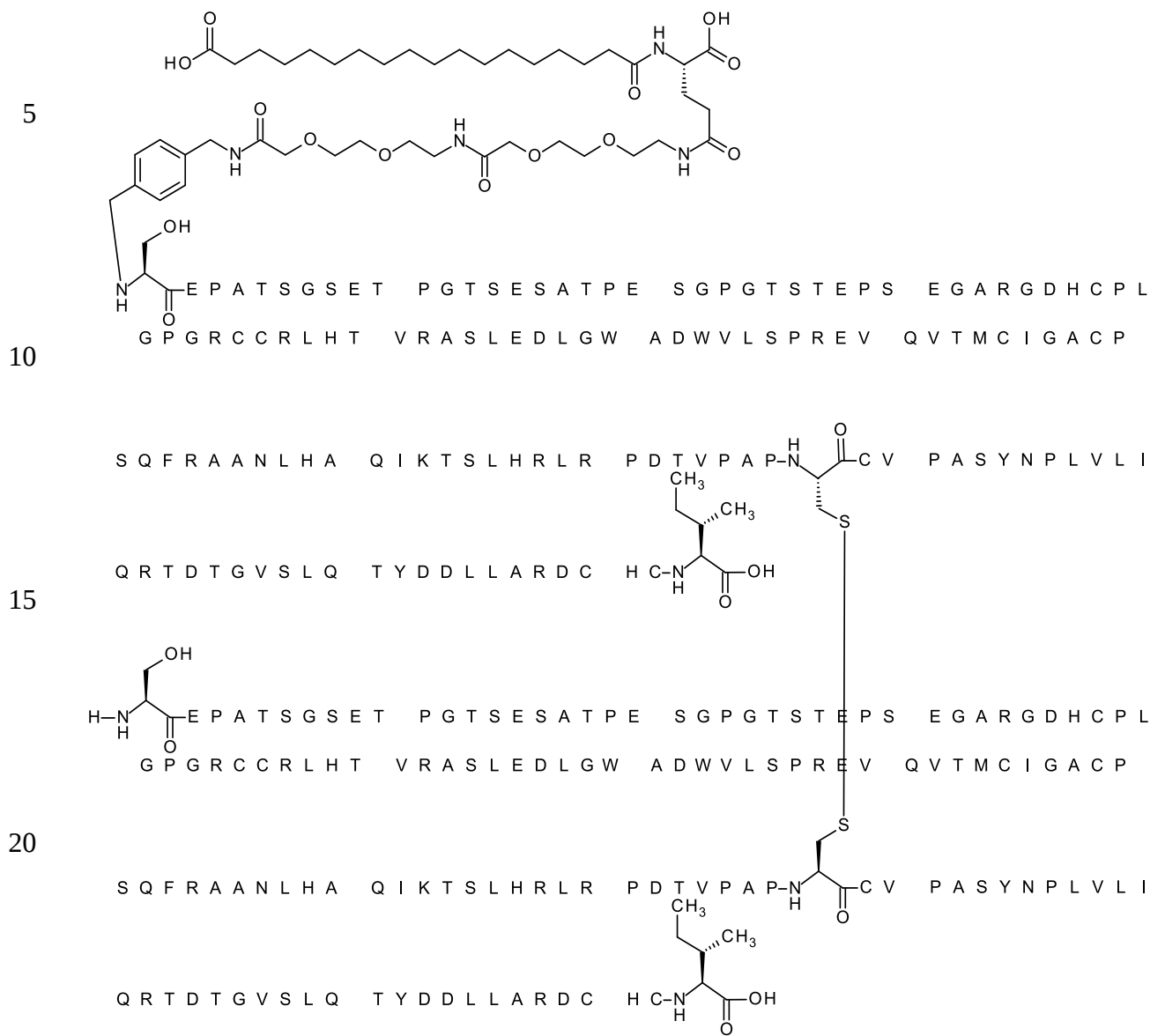
25

30

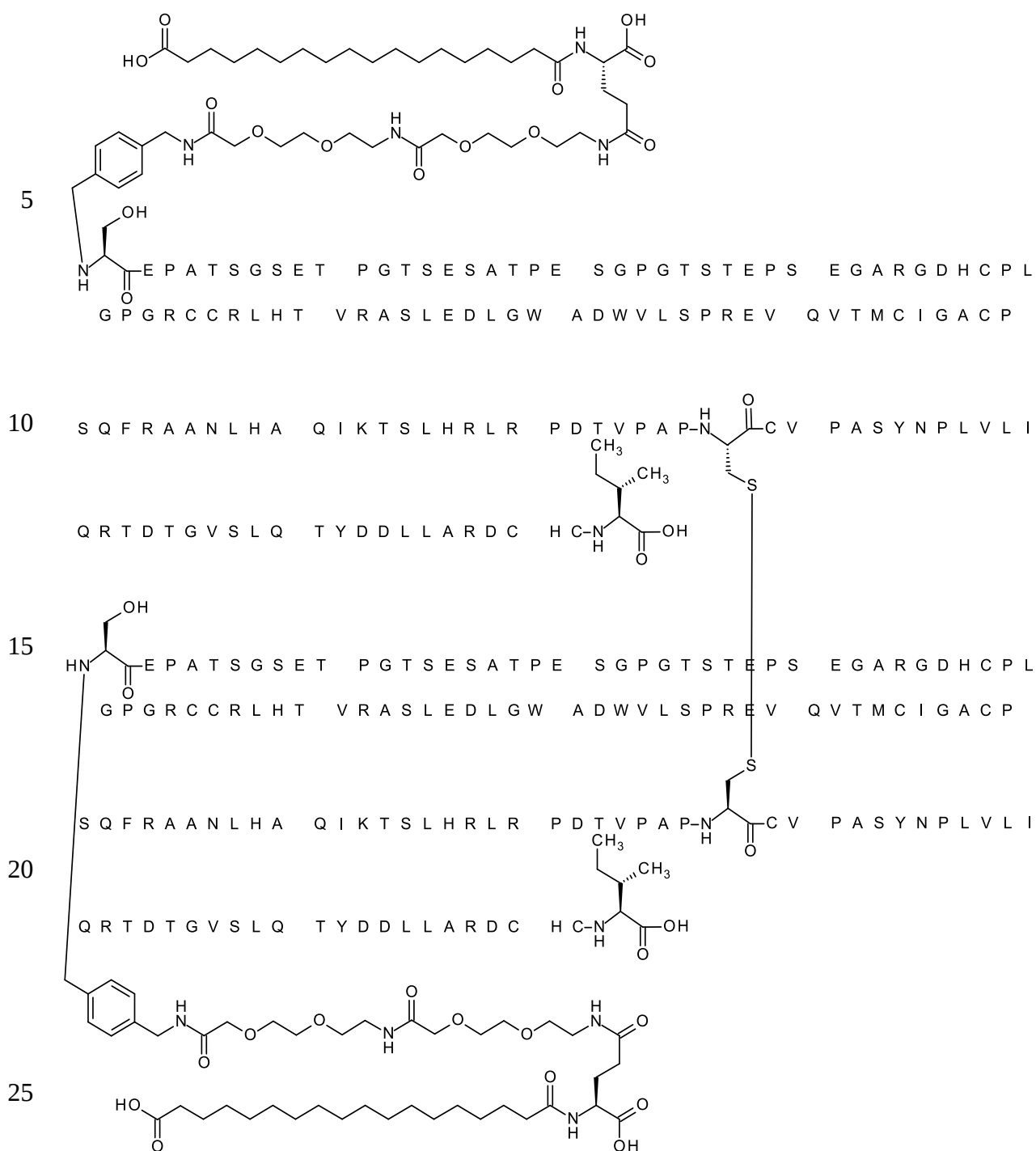
35

40

(Fórmula 14)



(Fórmula 15)

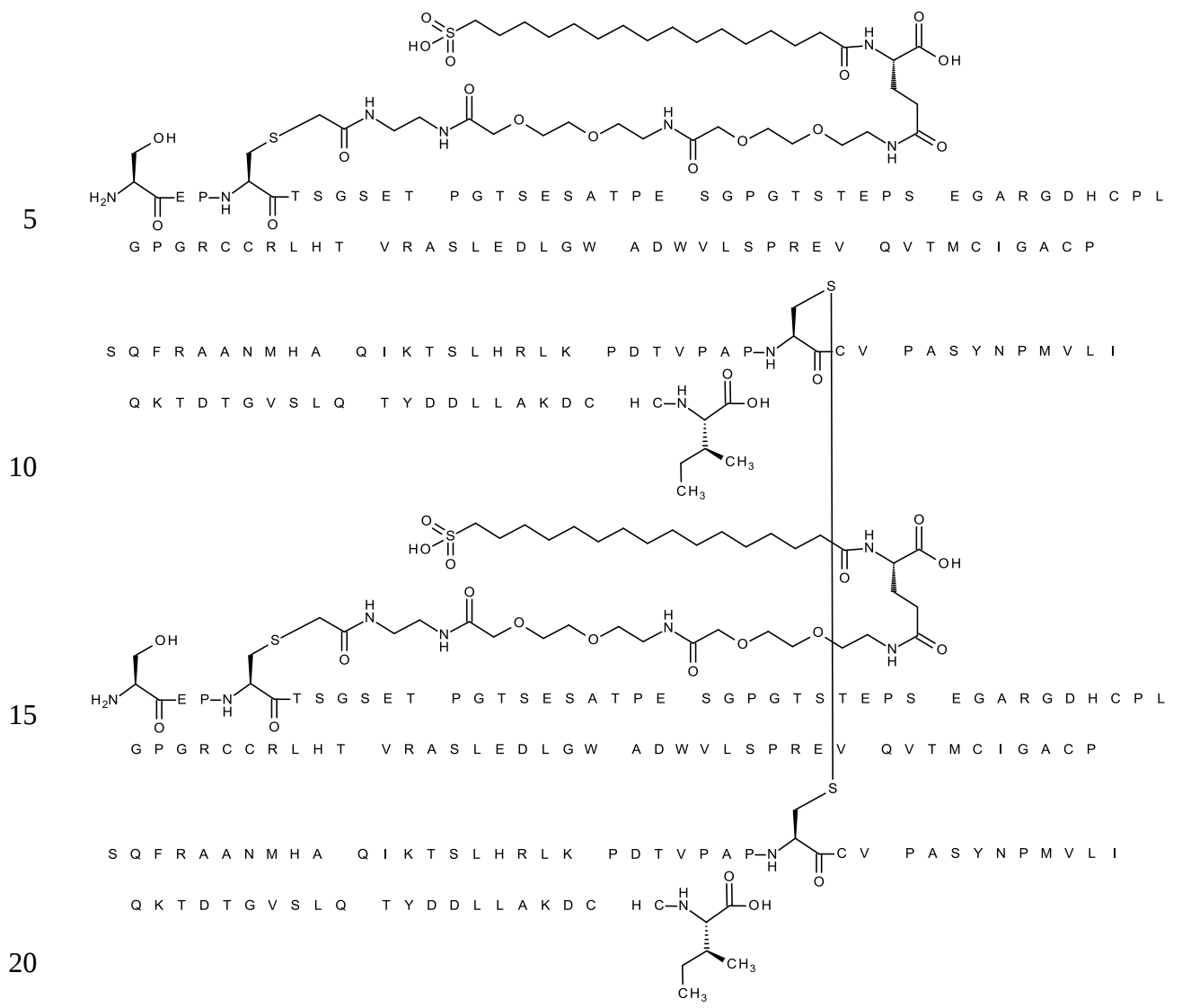


(Fórmula 16)

30

35

40



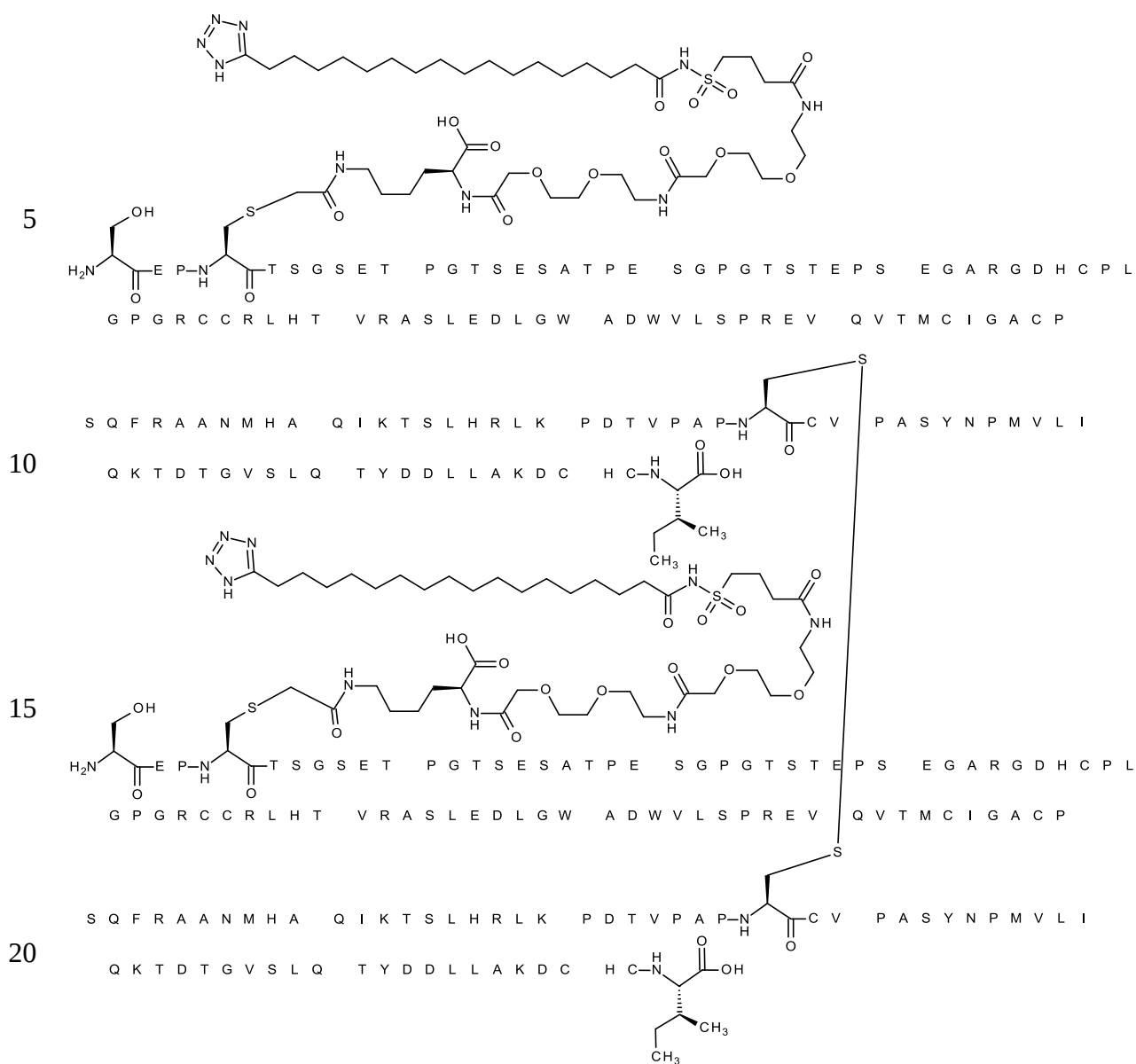
(Fórmula 17)

25

30

35

40



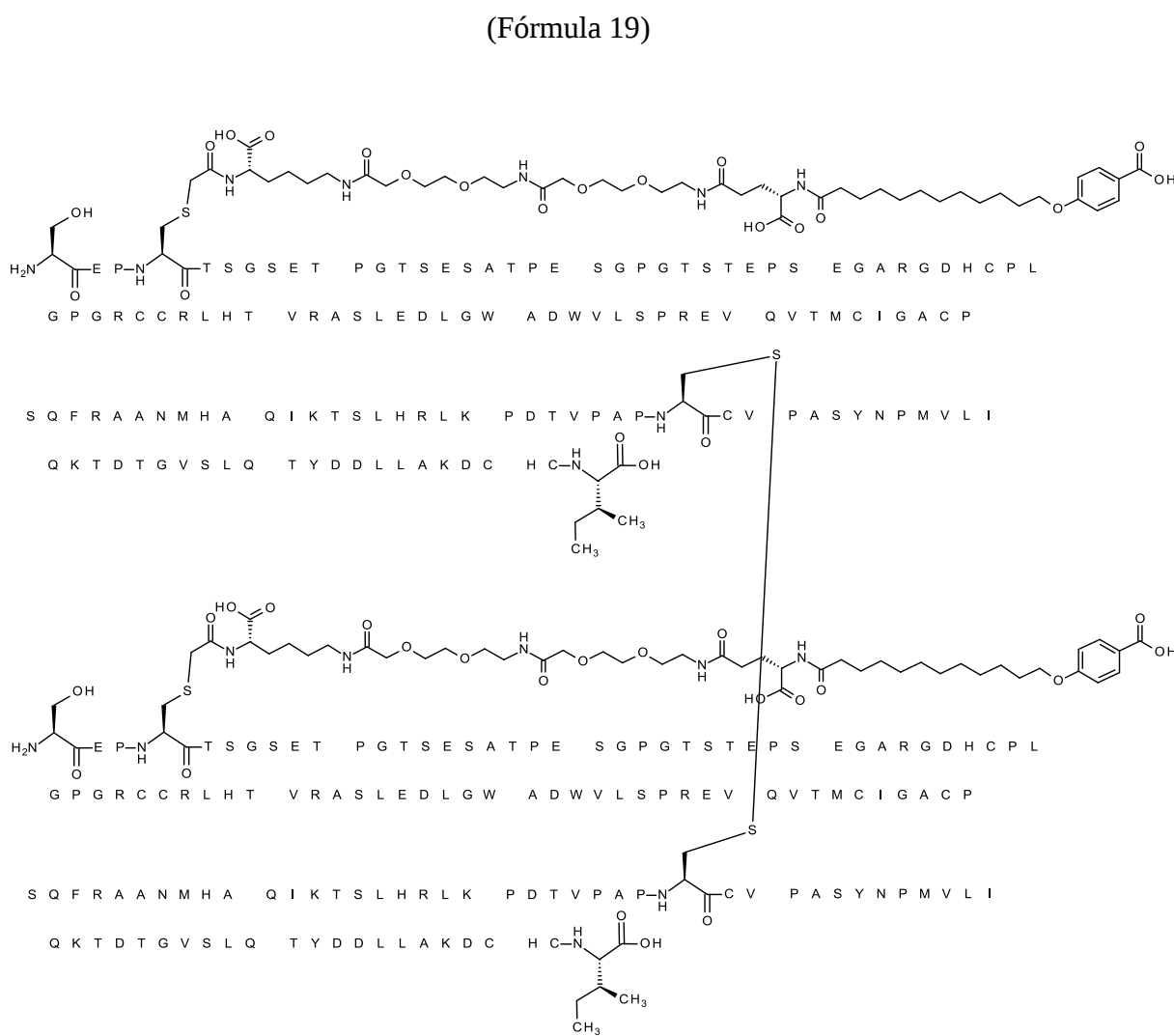
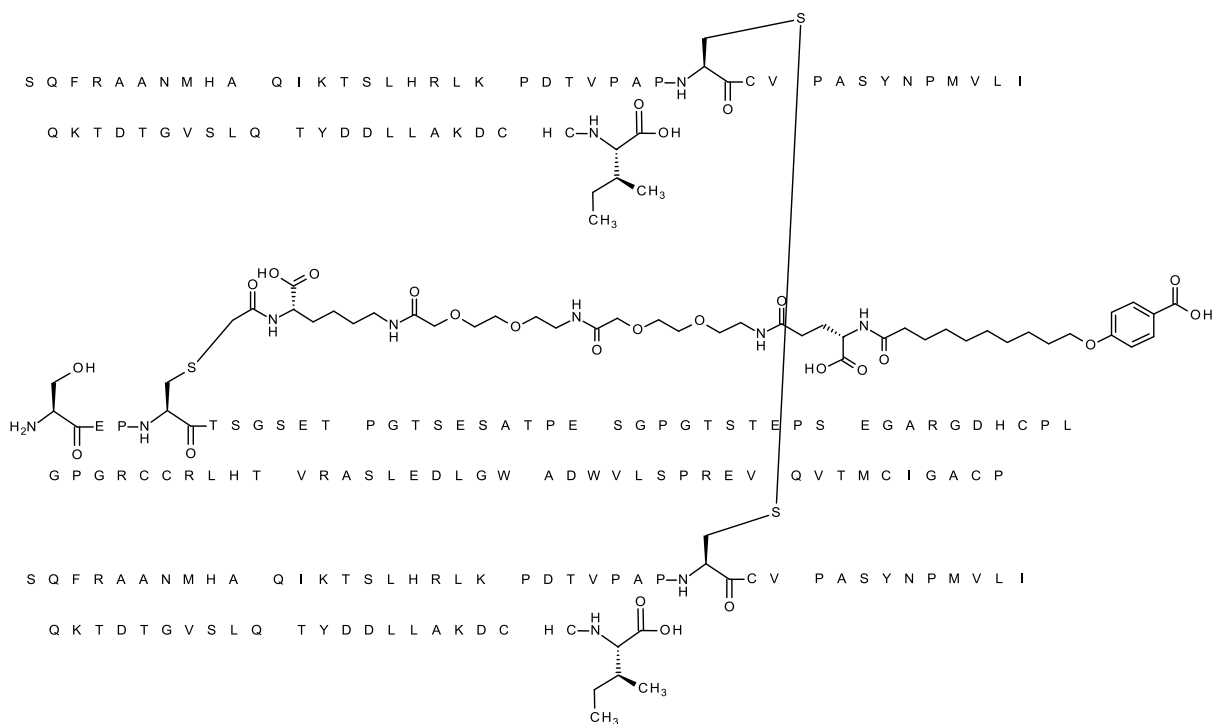
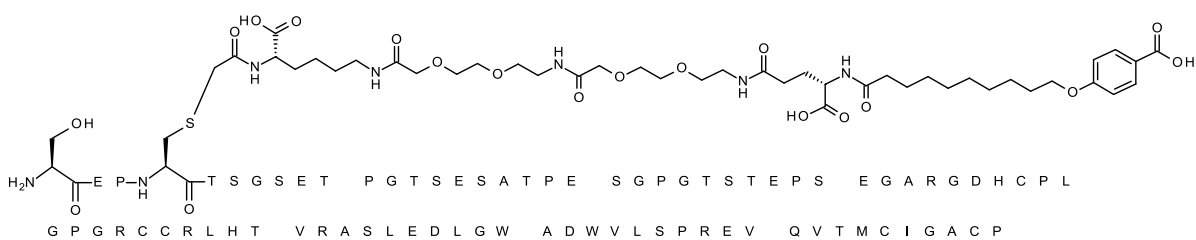
(Fórmula 18)

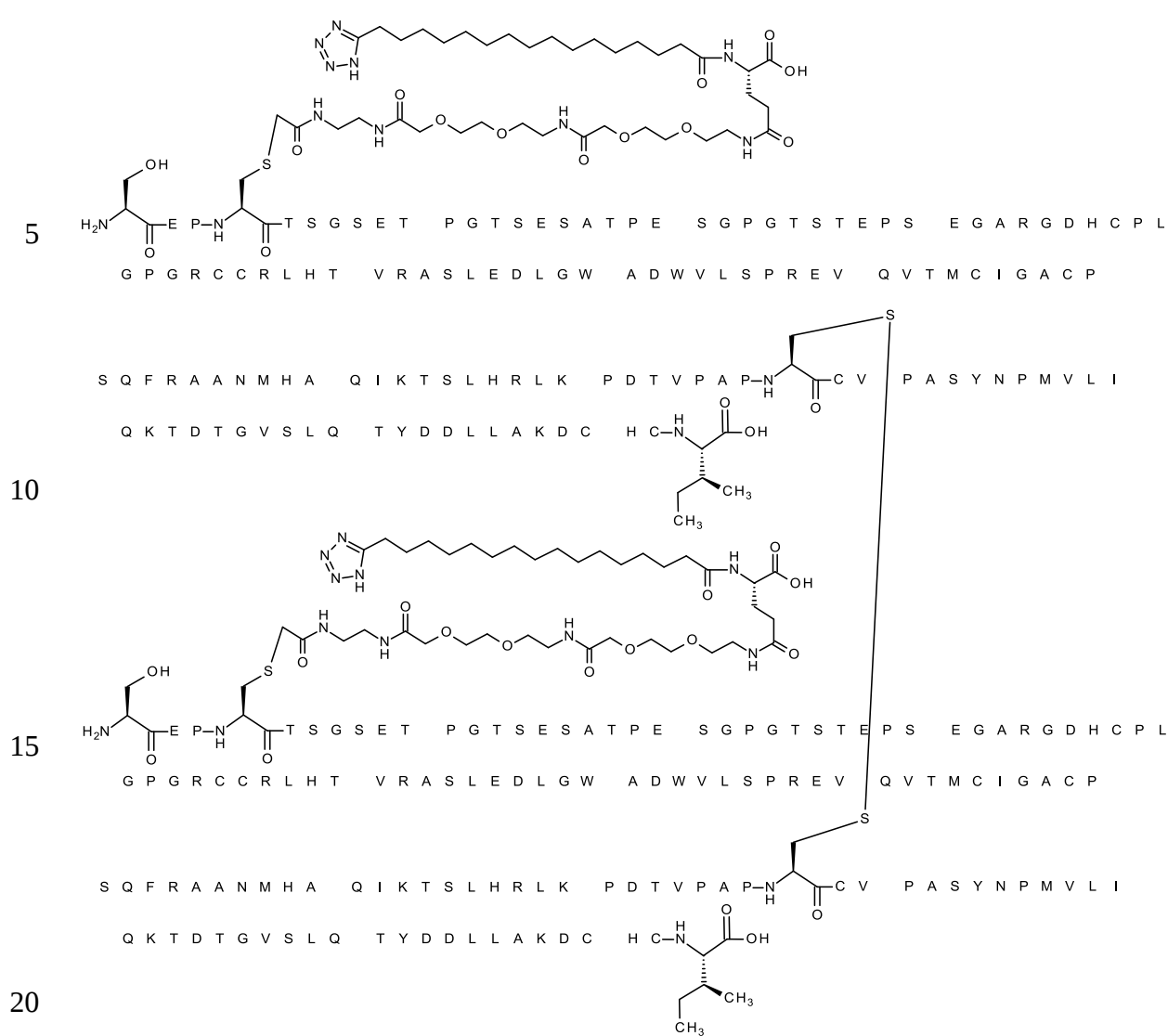
25

30

35

40



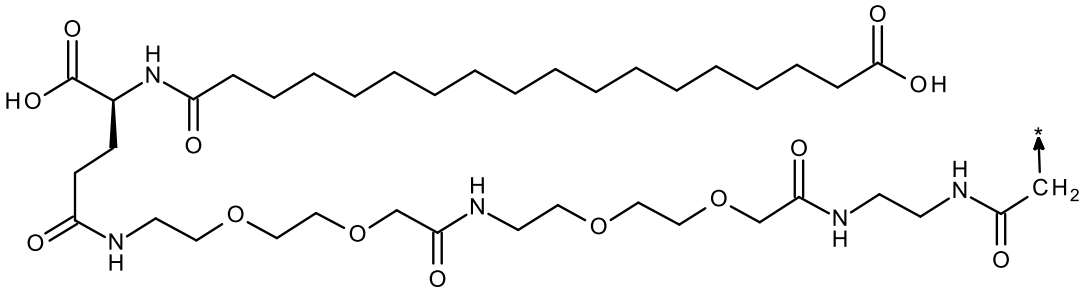


(Fórmula 21)

100. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes,
25 que muestra una semivida en plasma extendida en comparación con MIC-1 de SEQ ID NO:1.
101. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes,
que muestra una semivida en plasma mejorada en comparación con MIC-1 de SEQ ID NO:1 como se mide mediante la administración i.v. del compuesto a rata y se estima la
30 semivida terminal a partir de los cambios en la concentración plasmática del compuesto en el tiempo.
102. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes,
que muestra una potencia mantenida en comparación con MIC-1 de SEQ ID NO:1.
103. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes,
35 que muestra una eficacia mantenida en comparación con MIC-1 de SEQ ID NO:1 como se mide mediante la administración s.c. del compuesto a rata y la medición de los cambios en la ingesta diaria de alimentos.
104. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en
donde el polipéptido MIC-1 con una extensión de aminoácidos tiene una solubilidad
40 aceptable en comparación con MIC-1 de SEQ ID NO:1.

105. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-99, en donde el polipéptido MIC-1 con una extensión de aminoácidos tiene una solubilidad de 0.5, 1.0, 5.0, 10, 30 o 50 mg/ml como se mide a pH 8.0 en un sistema de tampón Tris.

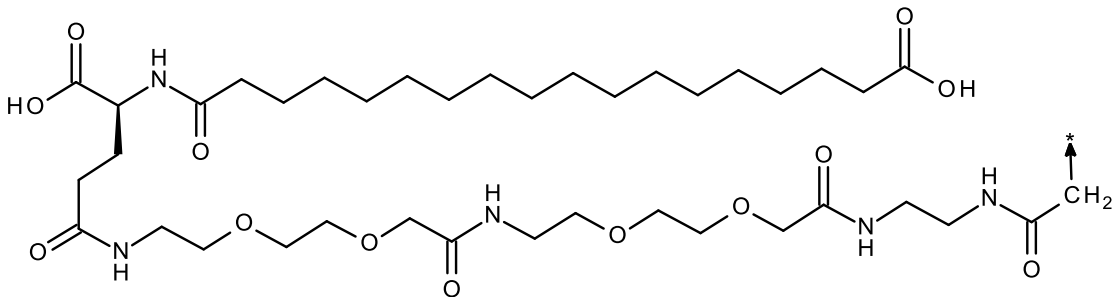
106. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con las modalidades 1 o 2, en donde el polipéptido MIC-1 comprende una delección de N3 (des-N3) en comparación con MIC-1 de SEQ ID NO:1, en donde la extensión de aminoácidos tiene la siguiente secuencia SEPCTSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG (SEQ ID NO: 225), y en donde el prolongador tiene la siguiente fórmula:



(Fórmula X),

y en donde el prolongador se une a la cisteína de la extensión de aminoácidos.

107. El compuesto de acuerdo con las modalidades 1 o 2, en donde el polipéptido MIC-1 con una extensión de aminoácidos en el N-terminal tiene la secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 288, y el prolongador tiene la siguiente fórmula:



(Fórmula X),

y en donde el prolongador se une a la cisteína de la extensión de aminoácidos.

108. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-107 o una sal, amida o éster farmacéuticamente aceptable de este.

109. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde el compuesto tiene una eficacia in vivo mejorada en la disminución de la ingesta de alimentos y/o la disminución del peso corporal en comparación con MIC-1 de SEQ ID NO:1.

110. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-109 y 132-152 para el uso como un medicamento.

111. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-109 y 132-152 para el uso en la prevención y/o el tratamiento de un trastorno metabólico.

112. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 111 para el uso en la prevención y/o el tratamiento de un trastorno metabólico, en donde el trastorno metabólico es obesidad, diabetes tipo 2, dislipidemia o nefropatía diabética.
113. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-109 y 132-152 para el uso en la prevención y/o el tratamiento de trastornos alimentarios, tales como obesidad.
114. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 113 para el uso en la prevención y/o el tratamiento de la obesidad mediante la disminución de la ingesta de alimentos, la reducción del peso corporal, la supresión del apetito y/o la inducción de la saciedad.
115. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-109 y 132-152 para el uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad cardiovascular.
116. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la modalidad 115 para el uso en la prevención y/o el tratamiento de dislipidemia, arteriosclerosis, esteatohepatitis o nefropatía diabética.
117. La composición farmacéutica que comprende el compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-109 y 132-152 o una sal, amida o éster farmacéuticamente aceptable de este, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
118. El uso de un compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-109 y 132-152 en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de un trastorno metabólico, en donde el trastorno metabólico es obesidad, diabetes tipo 2, dislipidemia o nefropatía diabética.
119. El uso de un compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-109 y 132-152 en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de trastornos alimentarios.
120. El uso de un compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-109 y 132-152 en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de la obesidad.
121. El uso de un compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-109 y 132-152 en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de la obesidad mediante la disminución de la ingesta de alimentos, la reducción del peso corporal, la supresión del apetito y/o la inducción de la saciedad.
122. El uso de un compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-109 y 132-152 en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad cardiovascular.
123. El uso de un compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-109 y 132-152 en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de dislipidemia, arteriosclerosis, esteatohepatitis o nefropatía diabética.
124. Un método para tratar y/o prevenir un trastorno metabólico mediante la administración de una cantidad farmacéuticamente activa de un compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-109 y 132-152, en donde el trastorno metabólico es obesidad, diabetes tipo 2, dislipidemia o nefropatía diabética.

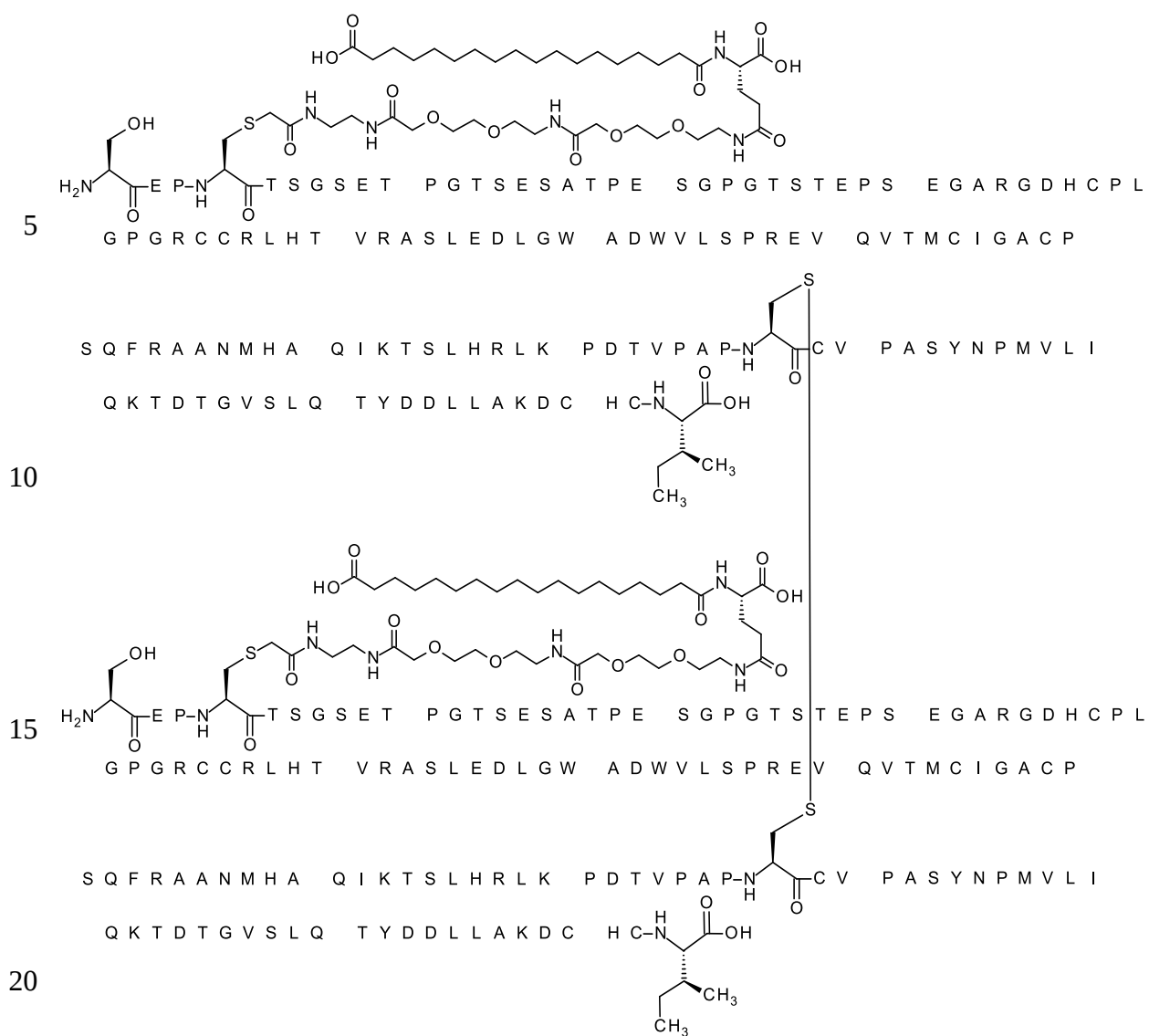
125. Un método para tratar y/o prevenir trastornos alimentarios mediante la administración de una cantidad farmacéuticamente activa de un compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-109 y 132-152.
126. Un método para tratar y/o prevenir la obesidad mediante la administración de una cantidad farmacéuticamente activa de un compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-109 y 132-152.
127. Un método para tratar y/o prevenir la obesidad mediante la disminución de la ingesta de alimentos, la reducción del peso corporal, la supresión del apetito y/o la inducción de la saciedad mediante la administración de una cantidad farmacéuticamente activa de un compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-109 y 132-152.
128. Un método para tratar y/o prevenir una enfermedad cardiovascular mediante la administración de una cantidad farmacéuticamente activa de un compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-109 y 132-152.
129. Un método para tratar y/o prevenir la dislipidemia, arteriosclerosis, esteatohepatitis o nefropatía diabética mediante la administración de una cantidad farmacéuticamente activa de un compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-109 y 132-152.
130. Una molécula polinucleotídica que codifica un compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-109 y 132-152.
131. Un método para tratar y/o prevenir el sobrepeso mediante la disminución de la ingesta de alimentos, la reducción del peso corporal, la supresión del apetito y/o la inducción de la saciedad mediante la administración de una cantidad farmacéuticamente activa de un compuesto de MIC-1 de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-109 y 132-152.
132. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la Fórmula 01:

25

30

35

40



(Fórmula 01).

133. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la Fórmula 02:

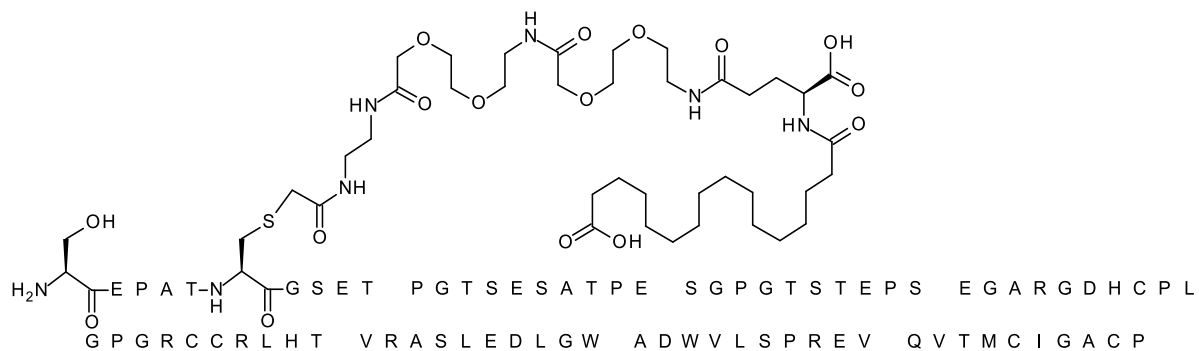
25

30

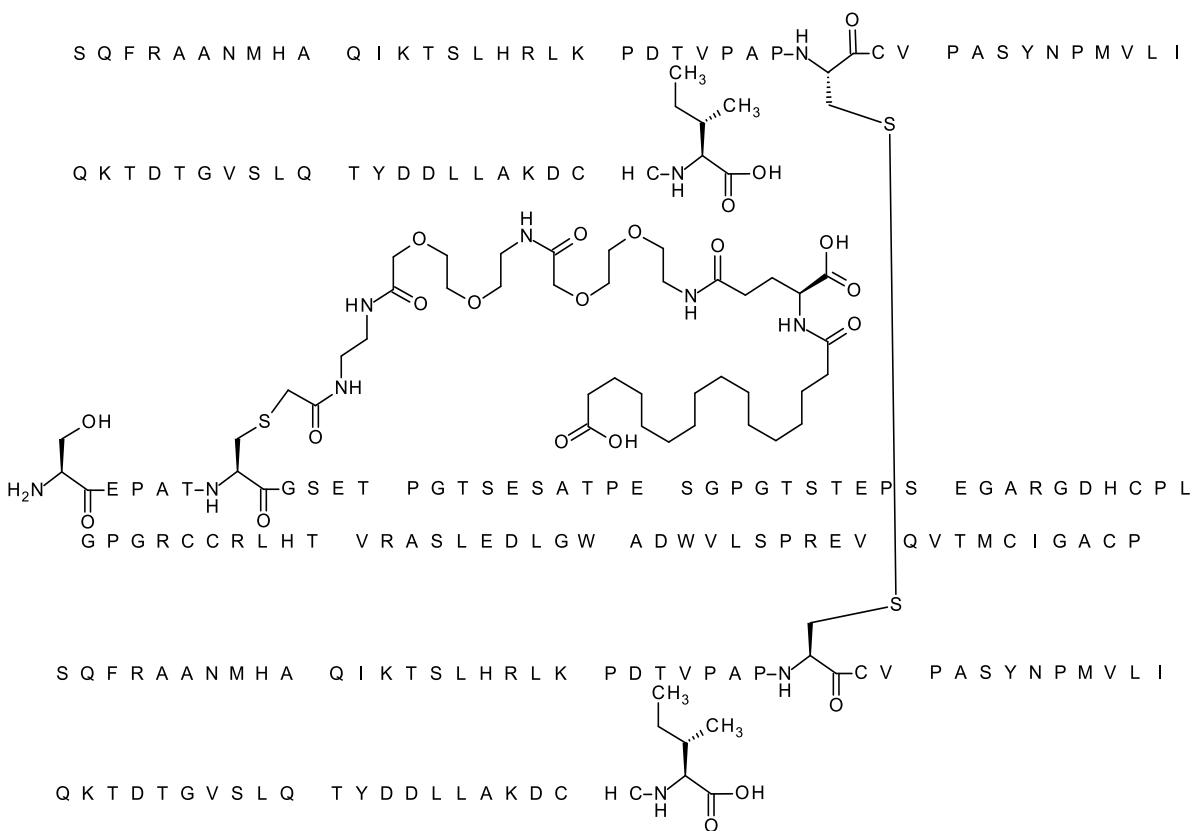
35

40

5



10



15

20

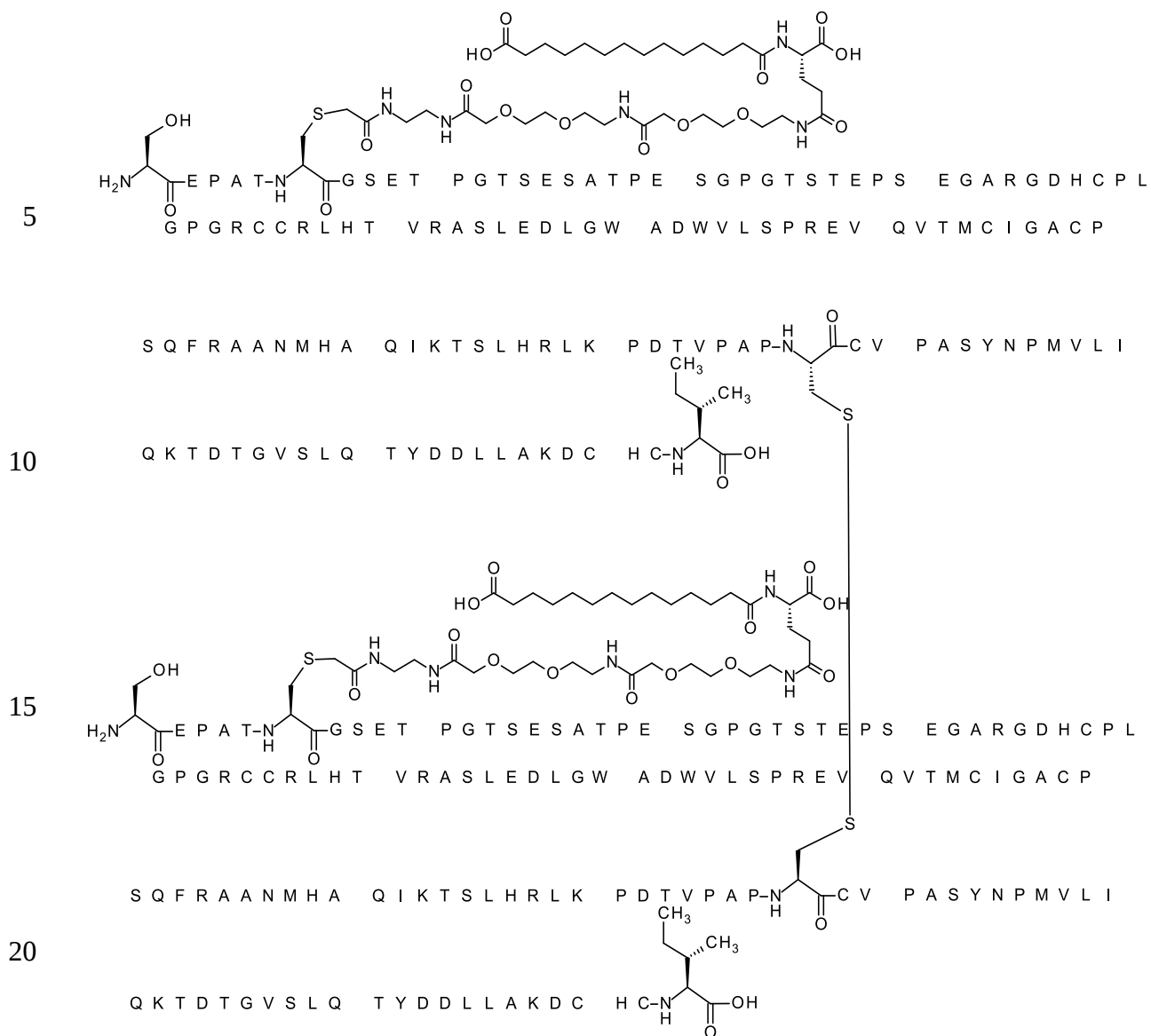
25

135. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la Fórmula 04:

30

35

40



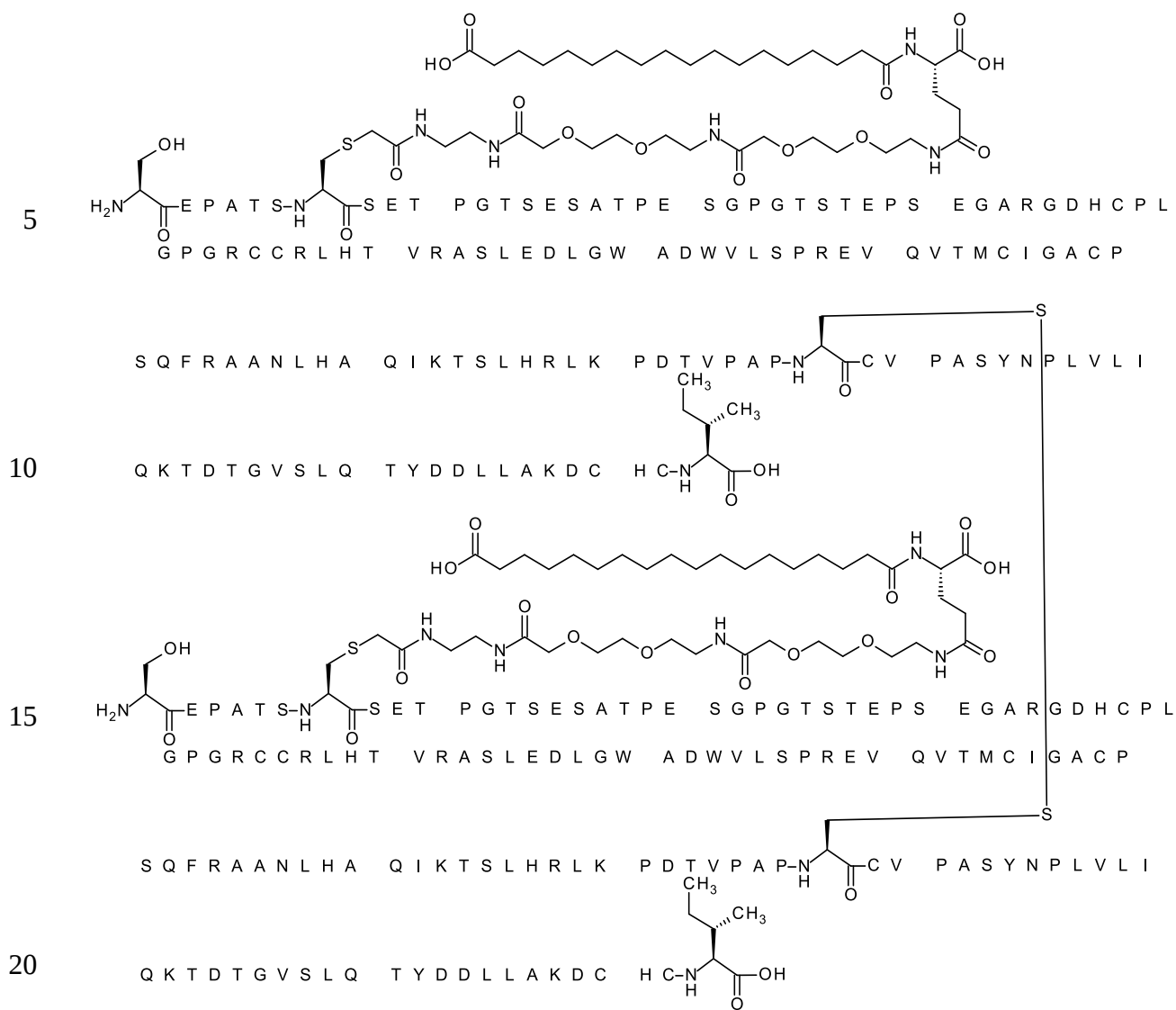
(Fórmula 04).

25 136. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la Fórmula 05:

30

35

40



(Fórmula 05).

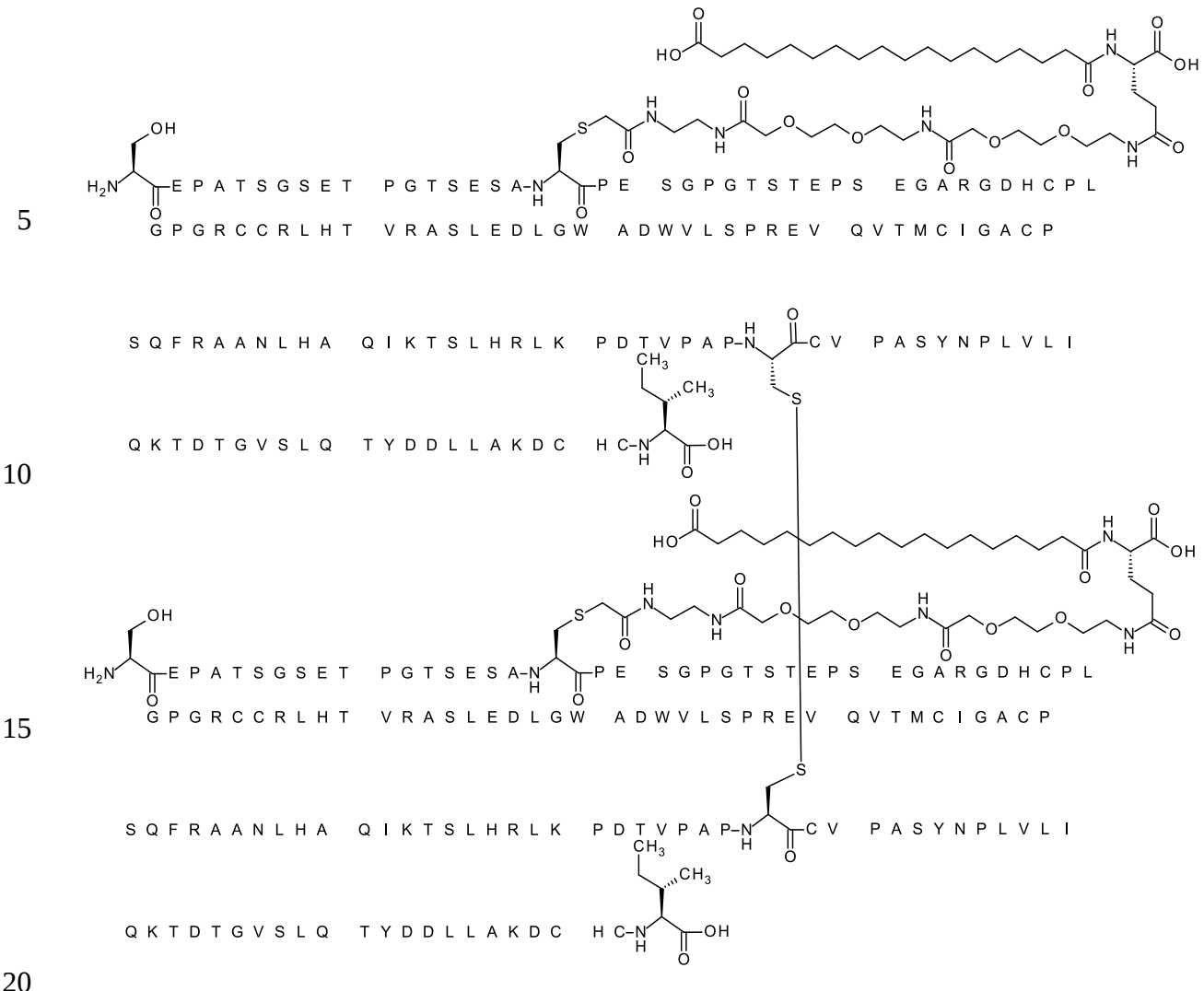
137. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la Fórmula 06:

25

30

35

40



(Fórmula 07).

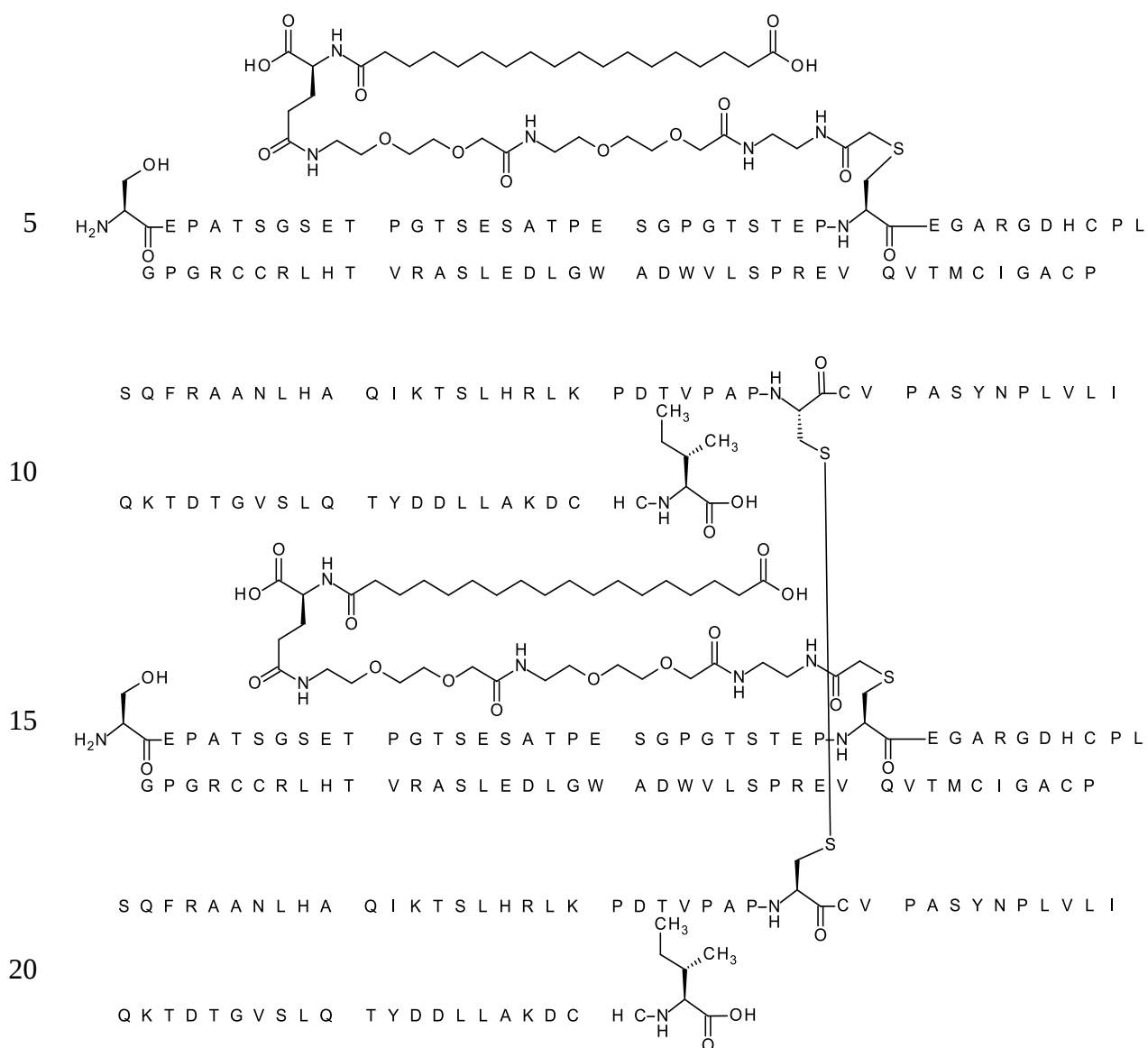
139. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la Fórmula 08:

25

30

35

40



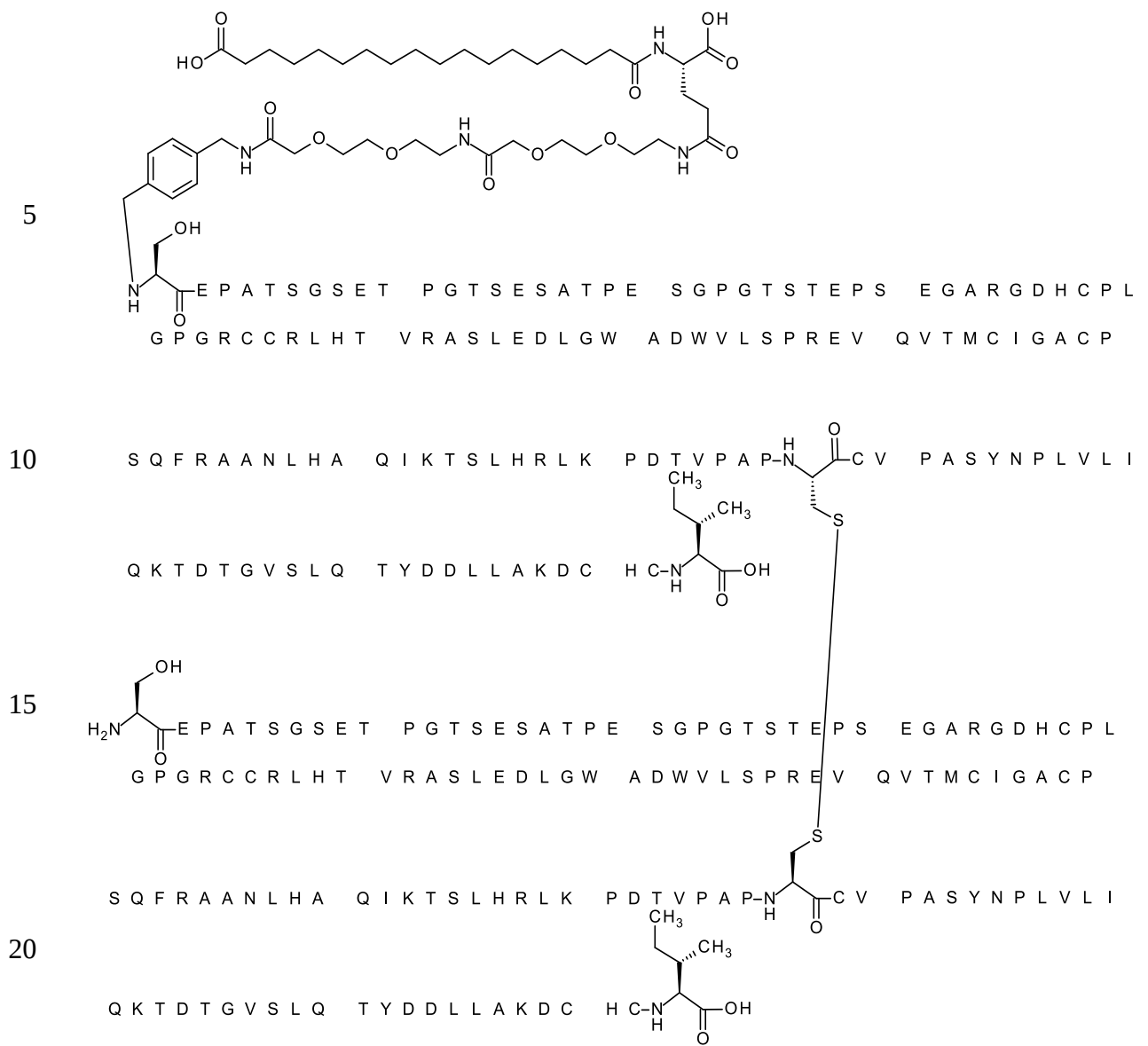
(Fórmula 08).

25 140. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la Fórmula 09:

30

35

40



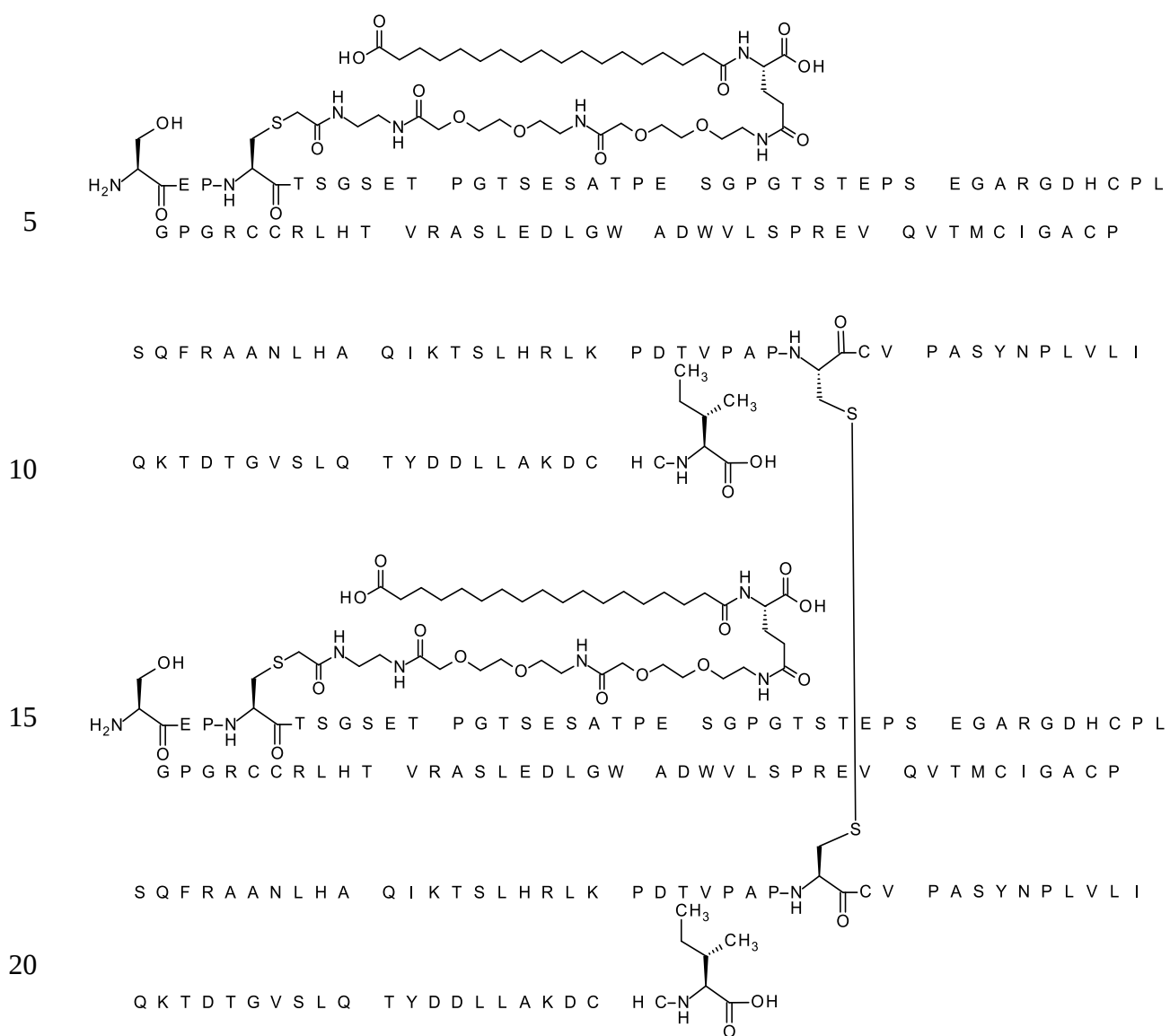
(Fórmula 09).

25 141. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la Fórmula 10:

30

35

40



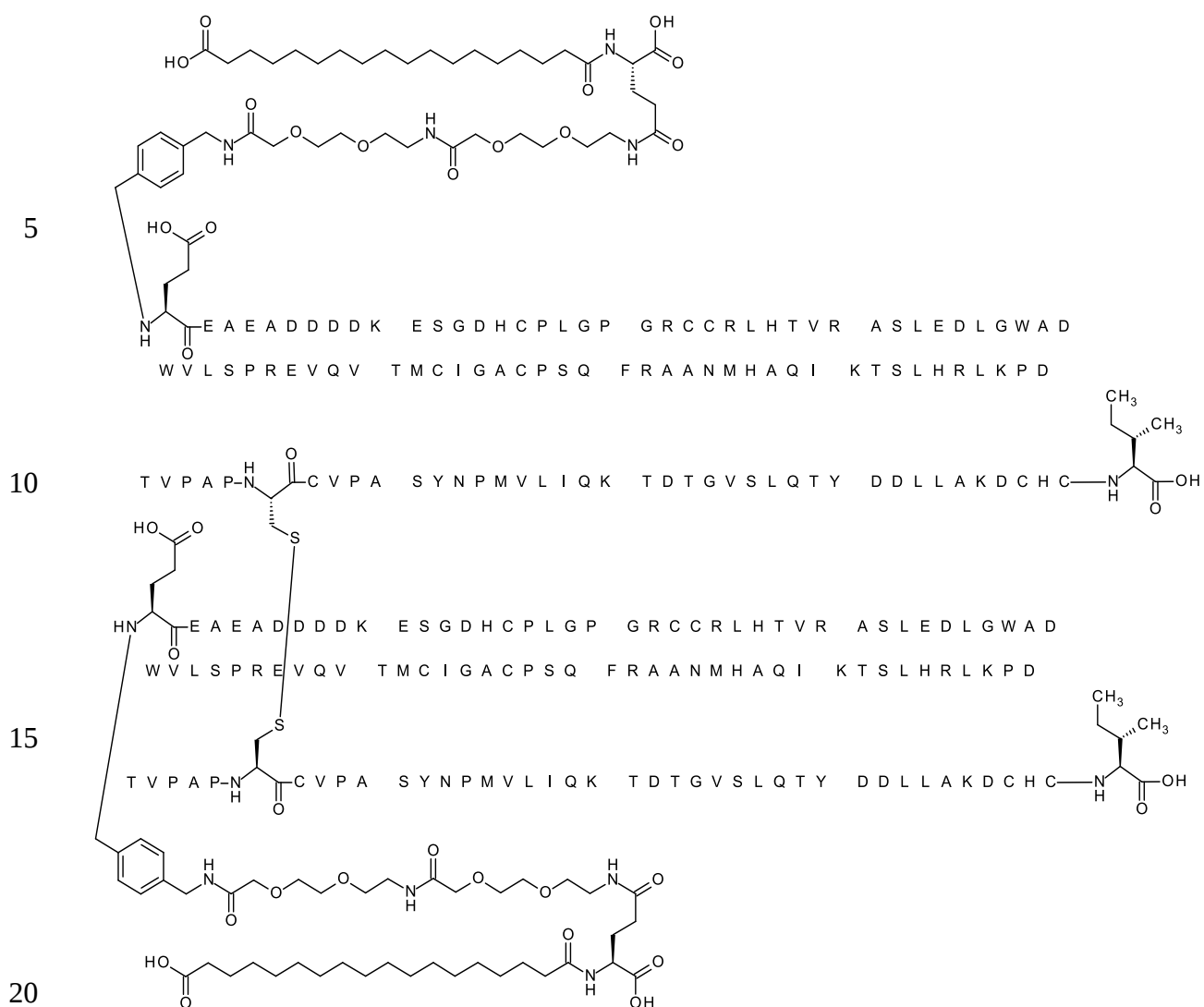
(Fórmula 11).

25 143. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la Fórmula 12:

30

35

40



(Fórmula 12).

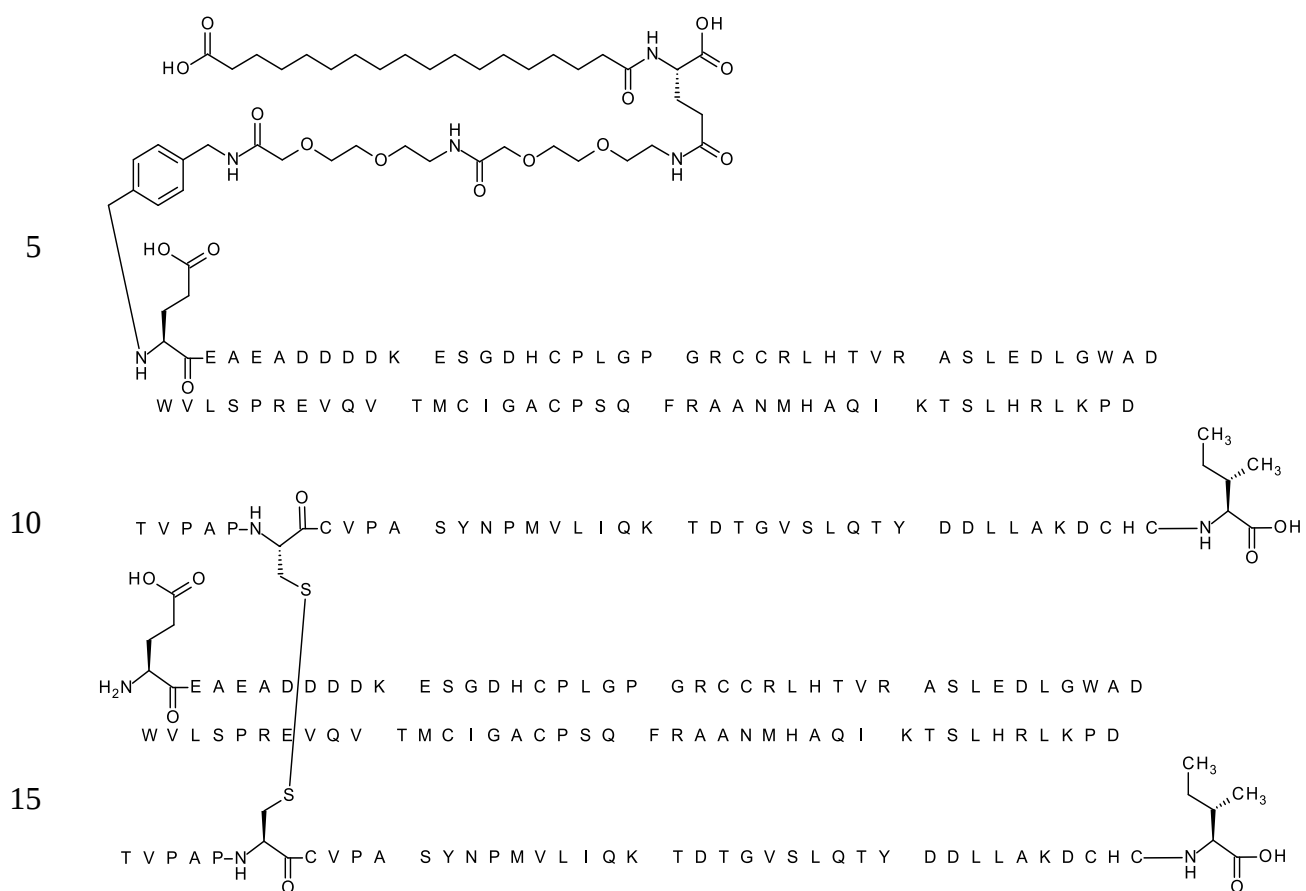
144. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la Fórmula 13:

25

30

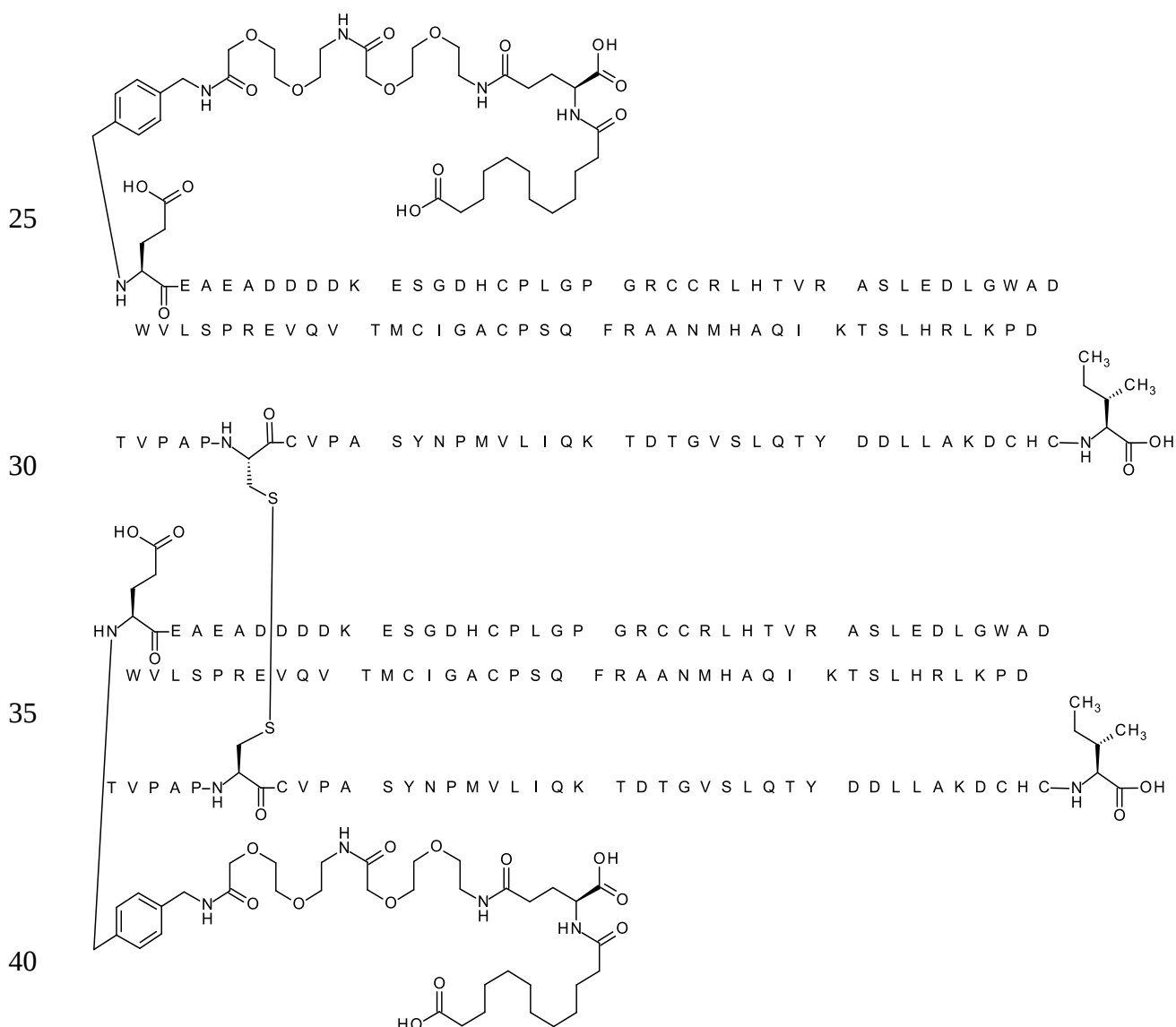
35

40



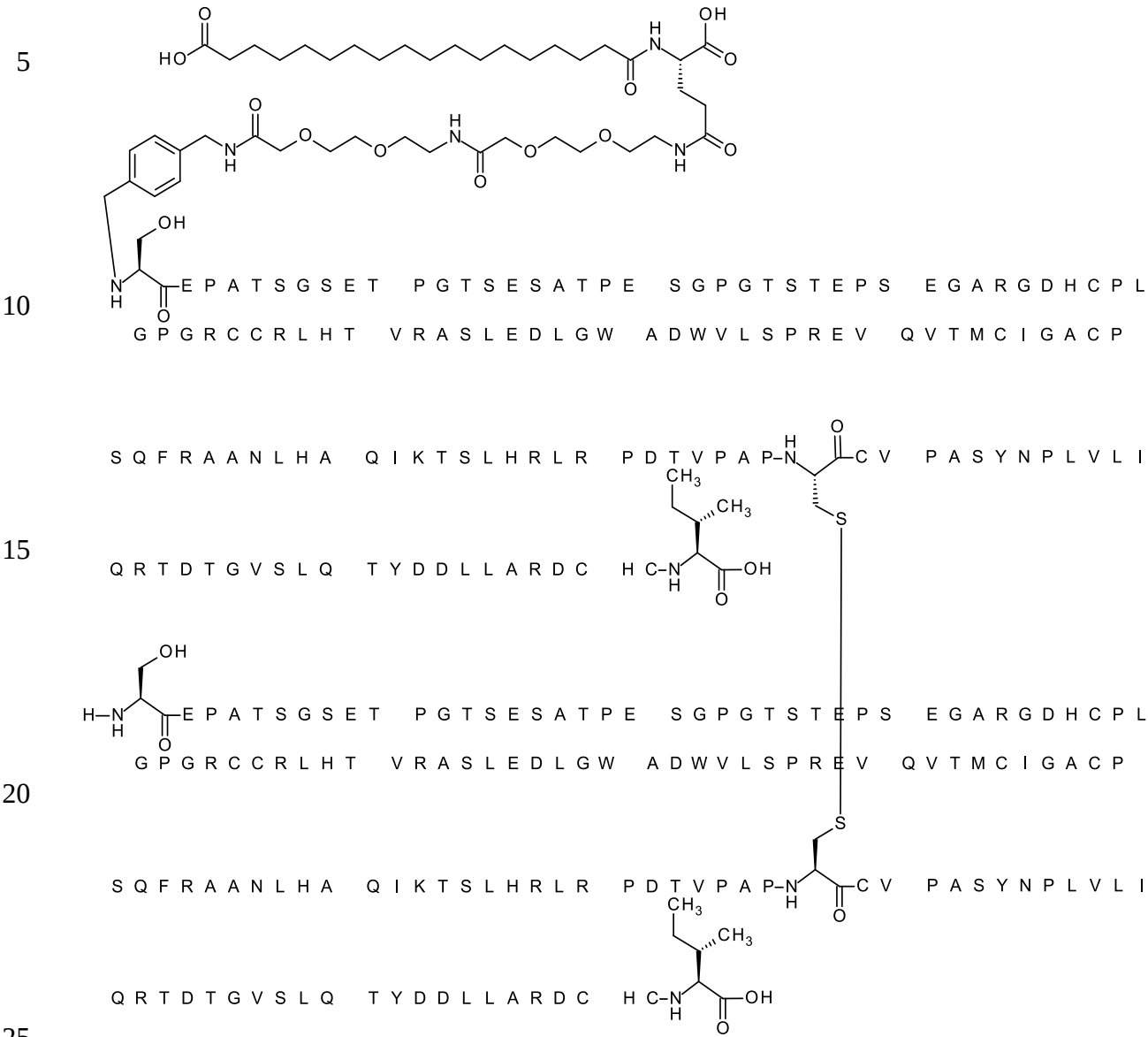
(Fórmula 13).

20 145. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la Fórmula 14:



(Fórmula 14).

146. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la Fórmula 15:



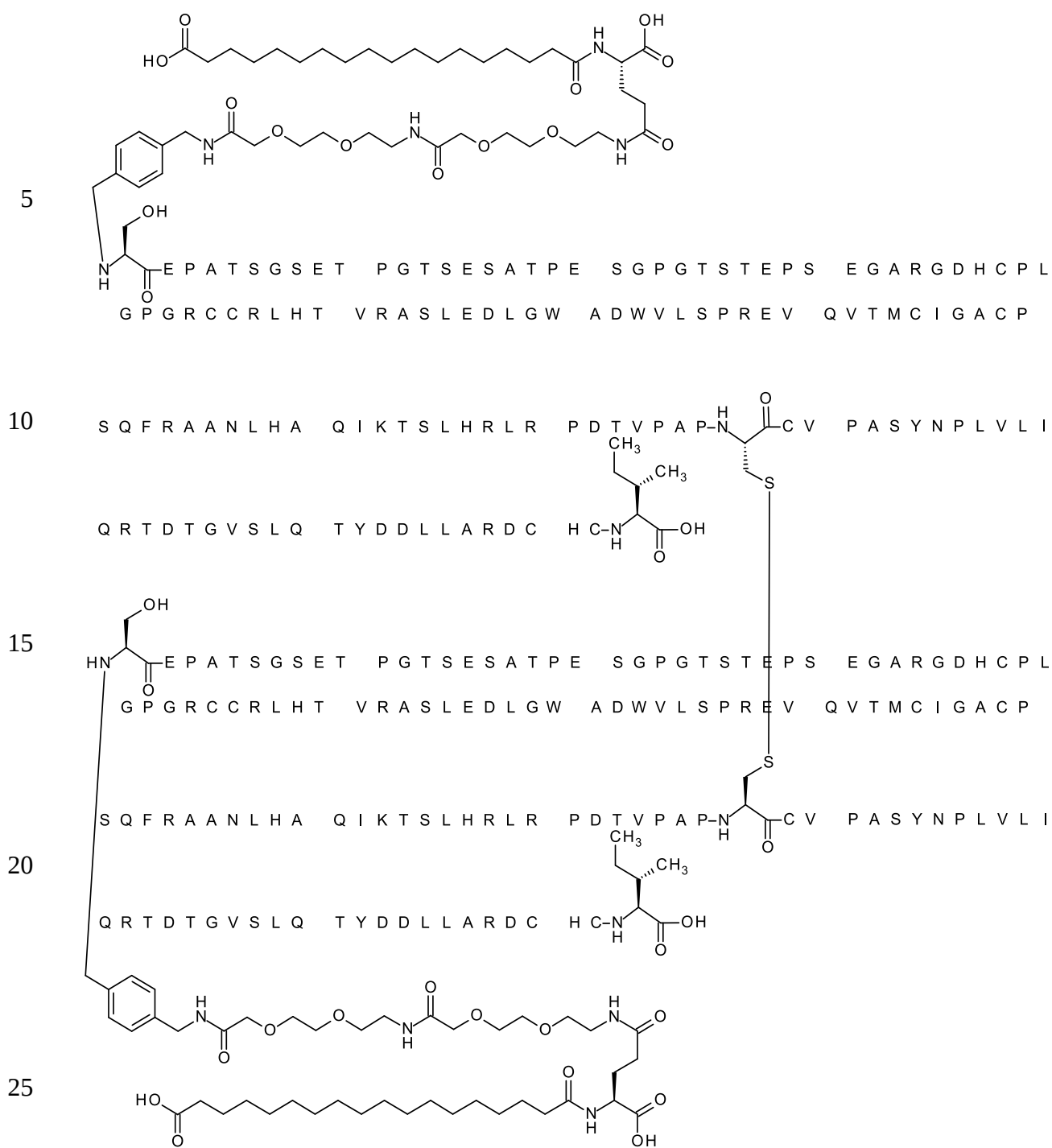
(Fórmula 15).

147. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la Fórmula 16:

30

35

40



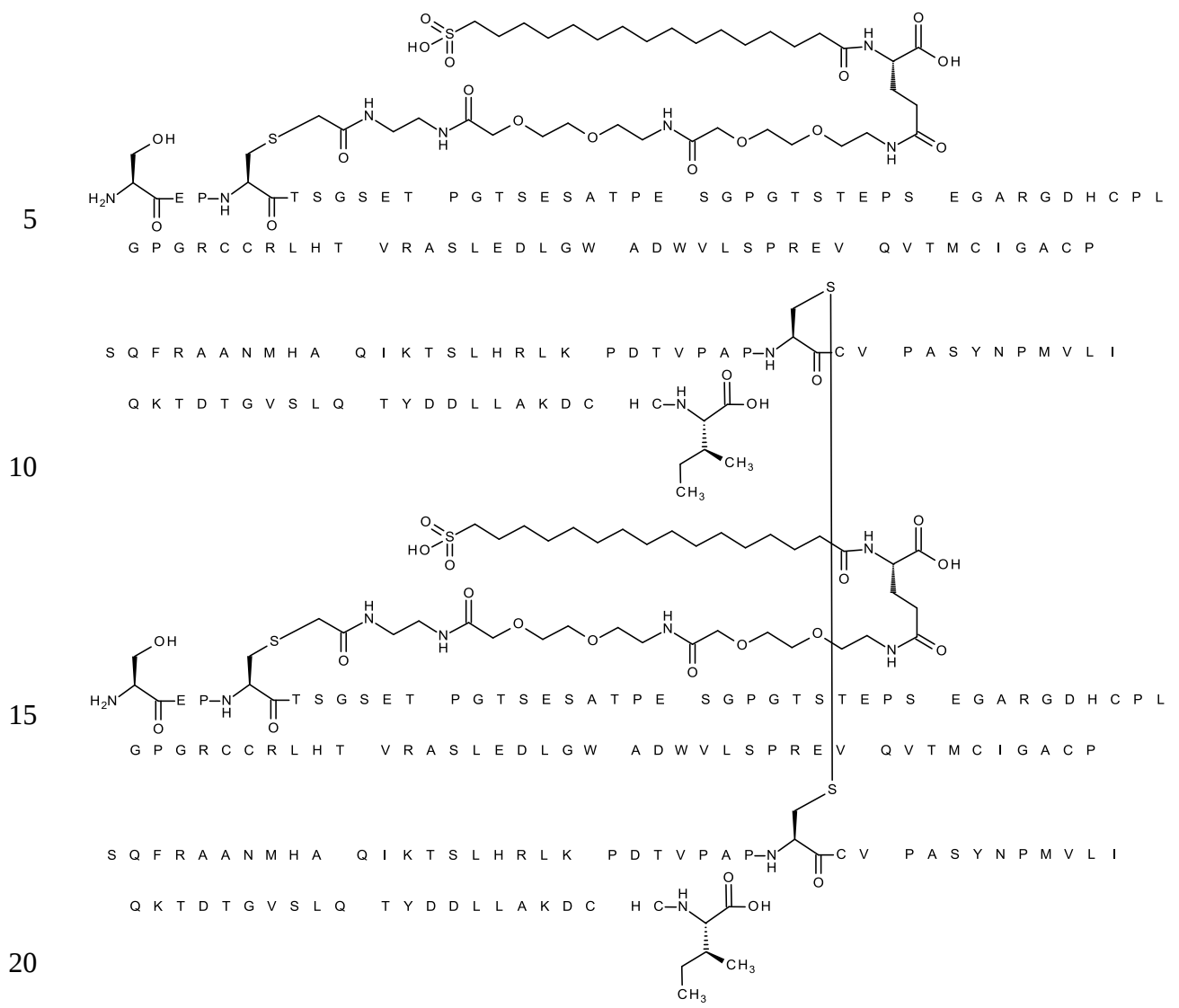
(Fórmula 16).

148. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la Fórmula 17:

30

35

40



(Fórmula 17).

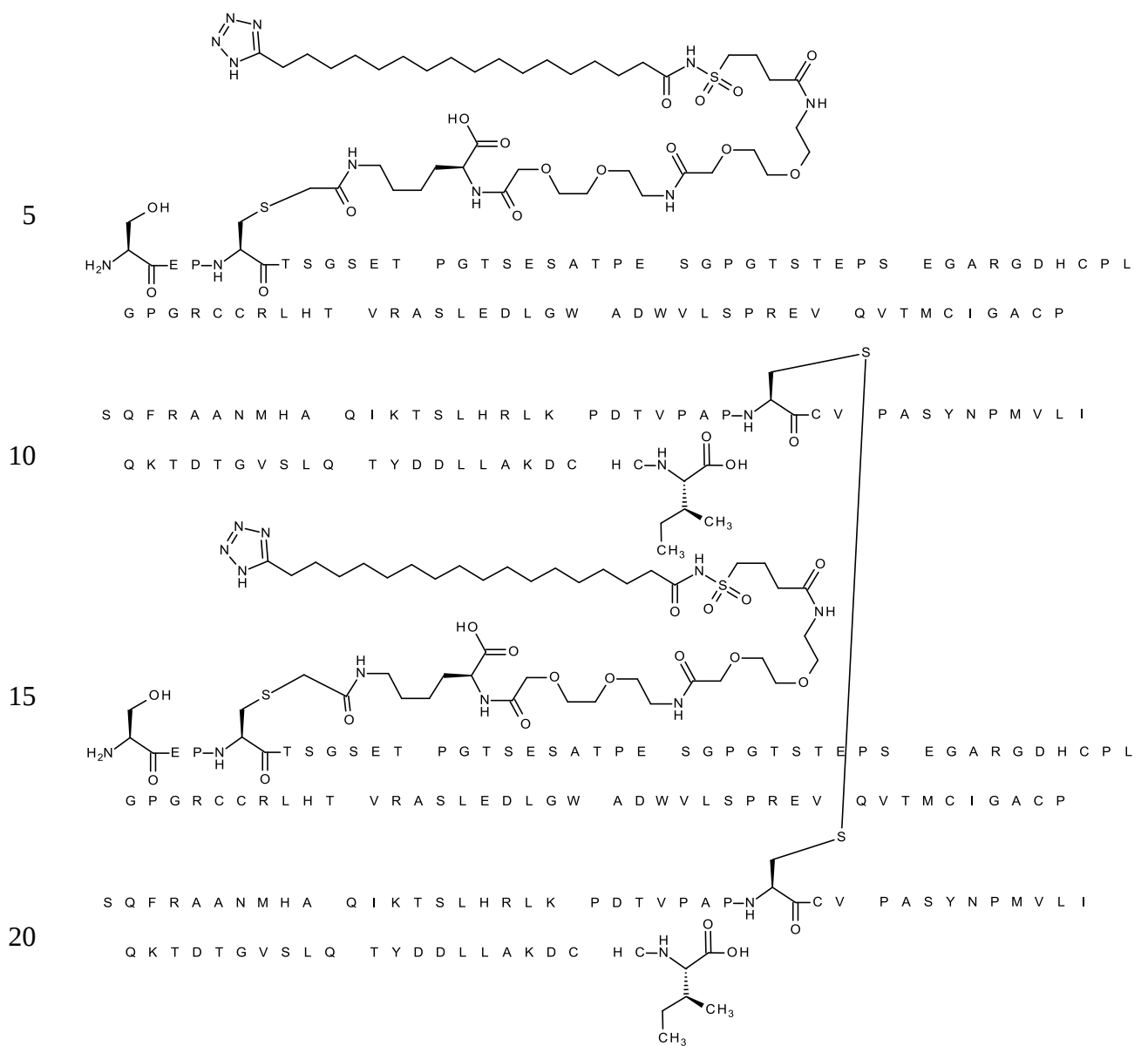
149. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la Fórmula 18:

25

30

35

40



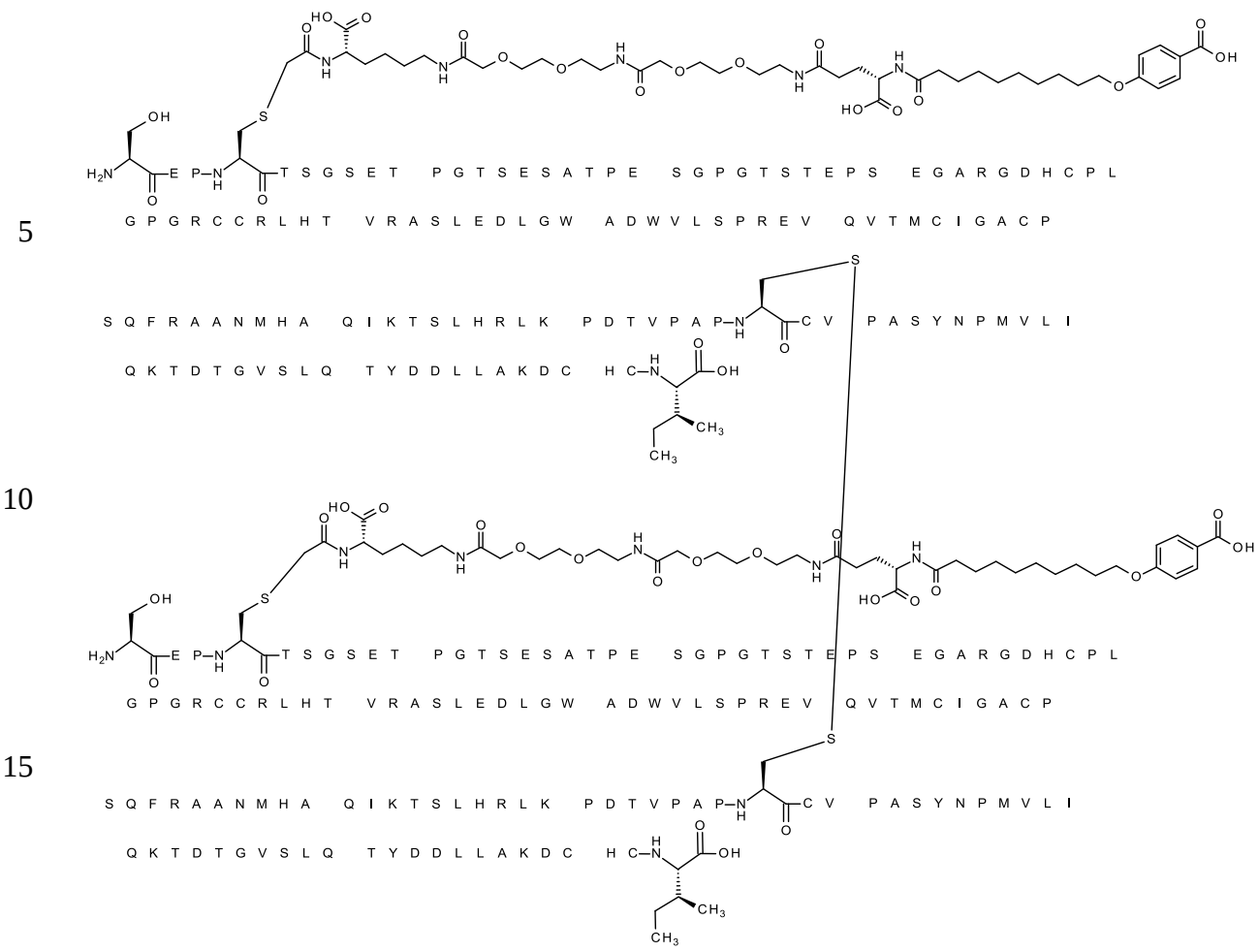
(Fórmula 18).

25 150. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la Fórmula 19:

30

35

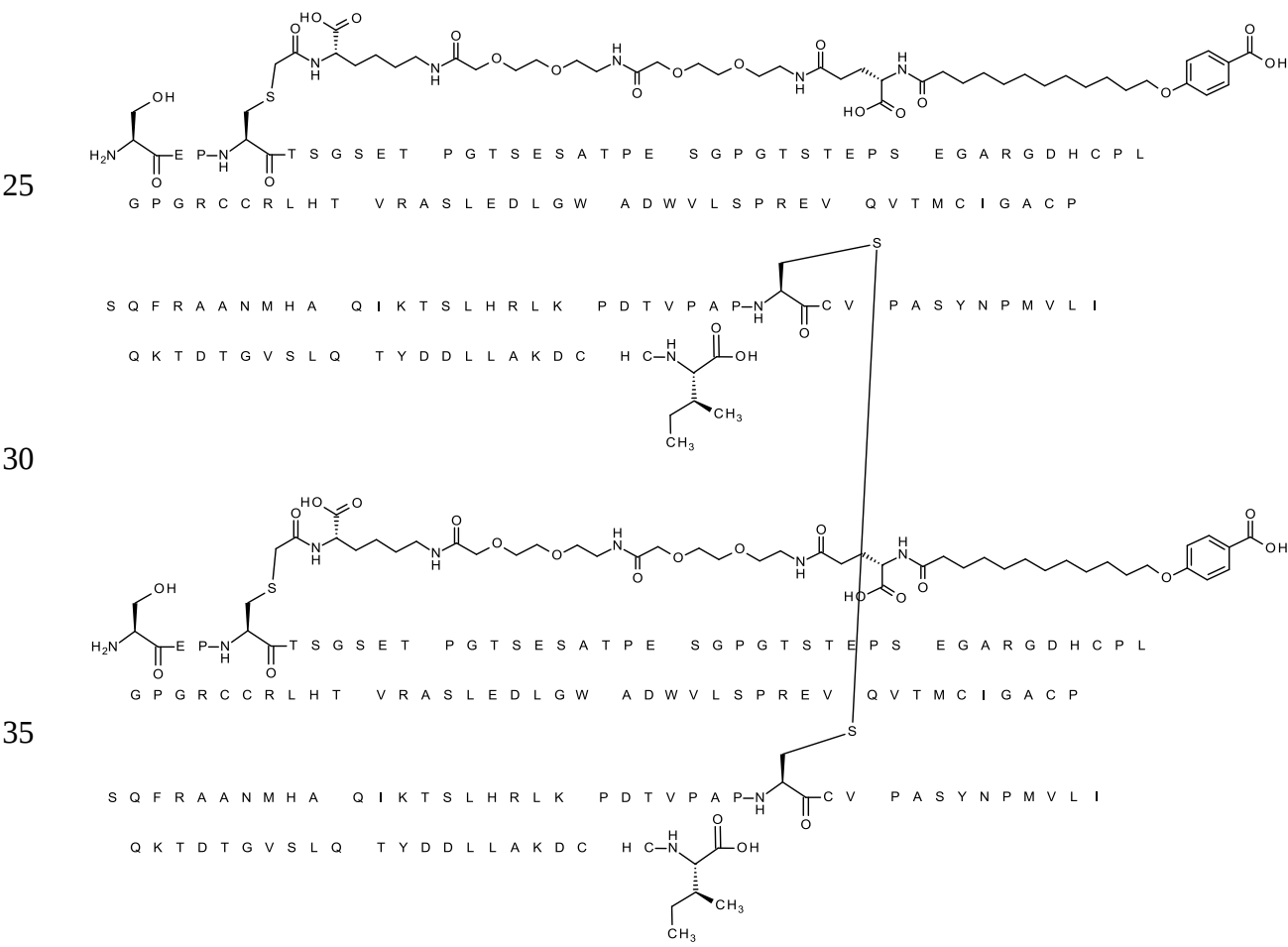
40



(Fórmula 19).

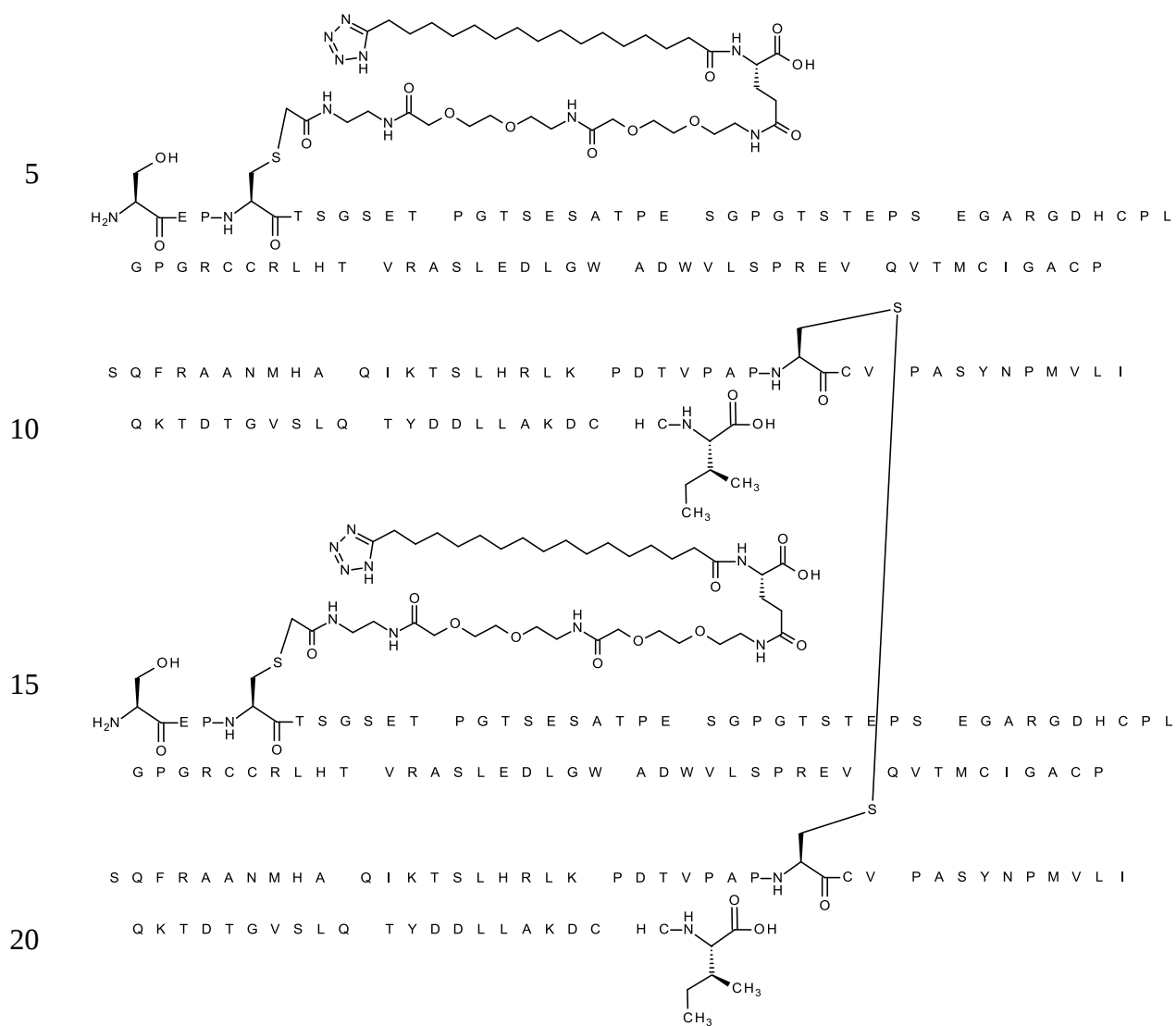
20

151. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la Fórmula 20:



(Fórmula 20)

152. El compuesto de MIC-1 de acuerdo con la Fórmula 21:



(Fórmula 21).

25 EJEMPLOS

Lista de abreviaturas

“Pico principal” se refiere al pico en un cromatograma de purificación que tiene la intensidad UV más alta en unidades de miliabsorbancia y que contiene la proteína fusión. HPLC es Cromatografía líquida de alta resolución.

30 SDS-PAGE es electroforesis en gel de Poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.

IMAC es cromatografía de afinidad con metal inmovilizado.

SEC es cromatografía de exclusión por tamaño.

MS es espectrometría de masas.

En esta descripción, las letras griegas pueden representarse por su símbolo o el nombre escrito correspondiente, por ejemplo: α = alfa; β = beta; ε = épsilon; γ = gamma; ω = omega; Δ = delta; etc. Además, la letra griega de μ puede representarse por "u", por ejemplo en μl =ul, o en μM =uM.

Polipéptidos MIC-1 con solubilidad mejorada

En un aspecto de la invención, los polipéptidos MIC-1 se diseñaron de modo que tengan un aumento de la solubilidad.

En un aspecto de la invención, esto se logró mediante la adición de una extensión “ácida” de aminoácidos en el N-terminal al polipéptido MIC-1.

- 5 En un aspecto de la invención, la solubilidad se incrementó y la estabilidad se mejoró mediante la modificación de la secuencia de aminoácidos del polipéptido MIC-1. Por ejemplo, se hizo una modificación dentro de la secuencia de aminoácidos del polipéptido MIC-1 (mutación en secuencia).

- 10 Los polipéptidos MIC-1 con una extensión de aminoácidos en el N-terminal pueden expresarse en bacterias tales como *E. coli*. En el contexto de la presente invención, la producción de proteínas a gran escala de los polipéptidos MIC-1 con una extensión en N podría necesitar el uso de cuerpos de inclusión (IB) ya que esto representa un enfoque ventajoso para controlar la recuperación del proceso, la pureza de la proteína, la degradación por proteasas y la estabilidad general de la proteína. Esto se vuelve
15 particularmente importante para la producción de proteínas a gran escala. De importancia crítica para la calidad de los IB es el equilibrio entre la solubilidad mejorada y la formación de IB de polipéptidos MIC-1 con una extensión N.

Diseño de la extensión en N:

- En el diseño de la extensión de aminoácidos en el N-terminal, se excluyeron F, I, L, M, V, W y Y, ya que podrían contribuir a la agregación de la proteína. H, K, y R también se
20 excluyeron, ya que podrían provocar la unión no deseada sobre la membrana celular. A, C, E, G, P, S, T, D, N y Q se prefieren para la secuencia de la extensión en N. E y D se prefieren particularmente ya que aumentan la solubilidad al aumentar el valor de pI del compuesto. C podría proporcionar un grupo –SH que puede usarse para fines de
25 prolongación, tales como la conjugación de ácidos grasos y la PEGilación. Particularmente, para algunas extensiones en N, se añadieron una o dos alaninas, glicinas o serinas adicionales al N-terminal para aumentar la eficiencia de eliminación de la metionina inicial cuando los polipéptidos MIC-1 con extensión en N se expresaron en *E.coli*.

- Se diseñaron diversas extensiones de aminoácidos en el N-terminal. Algunas extensiones en
30 N comprenden secuencias que se originan a partir de proteínas humanas (secuencias humanizadas); algunas comprenden secuencia(s) diseñada(s) de manera artificial (por ejemplo GS, SG, AEE, AES, GEPQ (SEQ ID NO:123), GEPS (SEQ ID NO:118)); algunas comprenden varias repeticiones de las secuencias humanizadas o secuencias artificiales; algunas comprenden una combinación de las anteriores. Se diseñaron varias secuencias de
35 6 residuos (6-meros). Las extensiones en N podrían comprender uno o más de 6-meros, parte de unos 6-meros (por ejemplo, 1-5 residuos de unos 6-meros), o una combinación de los anteriores. Los residuos de aminoácidos de las secuencias artificiales (incluidos los 6-meros) y las secuencias humanizadas podrían disponerse en cualquier orden.

- Algunos 6-meros y combinaciones de 6-meros representativas se enumeran en la Tabla 2 y
40 otros ejemplos de extensión en N se enumeran en la Tabla 3.

Tabla 2: 6-meros y combinaciones de 6-meros

6-meros:	6-mer-1: SPAGSP (SEQ ID NO:4)
	6-mer-2: TSESAT (SEQ ID NO:5)
	6-mer-3: TSTEPE (SEQ ID NO:6)
	6-mer-4: SEPATS (SEQ ID NO:7)
	6-mer-5: TSTEEG (SEQ ID NO:8)
	6-mer-6: PESGPG (SEQ ID NO:9)
	6-mer-7: SGSAPG (SEQ ID NO:10)
	6-mer-8: GSETPG (SEQ ID NO:11)
Combinaciones:	SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG (SEQ ID NO:12)
	SEPATSGSETPGTSESATPESGPG (SEQ ID NO:13)
	SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPG (SEQ ID NO:14)
	SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSP (SEQ ID NO:15)
	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSP (SEQ ID NO:16)
	SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGSPAGSP (SEQ ID NO:17)
	SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESAT (SEQ ID NO:18)
	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESAT (SEQ ID NO:19)
	SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGTSESAT (SEQ ID NO:20)
	SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPE (SEQ ID NO:21)
	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPE (SEQ ID NO:22)
	SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGTSTEPE (SEQ ID NO:23)
	SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSEPATS (SEQ ID NO:24)
	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATS (SEQ ID NO:25)
	SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGSEPATS (SEQ ID NO:26)
	SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEEG (SEQ ID NO:27)
	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEEG (SEQ ID NO:28)
	SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGTSTEEG (SEQ ID NO:29)
	SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGPESGPG (SEQ ID NO:30)
	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGPESGPG (SEQ ID NO:31)
	SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGPESGPG (SEQ ID NO:32)
	SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSGSAPG (SEQ ID NO:33)
	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSGSAPG (SEQ ID NO:34)
	SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGSGSAPG (SEQ ID NO:35)
	SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGGSETPG (SEQ ID NO:36)
	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGGSETPG (SEQ ID NO:37)
	SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGGSETPG (SEQ ID NO:38)
	SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG (SEQ ID NO:39)
	SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG (SEQ ID NO:40)

	SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPESGSAPG (SEQ ID NO:41)
	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEG (SEQ ID NO:42)
	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG (SEQ ID NO:43)
	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPESGSAPG (SEQ ID NO:44)
	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG (SEQ ID NO:45)
	SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGSPAGSPTSTEEG (SEQ ID NO:46)
	SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGTSESATPESGPG (SEQ ID NO:47)
	SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGTSTEPESGSAPG (SEQ ID NO:48)
	SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPGSEPATSGSETPG (SEQ ID NO:49)
	SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG (SEQ ID NO:50)
	SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG (SEQ ID NO:51)
	SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPESGSAPG (SEQ ID NO:52)
	SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPG (SEQ ID NO:53)

Tabla 3: Ejemplos de extensiones en N

SEQ ID NO	Número de residuos	Secuencia de la extensión en N
SEQ ID NO:54	6	AEEAES
SEQ ID NO:55	3	AES
SEQ ID NO:56	9	(AEE)2AES
SEQ ID NO:57	20	(GEPS)5
SEQ ID NO:58	24	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG
SEQ ID NO:59	21	(AEE)6AES
SEQ ID NO:60	18	(AEE)5AES
SEQ ID NO:61	12	(AEE)3AES
SEQ ID NO:62	26	AASPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG
SEQ ID NO:63	24	TSESATPESGPGTSESATPESGPG
SEQ ID NO:64	26	AASPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG
SEQ ID NO:65	22	AAPEDEETPEQEGSGSGSGSGS
SEQ ID NO:66	12	AAPEDEETPEQE
SEQ ID NO:67	22	AAPDEGTEEETEGSGSGSGSGS
SEQ ID NO:68	24	SEPATSGSETPGSEPATSGSETPG
SEQ ID NO:69	25	A(GPEQQQEP)3
SEQ ID NO:70	30	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS
SEQ ID NO:71	32	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG
SEQ ID NO:72	24	(GEPS)6
SEQ ID NO:161	36	(GEPS)9
SEQ ID NO:162	36	(GPEQ)9

SEQ ID NO	Número de residuos	Secuencia de la extensión en N
SEQ ID NO:163	25	AGPEQGGQEPGEPQGGQEPQPGEPEGQ

Mutaciones en secuencia:

Se modificaron determinados residuos internos de MIC-1 (SEQ ID NO:1), por ejemplo, mediante sustitución. Por ejemplo, para aumentar la solubilidad de los compuestos de MIC-1, un residuo hidrófobo de MIC-1 podría sustituirse con un residuo hidrófilo, preferentemente con un residuo ácido; un residuo con carga positiva podría sustituirse con un residuo ácido, etc. Para disminuir la oxidación, la metionina podría sustituirse con otros aminoácidos, por ejemplo E, F o L.

Las mutaciones en secuencia para aumentar la solubilidad incluyen pero sin limitarse a: P11E, H18E, R21E, A30E, A47E, R53E, A54E, M57E, H66E, R67E, L68E, K69E, A75E, A81E, P85E, Q90E, T92E, L105E y K107E.

Las mutaciones en secuencia para disminuir la oxidación incluyen pero sin limitarse a: M43L, M43E, M57E, M57L, M86F y M86L.

Las mutaciones en secuencia para aumentar la estabilidad química incluyen pero sin limitarse a N3S, N3E, N3A, N3T, N3P, N3G, N3V, N3H, N3Y y N3Q.

Las mutaciones en secuencia para la conjugación incluyen pero sin limitarse a K69R, K107R y K91R.

Otras mutaciones en secuencia incluyen pero sin limitarse a una delección de N3 (des-N3) y/o una delección de los primeros 3 residuos.

Cálculo del pI

El pI calculado de un polipéptido MIC-1 con una extensión de aminoácidos en el N-terminal se define como el pH en el cual la carga neta calculada del polipéptido MIC-1 con una extensión de aminoácidos en el N-terminal es cero. La carga calculada del polipéptido MIC-1 con la extensión de aminoácidos en el N-terminal como una función del pH se obtiene mediante el uso de los valores de pKa de los residuos de aminoácidos descritos en la Tabla 1 y del método descrito por B. Skoog y A. Wichman (Trends in Analytical Chemistry, 1986, vol. 5, páginas 82-83). El pKa de la cadena lateral de la cisteína (Cys) solo se incluye en el cálculo de la carga para cisteínas con un grupo sulfhidrilo libre. La extensión en N puede contener una mutación de cisteína. Como un ejemplo el valor de pI calculado de MIC-1 humana de tipo silvestre es 8.8 como el homodímero. Los valores de pI calculados del polipéptido MIC-1 se muestran en la Tabla 4.

En la presente descripción, y a lo largo de este documento, los cálculos del pI del polipéptido MIC-1 con una extensión de aminoácidos en el N-terminal, si no se indican de cualquier otra manera, se realizan en homodímeros.

Tabla 4: Valores de pI calculados

	MIC-1			MIC-1- MIC-1- Δ1-3		MIC-1- MIC-1- Δ1-3	
	(SEQ ID NO:1)	MIC-1- des-N3	MIC-1- Δ1-3	MIC-1 - Δ1-3 (M57E) (M57E)	Δ1-3 (M57E, H66E)	Δ1-3 (M57E, R67E)	(M57E, H66E y R67E)
Cualquier combinación de cuatro de los 6-meros 1- 8 [∞]	6.1	6.1	5.8	5.5	5.0	5.0	4.7
Cualquier combinación de cinco 6- meros 1-8 [∞]	5.8	5.8	5.5	5.2	4.8	4.8	4.6
(GEPQ*) ₅ o (GEPS*) ₅ [∞]	5.8	5.8	5.5	5.2	4.8	4.8	4.6
(GEPQ*) ₆ [∞]	5.5	5.5	5.2	5.2	4.7	4.7	4.5
Secuencias humanizadas en los ejemplos [∞]	4.5 ~ 5.5		4.2 ~ 5.3	4.2 ~ 5.2	4.2~5.1	4.2~5.1	4.2~5.0

* Los residuos de aminoácidos de “GEPQ” o “GEPS” pueden disponerse en cualquier orden

[∞] Una Cys en la extensión en el N-terminal cambia el pI en menos de ±0.1.

5 Materiales y Métodos

 Métodos generales de preparación

 Ejemplo-1: Expresión y fermentación del polipéptido MIC-1 o el polipéptido MIC-1 con una extensión en el N-terminal

 El ADNc del polipéptido MIC-1 o el polipéptido MIC-1 con una extensión en el N-terminal
10 se subclonó en un vector derivado de pET11b. La sobreexpresión del polipéptido MIC-1f o el polipéptido MIC-1 con una extensión en el N-terminal como cuerpos de inclusión se indujo en *E. coli* con isopropil β-d-tiogalactósido (IPTG) 0.5 mM cuando la densidad celular alcanzó una DO600 de 1.0. Después del crecimiento continuo en TB durante 20 h a 37 °C, las células se cosecharon y las muestras para ambos LC/MS y UPLC se prepararon
15 para confirmar el peso molecular.

 La fermentación se llevó a cabo en un proceso discontinuo alimentado en medio químico definido como suplemento. El rendimiento de la fermentación dependió en gran medida de los diferentes polipéptidos, que varió de 1 g/l a 8 g/l de polipéptido a polipéptido.

Ejemplo-2: Purificación y replegamiento:

El polipéptido MIC-1 o el polipéptido MIC-1 con una extensión en el N-terminal se purificaron adicionalmente como sigue:

La suspensión (20 % p/v) de *E.coli* en tampón Tris 10 mM pH 8.0 se sonicó (intervalos de encendido/apagado de 3 segundos en hielo durante 5 minutos) y el polipéptido MIC-1 o el polipéptido MIC-1 con una extensión en el N-terminal se sedimentaron mediante centrifugación (10,000 x g, durante 30 minutos). Los cuerpos de inclusión se volvieron a solubilizar con urea 8 M en Tris 20 mM pH 8.0, y los restos se eliminaron mediante centrifugación (10,000 x g, durante 30 minutos). El polipéptido MIC-1 o el polipéptido MIC-1 con una extensión en el N-terminal en el sobrenadante resultante se recolectó y se diluyó en el tampón de replegamiento (Tris 50 mM, pH 8.5 y DMF al 10 % o DMSO al 10 %) a la concentración final de 0.1 mg/ml. El proceso de replegamiento duró 48 horas en la cámara fría. La solución resultante se filtró mediante un filtro de 0.4 µm y se cargó en una columna de interacciones hidrofóbicas o de cromatografía de intercambio aniónico (Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 0-500 mM) mediante el uso de serina Q Sepharose Fast Flow (GE Healthcare), como se describe generalmente en *Protein Purification*. Principles and Practice Series: Springer Advanced Texts in Chemistry Scopes, Robert K. 3ra ed., 1994 (Capítulos 6 y 8). En algunos ejemplos, la purificación adicional se realizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño mediante el uso de una columna HiLoad 26/60 Superdex pg 75 (GE Healthcare) que se hizo funcionar con Tris 50 mM pH 8.0 y NaCl 200 mM. Para el almacenamiento, el polipéptido MIC-1 o el polipéptido MIC-1 con una extensión en el N-terminal se transfirió a DPBS y se almacenó congelado. Los polipéptidos MIC-1 o los polipéptidos MIC-1 con una extensión en el N-terminal y su solubilidad máxima a pH 8 en tampón Tris se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Polipéptidos MIC-1 o polipéptidos MIC-1 con una extensión en el N-terminal y su solubilidad máxima a pH 8 en tampón Tris analizada de acuerdo con el Ejemplo 4

SEQ ID NO	Estructura	pI calculado	Solubilidad máxima (mg/ml)
SEQ ID NO:1	MIC-1 (SEQ ID NO:1)	8.8	0.3
SEQ ID NO:73	MIC-1(R2A,N3E)	6.8	0.9
SEQ ID NO:74	MIC-1(R2A,N3E,A54E)	6.4	1.0
SEQ ID NO:75	MIC-1(R2A,N3E,A81E)	6.4	N.D.*
SEQ ID NO:76	MIC-1(R2A,N3E,H18E)	6.2	1.7
SEQ ID NO:77	MIC-1(R2A,N3E,K69E)	6.1	2.2
SEQ ID NO:78	MIC-1(R2A,N3E,K107E)	6.1	1.9
SEQ ID NO:79	MIC-1(R2A,N3E,L68E)	6.4	3.9
SEQ ID NO:80	MIC-1(R2A,N3E,A47E)	6.4	1.0
SEQ ID NO:81	MIC-1(R2A,N3E,L105E)	6.4	N.D.

SEQ ID NO	Estructura	pI calculado	Solubilidad máxima (mg/ml)
SEQ ID NO:82	MIC-1(R2A,N3E,M57E)	6.4	1.7
SEQ ID NO:83	MIC-1(R2A,N3E,P85E)	6.4	N.D.
SEQ ID NO:84	MIC-1(R2A,N3E,P11E)	6.4	1.6
SEQ ID NO:85	MIC-1(R2A,N3E,R21E)	6.1	1.8
SEQ ID NO:86	MIC-1(R2A,N3E,R53E)	6.1	1.9
SEQ ID NO:87	MIC-1(R2A,N3E,R67E)	6.1	1.8
SEQ ID NO:88	MIC-1(R2A,N3E,A30E)	6.4	1.5
SEQ ID NO:89	AEEAES-MIC-1-Δ1-3	6.1	N.D.
SEQ ID NO:90	AES-MIC-1-Δ1-3	6.8	0.9
SEQ ID NO:91	(AEE) ₂ AES-MIC-1-Δ1-3	5.5	N.D.
SEQ ID NO:92	(GEPS) ₅ -MIC-1(SEQ ID NO:1)	5.8	35.1
SEQ ID NO:93	SPAGSPTSTEEGTSESATPESG PG-MIC-1(SEQ ID NO:1)	6.1	44.5
SEQ ID NO:94	(AEE) ₆ AES-MIC-1(SEQ ID NO:1)	4.5	39.0
SEQ ID NO:95	(AEE) ₅ AES-MIC-1-Δ1-3	4.6	35.0
SEQ ID NO:96	(AEE) ₃ AES-MIC-1-Δ1-3	5.0	36.0
SEQ ID NO:97	AASPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPG-MIC-1(SEQ ID NO:1)	6.1	N.D.
SEQ ID NO:98	TSESATPESGPGTSESATPESG PG-MIC-1(R2A,N3E)	5.5	N.D.
SEQ ID NO:99	AASPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPG-MIC-1-Δ1-3	5.8	N.D.
SEQ ID NO:100	AAPDEETPEQEGSGSGSGSG S-MIC-1-Δ1-3	5.2	35.7
SEQ ID NO:101	AAPDEETPEQE-MIC-1-Δ1-3	5.2	N.D.
SEQ ID NO:102	AAPDEGTEEETEGSGSGSGSG S-MIC-1-Δ1-3	5.2	N.D.
SEQ ID NO:103	SEPATSGSETPGTSTEPSEGSA PG-MIC-1-Δ1-3	5.8	N.D.
SEQ ID NO:104	(SEPATSGSETPG) ₂ -MIC-1-Δ1-3	5.8	35.4
SEQ ID NO:105	(SEPATSGSETPG) ₂ -MIC-1-Δ1-3(M57E)	5.5	37.1
SEQ ID NO:106	(SEPATSGSETPG) ₂ -MIC-1-Δ1-3(M57L)	5.8	32.5
SEQ ID NO:107	A(GPEQGQEP) ₃ -MIC-1-Δ1-3	5.2	32.2

SEQ ID NO	Estructura	pI calculado	Solubilidad máxima (mg/ml)
SEQ ID NO:108	SEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPS-MIC-1-Δ1-3	5.5	40.0
SEQ ID NO:109	SEPATSGSETPG TSESATPESGPG TSTEPSEG- MIC-1-Δ1-3	5.2	40.0
SEQ ID NO:110	(SEPATSGSETPG) ₂ -MIC-1-Δ1- 3(M86L)	5.8	N.D.
SEQ ID NO:111	(SEPATSGSETPG) ₂ -MIC-1-Δ1- 3(M57L, M86L)	5.8	31.1
SEQ ID NO:112	(SEPATSGSETPG) ₂ -MIC-1-Δ1- 3(M57E, H66E)	5.0	N.D.
SEQ ID NO:113	(SEPATSGSETPG) ₂ -MIC-1-Δ1- 3(M57E, R67E)	5.0	N.D.
SEQ ID NO:114	(SEPATSGSETPG) ₂ -MIC-1-Δ1- 3(M57E, R67E, M86L)	5.0	N.D.
SEQ ID NO:115	SEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSTEPSEG- MIC-1-Δ1-3(M57L, M86L)	5.5	N.D.
SEQ ID NO:116	(GEPS) ₆ -MIC-1-Δ1-3	5.2	N.D.
SEQ ID NO:117	(SEPATSGSETPG) ₂ -MIC-1-des- N3	6.1	N.D.

*N.D.: No determinado

Ejemplo-3: Solubilidad dependiente del pH del polipéptido MIC-1 con una extensión en el N-terminal

- 5
- El propósito de este experimento fue realizar el tamizaje de un polipéptido MIC-1 con una extensión en N con solubilidad mejorada y determinar la ventana de pH óptimo para la formulación.
- Los polipéptidos MIC-1 con extensiones en el N-terminal se disolvieron en una mezcla de agua y etanol (60 % de agua y 40 % de etanol) con un intervalo de concentración entre 3
- 10
- mg/ml a 10 mg/ml. El disolvente se evaporó con SpeedVac (Concentrator Plus, Eppendorf) durante 6 horas para obtener el sedimento del polipéptido MIC-1 con extensión en el N-terminal.
- Los tampones anteriores se usaron para este ensayo de curva de solubilidad dependiente de pH: tampón acetato (pH 3 a pH 6); tampón Tris (pH 7 a pH 9); tampón CAPS (pH 10 a pH
- 15
- 11).

Los tampones se añadieron a cada pocillo de la placa de 96 pocillos junto con los polipéptidos MIC-1 con extensiones en el N-terminal. La cantidad usada puede no ser exactamente la misma pero todas apuntan a una concentración teórica dentro de 12-18 mg/ml. La concentración de polipéptido MIC-1 con extensión en el N-terminal en el sobrenadante se determinó mediante UPLC (Tabla 6). En base a los resultados, la solubilidad del polipéptido MIC-1 con extensión en el N-terminal de la invención mejoró significativamente entre pH 6-9 en comparación con MIC-1ts. La ventana de pH óptimo de los polipéptidos MIC-1 con una extensión en el N-terminal cae en el intervalo de pH que se prefiere para la formulación, por ejemplo pH 6.5-8.5.

10 Tabla 6: Prueba de solubilidad dependiente del pH de polipéptidos MIC-1 con una extensión en el N-terminal (mg/ml)

SEQ ID NO	Estructura	pH								
		3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0
SEQ ID NO:1	MIC-1 (SEQ ID NO:1)	12.8	2.0	0.2	0.3	0.2	0.3	0.6	3.6	13.9
SEQ ID NO:74	MIC-1(R2A,N3E, A54E)	13.3	1.3	0.4	0.6	0.5	1.0	1.5	3.6	15.5
SEQ ID NO:76	MIC-1(R2A,N3E, H18E)	14.5	3.4	0.4	0.4	0.9	1.7	3.0	14.3	13.6
SEQ ID NO:79	MIC-1(R2A,N3E, L68E)	13.6	1.4	1.4	1.7	3.2	3.9	3.9	4.0	12.1
SEQ ID NO:80	MIC-1(R2A,N3E, A47E)	13.4	2.5	0.5	0.6	0.9	1.0	1.0	2.9	10.8
SEQ ID NO:85	MIC-1(R2A,N3E, R21E)	14.9	1.6	0.5	0.5	1.4	1.8	1.7	2.5	12.9
SEQ ID NO:88	MIC-1(R2A,N3E, A30E)	13.9	1.7	0.8	0.8	1.4	1.5	2.1	2.4	13.7
SEQ ID NO:90	AES-MIC-1-Δ1-3	12.5	2.3	0.6	0.7	1.2	0.9	1.0	3.6	8.9
SEQ ID NO:93	SPAGSPTS TEEGTSES ATPESGPG	12.9	1.5	1.2	1.4	5.1	12.8	13.0	13.0	13.5

	-MIC- 1(SEQ ID NO:1)									
SEQ ID NO:94	(AEE) ₆ AES -MIC-1-Δ1- 3	7.3	0.2	2.9	9.5	11.6	15.3	15.1	15.0	14.8
SEQ ID NO:95	(AEE) ₅ AES -MIC-1-Δ1- 3	11.9	0.3	1.6	5.7	9.4	15.8	15.7	14.9	15.0
SEQ ID NO:100	AAPEDEE TPEQEGS GSGSGSG S-MIC-1- Δ1-3	11.2	3.2	2.1	5.1	8.3	15.0	15.3	15.0	15.6
SEQ ID NO:104	(SEPATSG SETPG) ₂ - MIC-1-Δ1-3	12.2	0.7	0.3	1.0	4.6	16.4	16.9	16.0	16.2
SEQ ID NO:105	(SEPATSG SETPG) ₂ - MIC-1-Δ1- 3(M57E)	7.2	1.2	0.8	3.8	11.5	15.6	15.2	14.9	16.2
SEQ ID NO:106	(SEPATSG SETPG) ₂ - MIC-1-Δ1- 3(M57L)	10.1	0.2	0.3	1.6	4.3	15.6	16.1	16.1	16.8

Ejemplo 4: Solubilidad máxima de polipéptidos MIC-1 con una extensión en el N-terminal a pH 8

5

Para analizar la solubilidad máxima, los polipéptidos MIC-1 con una extensión en el N-terminal se disolvieron en una mezcla de agua y etanol (60 % de agua y 40 % de etanol) con un intervalo de concentración entre 3 mg/ml a 10 mg/ml. Después se hicieron alícuotas de la solución (150 µl cada pocillo) en una placa de 96 pocillos (Corning). El disolvente se evaporó con SpeedVac (Concentrator Plus, Eppendorf) durante 6 horas para obtener el sedimento del polipéptido MIC-1 con una extensión en el N-terminal. Se añadió tampón

10

Tris (pH 8.0, sin excipientes) en cada pocillo de la placa de 96 pocillos. La cantidad de tampón añadido al pocillo fue menor que la cantidad necesaria para disolver todo el sedimento en el pocillo, de manera que se logró la concentración máxima. La placa se agitó en un agitador de placas a 800 rpm (MixMate, Eppendorf) durante 2 horas. El sedimento se centrifugó a 3,600 g durante 5 min. Los sobrenadantes se transfirieron a una placa de 96

pocillos profundos y se diluyeron 20 veces con etanol al 40 %. Después, todas las muestras se sometieron a UPLC (Acquity, Waters), lector de placas (Infinite M200 pro, Tecan) y espectrómetro UV (NanoDrop 8000, Thermo Scientific) para determinar la concentración (Tabla 7).

- 5 Basado en los resultados, la solubilidad de los polipéptidos MIC-1 con una extensión en el N-terminal de la invención mejoró significativamente a pH 8.0. Especialmente, los polipéptidos MIC-1 con una extensión en el N-terminal lograron una solubilidad de más de 30 mg/ml a pH 8.0.

Tabla 7: Prueba de solubilidad máxima de polipéptidos MIC-1 con una extensión en el N-terminal a pH 8.0

10

SEQ ID NO	Estructura	Solubilidad (mg/ml)
SEQ ID NO:96	(AEE) ₃ AES-MIC-1-Δ1-3	36.0
SEQ ID NO:95	(AEE) ₅ AES-MIC-1-Δ1-3	35.0
SEQ ID NO:94	(AEE) ₆ AES-MIC-1(SEQ ID NO:1)	39.0
SEQ ID NO:93	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG-MIC-1	44.5
SEQ ID NO:92	(GEPS) ₅ -MIC-1(SEQ ID NO:1)	35.1
SEQ ID NO:100	AAPEDEETPEQEGSGSGSGSGS-MIC-1-Δ1-3	35.7
SEQ ID NO:79	MIC-1(R2A,N3E,L68E)	3.9
SEQ ID NO:85	MIC-1(R2A,N3E,R21E)	1.8
SEQ ID NO:88	MIC-1(R2A,N3E,A30E)	1.5
SEQ ID NO:74	MIC-1(R2A,N3E,A54E)	1.0
SEQ ID NO:76	MIC-1(R2A,N3E,H18E)	1.7
SEQ ID NO:77	MIC-1(R2A,N3E,K69E)	2.2
SEQ ID NO:80	MIC-1(R2A,N3E,A47E)	1.0
SEQ ID NO:90	AES-MIC-1-Δ1-3	0.9
SEQ ID NO:78	MIC-1(R2A,N3E,K107E)	1.9
SEQ ID NO:82	MIC-1(R2A,N3E,M57E)	1.7
SEQ ID NO:84	MIC-1(R2A,N3E,P11E)	1.6
SEQ ID NO:86	MIC-1(R2A,N3E,R53E)	1.9
SEQ ID NO:87	MIC-1(R2A,N3E,R67E)	1.8
SEQ ID NO:104	(SEPATSGSETPG) ₂ -MIC-1-Δ1-3	35.4
SEQ ID NO:105	(SEPATSGSETPG) ₂ -MIC-1-Δ1-3(M57E)	37.1
SEQ ID NO:106	(SEPATSGSETPG) ₂ -MIC-1-Δ1-3(M57L)	32.5
SEQ ID NO:107	A(GPEQGQEP) ₃ -MIC-1-Δ1-3	32.2
SEQ ID NO:108	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS-MIC-1-Δ1-3	40.0
SEQ ID NO:109	SEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEG-MIC-1-Δ1-3	40.0

SEQ ID NO:111	(SEPATSGSETPG) ₂ -MIC-1-Δ1-3(M57L, M86L)	31.1
SEQ ID NO:73	MIC-1(R2A, N3E)	0.9
SEQ ID NO: 164	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG- MIC-1-des-N3 (M57L, M86L)	40.0
SEQ ID NO:1	MIC-1(SEQ ID NO:1)	0.3

La solubilidad mejorada de los polipéptidos MIC-1 con una extensión en N se mantuvo en los compuestos de MIC-1, es decir, la adición de un prolongador no disminuyó significativamente la solubilidad (Ejemplo 12).

5 Métodos generales de tamizaje de la actividad in vitro

Ejemplo 5: Establecimiento de la línea celular BHK21-hGFRAL-IRES-hRET

El propósito de este ejemplo fue establecer un ensayo in vitro basado en células para analizar la actividad de MIC-1. Se transfectaron células de mamífero y se expresó de manera estable el receptor de MIC-1 en toda su longitud (hGFRAL) y su correceptor de señalización completo hRET51.

Los plásmidos que expresaban hGFRAL en toda su longitud y hRET51 en toda su longitud se construyeron insertando nucleótidos de ADN sintetizados que codifican hGFRAL en toda su longitud y hRET51 en toda su longitud en el vector de expresión de mamífero pEL. El IRES (sitio interno de entrada al ribosoma) es un enlazador usado comúnmente entre dos secuencias de ADN, de manera que las dos secuencias de ADN pueden traducirse simultáneamente a ARNm. La cadena principal del vector PEL fue proporcionada por la compañía Taihegene CRO.

Se sembraron dos millones de células BHK21 en una placa de Petri de 10 cm y se cultivaron durante la noche en medio de cultivo (DMEM + FBS al 10 % + PS al 1 %). Las células se transfectaron con plásmidos pEL-hGFRAL-IRES-hRET. Las células transfectadas se dividieron en nuevas placas de 10 cm a diferentes densidades y crecieron en medio de selección (DMEM + FBS al 10 % + PS al 1 % + 1 mg/ml de G418) durante más de 2 semanas para obtener clones individuales. Los clones individuales se transfirieron a placas de 6 pocillos y se cultivaron hasta el 100 % de confluencia. La expresión de ARNm de hGFRAL e hRET se midió mediante qPCR. Los clones transfectados con éxito se seleccionaron y se analizaron en cuanto a la unión de MIC-1.

Ejemplo 6: Ensayo de actividad in vitro de MIC-1 basado en células

Ambos polipéptidos MIC-1ts y MIC-1 con una extensión en el N-terminal indujeron la fosforilación de ERK1/2 en células estables BHK21-hGFRAL-IRES-hRET (Tabla 8). Puede concluirse a partir de los resultados que el complejo ternario de MIC-1, GFRAL y RET fosforila la proteína tirosina cinasa RET para inducir actividades in vivo de MIC-1 a través de vías de señales que comprenden la vía ERK/MAPK mediante la fosforilación de ERK1/2.

Los resultados del tamizaje de polipéptidos MIC-1 con una extensión en el N-terminal mediante el uso de BHK21-hGFRAL-IRES-hRET se muestran en la Tabla 8. Los

polipéptidos MIC-1 con extensiones en N solos o los análogos de MIC-1 con mutaciones en secuencia solos lograron una actividad in vitro igual o incluso mayor que la de MIC-1ts. Además, la combinación de extensión en N y mutaciones en secuencia también logró actividad similar.

5

Tabla 8: Actividad in vitro

SEQ ID NO	Estructura	EC50 pERK (nM)	Emáx (%)
SEQ ID NO:1	MIC-1(SEQ ID NO:1)	0.3	100 %
SEQ ID NO:73	MIC-1(R2A, N3E)	0.3	100 %
SEQ ID NO:74	MIC-1(R2A,N3E,A54E)	0.3	100 %
SEQ ID NO:75	MIC-1(R2A,N3E,A81E)	0.3	100 %
SEQ ID NO:76	MIC-1(R2A,N3E,H18E)	0.5	100 %
SEQ ID NO:77	MIC-1(R2A,N3E,K69E)	0.5	100 %
SEQ ID NO:78	MIC-1(R2A,N3E,K107E)	0.3	100 %
SEQ ID NO:79	MIC-1(R2A,N3E,L68E)	0.8	100 %
SEQ ID NO:80	MIC-1(R2A,N3E,A47E)	0.4	100 %
SEQ ID NO:81	MIC-1(R2A,N3E,L105E)	0.7	100 %
SEQ ID NO:82	MIC-1(R2A,N3E,M57E)	0.3	70 %
SEQ ID NO:83	MIC-1(R2A,N3E,P85E)	0.6	100 %
SEQ ID NO:84	MIC-1(R2A,N3E,P11E)	0.4	100 %
SEQ ID NO:85	MIC-1(R2A,N3E,R21E)	0.6	100 %
SEQ ID NO:86	MIC-1(R2A,N3E,R53E)	0.4	100 %
SEQ ID NO:87	MIC-1(R2A,N3E,R67E)	0.5	100 %
SEQ ID NO:88	MIC-1(R2A,N3E,A30E)	0.7	100 %
SEQ ID NO:89	AEEAES-MIC-1-Δ1-3	0.3	100 %
SEQ ID NO:90	AES-MIC-1-Δ1-3	0.3	100 %
SEQ ID NO:91	(AEE) ₂ AES-MIC-1-Δ1-3	0.4	100 %
SEQ ID NO:92	(GEPS) ₅ -MIC-1(SEQ ID NO:1)	0.5	100 %
SEQ ID NO:93	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG-MIC-1(SEQ ID NO:1)	0.4	100 %
SEQ ID NO:94	(AEE) ₆ AES-MIC-1	0.8	100 %
SEQ ID NO:95	(AEE) ₅ AES-MIC-1-Δ1-3	0.5	100 %
SEQ ID NO:96	(AEE) ₃ AES-MIC-1-Δ1-3	0.5	100 %
SEQ ID NO:97	AASPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG-MIC-1(SEQ ID NO:1)	0.4	100 %
SEQ ID NO:98	TSESATPESGPGTSESATPESGPG-MIC-1(R2A,N3E)	0.3	100 %
SEQ ID NO:99	AASPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG-MIC-1-Δ1-3	0.7	100 %

SEQ ID NO	Estructura	EC50 pERK (nM)	Emáx (%)
SEQ ID NO:100	AAPDEETPEQEGSGSGSGSGS-MIC-1- Δ 1-3	0.5	100 %
SEQ ID NO:101	AAPDEETPEQE-MIC-1- Δ 1-3	0.5	100 %
SEQ ID NO:102	AAPDEGTEETEGSGSGSGSGS-MIC-1- Δ 1-3	0.5	100 %
SEQ ID NO:103	SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPG-MIC-1- Δ 1-3	0.7	100 %
SEQ ID NO:104	(SEPATSGSETPG) ₂ -MIC-1- Δ 1-3	0.4	100 %
SEQ ID NO:105	(SEPATSGSETPG) ₂ -MIC-1- Δ 1-3(M57E)	0.6	60 %
SEQ ID NO:106	(SEPATSGSETPG) ₂ -MIC-1- Δ 1-3(M57L)	0.6	100 %
SEQ ID NO:107	A(GPEQGQEP) ₃ -MIC-1- Δ 1-3	0.8	100 %
SEQ ID NO:108	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS-MIC-1- Δ 1-3	0.4	100 %
SEQ ID NO:109	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG-MIC-1- Δ 1-3	0.4	100 %
SEQ ID NO:110	(SEPATSGSETPG) ₂ -MIC-1- Δ 1-3(M86L)	0.4	100 %
SEQ ID NO:111	(SEPATSGSETPG) ₂ -MIC-1- Δ 1-3(M57L, M86L)	0.4	100 %

Eficacia in vivo

Ejemplo 7: Efecto de polipéptidos MIC-1 con una extensión en el N-terminal sobre la ingesta de alimentos en ratas Sprague Dawley delgadas

- 5 La eficacia in vivo de los polipéptidos MIC-1 con una extensión en el N-terminal se midió en ratas Sprague Dawley machos delgadas de 9-11 semanas de edad. Los animales se inyectaron una vez al día con una dosis de 8 nmol/kg de peso corporal 1-2 h antes del inicio del período de oscuridad. Los compuestos se administraron por vía subcutánea (1-4 ml/kg) en solución tamponada apropiada. Los cambios en la ingesta de alimentos se midieron
- 10 mediante sistemas automáticos de monitoreo de alimentos (sistema BioDAQ y sistema HM2 para rata). En el sistema BioDAQ los animales se alojaron por separado; y en el sistema HM2 los animales se alojaron en grupos con hasta 3 animales por jaula. Cada compuesto se analizó en n=4-8 animales. Los animales se aclimataron durante al menos 7

días antes del experimento. Los datos recopilados se expresan como la ingesta diaria de alimentos (ingesta de alimentos de 24 horas) medida desde el inicio de cada fase de oscuridad diaria de 12 horas hasta la fase de oscuridad del día siguiente. Los cambios diarios en la ingesta de alimentos en respuesta al compuesto administrado se calcularon restando la ingesta diaria promedio de alimentos del grupo de vehículo de la ingesta diaria promedio de alimentos del grupo de tratamiento. Los cambios se consideraron significativos si $p < 0.1$ mediante el uso de una prueba t de Student de dos colas. Los resultados se expresan como la “máxima reducción” de la ingesta de alimentos en comparación con el vehículo (porcentaje) registrada durante el período de estudio. Los datos se expresan, además, como la “reducción acumulada” de la ingesta de alimentos que es la suma de las reducciones diarias significativas ($p < 0.1$) de la ingesta de alimentos (porcentaje) durante el período de estudio.

Tabla 9: Efecto de dosis diarias (8 nmol/kg) de polipéptidos MIC-1 con una extensión en N sobre la ingesta de alimentos en ratas SD delgadas.

SEQ ID NO	Estructura	Máxima Eficacia (%)	Acumulada Eficacia (%)
SEQ ID NO:1	MIC-1(SEQ ID NO:1)	68	361
SEQ ID NO:77	MIC-1(R2A,N3E,K69E)	46	247
SEQ ID NO:82	MIC-1(R2A,N3E,M57E)	72	395
SEQ ID NO:92	(GEPS) ₅ -MIC-1(SEQ ID NO:1)	84	469
SEQ ID NO:97	AASPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG-MIC-1(SEQ ID NO:1)	90	456
SEQ ID NO:98	TSESATPESGPGTSESATPESGPG-MIC-1(R2A,N3E)	90	503
SEQ ID NO:100	AAPDEETPEQEGSGSGSGSGS-MIC-1-Δ1-3	84	446
SEQ ID NO:101	AAPDEETPEQE-MIC-1-Δ1-3	75	408
SEQ ID NO:102	AAPDEGTEEETEGSGSGSGSGS-MIC-1-Δ1-3	82	423
SEQ ID NO:103	SEPATSGSETPGTSTEPESGSAPG-MIC-1-Δ1-3	82	452
SEQ ID NO:104	(SEPATSGSETPG) ₂ -MIC-1-Δ1-3	93	509
SEQ ID NO:105	(SEPATSGSETPG) ₂ -MIC-1-Δ1-3(M57E)	97	532
SEQ ID NO:106	(SEPATSGSETPG) ₂ -MIC-1-Δ1-3(M57L)	99	532
SEQ ID NO:107	A(GPEQGQEP) ₃ -MIC-1-Δ1-3	81	395
SEQ ID NO:108	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS	80	448

SEQ ID NO	Estructura	Máxima Eficacia (%)	Acumulada Eficacia (%)
	TEPS-MIC-1-Δ1-3		
SEQ ID NO:165	A(GPEQGQEPGEPQGQEPQPGEPEG Q)-MIC-1-Δ1-3	78	382
SEQ ID NO:109	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS TEPSEG-MIC-1-Δ1-3	82	445
SEQ ID NO:110	(SEPATSGSETPG) ₂ -MIC-1-Δ1-3 (M86L)	70	398
SEQ ID NO:111	(SEPATSGSETPG) ₂ -MIC-1-Δ1-3 (M57L/M86L)	85	462
SEQ ID NO:112	(SEPATSGSETPG) ₂ -MIC-1-Δ1-3 (M57E/H66E)	80	369
SEQ ID NO:113	(SEPATSGSETPG) ₂ -MIC-1-Δ1-3 (M57E/R67E)	67	266

Nota: * significa que la dosis de administración es 4 nmol/kg de peso corporal.

Los inventores encontraron sorprendentemente que estos polipéptidos MIC-1 con una extensión en N no solo aumentaron la solubilidad de las moléculas sino que también dieron

5 como resultado una eficacia igual o incluso mejor que la de MIC-1ts (Tabla 9). Por ejemplo, los compuestos de acuerdo con la SEQ ID NO: 105 y la SEQ ID NO: 106 tenían una eficacia in vivo máxima y acumulada que era 40-50 % mayor que la de MIC-1ts con dosificación subcutánea. El aumento en la eficacia se asoció, además, con un aumento en la solubilidad ya que los compuestos de acuerdo con la SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 104,

10 SEQ ID NO: 105 y SEQ ID NO: 106 tenían una solubilidad elevada y una eficacia in vivo significativamente mayor en comparación con MIC-1ts. Esta correlación parece no explicarse por los cambios en la Emáx in vitro ya que todos los compuestos en la Tabla 8, excepto el compuesto de acuerdo con la SEQ ID NO:105, tenían una Emáx comparable con MIC-1ts. De hecho, el compuesto de la SEQ ID NO:105 tenía una Emáx menor que la de

15 MIC-1ts y fue aún más eficaz que MIC-1ts in vivo. Además, las potencias in vitro fueron comparables entre los compuestos ya que ninguno de los compuestos tenía un EC50 que difería de MIC-1ts. Por lo tanto, la asociación entre el aumento de las eficacias in vivo y el aumento de la solubilidad es sorprendente y no puede explicarse simplemente por los cambios en la activación aumentada del receptor in vitro.

20 Ejemplo 8: Expresión de MIC-1 y eficiencia de eliminación de la Met inicial de diferentes bloques de 12-meros

En el cuerpo humano, la N-Formil-Metionina es reconocida por el sistema inmunitario como material extraño, o como una señal de alarma liberada por las células dañadas, y estimula al cuerpo para luchar contra una infección potencial (Pathologic Basis of Veterinary Disease5: Pathologic Basis of Veterinary Disease, por James F. Zachary, M. Donald McGavin). Además, la Metionina es un residuo inestable que podría oxidarse fácilmente. Por lo tanto, la eficiencia de escisión de N-Met es muy importante para la expresión de MIC-1.

Hay 4 tipos diferentes de 12meros, y todos ellos están compuestos por 3 Ser, 2 Pro, 2 Gly, 2 Thr, 2 Glu y 1 Ala. Sin embargo, los 12 residuos en cada repetición se disponen de diferentes maneras.

Poco se conoce sobre los efectos de los diferentes 12meros en el nivel de expresión y en la eficiencia de escisión de N-Met. Por lo tanto, la investigación sistemática de los polipéptidos MIC-1 que inician con 12-meros individuales y dobles respectivamente es muy necesaria.

El ADNc de polipéptido MIC-1 con extensión en el N-terminal se subclonó en un vector derivado de pET11b. La sobreexpresión de polipéptidos MIC-1 con una extensión en el N-terminal como cuerpos de inclusión o proteína soluble se indujo en E. coli con isopropil β-d-tiogalactósido (IPTG) 0.5 mM cuando la densidad celular alcanzó una DO600 de 1.0. Después del crecimiento continuo en TB durante 20 h a 37 °C, las células se cosecharon y se sonicaron en tampón A (Tris 20 mM, pH 8.0). La mezcla resultante se centrifugó a 10,000 g durante 20 min y se analizó mediante LC/MS y SDS-PAGE para confirmar el peso molecular.

La fermentación se llevó a cabo en un proceso discontinuo alimentado en medio químico definido como suplemento. El rendimiento de la fermentación dependió en gran medida de diferentes compuestos, que varió de 1 g/l a 8 g/l de compuesto a compuesto.

Los compuestos diseñados para la prueba de 12-meros individuales y el resultado se muestran en la Tabla 10 y la Figura 1.

Tabla 10: Eficiencia de eliminación de la Met inicial de los bloques de construcción de 12-meros individuales

Extensión en N	Secuencia de aminoácidos en N	Polipéptido MIC-1	Eficiencia de escisión de N-Met (%)
12mer-1	SPAGSPTSTEEG (SEQ ID NO: 166)	MIC-1 Δ1-3	N/A
12mer-2	TSESATPESGPG (SEQ ID NO: 167)		0
12mer-3	TSTEPSEGSAPG (SEQ ID NO: 168)		0

12mer-4	SEPATSGSETPG (SEQ ID NO: 169)		100
---------	----------------------------------	--	-----

N/A: significa que MIC-1 con la extensión en el N-terminal no se expresó en *E.coli*.

Los compuestos que portan 12-meros dobles se enumeran en la Tabla 11 y los resultados se muestran también (ver la Tabla 11 y la Figura 2).

5 Tabla 11: Eficiencia de eliminación de la Met inicial de los bloques de construcción de 12-meros dobles

SEQ ID NO	Extensión en N	Secuencia de aminoácidos en N	Polipéptido MIC-1	Eficiencia de escisión de N- Met (%)
N/A	12mer- (1+1)	SPAGSPTSTEEG- SPAGSPTSTEEG (SEQ ID NO: 170)	MIC-1 Δ1-3	N/A
N/A	12mer- (1+3)	SPAGSPTSTEEG- TSTEPSEGSAPG (SEQ ID NO: 171)		N/A
N/A	12mer- (1+4)	SPAGSPTSTEEG- SEPATSGSETPG (SEQ ID NO: 172)		N/A
N/A	12mer- (2+1)	TSESATPESGPG- SPAGSPTSTEEG (SEQ ID NO: 173)		58.1
N/A	12mer- (2+2)	TSESATPESGPG- TSESATPESGPG (SEQ ID NO: 174)		30.0
N/A	12mer- (2+3)	TSESATPESGPG- TSTEPSEGSAPG (SEQ ID NO: 175)		58.5
N/A	12mer- (2+4)	TSESATPESGPG- SEPATSGSETPG (SEQ ID NO: 176)		64.5
N/A	12mer- (3+1)	TSTEPSEGSAPG- SPAGSPTSTEEG (SEQ ID NO: 177)		10.0

N/A	12mer- (3+2)	TSTEPSEGSAPG- TSESATPESGPG (SEQ ID NO: 178)		1.0
N/A	12mer- (3+3)	TSTEPESGSAPG- TSTEPESGSAPG (SEQ ID NO: 179)		26.4
N/A	12mer- (3+4)	TSTEPSEGSAPG- SEPATSGSETPG (SEQ ID NO: 180)		10.5
N/A	12mer- (4+1)	SEPATSGSETPG- SPAGSPTSTEEG (SEQ ID NO: 12)		N/A
SEQ ID NO: 182	12mer- (4+2)	SEPATSGSETPG- TSESATPESGPG (SEQ ID NO: 13)		100
SEQ ID NO: 103	12mer- (4+3)	SEPATSGSETPG- TSTEPSEGSAPG (SEQ ID NO: 14)		100
SEQ ID NO: 104	12mer- (4+4)	SEPATSGSETPG- SEPATSGSETPG (SEQ ID NO: 181)		100

N/A: significa que el polipéptido MIC-1 con extensión en el N-terminal no se expresó en *E.coli*.

En conclusión, las extensiones en N que inician con el bloque de 12mer-1 podrían no expresarse en *E.coli*. Para los otros bloques de 12mer, se logró la expresión de proteínas pero solo 12mer-4, ya que la secuencia inicial dio como resultado la escisión completa de la metionina. Además, la eficiencia de escisión de N-met de la serie 12mer-2 es mejor que la de la serie 12mer-3.

Ejemplo 9: Nivel de expresión y relación de cuerpos de inclusión del polipéptido MIC-1 con extensión en N de 2* o 2.5*12-mero

1. Expresión de polipéptido MIC-1 con extensión en N de 2.5*12-mero

Ver el Ejemplo 8 para el método de producción de proteínas. Los resultados se muestran en la Tabla 12, la Figura 3 y la Figura 4.

Tabla 12: Constructos y producción de proteínas para la prueba de 2.5*12-mero

SEQ ID NO	Extensión en N	Secuencia de aminoácidos en N	Polipéptido MIC-1	UPLC Matraz de agitación (g/l/10DO)	UPLC Fermentador (g/l/10DO)

SEQ ID NO	Extensión en N	Secuencia de aminoácidos en N	Polipéptido MIC-1	UPLC Matraz de agitación (g/l/10DO)	UPLC Fermentador (g/l/10DO)
SEQ ID NO: 200	12mer- (4+2+1.6 último)	SEPATSGSET PG TSESATPESG PG TSTEEG (SEQ ID NO:28)	MIC-1 Δ 1-3	N.D.	
SEQ ID NO: 201	12mer- (4+2+2.6)	SEPATSGSET PG TSESATPESG PGTSESAT (SEQ ID NO:19)		0.197	
SEQ ID NO: 202	12mer- (4+2+2.6 inter)	SEPATSGSET PG TSESATPESG PGESATPE (SEQ ID NO:183)		0.206	
SEQ ID NO: 108	12mer- (4+2+3.6)	SEPATSGSET PG TSESATPESG PGTSTEPS (SEQ ID NO:70)		0.367	0.374
SEQ ID NO: 203	12mer- (4+2+3.6 inter)	SEPATSGSET PG TSESATPESG PG STEPSE (SEQ ID NO:184)		0.243	
SEQ ID NO: 109	12mer- (4+2+3.8)	SEPATSGSET PG TSESATPESG PGTSTEPSEG		0.273	0.162

SEQ ID NO	Extensión en N	Secuencia de aminoácidos en N	Polipéptido MIC-1	UPLC Matraz de agitación (g/l/10DO)	UPLC Fermentador (g/l/10DO)
		(SEQ ID NO:71)			
SEQ ID NO: 204	12mer- (4+2+4.6)	SEPATSGSET PG TSESATPESG PGSEPATS (SEQ ID NO:25)		0.373	
SEQ ID NO: 205	12mer- (4+3+1.6 último)	SEPATSGSET PG TSTEPSEGSA PGTSTEEG (SEQ ID NO:185)	MIC-1 Δ1- 3, M57L	0.195	
SEQ ID NO: 206	12mer- (4+3+2.6)	SEPATSGSET PG TSTEPSEGSA PGTSESAT (SEQ ID NO:186)		0.234	
SEQ ID NO: 207	12mer- (4+3+3.6)	SEPATSGSET PG TSTEPSEGSA PGTSTEPS (SEQ ID NO:187)		0.367	
SEQ ID NO: 208	12mer- (4+3+4.6)	SEPATSGSET PG TSTEPSEGSA PG SEPATS (SEQ ID NO:188)		0.324	

SEQ ID NO	Extensión en N	Secuencia de aminoácidos en N	Polipéptido MIC-1	UPLC Matraz de agitación (g/l/10DO)	UPLC Fermentador (g/l/10DO)
SEQ ID NO: 209	12mer- (4+4+1.6 último)	SEPATSGSET PG SEPATSGSET PGTSTEEG(S EQ ID NO:189)	MIC-1 Δ1- 3, M57L	0.148	
SEQ ID NO: 210	12mer- (4+4+2.6)	SEPATSGSET PG SEPATSGSET PG TSESAT (SEQ ID NO:190)	MIC-1 Δ1-3	0.361	
SEQ ID NO: 211	12mer- (4+4+2.6 inter)	SEPATSGSET PG SEPATSGSET PG ESATPE (SEQ ID NO:191)		N.D.	
SEQ ID NO: 212	12mer- (4+4+3.6)	SEPATSGSET PG SEPATSGSET PGTSTEPS (SEQ ID NO:192)	MIC-1 Δ1- 3, M57L	0.262	
SEQ ID NO: 213	12mer- (4+4+3.6 inter2)	SEPATSGSET PG SEPATSGSET PG STEPSE (SEQ ID NO:193)	MIC-1 Δ1-3	N.D.	

SEQ ID NO	Extensión en N	Secuencia de aminoácidos en N	Polipéptido MIC-1	UPLC Matraz de agitación (g/l/10DO)	UPLC Fermentador (g/l/10DO)
SEQ ID NO: 214	12mer- (4+4+4.6)	SEPATSGSET PG SEPATSGSET PG SEPATS (SEQ ID NO:194)		0.330	

Notas:”.6” significa los primeros 6aa de 12meros, “último” significa los últimos 6aa de 12meros, “inter” significa los 6aa internos de 12meros. “N.D.” significa “no detectado”.

Aunque el 12-mero extendido (6aa) se ubica a 24aa del N-terminal, los niveles de expresión del polipéptido MIC-1 con una extensión en el N-terminal varían mucho entre los diferentes grupos. Está claro que el fragmento de 12mer-1 no es adecuado para la expresión, lo que es consistente con los resultados anteriores. El promedio de los niveles de expresión de 12mer-(4+_+3.6) y -(4+_+4.6) son relativamente mayores que otros.

2. Relación de cuerpos de inclusión del polipéptido MIC-1 con extensión en N de 2* o 2.5*12-mero

Para la producción de proteínas a gran escala, el cuerpo de inclusión generalmente se considera como una buena opción debido principalmente a sus mejores propiedades de escalado, que incluyen principalmente: alto nivel de expresión, etapa de recuperación simple y alta pureza, resistencia a proteasas y buena estabilidad en el proceso.

Los polipéptidos MIC-1 con una extensión en el N-terminal podrían expresarse ya sea como cuerpo de inclusión o en forma soluble, lo que depende principalmente del pI de los compuestos y la longitud de la extensión. Los resultados se muestran en la Tabla 13 y la Figura 4.

Tabla 13: Solubilidad en el citosol celular y sus valores de pI

SEQ ID NO	Extensión en N	Secuencias de la extensión en N	Polipéptid o MIC-1	Relación de cuerpos de inclusión★	Valores de pI
SEQ ID NO: 104	12mer-(4+4)	SEPATSGSET PG SEPATSGSET PG (SEQ ID NO: 181)	MIC-1 Δ1-3	100 %	5.8
SEQ ID	12mer-(4+2+3.6)	SEPATSGSET		100 %	5.5

SEQ ID NO	Extensión en N	Secuencias de la extensión en N	Polipéptid o MIC-1	Relación de cuerpos de inclusión★	Valores de pI
NO: 108		PG TSESATPESG PGTSTEPS (SEQ ID NO:70)			
SEQ ID NO: 109	12mer-(4+2+3.8)	SEPATSGSET PG TSESATPESG PGTSTEPSEG (SEQ ID NO:71)		90 %	5.2
SEQ ID NO: 215	12mer-(4+2)- GPEQGPEQ	SEPATSGSET PG TSESATPESG PGGPEQGPE Q (SEQ ID NO:195)		90 %	5.2
SEQ ID NO: 216	12mer-(4+2)- GEPSGEPS	SEPATSGSET PG TSESATPESG PG GEPSGEPS (SEQ ID NO:196)		95 %	5.2
SEQ ID NO: 112	12mer-(4+4) M57E, H66E	SEPATSGSET PG SEPATSGSET PG (SEQ ID NO: 181)		70 %	5.0
SEQ ID NO: 113	12mer-(4+4) M57E, R67E	SEPATSGSET PG SEPATSGSET PG (SEQ ID NO:		70 %	5.0

SEQ ID NO	Extensión en N	Secuencias de la extensión en N	Polipéptid o MIC-1	Relación de cuerpos de inclusión★	Valores de pI
		181)			
SEQ ID NO: 217	12mer-(tres repeticiones)	SEPATSGSET PG TSESATPESG PG TSTEPSEGSA PG (SEQ ID NO: 197)	MIC-1- des-N3	85 %	5.4
SEQ ID NO: 218	12mer-(cuatro repeticiones)	SEPATSGSET PG TSESATPESG PG TSTEPSEGSA PG TSTEPSEGSA PG (SEQ ID NO: 198)	MIC-1- des-N3	30 %	5.1
SEQ ID NO: 219	12mer-(cinco repeticiones)	SPAGSPTSTE EGTSESATPE SGPGTSTEPS EGSAPGSPA GSPTSTEEGT STEPSEGSAP G (SEQ ID NO: 199)	MIC-1	0 %	4.8
SEQ ID NO: 220	12mer-(4+4) M57E, H66E, R67E	SEPATSGSET PG SEPATSGSET PG (SEQ ID NO: 181)	MIC-1 Δ1-3	0 %	4.7
SEQ ID NO: 221	12mer-(4+2+3.6) M57E, R67E	SEPATSGSET PG		0 %	4.7

SEQ ID NO	Extensión en N	Secuencias de la extensión en N	Polipéptido o MIC-1	Relación de cuerpos de inclusión★	Valores de pI
		TSESATPESG PGTSTEPS (SEQ ID NO:70)			

Nota: ★ El número aquí se estima mediante SDS-PAGE.

La solubilidad de los polipéptidos MIC-1 con mutaciones en secuencia se muestra en la Tabla 14 y la Figura 5 (la secuencia del polipéptido MIC-1 es MIC-1 Δ1-3).

5 Tabla 14: Solubilidad del polipéptido MIC-1 con mutaciones en secuencia

Extensión en N	M en secuencia	Solubilidad en célula
SEPATSGSETPG SEPATSGSETPG (12mer-(4+4)) (SEQ ID NO: 181)	M57E	IBs
	M57E/H66E	Parcialmente soluble
	M57E/H66E/R67E	Completamente soluble
SEPATSGSETPG TSESATPESGPG- TSTEPS (12mer-(4+2+3.6)) (SEQ ID NO:70)	M57E	N.D.
	M57E/H66E	Completamente soluble
	M57E/H66E/R67E	Completamente soluble

Los polipéptidos MIC-1 que inician con 12-mero- (4+2+_), - (4+4+_) y – (4+3+_) se investigaron en cuanto a su capacidad de expresar cuerpo de inclusión. Se demostró que la relación de cuerpos de inclusión es >90 % cuando pI>5.1. Además, los polipéptidos MIC-1

con mutaciones en secuencia M57E/H66E expresaron principalmente fracciones solubles.
Ejemplo 9: Producción de polipéptidos MIC-1 con una extensión en el N-terminal que incluye una mutación de Cys

Para aumentar la semivida de los polipéptidos MIC-1 con una extensión en el N-terminal, las diferentes cadenas de ácidos grasos que se usaron para la prolongación se conjugaron a la extensión en el N-terminal a través de la alquilación mediada por una cisteína introducida por mutación dirigida al sitio. La posición para la mutación de Cys se ha mapeado sistemáticamente y los polipéptidos MIC-1 resultantes con una extensión en el N-terminal se volvieron a plegar y se purificaron de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 8.

1. Introducir una mutación de Cys en la extensión en el N-terminal para la prolongación

Un total de 20 mutantes de cisteína diferentes se generaron por mutaciones dirigidas al sitio mediante el uso del método de PCR y los constructos que se enumeran en la Tabla 15.

Tabla 15: Constructos que tienen la mutación de Cys en diferentes posiciones

Constructos (SEQ ID NO)	Extensión en el N-terminal	Mutación de Cys	Polipéptido MIC-1	Relación de cuerpos de inclusión★	Valores de pI
SEQ ID NO: 301	SEPATCGSET PG- TSESATPESG PG-TSTEPS (SEQ ID NO: 223)	S(-25)C	MIC-1, des-N3	100 %	5.7
SEQ ID NO: 302	SEPATSGCET PG- TSESATPESG PG- TSTEPS(SEQ ID NO: 224)	S(-23)C		100 %	5.7
SEQ ID NO: 288	SEPCTSGSET PG- TSESATPESG PG- TSTEPSEG(SE Q ID NO: 225)	A(-29)C		100 %	5.4
SEQ ID NO: 291	SEPATCGSET PG- TSESATPESG PG- TSTEPSEG(SE Q ID NO: 226)	S(-27)C		100 %	5.4
-	SEPATSCSET PG- TSESATPESG PG- TSTEPSEG(SE Q ID NO: 227)	G(-26)C		100 %	5.4
-	SEPCTSGSET PG- TSESATPESG	A(-29)C	MIC-1, des-N3, M57L	100 %	5.4

	PG-TSTEPSEG(SEQ ID NO: 225)				
-	SEPATSCSET PG-TSESATPESG PG-TSTEPSEG(SEQ ID NO: 227)	G(-26)C		100 %	5.4
-	SEPCTSGSET PG-TSESATPESG PG-TSTEPSEG(SEQ ID NO: 228)	A(-29)C		100 %	5.4
-	SEPACSGSET PG-TSESATPESG PG-TSTEPSEG(SEQ ID NO: 229)	T(-28)C		100 %	5.4
SEQ ID NO: 289	SEPATSCSET PG-TSESATPESG PG-TSTEPSEG(SEQ ID NO: 227)	G(-26)C	MIC-1, des-N3, M57L, M86L	100 %	5.4
SEQ ID NO: 303	SEPATSGCET PG-TSESATPESG PG-TSTEPSEG(SEQ ID NO: 230)	S(-25)C		100 %	5.4
SEQ ID NO: 304	SEPATSGSEC PG-TSESATPESG PG-TSTEPSEG(SEQ ID NO: 231)	T(-23)C		100 %	5.4

SEQ ID NO: 305	SEPATSGSET PC- TSESATPESG PG- TSTEPSEG(SE Q ID NO: 232)	G(-21)C		100 %	5.4
SEQ ID NO: 306	SEPATSGSET PG- TCESATPESG PG- TSTEPSEG(SE Q ID NO: 233)	S(-19)C		100 %	5.4
SEQ ID NO: 307	SEPATSGSET PG- TSECATPESG PG- TSTEPSEG(SE Q ID NO: 234)	S(-17)C		100 %	5.4
SEQ ID NO: 292	SEPATSGSET PG- TSESACPESG PG- TSTEPSEG(SE Q ID NO: 235)	T(-15)C		100 %	5.4
SEQ ID NO: 308	SEPATSGSET PG- TSESATPECG PG- TSTEPSEG(SE Q ID NO: 236)	S(-12)C		100 %	5.4
SEQ ID NO: 309	SEPATSGSET PG- TSESATPESC PG- TSTEPSEG(SE Q ID NO: 237)	G(-11)C		100 %	5.4
SEQ ID NO: 310	SEPATSGSET PG- TSESATPESG	T(-6)C		100 %	5.4

	PG- TSCEPSEG(SE Q ID NO: 238)				
SEQ ID NO: 293	SEPATSGSET PG- TSESATPESG PG- TSTEPCEG(SE Q ID NO: 239)	S(-3)C		100 %	5.4
SEQ ID NO: 316	GEQPCEQPGE QPGEQPGEQP GEQPGEQP (SEQ ID NO: 317)	G(-24)C	MIC-1	100 %	5.3

N.A.=No disponible.

*: El número entre paréntesis (de la Columna mutación de Cys) significa la distancia entre la Cys y el aminoácido N-terminal del polipéptido MIC-1.

Muestra que el nivel de expresión del polipéptido MIC-1 con una extensión en el N-terminal con una mutación de Cys es similar a la de aquellos sin mutación de Cys.

2. Replegamiento y purificación del polipéptido MIC-1 con una extensión en el N-terminal que incluye una mutación de Cys

El homodímero de MIC-1ts contiene un total de 9 pares de enlaces disulfuro y en teoría, la introducción de una nueva cisteína perturbará la correspondencia original de los enlaces disulfuros mediante la mezcla de enlaces disulfuro, lo que podría disminuir aún más el rendimiento de replegamiento. Mientras en nuestros experimentos, es sorprendente encontrar que estos mutantes de Cys enumerados se analizaron en el mismo tampón de replegamiento usado para el replegamiento de MIC-1ts y mostraron un rendimiento de replegamiento similar (~ 50 % a 60 %) al de MIC-1ts o al polipéptido MIC-1 de solubilidad modificada genéticamente con una extensión en el N-terminal descrita.

3. Solubilidad dependiente del pH y solubilidad máxima del polipéptido MIC-1 con una extensión en el N-terminal que incluye una mutación de Cys

La solubilidad dependiente del pH y la solubilidad máxima se determinaron mediante el mismo método descrito en el Ejemplo 4. Los resultados se muestran en la Tabla 16 y la Tabla 17.

Tabla 16: Prueba de solubilidad dependiente del pH del polipéptido MIC-1 con una extensión en el N-terminal que incluye una mutación de Cys

SEQ ID NO	Estructura	pH								
		3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0
SEQ ID NO: 288	SEPCTSGSETP GTSESATPESG PGTSTEPSEG- MIC-1-Δ3	8.81	4.22	1.34	5.18	13.52	15.65	15.1	15.84	15.97
SEQ ID NO: 289	SEPATSCSETP GTSESATPESG PGTSTEPSEG- MIC-1 (M57L, M86L)	7.91	5.12	1.37	5.91	13.59	15.62	15.15	15.83	16.47
SEQ ID NO: 316	GEQPCEQPGE QPGEQPGEQP GEQPGEQP- MIC-1	6.24	3.14	2.54	4.71	9.43	13.24	14.21	15.21	15.2

Tabla 17: Prueba de determinación de la solubilidad máxima del polipéptido MIC-1 con una extensión en el N-terminal que incluye una mutación de Cys

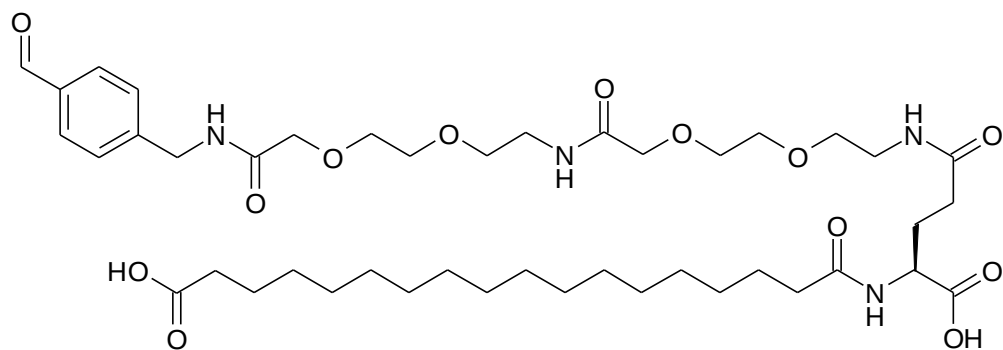
SEQ ID NO	Estructura	Solubilidad máxima (mg/ml)
SEQ ID NO: 288	SEPCTSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG- MIC-1-Δ3	36.1
SEQ ID NO: 289	SEPATSCSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG- MIC-1 (M57L, M86L)	38.4
SEQ ID NO: 316	GEQPCEQPGEQPGEQPGEQPGEQPGEQP- MIC-1	32.1

- 5
- Puede observarse que una mutación de Cys no afecta la solubilidad mejorada obtenida mediante la adición de una extensión de aminoácidos en el N-terminal a un polipéptido MIC-1.

Ejemplo 10: Preparación de prolongadores para compuestos de MIC-1

- 10
- Ejemplo 10.1: Preparación de ácido 17-[(S)-1-carboxi-3-(2-{2-[(2-{2-[(4-formilbencilcarbamoil)metoxi]etoxi}etilcarbamoil)-metoxi]etoxi}etilcarbamoil)propilcarbamoil]heptadecanoico

5



(Fórmula A)

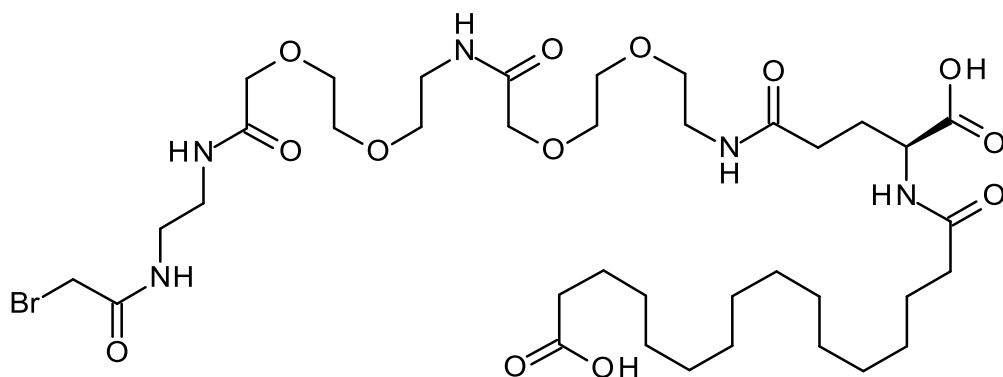
10 Se trató t-Bu-N-(4-formilbencil) carbamato (100 mg) con TFA/DCM (1:1) durante 1 h. La
mezcla se concentró al vacío y se concentró junto con tolueno (dos veces). El residuo se
disolvió en THF (2.5 ml) y se añadió una solución de ácido 17-((S)-1-carboxi-3-{2-[2-({2-
[2-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxicarbonilmetoxi)-
etoxi]etilcarbamoil}metoxi)etoxi]etilcarbamoil}propilcarbamoil)heptadecanoico (320 mg,
15 preparado como se describió anteriormente en el documento WO2009/083549) en THF (5
ml). Se añadió DIPEA (0.5 ml) lentamente. Después de 130 min, la mezcla se concentró al
vacío. El residuo se disolvió en EtOAc y HCl 1 N. La capa orgánica se extrajo con HCl 1 N
y salmuera. La capa orgánica se secó (Na₂SO₄) y se concentró al vacío para dar el
compuesto del título como un sólido blanco, que se usó sin purificación adicional.
20 Rendimiento 234 mg (72 %)

LCMS2: Masa teórica: 851.0 Encontrada: 851.5 (M+1).

Ejemplo 10.2 (C16): Preparación de ácido 16-[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-
bromoacetil)amino]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-
carboxi-4-oxo-butil]amino]-16-oxo-hexadecanoico

25

30



(Fórmula B)

35 Protocolo de síntesis en fase sólida:

Una solución de N-(benciloxycarbonilo)succinimida (ZOSu, 100 g, 401 mmol) en
diclorometano (500 ml) se añadió en forma de gotas durante 2 horas a una solución de
etilendiamina (1, 189 ml, 2.81 mol) en diclorometano (750 ml). Después de 30 minutos la
suspensión se filtró y los sólidos se lavaron con diclorometano. El filtrado se evaporó hasta
40 la sequedad y el residuo se diluyó con tolueno (1.00 L) y agua (0.50 L). La mezcla

resultante se filtró y el filtrado se separó para proporcionar dos fases. La fase acuosa contenía el producto; por lo tanto se extrajo con diclorometano (2 x 250 ml). Todas las fases orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se diluyó con tolueno (750 ml) y se extrajo con ácido clorhídrico acuoso 2 M (500 ml) y ácido clorhídrico acuoso 1 M (100 ml). Las fases acuosas ácidas se combinaron y se alcalinizaron con una solución de hidróxido de sodio (60.0 g, 1.50 mol) en agua (90 ml). La mezcla resultante se extrajo con diclorometano (4 x 200 ml), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró, se concentró al vacío y se diluyó con hexanos (200 ml). Se añadió solución de cloruro de hidrógeno 4 M en éter (100 ml, 400 mmol) a la solución, la suspensión resultante se concentró al vacío y se diluyó con hexanos (1.00 L). El sólido precipitado se filtró, se lavó con hexanos y se secó al vacío para dar clorhidrato de éster bencílico del ácido (2-amino-etil)-carbámico como un polvo blanco. Rendimiento: 62.62 g (68 %).

RF (SiO₂, diclorometano/metanol 4:1): 0.25 (base libre).

Espectro ¹H NMR (300 MHz, AcOD-d₄, 80 °C, dH): 7.42-7.26 (m, 5 H); 5.16 (s, 2 H); 3.60 (t, J=5.7 Hz, 2 H); 3.32 (t, J=5.7 Hz, 2 H).

La resina de 2-clorotritilo de 100-200 mesh a 1.7 mmol/g (3, 40.1 g, 68.1 mmol) se dejó hinchar en diclorometano seco (250 ml) durante 20 minutos. Una solución de ácido {2-[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-etoxi]-etoxi}-acético (Fmoc-Ado-OH, 17.5 g, 45.4 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (30.1 ml, 173 mmol) en diclorometano seco (50 ml) se añadió a la resina y la mezcla se agitó durante 5 horas. La resina se filtró y se trató con una solución de N,N-diisopropiletilamina (15.8 ml, 90.8 mmol) en mezcla de metanol/diclorometano (4:1, 250 ml, 2 x 5 min). Después la resina se lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 250 ml), diclorometano (2 x 250 ml) y N,N-dimetilformamida (3 x 250 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 30 min, 3 x 250 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 250 ml), 2-propanol (2 x 250 ml) y diclorometano (300 ml, 2 x 250 ml). Una solución de ácido {2-[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-etoxi]-etoxi}-acético (Fmoc-Ado-OH, 26.3 g, 68.1 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 24.2 g, 68.1 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (21.4 ml, 123 mmol) en N,N-dimetilformamida (140 ml) se añadió a la resina y la mezcla se agitó durante 1 hora. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 250 ml), diclorometano (2 x 250 ml) y N,N-dimetilformamida (250 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 30 min, 3 x 250 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 250 ml), 2-propanol (2 x 250 ml) y diclorometano (300 ml, 2 x 250 ml). Una solución de éster 1-terc-butílico del ácido (S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-pentanodioico (Fmoc-Glu-OtBu, 29.0 g, 68.1 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-cloro-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 24.2 g, 68.1 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (21.4 ml, 123 mmol) en N,N-dimetilformamida (140 ml) se añadió a la resina y la mezcla se agitó

durante 1 hora. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 250 ml), diclorometano (2 x 250 ml) y N,N-dimetilformamida (250 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 30 min, 3 x 250 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 250 ml), 2-propanol (2 x 250 ml) y diclorometano (300 ml, 2 x 250 ml). Una solución de ácido 16-(terc-butoxi)-16-oxohexadecanoico (23.3 g, 68.1 mmol), tetrafluoroborato de O-(6-clorobenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TCTU, 24.2 g, 68.1 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (21.4 ml, 123 mmol) en mezcla de N,N-dimetilformamida/diclorometano (4:1, 200 ml) se añadió a la resina. La resina se agitó durante 1 hora, se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 250 ml), diclorometano (2 x 250 ml), metanol (2 x 250 ml) y diclorometano (350, 6 x 250 ml). El producto se escindió de la resina mediante tratamiento con 2,2,2-trifluoroetanol (250 ml) durante 18 horas. La resina se filtró y se lavó con diclorometano (2 x 250 ml), mezcla de 2-propanol/diclorometano (1:1, 2 x 250 ml), 2-propanol (250 ml) y diclorometano (3 x 250 ml). Las soluciones se combinaron; el disolvente se evaporó y el producto crudo se purificó mediante cromatografía rápida en columna (Silicagel 60, 0.040-0.060 mm; eluyente: diclorometano/metanol 1:0-9:1). El ácido (S)-22-(terc-butoxicarbonil)-41,41-dimetil-10,19,24,39-tetraoxo-3,6,12,15,40-pentaoxa-9,18,23-triazadotetracontanoico puro se secó al vacío y se obtuvo como un aceite amarillo espeso amarillo pálido.

Rendimiento: 30.88 g (83 %).

RF (SiO₂, diclorometano/metanol 4:1): 0.30.

Espectro ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, dH): 7.36 (t, J=5.7 Hz, 1 H); 7.02 (t, J=5.4 Hz, 1 H); 6.55 (d, J=7.7 Hz, 1 H); 4.46 (m, 1 H); 4.18 (s, 2 H); 4.02 (s, 2 H); 3.83-3.36 (m, 16 H); 2.44-2.12 (m, 7 H); 2.02-1.86 (m, 1 H); 1.60 (m, 4 H); 1.47 (s, 9 H); 1.45 (s, 9 H); 1.36-1.21 (m, 20 H).

Método 4 de LC-MS:

Pureza: 100 %

Rt (Kinetex 4.6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 50:50 a 100:0 + FA al 0.1 %): 3.60 min.

m/z encontrada, z=1: 818.7 (M+H)⁺

Hexafluorofosfato de 2-(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU, 11.4 g, 30.1 mmol) y trietilamina (8.77 ml, 62.9 mmol) se añadieron posteriormente a una solución de ácido (S)-22-(terc-butoxicarbonil)-41,41-dimetil-10,19,24,39-tetraoxo-3,6,12,15,40-pentaoxa-9,18,23-triazadotetracontanoico (22.4 g, 27.4 mmol) en diclorometano seco (110 ml). Se añadió trietilamina (5.72 ml, 41.0 mmol) a una suspensión de clorhidrato de éster bencílico del ácido (2-amino-etil)-carbámico (6.94 g, 30.1 mmol) en diclorometano seco (165 ml) y la mezcla resultante se añadió a la solución anterior. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche, y después se evaporó hasta la sequedad. El residuo se disolvió nuevamente en acetato de etilo (500 ml); se lavó con ácido clorhídrico acuoso 1 M (2 x 200 ml), solución acuosa de carbonato de sodio al 5 % (2 x 200 ml, separación de fases muy lenta), ácido clorhídrico acuoso 1 M (8 x 200 ml) y salmuera;

se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó hasta la sequedad al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía rápida en columna (Silicagel 60, 0.040-0.060 mm; eluyente: diclorometano/metanol 95:5) para proporcionar el éster terc-butílico del ácido 15-[(S)-3-(2-{2-[(2-{2-[(2-benciloxicarbonilamino-etilcarbamoil)-metoxi]-etoxi]-etilcarbamoil)-metoxi]-etoxi}-etilcarbamoil)-1-terc-butoxicarbonil-propilcarbamoil]-pentadecanoico como un aceite espeso amarillo pálido.

Rendimiento: 23.84 g (88 %)

RF (SiO₂, diclorometano/metanol 9:1): 0.35

Espectro ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, dH): 7.39-7.26 (m, 6 H); 7.19 (t, J=6.3 Hz, 1 H); 6.91 (t, J=5.7 Hz, 1 H); 6.52 (d, J=7.5 Hz, 1 H); 5.83 (t, J=5.5 Hz, 1 H); 5.09 (s, 2 H); 4.41 (ddd, J=12.3, 4.6 y 4.3 Hz, 1 H); 3.99 (s, 2 H); 3.97 (s, 2 H); 3.71-3.30 (m, 20 H); 2.33-2.08 (m, 7 H); 1.97-1.83 (m, 1 H); 1.67-1.51 (m, 4 H); 1.45 (s, 9 H); 1.44 (s, 9 H); 1.35-1.20 (m, 20 H).

Método 4 de LC-MS

Pureza: 100 %

Rt (Kinetex 4.6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 50:50 a 100:0 + FA al 0.1 %): 4.18 min

m/z encontrada, z=1: 994.9 (M+H)⁺

Se añadió paladio sobre carbono (10 %, 1.27 g, 1.20 mmol) a una solución del compuesto anterior (23.8 g, 24.0 mmol) en metanol (350 ml) y la mezcla resultante se hidrogenó a presión normal durante 4 horas. El catalizador se filtró y el filtrado se evaporó hasta la sequedad. El residuo se evaporó varias veces a partir de diclorometano para eliminar los residuos de metanol y se secó al vacío para producir (S)-1-amino-25-(terc-butoxicarbonil)-4,13,22,27-tetraoxo-6,9,15,18-tetraoxa-3,12,21,26-tetraazadotetracontan-42-oato de terc-butilo como un aceite incoloro espeso.

Rendimiento: 20.50 g (99 %).

RF (SiO₂, diclorometano/metanol 9:1): 0.05.

Espectro ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, dH): 7.54 (t, J=5.7 Hz, 1 H); 7.41 (t, J=5.6 Hz, 1 H); 7.14 (t, J=5.5 Hz, 1 H); 6.68 (d, J=7.5 Hz, 1 H); 5.25 (bs, 2 H); 4.39 (td, J=8.3 y 4.2 Hz, 1 H); 4.01 (s, 4 H); 3.74-3.39 (m, 18 H); 2.96 (t, J=5.7 Hz, 2 H); 2.34-2.06 (m, 7 H); 1.97-1.83 (m, 1 H); 1.68-1.50 (m, 4 H); 1.45 (s, 9 H); 1.43 (s, 9 H); 1.37-1.19 (m, 20 H).

Método 4 de LC-MS

Pureza: 100 %

Rt (Kinetex 4.6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 50:50 a 100:0 + FA al 0.1 %): 1.43 min

m/z encontrada, z=1: 860.8 (M+H)⁺

Se añadió N,N-diisopropiletilamina (4.98 ml, 28.6 mmol) a una solución de la amina anterior (6, 20.5 g, 23.8 mmol) en diclorometano seco (290 ml) a -30 °C bajo argón. Se añadió bromuro de bromoacetilo (2.48 ml, 28.6 mmol) en forma de gotas y la solución resultante se agitó a -30 °C durante 3 horas adicionales. El baño de enfriamiento se retiró, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y después el disolvente se eliminó al vacío. El residuo se disolvió nuevamente en acetato de etilo (450 ml) y se lavó con solución

acuosa de ácido cítrico al 5 % (300 ml). Las fases se separaron en 1 hora. La capa orgánica se lavó con agua (300 ml) y la emulsión resultante se dejó separar durante la noche para dar 3 fases. La capa acuosa transparente se eliminó y las 2 fases residuales se agitaron con solución acuosa saturada de bromuro de potasio (100 ml) añadida. Las fases se dejaron separar durante la noche, después la acuosa se eliminó y la orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se eliminó al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía rápida en columna (Silicagel 60, 0.040-0.060 mm; eluyente: diclorometano/metanol 95:5) para proporcionar (S)-1-bromo-28-(terc-butoxicarbonil)-2,7,16,25,30-pentaoxo-9,12,18,21-tetraoxa-3,6,15,24,29-pentaazapentatetracontan-45-oato de terc-butilo como un sólido incoloro.

Rendimiento: 19.46 g (83 %).

RF (SiO₂, diclorometano/metanol 9:1): 0.25

Espectro ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, dH): 7.46 (m, 1 H); 7.33 (t, J=5.9 Hz, 1 H); 7.21 (t, J=5.1 Hz, 1 H); 6.92 (t, J=5.2 Hz, 1 H); 6.50 (d, J=7.5 Hz, 1 H); 4.41 (ddd, J=12.2, 4.5 y 4.2 Hz, 1 H); 4.01 (s, 4 H), 3.85 (s, 2 H); 3.75-3.40 (m, 20 H), 2.36-2.08 (m, 7 H); 1.99-1.84 (m, 1 H); 1.68-1.51 (m, 4 H), 1.46 (s, 9 H); 1.44 (s, 9 H); 1.38-1.19 (m, 20 H)

Método 4 de LC-MS

Pureza: 100 %

Rt (Kinetex 4.6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 50:50 a 100:0 + FA al 0.1 %): 3.51 min.

Encontrada: m/z, z=1: 980.9, 982.9 (M+H)⁺

El compuesto anterior (19.5 g, 19.8 mmol) se disolvió en ácido trifluoroacético (120 ml) y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 horas. El ácido trifluoroacético se eliminó al vacío y el residuo se evaporó a partir de diclorometano (6 x 200 ml). Se añadió éter de dietilo (200 ml) al residuo oleoso y la mezcla se agitó durante la noche para dar una suspensión. El producto sólido se filtró, se lavó con éter de dietilo y hexanos y se secó al vacío para proporcionar el producto del título ácido 15-[(S)-1-carboxi-3-[2-(2-[[2-(2-[[2-(2-bromoacetilamino)etilcarbamoil]metoxi]-etoxi)etilcarbamoil]metoxi]etoxi)etilcarbamoil]propilcarbamoil]pentadecanoico como un polvo blanco.

Rendimiento: 16.74 g (97 %).

Espectro ¹H NMR (300 MHz, AcOD-d₄, dH): 4.61 (dd, J=8.8 y 4.8 Hz, 1 H); 4.12 (s, 2 H), 4.10 (s, 2 H); 3.96 (s, 2 H); 3.77 -3.39 (m, 20 H), 2.49-2.18 (m, 7 H); 2.16-1.04 (m, 1 H); 1.71-1.56 (m, 4 H), 1.30 (bs, 20 H)

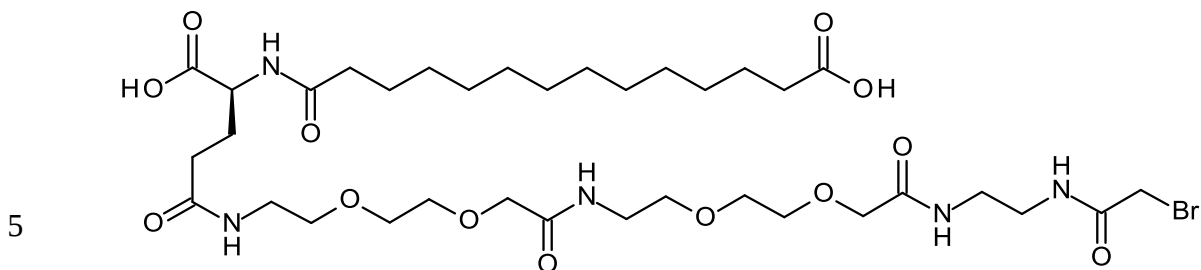
Método 4 de LCMS:

Pureza: 100 %

Rt (Kinetex 4.6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 50:50 a 100:0 + FA al 0.1 %): 3.51 min

m/z teórica, z=1: 869.8, Encontrada: m/z, z=1: 868.7, 870.7

Ejemplo 10.3 (C₁₄): Preparación de ácido 14-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-bromoacetil)amino]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]amino]-14-oxo-tetradecanoico



(Fórmula C)

El ácido 13-{(S)-1-carboxi-3-[2-(2-{[2-(2-{[2-(2-bromoacetilamino)etilcarbamoil]metoxi}-
10 etoxi)etil-carbamoil]metoxi}etoxi)etilcarbamoil]propilcarbamoil]tridecanoico se preparó mediante el mismo método descrito en el Ejemplo 10.2 lo que dio como resultado un aceite amarillo espeso.

Espectro ¹H NMR (300 MHz, AcOD-d₄, dH): 4.61 (dd, J=8.9 y 4.9 Hz, 1 H); 4.13 (s, 2 H);
15 4.11 (s, 2 H); 3.96 (s, 2 H); 3.77-3.40 (m, 20 H); 2.49-2.18 (m, 7 H); 2.16-2.07 (m, 1 H); 1.70-1.56 (m, 4 H); 1.31 (bs, 16 H).

Método 4 de LCMS:

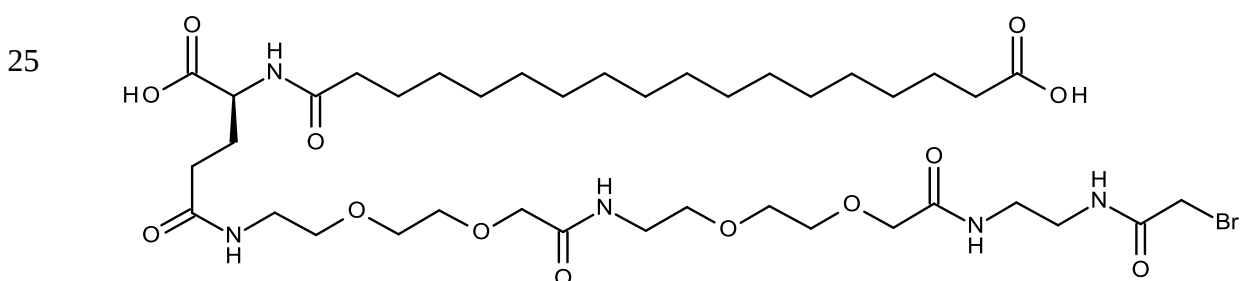
Pureza: 100 % (ELSD)

Rt (Kinetex 4.6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 20:80 a 100:0 + FA al 0.1 %): 2.94 min

m/z teórica, z=1: 841.9, Encontrada: m/z, z=1: 841.7, 843.7

20 Ejemplo 10.4 (C18): Preparación de

ácido 18-[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-bromoacetil)amino]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]amino]-18-oxo-octadecanoico



(Fórmula D)

Protocolo de síntesis en fase de solución:

Etapa 1: 18-[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-aminoetilamino)-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-benciloxycarbonil-4-oxo-butil]amino]-18-oxo-octadecanoato de bencilo
35 A una solución de etilendiamina (8.5 ml ml) en DCM (80 ml) y trietilamina (5.2 ml) a 0 °C se añadió una solución de 18-[(1S)-1-benciloxycarbonil-4-[2-[2-[2-[2-[2-(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-4-oxo-butil]amino]-18-oxo-octadecanoato de bencilo (26 g), preparada como se describe en el documento WO10029159, en DCM (320 ml) en forma de
40 gotas durante 75 min. Después de agitar durante 2 h el precipitado se filtró. Al filtrado se

añadió agua (200 ml) e isopropanol (50 ml). La mezcla se extrajo. La capa orgánica se secó mediante el uso de MgSO₄. El MgSO₄ se eliminó por filtración y el filtrado se secó al vacío para dar el compuesto del título 20.07 g (81 %) LCMS: Masa teórica: 956.2; m/z encontrada, z=1: 957.0

5 Etapa 2: 18-[[[(1S)-1-benciloxicarbonil-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-cloroacetil)amino]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-4-oxo-butil]amino]-18-oxo-octadecanoato de bencilo

Se disolvió ácido cloroacético (0.19 g) en DCM (15 ml). Se añadió N-hidroxisuccinimida (0.22 g) y EDAC HCl (0.42 g). Después de agitar durante 2.5 h se añadió 18-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-aminoetilamino)-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-benciloxicarbonil-4-oxo-butil]amino]-18-oxo-octadecanoato de bencilo (1.5 g) en DCM (5 ml). Después de agitar durante la noche a TA la mezcla se extrajo con HCl 1 M (2x20 ml) y agua/salmuera 2:1 (30 ml). La capa orgánica se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró al vacío para dar un aceite transparente, 1.37 g (84 %)

10 LCMS: Masa teórica: 1032.7; m/z encontrada, z=1: 1033.1

Etapa 3: ácido 18-[[[(1S)-1-carboxi-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-cloroacetil)amino]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-4-oxo-butil]amino]-18-oxo-octadecanoico

A una solución de 18-[[[(1S)-1-benciloxicarbonil-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-cloroacetil)amino]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-4-oxo-butil]amino]-18-oxo-octadecanoato de bencilo (10.5 g) en acetona (140 ml) se añadió PD/C al 10 % (1.0 g) después de la aireación con nitrógeno. Después de la hidrogenación durante 6 h, la mezcla se calentó a 40-50 °C antes de la filtración. El precipitado en el filtrado frío se aisló y se lavó con acetona y se secó para dar el compuesto del título, 7.42 g (85 %).

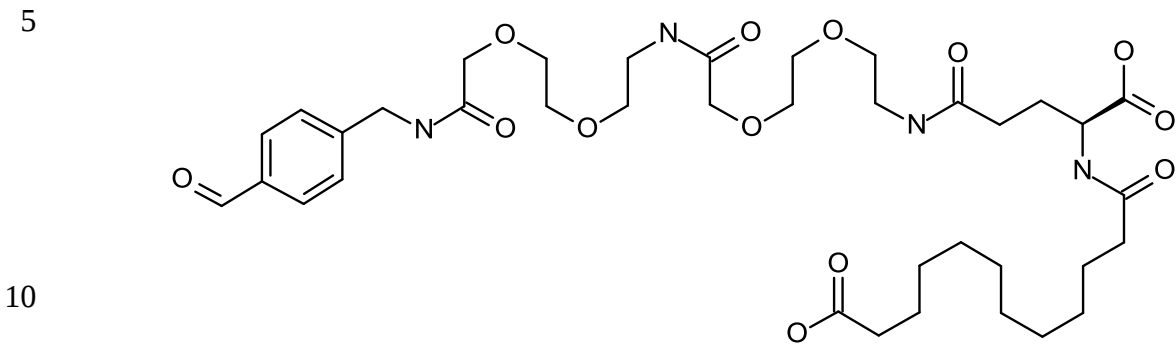
20 Etapa 4: ácido 8-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-bromoacetil)amino]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxo-butil]amino]-18-oxo-octadecanoico

A una suspensión de ácido 18-[[[(1S)-1-carboxi-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-cloroacetil)amino]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-4-oxo-butil]amino]-18-oxo-octadecanoico en acetona (60 ml) se añadió bromuro de sodio (5 eq, 1.21 g). La mezcla se agitó a TA en la oscuridad. Después de 2 h se añadió más bromuro de sodio (10 eq, 2.41 g). Después de 2 días se añadió más bromuro de sodio (5 eq, 1.21 g). Después de 5 días la mezcla se concentró. A la mitad del residuo se añadió DCM (30 ml), ácido ascórbico al 10 % (20 ml) y agua 30 ml. A la emulsión se añadió isopropanol (50 ml) y agua (30 ml). La fase orgánica se separó y se lavó dos veces con una mezcla de ácido ascórbico al 10 % (20 ml) e isopropanol (10 ml). La capa orgánica se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró para dar un aceite sólido, que se cristalizó en acetona y se aisló por filtración para dar el compuesto del título contaminado con el material de partida, 0.80 g (72 %).

35 40

LCMS: Masa teórica: 896.9. m/z encontrada, z=1: 898.9 (M+1)

Ejemplo 10.5 (C12): Preparación de ácido 12-[[[(1S)-1-carboxi-4-[2-[2-[2-[2-[2-[(4-formilfenil)metilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-4-oxo-butil]amino]-12-oxo-dodecanoico



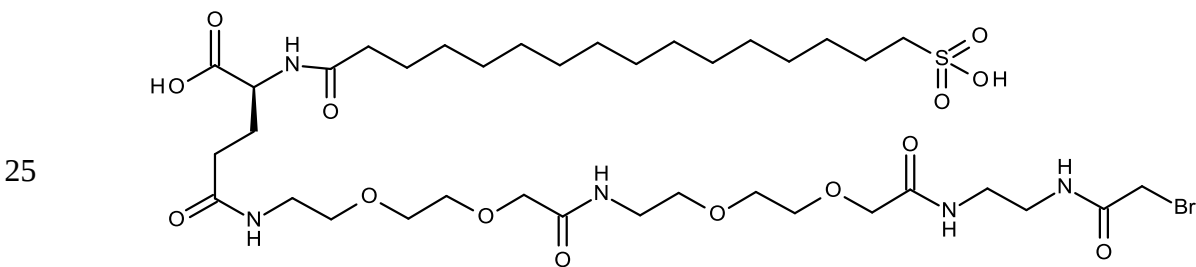
(Fórmula E)

El compuesto se preparó mediante el mismo método descrito para el ejemplo 10.1.

15 Espectro ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, dH): 7.39-7.29 (m, 1 H); 7.03-6.93 (m, 1 H); 6.59-6.51 (m, 1 H); 4.49-4.37 (m, 1 H); 4.15 (s, 2 H); 4.01 (s, 2 H); 3.78-3.39 (m, 16 H); 2.36-2.10 (m, 7 H); 2.01-1.85 (m, 1 H); 1.68-1.50 (m, 4 H); 1.48-1.41 (m, 18 H); 1.34-1.22 (m, 12 H).

Ejemplo 10.6: Preparación de ácido (2S)-5-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-bromoacetil)amino]etilamino]-2-oxoetoxi]etoxi]etilamino]-2-oxoetoxi]etoxi]etilamino]-5-oxo-2-(16-sulfohexadecanoilamino)pentanoico

20



(Fórmula F)

30 La resina de 2-clorotritilo de 100-200 mesh a 1.5 mmol/g (18.0 g, 27.0 mmol) se dejó hinchar en diclorometano seco (160 ml) durante 20 minutos. Una solución de ácido {2-[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-etoxi]-etoxi}-acético (Fmoc-OEG-OH, 6.94 g, 18.0 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (12.5 ml, 72.0 mmol) en diclorometano seco (100 ml) se añadió a la resina y la mezcla se agitó durante la noche. La resina se filtró y se trató con una solución de N,N-diisopropiletilamina (4.12 ml, 23.7 mmol) en mezcla de metanol/diclorometano (4:1, 2 x 5 min, 2 x 100 ml). Después la resina se lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 100 ml), diclorometano (2 x 100 ml) y N,N-dimetilformamida (3 x 100 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 100 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 100 ml), 2-propanol (2 x 100 ml) y diclorometano (3 x 100 ml). Una

35

40

solución de ácido {2-[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-etoxi]-etoxi}-acético (Fmoc-OEG-OH, 10.4 g, 27.0 mmol), tetrafluoroborato de 5-cloro-1-((dimetilamino)(dimetiliminio)metil)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol 3-óxido (TCTU, 9.60 g, 27.0 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (8.50 ml, 48.6 mmol) en N,N-dimetilformamida (100 ml) se añadió a la resina y la mezcla se agitó durante 2 horas. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 100 ml), diclorometano (2 x 100 ml) y N,N-dimetilformamida (3 x 100 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 100 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 100 ml), 2-propanol (2 x 100 ml) y diclorometano (3 x 100 ml). Una solución de éster 1-terc-butílico del ácido (S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-pentanodioico (Fmoc-gGlu-OtBu, 11.5 g, 27.0 mmol), tetrafluoroborato de 5-cloro-1-((dimetilamino)(dimetiliminio)metil)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol 3-óxido (TCTU, 9.60 g, 27.0 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (8.50 ml, 48.6 mmol) en N,N-dimetilformamida (100 ml) se añadió a la resina y la mezcla se agitó durante 2 horas. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 100 ml), diclorometano (2 x 100 ml) y N,N-dimetilformamida (2 x 100 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 100 ml). La resina (2) se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 100 ml), 2-propanol (2 x 100 ml) y diclorometano (3 x 100 ml). La resina se dividió en 4 partes iguales y esta síntesis se continuó con la cuarta parte de la cantidad original (4.50 mmol). Una solución de ácido sódico 16-sulfo-hexadecanoico (3, 6.16 g, 17.2 mmol, la preparación se describe en el procedimiento para la síntesis del compuesto REaD-22296, Lote núm.195-257-1), hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio (PyBOP, 8.95 g, 17.2 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (6.00 ml, 34.0 mmol) en dimetilsulfóxido (180 ml) se añadió a la resina y la mezcla se agitó durante 4 horas. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 100 ml), N,N-dimetilformamida/agua (2:1, 2 x 100 ml), dimetilsulfóxido (2 x 100 ml), agua (2 x 100 ml) y N,N-dimetilformamida (3 x 100 ml). El producto se escindió de la resina mediante tratamiento con 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (80 ml) durante 2 horas. La resina se filtró y se lavó con diclorometano (4 x 100 ml). Las soluciones se combinaron, los volátiles se evaporaron y el ácido (S)-22-(terc-butoxicarbonil)-10,19,24-trioxo-39-sulfo-3,6,12,15-tetraoxa-9,18,23-triazanonatriacontanoico crudo (4) se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional. Rendimiento: cuantitativo (basado en ELSD). Pureza por LC-MS: 96 %.

Rt LC-MS (Kinetex C18, 4.6 mm x 100 mm, acetonitrilo/agua 20:80 a 100:0 + FA al 0.1 %): 3.07 min.

LC-MS m/z: 812.9 (M+H)⁺.

Hexafluorofosfato de 1-((dimetilamino)(dimetiliminio)metil)-1H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridina 3-óxido (V) (HATU, 1.87 g, 4.92 mmol) y trietilamina (3.43 ml, 24.6 mmol) se añadieron posteriormente a una solución de ácido (S)-22-(terc-butoxicarbonil)-10,19,24-

trioxo-39-sulfo-3,6,12,15-tetraoxa-9,18,23-triazanonatriacontanoico (4.5 mmol) en diclorometano seco (40 ml). Se añadió trietilamina (1.82 ml, 13.1 mmol) a una suspensión de clorhidrato de éster bencílico del ácido (2-amino-etil)-carbámico (5, 1.93 g, 8.37 mmol) en diclorometano seco (20 ml) y la mezcla resultante se añadió a la solución anterior. La

5 mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Después de 16 horas, se añadió otra porción de hexafluorofosfato de 1-((dimetilamino)(dimetiliminio)metil)-1H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridina 3-óxido (V) (HATU, 0.38 g, 1 mmol), trietilamina (2.00 ml, 14.3 mmol) y clorhidrato de éster bencílico del ácido (2-amino-etil)-carbámico (5, 0.40 g, 1.70 mmol) y la mezcla se agitó durante otras 2 horas. La solución se lavó con ácido

10 clorhídrico acuoso 1 M (2 x 100 ml) y salmuera (50 ml), se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó hasta la sequedad. El ácido (S)-29-(terc-butoxicarbonil)-3,8,17,26,31-pentaoxo-1-fenil-2,10,13,19,22-pentaoxa-4,7,16,25,30-pentaazahexatetracontano-46-sulfónico crudo (6) se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

Rendimiento: cuantitativo (basado en ELSD).

15 Pureza por LC-MS: 83 % (ELSD).

Rt LC-MS (Kinetex C18, 4.6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 20:80 a 100:0 + FA al 0.1 %): 3.35 min.

LC-MS m/z: 989.1 (M+H)⁺.

Se añadió paladio sobre carbono (10 %, 0.22 g, 0.20 mmol) a una solución del compuesto

20 anterior (4.50 mmol) en metanol (100 ml) y la mezcla resultante se hidrogenó a presión normal durante 16 horas y después en sonicador durante 1 hora a 40 °C. El catalizador se filtró sobre Celite™ y el filtrado se evaporó hasta la sequedad a presión reducida. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa (columna DeltaPak C18, 15 m; 50 x 500 mm; acetonitrilo/agua 30:70 durante 80 min + TFA al 0.05 %) y se liofilizó para

25 proporcionar ácido (S)-1-amino-25-(terc-butoxicarbonil)-4,13,22,27-tetraoxo-6,9,15,18-tetraoxa-3,12,21,26-tetraazadotetracontano-42-sulfónico (7) como un sólido incoloro.

Rendimiento: 1.95 g (45 % de 1).

Pureza por LC-MS: 98 % (ELSD).

Rt LC-MS (Kinetex C18, 4.6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 20:80 a 100:0 + FA al 0.1 %):

30 2.87 min.

LC-MS m/z: 854.7 (M+H)⁺.

Se añadió 2,4,6-colidina (1.60 ml, 12.0 mmol) a una solución de la amina anterior (7, 2.06 g, 2.11 mmol) en N,N-dimetilformamida anhidra (20 ml) a 0 °C bajo argón. Se añadió anhídrido 2-bromoacético (0.68 g, 2.61 mmol) y la solución resultante se agitó a 0 °C

35 durante 1 hora. Después la mezcla de reacción se evaporó hasta la sequedad a presión reducida y el residuo se trituró con éter de dietilo (2 x 10 ml). El compuesto restante ácido (S)-1-bromo-28-(terc-butoxicarbonil)-2,7,16,25,30-pentaoxo-9,12,18,21-tetraoxa-3,6,15,24,29-pentaazapentatetracontano-45-sulfónico (8) se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

40 Rendimiento: cuantitativo (basado en ELSD).

Rt LC-MS (Kinetex C18, 4.6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 20:80 a 100:0 + FA al 0.1 %):
3.04 min.

LC-MS m/z: 976.9 (M+H)⁺.

El compuesto anterior (8, 2.00 mmol) se disolvió en diclorometano (20 ml), agua (2 ml) y ácido trifluoroacético (25 ml) y la solución resultante se agitó durante 2 horas. El ácido trifluoroacético se eliminó a presión reducida y el residuo se evaporó junto con diclorometano (3 x 80 ml). El residuo se purificó mediante HPLC preparativa (columna DeltaPak C18, 15 m; 50 x 500 mm; acetonitrilo/agua 30:70 durante 70 min + TFA al 0.05 %) y se liofilizó para proporcionar ácido (S)-1-bromo-2,7,16,25-tetraoxo-28-(16-sulfohexadecanamido)-9,12,18,21-tetraoxa-3,6,15,24-tetraazanonacosan-29-oico (9) como un sólido blanco.

Rendimiento: 1.92 g (98 % en 2 etapas).

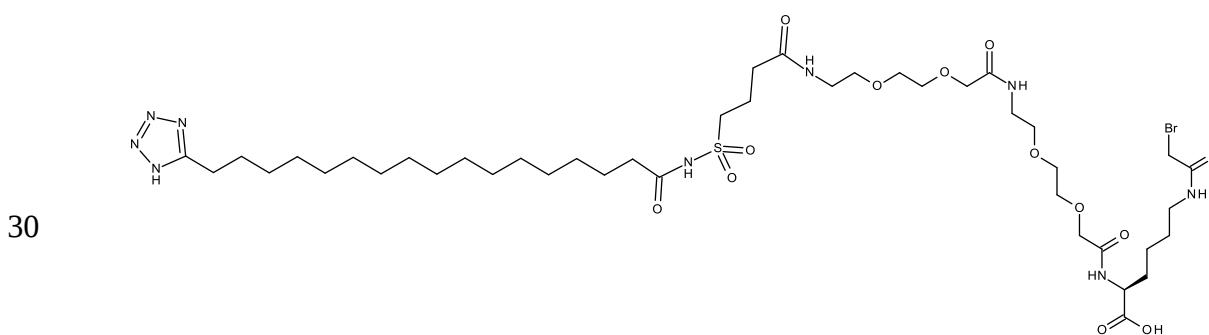
Espectro ¹H NMR (300 MHz, AcOD-d₄, 80 C, dH): 4.68-4.58 (m, 1 H); 4.20-4.08 (m, 4 H); 3.94 (s, 2 H); 3.82-3.64 (m, 12 H); 3.60-3.46 (m, 8 H); 3.20-3.10 (m, 2 H); 2.51 (t, J=7.2 Hz, 2 H); 2.37 (t, J=7.3 Hz, 2 H); 2.26 (bs, 1 H); 1.92-1.80 (m, 2 H); 1.73-1.62 (m, 2 H); 1.55-1.44 (m, 2 H); 1.43-1.29 (m, 21 H).

Pureza por LC-MS: 95 % (ELSD).

Rt LC-MS (Kinetex C18, 4,6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 20:80 a 100:0 + FA al 0.1 %):
20 2.73 min.

LC-MS m/z: 920.9 (M+H)⁺.

Ejemplo 10.7: Preparación de ácido (2S)-6-[(2-bromoacetil)amino]-2-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[4-[17-(1H-tetrazol-5-il)heptadecanoilsulfamoil]butanoilamino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]hexanoico



(Fórmula G)

35 La resina de Wang Fmoc-Lys(Mtt) a 0.29 mmol/g (17.24 g, 5.0 mmol) se dejó hinchar y se lavó en DMF (60 ml) durante 7 x 5 minutos. El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (2 x 60 ml, 2 x 15 min). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (6 x 60 ml). El Fmoc-OEG-OH se pesó para dos reacciones (2x20 mmol 15.416 g). Se disolvió en 120 ml de DMF con Oxyma (0.3 M) y se
40 dividió en volumen de 2x53 ml. Una solución de Fmoc-OEG-OH y Oxyma en DMF (53.2

ml, 0.3 M) se mezcló con DIC (26.6 ml, 0.6M) en DMF. El AA se activó durante 10 min después se añadió a la resina y la mezcla se agitó durante 8 horas.

La resina se drenó y se lavó con N,N-dimetilformamida (4 x 60 ml).

El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (2 x 60 ml, 2 x 15 min). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (6 x 60 ml)

Una solución de Fmoc-OEG-OH y Oxyma en DMF (53.2 ml, 0.3 M) se mezcló con DIC (26.6 ml, 0.6 M) en DMF. El AA se activó durante 10 min después se añadió a la resina y la mezcla se agitó durante 8 horas. La resina se drenó y se lavó con N,N-dimetilformamida (4 x 60 ml) y después con acetonitrilo (2 x 60 ml 2x8 h).

La resina anterior, a 0.27 mmol/g (2.46 g, 0.66 mmol) se hinchó en DMF (12 ml, 3x 5 min).

El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (2 x 12 ml, 1 x 15 min + 1 x 30 min). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 15 ml), DCM (2 x 15 ml), DMF (2 x 15 ml).

Se preparó una solución de ácido 4-[17-(1H-tetrazol-5-il)heptadecanoilsulfamoil]butanoico (0.966 g, 1.98 mmol), Oxyma (0.281 g, 1.98 mmol) y DIC (0.309 ml) en N,N-dimetilformamida (15 ml) y se dejó durante aproximadamente 10 min para activar el aminoácido. Después la mezcla se añadió al tubo de reacción y se agitó durante la noche.

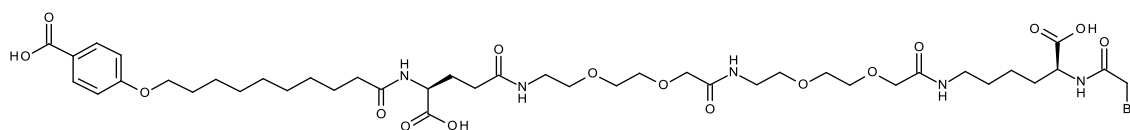
La resina se drenó y se lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 15 ml), DCM (5 x 15 ml). El grupo MTT se escindió mediante 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol/DCM/triisopropilsilano 80/18/2, 3 x 20 ml, (3 x 20 min con lavado con DCM entre cada tratamiento) y después se lavó con 4 x 20 ml de DCM. Se añadió ácido bromoacético (1.10 g, 7.92 mmol) y DIC (0.62 ml, 3.96 mmol) en 10 ml de DMF a la resina y se agitó durante 1 h. La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 20 ml) y diclorometano (5 x 20 ml).

El producto se escindió de la resina con TFA (98 %), agua (2 %), 20 ml durante 1 h y 20 ml durante ½ h. La resina se lavó con 20 ml de DCM. Los disolventes se evaporaron para dar un aceite amarillo. El aceite se disolvió en EtOAc (50 ml) y se lavó con agua 2 x 100 ml). Un sólido blanco precipitó en la capa de EtOAc. La cantidad de EtOAc se redujo al vacío y se filtró. El precipitado se lavó con EtOAc y se secó sobre el filtro para dar 270 mg de un sólido blanco.

LC-MS m/z: 1026.39 (M+H)+.

Ejemplo 10.8: Preparación de ácido 4-[10-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(5S)-5-[(2-bromoacetil)amino]-5-carboxipentil]amino]-2-oxoetoxi]etoxi]etilamino]-2-oxoetoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxobutil]amino]-10-oxodecoxi]benzoico

35



(Fórmula H)

La resina de 2-clorotritilo de 100-200 mesh a 1.5 mmol/g (1, 2.70 g, 4.05 mmol) se dejó hinchar en diclorometano seco (40 ml) durante 30 minutos. Una solución de ácido {2-[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-etoxi]-etoxi}-acético (Fmoc-OEG-OH, 1.04 g, 2.70 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (1.82 ml, 10.3 mmol) en diclorometano seco (40 ml) se
5 añadió a la resina y la mezcla se agitó durante la noche. La resina se filtró y se trató con una solución de N,N-diisopropiletilamina (0.94 ml, 5.40 mmol) en mezcla de metanol/diclorometano (4:1, 2 x 5 min, 2 x 40 ml). Después la resina se lavó con N,N-dimetilformamida (4 x 40 ml), diclorometano (4 x 40 ml) y N,N-dimetilformamida (4 x 40 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 10 min, 1 x 30 min, 2 x 40 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 40 ml), 2-propanol (2 x 40 ml), diclorometano (3 x 40 ml) y N,N-dimetilformamida (3 x 40 ml). Una solución de ácido {2-[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-etoxi]-etoxi}-acético (Fmoc-OEG-OH, 3.18 g, 8.20 mmol), tetrafluoroborato de 5-cloro-1-((dimetilamino)(dimetiliminio)metil)-1H-
10 benzo[d][1,2,3]triazol 3-óxido (TCTU, 2.93 g, 8.20 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (2.87 ml, 16.4 mmol) en N,N-dimetilformamida (40 ml) se añadió a la resina y la mezcla se agitó durante 1 hora. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (4 x 40 ml), diclorometano (4 x 40 ml) y N,N-dimetilformamida (4 x 40 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 10 min, 1 x 30 min, 2 x 40 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 40 ml), 2-propanol (2 x 40 ml), diclorometano (3 x 40 ml) y N,N-dimetilformamida (3 x 40 ml). Una solución de éster 1-terc-butílico del ácido (S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-pentanodioico (Fmoc-L-Glu-OtBu, 3.50 g, 8.20 mmol), tetrafluoroborato de 5-cloro-1-((dimetilamino)(dimetiliminio)metil)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol 3-óxido (TCTU, 2.93 g,
15 8.20 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (2.87 ml, 16.4 mmol) en N,N-dimetilformamida (40 ml) se añadió a la resina y la mezcla se agitó durante 1 hora. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (4 x 40 ml), diclorometano (4 x 40 ml) y N,N-dimetilformamida (4 x 40 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 10 min, 1 x 30 min, 2 x 40 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 40 ml), 2-propanol (2 x 40 ml), diclorometano (3 x 40 ml) y N,N-dimetilformamida (3 x 40 ml). Una solución de ácido 10-(4-(terc-butoxicarbonil)fenoxi)decanoico (CNB, 3.00 g, 8.20 mmol), tetrafluoroborato de 5-cloro-1-((dimetilamino)(dimetiliminio)metil)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol 3-óxido (TCTU, 2.93 g,
20 8.20 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (2.87 ml, 16.4 mmol) en N,N-dimetilformamida (40 ml) se añadió a la resina y la mezcla se agitó durante 1 hora. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (4 x 40 ml), diclorometano (4 x 40 ml) y N,N-dimetilformamida (4 x 40 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 10 min, 1 x 30 min, 2 x 40 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 40 ml), 2-propanol (2 x 40 ml), diclorometano (3 x 40 ml) y N,N-dimetilformamida (3 x 40 ml). Una solución de ácido 10-(4-(terc-butoxicarbonil)fenoxi)decanoico (CNB, 3.00 g, 8.20 mmol), tetrafluoroborato de 5-cloro-1-((dimetilamino)(dimetiliminio)metil)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol 3-óxido (TCTU, 2.93 g,
25 8.20 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (2.87 ml, 16.4 mmol) en N,N-dimetilformamida (40 ml) se añadió a la resina y la mezcla se agitó durante 1 hora. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (4 x 40 ml), diclorometano (4 x 40 ml), N,N-dimetilformamida (4 x 40 ml) y diclorometano (10 x 40 ml).

El producto se escindió de la resina mediante el tratamiento con 2,2,2-trifluoroetanol (40 ml) durante la noche. La resina se filtró y se lavó con diclorometano (4 x 40 ml). El
40 disolvente se evaporó hasta la sequedad para proporcionar ácido (S)-22-(terc-

butoxicarbonil)-33-(4-(terc-butoxicarbonil)fenoxi)-10,19,24-trioxo-3,6,12,15-tetraoxa-9,18,23-triazatritriacontanoico puro como un aceite amarillo.

Rendimiento: 2.26 g (100 %).

Espectro ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, dH): 7.95-7.87 (m, 2 H); 7.41-7.32 (m, 1 H); 7.05-6.95 (m, 1 H); 6.92-6.82 (m, 2 H); 6.61 (d, J=7.7 Hz, 1 H); 4.49-4.37 (m, 1 H); 4.15 (s, 2 H); 4.04-3.95 (m, 4 H); 3.76-3.36 (m, 17 H); 2.39-2.09 (m, 5 H); 2.04-1.85 (m, 1 H); 1.84-1.70 (m, 2 H); 1.67-1.52 (m, 10 H); 1.50-1.39 (m, 11 H); 1.37-1.24 (m, 8 H).

Pureza por LC-MS: 100 % (ELSD).

Rt LC-MS (Kinetex C18, 4.6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 50:50 a 100:0 + FA al 0.1 %): 4.49 min.

LC-MS m/z: 841.2 (M+H)⁺.

La resina de Wang-Fmoc-Lys(Mtt)-OH a 0.33 mmol/g (3, 4.15 g, 1.37 mmol) se dejó hinchar en diclorometano (50 ml) durante 30 minutos. El grupo Mtt se eliminó mediante tratamiento con 1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-ol al 80 % en diclorometano (2 x 5 min, 2 x 10 min, 1 x 15 min, 1 x 30 min, 6 x 50 ml). La resina 3 se lavó con diclorometano (4 x 70 ml), N,N-diisopropiletilamina al 10 % en diclorometano (1 x 50 ml) y diclorometano (2 x 50 ml).

Una solución de ácido (S)-22-(terc-butoxicarbonil)-33-(4-(terc-butoxicarbonil)fenoxi)-10,19,24-trioxo-3,6,12,15-tetraoxa-9,18,23-triazatritriacontanoico (2, 2.30 g, 2.73 mmol), tetrafluoroborato de 5-cloro-1-((dimetilamino)(dimetiliminio)metil)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol 3-óxido (TCTU, 0.97 g, 2.73 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (1.20 ml, 6.85 mmol) en N,N-dimetilformamida (50 ml) se añadió a la resina y la mezcla se agitó durante la noche. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (4 x 50 ml), diclorometano (4 x 50 ml) y N,N-dimetilformamida (4 x 50 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 10 min, 1 x 30 min, 2 x 50 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 50 ml), 2-propanol (2 x 50 ml), diclorometano (3 x 50 ml) y N,N-dimetilformamida (3 x 50 ml). Una solución de ácido bromoacético (0.76 g, 5.48 mmol), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC, 0.85 ml, 5.48 mmol), 2,4,6-colidina (0.91 ml, 5.48 mmol) en N,N-dimetilformamida (50 ml) se añadió a la resina y la mezcla se agitó durante 1 hora. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (4 x 50 ml), diclorometano (4 x 50 ml), N,N-dimetilformamida (4 x 50 ml) y diclorometano (10 x 40 ml). El producto (4) se escindió de la resina mediante el tratamiento con mezcla de ácido trifluoroacético/diclorometano (2:1, 30 ml) y durante 3 horas. La resina se filtró y se lavó con diclorometano (4 x 40 ml). El disolvente se evaporó hasta la sequedad para proporcionar ácido (2S,29S)-29-(2-bromoacetamido)-2-(10-(4-carboxifenoxi)decanamido)-5,14,23-trioxo-9,12,18,21-tetraoxa-6,15,24-triazatritriacontanoico puro (4) como un aceite amarillo.

Rendimiento: 1.33 g (100 %).

Espectro ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆ + DCl, dH): 7.93-7.76 (m, 2 H); 7.05-6.89 (m, 2 H); 4.16-4.05 (m, 3 H); 4.05-3.93 (m, 2 H); 3.93-3.79 (m, 5 H); 3.60-3.48 (m, 9 H); 3.46-

3.32 (m, 4 H); 3.30-3.21 (m, 2 H); 3.21-3.12 (m, 2 H); 3.10-3.00 (m, 2 H); 2.19-1.77 (m, 6 H); 1.77-1.49 (m, 7 H); 1.48-1.22 (m, 12 H).

Pureza por LC-MS: 95 % (ELSD).

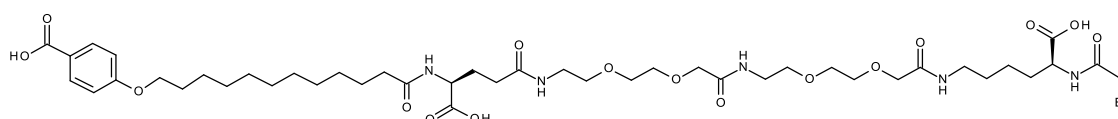
Rt LC-MS (Kinetex C18, 4.6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 20:80 a 100:0 + FA al 0.1 %):

5 3.02 min.

LC-MS m/z: 977.3 (M+H)⁺.

Ejemplo 10.9: Preparación de ácido 4-[12-[[[(1S)-4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(6S)-6-[(2-bromoacetil)amino]-6-carboxihexil]amino]-2-oxoetoxi]etoxi]etilamino]-2-oxoetoxi]etoxi]etilamino]-1-carboxi-4-oxobutil]amino]-12-oxododecoxi]benzoico

10



(Fórmula K)

15 La resina de cloruro de 2-clorotritilo de 100-200 mesh a 1.5 mmol/g (2.60 g, 3.90 mmol) se dejó hinchar en diclorometano seco (40 ml) durante 30 minutos. Una solución de ácido {2-[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-etoxi]-etoxi}-acético (Fmoc-OEG-OH, 1.02 g, 2.60 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (1.75 ml, 10.0 mmol) en diclorometano seco (40 ml) se añadió a la resina y la mezcla se agitó durante la noche. La resina se filtró y se trató con una solución de N,N-diisopropiletilamina (0.90 ml, 5.20 mmol) en mezcla de metanol/diclorometano (4:1, 2 x 5 min, 2 x 40 ml). Después la resina se lavó con N,N-dimetilformamida (4 x 40 ml), diclorometano (4 x 40 ml) y N,N-dimetilformamida (4 x 40 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 10 min, 1 x 30 min, 2 x 40 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 40 ml), 2-propanol (2 x 40 ml), diclorometano (3 x 40 ml) y N,N-dimetilformamida (3 x 40 ml). Una solución de ácido {2-[2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-etoxi]-etoxi}-acético (Fmoc-OEG-OH, 3.06 g, 7.90 mmol), tetrafluoroborato de 5-cloro-1-((dimetilamino)(dimetiliminio)metil)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol 3-óxido (TCTU, 2.82 g, 7.90 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (2.76 ml, 15.0 mmol) en N,N-dimetilformamida (40 ml) se añadió a la resina y la mezcla se agitó durante 1 hora. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (4 x 40 ml), diclorometano (4 x 40 ml) y N,N-dimetilformamida (4 x 40 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 10 min, 1 x 30 min, 2 x 40 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 40 ml), 2-propanol (2 x 40 ml), diclorometano (3 x 40 ml) y N,N-dimetilformamida (3 x 40 ml). Una solución de éster 1-terc-butílico del ácido (S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-pentanodioico (Fmoc-L-Glu-OtBu, 3.40 g, 7.90 mmol), tetrafluoroborato de 5-cloro-1-((dimetilamino)(dimetiliminio)metil)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol 3-óxido (TCTU, 2.82 g, 7.90 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (2.76 ml, 15.0 mmol) en N,N-dimetilformamida (40 ml) se añadió a la resina y la mezcla se agitó durante 1 hora. La resina se filtró y se lavó

con N,N-dimetilformamida (4 x 40 ml), diclorometano (4 x 40 ml) y N,N-dimetilformamida (4 x 40 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 10 min, 1 x 30 min, 2 x 40 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 40 ml), 2-propanol (2 x 40 ml), diclorometano (3 x 40 ml) y N,N-dimetilformamida (3 x 40 ml). Una solución de ácido 12-(4-(terc-butoxicarbonil)fenoxi)dodecanoico (CUB, 3.12 g, 7.90 mmol), tetrafluoroborato de 5-cloro-1-((dimetilamino)(dimetiliminio)metil)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol 3-óxido (TCTU, 2.82 g, 7.90 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (2.76 ml, 15.0 mmol) en N,N-dimetilformamida (40 ml) se añadió a la resina y la mezcla se agitó durante 1 hora. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (4 x 40 ml), diclorometano (4 x 40 ml), N,N-dimetilformamida (4 x 40 ml) y diclorometano (10 x 40 ml).

El producto se escindió de la resina mediante el tratamiento con 2,2,2-trifluoroetanol (40 ml) durante la noche. La resina se filtró y se lavó con diclorometano (4 x 40 ml). El disolvente se evaporó hasta la sequedad para proporcionar ácido (S)-22-(terc-butoxicarbonil)-35-(4-(terc-butoxicarbonil)fenoxi)-10,19,24-trioxo-3,6,12,15-tetraoxa-9,18,23-triazapentatriacontanoico puro como un aceite amarillo.

Rendimiento: 1.93 g (86 %).

Pureza por LC-MS: 100 % (ELSD).

Rt LC-MS (Kinetex C18, 4.6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 20:80 a 100:0 + FA al 0.1 %): 4.88 min.

LC-MS m/z: 869.2 (M+H)⁺.

La resina de Wang-Fmoc-Lys(Mtt)-OH a 0.33 mmol/g (3.40 g, 1.11 mmol) se dejó hinchar en diclorometano (50 ml) durante 30 minutos. El grupo Mtt se eliminó mediante tratamiento con 1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-ol al 80 % en diclorometano (2 x 5 min, 2 x 10 min, 1 x 15 min, 1 x 30 min, 6 x 50 ml). La resina se lavó con diclorometano (4 x 70 ml), N,N-diisopropiletilamina al 10 % en diclorometano (1 x 50 ml) y diclorometano (2 x 50 ml).

Una solución de ácido (S)-22-(terc-butoxicarbonil)-35-(4-(terc-butoxicarbonil)fenoxi)-10,19,24-trioxo-3,6,12,15-tetraoxa-9,18,23-triazapentatriacontanoico (1.93 g, 2.22 mmol), tetrafluoroborato de 5-cloro-1-((dimetilamino)(dimetiliminio)metil)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol 3-óxido (TCTU, 0.79 g, 2.22 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (0.86 ml, 6.66 mmol) en N,N-dimetilformamida (50 ml) se añadió a la resina y la mezcla se agitó durante la noche. La resina se filtró y se lavó con N,N-dimetilformamida (4 x 50 ml), diclorometano (4 x 50 ml) y N,N-dimetilformamida (4 x 50 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 10 min, 1 x 30 min, 2 x 50 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 50 ml), 2-propanol (2 x 50 ml), diclorometano (3 x 50 ml) y N,N-dimetilformamida (3 x 50 ml). Una solución de ácido bromoacético (0.62 g, 4.44 mmol), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC, 0.69 ml, 4.44 mmol) y 2,4,6-colidina (0.59 ml, 4.44 mmol) en N,N-dimetilformamida (50 ml) se añadió a la resina y la mezcla se agitó durante 1 hora. La resina se filtró y se lavó con N,N-

dimetilformamida (4 x 50 ml), diclorometano (4 x 50 ml), N,N-dimetilformamida (4 x 50 ml) y diclorometano (10 x 40 ml). El producto se escindió de la resina mediante el tratamiento con mezcla de ácido trifluoroacético/diclorometano (2:1, 30 ml) durante 3 horas. La resina se filtró y se lavó con diclorometano (4 x 40 ml). El disolvente se evaporó hasta la sequedad para proporcionar ácido (2S,29S)-29-(2-bromoacetamido)-2-(12-(4-carboxifenoxi)dodecanamido)-5,14,23-trioxa-9,12,18,21-tetraoxa-6,15,24-triazatriacontanodioico puro como un aceite amarillo.

Rendimiento: 1.10 g (99 %).

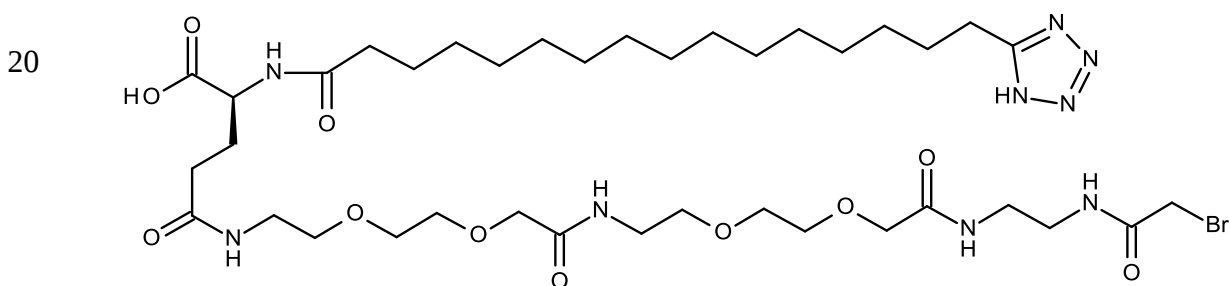
Espectro ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆ + DCl, dH): 7.93-7.74 (m, 2 H); 7.06-6.86 (m, 2 H); 4.20-3.93 (m, 5 H); 3.92-3.78 (m, 6 H); 3.54 (s, 9 H); 3.46-2.94 (m, 12 H); 2.19-1.84 (m, 5 H); 1.81-1.52 (m, 6 H); 1.51-1.23 (m, 15 H).

Pureza por LC-MS: 97 % (ELSD).

Rt LC-MS (Kinetex C18, 4.6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 20:80 a 100:0 + FA al 0.1 %): 3.20 min.

LC-MS m/z: 1005.3 (M+H)⁺.

Ejemplo 10.10: Preparación de ácido (2S)-5-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(2-bromoacetil)amino]etilamino]-2-oxoetoxi]etoxi]etilamino]-2-oxoetoxi]etoxi]etilamino]-5-oxo-2-[16-(1H-tetrazol-5-il)hexadecanoilamino]pentanoico



(Fórmula J)

Se añadió clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCHCl, 6.25 g, 32.6 mmol) a una solución agitada de ácido 16-(1H-tetrazol-5-il)hexadecanoico (1, 5.28 g, 16.3 mmol) y N-hidroxisuccínico imida (HOSu, 3.75 g, 32.6 mmol) en N,N-dimetilformamida (70 ml) y la mezcla se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con solución acuosa 1 M de ácido clorhídrico (400 ml). El producto crudo se extrajo con acetato de etilo (4 x 400 ml) y la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Después de la filtración el disolvente se eliminó a presión reducida. Se añadió 2-propanol (100 ml) al residuo oleoso y el sólido blanco precipitado se filtró. El producto puro (2) se obtuvo mediante recristalización a partir de 2-propanol (70 ml) como un sólido microcristalino blanco.

Rendimiento: 4.73 g (69 %).

RF (SiO₂, acetato de etilo): 0.35.

Espectro ¹H NMR (300 MHz, AcOD-d₄, dH): 3.02 (t, J=7.7 Hz, 2 H); 2.86 (s, 4 H); 2.62 (t, J=7.3 Hz, 2 H); 1.90-1.63 (m, 4 H); 1.30 (bs, 22 H).

La resina de 2-clorotritilo con Fmoc-gGlu(tBu)-OEG-OEG- unido (11.5 mmol, la preparación se describe en el procedimiento para la síntesis del prolongador del Ejemplo 10.6) se dejó hinchar en diclorometano (100 ml) durante 20 minutos. La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (2 x 100 ml). El grupo Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 % en N,N-dimetilformamida (1 x 5 min, 1 x 30 min, 2 x 100 ml). La resina se lavó con N,N-dimetilformamida (3 x 100 ml), 2-propanol (2 x 100 ml) y diclorometano (8 x 100 ml). El producto se escindió de la resina mediante tratamiento con 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol en diclorometano (2:8, 80 ml) durante 2 horas. La resina se filtró y se lavó con diclorometano (2 x 80 ml). Las soluciones se combinaron; los disolventes se evaporaron para obtener el producto (4) como un aceite parduzco. El producto crudo contenía 2 equivalentes de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol.

Rendimiento: 9.49 g (99 %, contado para aducto con 2 equivalentes de HFIP).

Espectro ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, dH): 7.72-7.64 (m, 1 H); 7.59-7.50 (m, 1 H); 4.00 (s, 2 H); 3.94 (s, 2 H); 3.94-3.85 (m, 1 H); 3.71-3.32 (m, 16 H); 2.56-2.45 (m, 2 H); 2.42-2.26 (m, 1 H); 2.16-2.02 (m, 1 H); 1.49 (s, 9 H).

A una solución del ácido anterior (6.10 g, 7.93 mmol) en tetrahidrofurano (50 ml) y 2,5-dioxopirrolidin-1-il 16-(1H-tetrazol-5-il)hexadecanoato (2, 3.33 g, 7.93 mmol) se añadió N,N-diisopropiletilamina (6.91 ml, 39.6 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche. Después el disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía rápida en columna (Silicagel 60, 0.040-0.063 mm; eluyente: diclorometano/metanol/ácido acético 15:1:0.2 a 5:1:0.2). El ácido acético residual se eliminó por liofilización de la mezcla de acetonitrilo/agua 1:1 para dar (5) puro como un sólido blancuzco.

Rendimiento: 1.39 g (22 %).

Espectro ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆, dH): 8.13-8.07 (m, 1 H); 8.01-7.93 (m, 1 H); 7.74-7.68 (m, 1 H); 4.11-3.99 (m, 1 H); 3.88 (s, 2 H); 3.82 (s, 2 H); 3.62-3.49 (m, 8 H); 3.49-3.37 (m, 4 H); 3.33-3.15 (m, 4 H); 2.73-2.65 (m, 2 H); 2.18-2.03 (m, 4 H); 1.94-1.81 (m, 1 H); 1.80-1.67 (m, 1 H); 1.66-1.53 (m, 2 H); 1.53-1.41 (m, 2 H); 1.38 (s, 9 H); 1.23 (s, 22 H).

A una solución del compuesto anterior (1.39 g, 1.73 mmol), hexafluorofosfato de 1-(((dimetilamino)(dimetiliminio)metil)-1H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]piridina 3-óxido (V) (HATU, 657 mg, 1.73 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (1.21 ml, 6.90 mmol) en N,N-dimetilformamida (30 ml) se añadió (2-aminoetil)carbamato de bencilo (6, 400 mg, 1.73 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche. Después el disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía rápida en columna (Silicagel 60, 0.040-0.063 mm; eluyente: acetato de etilo/metanol/ácido acético 15:1:0.2 a diclorometano/metanol/ácido acético 15:1:0.2) para dar el producto puro (7) como un sólido pegajoso parduzco.

Rendimiento: 1.63 g (97 %).

Espectro ¹H NMR (300 MHz, AcOD-d₄, dH): 7.35 (bs, 5 H); 5.25-5.12 (m, 2 H); 4.50-4.42 (m, 1 H); 4.14 (s, 2 H); 4.09 (s, 2 H); 3.79-3.30 (m, 20 H); 3.02 (t, J=7.6 Hz, 2 H); 2.46-2.27 (m, 4 H); 2.26-2.09 (m, 1 H); 2.05-1.92 (m, 1 H); 1.88-1.72 (m, 2 H); 1.72-1.53 (m, 2 H); 1.47 (s, 9 H); 1.29 (bs, 22 H).

A una solución del compuesto anterior (1.63 g, 1.67 mmol) en metanol se añadió paladio sobre carbono (10 %, 0.25 g, 0.23 mmol) bajo manta de hidrógeno y la mezcla de reacción se agitó vigorosamente durante 2 horas. Después la mezcla de reacción se filtró a través de una pequeña almohadilla de diatomita y se lavó con metanol. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar el producto puro (8) como una espuma sólida blanca.

Rendimiento: 1.32 g (94 %).

Espectro ¹H NMR (300 MHz, AcOD-d₄, dH): 4.50-4.42 (m, 1 H); 4.16-4.10 (m, 4 H); 3.71-3.61 (m, 14 H); 3.59-3.51 (m, 2 H); 3.51-3.45 (m, 2 H); 3.40-3.32 (m, 2 H); 3.02 (t, J=7.6 Hz, 2 H); 2.45-2.28 (m, 4 H); 2.27-2.12 (m, 1 H); 2.05-1.93 (m, 1 H); 1.89-1.74 (m, 2 H); 1.70-1.58 (m, 2 H); 1.47(s, 9 H); 1.30 (bs, 22 H).

El compuesto anterior (1.32 g, 1.57 mmol) se disolvió en una mezcla de ácido trifluoroacético (90 ml) y agua (10 ml). Después de 90 minutos los volátiles se eliminaron a presión reducida y el residuo se evaporó con tolueno (3 x 50 ml). El residuo se disolvió en N,N-dimetilformamida (15 ml) y se enfrió a 0 °C. Se añadió anhídrido bromoacético (678 mg, 2,61 mmol) y bicarbonato de sodio (2.02 g, 24.0 mmol) mientras se agitaba y la mezcla de reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente. Después de 60 minutos se añadió anhídrido bromoacético adicional (200 mg, 0.77 mmol) para completar la reacción. Después de 30 minutos el disolvente se eliminó a presión reducida para dar un líquido parduzco inmiscible con diclorometano, acetato de etilo y agua. El residuo se colocó en un embudo de separación y se intentó disolver en acetato de etilo (50 ml) y agua (50). Esto creó tres fases. La fase de acetato de etilo y la fase acuosa se eliminaron y la tercera fase se purificó mediante HPLC preparativa (columna labio DeltaPak C18, 15 mm, 50 x 500 mm, acetonitrilo/agua 25:75 a 50:50 + TFA al 0.05 %). La solución resultante se liofilizó para dar el producto del título (9) como un sólido blanco.

Rendimiento: 210 mg (15 %).

Espectro ¹H NMR (300 MHz, AcOD-d₄, dH): 4.64-4.56 (m, 1 H); 4.12 (s, 2 H); 4.10 (s, 2 H); 3.95 (s, 2 H); 3.77-3.59 (m, 12 H); 3.59-3.37 (m, 8 H); 3.02 (t, J=7.6 Hz, 2 H); 2.44 (t, J=7.8 Hz, 2 H); 2.34 (t, J=8.0 Hz, 2 H); 2.28-2.18 (m, 1 H); 2.15-2.04 (m, 1 H); 1.86-1.70 (m, 2 H); 1.70-1.56 (m, 2 H), 1.29 (bs, 22 H).

Pureza por LC-MS: 100 %.

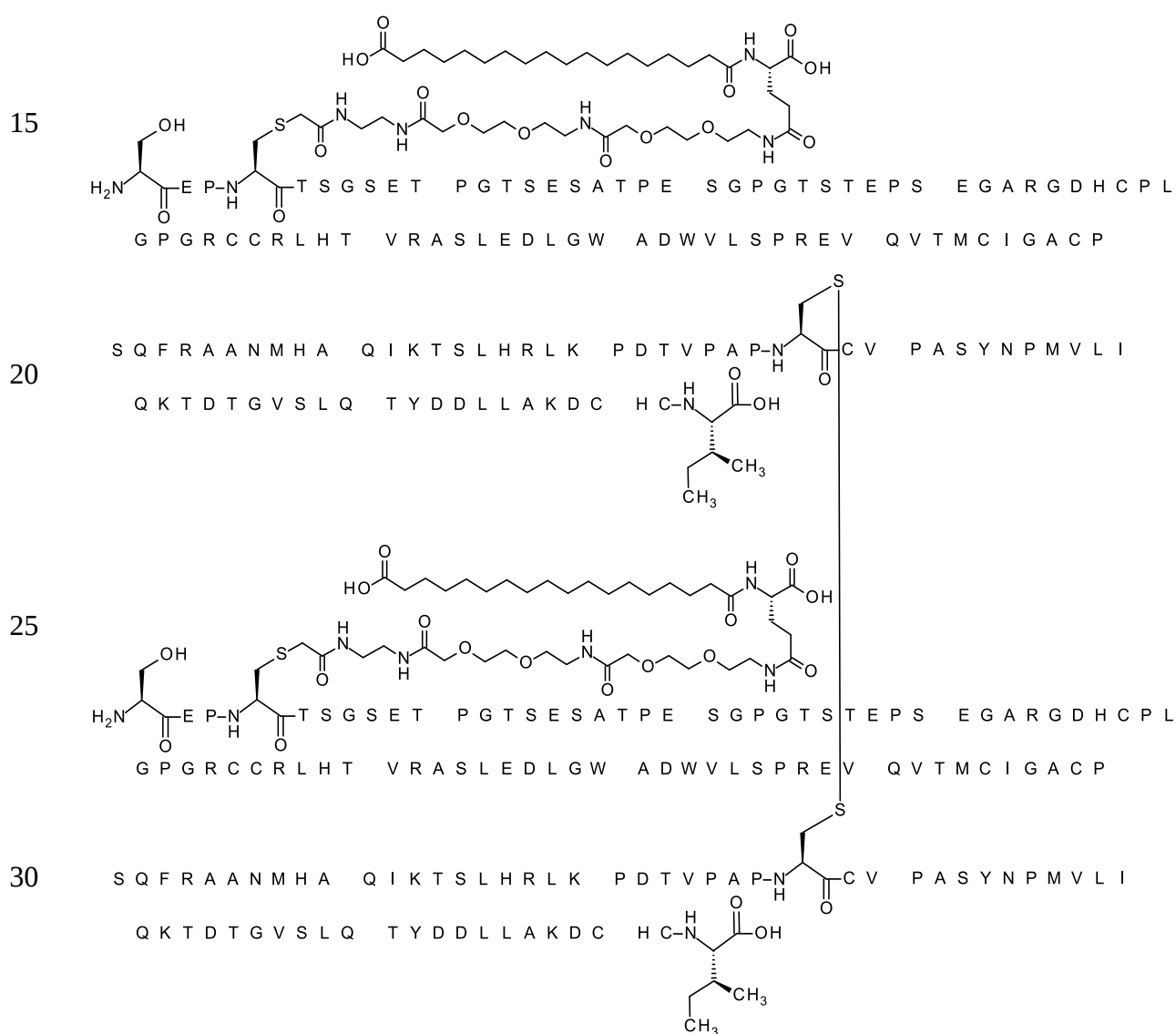
Rt LC-MS (Kinetex C18, 4.6 mm x 50 mm, acetonitrilo/agua 20:80 a 100:0 + FA al 0.1 %): 3.35 min.

LC-MS m/z: 908.8 (M+H)⁺.

Ejemplo 11: Preparación de compuestos de MIC-1 con prolongadores

Ejemplo 11.1: Compuesto 01

SerA-32,GluA-31,ProA-30,S{Beta}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etilamino]-2-oxoetil]CysA-29,ThrA-28,SerA-27,GlyA-26,SerA-25,GluA-24,ThrA-23,ProA-22,GlyA-21,ThrA-20,SerA-19,GluA-18,SerA-17,AlaA-16,ThrA-15,ProA-14,GluA-13,SerA-12,GlyA-11,ProA-10,GlyA-9,ThrA-8,SerA-7,ThrA-6,GluA-5,ProA-4,SerA-3,GluA-2,GlyA-1,SerB-32,GluB-31,ProB-30,S{Beta}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etilamino]-2-oxoetil]CysB-29,ThrB-28,SerB-27,GlyB-26,SerB-25,GluB-24,ThrB-23,ProB-22,GlyB-21,ThrB-20,SerB-19,GluB-18,SerB-17,AlaB-16,ThrB-15,ProB-14,GluB-13,SerB-12,GlyB-11,ProB-10,GlyB-9,ThrB-8,SerB-7,ThrB-6,GluB-5,ProB-4,SerB-3,GluB-2,GlyB-1,des-AsnA3,AsnB3-MIC-1



(Fórmula 01)

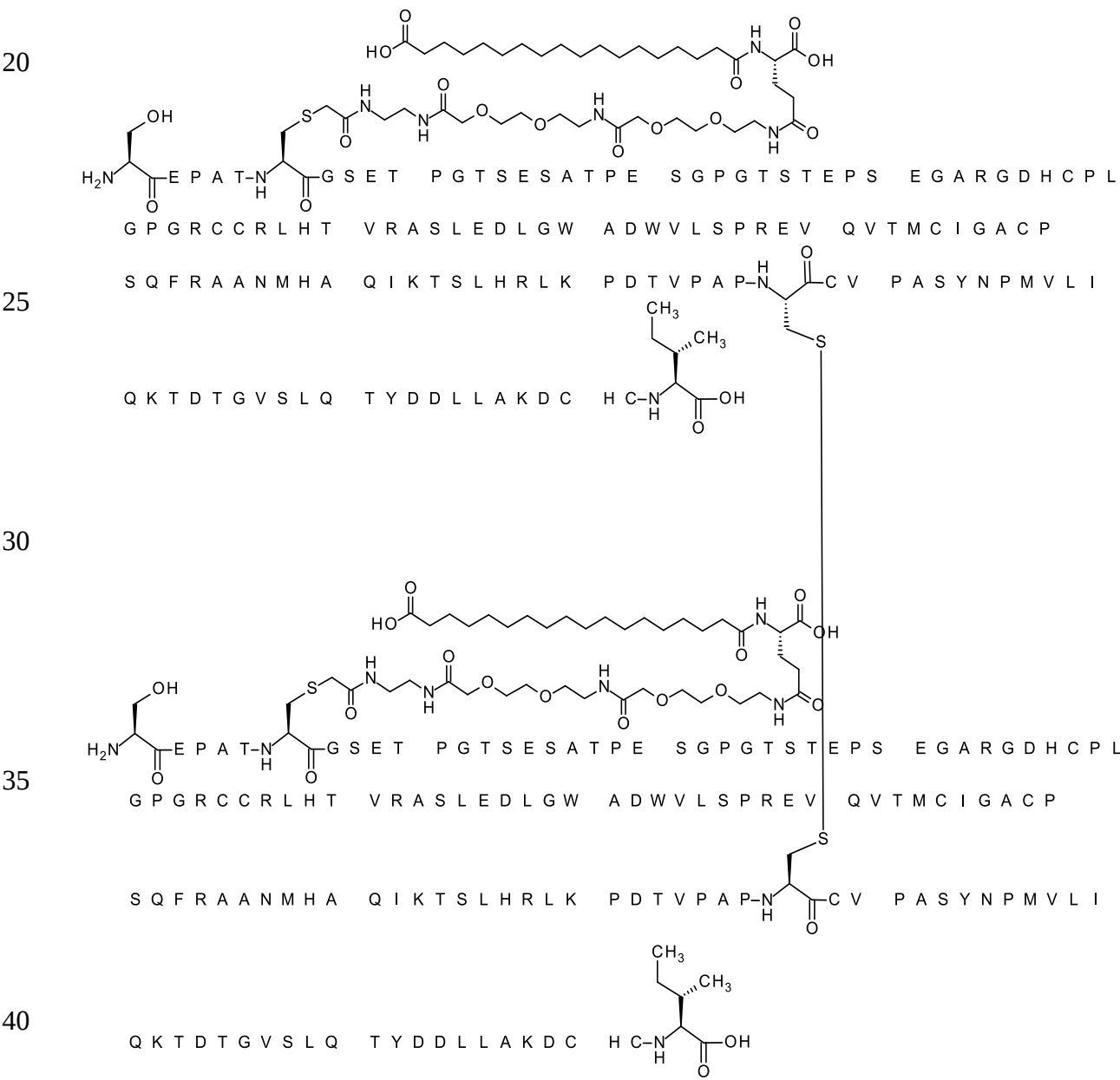
Se disolvió 30 mg de prolongador (ejemplo 10.4, 8 equivalentes) en 1.5 ml de NaHCO₃ sat. y se añadió a 108 mg de polipéptido MIC-1 con extensión en N (SEQ ID NO: 288) en tampón PBS, pH 7.4, 2.1 mg/ml. Se añadió 19 mg de bis(p-sulfonatofenil)fenilfosfina, sal de potasio dihidratada, Sigma-Aldrich 698539 (8 equivalentes). Después de 24 h de

permanencia a temperatura ambiente la proteína se purificó en una columna de fase inversa C4 mediante el uso de un gradiente de 10-50 % etanol/tampón fosfato pH 3.0. Rendimiento ~20 % después de la purificación.

Masa teórica: 32,006.3; Encontrada: 32,006.5.

5 Ejemplo 11.2: Compuesto 02

SerA-32,GluA-31,ProA-30,AlaA-29,ThrA-28,S{Beta}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etilamino]-2-oxoetil]CysA-27,GlyA-26,SerA-25,GluA-24,ThrA-23,ProA-22,GlyA-10 21,ThrA-20,SerA-19,GluA-18,SerA-17,AlaA-16,ThrA-15,ProA-14,GluA-13,SerA-12,GlyA-11,ProA-10,GlyA-9,ThrA-8,SerA-7,ThrA-6,GluA-5,ProA-4,SerA-3,GluA-2,GlyA-1,SerB-32,GluB-31,ProB-30,AlaB-29,ThrB-28,S{Beta}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etilamino]-2-oxoetil]CysB-27,GlyB-26,SerB-25,GluB-24,ThrB-23,ProB-22,GlyB-15 21,ThrB-20,SerB-19,GluB-18,SerB-17,AlaB-16,ThrB-15,ProB-14,GluB-13,SerB-12,GlyB-11,ProB-10,GlyB-9,ThrB-8,SerB-7,ThrB-6,GluB-5,ProB-4,SerB-3,GluB-2,GlyB-1des-AsnA3,AsnB3-MIC-1



(Fórmula 02)

El compuesto 02 se preparó mediante el uso del procedimiento descrito en el ejemplo 11.1 usando el polipéptido MIC-1 con extensión en N (SEQ ID NO: 291).

5 Masa teórica: 31,974.3; Encontrada: 31,974.0

Ejemplo 11.3: Compuesto 03

SerA-32,GluA-31,ProA-30,AlaA-29,ThrA-28,S{Beta}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(15-

carboxipentadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]ami

10 no]etilamino]-2-oxoetil]CysA-27,GlyA-26,SerA-25,GluA-24,ThrA-23,ProA-22,GlyA-

21,ThrA-20,SerA-19,GluA-18,SerA-17,AlaA-16,ThrA-15,ProA-14,GluA-13,SerA-

12, GlyA-11, ProA-10, GlyA-9, ThrA-8, SerA-7, ThrA-6, GluA-5, ProA-4, SerA-3, GluA-

2,GlyA-1,SerB-32,GluB-31,ProB-30,AlaB-29,ThrB-28,S{Beta}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-

[[**(4S)**]-4-carboxi-4-(15-

15 carboxipentadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]ami

no[etilamino]-2-oxoetil[CysB-27,GlvB-26,SerB-25,GlvB-24,ThrB-23,ProB-22,GlvB-

21,ThrB-20,SerB-19,GluB-18,SerB-17,AlaB-16,ThrB-15,ProB-14,GluB-13,SerB-12,GlyB-

11,ProB-10,GlyB-9,ThrB-8,SerB-7,ThrB-6,GluB-5,ProB-4,SerB-3,GluB-2,GlyB-1des-

AsnA3,AsnB3-MIC-1



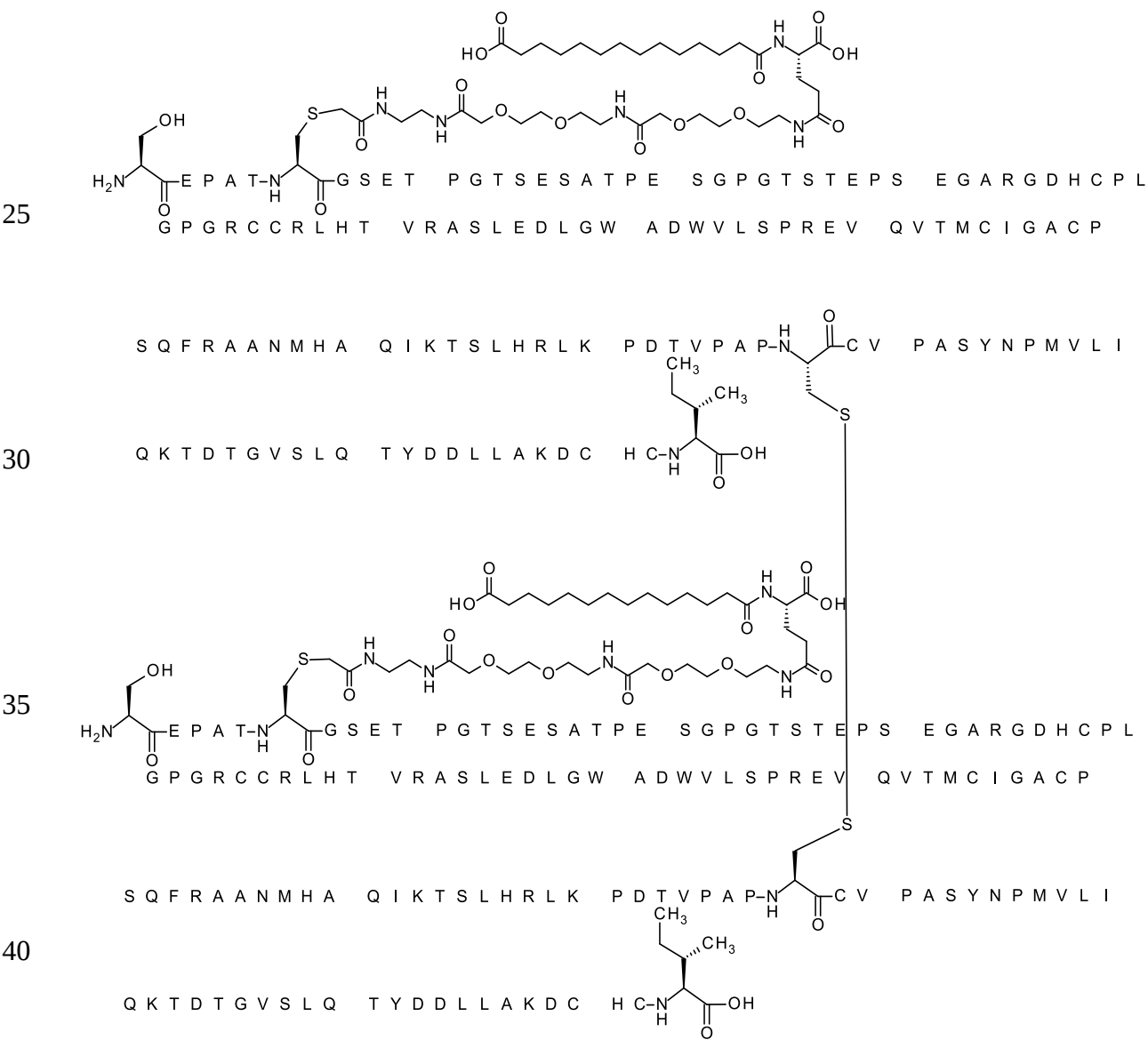
(Fórmula 03)

El compuesto 03 se preparó mediante el uso del procedimiento descrito en el ejemplo 11.1 usando el prolongador descrito en el ejemplo 10.2 y el polipéptido MIC-1 con extensión en N (SEQ ID NO: 291).

Masa teórica: 31,918.2; Encontrada: 31,918.0.

Ejemplo 11.4: Compuesto 04

SerA-32,GluA-31,ProA-30,AlaA-29,ThrA-28,S{Beta}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etilamino]-2-oxoetil]CysA-27,GlyA-26,SerA-25,GluA-24,ThrA-23,ProA-22,GlyA-21,ThrA-20,SerA-19,GluA-18,SerA-17,AlaA-16,ThrA-15,ProA-14,GluA-13,SerA-12,GlyA-11,ProA-10,GlyA-9,ThrA-8,SerA-7,ThrA-6,GluA-5,ProA-4,SerA-3,GluA-2,GlyA-1,SerB-32,GluB-31,ProB-30,AlaB-29,ThrB-28,S{Beta}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(13-carboxitridecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etilamino]-2-oxoetil]CysB-27,GlyB-26,SerB-25,GluB-24,ThrB-23,ProB-22,GlyB-21,ThrB-20,SerB-19,GluB-18,SerB-17,AlaB-16,ThrB-15,ProB-14,GluB-13,SerB-12,GlyB-11,ProB-10,GlyB-9,ThrB-8,SerB-7,ThrB-6,GluB-5,ProB-4,SerB-3,GluB-2,GlyB-1des-AsnA3,AsnB3-MIC-1



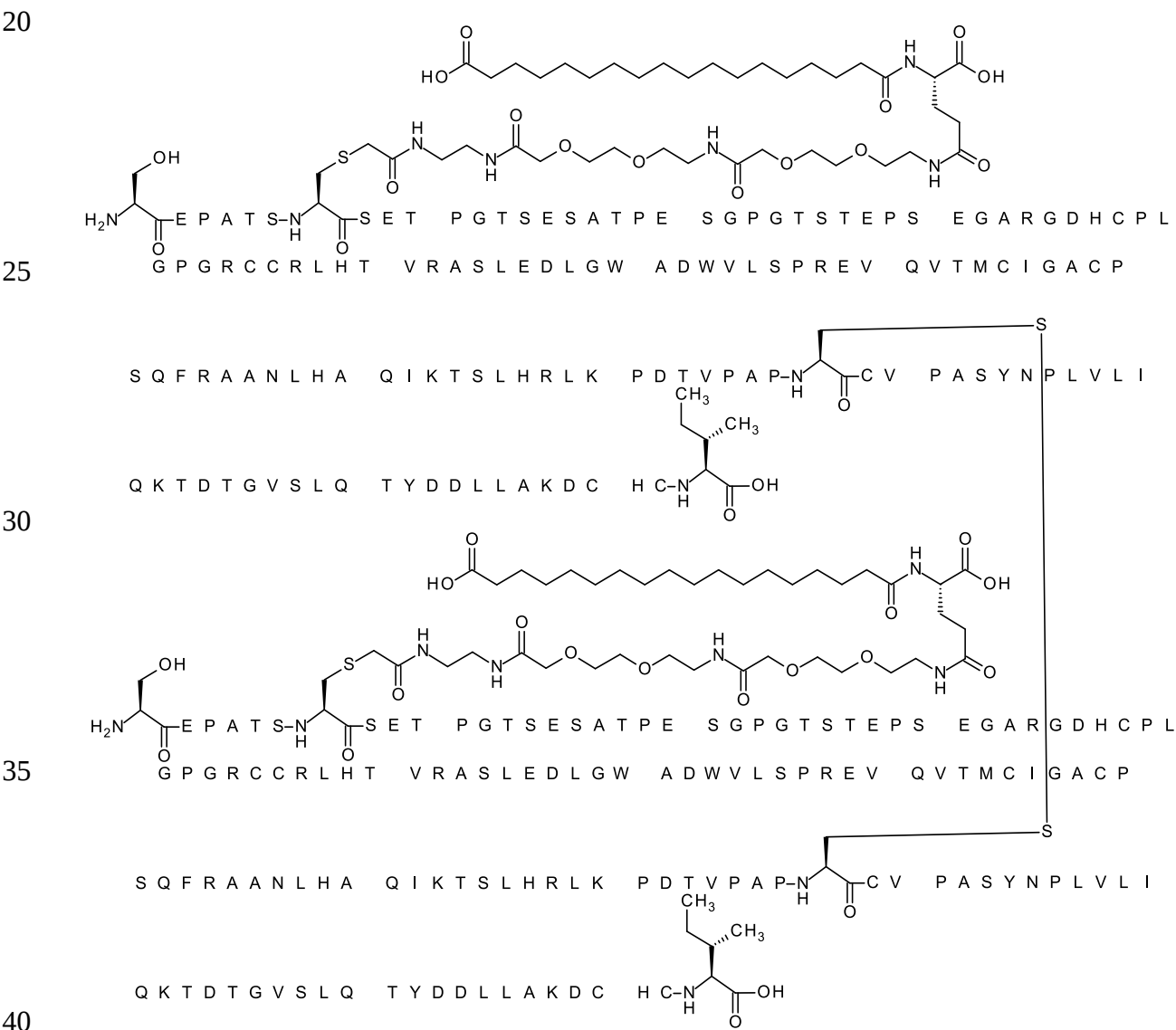
(Fórmula 04)

El compuesto 04 se preparó mediante el uso del procedimiento descrito en el ejemplo 11.1 usando el prolongador descrito en el ejemplo 10.3 y el polipéptido MIC-1 con extensión en N (SEQ ID NO: 291).

5 Masa teórica: 31,862.1; Encontrada: 31,862.0.

Ejemplo 11.5: Compuesto 05

SerA-32,GluA-31,ProA-30,AlaA-29,ThrA-28,SerA-27,S{Beta}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-
[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]ami
10 no]etilamino]-2-oxoetil]CysA-26,SerA-25,GluA-24,ThrA-23,ProA-22,GlyA-21,ThrA-
20,SerA-19,GluA-18,SerA-17,AlaA-16,ThrA-15,ProA-14,GluA-13,SerA-12,GlyA-
11,ProA-10,GlyA-9,ThrA-8,SerA-7,ThrA-6,GluA-5,ProA-4,SerA-3,GluA-2,GlyA-1,SerB-
32,GluB-31,ProB-30,AlaB-29,ThrB-28,SerB-27,S{Beta}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-
4-carboxi-4-(17-
15 carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]ami
no]etilamino]-2-oxoetil]CysB-26,SerB-25,GluB-24,ThrB-23,ProB-22,GlyB-21,ThrB-
20,SerB-19,GluB-18,SerB-17,AlaB-16,ThrB-15,ProB-14,GluB-13,SerB-12,GlyB-11,ProB-
10,GlyB-9,ThrB-8,SerB-7,ThrB-6,GluB-5,ProB-4,SerB-3,GluB-2,GlyB-
1[LeuA57,LeuA86,LeuB57,LeuB86],des-AsnA3,AsnB3-MIC-1



(Fórmula 05)

El compuesto 05 se preparó mediante el uso del procedimiento descrito en el ejemplo 11.1 usando el prolongador descrito en el ejemplo 10.4 y el polipéptido MIC-1 con extensión en N (SEQ ID NO: 289).

Masa teórica: 31,962.2; Encontrada: 31,962.0.

Ejemplo 11.6: Compuesto 06

SerA-32,GluA-31,ProA-30,AlaA-29,ThrA-28,SerA-27,GlyA-26,S{Beta}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-

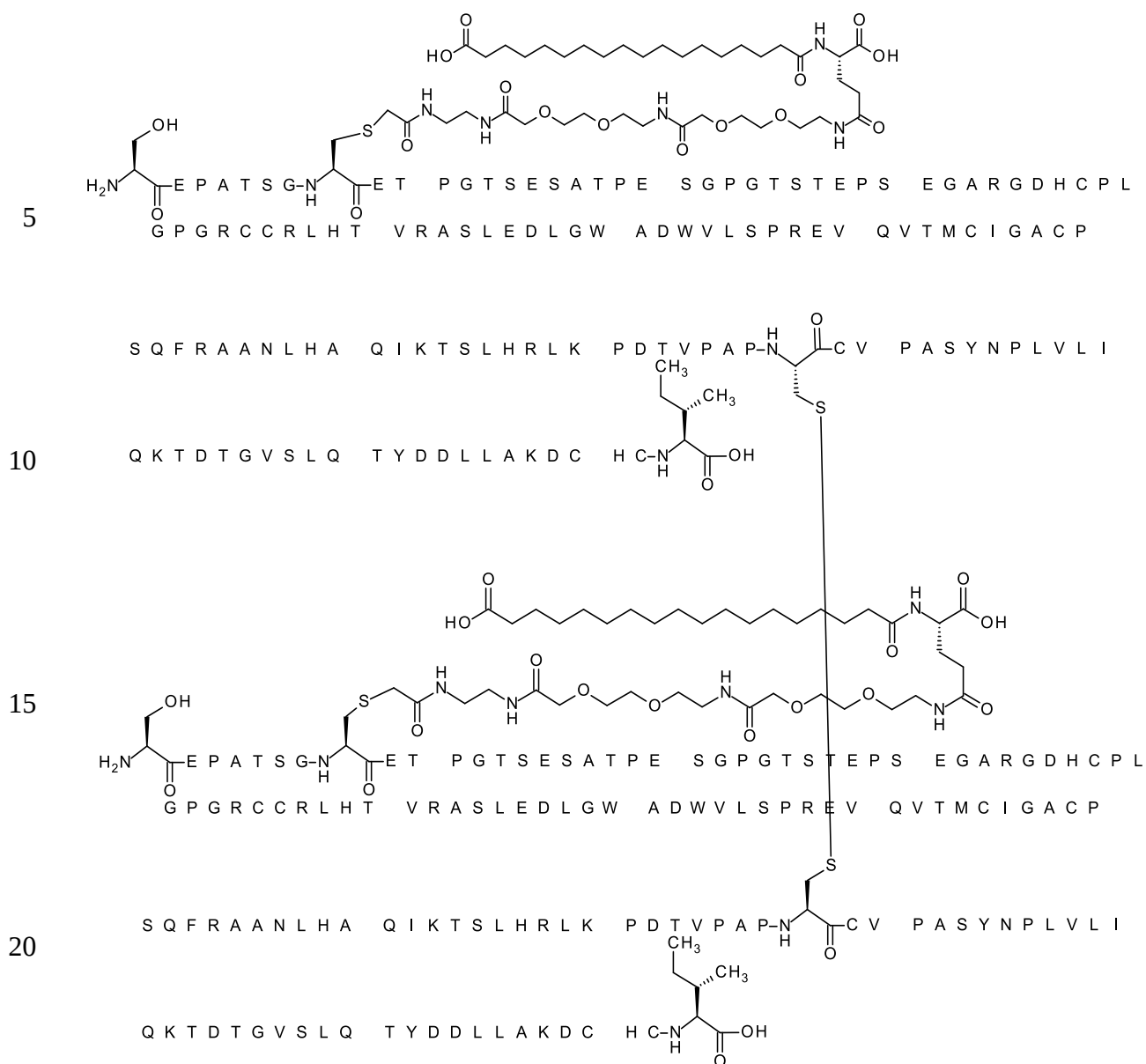
10 carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etilamino]-2-oxoetil]CysA-25,GluA-24,ThrA-23,ProA-22,GlyA-21,ThrA-20,SerA-19,GluA-18,SerA-17,AlaA-16,ThrA-15,ProA-14,GluA-13,SerA-12,GlyA-11,ProA-10,GlyA-9,ThrA-8,SerA-7,ThrA-6,GluA-5,ProA-4,SerA-3,GluA-2,GlyA-1,SerB-32,GluB-31,ProB-30,AlaB-29,ThrB-28,SerB-27,GlyB-26,S{Beta}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-
15 4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etilamino]-2-oxoetil]CysB-25,GluB-24,ThrB-23,ProB-22,GlyB-21,ThrB-20,SerB-19,GluB-18,SerB-17,AlaB-16,ThrB-15,ProB-14,GluB-13,SerB-12,GlyB-11,ProB-10,GlyB-9,ThrB-8,SerB-7,ThrB-6,GluB-5,ProB-4,SerB-3,GluB-2,GlyB-
20 1[LeuA57,LeuA86,LeuB57,LeuB86],des-AsnA3,AsnB3-MIC-1

25

30

35

40



(Fórmula 06)

25

El compuesto 06 se preparó mediante el uso del procedimiento descrito en el ejemplo 11.1 usando el prolongador descrito en el ejemplo 10.4 y el polipéptido MIC-1 con extensión en N (SEQ ID NO: 303).

Masa teórica: 31,902.1; Encontrada: 31,902.0

30 Ejemplo 11.7: Compuesto 07

SerA-32,GluA-31,ProA-30,AlaA-29,ThrA-28,SerA-27,GlyA-26,SerA-25,GluA-24,ThrA-23,ProA-22,GlyA-21,ThrA-20,SerA-19,GluA-18,SerA-17,AlaA-16,S{Beta}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-

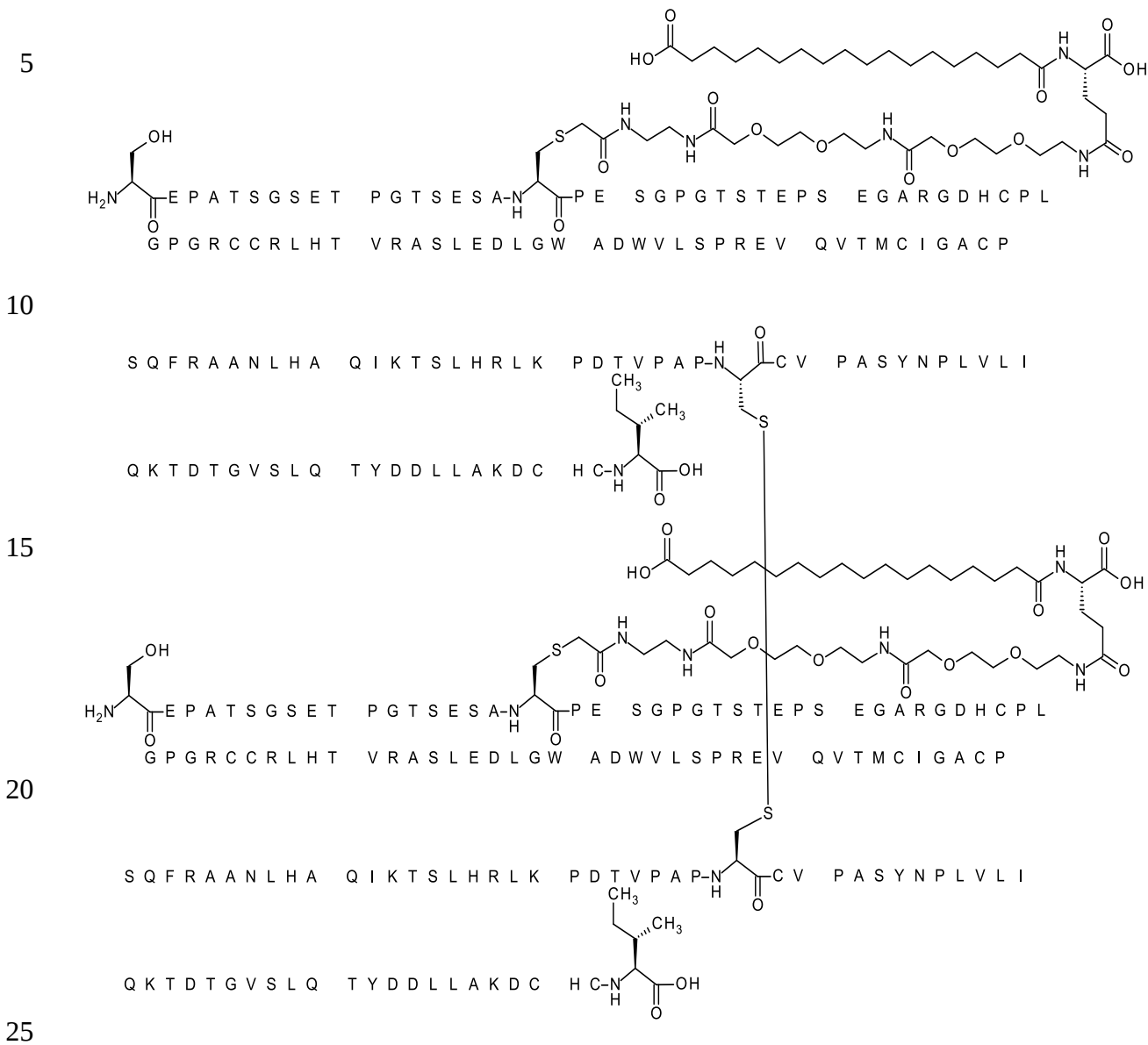
35

no[etilamino]-2-oxoetil]CysA-15,ProA-14,GluA-13,SerA-12,GlyA-11,ProA-10,GlyA-9,ThrA-8,SerA-7,ThrA-6,GluA-5,ProA-4,SerA-3,GluA-2,GlyA-1,SerB-32,GluB-31,ProB-30,AlaB-29,ThrB-28,SerB-27,GlyB-26,SerB-25,GluB-24,ThrB-23,ProB-22,GlyB-21,ThrB-20,SerB-19,GluB-18,SerB-17,AlaB-16,S{Beta}-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-

40

carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]ami

no]etilamino]-2-oxoetil]CysB-15,ProB-14,GluB-13,SerB-12,GlyB-11,ProB-10,GlyB-9,ThrB-8,SerB-7,ThrB-6,GluB-5,ProB-4,SerB-3,GluB-2,GlyB-1[LeuA57,LeuA86,LeuB57,LeuB86],des-AsnA3,AsnB3-MIC-1

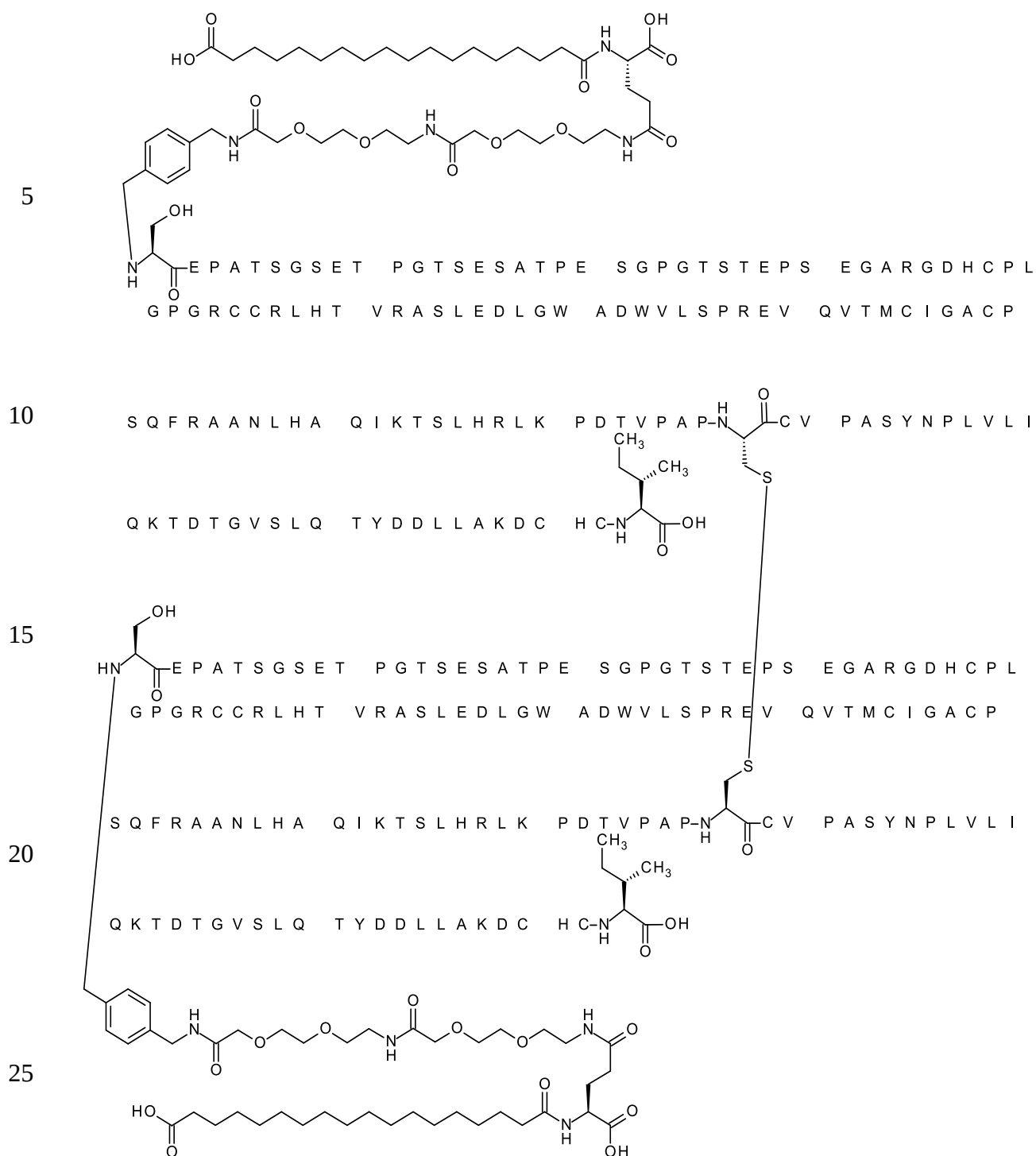


El compuesto 07 se preparó mediante el uso del procedimiento descrito en el ejemplo 11.1 usando el prolongador descrito en el ejemplo 10.4 y el polipéptido MIC-1 con extensión en N (SEQ ID NO: 292).

Masa teórica: 31,874.1; Encontrada: 31,873.0.

Ejemplo 11.8: Compuesto 08

SerA-32,GluA-31,ProA-30,AlaA-29,ThrA-28,SerA-27,GlyA-26,SerA-25,GluA-24,ThrA-23,ProA-22,GlyA-21,ThrA-20,SerA-19,GluA-18,SerA-17,AlaA-16,ThrA-15,ProA-14,GluA-13,SerA-12,GlyA-11,ProA-10,GlyA-9,ThrA-8,SerA-7,ThrA-6,GluA-5,ProA-4,S{Beta}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etilamino]-2-oxoetil]CysA-3,GluA-2,GlyA-1,SerB-32,GluB-31,ProB-30,AlaB-29,ThrB-28,SerB-27,GlyB-26,SerB-25,GluB-24,ThrB-23,ProB-22,GlyB-21,ThrB-20,SerB-19,GluB-18,SerB-17,AlaB-16,ThrB-15,ProB-14,GluB-13,SerB-12,GlyB-11,ProB-10,GlyB-9,ThrB-



30 Se añadió 20 mg de prolongador (ejemplo 10.1, 8 equivalentes) disuelto en 2 ml de hidroxipropil-beta-ciclodextrina al 40 % a 75 mg de polipéptido MIC-1 con extensión en N (SEQ ID NO: 164) en 40 ml de tampón PBS, pH 7.4. Se añadió 100 µl de complejo de borano piridina (8 M). Después de 24 h de permanencia a temperatura ambiente se añadió nuevamente 20 mg del prolongador y 100 µl de reactivo borano.

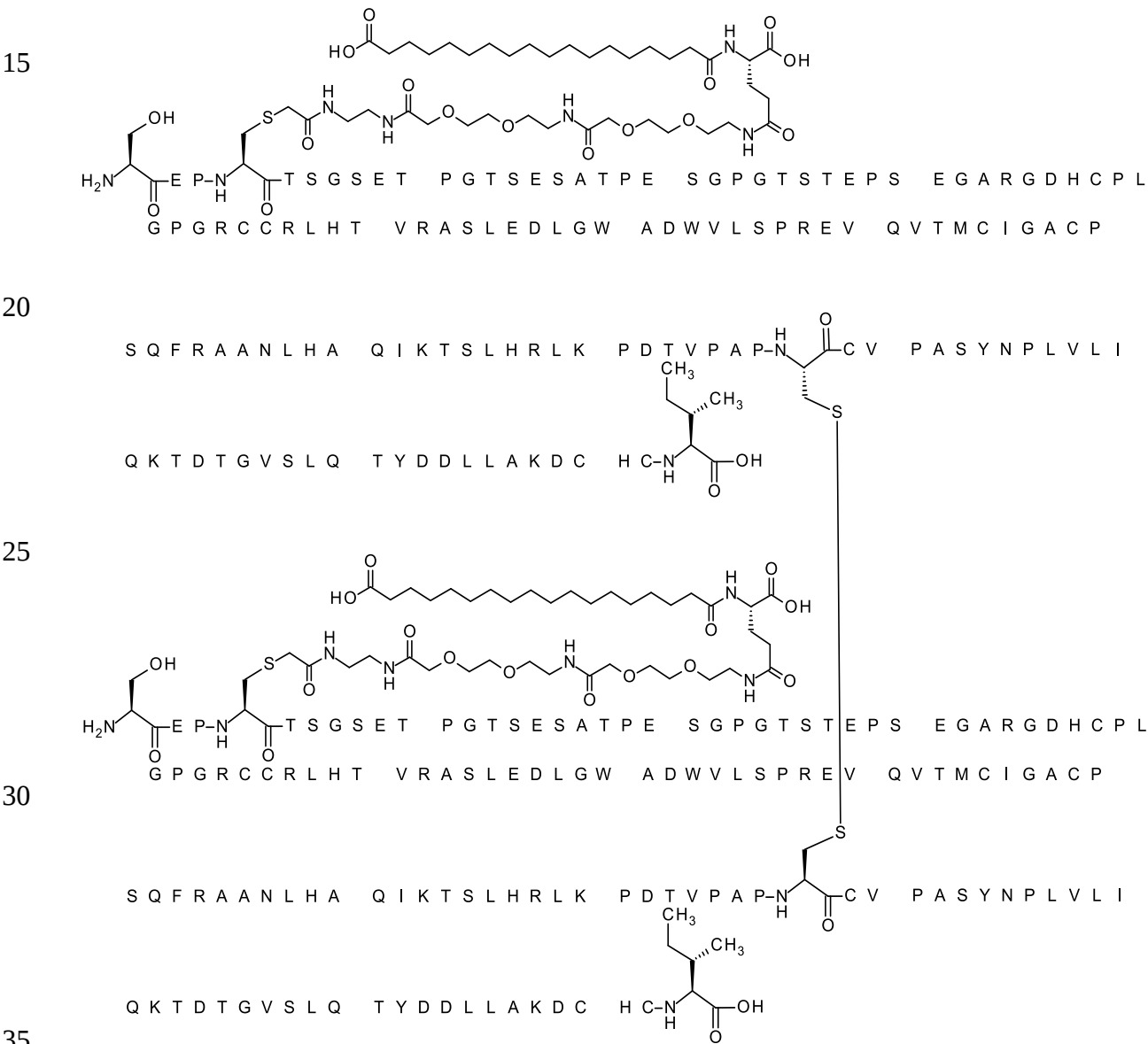
35 Después de 48 h la mezcla de proteína mono y dialquilada se purificó en una columna de fase inversa C4 mediante el uso de un gradiente de 10-50 % etanol/tampón fosfato pH 3.0. Rendimiento ~19 % de proteína monoalquilada (Compuesto 09) y 6 % de proteína dialquilada (Compuesto 10) después de la purificación.

Compuesto 09: Masa teórica: 31,073.0; Encontrada: 31,073.5

40 Compuesto 10: Masa teórica: 31,908.1; Encontrada: 31,908.5

Ejemplo 11.11: Compuesto 11

SerA-32,GluA-31,ProA-30,S{Beta}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]ami
no]etilamino]-2-oxoetil]CysA-29,ThrA-28,SerA-27,GlyA-26,SerA-25,GluA-24,ThrA-
23,ProA-22,GlyA-21,ThrA-20,SerA-19,GluA-18,SerA-17,AlaA-16,ThrA-15,ProA-
14,GluA-13,SerA-12,GlyA-11,ProA-10,GlyA-9,ThrA-8,SerA-7,ThrA-6,GluA-5,ProA-
4,SerA-3,GluA-2,GlyA-1,SerB-32,GluB-31,ProB-30,S{Beta}-[2-[2-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-
[[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]ami
no]etilamino]-2-oxoetil]CysB-29,ThrB-28,SerB-27,GlyB-26,SerB-25,GluB-24,ThrB-
23,ProB-22,GlyB-21,ThrB-20,SerB-19,GluB-18,SerB-17,AlaB-16,ThrB-15,ProB-14,GluB-
13,SerB-12,GlyB-11,ProB-10,GlyB-9,ThrB-8,SerB-7,ThrB-6,GluB-5,ProB-4,SerB-
3,GluB-2,GlyB-1[LeuA57,LeuA86,LeuB57,LeuB86],des-AsnA3,AsnB3-MIC-1



(Fórmula 11)

El compuesto 11 se preparó mediante el uso del procedimiento descrito en el ejemplo 11.1
usando el prolongador descrito en el ejemplo 10.4 y el polipéptido MIC-1 con extensión en
N (SEQ ID NO: 290).

Masa teórica: 31,934.1; Encontrada: 31,938.5.

Ejemplo 11.12 y Ejemplo 11.13: Compuesto 12 y Compuesto 13

Compuesto 12:

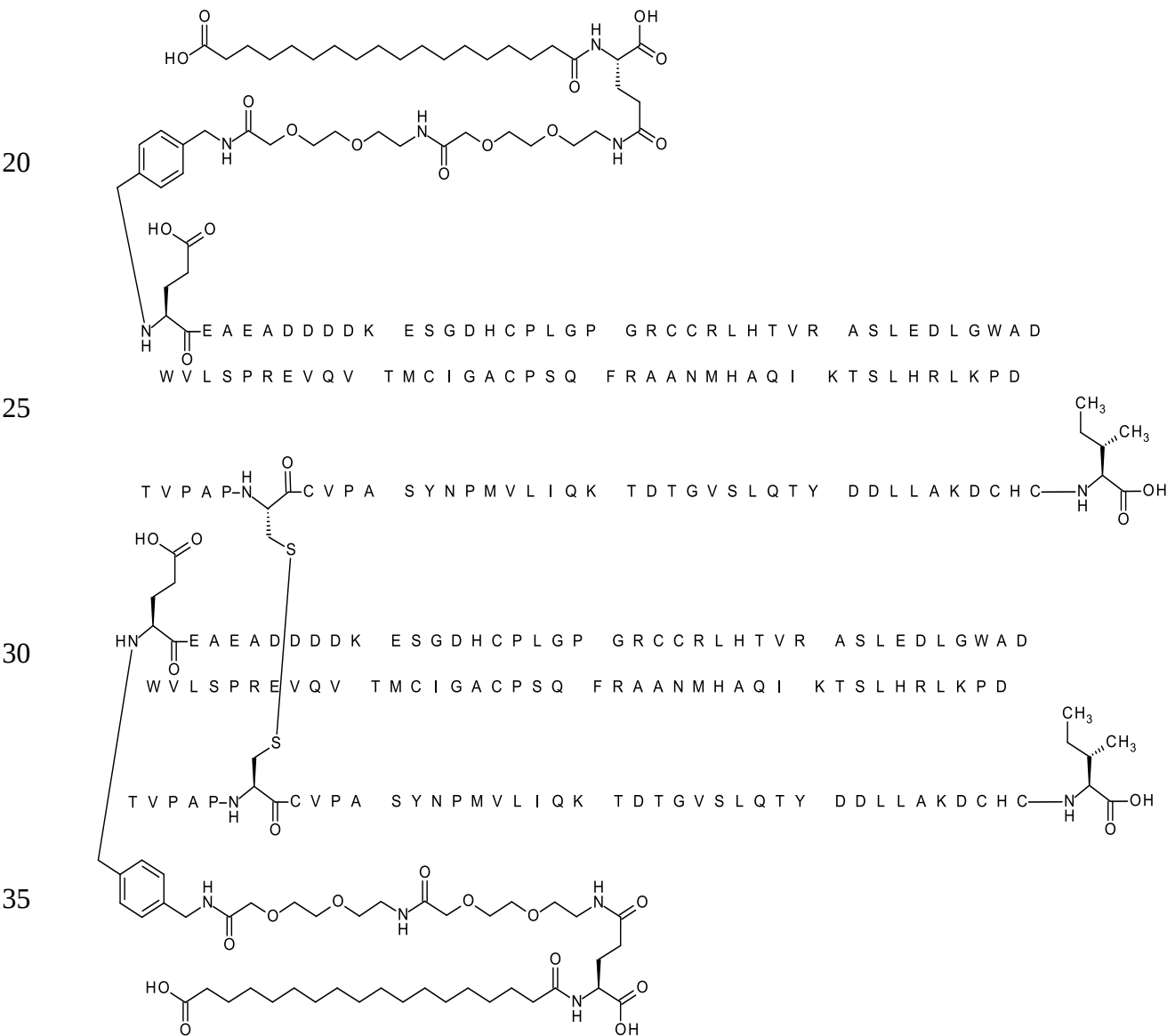
N{A-9}-[4-[[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-

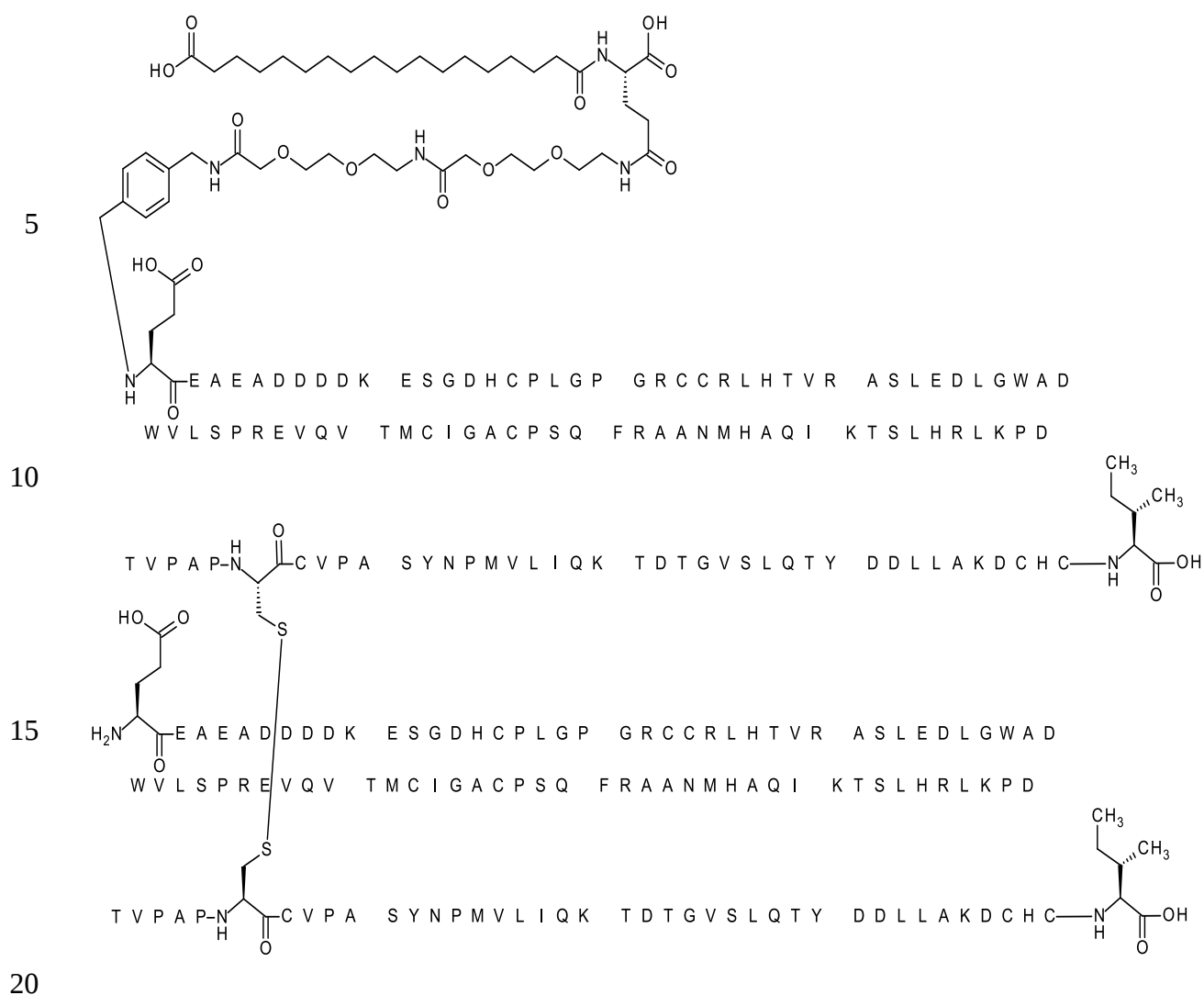
5 carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]ami
no]metil]fenil]metil,N{B-9}-[4-[[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]ami
no]metil]fenil]metil-GluA-9,GluA-8,AlaA-7,GluA-6,AlaA-5,AspA-4,AspA-3,AspA-
2,AspA-1,GluB-9,GluB-8,AlaB-7,GluB-6,AlaB-5,AspB-4,AspB-3,AspB-2,AspB-
10 1[LysA1,GluA2,SerA3,LysB1,GluB2,SerB3]-MIC-1

Compuesto 13:

N{B-9}-[4-[[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[(4S)-4-carboxi-4-(17-

carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]ami
no]metil]fenil]metil-GluA-9,GluA-8,AlaA-7,GluA-6,AlaA-5,AspA-4,AspA-3,AspA-
15 2,AspA-1,GluB-9,GluB-8,AlaB-7,GluB-6,AlaB-5,AspB-4,AspB-3,AspB-2,AspB-
1[LysA1,GluA2,SerA3,LysB1,GluB2,SerB3]-MIC-1





(Fórmula 13)

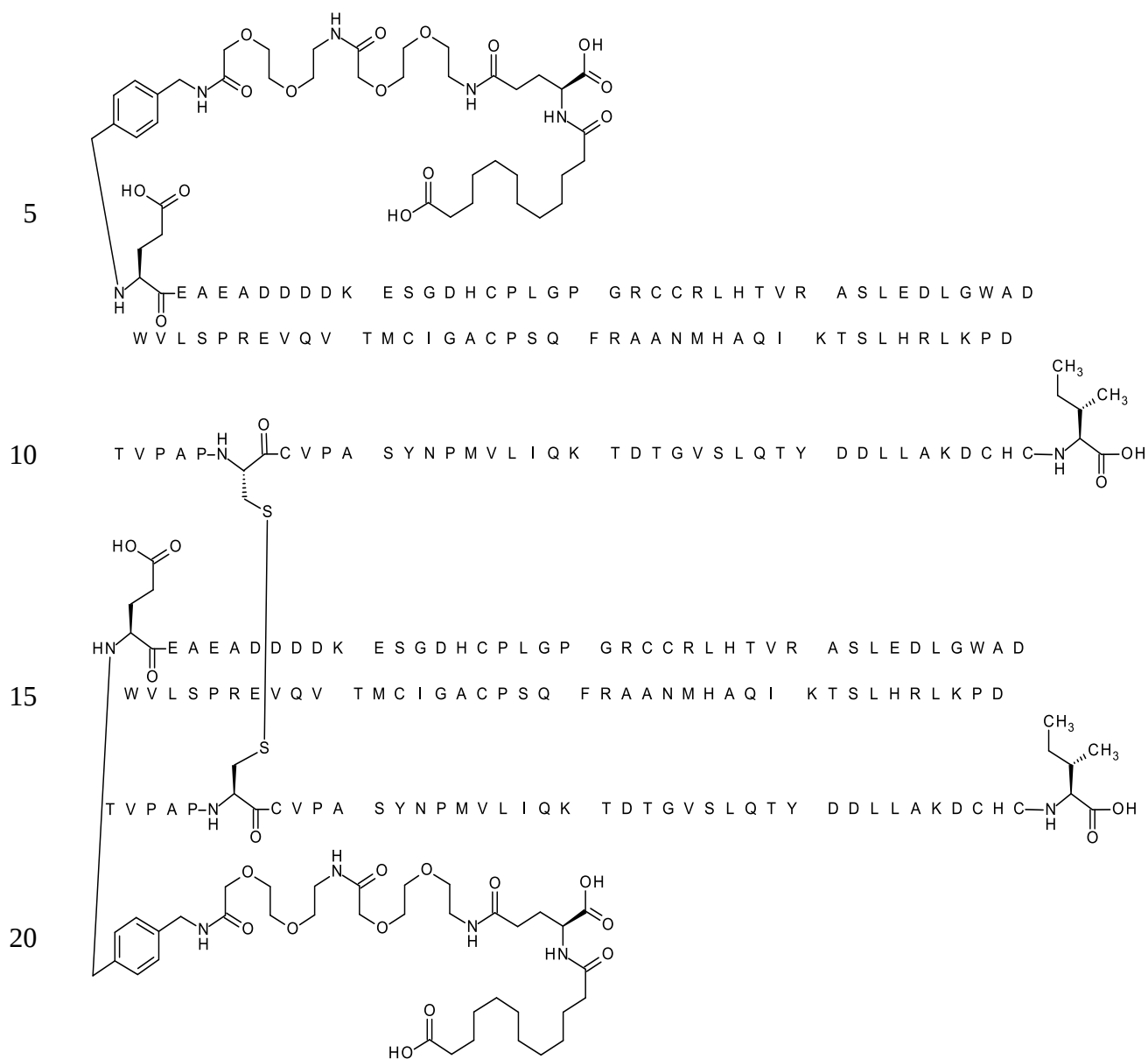
Los compuestos 12 y 13 se prepararon mediante el uso del procedimiento descrito en el ejemplo 11.10 usando el prolongador descrito en el ejemplo 10.1 y el polipéptido MIC-1 con extensión en N (SEQ ID NO: 311).

Compuesto 12: Masa teórica: 28,212.3; Encontrada: 28,211.9

Compuesto 13: Masa teórica: 27,377.2; Encontrada: 27,376.8

Ejemplo 11.14: Compuesto 14

N{A-9}-[4-[[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-(11-carboxiundecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]metil]fenil]metil,N{B-9}-[4-[[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-(11-carboxiundecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]metil]fenil]metil-GluA-9,GluA-8,AlaA-7,GluA-6,AlaA-5,AspA-4,AspA-3,AspA-2,AspA-1,GluB-9,GluB-8,AlaB-7,GluB-6,AlaB-5,AspB-4,AspB-3,AspB-2,AspB-1[LysA1,GluA2,SerA3,LysB1,GluB2,SerB3]-MIC-1



(Fórmula 14)

25

El compuesto 14 se preparó mediante el uso del procedimiento descrito en el ejemplo 11.10 usando el prolongador descrito en el ejemplo 10.5 y el polipéptido MIC-1 con extensión en N (SEQ ID NO: 311).

Masa teórica: 28,043.9; Encontrada: 28,043.6.

30

Ejemplo 11.15 y Ejemplo 11.16: Compuesto 15 y Compuesto 16

Compuesto 15:

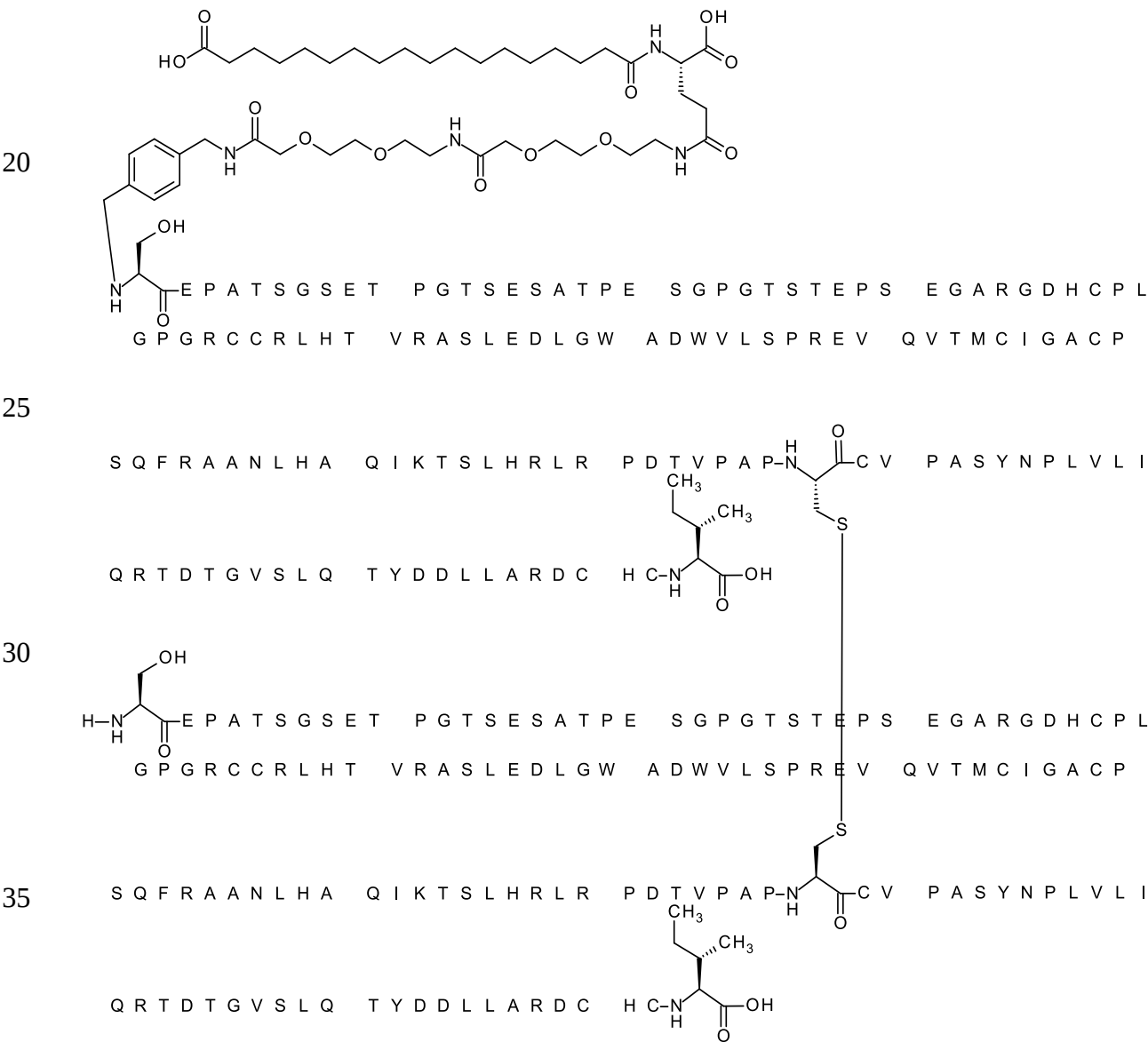
N{B-32}-[4-[[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]metil]fenil]metil-SerA-32,GluA-31,ProA-30,AlaA-29,ThrA-28,SerA-27,GlyA-26,SerA-25,GluA-24,ThrA-23,ProA-22,GlyA-21,ThrA-20,SerA-19,GluA-18,SerA-17,AlaA-16,ThrA-15,ProA-14,GluA-13,SerA-12,GlyA-11,ProA-10,GlyA-9,ThrA-8,SerA-7,ThrA-6,GluA-5,ProA-4,SerA-3,GluA-2,GlyA-1,SerB-32,GluB-31,ProB-30,AlaB-29,ThrB-28,SerB-27,GlyB-26,SerB-25,GluB-24,ThrB-23,ProB-22,GlyB-21,ThrB-20,SerB-19,GluB-18,SerB-17,AlaB-16,ThrB-15,ProB-14,GluB-13,SerB-12,GlyB-11,ProB-10,GlyB-9,ThrB-8,SerB-7,ThrB-6,GluB-5,ProB-4,SerB-3,GluB-2,GlyB-

40

1[LeuA57,ArgA69,LeuA86,ArgA91,ArgA107,LeuB57,ArgB69,LeuB86,ArgB91,ArgB107
],des-AsnA3,AsnB3-MIC-1

Compuesto 16:

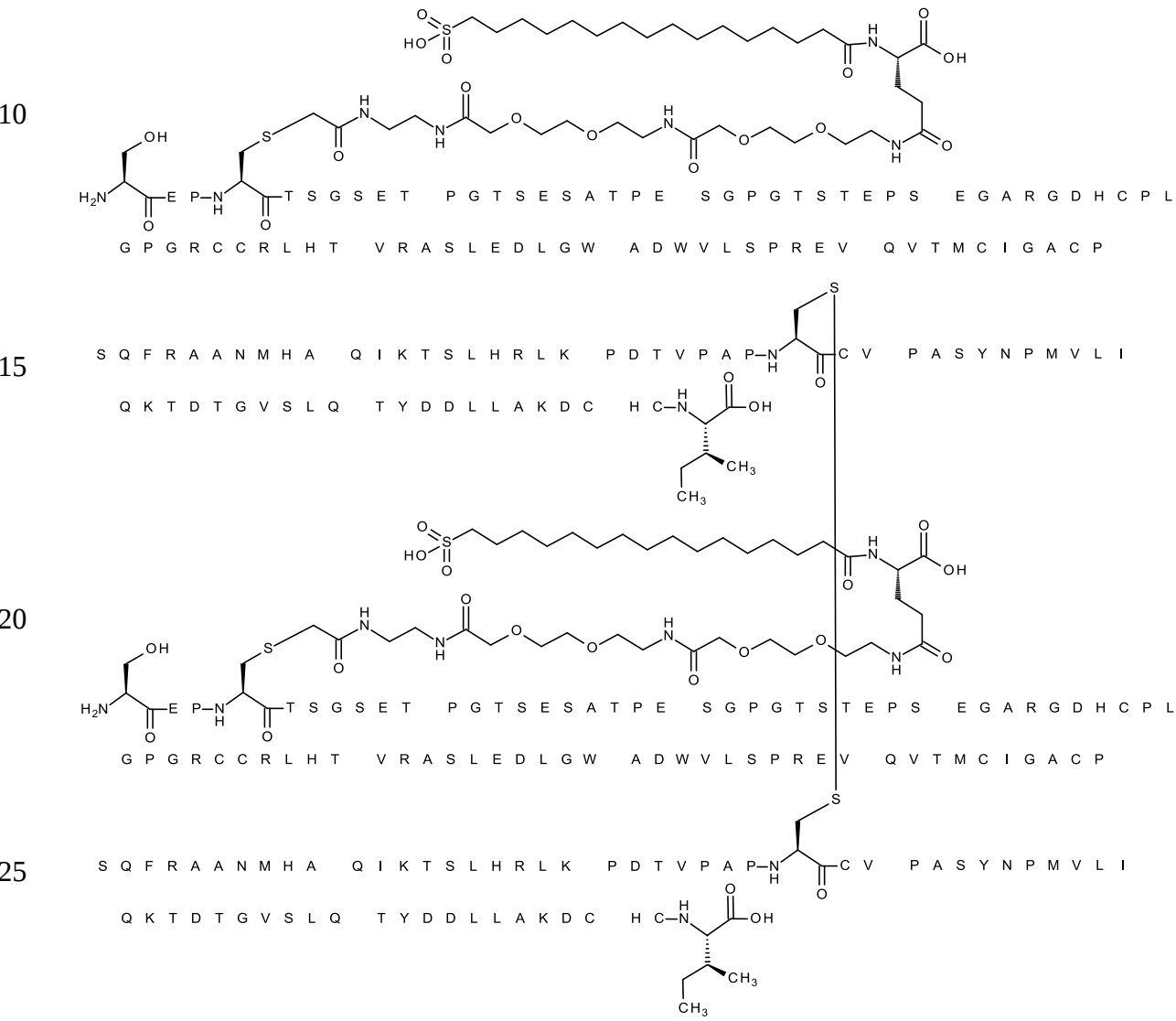
N{A-32}-[4-[[[2-2-[2-2-[2-2-[2-2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]ami
no]metil]fenil]metil,N{B-32}-[4-[[[2-2-[2-2-[2-2-[2-2-[[(4S)-4-carboxi-4-(17-
carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]ami
no]metil]fenil]metil-SerA-32,GluA-31,ProA-30,AlaA-29,ThrA-28,SerA-27,GlyA-26,SerA-
25,GluA-24,ThrA-23,ProA-22,GlyA-21,ThrA-20,SerA-19,GluA-18,SerA-17,AlaA-
16,ThrA-15,ProA-14,GluA-13,SerA-12,GlyA-11,ProA-10,GlyA-9,ThrA-8,SerA-7,ThrA-
6,GluA-5,ProA-4,SerA-3,GluA-2,GlyA-1,SerB-32,GluB-31,ProB-30,AlaB-29,ThrB-
28,SerB-27,GlyB-26,SerB-25,GluB-24,ThrB-23,ProB-22,GlyB-21,ThrB-20,SerB-19,GluB-
18,SerB-17,AlaB-16,ThrB-15,ProB-14,GluB-13,SerB-12,GlyB-11,ProB-10,GlyB-9,ThrB-
8,SerB-7,ThrB-6,GluB-5,ProB-4,SerB-3,GluB-2,GlyB-
1[LeuA57,ArgA69,LeuA86,ArgA91,ArgA107,LeuB57,ArgB69,LeuB86,ArgB91,ArgB107
],des-AsnA3,AsnB3-MIC-1



(Fórmula 15)

40

6, GluA-5, ProA-4, SerA-3, GluA-2, GlyA-1, SerB-32, GluB-31, ProB-30, S{Beta}-[2-[2-[[2-[2-
 [2-[[2-[2-[2-[[(4S)-4-carboxi-4-(16-
 sulfohexadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]
 acetil]amino]etilamino]-2-oxoetil]CysB-29, ThrB-28, SerB-27, GlyB-26, SerB-25, GluB-
 5 24, ThrB-23, ProB-22, GlyB-21, ThrB-20, SerB-19, GluB-18, SerB-17, AlaB-16, ThrB-15, ProB-
 14, GluB-13, SerB-12, GlyB-11, ProB-10, GlyB-9, ThrB-8, SerB-7, ThrB-6, GluB-5, ProB-
 4, SerB-3, GluB-2, GlyB-1des-AsnA3, AsnB3-MIC-1

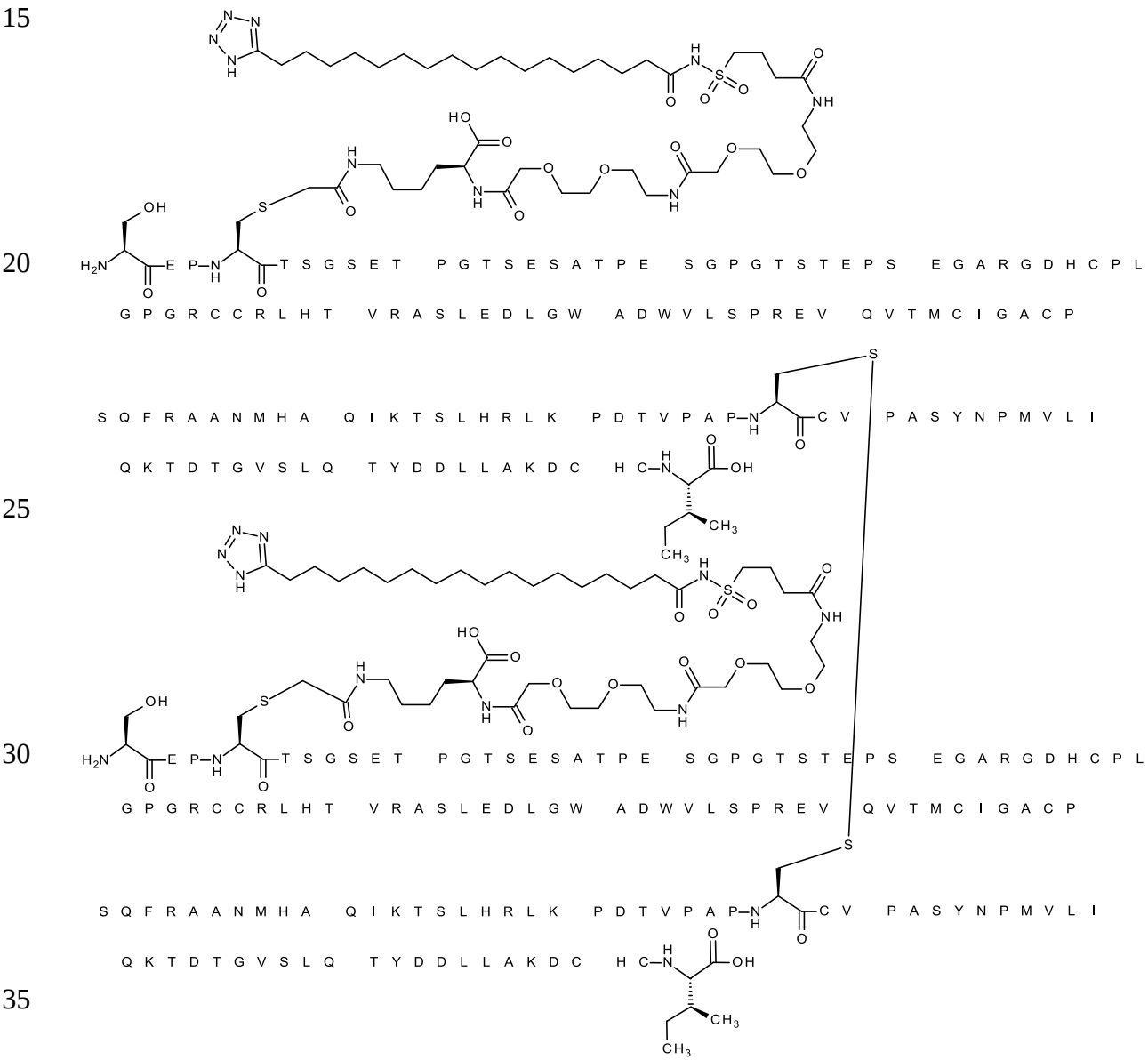


(Fórmula 17)

30 Se añadió 4 ml de tampón TRIS 2 M a 176 mg de polipéptido MIC-1 con extensión en N
 (SEQ ID NO: 288) en ácido cítrico 15 mM/cloruro de sodio 450 mM, pH 3, 2.2 mg/ml. El
 prolongador descrito en el Ejemplo 10.6 se disolvió en hidrógeno carbonato de sodio
 saturado a 20 mg/l, 8 equivalentes. Después el prolongador se añadió a la solución de
 35 polipéptido. Se añadió 12.4 mg de bis(p-sulfonatofenil)fenilfosfina, sal de potasio
 dihidratada, Sigma-Aldrich 698539 disuelta en agua (0.1 mg/ml) y la mezcla de reacción se
 agitó suavemente durante 10 s. Después de 6 horas el compuesto se purificó en una
 columna C4 mediante el uso de una columna de fase inversa C4 usando un 10-50 %
 etanol/tampón fosfato pH 3.0.
 40 Masa teórica: 32,050.3; Encontrada: 32,050.0.

Ejemplo 11.18: Compuesto 18

SerA-32,GluA-31,ProA-30,S{Beta}-[2-[[[(5S)-5-carboxi-5-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[4-[17-(1H-tetrazol-5-il)heptadecanoilsulfamoil]butanoilamino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]pencil]amino]-2-oxoetil]CysA-29,ThrA-28,SerA-27,GlyA-26,SerA-25,GluA-24,ThrA-23,ProA-22,GlyA-21,ThrA-20,SerA-19,GluA-18,SerA-17,AlaA-16,ThrA-15,ProA-14,GluA-13,SerA-12,GlyA-11,ProA-10,GlyA-9,ThrA-8,SerA-7,ThrA-6,GluA-5,ProA-4,SerA-3,GluA-2,GlyA-1,SerB-32,GluB-31,ProB-30,S{Beta}-[2-[[[(5S)-5-carboxi-5-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[4-[17-(1H-tetrazol-5-il)heptadecanoilsulfamoil]butanoilamino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]pencil]amino]-2-oxoetil]CysB-29,ThrB-28,SerB-27,GlyB-26,SerB-25,GluB-24,ThrB-23,ProB-22,GlyB-21,ThrB-20,SerB-19,GluB-18,SerB-17,AlaB-16,ThrB-15,ProB-14,GluB-13,SerB-12,GlyB-11,ProB-10,GlyB-9,ThrB-8,SerB-7,ThrB-6,GluB-5,ProB-4,SerB-3,GluB-2,GlyB-1des-AsnA3,AsnB3-MIC-1

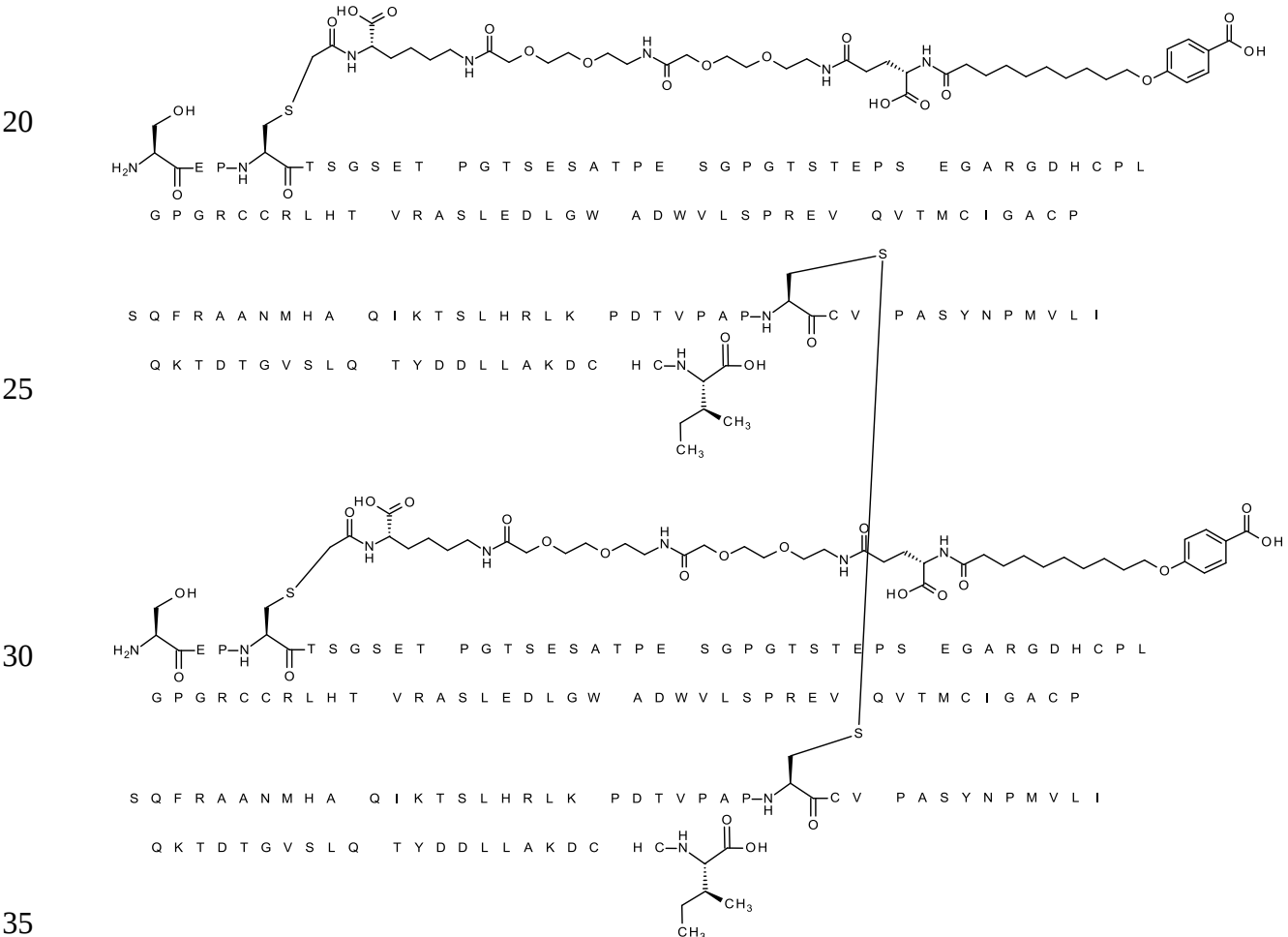


El compuesto 18 se preparó mediante el uso del procedimiento descrito en el Ejemplo 11.17 usando el prolongador descrito en el Ejemplo 10.7 y el polipéptido MIC-1 con extensión en N (SEQ ID NO: 288).

Masa teórica: 32,266.6; Encontrada: 32,266.0.

5 Ejemplo 11.19: Compuesto 19

SerA-32,GluA-31,ProA-30,S{Beta}-[2-[[[(1S)-1-carboxi-5-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]pentil]amino]-2-oxoetil]CysA-29,ThrA-28,SerA-27,GlyA-26,SerA-25,GluA-24,ThrA-23,ProA-22,GlyA-21,ThrA-20,SerA-19,GluA-18,SerA-17,AlaA-16,ThrA-15,ProA-14,GluA-13,SerA-12,GlyA-11,ProA-10,GlyA-9,ThrA-8,SerA-7,ThrA-6,GluA-5,ProA-4,SerA-3,GluA-2,GlyA-1,SerB-32,GluB-31,ProB-30,S{Beta}-[2-[[[(1S)-1-carboxi-5-[[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[10-(4-carboxifenoxi)decanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]pentil]amino]-2-oxoetil]CysB-29,ThrB-28,SerB-27,GlyB-26,SerB-25,GluB-24,ThrB-23,ProB-22,GlyB-21,ThrB-20,SerB-19,GluB-18,SerB-17,AlaB-16,ThrB-15,ProB-14,GluB-13,SerB-12,GlyB-11,ProB-10,GlyB-9,ThrB-8,SerB-7,ThrB-6,GluB-5,ProB-4,SerB-3,GluB-2,GlyB-1des-AsnA3,AsnB3-MIC-1



(Fórmula 19)

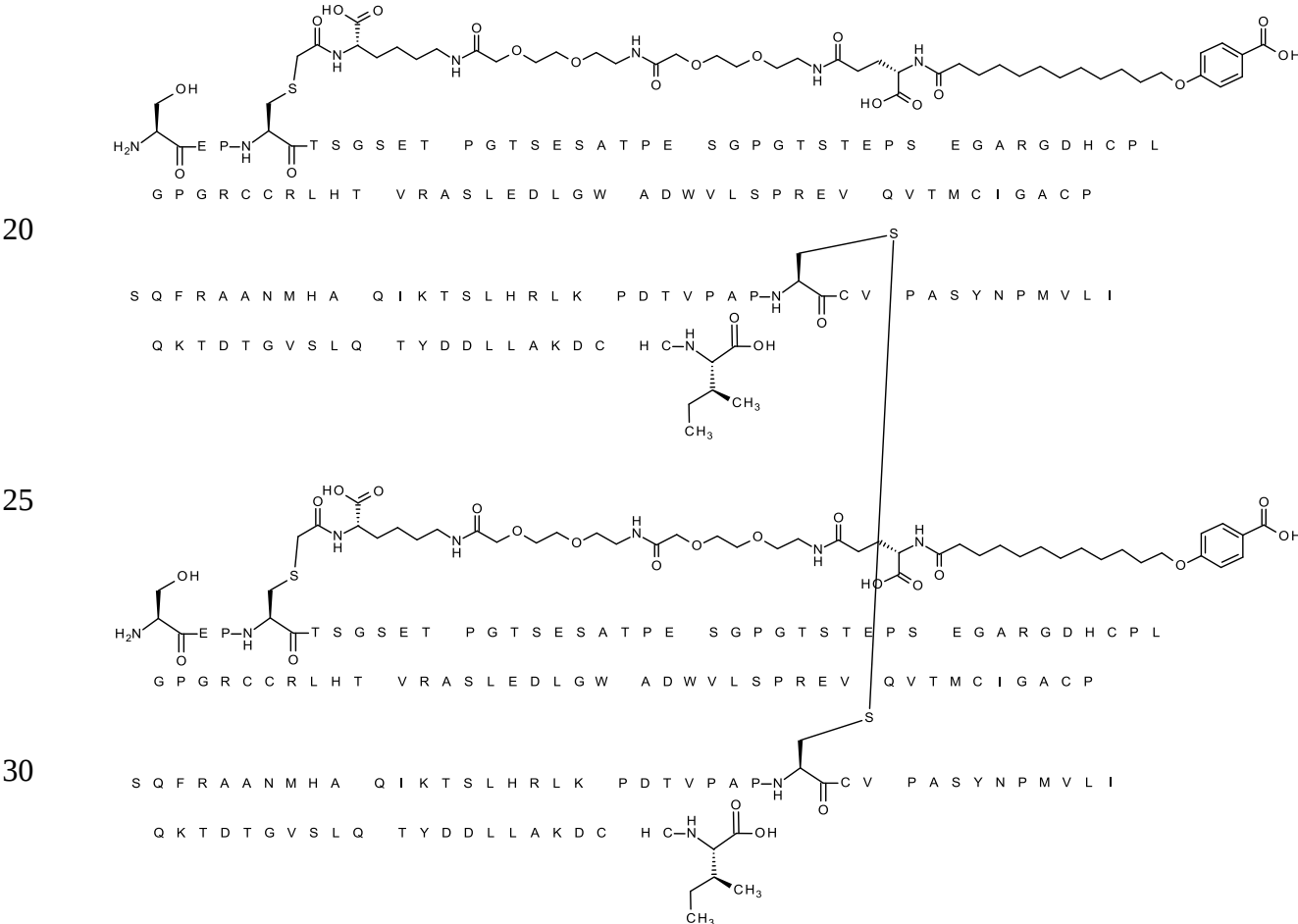
El compuesto 19 se preparó mediante el uso del procedimiento descrito en el Ejemplo 11.17 usando el prolongador descrito en el Ejemplo 10.8 y el polipéptido MIC-1 con extensión en N (SEQ ID NO: 288).

Masa teórica: 32,166.3; Encontrada: 32,166.0.

Ejemplo 11.20: Compuesto 20

SerA-32,GluA-31,ProA-30,S{Beta}-[2-[[[(1S)-1-carboxi-5-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-

carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]
amino]pentil]amino]-2-oxoetil]CysA-29,ThrA-28,SerA-27,GlyA-26,SerA-25,GluA-
24,ThrA-23,ProA-22,GlyA-21,ThrA-20,SerA-19,GluA-18,SerA-17,AlaA-16,ThrA-
15,ProA-14,GluA-13,SerA-12,GlyA-11,ProA-10,GlyA-9,ThrA-8,SerA-7,ThrA-6,GluA-
5,ProA-4,SerA-3,GluA-2,GlyA-1,SerB-32,GluB-31,ProB-30,S{Beta}-[2-[[[(1S)-1-carboxi-
5-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[12-(4-
carboxifenoxi)dodecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]
amino]pentil]amino]-2-oxoetil]CysB-29,ThrB-28,SerB-27,GlyB-26,SerB-25,GluB-
24,ThrB-23,ProB-22,GlyB-21,ThrB-20,SerB-19,GluB-18,SerB-17,AlaB-16,ThrB-15,ProB-
14,GluB-13,SerB-12,GlyB-11,ProB-10,GlyB-9,ThrB-8,SerB-7,ThrB-6,GluB-5,ProB-
4,SerB-3,GluB-2,GlyB-1des-AsnA3,AsnB3-MIC-1



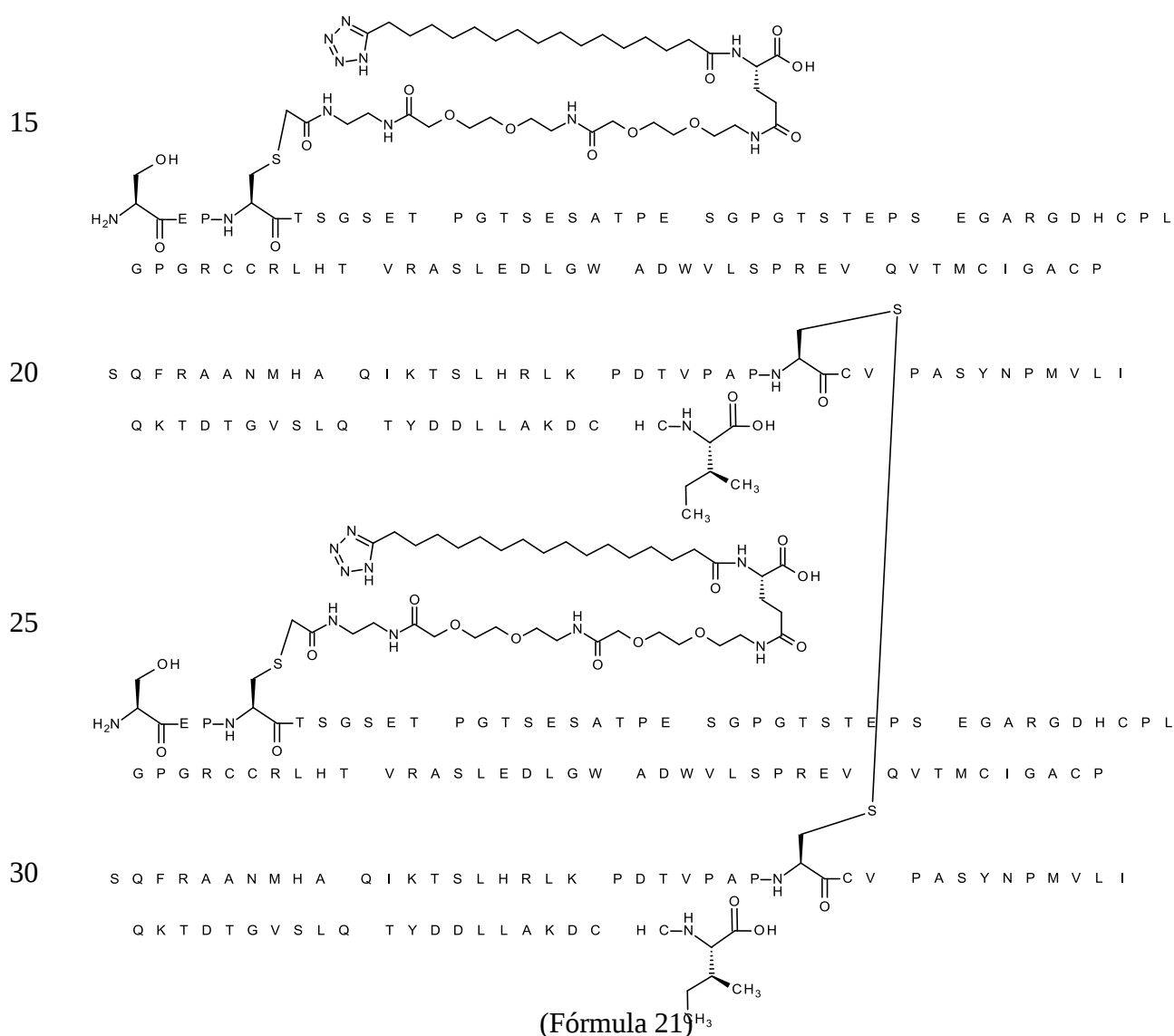
(Fórmula 20)

El compuesto 20 se preparó mediante el uso del procedimiento descrito en el Ejemplo 11.17 usando el prolongador descrito en el Ejemplo 10.9 y el polipéptido MIC-1 con extensión en N (SEQ ID NO: 288).

Masa teórica: 32,222.4; Encontrada: 32,222.0.

Ejemplo 11.21: Compuesto 21

SerA-32,GluA-31,ProA-30,S{Beta}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[16-(1H-tetrazol-5-il)hexadecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etilamino]-2-oxoetil]CysA-29,ThrA-28,SerA-27,GlyA-26,SerA-25,GluA-24,ThrA-23,ProA-22,GlyA-21,ThrA-20,SerA-19,GluA-18,SerA-17,AlaA-16,ThrA-15,ProA-14,GluA-13,SerA-12,GlyA-11,ProA-10,GlyA-9,ThrA-8,SerA-7,ThrA-6,GluA-5,ProA-4,SerA-3,GluA-2,GlyA-1,SerB-32,GluB-31,ProB-30,S{Beta}-[2-[2-[[2-[2-[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[16-(1H-tetrazol-5-il)hexadecanoilamino]butanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etilamino]-2-oxoetil]CysB-29,ThrB-28,SerB-27,GlyB-26,SerB-25,GluB-24,ThrB-23,ProB-22,GlyB-21,ThrB-20,SerB-19,GluB-18,SerB-17,AlaB-16,ThrB-15,ProB-14,GluB-13,SerB-12,GlyB-11,ProB-10,GlyB-9,ThrB-8,SerB-7,ThrB-6,GluB-5,ProB-4,SerB-3,GluB-2,GlyB-1des-AsnA3,AsnB3-MIC-1



35 El compuesto 21 se preparó mediante el uso del procedimiento descrito en el Ejemplo 11.17 usando el prolongador descrito en el Ejemplo 10.10 y el polipéptido MIC-1 con extensión en N (SEQ ID NO: 288).

Masa teórica: 32,026.3; Encontrada: 32,026.0.

Las estructuras de los Compuestos 01-21 se resumen en la Tabla 18.

40 Tabla 18: Las estructuras de los compuestos de MIC-1

Compuesto núm.	Extensión en N	Polipéptido MIC-1	prolongador
Compuesto 01	SEPCTSGSETPGT SESATPESGPGTS TEPSEG (SEQ ID NO: 225)	MIC-1, des-N3 (SEQ ID NO:2)	Fórmula D (C18)
Compuesto 02	SEPATCGSETPGT SESATPESGPGTS TEPSEG (SEQ ID NO: 226)	MIC-1, des-N3 (SEQ ID NO:2)	Fórmula D (C18)
Compuesto 03	SEPATCGSETPGT SESATPESGPGTS TEPSEG (SEQ ID NO: 226)	MIC-1, des-N3 (SEQ ID NO:2)	Fórmula B (C16)
Compuesto 04	SEPATCGSETPGT SESATPESGPGTS TEPSEG (SEQ ID NO: 226)	MIC-1, des-N3 (SEQ ID NO:2)	Fórmula C (C14)
Compuesto 05	SEPATSCSETPGT SESATPESGPGTS TEPSEG (SEQ ID NO: 227)	MIC-1, des-N3, M57L, M86L (SEQ ID NO:222)	Fórmula D (C18)
Compuesto 06	SEPATSGCETPGT SESATPESGPGTS TEPSEG (SEQ ID NO: 230)	MIC-1, des-N3, M57L, M86L (SEQ ID NO:222)	Fórmula D (C18)
Compuesto 07	SEPATSGSETPGT SESACPESGPGTS TEPSEG (SEQ ID NO: 235)	MIC-1, des-N3, M57L, M86L (SEQ ID NO:222)	Fórmula D (C18)
Compuesto 08	SEPATSGSETPGT SESATPESGPGTS TEPCEG (SEQ ID NO: 239)	MIC-1, des-N3, M57L, M86L (SEQ ID NO:222)	Fórmula D (C18)
Compuesto 09	SEPATSGSETPGT SESATPESGPGTS TEPSEG (SEQ ID NO: 71)	MIC-1, des-N3, M57L, M86L (SEQ ID NO:222)	Fórmula A (C18)*
Compuesto	SEPATSGSETPGT	MIC-1, des-N3,	Fórmula A (C18)

10	SESATPESGPGTS TEPSEG (SEQ ID NO: 71)	M57L, M86L (SEQ ID NO:222)	
Compuesto 11	SEPCTSGSETPGT SESATPESGPGTS TEPSEG (SEQ ID NO: 225)	MIC-1, des-N3, M57L, M86L (SEQ ID NO:222)	Fórmula D (C18)
Compuesto 12	EEAEADDDDK (SEQ ID NO: 313)	MIC-1, des-A1, R2E, N3S	Fórmula D (C18)
Compuesto 13	EEAEADDDDK (SEQ ID NO: 313)	MIC-1, des-A1, R2E, N3S (SEQ ID NO:314)	Fórmula D (C18)*
Compuesto 14	EEAEADDDDK (SEQ ID NO: 313)	MIC-1, des-A1, R2E, N3S (SEQ ID NO:314)	Fórmula E (C12)
Compuesto 15	SEPATSGSETPGT SESATPESGPGTS TEPSEG (SEQ ID NO: 71)	MIC-1, del-N3, M57L, M86L, K69R, K107R, K91R (SEQ ID NO:315)	Fórmula A (C18)*
Compuesto 16	SEPATSGSETPGT SESATPESGPGTS TEPSEG (SEQ ID NO: 71)	MIC-1, del-N3, M57L, M86L, K69R, K107R, K91R (SEQ ID NO:315)	Fórmula A (C18)
Compuesto 17	SEPCTSGSETPGT SESATPESGPGTS TEPSEG (SEQ ID NO: 225)	MIC-1, des-N3 (SEQ ID NO:2)	Fórmula F
Compuesto 18	SEPCTSGSETPGT SESATPESGPGTS TEPSEG (SEQ ID NO: 225)	MIC-1, des-N3 (SEQ ID NO:2)	Fórmula G
Compuesto 19	SEPCTSGSETPGT SESATPESGPGTS TEPSEG (SEQ ID NO: 225)	MIC-1, des-N3 (SEQ ID NO:2)	Fórmula H
Compuesto 20	SEPCTSGSETPGT SESATPESGPGTS TEPSEG (SEQ ID NO: 225)	MIC-1, des-N3 (SEQ ID NO:2)	Fórmula K

Compuesto 21	SEPCTSGSETPGT SESATPESGPGTS TEPSEG (SEQ ID NO: 225)	MIC-1, des-N3 (SEQ ID NO:2)	Fórmula J
-----------------	--	--------------------------------	-----------

Nota: * significa que un solo prolongador se une al Compuesto 09, Compuesto 13 o Compuesto 15, es decir el Compuesto 09, Compuesto 13 o Compuesto 15 como un dímero solo tiene un prolongador unido a una de sus dos extensiones en el N-terminal. Para los otros Compuestos, un prolongador se une a cada una de las dos extensiones en el N-terminal del dímero, es decir dos prolongadores por Compuesto dimérico.

Ejemplo 12: Solubilidad de compuestos de MIC-1

Las muestras de los compuestos de MIC-1 se prepararon en tampón PBS pH 7.4 seguido de la concentración de las muestras por encima de 35 mg/ml.

Las muestras de los compuestos de MIC-1 en PBS se concentraron en un Vivaspín 20 con MWCO de 10 kDa (Sartorius) de acuerdo con la descripción en el manual de Vivaspín. Se usó una centrífuga Heraeus Multifuge X3R equipada con rotor de cubeta oscilante (Thermo Scientific) a 4000 rpm (3310 x g) para concentrar las muestras de los compuestos de MIC-1. La concentración se determinó posteriormente mediante la medición de UV a 280 nm en un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Las concentraciones medidas se presentan en la Tabla 19.

Tabla 19: La solubilidad de los compuestos de MIC-1

Compuestos de MIC-1	Solubilidad (mg/ml)
Compuesto 03	43
Compuesto 05	36
Compuesto 01	32
Compuesto 07	35
Compuesto 17	41
Compuesto 19	37
Compuesto 20	39
Compuesto 21	31

Puede observarse que la unión de varios prolongadores no afecta la solubilidad mejorada obtenida mediante la adición de una extensión de aminoácidos en el N-terminal a un polipéptido MIC-1.

Ejemplo 13: Ensayo de potencia y actividad de unión in vitro de compuestos de MIC-1 con prolongadores

Línea celular

La línea celular estable BHK21-hGFRAL-IRES-hRET se generó en Novo Nordisk con la adición de un vector con el elemento de respuesta al suero (SRE) delante del reportero

luciferasa (ver el Ejemplo 5). La secuencia de GFRAL humana y RET humana se obtuvo en Uniprot: UniProtKB - Q6UXV0 (GFRAL_HUMAN) y UniProtKB - P07949 (RET_HUMAN). Esta línea celular se usó para el ensayo de luciferasa funcional así como para la preparación de membranas para la unión en el ensayo de centelleo por proximidad (SPA).

5 Ensayo de luciferasa: Las células BHK21 transfectadas de manera estable con los genes de los receptores hGFRAL, hRET y del reportero SRE-Luciferasa se trataron con diferentes concentraciones de compuestos de MIC-1. La activación de los receptores se midió mediante la cuantificación de la actividad luciferasa y las potencias de los compuestos se

10 calcularon por EC50.

Unión en SPA: La membrana celular de células BHK21-hGFRAL-IRES-hRET, SRE-Luciferasa se aislaron y se trataron con 50 pM de MIC-1 marcada con I125 con diferentes concentraciones de compuestos de MIC-1. Las potencias de unión de los compuestos de MIC-1 se calcularon por IC50 de las curvas de desplazamiento.

15 Ensayo de luciferasa

Los frascos con células congeladas se descongelaron rápidamente y las células se trasladaron a un tubo corning de 50 ml con 10 ml de medio completo precalentado que consistía en DMEM con alto contenido de glucosa y pirovato de sodio, suero bovino fetal al 10 % inactivado por calor, penicilina-estreptomicina al 1 %, G418-Geneticina a 1 mg/ml e

20 higromicina a 400 µg/ml. Las células se centrifugaron a 1200 rpm y el sobrenadante se desechó. Este procedimiento de lavado se repitió una vez lo que dio como resultado el lavado por 2 veces de las células. Las células se resuspendieron en medio completo a una concentración de 1.2×10^6 células por ml. Las células se sembraron a 1.2×10^5 células por pocillo (100 µl/pocillo) en placas de ensayo de 96 pocillos recubiertas con poli-D-Lisina.

25 Las células se dejaron unir a la superficie inferior de los pocillos durante 4-6 horas a +34 °C seguido del cambio de medio a 80 µl de medio de inanición que consistía en medio RPMI con HEPES 15 mM. Las células se dejaron incubar durante la noche a +34 °C en un medio humidificado con 5 % de CO₂. Los compuestos de prueba se diluyeron en serie en medio de ensayo que consistía en RPMI, HEPES 15 mM y ovoalbúmina al 0.5 % con o sin

30 albúmina sérica humana (HSA) al 5 %. Se añadió a cada pocillo 20 µl de tampón de ensayo que contenía los compuestos de prueba lo que dio como resultado una concentración final de ovoalbúmina al 0.1 %, HSA al 1 % y compuestos de prueba en el intervalo de 30,000 pM a 3 pM con un blanco incluido. Las placas se incubaron durante 4 horas a +37 °C en un medio humidificado con 5 % de CO₂. Después de la incubación, se añadió 100 µl de

35 soluciones de sustrato de luciferasa a cada pocillo y se selló. La placa se dejó incubar durante 15 minutos seguido de la lectura de la luminiscencia. Se usó una medición de la intensidad de luminiscencia para los cálculos de los valores de EC₅₀ mediante análisis de regresión no lineal de las curvas de respuesta a dosis sigmoidales.

Unión en SPA

Las células BHK21-hGFRAL-IRES-hRET se cultivaron a +37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂ en medio completo que consistía en DMEM con alto contenido de glucosa y pirovato de sodio, suero bovino fetal al 10 % inactivado por calor, penicilina-estreptomicina al 1 %, G418-Geneticina a 1 mg/ml e higromicina a 400 ug/ml.

5 Las células se lavaron dos veces en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) fría y se desprendieron mecánicamente mediante raspado, se transfirieron en DPBS frío a tubos de centrífuga cónicos y se centrifugaron durante 5 min a 1500 rpm a +20 °C. El sedimento celular se resuspendió en una cantidad total de 10 ml de tampón de

10 homogeneización A frío (Tris 50 mM, EDTA 2.5 mM, pH ajustado a 7.4 con una tableta de cóctel inhibidor de proteasas sin EDTA/50 ml) y se homogeneizó durante 20 segundos. El homogeneizado se centrifugó a 16,000 rpm en 20 minutos a +4 °C. El sobrenadante se desechó y el sedimento se reconstituyó en 10 ml de tampón de homogeneización B (Tris 50 mM, sacarosa 320 mM, pH ajustado a 7.4 con una tableta de cóctel inhibidor de proteasas sin EDTA/50 ml) y se homogeneizó durante 20 segundos y se centrifugó a 16,000 rpm en

15 20 minutos a +4 °C. Este procedimiento se repitió una vez más. El sobrenadante se desechó y el sedimento se reconstituyó en 3 ml de tampón de homogeneización B y se homogeneizó durante 10 segundos a baja velocidad. La concentración de proteína se determinó mediante el método estándar de Bradford y se hicieron alícuotas de 1.5 mg de proteína/tubo en criotubos y se almacenaron a -80 °C. Los ensayos de unión se realizaron en placas de 96

20 pocillos blancas en un volumen total de 200 µl por pocillo. Las perlas de SPA con aglutinina de germen de trigo se reconstituyeron en tampón de ensayo (Tris/HCl 50 mM, MgCl₂ 4.5 mM, Tween 20 al 0.02 % y ovoalbúmina al 0.25 % pH 7.4) y se mezclaron con preparación de membranas para dar una concentración final de 0.5 mg de perlas de SPA y 10 µg de proteína total por pocillo. Se añadió cincuenta mil conteos por minuto por pocillo

25 del radioligando humano [125I]-MIC-1 (generado en Novo Nordisk) correspondiente a una concentración de 50 pM. Los compuestos de MIC-1 a analizar se diluyeron en serie en tampón de ensayo para dar una concentración final de ensayo en el intervalo de 1 µM a 1 pM. La placa se selló y se incubó a +22 °C durante 2 horas en un agitador de placas configurado a 350 rpm y después de eso se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos antes

30 de la lectura de la emisión de luz de las perlas de SPA. El desplazamiento del radioligando se midió como la reducción de la emisión de luz de las perlas de SPA y los valores de IC₅₀ se calcularon mediante análisis de regresión no lineal de las curvas de respuesta a dosis sigmoidales (Tabla 20).

Tabla 20: Potencia y actividad de unión de los compuestos de MIC-1

Compuesto núm./SEQ ID NO	EC50 de Luciferasa NNDK (pM)	EC50 de Luciferasa +HSA al 0.1 % NNDK (pM)	IC50 de unión en SPA de MIC-1 (nM)
SEQ ID NO: 1	59	36	0.67
SEQ ID NO: 164	85	64	119

SEQ ID NO: 288	70	47	6.7
SEQ ID NO: 291	80	45	10
SEQ ID NO: 312	42	35	116
SEQ ID NO: 303	57	34	43
SEQ ID NO: 292	125	115	29
SEQ ID NO: 293	217	243	83
SEQ ID NO: 289	35	26	36
SEQ ID NO: 290	100	75	80
Compuesto 10	71	146	20
Compuesto 02	123	107	4.9
Compuesto 03	96	106	11
Compuesto 04	90	58	17
Compuesto 01	72	59	3.8
Compuesto 15	61	39	39
Compuesto 16	63	51	11
Compuesto 06	81	61	21
Compuesto 05	57	63	23
Compuesto 08	139	651	56
Compuesto 11	55	62	29
Compuesto 07	121	198	29
Compuesto 17	43	65	4.7
Compuesto 18	66	67	1.3
Compuesto 19	45	62	17
Compuesto 20	49	77	6.5
Compuesto 21	53	56	1.0

Como puede observarse en la Tabla 20, los compuestos de MIC-1 con ácidos grasos tienen una potencia in vitro similar en comparación con los polipéptidos MIC-1 sin ácidos grasos. Pero la potencia in vitro sería menor si la mutación de Cys está cerca del N-terminal del polipéptido MIC-1, tal como la mutación de Cys S(-3)C.

El descubrimiento de que los compuestos de MIC-1 con ácidos grasos tienen una potencia similar a la de los polipéptidos MIC-1 sin ácidos grasos es sorprendente. En general, la adición de ácidos grasos a compuestos biológicos farmacéuticos para la prolongación da como resultado una disminución de la potencia y en general esta disminución se incrementa aún más al medir la potencia en presencia de albúmina. Por lo tanto, el descubrimiento de la no reducción de la potencia de los compuestos de MIC-1 con prolongadores de ácidos grasos es inesperado.

Ejemplo 14: Efecto de los compuestos de MIC-1 sobre la ingesta de alimentos y el peso corporal en ratas Sprague Dawley delgadas

La eficacia in vivo de los compuestos de MIC-1 de la invención se midió en ratas Sprague Dawley machos delgadas de 9-11 semanas de edad. Los animales se inyectaron diariamente con una dosis de 8 nmol/kg de peso corporal 1-2 h antes del inicio del período de oscuridad. Los compuestos se administraron por vía subcutánea (1-4 ml/kg) en una solución tamponada apropiada. Los cambios en la ingesta de alimentos se midieron durante 7 días mediante el uso de sistemas automáticos de monitoreo de alimentos (sistema BioDAQ y sistema HM2 para rata). En el sistema BioDAQ los animales se alojaron por separado; y en el sistema HM2 los animales se alojaron en grupos con hasta 3 animales por jaula. En el día 8, se recolectó una muestra de sangre de la cola 2-3 h después de la administración del compuesto, y esta muestra se usó para medir las concentraciones plasmáticas de los compuestos administrados. Cada compuesto se analizó en n=4-8 animales. Los animales se aclimataron durante al menos 7 días antes del experimento. Los datos recolectados de la ingesta de alimentos se expresan como la ingesta diaria de alimentos (ingesta de alimentos de 24 horas) medida desde el inicio de cada fase de oscuridad diaria de 12 horas hasta la fase de oscuridad del día siguiente. Los cambios diarios en la ingesta de alimentos en respuesta al compuesto administrado se calcularon restando la ingesta diaria promedio de alimentos del grupo de vehículo de la ingesta diaria promedio de alimentos del grupo de tratamiento. Los cambios se consideraron significativos si $p < 0.1$ mediante el uso de una prueba t de Student de dos colas. Los resultados se expresan como la “máxima reducción” de la ingesta de alimentos en comparación con el vehículo (solución tampón, porcentaje) registrada durante el período de estudio. Los datos se expresan, además, como la “reducción acumulada” de la ingesta de alimentos que es la suma de las reducciones diarias significativas ($p < 0.1$) de la ingesta de alimentos (porcentaje) durante el período de estudio. El peso corporal de los animales se midió en el día de la conclusión del estudio mediante el uso de una balanza calibrada. El efecto del tratamiento sobre el peso corporal se calculó como la diferencia porcentual en el peso corporal entre los animales tratados con el compuesto en comparación con los animales tratados con vehículo al concluir el estudio (Tabla 21).

Tabla 21: Reducción de la ingesta de alimentos y el peso corporal en ratas SD

Compuesto núm./SEQ ID NO	Reducción de la ingesta de alimentos		Reducción del peso corporal [% en comparación con el vehículo]
	Eficacia máxima @ 8 nmol/kg [% de reducción en comparación con el vehículo]	Eficacia Acu, 7 días [% de reducción en comparación con el vehículo]	
SEQ ID NO: 1	67	391	18.4
Compuesto 12	66	342	18.5
SEQ ID NO: 300	87	431	23.5
SEQ ID NO: 299	92	453	26.0

SEQ ID NO: 298	83	446	24.2
SEQ ID NO: 297	92	495	26.6
SEQ ID NO: 296	86	427	22.6
SEQ ID NO: 295	92	533	29.5
SEQ ID NO: 311	77	420	23.4
Compuesto 13	75	431	25.2
Compuesto 14	89	484	26.1
SEQ ID NO: 164	71	408	23.3
Compuesto 09	54	283	16.5
Compuesto 10	61	288	18.4
Compuesto 02	86	470	27.2
Compuesto 03	86	458	27.4
Compuesto 04	79	497	30.2
Compuesto 07	77	375	20.0
Compuesto 08	70	353	17.7
Compuesto 05	75	405	19.9
Compuesto 01	77	426	23.4
Compuesto 11	58	287	17.5
Compuesto 17	63	371	18.6
Compuesto 18	72	384	21.2
Compuesto 19	68	398	23.5
Compuesto 20	69	374	22.5
Compuesto 21	73	394	23.1

Se muestra a partir de los datos experimentales de la Tabla 21 que los compuestos de MIC-1 con o sin prolongadores tienen una eficacia in vivo equivalente o mejor en ratas en comparación con el polipéptido MIC-1 de tipo silvestre. Los datos muestran, además, que
5 estos prolongadores no tienen un efecto negativo sobre la eficacia in vivo de los compuestos de MIC-1.

Ejemplo 15: Estudio farmacodinámico (PD) en cerdos

El propósito de este experimento fue investigar el efecto de los compuestos de MIC-1 sobre la ingesta de alimentos y el peso corporal en cerdos. Esto se realizó en un estudio
10 farmacodinámico (PD) como se describe a continuación, en el que la ingesta de alimentos se midió de 1 a 21 días después de la administración de una dosis única del compuesto de MIC-1, en comparación con un grupo de control tratado con vehículo.

Se usaron cerdos hembras Landrace Yorkshire Duroc (LYD) de aproximadamente 3 meses de edad, con un peso de aproximadamente 30-35 kg (n=4-6 por grupo). Los animales se
15 alojaron en un grupo durante aproximadamente 1 semana durante la aclimatación a las instalaciones animales. Durante la última parte del período de aclimatación los animales se

colocaron en corrales individuales (2 semanas antes de la dosificación) y durante todo el experimento para medir la ingesta de alimentos individual. La ingesta de alimentos medida los últimos tres días antes de la dosificación sirvió como referencia.

Los animales se alimentaron ad libitum con pienso para cerdos (Svinefoder Danish Top SI 611+3', Danish Agro) en todo momento durante la aclimatación y el período experimental.

La ingesta de alimentos se monitoreó en línea mediante el registro continuo del peso del pienso mediante el uso del sistema HMview (Ellegaard Systems, Faaborg, Dinamarca). Se recolectó y se pesó cualquier derrame notable, y la ingesta de alimentos medida automáticamente se corrigió para esta cantidad.

El peso corporal se midió una o dos veces por semana durante el estudio.

Los compuestos de MIC-1 se disolvieron en un tampón apropiado a concentraciones de aproximadamente 25 o 100 nmol/ml correspondientes a dosis de 1 o 9 nmol/kg. La solución tampón sirvió además como vehículo.

Los animales recibieron una dosis subcutánea única de los compuestos de MIC-1 o de vehículo en la mañana del día 1, y la ingesta de alimentos se midió durante 21 días después de la dosificación. Al final del estudio los animales se sacrificaron con una sobredosis i.v. de Euthasol administrada a través del catéter de la vena de la oreja.

La ingesta de alimentos se calculó en intervalos de 24 horas (0-24 h, 24-48 h, 48-72 h, 72-96 h hasta 20-21 días). En la Tabla 22, la ingesta de alimentos promedio resultante se presenta como el porcentaje de la ingesta de alimentos promedio del grupo de vehículo en el mismo intervalo de tiempo.

Tabla 22: Efecto sobre la ingesta de alimentos en cerdos

Compuesto de MIC-1 / Intervalo de tiempo (días)	PD en cerdo, ingesta de alimentos (% de vehículo) a intervalos de tiempo indicados		
	6-7	13-14	20-21
Vehículo	100	100	100
Compuesto 05 (1 nmol/kg)	88	100	117
Compuesto 05 (9 nmol/kg)	36	38	65
Compuesto 01 (1 nmol/kg)	49	86	103
Compuesto 01 (9 nmol/kg)	29	22	23

Los datos muestran que una inyección s.c. única de los compuestos analizados en los cerdos provocó una reducción de la ingesta de alimentos durante hasta e incluso más de 21 días después de la inyección (para las dosis de 9 nmol/kg del Compuesto 01).

El peso corporal se midió durante el estudio y los cerdos ganaron menos peso en los grupos tratados con compuestos de MIC-1 (Tabla 23, Figura 6).

Tabla 23: Cambio en la ganancia de peso corporal en relación con el grupo de vehículo

Compuestos de MIC-1 / Tiempo (días)	PD en cerdo, Δpeso corporal (en relación con el vehículo (%))		
	7	14	21
Vehículo	0	0	0
Compuesto 05 (1 nmol/kg)	-5.7	-5.7	-1.1
Compuesto 05 (9 nmol/kg)	-15.7	-26.5	-22.0
Compuesto 01 (1 nmol/kg)	-9.8	-9.1	-6.6
Compuesto 01 (9 nmol/kg)	-18.4	-26.9	-29.4

Ejemplo 16: Estudio farmacocinético en ratas SD delgadas

El propósito de este estudio es determinar la semivida terminal ($T_{1/2}$), el tiempo medio de residencia (MRT), el tiempo para los niveles plasmáticos máximos ($T_{m\acute{a}x}$) y el tiempo de biodisponibilidad (F) *in vivo* de los compuestos de MIC-1 después de la administración intravenosa y subcutánea a ratas Sprague Dawley delgadas. Esto se realiza en un estudio farmacocinético (PK), donde se determinan los parámetros PK de los compuestos de MIC-1 en cuestión. Por $T_{1/2}$ se entiende generalmente el período de tiempo requerido para reducir a la mitad una concentración plasmática determinada, medida después de la fase de distribución inicial con dosificación intravenosa. Por MRT se entiende en general la cantidad promedio de tiempo que el compuesto en cuestión permanece en el cuerpo. Por $T_{m\acute{a}x}$ se entiende en general el punto en el tiempo después de la administración subcutánea del compuesto en cuestión cuando el compuesto en cuestión alcanza la concentración más alta en el plasma sanguíneo durante. Por F se entiende en general la fracción de compuesto administrado por vía subcutánea que aparece en el plasma sanguíneo.

Los parámetros PK antes mencionados se midieron en ratas SD delgadas de 300 g-500 g mediante la inyección del compuesto en la vena de la cola o en el subcutis del cuello seguido de la recolección de muestras de plasma sanguíneo en diversos puntos de tiempo para el análisis de exposición. Los compuestos (4-5 nmol/kg de peso corporal) se administraron por vía intravenosa (1 ml/kg) en una solución tampón adecuada. El tamaño de grupo del grupo por vía intravenosa fue típicamente 4 y el tamaño de grupo del grupo por vía subcutánea fue típicamente 5. Las ratas estaban despiertas durante todo el experimento y tenían acceso al alimento y al agua.

Para los compuestos con una $T_{1/2}$ de menos de 12 h las muestras de sangre se recolectaron de la lengua típicamente en el tiempo 5 min, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h, 12 h, 14 h, 22 h, 30 h, 48 h después de la dosificación o en los tiempos 0 min, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 2 h, 2½ h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h, 24 h, 30 h, 48 h después de la dosificación. Para los compuestos con una $T_{1/2}$ de más de 24 h las muestras de sangre se recolectaron de la lengua en el tiempo 5 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min, 360 min, 720 min, 24 h, 30 h, 48 h, 54 h, 72 h, 96 h, 168 h, 216 h, 264 h, 336 h después de la

dosificación, se recolectó 200 µl de sangre en tubos con EDTA y se almacenó en hielo durante hasta 20 minutos. Las muestras de plasma se generaron mediante la centrifugación de las muestras de sangre durante 5 minutos a 10,000 G a 4 °C. La muestra se pipeteó posteriormente a tubos Micronic en hielo seco, y se mantuvo a -20 °C hasta analizarse en

5 cuanto a la concentración plasmática del compuesto de MIC-1 respectivo mediante el uso de LOCI o un ensayo basado en anticuerpos similar tal como ELISA. Los perfiles individuales de concentración plasmática en el tiempo se analizaron mediante un modelo no compartimental en el programa informático Phoenix v. 6.4 (Pharsight Inc., Mountain View, CA, Estados Unidos), y se determinó T½, MRT, Tmáx y F resultantes (Tabla 24).

10 Tabla 24: Perfiles farmacocinéticos de compuestos/polipéptidos MIC-1 con extensión en el N-terminal

Compuesto núm./SEQ ID NO	Dosis	ROA	T½ h (media)	MRT h (media)	Tmáx h (media)	% de BA (media)
SEQ ID NO: 1	4 nmol/kg	IV	1.7	0.53	NA	NA
SEQ ID NO: 92	4 nmol/kg	IV	3.9	2.2	NA	NA
SEQ ID NO: 100	4 nmol/kg	IV	4.0	3.0	NA	NA
SEQ ID NO: 104	4 nmol/kg	IV	3.8	3.2	NA	NA
SEQ ID NO: 105	4 nmol/kg	IV	3.4	2.1	NA	NA
SEQ ID NO: 106	4 nmol/kg	IV	3.4	1.7	NA	NA
SEQ ID NO: 107	4 nmol/kg	IV	2.8	1.4	NA	NA
SEQ ID NO: 108	4 nmol/kg	IV	3.8	3.8	NA	NA
SEQ ID NO: 294	4 nmol/kg	IV	2.9	1.5	NA	NA
SEQ ID NO: 1	4 nmol/kg	SC	1.9	4.1	2.2	70
SEQ ID NO: 106	4 nmol/kg	SC	3.3	6.7	3.0	88
SEQ ID NO: 107	4 nmol/kg	SC	3.4	6.8	2.8	82
SEQ ID	4 nmol/kg	SC	4.1	8.6	3.0	90±

NO: 108						
SEQ ID NO: 294	4 nmol/kg	SC	2.8	6.2	3.0	67
Compuesto 13	5 nmol/kg	IV	26.3	33.1	NA	NA
Compuesto 12	5 nmol/kg	IV	42.1	54.8	NA	NA
Compuesto 14	5 nmol/kg	IV	2.9	2.1	NA	NA
Compuesto 10	4 nmol/kg	IV	37.0	45.7	NA	NA
Compuesto 02	4 nmol/kg	IV	73.8	106.2.	NA	NA
Compuesto 03	4 nmol/kg	IV	62.4	89.3	NA	NA
Compuesto 04	4 nmol/kg	IV	15.6	16.8	NA	NA
Compuesto 06	4 nmol/kg	IV	46.6	63.8	NA	NA
SEQ ID NO: 289	4 nmol/kg	IV	5.1	2.8	NA	NA
Compuesto 01	4 nmol/kg	IV	58	82	NA	NA
Compuesto 05	4 nmol/kg	IV	53	71	NA	NA
Compuesto 11	4 nmol/kg	IV	50	72	NA	NA
Compuesto 01	4 nmol/kg	SC	56	114	50	36
Compuesto 05	4 nmol/kg	SC	53	106	50	35
Compuesto 11	4 nmol/kg	SC	57	116	50	52
Compuesto 17	4 nmol/kg	SC	55.8	57.2	55.5	42.3
Compuesto 18	4 nmol/kg	SC	52.9	53.1	54.0	38.2
Compuesto 17	4 nmol/kg	IV	68.5	90.1	NA	NA

Compuesto 18	4 nmol/kg	IV	50.8	67.4	NA	NA
-----------------	-----------	----	------	------	----	----

Puede observarse que los compuestos de MIC-1 con prolongadores tienen T½, MRT y Tmáx mucho más largos en comparación con sus polipéptidos MIC-1 con extensiones en N sin prolongador. La prolongación de compuestos biológicos farmacéuticos con prolongadores de ácidos grasos comparables en general da como resultado una semivida terminal que rara vez excede las 12 horas en ratas. El descubrimiento de semividas terminales de más de 48 horas es inesperado y sorprendente.

Ejemplo 17: Estudio farmacocinético en minicerdos

El propósito de este estudio fue determinar la prolongación *in vivo* del compuesto de MIC-1 después de la administración i.v. a minicerdos, es decir la prolongación de su tiempo en el cuerpo y de esta manera su tiempo de acción. Esto se realizó en estudios farmacocinéticos (PK), donde se determinó la semivida terminal del compuesto en cuestión. Por semivida terminal se entiende el tiempo requerido para reducir a la mitad una concentración plasmática determinada en la fase de eliminación terminal.

Los minicerdos Göttingen hembras de aproximadamente 8 meses de edad y un peso de aproximadamente 23-25 kg usados en los estudios se obtuvieron de Ellegaard Göttingen Minipigs (Dalmose, Dinamarca). Los minicerdos se alojaron individualmente (cerdos con catéteres permanentes) en corrales con paja como lecho y se alimentaron de manera restringida una vez al día con dieta para minicerdos Altromin 9030 (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG).

Después de tres semanas de aclimatación se implantaron dos catéteres venosos centrales permanentes en la vena cava caudalis en cada animal. Los animales se dejaron en recuperación durante 1 semana después de la cirugía, y después se usaron para estudios farmacocinéticos repetidos con un período de lavado adecuado entre dosificaciones sucesivas.

Se administraron inyecciones intravenosas (el volumen correspondiente a 0.17 ml/kg) del compuesto a través de un catéter, y se tomaron muestras de sangre en puntos de tiempo predefinidos durante hasta 12 días después de la dosificación (preferentemente del otro catéter).

Las muestras de sangre (por ejemplo 0.8 ml) se recolectaron en tubos recubiertos con EDTA (8 mM) y después se centrifugaron a 4 °C y 1942 g durante 10 minutos. Las muestras de sangre se recolectaron en puntos de tiempo predefinidos. En el ejemplo las muestras de sangre se recolectaron a t= predosis, 0.0833, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 30, 48, 72, 96, 120, 168, 192, 216, 240, 264, y 288 horas después de la dosis.

El plasma se pipeteó a tubos Micronic en hielo seco, y se mantuvo a -20 °C hasta analizarse en cuanto a la concentración plasmática del compuesto de MIC-1 mediante el uso de LOCI. Los perfiles individuales de concentración plasmática en el tiempo se analizaron mediante

un método farmacocinético no compartimental en Phoenix v. 6.4 (Pharsight Inc., Mountain View, CA, Estados Unidos) y se determinaron las semividas resultantes (media armónica).

Resultados

Se obtuvo el siguiente resultado (Tabla 25).

5 Tabla 25: Estudio *in vivo* en minicerdos Göttingen después de la administración intravenosa

Compuesto núm.	PK iv en minicerdos	
	t½ (horas)	MRT (horas)
Compuesto 02	338	487
Compuesto 05	290	420
Compuesto 11	347	489

La semivida terminal (t½) es la media armónica, n=3

La prolongación de compuestos biológicos farmacéuticos con prolongadores de ácidos grasos comparables en general da como resultado una semivida terminal que rara vez
10 excede las 100 horas en minicerdos. El descubrimiento de una semivida terminal de más de 300 horas es inesperado y sorprendente.