



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 334 864**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **96908973 .9**  
96 Fecha de presentación : **12.04.1996**  
97 Número de publicación de la solicitud: **0830377**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.03.1998**

54 Título: **Péptido-2 análogo al glucagón y su uso terapéutico.**

30 Prioridad: **14.04.1995 US 422540**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.03.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.03.2010**

73 Titular/es: **1149336 ONTARIO Inc.**  
**19 Fernwood Road**  
**Toronto, Ontario M6B 3G3, CA**

72 Inventor/es: **Drucker, Daniel, J.**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 334 864 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Péptido-2 análogo al glucagón y su uso terapéutico.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a péptidos relacionados con glucagón con propiedades que promueven el crecimiento del tejido gastrointestinal, y a su uso terapéutico para tratar diversas afecciones médicas que resultan de un menor crecimiento o de la pérdida de tejido gastrointestinal, en particular, tejido intestinal y pancreático.

10

**Antecedentes de la invención**

La expresión del gen de glucagón proporciona diversos productos peptídicos específicos de tejidos que son procesados a partir del producto de proglucagón del residuo 160. La organización de estos péptidos dentro del precursor de proglucagón fue descubierta por la clonación molecular de los cADN de preproglucagón a partir del páncreas de rafe, rata, hámster y bovino. Estos análisis revelaron que el preproglucagón no sólo contiene la secuencia de glucagón y glicentina, sino que también dos péptidos más del tipo glucagón (GLP-1 y GLP-2) separados de glucagón y entre sí por dos péptidos espaciadores o intermedios (IP-I e IP-II). Estos péptidos están bordeados por pares de aminoácidos básicos, característico de los sitios de división prohormonales clásicos, lo que sugiere que podrían ser liberados después del procesamiento post-translacional del proglucagón (Drucker, *Pancreas*, 1990, 5 (4):484).

El análisis de los péptidos liberados del proglucagón en los islotes pancreáticos de Langerhans, por ejemplo, sugiere que el péptido pancreático primario liberado es el mero 29 glucagón, mientras que la glicentina, oxintomodulina, IP-II y los péptidos tipo glucagón son más frecuentes en los intestinos delgado y grueso. Esta demostración de que los péptidos tipo glucagón se encuentran en el intestino ha dirigido la investigación hacia el estudio de la estructura precisa y la(s) supuesta(s) función(ones) de estos péptidos viscerales recientemente descubiertos. La mayor parte de los estudios se han focalizado en GLP-1, porque las diversas líneas de evidencias sugirieron que GLP-1 puede ser un nuevo péptido regulador importante. En efecto, se ha determinado que GLP-1 es el estímulo peptidérgico más potente conocido para la liberación de insulina, una acción mediada dependiente de la glucosa por la interacción con receptores en células  $\beta$  pancreáticas. El GLP-1 y sus derivados están en desarrollo para su uso en el tratamiento de diabéticos.

Las funciones fisiológicas de la glicentina y la oxintomodulina, llamadas "enteroglucagones", están también bajo investigación, en particular con respecto a la regulación de la secreción ácida y el crecimiento de células intestinales. La oxintomodulina es capaz de inhibir la secreción de ácido gástrico estimulada por pentagastrina de una manera dependiente de la dosis. Se ha investigado la función de la glicentina en la mediación de los cambios de la adaptación intestinal y el crecimiento de la mucosa intestinal, y el efecto intestinotrófico de la glicentina y su uso terapéutico ha sido descrito por Matsuno *et al.* en el documento EP 612.531 publicado el 31 de agosto de 1994.

En contraste con GLP-1 y otros péptidos relacionados con glucagón, la función fisiológica del péptido tipo glucagón (GLP-2) aún no se entiende bien a pesar del aislamiento y la secuenciación de varios homólogos de GLP-2 en las especies humano, rata, bovino, porcino, conejillo de indias, hámster y degú. Con la utilización de antiseros de GLP-2 generados contra versiones sintéticas de GLP-2, varios grupos han determinado que GLP-2 está presente principalmente más en extractos intestinales que en pancreáticos (véase Mojsov *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1986, **261** (25):11880; Orskov *et al.*, en *Endocrinology*, 1986, **119** (4):1467 y en *Diabetologia*, 1987, **30**:874 y en *FEBS Letters*, 1989, **247** (2):193; George *et al.*, *FEBS Letters*, 1985, **192** (2):275). Con respecto a su función biológica, Hoosein *et al.* publicaron (*FEBS Letters*, 1984, **178** (1):8 83) que GLP-2 ni compete con glucagón por unirse al hígado de rata y a tejidos cerebrales, ni estimula la producción de la adenilato ciclase en membranas plasmáticas de hígado, aunque, enigmáticamente, estimula a la adenilato ciclase tanto en membranas hipotalámicas como pituitarias de rata a concentraciones de 30-50 pM. Además, se ha demostrado que GLP-2 no tiene ningún efecto sobre la liberación de glicerol cuando se incubaba con adipocitos de rata aislados (Ruíz-Grande *et al.*, (1992) *Peptides* **13** (1): 13-16). Una aclaración del papel fisiológico de GLP-2 sería ciertamente deseable.

55 **Resumen de la invención**

Se ha determinado recientemente que GLP-2 actúa como un agente trófico para promover el crecimiento del tejido gastrointestinal. El efecto de GLP-2 resalta en particular por un mayor crecimiento del intestino delgado, y por lo tanto se refiere en este documento a un efecto "intestinotrófico". De forma notable, los efectos promotores del crecimiento de GLP-2 también se manifiestan en un crecimiento de los islotes pancreáticos, y particularmente por el agrandamiento y la proliferación de los islotes. En consecuencia, un objeto general de la presente invención es explotar los GLP-2 y análogos de GLP-2 con fines terapéuticos y relacionados.

Más particularmente, y según un aspecto de la invención, se proporciona un GLP-2 o un análogo de GLP-2 en una forma farmacéuticamente aceptable que es adecuada para la formulación y su administración subsecuente a pacientes.

En otro de sus aspectos, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un GLP-2 o un análogo de GLP-2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto más, la invención proporciona un método para promover el crecimiento y la proliferación de tejido gastrointestinal, incluyendo tejido del intestino delgado y de los islotes pancreáticos, en un paciente con necesidad de éste, comprendiendo la etapa de administrar al paciente una cantidad que promueva el crecimiento del tejido gastrointestinal de un GLP-2 o un análogo de GLP-2.

5

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método útil para identificar nuevos análogos de GLP-2 intestino-tróficos, que comprende las etapas de:

10 1) obtener un análogo de GLP-2 intestino-trófico, teniendo el análogo al menos una sustitución de aminoácido o un aminoácido con un grupo bloqueante;

15 2) tratar a un mamífero con dicho análogo usando un régimen capaz de obtener un efecto intestino-trófico cuando se utiliza para GLP-2 de rata; y

20 3) determinar el efecto de dicho análogo en el peso del intestino delgado y/o en la altura de cripta más vellosidad y/o el tamaño de los islotes pancreáticos con relación a un mamífero control tratado de ensayo, por el cual dicho péptido intestino-trófico es identificado como un análogo que produce un aumento de dicho peso y/o dicha altura y/o dicho tamaño.

En otro de sus aspectos, la presente invención proporciona nuevos análogos de GLP-2, en la forma de análogos intestino-tróficos de GLP-2 de vertebrados. Estos análogos de GLP-2 promueven el crecimiento y la proliferación de tejido gastrointestinal, incluyendo tejido del intestino delgado y tejido de los islotes pancreáticos.

25

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método en el que se realiza un tratamiento en pacientes para restaurar el tejido gastrointestinal mediante las etapas de (1) cultivar dicho tejido o las células de éste con una cantidad que promueve el crecimiento de tejido de un GLP-2, o un análogo de GLP-2, y luego (2) implantar dicho tejido o células en el paciente que se trate.

30

En un aspecto relacionado, la invención proporciona un método para cultivar tejido gastrointestinal o las células de éste, que comprende la etapa de cultivar dicho tejido o células en un medio de cultivo suplementado con una cantidad que promueve el crecimiento de un GLP-2 o un análogo de GLP-2.

### 35 **Breve referencia a los dibujos**

La figura 1 muestra los resultados de la respuesta frente a la dosis con un GLP-2. Las medidas del efecto sobre el peso del intestino delgado (BW-panel A), altura de cripta más vellosidad en jejunio proximal (PJ-panel B), jejunio distal (DJ-panel C) e ileón distal (DI-panel D) en animales a los que se les ha inyectado GLP-2 de rata, son cada una representadas como una función de la dosis de GLP-2 de rata.

40

La figura 2 muestra el efecto del vehículo de formulación sobre la actividad intestino-trófica de un GLP-2. El peso del intestino delgado (BW), y la altura de cripta más vellosidad en jejunio proximal (PJ), jejunio distal (DJ) e ileón distal (DI) fueron medidos cada uno como una función de la administración de GLP-2 de rata en gelatina (G) o solución salina (PBS). Una solución de gelatina sin GLP-2 de rata fue usada como control (C).

45

La figura 3 muestra el efecto de la ruta de administración sobre la actividad intestino-trófica de un GLP-2. El cambio del porcentaje del peso del intestino delgado fue medido después de que se inyectara GLP-2 de rata subcutáneamente (SC), intramuscularmente (IM) o intraperitonealmente (IP). Las barras marcadas con T indican las muestras de ratas tratadas con GLP-2; C indica las muestras obtenidas de ratas control a las que se les ha inyectado solución salina.

50

La figura 4 muestra el efecto de la frecuencia de administración sobre la actividad de GLP-2. A los animales se le inyectó subcutáneamente PBS cada 12 horas, con 2,5  $\mu$ g de GLP-2 de rata cada 12 horas (q12h), con 5  $\mu$ g de GLP-2 de rata cada día (qd), o con 10  $\mu$ g de GLP-2 de rata cada dos días (qod), como se indica en el eje x. El peso del intestino delgado (BW) y la altura de cripta más vellosidad en jejunio proximal (PJ), jejunio distal (DJ) e ileón distal (DI) fueron medidos para cada protocolo de administración.

55

La figura 5 muestra el efecto de la duración de la administración de GLP-2 como una función de la actividad. A los animales se les inyectó una vez cada día 5  $\mu$ g de GLP-2 de rata en gelatina al 10%, o con gelatina al 10% sola durante cuatro semanas (panel A), ocho semanas (panel B) o 12 semanas (panel C), luego se sacrificaron. El efecto del tratamiento con GLP-2 con relación al control fue medido para el peso del intestino delgado (BW) y la altura de cripta más vellosidad en jejunio proximal (PJ), jejunio distal (DJ) e ileón distal (DI).

60

La figura 6 proporciona un curso de tiempo del efecto intestino-trófico de un GLP-2. Se sacrificaron ratones hembra a los que fueron inyectados dos veces al día 2,5  $\mu$ g de GLP-2 de rata en PBS varios días después de la iniciación del tratamiento, y se evaluó el peso del intestino delgado con relación a un animal de control al que solo se le había inyectado PBS.

65

La figura 7 muestra los efectos de la edad del receptor y del género sobre la actividad intestinotrófica de GLP-2. En los paneles de A a H, se compararon animales tratados con GLP-2 emparejados por sexo (ratones CD1) de 4 a 16 semanas de edad con respecto a sus propios controles tanto para el peso del intestino delgado (BW) como para la altura de cripta más vellosidad en jejunio proximal (PJ), jejunio distal (DJ) e ileón distal (DI) después del tratamiento con GLP-2 de rata.

La figura 8 muestra el efecto intestinotrófico de varios GLP-2 diferentes y análogos de GLP-2 con relación a un control. Los paneles A, C, E y G presentan el cambio de peso del intestino delgado (BW); los paneles B, D y F presentan el cambio de la altura de cripta más vellosidad en jejunio proximal (PJ). Las abreviaturas de los análogos son N-acetilo (péptido GLP-2 de rata bloqueado en el extremo amino con un grupo acetilo), Arg<sup>+1</sup> (GLP-2 de rata que contiene un residuo Arg adicional en el extremo amino), Arg<sup>+34</sup> (GLP-2 de rata que contiene un residuo Arg adicional en el extremo carboxilo), C-amido (GLP-2 de rata con un grupo amido que bloquea el extremo carboxilo), Arg<sup>+1+3</sup> que contiene dos residuos Arg adicionales en el extremo amino). Además, el efecto de GLP-2 de degú (degú) fue probado según su efecto intestinotrófico en ratones.

La figura 9 muestra el efecto intestinotrófico de GLP-2 de rata sobre la longitud del intestino delgado. El aumento de la longitud del intestino delgado se mide con relación a un animal control después del tratamiento con GLP-2 durante 10 días.

### Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a usos terapéuticos y relacionados de GLP-2 y análogos de GLP, en particular para promover el crecimiento y la proliferación de tejido gastrointestinal, más particularmente del tejido del intestino delgado o islotes pancreáticos. Con respecto al tejido del intestino delgado, tal crecimiento se mide adecuadamente como un aumento mediado por GLP-2 en masa y longitud del intestino delgado, con relación a un control no tratado. Como se demuestra por los resultados presentados en este documento, el efecto de GLP-2 sobre el intestino delgado también se manifiesta como un aumento de la altura del eje de la cripta más las vellosidades. Tal actividad se denomina en este documento actividad “intestinotrófica”. También es detectable como respuesta frente a GLP-2 un aumento de la proliferación de células de la cripta y/o una disminución en la apoptosis del epitelio del intestino delgado. Estos efectos celulares se aprecian de forma más significativa con relación al jejunio, incluyendo el jejunio distal y, en particular, el jejunio proximal, y también se aprecian en el ileón distal. Se considera que un compuesto tiene “efecto intestinotrófico” si los animales de ensayo de al menos una especie vertebrada que responde a un péptido GLP-2 de referencia muestran significativamente un aumento del peso del intestino delgado, un aumento de la altura del eje de la cripta más las vellosidades o un aumento de la proliferación de células de la cripta o una disminución de la apoptosis del epitelio del intestino delgado cuando se trata con el compuesto (o se modifican genéticamente para expresarlos ellos mismos).

Un modelo adecuado para determinar tal crecimiento gastrointestinal es descrito por Matsuno *et al.*, *supra*, y se ejemplifica más abajo en el Ejemplo 1. El análisis morfométrico de los efectos celulares de GLP-2 y análogos de GLP-2 en la altura del eje de la cripta más las vellosidades en el intestino delgado se describe más abajo en el Ejemplo 2.

Con respecto a los islotes pancreáticos, tal crecimiento se muestra por el agrandamiento mediado por GLP-2 y/o la proliferación de islotes pancreáticos, con relación a un control no tratado. Un método para determinar el efecto intestinotrófico de un compuesto evaluando el efecto del compuesto de ensayo en el crecimiento de células de islotes pancreáticos, incluyendo tanto el aumento de tamaño como los números de células pancreáticas, se ejemplifica más abajo en el Ejemplo 1.

La expresión “péptido GLP-2” se refiere colectivamente en este documento al GLP-2 que aparece naturalmente en los vertebrados, y a análogos de formas que aparecen naturalmente de GLP-2, cuyos análogos de GLP-2 producen un efecto intestinotrófico y tienen una estructura diferente, con relación al GLP-2 de un vertebrado dado, por al menos una adición de aminoácido, sustitución, o por la incorporación de uno (varios) aminoácido(s) con un grupo bloqueante.

Las diversas formas de GLP-2 de vertebrado incluyen, por ejemplo, GLP-2 de rata y sus homólogos incluyendo GLP-2 de buey, GLP-2 porcino, GLP-2 de degú, GLP-2 bovino, GLP-2 de conejillo de indias, GLP-2 de hámster, GLP-2 humano, GLP-2 de trucha arco iris y GLP-2 de pollo, cuyas secuencias han sido descritas por muchos autores incluyendo Buhl *et al.*, en *J. Biol. Chem.*, 1988, **263** (18):8621, Nishi y Steiner, *Mol. Endocrinol.*, 1990, **4**:1192-8, e Irwin y Wong, *Mol. Endocrinol.*, 1995, **9** (3):267-77. Las secuencias descritas por estos autores se incorporan en este documento como referencia.

Los análogos de GLP-2 de vertebrado pueden ser generados usando técnicas estándares de la química de péptidos y pueden ser evaluados respecto a su actividad intestinotrófica, todos según las directrices proporcionadas en este documento. Los análogos particularmente preferidos de la invención son aquellos basados en la secuencia de GLP-2 humano que sigue:

**His-Ala-Asp-Gly-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-Met-Asn-Thr-  
Ile-Leu-Asp-Asn-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Asn-  
Trp-Leu-Ile-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp**

en la que uno o varios residuos de aminoácidos se sustituyen de forma conservadora por otro residuo de aminoácido, siempre que el análogo conserve todavía la actividad intestinotrófica, tal como el crecimiento del intestino delgado, el crecimiento de islotes pancreáticos y/o el aumento de la altura de cripta/vellosidad, en un vertebrado.

Las sustituciones conservadoras en cualquier GLP-2 que aparece naturalmente, preferiblemente la secuencia de GLP-2 humana, son definidas como intercambios dentro de cualquiera de los cinco grupos siguientes:

I. Ala, Ser, Thr (Pro, Gly)

II. Asn, Asp, Glu, Gln

III. His, Arg, Lys

IV. Met, Leu, Ile, Val (Cys)

V. Phe, Tyr, Trp.

La invención también abarca sustituciones no conservadoras de aminoácidos en cualquier secuencia de GLP-2 de vertebrado, a condición de que las sustituciones no conservadoras aparezcan en posiciones de aminoácidos conocidas que varían en GLP-2 aislado de diferentes especies. Las posiciones de residuos no conservadas se determinan fácilmente alineando todas las secuencias de GLP-2 de vertebrados conocidas. Por ejemplo, Buhl *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1988, **263** (18):8621, compararon con las secuencias de GLP-2 humano, porcino, de rata, hámster, conejillo de indias y bovino, y encontraron que las posiciones 13, 16, 19, 27 y 28 eran no conservadas (los números de posición se refieren a la posición análoga en la secuencia de GLP-2 humana). Nishi y Steiner, *Mol. Endocrinol.*, 1990, **4**:1192-8, encontraron que una posición adicional dentro de la secuencia que codificaba GLP-2, el residuo 20 en la susodicha secuencia humana, también variaba en degú, una especie de roedor indígena de Sudamérica. Por lo tanto, según esta regla, las posiciones de aminoácidos que varían en mamíferos y que, preferiblemente, pueden ser sustituidas con residuos no conservadores son las posiciones 13, 16, 19, 20, 27 y 28.

O bien, pueden hacerse sustituciones no conservadoras en cualquier posición en la cual la mutagénesis por barrido con alanina muestre alguna tolerancia por la mutación porque la sustitución de un residuo de aminoácido con alanina no destruye toda la actividad intestinotrófica. La técnica de mutagénesis por barrido con alanina se describe en Cunningham y Wells, *Science*, 1989, **244**:1081, y se incorpora en este documento como referencia en su totalidad. Ya que la mayor parte de las secuencias de GLP-2 consisten en sólo aproximadamente 33 aminoácidos (y en alanina de GLP-2 humana ya aparece en cuatro posiciones), un experto en la técnica podría probar fácilmente un análogo de alanina en cada posición restante según su efecto intestinotrófico, como se muestra en los ejemplos siguientes.

Alineando las secuencias conocidas de GLP-2 de vertebrado, se ha construido una fórmula general que tiene en cuenta la homología de secuencia significativa entre estas especies de GLP-2, así como los residuos que se sabe que varían entre especies. Esta fórmula puede usarse para guiar la elección de los residuos no conservados preferidos particulares para la sustitución, adición o modificación por la adición de grupos bloqueantes de aminoácidos. Por lo tanto, los análogos particulares de GLP-2 de vertebrado abarcados por la presente invención, de acuerdo con uno de sus aspectos, son aquellos GLP-2 de vertebrado y análogos de GLP-2 que se conforman con respecto a la fórmula general representada más abajo como SEQ ID NO:1

**R1-[Y]<sub>m</sub>-His-Ala-Asp-Gly-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-Met-Asn-  
Thr-aa1-Leu-Asp-aa2-Leu-Ala-aa3-aa4-Asp-Phe-Ile-Asn-  
Trp-Leu-aa5-aa6-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp-[X]<sub>n</sub>-R2**

en la que aa se refiere a cualquier residuo de aminoácido, y de aa1 a aa6 son aquellas posiciones de residuos conocidas que varían entre secuencias de GLP-2 obtenidas entre especies diferentes, y:

## ES 2 334 864 T3

X es uno o dos aminoácidos seleccionados del grupo III, tales como Arg, Lys o Arg-Arg

Y es uno o dos aminoácidos seleccionados del grupo III, tales como Arg, Lys o Arg-Arg

5 m es 0 ó 1;

n es 0 ó 1;

R1 es H o un grupo bloqueante del extremo N-terminal; y

10 R2 es OH o un grupo bloqueante del extremo C-terminal.

En varias de las realizaciones de la invención, de aa1 a aa6 son como se define más abajo:

15 aa1 se selecciona del grupo IV;

aa2 se selecciona del grupo I o II;

20 aa3 se selecciona del grupo I;

aa4 se selecciona del grupo III;

aa5 se selecciona del grupo IV;

25 aa6 se selecciona del grupo II o III.

En realizaciones particularmente preferidas de la invención, de aa1 a aa6 se eligen entre el grupo de residuos que se sabe que aparecen en dicha posición en GLP-2 aislados de diferentes especies, como sigue:

30 aa1 es Ile o Val;

aa2 es Asn o Ser;

35 aa3 es Ala o Thr;

aa4 es Lys o Arg;

aa5 es Ile o Leu; y

40 aa6 es Gln o His.

El GLP-2 de humano y de rata se diferencian entre sí en sólo el residuo de aminoácido en la posición 19. En la secuencia humana, este residuo es alanina; en GLP-2 de rata, la posición 19 es treonina. Así, el GLP-2 particular o los análogos de GLP-2 abarcados por la invención contienen un residuo variable en la posición 19. En estas realizaciones de la invención, el péptido GLP-2 se conforma respecto a la SEQ ID NO:2 mostrada a continuación:

50 **R1-[Y]m-His-Ala-Asp-Gly-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-Met-Asn-  
Thr-Ile-Leu-Asp-Asn-Leu-Ala-aa3-Arg-Asp-Phe-Ile-Asn-  
Trp-Leu-Ile-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp-[X]n-R2**

55 en la que aa3, Y, m, X, n, R1 y R2 son como se definen anteriormente.

En realizaciones específicas de la invención, el péptido GLP-2 se selecciona entre:

60 1) GLP-2 de rata que tiene la SEQ ID NO:3 ilustrada más abajo:

65 **His-Ala-Asp-Gly-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-Met-Asn-Thr-  
Ile-Leu-Asp-Asn-Leu-Ala-Thr-Arg-Asp-Phe-Ile-Asn-  
Trp-Leu-Ile-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp;**

2) GLP-2 humano, que es el equivalente de Thr<sup>19</sup> a Ala<sup>19</sup> de GLP-2 de rata ilustrado más abajo:

5 **His-Ala-Asp-Gly-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-Met-Asn-Thr-**  
**Ile-Leu-Asp-Asn-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Asn-**  
 10 **Trp-Leu-Ile-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp;**

3) GLP-2 de degú que es el equivalente [de Ile<sup>13</sup> a Val<sup>13</sup>, de Asn<sup>16</sup> a His<sup>16</sup>, de Lys<sup>20</sup> a Arg<sup>20</sup>] de GLP-2 de rata; y

15 4) los GLP-2, y análogos de GLP-2, que incorporan un grupo bloqueante del extremo N-terminal y/o una extensión del extremo N-terminal tal como Arg o Arg-Arg; y/o que incorporan un grupo bloqueante del extremo C-terminal y/o una extensión del extremo C-terminal tal como Arg o Arg-Arg.

20 Los "grupos bloqueantes" representados por R1 y R2 son grupos químicos que se usan rutinariamente en la técnica de la química de los péptidos para conferir estabilidad bioquímica y resistencia frente a la digestión con exopeptidasa. Los grupos protectores del extremo N-terminal adecuados incluyen, por ejemplo, grupos alcianoilo C<sub>1-5</sub>, tales como acetilo. También son adecuados como grupos protectores del extremo N-terminal los análogos de aminoácido que carecen de la función amino. Los grupos protectores del extremo C-terminal adecuados incluyen grupos que forman cetonas o amidas en el átomo de carbono del carboxilo del extremo C-terminal, o grupos que forman ésteres en el átomo de oxígeno del carboxilo. La cetona y los grupos que forman éster incluyen grupos alquilo, en particular grupos alquilo C<sub>1-5</sub> ramificados o no ramificados, p.ej, grupos metilo, etilo y propilo, mientras que los grupos que forman amida incluyen funciones amino tales como funciones de amina primaria o alquilamino, p.ej., grupos monoalquil C<sub>1-5</sub>-amino y di-alquil C<sub>1-5</sub>-amino tales como metilamino, etilamino, dimetilamino, dietilamino, metiletilamino y otros similares. Los análogos de aminoácido son también adecuados para proteger el extremo C-terminal de los presentes compuestos, por ejemplo, análogos de aminoácidos descarboxilados tales como agmatina.

La forma particular de GLP-2 seleccionada para promover el crecimiento del tejido gastrointestinal puede prepararse mediante diversas técnicas conocidas para generar productos peptídicos. Las formas de GLP-2 de vertebrados pueden obtenerse, por supuesto, mediante extracción a partir de una fuente natural, usando una combinación apropiada de técnicas de aislamiento de proteínas. Como es descrito por Buhl *et al.*, *supra*, el aislamiento y la purificación de GLP-2 porcino se consigue a partir de extractos de ácido-etanol de la mucosa ileal por una combinación de selección por tamaños y fraccionamiento por HPLC, con la ayuda del anticuerpo generado contra proglucagón sintético 126-159, para monitorizar la preparación. Como una alternativa respecto a la extracción de GLP-2, aquellas formas de GLP-2 que incorporan sólo L-aminoácidos, tanto GLP-2 de vertebrado como sus análogos, pueden producirse en cantidades comerciales por aplicación de la tecnología del ADN recombinante. Para este fin, se incorpora el ADN que codifica para el GLP-2 deseado o análogo de GLP-2 en un vector de expresión y se transforma en un huésped microbiano, p.ej, levadura, u otro celular, que se cultiva entonces bajo condiciones apropiadas para la expresión de GLP-2. Se han adaptado con este fin diversos sistemas de expresión de genes, y típicamente conducen la expresión del gen deseado a partir de controles de expresión usados naturalmente por el huésped elegido. Como GLP-2 no requiere la glucosilación post-translación para su actividad, su producción puede ser conseguida más adecuadamente en huéspedes bacterianos tales como *E. coli*. Para dicha producción, el ADN que codifica para el péptido de GLP-2 seleccionado puede ser colocado útilmente en controles de expresión de los genes lac, trp o PL de *E. coli*. Como una alternativa a la expresión del ADN que codifica para GLP-2 en sí, el huésped puede ser adaptado para expresar el péptido GLP-2 como una proteína de fusión en la cual GLP-2 se une de forma desprendible a una proteína vehículo que facilita el aislamiento y la estabilidad del producto de expresión.

En un enfoque universalmente aplicable respecto a la producción de un GLP-2 seleccionado o análogo de GLP-2, y uno usado necesariamente para producir péptidos GLP-2 que incorporan aminoácidos no codificados genéticamente y formas derivatizadas del extremo N- y C-terminal, se emplean técnicas bien establecidas de síntesis de péptidos automatizadas, cuyas descripciones generales aparecen, por ejemplo, en J. M Stewart y J. D. Young, "Solid Phase Peptide Synthesis", 2ª edición, 1984, Compañía Química Pierce, Rockford, Ill; y en M. Bodanszky y A. Bodanszky, "The Practice of Peptide Synthesis", 1984, Springer-Verlag, Nueva York; "Manual de Usuario 430A de Applied Biosystems", 1987, ABI Inc, Foster City, California. En estas técnicas, el péptido GLP-2 se cultiva a partir de su extremo C-terminal, residuo conjugado por resina por la adición secuencial de aminoácidos apropiadamente protegidos, usando los protocolos de Fmoc o tBoc, como se describe, por ejemplo, por Orskov *et al.*, 1989, *supra*.

Para la incorporación de grupos N- y/o C-bloqueantes, también pueden aplicarse protocolos convencionales a métodos de síntesis de péptidos en fase sólida. Para la incorporación de grupos bloqueantes del extremo C-terminal, por ejemplo, la síntesis del péptido deseado se realiza típicamente usando, como fase sólida, una resina de soporte que ha sido modificada por medios químicos de modo que la división desde la resina cause un péptido GLP-2 con el grupo bloqueante del extremo C-terminal deseado. Para proporcionar péptidos en los cuales el extremo C-terminal lleva un

grupo bloqueante amino primario, por ejemplo, la síntesis se realiza usando una resina de p-metilbenzidrilamina (MBHA) de modo que, cuando la síntesis de péptidos se completa, el tratamiento con ácido fluorhídrico libera el péptido amidado del extremo C-terminal deseado. Del mismo modo, la incorporación de un grupo bloqueante N-metilamina en el extremo C-terminal se consigue usando una resina DVB derivatizada con N-metilaminoetilo, que bajo el tratamiento con HF libera el péptido que lleva un extremo C-terminal N-metilamidado. También puede conseguirse la protección del extremo C-terminal por esterificación usando procedimientos convencionales. Esto implica el uso de la combinación resina/grupo bloqueante que permite la liberación del péptido protegido de la cadena lateral de la resina, para permitir la consecuente reacción con el alcohol deseado, para formar la función éster. Los grupos protectores de FMOC, en combinación con la resina DVB derivatizada con el alcohol de metoxialcoxibencilo o enlazante equivalente, pueden usarse para este fin, siendo efectuada la división desde el soporte por TFA en diclorometano. La esterificación de la función carboxilo apropiadamente activada, p.ej, con DCC, puede proceder entonces por la adición del alcohol deseado, seguido de la desprotección y el aislamiento del péptido GLP-2 esterificado.

La incorporación de grupos bloqueantes del extremo N-terminal puede conseguirse mientras el péptido GLP-2 sintetizado todavía está unido a la resina, por ejemplo, por tratamiento con un anhídrido adecuado y nitrilo. Para incorporar un grupo bloqueante de acetilo en el extremo N-terminal, por ejemplo, el péptido conectado a la resina puede tratarse con anhídrido acético al 20% en acetonitrilo. El péptido GLP-2 N-bloqueado puede escindirse entonces desde la resina, desprotegerse y posteriormente aislarse.

Una vez que se ha sintetizado el péptido GLP-2 deseado, se ha escindido de la resina y está totalmente desprotegido, el péptido se purifica entonces para asegurar la recuperación de un oligopéptido sencillo que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada. La purificación puede conseguirse usando cualquiera de los enfoques estándares, incluyendo la cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC) en columnas de sílice alquiladas, p.ej, C<sub>4</sub>-, C<sub>8</sub>- o C<sub>18</sub>-sílice. Tal fraccionamiento en columna se lleva a cabo generalmente produciendo gradientes lineales, p.ej, 10-90%, de % de disolvente orgánico creciente, p.ej, acetonitrilo, en tampón acuoso, conteniendo por lo general una pequeña cantidad (p.ej, 0,1%) de agente de emparejamiento, tal como TFA o TEA. O bien, puede emplearse HPLC de intercambio iónico para separar especies de péptidos según sus características de carga. Las fracciones de columna se recuperan, y aquellas que contienen el péptido de la pureza deseada/requerida son opcionalmente reunidas. En una realización de la invención, el péptido GLP-2 se trata entonces de la manera establecida para cambiar el ácido de escisión (p.ej, TFA) con un ácido farmacéuticamente aceptable, tal como acético, clorhídrico, fosfórico, maleico, tartárico, succínico y otros similares, para generar una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del péptido.

Para la administración a pacientes, se proporciona el péptido GLP-2 o su sal, en un aspecto de la invención, en una forma farmacéuticamente aceptable, p.ej, como una preparación filtrada de modo estéril, p.ej, a través de un filtro de 0,22  $\mu$ , y sustancialmente sin pirógenos. Deseablemente, el péptido GLP-2 que se formula emigra como un pico solo o individualizado en HPLC, muestra una composición de aminoácidos uniforme y auténtica y su secuencia bajo análisis, y por otra parte satisface los estándares expuestos por las diversas entidades nacionales que regulan la calidad de los productos farmacéuticos.

Para uso terapéutico, se formula el GLP-2 elegido o análogo de GLP-2 con un vehículo que es farmacéuticamente aceptable y que es apropiado para administrar el péptido por la ruta de administración elegida. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados son aquellos usados convencionalmente con fármacos peptídicos, tales como diluyentes, excipientes y otros similares. Puede hacerse referencia al "Remington's Pharmaceutical Sciences", 17ª edición, Mack Publishing Company, Easton, Penn., 1985, para una guía sobre formulaciones farmacéuticas generalmente. En una realización de la invención, se formulan los compuestos para su administración por infusión, p.ej, cuando se usan como suplementos alimenticios líquidos para pacientes en terapia nutricional parenteral total, o por inyección, p.ej, subcutáneamente, intramuscularmente o intravenosamente, y son, en consecuencia, utilizados como soluciones acuosas en forma estéril y sin pirógenos y opcionalmente están tamponados a un pH fisiológicamente tolerable, p.ej., un pH ligeramente ácido o fisiológico. Así, los compuestos pueden administrarse en un vehículo tal como agua destilada o, más deseablemente, en solución salina, solución salina tamponada con fosfato o solución salina con dextrosa al 5%. La solubilidad en agua del GLP-2 o análogo de GLP-2 puede ser realizada, de ser deseado, incorporando un potenciador de la solubilidad, tal como el ácido acético.

El vehículo acuoso o vehículo puede ser suplementado para su uso como inyectable con una cantidad de gelatina que sirva para guardar el GLP-2 o el análogo de GLP-2 en el sitio de inyección o cerca de éste, para su liberación lenta en el sitio deseado de acción. Es de esperar que las concentraciones de gelatina eficaces para conseguir el efecto de almacenamiento estén en el intervalo del 10-20%. También pueden ser útiles agentes gelificantes alternativos, tales como el ácido hialurónico, como agentes de almacenamiento.

También pueden formularse los GLP-2 y los análogos de GLP-2 de la invención como un dispositivo de implantación de liberación lenta para una administración extendida y sostenida de GLP-2. Los ejemplos de tales formulaciones de liberación sostenida incluyen materiales compuestos de polímeros biocompatibles, tales como poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-co-glicólico), metilcelulosa, ácido hialurónico, colágeno y otros similares. Se han examinado la estructura, la selección y el uso de polímeros degradables en vehículos de administración farmacéutica en varias publicaciones, incluyendo, A. Domb *et al.*, *Polymers for Advanced Technologies* 3:279-292 (1992). Una guía adicional para la selección y utilización de polímeros en formulaciones farmacéuticas puede encontrarse en el texto de M. Chasin y R. Langer (editores), "Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems", volumen 45 de "Drugs and the Pharmaceutical Sciences", M Dekker, Nueva York, 1990. También pueden usarse liposomas para proporcionar una liberación



## ES 2 334 864 T3

sostenida de un GLP-2 o análogo de GLP-2. Los detalles acerca de cómo usar y preparar formulaciones liposómicas de los fármacos de interés pueden ser encontrados, entre otros sitios, en la patente de EE.UU. N°. 4.944.948; patente de EE.UU. N°. 5.008.050; patente de EE.UU. N°. 4.921.706; patente de EE.UU. N°. 4.927.637; patente de EE.UU. N°. 4.452.747; patente de EE.UU. N°. 4.016.100; patente de EE.UU. N°. 4.311.712; patente de EE.UU. N°. 4.370.349; 5 patente de EE.UU. N°. 4.372.949; patente de EE.UU. N°. 4.529.561; patente de EE.UU. N°. 5.009.956; patente de EE.UU. N°. 4.725.442; patente de EE.UU. N°. 4.737.323; patente de EE.UU. N°. 4.920.016. Las formulaciones de liberación sostenida son de interés particular cuando es deseable proporcionar una concentración local alta de un GLP-2 o análogo de GLP-2, p.ej, cerca del páncreas para promover el crecimiento pancreático, en la diabetes, etc.

10 Para el uso en la estimulación del crecimiento del intestino delgado o de la proliferación y el aumento de células de islotes pancreáticas en un mamífero incluyendo un ser humano, la presente invención proporciona en uno de sus aspectos un envase, en forma de un vial relleno de modo estéril o ampolla, que contiene una cantidad del GLP-2 o análogo de GLP-2 que promueve el crecimiento de tejido, en dosis unitarias o en cantidades multidosis, en el que el envase incorpora una etiqueta que instruye sobre el uso de su contenido para la promoción de tal crecimiento. En 15 una realización de la invención, el envase contiene el GLP-2 o el análogo de GLP-2 y el vehículo deseado, como una formulación preparada para la administración. O bien, y según otra realización de la invención, el envase proporciona el GLP-2 o análogo de GLP-2 en una forma, tal como una forma liofilizada, adecuada para su reconstitución en un vehículo adecuado, tal como una solución salina tamponada de fosfato.

20 En una realización, el envase es un vial relleno de un modo estéril o ampolla que contiene una solución inyectable que comprende una cantidad eficaz, intestinotrófica de GLP-2 o análogo de GLP-2 disuelto en un vehículo acuoso.

Como una alternativa a las formulaciones inyectables, el GLP-2 o el análogo de GLP-2 pueden formularse para su 25 administración por otras rutas. Las formas de dosificación oral, tales como pastillas, cápsulas y otros similares, pueden ser formuladas de acuerdo con la práctica farmacéutica estándar.

Según la presente invención, el GLP-2 o análogo de GLP-2 se administra para tratar a pacientes que se beneficiarían del crecimiento del tejido gastrointestinal. En un aspecto, los pacientes candidatos son aquellos que se beneficiarían del crecimiento del tejido de intestino delgado. Los efectos del péptido GLP-2 en este tejido, como se evidencia 30 por los resultados ejemplificados en este documento, son drásticos y beneficiarían claramente a aquellos pacientes que padecen enfermedades o afecciones marcadas por anomalías en la mucosa del tracto del intestino delgado, incluyendo: úlceras y trastornos inflamatorios; trastornos de la absorción y de la digestión congénitos o adquiridos incluyendo síndromes de malabsorción; y enfermedades y afecciones causadas por la pérdida de la función mucosa del intestino en particular en pacientes que se someten a una larga alimentación parenteral o a quienes, a consecuencia 35 de una cirugía, se han sometido a la resección del intestino y sufren el síndrome del intestino corto y el síndrome cul-de-sac. El tratamiento terapéutico con péptidos GLP-2 se administra para reducir o eliminar los síntomas de la enfermedad en estos pacientes asociados con su menor función mucosa del tracto intestinal. Por ejemplo, GLP-2 o el análogo de GLP-2 se administran a un paciente con una afección inflamatoria del intestino en una cantidad suficiente para mejorar la incomodidad intestinal y la diarrea causada por la afección. Además, GLP-2 o un análogo de GLP-2 40 puede ser administrado a pacientes con desórdenes de malabsorción para realzar la absorción alimenticia y así mejorar el estado alimenticio de tales pacientes.

En general, los pacientes que se beneficiarían del aumento de la masa del intestino delgado y la consiguiente mayor función de la mucosa del intestino delgado son candidatos para el tratamiento con GLP-2 o análogo de GLP-2. Las 45 afecciones particulares que pueden ser tratadas con GLP-2 incluyen las diversas formas de esprúe incluyendo esprúe celiaco causado por una reacción tóxica a la  $\alpha$ -gliadina del trigo, y marcado por una enorme pérdida de vellosidades del intestino; esprúe tropical causado por la infección y marcado por un aplanamiento parcial de las vellosidades; esprúe hipogammaglobulinémico que se observa comúnmente en pacientes con inmunodeficiencia variable común o hipogammaglobulinemia y marcado por una disminución significativa de la altura de las vellosidades. La eficacia 50 terapéutica del tratamiento con GLP-2 puede ser monitorizada por una biopsia entérica para examinar la morfología de las vellosidades, por evaluación bioquímica de la absorción nutritiva, por la ganancia de peso del paciente, o por la mejora de los síntomas asociados con estas afecciones. Otras afecciones que pueden ser tratadas con GLP-2 o el análogo de GLP-2, o para las que GLP-2 o el análogo de GLP-2 pueden ser útiles profilácticamente, incluyen enteritis por radiación, enteritis infecciosa o post-infecciosa, enteritis regional (enfermedad de Crohn), daño del intestinal delgado debido a agentes quimioterapéuticos tóxicos u otros, y pacientes con síndrome del intestino corto. 55

En otro aspecto, los pacientes candidatos para un tratamiento con GLP-2 o análogo de GLP-2 son aquellos que se beneficiarían del crecimiento de islotes pancreáticos, y en particular de la ampliación o proliferación o regeneración de islotes pancreáticos. Tales pacientes incluyen aquellos que padecen enfermedades o afecciones marcadas por la 60 ausencia o la reducción de islotes pancreáticos o por una menor función de los islotes pancreáticos. Los pacientes candidatos particulares son aquellos que padecen diabetes tipo 1 o tipo 2, así como pacientes con formas secundarias de diabetes debido a infiltración, inflamación o destrucción del páncreas. Se administra GLP-2 o el análogo de GLP-2 a estos pacientes en una cantidad suficiente para restaurar la función pancreática, al menos parcialmente, para aumentar el nivel de insulina endógena, y mejorar sus síntomas. 65

La medicación terapéutica y el régimen más apropiado para el tratamiento del paciente variarán, por supuesto, con la enfermedad o afección que se trate, y según el peso del paciente y otros parámetros. De aquí en adelante en este documento, se presentan resultados que demuestran que una dosis de GLP-2 o análogo de GLP-2 equivalente

a aproximadamente 2,5 mg/kilogramos (o menos, véase más abajo) administrada dos veces al día durante 10 días puede generar aumentos muy significativos de la masa del intestino delgado y de la altura de cripta/vellosidad, en particular, del jejunio proximal. Se espera que dosis mucho más pequeñas, p.ej, en el intervalo de  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , y de duración o frecuencia de tratamiento más corta o más larga, también producirán resultados terapéuticamente útiles, es decir, un aumento estadísticamente significativo, en particular, de la masa del intestino delgado. Las cantidades de las dosis y los regímenes de medicación más apropiados para uso en humanos se eligen según los resultados presentados en este documento, y pueden ser confirmados en procesos clínicos correctamente diseñados.

Pueden determinarse la dosis eficaz y el protocolo de tratamiento por medios convencionales, comenzando con una dosis baja en animales de laboratorio y luego aumentando la dosis supervisando los efectos, y variando sistemáticamente también el régimen de dosificación. El médico puede tomar en cuenta numerosos factores cuando determine la dosis óptima para un sujeto dado. Principalmente, entre éstos está la cantidad de GLP-2 que normalmente circula en el plasma, que está en el orden de 151 pmol/mL en estado de reposo, elevándose a 225 pmol/mL después de una ingestión nutritiva para seres humanos adultos sanos. Orskow, C. y Helst, J. J., 1987, *Scand. J. Clin. Lav. Invest.* 47:165. Otros factores incluyen la talla del paciente, la edad del paciente, la condición general del paciente, la enfermedad particular tratada, la severidad de la enfermedad, la presencia de otros fármacos en el paciente, la actividad *in vivo* del péptido GLP-2 y otros similares. Las dosis de ensayo serían elegidas según la consideración de los resultados de estudios en animales y la historia clínica. Será apreciado por cualquier experto ordinario en la técnica que también puede usarse en el cálculo de la dosis información tal como las constantes de unión y la  $K_i$  derivada de los ensayos de unión competitivos de GLP-2 *in vitro*.

Una dosis humana típica de un péptido GLP-2 sería de aproximadamente 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal/día a aproximadamente 10 mg/kg/día, preferiblemente de aproximadamente 50  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  a aproximadamente 5 mg/kg/día, y más preferiblemente aproximadamente de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  a 1 mg/kg/día.

En otro de sus aspectos, la invención proporciona un tratamiento de pacientes candidatos como el que se ha identificado usando células implantadas que han sido acondicionadas *in vitro* o *in vivo* por incubación previa o tratamiento con GLP-2 o análogo de GLP-2, o que han sido modificadas genéticamente para producirlo. El acondicionamiento de células *ex vivo* puede conseguirse simplemente cultivando las células o el tejido que se trasplanta en un medio que haya sido suplementado con una cantidad que promueva el crecimiento de GLP-2 o análogo de GLP-2 y que sea, por otra parte, apropiado para cultivar a aquellas células. Las células pueden, después de un período de acondicionamiento apropiado, ser implantadas después directamente en el paciente o pueden ser encapsuladas usando la tecnología de encapsulación de células establecida, y luego implantarse.

Otro aspecto más de la invención abarca el tratamiento de animales *in vivo* con péptidos GLP-2 a fin de promover el crecimiento del tejido del intestino delgado o aumentar el tamaño o el número de las células de los islotes pancreáticos. Después del agrandamiento subsecuente del intestino delgado y/o de los islotes pancreáticos, estos tejidos pueden usarse entonces en un procedimiento de xenotransplante. Tal tratamiento con el péptido GLP-2 puede ser ventajoso antes del xenotransplante del tejido de un animal no humano a un ser humano porque el tamaño del órgano trasplantado o el tejido a menudo limitan el éxito de este procedimiento. Por ejemplo, un animal donante porcino puede tratarse con el péptido GLP-2 a fin de aumentar el tamaño del intestino delgado antes del xenotransplante del tejido de intestino delgado porcino en un ser humano que necesite este órgano.

O bien, pueden hacerse crecer las células que se implantan *in vitro* a partir de una célula que ha sido modificada genéticamente para expresar o sobreexpresar el gen de glucagón o, más directamente, el ADN que codifica únicamente para GLP-2. La secuencia de tal ADN puede ser determinada fácilmente a partir de la secuencia de aminoácidos de GLP-2 seleccionada, con la limitación de que sólo las formas de GLP-2 que contienen aminoácidos genéticamente codificados pueden ser producidas de esta manera. Pueden emplearse varios vectores virales, adecuados para la introducción de la información genética en células humanas, e incorporarán el ADN que codifica GLP-2 en controles de expresión funcionales en las células huésped. Una vez modificadas genéticamente, las células modificadas pueden ser implantadas después usando procedimientos establecidos en la técnica.

#### Ejemplo 1

En un primer experimento diseñado para investigar el efecto de glicentina sobre el crecimiento del intestino delgado, fueron tratados como sigue dos grupos de seis ratones (de 8 semanas, hembras CD1 de Laboratorios Charles River). Cada ratón recibió inyecciones de 41,5  $\mu\text{g}$  cada 12 horas durante 10 días. Las inyecciones fueron administradas subcutáneamente en un volumen final de gelatina del 16%, con 0,5 centímetros cúbicos inyectados subcutáneamente cada 12 horas. La glicentina (rata) se disolvió fácilmente en 10 ml de agua. Los ratones control recibieron 0,5 centímetros cúbicos de solución de gelatina del 16%, pero ningún péptido, cada 12 horas. Los ratones fueron alimentados con comida de rata estándar y con libre acceso a la comida y al agua, hasta 12 horas antes de su sacrificio, en cuyo tiempo la comida fue retirada, y sólo les fue administrada el agua. El peso del intestino delgado fue calculado escindiendo el intestino delgado entero, y quitando el estómago (extremo proximal) y el apéndice/ciego/intestino grueso (extremo distal). El intestino delgado restante fue limpiado con una solución salina para quitar las heces, y fue pesado. Los resultados fueron como sigue:

ES 2 334 864 T3

	Peso de ratones (gramos)		Peso del intestino delgado (gramos)
	Día 0	Día 10	Día 10
Control	30,0	27,8	1,6
	29,8	27,5	1,3
	28,7	25,6	1,7
	28,8	25,8	1,2
	28,0	25,8	0,7
	27,9	26,2	1,3
Glicentina	27,9	26,6	1,6
	27,1	26,2	1,7
	28,0	26,6	1,3
	24,8	24,5	1,6
	27,2	24,7	1,7
	26,5	25,8	1,9

Con estos resultados que indican que el efecto intestinotrófico de glicentina era modesto, fue realizado un segundo experimento usando los mismos protocolos para investigar los efectos de otros productos derivados del gen de proglucagón, incluyendo GLP-1 y GLP-2. Para este fin, se sintetizaron a medida GLP-2 de rata de SEQ ID NO:3 y GLP-1 humano (7-36 amida) por la aplicación del enfoque en fase sólida basado en tBoc. El análisis de GLP-2 de rata reveló una pureza del 95% por HPLC analítico (muestra de 20 µl de 1,0 mg/ml; columna C18 de Vydac de 5 µ; TFA al 0,1%/CH<sub>3</sub>CN al 20-60% durante 20 minutos a 1,5 ml/min).

Las formulaciones de GLP-2 para la inyección se prepararon como sigue: Se disolvió gelatina en agua caliente con una proporción en peso del 16%, y la solución de 50 mL se sometió a autoclave y se enfrió a temperatura ambiente. Una solución del péptido se preparó por separado entonces mezclando 5 mg de GLP-2 con agua en un volumen ligeramente menor de 10 mL, y luego añadiendo ácido acético 1N en un volumen (10-20 µL) suficiente para disolver el péptido completamente. El pH fue reajustado entonces a aproximadamente 7,0 por la adición de un volumen igual de NaOH 1N (10-20 µL), y el volumen de solución fue ajustado entonces a 10 mL por la adición de agua destilada. Para preparar la formulación para la inyección, se combinaron la solución del péptido de 10 mL y la solución de 50 mL de gelatina del 16% con mezcla, y se introdujeron alícuotas para inyección en una jeringuilla de insulina de 0,5 mL. El mismo procedimiento fue usado para formular el GLP-1, a excepción del hecho de que no fue necesario ningún ajuste ácido/básico dado su mayor solubilidad relativa en agua.

A los ratones les fueron inyectados 0,5 ml de la solución de gelatina del 16%, sin o con el péptido (62,5 µg/dosis). A cuatro grupos de cuatro ratones (de 8 semanas, hembras CD1 de Laboratorios Charles River) les fue inyectado dos veces al día durante 10 días. Los resultados son tabulados más abajo:

## ES 2 334 864 T3

	Peso de ratones (gramos)		Peso del intestino delgado (gramos)			
	Día 0	Día 10	Día 10 Promedio	% peso corporal		
5	Control	26,0	25,4	1,4	1,4 ± 0,04	5,47 ± 0,14
10		27,0	25,9	1,3		
		26,0	26,7	1,5		
		25,6	24,4	1,4		
15	GLP-1	26,6	24,8	1,4	1,33 ± 0,04	5,26 ± 0,2
20		23,2	22,8	1,3		
		26,0	27,0	1,2		
		25,1	26,5	1,4		
25	GLP-2	25,2	23,7	1,8	2,08 ± ,14	8,12 ± ,40
30		27,1	25,7	2,3		
		28,4	27,1	2,4		
		25,8	25,4	1,8		

30 Estos resultados demuestran que, a una dosis de aproximadamente 2,5 mg/kilogramo (640 nmol/kg), GLP-2 muestra un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) de la masa del intestino delgado con un tratamiento de dos veces al día durante 10 días, respecto tanto al grupo de control que no recibe ningún péptido, como al grupo que recibe otro péptido relacionado con glucagón, GLP-1. Con relación a los resultados presentados en este documento para glicentina, también está claro que GLP-2 constituye un factor de crecimiento principal del tejido intestinal.

35 Los efectos de la administración del péptido GLP-2 a estos ratones fueron explorados también, por el seccionamiento de órganos gastrointestinales de cuatro ratones tratados con GLP-2 y los cuatro ratones control, usando secciones fijadas con parafina y técnicas histopatológicas estándar. Las áreas de islote fueron medidas por análisis morfométrico. La hematoxilina y las secciones teñidas con eosina fueron usadas para la cuantificación. El área pancreática total y el área de islotes total en cada sección fueron medidas. Los datos mostraron que el área de islotes era, por término medio, el 0,31% del área pancreática total en el grupo de control. Por otra parte, los islotes del grupo tratado con GLP-2 constituyeron el 0,76% del área pancreática total, representando un aumento del área de islotes de más del doble en el grupo tratado con GLP-2. Además del tamaño de islotes, fue observado un aumento del número de islotes.

### 45 Ejemplo 2

50 También fueron investigados los efectos del péptido GLP-2 sobre el crecimiento del intestino delgado, en particular para evaluar la respuesta del tejido como una función de la dosis, el tiempo, la ruta de administración y la frecuencia, el tipo de formulación, y el género y la edad del receptor. Estos efectos fueron medidos en el contexto no sólo del aumento de la masa del intestino delgado, sino también en el contexto del aumento de la altura de cripta y vellosidad.

55 Para estos fines, se preparó GLP-2 de rata como se describe en el Ejemplo 3. El GLP-2 de rata se formuló en solución salina tamponada con fosfato o como una formulación de almacenamiento que contenía gelatina. Para preparar la solución salina tamponada con fosfato, el péptido GLP-2 se preparó como sigue: Se preparó primero una solución madre 10X de PBS, usando 80 g de NaCl (BDH ACS 783), 2 g de KCl (BDH ACS 645), 11,5 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Anachemia AC-8460), y 2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Malinckrodt AR7100), que se llevó a un volumen total de un litro con agua destilada estéril. La solución de trabajo final fue obtenida por una dilución 10:1 de la solución madre con agua destilada estéril y se ajustó a un pH 7,3-7,4 si era necesario usando varios microlitros de NaOH 10N (hidróxido de sodio). La solución de trabajo se sometió entonces a autoclave durante 30 minutos. En la solución de trabajo final de PBS, las concentraciones fueron NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 4,3 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM.

65 Para generar el péptido GLP-2 formulado con PBS, el péptido pulverizado se añadió a la solución de trabajo de PBS según se requería a formulaciones que tenían las concentraciones de péptido deseadas. Por ejemplo, para generar una solución de PBS del péptido a 130 mg/L, se disolvieron 4,2 mg de GLP-2 en 40 ml de PBS para proporcionar una concentración de GLP-2 de 130 µg/ml. Para administrar una dosis de 2,5 mg/kilogramos a un ratón, aproximadamente 0,5 ml de esta solución se inyectarían dos veces al día.

## ES 2 334 864 T3

Para generar la formulación con gelatina, se preparó primero una solución de gelatina disolviendo 12 gramos de gelatina (Sigma, G-8150, N° de lote 54HO7241 Tipo A de piel porcina [9000-70-8] -300 Bloom) en 100 mL de agua destilada. La solución de gelatina se sometió entonces a autoclave, se calentó a 37°C, y el péptido GLP-2, anteriormente disuelto en una solución salina tamponada con fosfato como se describe antes, fue añadido para conseguir concentraciones de péptido específicas y deseadas. Las formulaciones de GLP-2 con gelatina se prepararon entonces a la concentración de GLP-2 deseada mezclando el GLP-2 formulado con PBS con la solución de gelatina preparada justo como se describe antes. Por ejemplo, para generar una solución de PBS con gelatina del GLP-2 a una concentración de 130 mg/L, se diluyeron 10 ml de una solución de PBS preparada con GLP-2 de 4,2 miligramos a una concentración de 30 ml de la solución de trabajo de gelatina al 20% preparada como se describe antes. La solución se mezcló pipeteando suavemente para proporcionar una solución final de 130 mg/L de GLP-2 en PBS con gelatina del 15%.

Como en el Ejemplo 1, los receptores eran ratones CD1 obtenidos del Laboratorio Charles River (Ontario, Canadá). Se emparejaron por edades los ratones CD1 hembras en el tiempo de inyección (n=3-4 por grupo), 6 semanas de edad, a menos que se especifique de otro modo. Se permitió a los animales aclimatarse durante un mínimo de 24 horas a la instalación del laboratorio antes de la iniciación de cada experimento. Los animales se identificaron por punción en los oídos. A los ratones no les fue restringida la dieta o la actividad durante los experimentos. El ciclo de luz/oscuridad fue de 12 horas, entre las 18 h 00 y las 6 h 00. En la mayoría de las inyecciones se usaba gelatina del 12% o PBS como vehículo. Los controles eran animales emparejados por edad y sexo (n=3-4) a los que se les inyectó la formulación de gelatina o PBS. Cada péptido se preparó a una concentración específica, disuelto en 0,5 centímetros cúbicos de vehículo. Los péptidos fueron inyectados subcutáneamente y los ratones fueron supervisados diariamente en la instalación del laboratorio. Los animales se sacrificaron 14 días después de la inyección, y ayunaron 20-24 horas antes del sacrificio.

Los ratones se anestesiaron con CO<sub>2</sub> y se desangraron por punción cardíaca. La sangre fue recuperada en 75 µl de TED (Trasysol; EDTA (5000 KIU/ml; 1,2 mg/ml; Diprotin-A), y la sangre se centrifugó a 14 k x g durante 5 minutos y el plasma se almacenó a -70 antes del análisis. El intestino delgado se retiró de la cavidad peritoneal, del píloro al ciego, se pesó limpio y se midió. Con fines comparativos, se obtuvieron las secciones de cada animal de la posición anatómica idéntica. Se obtuvieron los fragmentos 8±2 cm, 18±2 cm, 32±2 cm cada uno con una medida de 1,5-2,0 cm de longitud desde el píloro para la histomorfometría que representa el jejunio proximal, jejunio distal e ileón distal. Cada fragmento de intestino delgado fue abierto longitudinalmente por su borde antimesentérico en un bloque de tejido y luego se colocó en formalina del 10% (vol./vol.) durante la noche, luego se transfirió a ETOH del 70%.

Para el análisis de micrometría y morfométrico, y en particular para evaluar los efectos de GLP-2 sobre la altura de cripta/vellosidad, se cortaron secciones de 5 µm de espesor y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Se realizó la micrometría intestinal usando un microscopio con una cámara de vídeo (Leitz, Wetzlar, Alemania) conectado a un monitor de ordenador. El microscopio se calibró con un aumento de 4x, 10x, 25x y el mismo microscopio se usó para todas las evaluaciones. La altura de cripta más vellosidad se midió examinando al menos 20 vellosidades longitudinalmente orientadas desde la base de la cripta a la punta de la vellosidad de cada corte para el jejunio proximal y distal e ileón distal y se expresó en µm + S.E.M.

Los resultados de los diversos análisis se muestran en las figuras 1-7 y 9 que acompañan, y se resumen más abajo con relación a aquellas Figuras:

*Respuesta frente a la dosis:* La figura 1 muestra la respuesta frente a GLP-2 de rata medida como el peso del intestino delgado (BW-panel A) y como la altura de cripta más vellosidad en jejunio proximal (PJ-panel B), jejunio distal (DJ-panel C) e ileón distal (DI-panel D) como una función de la dosis de GLP-2 de rata en una formulación de gelatina del 12% (es decir, GLP-2 en PBS) administrada s.c. El péptido GLP-2 de rata se administró subcutáneamente. Los resultados se expresan como el cambio en tanto por ciento del control que recibe gelatina del 12% como vehículo sólo. Los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas comparado con el control (\*=p<0,005, \*\*=p<0,01, \*\*\*=p<0,001). Será apreciado a partir de los resultados presentados en la figura 1 que la inyección del péptido GLP-2 causa aumentos estadísticamente significativos del peso del intestino delgado a una dosis de 1,0 a 5,0 µg. El efecto deseado en la altura de cripta más vellosidad se realiza a una dosis tan baja como 0,25 µg.

*Efecto de la formulación:* La figura 2 muestra los resultados obtenidos usando la formulación con gelatina (G) o la formulación con PBS (PBS), cuando se administra s.c. a una dosis de GLP-2 de 2,5 µg dos veces al día. El Panel A muestra las diferencias en efecto vistas en el peso del intestino delgado en gramos, y el panel B muestra las diferencias en efecto vistas en la altura de cripta más vellosidad en µm vistas para el jejunio proximal (PJ) y distal (DJ) e ileón distal (DI). Será apreciado que ambos tipos de formulación produjeron un aumento estadísticamente significativo. Probablemente debido a su capacidad de liberar el GLP-2 de una manera más sostenida desde el sitio de inyección, la formulación con gelatina produjo una respuesta ligeramente mayor que la formulación con PBS.

*Efecto de la ruta de administración:* La figura 3 muestra el aumento del porcentaje en peso del intestino (BW) cuando se inyecta GLP-2 de rata, a una dosis de 2,5 µg dos veces al día, subcutáneamente (SC), intramuscularmente (IM) o intraperitonealmente (IP) en vehículo de solución salina tamponada con fosfato. Se apreciará que se derivaba una respuesta significativa frente al péptido GLP-2 independientemente de la ruta de administración seleccionada, con relación a un grupo control que recibe s.c. la administración de vehículo PBS solo. La inyección subcutánea proporcionó la mayor respuesta.

## ES 2 334 864 T3

*Efecto de la frecuencia de administración:* La figura 4 muestra los resultados de una evaluación del peso del intestino delgado y la altura de cripta más vellosidad como una función de la frecuencia de administración de GLP-2. El GLP-2 fue administrado s.c. a la dosis mencionada, tanto cada doce horas (q12 h), como una vez al día (qd) como una vez cada dos días (qod). Se apreciará a partir de los resultados mostrados que todas las frecuencias de administración produjeron un aumento significativo en el cambio en tanto por ciento del peso del intestino delgado, con relación a un grupo control que recibe PBS solo. El mayor aumento fue producido, para el peso del intestino delgado y para la altura de cripta más vellosidad, por el programa de medicación más frecuente, es decir, cada 12 horas.

*Efecto de la administración a largo plazo:* Se administró s.c. GLP-2 de rata en una formulación de gelatina del 10% en una dosis individual de 5 µg una vez al día continuamente durante 4 semanas (panel A), durante 8 semanas (panel B) o durante 12 semanas (panel C). La figura 5 muestra los efectos mediados por GLP-2 en el peso del intestino delgado (BW) y en las alturas de cripta más vellosidad (PJ, DJ y DI) en grupos tratados (T), con relación a un control (C) que recibía gelatina del 10% solo. Los resultados para el peso del intestino delgado indican que el aumento del peso del intestino delgado mediado por GLP-2 es inducido y sostenido durante el tiempo examinado de administración, como aumenta la altura de cripta/vellosidad del jejunio proximal. Se observó una respuesta similar también para el jejunio distal. Todos los animales se sometieron a una autopsia completa en el momento del sacrificio y no se encontró ninguna anomalía histológica en ninguno de los animales.

*Evaluación del curso de tiempo:* La figura 6 presenta el cambio del porcentaje en el peso del intestino delgado medido en ratones CD-1 hembra tratados subcutáneamente con PBS solo (Control) o con 2,5 µg de GLP-2 de rata en PBS administrado dos veces al día durante un número conocido de días consecutivos. Está claro a partir de los resultados que se alcanza un resultado significativo después del 4º día de administración, y que este efecto se mantiene con una administración continuada. En otros estudios, está claro también que el aumento del peso del intestino delgado alcanzado con la administración de GLP-2 había retrocedido aproximadamente 10 días después del tratamiento. Sin embargo, los efectos de GLP-2 en la hiperplasia de las vellosidades no retrocedieron completamente, en particular en los ratones más viejos (de 24 meses) sugiriendo una velocidad más lenta del recambio de tejido intestinal en estos receptores más viejos. Por lo tanto, es apropiado poner a los receptores en un régimen de medicación de mantenimiento durante la terapia con GLP-2.

*Género del receptor y evaluación de la edad:* La figura 7 muestra los resultados obtenidos con ratones CD-1 emparejados por sexo tratados con 2,5 µg de GLP-2 dos veces al día a partir de 4 a 16 semanas de edad, comparado con sus propios controles tanto para el peso del intestino delgado como para la histología. Se apreciará a partir de los resultados presentados que los efectos de GLP-2 en el intestino delgado se producen independientemente del género del receptor. En un experimento relacionado, se evaluaron ratones C57BLK hembra (Charles River, Estados Unidos) de 6 meses a 2 años tratados con GLP-2 y se encontró que GLP-2 era eficaz en la promoción del crecimiento del intestino delgado en ratones de 6 meses a 2 años de edad.

*Evaluación de los efectos de GLP-2 en la longitud del intestino delgado:* La figura 9 muestra el efecto de la administración de GLP-2 en la longitud del intestino delgado. Se trataron ratones CD1 con PBS (Control) o GLP-2 de rata (2,5 µg dos veces al día) en PBS durante 10 días, después de lo cual los ratones se sacrificaron y se midió en centímetros la longitud del intestino delgado del estómago frente a la válvula ileocecal.

El agrandamiento de las vellosidades observado en respuesta a GLP-2 puede generarse por un efecto de GLP-2 sobre la proliferación de células o sobre la inhibición de la senectud. Para examinar estas dos posibilidades, se examinaron secciones de parafina del intestino delgado a partir de tejidos estimulados y control para detectar el antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA), como una medida de la proliferación, y para detectar células apoptóticas usando el método TUNEL para el análisis de la apoptosis. Las velocidades de proliferación en el jejunio proximal de ratones tratados con GLP-2 aumentaron (124%) respecto a los ratones de control (46,0 ± 1,2% en control; 57 ± 5,5% en tratado). En ratones control, la proliferación se limitó al compartimento de cripta del intestino delgado; las vellosidades no contenían células PCNA-positivas. En el grupo tratado con GLP-2, se detectaron células proliferantes en las vellosidades, y en la unión del eje cripta-vellosidad. Las velocidades apoptóticas en el jejunio proximal de ratones tratados con GLP-2 disminuyeron respecto a los ratones control. Las células apoptóticas en ratones control se encontraron principalmente en la punta o el borde de las vellosidades; ninguna se encontró en el compartimento de cripta del intestino. En los ratones tratados con GLP-2, la distribución de células apoptóticas fue similar, pero sus números fueron menores.

### Ejemplo 3

Considerando los resultados observados con GLP-2 de rata en receptores de ratones, se supuso que varios homólogos vertebrados y análogos de GLP-2 de rata también mediarían un efecto intestinotrófico. Con este fin, se sintetizaron y evaluaron diversos GLP-2 y análogos de GLP-2, como se describe más abajo.

Se realizó a mano la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) en un recipiente de 300 mililitros (mL) sobre una escala de 3 milimoles (mmol) usando 6 gramos (g) de resina de clorometilo (Merrifield) (para los péptidos ácidos libres del extremo C-terminal) con una sustitución de 0,5 miliequivalentes (meq) por gramo. Los aminoácidos se

## ES 2 334 864 T3

protegieron en el extremo amino con el grupo t-butiloxicarbonilo (tBoc). Las cadenas laterales de los aminoácidos fueron protegidas con los grupos protectores de cadena lateral bencilo (Bz, para serina y treonina), benciloximetilo (BOM, para histidina), 2-bromobenciloxicarbonilo (2-BrZ, para tirosina), 2-clorobenciloxicarbonilo (2-ClZ, para lisina), ciclohexilo (cHex, para los ácidos aspártico y glutámico) y tosilo (Ts, para arginina) y resina de clorometilo (Merrifield). El primer aminoácido fue conectado a la resina de clorometilo por esterificación del aminoácido protegido en presencia de fluoruro de potasio (KF). Los péptidos de amida del extremo C-terminal se sintetizaron en una resina de 4-metilbenzohidrilamina (MBHA) sobre una escala de 3 mmol usando 6 g de resina con una sustitución de 0,5 miliequivalentes/g. El primer aminoácido fue conectado a la resina de MBHA según el procedimiento descrito para el alargamiento de péptidos.

La desprotección del grupo amino se realizó usando ácido trifluoroacético al 50% (TFA) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , seguido de la neutralización usando dos lavados de trietilamina al 10% ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . El alargamiento del péptido se realizó usando N,N-diciclohexilcarbodiimida/1-hidroxibenzotriazol (DCC/HOBt) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /dimetilformamida (DMF). El crecimiento de la cadena peptídica se terminó después de cada etapa de alargamiento con anhídrido acético al 20% ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ) en diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). La resina-péptido se lavó después de cada alargamiento, terminación y etapa de desprotección con isopropanol (iPrOH) y metanol (MeOH). Se repitió el lavado una vez. Se prepararon péptidos de acetilo del extremo N-terminal por acetilación del grupo amino-terminal con  $\text{Ac}_2\text{O}$  del 20% en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Los productos unidos a la resina se separaron rutinariamente por un procedimiento bajo-alto usando fluoruro de hidrógeno (HF) conteniendo dimetilsulfuro (DMS) y p-cresol como secuestrantes.

Los péptidos a granel fueron purificados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) usando una columna de sílice de fase inversa C18 de Vydac, 15-20  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, 2 pulgadas x 12 pulgadas, usando un gradiente de dilución con TFA del 0,1% en agua modificado con acetonitrilo. La dilución se monitorizó a 220 nanómetros (nm). Cada fracción recuperada se analizó según su pureza por HPLC analítico usando una columna de sílice de fase inversa C18 de Vydac, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 254 milímetros (mm), por gradiente de dilución con TFA del 0,1% en agua modificado con acetonitrilo, y monitorizado a 215 nm. Las fracciones que se manifestaron con una pureza mayor del 95% se combinaron y liofilizaron. Las sales de acetato de los péptidos se prepararon a partir de las sales de TFA por disolución del polvo liofilizado en agua, con la adición de acetonitrilo para ayudar a la disolución cuando era necesario. La disolución se pasó por una resina de intercambio catiónico Bio-Rex 70 protonada. La resina se lavó con 5 volúmenes de lecho de agua, y el péptido unido a la resina se diluyó con ácido acético del 50% en agua. La fase móvil se diluyó con agua y se liofilizó.

El polvo liofilizado final se analizó según su pureza por dos métodos analíticos de HPLC de fase inversa usando una columna de sílice de fase inversa, columna C18 de Vydac, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 254 mm. Los dos sistemas disolventes usados fueron un gradiente de agua ajustada a pH 2,25 con fosfato de trietilamina, modificado con acetonitrilo, y un gradiente de TFA del 0,1% en agua, modificado con acetonitrilo. La fase móvil de la columna se monitorizó a 215 nm. La identidad de cada producto se confirmó por el análisis de los aminoácidos y por espectrometría de masas por electropulverización.

Mediante este método, se produjeron los siguientes GLP-2 o análogos de GLP-2, como acetatos:

a) GLP-2 de rata de SEQ ID NO: 3;

b) GLP-2 de rata de N-acetilo, cuyo extremo amino de GLP-2 de rata se bloqueó con un grupo acetilo;

c) GLP-2 de rata [ $\text{Arg}^{+1}$ ], que es GLP-2 de rata modificado con un residuo Arg adicional en el extremo amino;

d) GLP-2 de rata C-amido, que es GLP-2 de rata con un grupo amido añadido al extremo carboxilo (la disolución de 1 mg fue conseguida en ácido acético del 1% (110  $\mu\text{l}$ ), neutralizada con 450  $\mu\text{l}$  de NaOH 5N);

e) GLP-2 de rata [ $\text{Arg}^{+1,+2}$ ], que es GLP-2 de rata modificado por dos residuos Arg adicionales presentes en el extremo amino;

f) GLP-2 humano [ $\text{Arg}^{+34}$ ], que es GLP-2 humano con un residuo Arg añadido después del residuo 33; y

g) GLP-2 de degú.

Estos péptidos eran totalmente solubles en agua a temperatura ambiente a menos que se indique otra cosa.

El efecto intestinotrófico de estos GLP-2 y análogos de GLP-2 se evaluó de la manera descrita en el Ejemplo 2. En particular, los péptidos se formularon en PBS a una dosis de 2,5  $\mu\text{g}$  por inyección de 0,5 ml, y se administraron subcutáneamente a ratones CD-1 hembra cada 12 horas durante 10 ó 14 días. El peso del intestino y la altura de cripta y vellosidad se compararon frente a ratones tratados de ensayo (PBS solo).

Los resultados de estos experimentos se presentan en la figura 8. Los péptidos que fueron modificados a partir de GLP-2 por la adición de grupos químicos al extremo amino, expresamente [N-acetil]-GLP-2, o contenían el (los)

## ES 2 334 864 T3

aminoácido(s) adicional(es) al extremo N-terminal, [Arg<sup>+1</sup>]-GLP-2, o al extremo carboxilo, tal como [Arg<sup>+34</sup>]-GLP-2, causaron derivados de GLP-2 que todavía mostraban propiedades del factor de crecimiento del intestino delgado *in vivo*, como se demuestra por su eficacia en la promoción del crecimiento del intestino delgado y el aumento de la altura de cripta más vellosidad (comparado con los controles tratados con solución salina) en un experimento de 14 días en ratones (figura 8, paneles A-F). Además, pueden prepararse moléculas relacionadas con GLP-2 con propiedades eficaces del tipo factor de crecimiento del intestino delgado utilizando la información sacada de las secuencias de moléculas del tipo GLP-2 relacionadas a partir de diversas especies. Por ejemplo, la secuencia de GLP-2 de degú también muestra actividad del tipo factor de crecimiento del intestino delgado en un experimento de 10 días en ratones, con un aumento del peso del intestino delgado casi comparable al conseguido con GLP-2 de rata (ambos péptidos administrados subcutáneamente a 2,5  $\mu\text{g}$  dos veces al día). Estos datos demuestran que estas modificaciones de la estructura del péptido GLP-2, como se ilustra en este documento, originan moléculas que muestran propiedades del tipo GLP-2 natural *in vivo*. En contraste, cuando se modificaba la región del extremo carboxilo-terminal de la molécula por la adición de un grupo amino bloqueante, [C-amido]-GLP-2, el péptido resultante no mostraba una actividad biológica significativa de GLP-2 *in vivo* (figuras 8C-D).

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

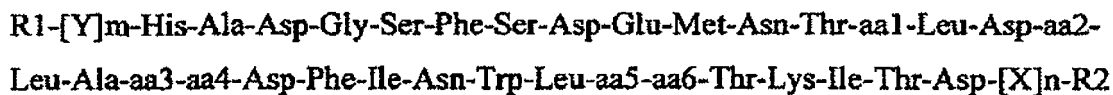
65



## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica, que comprende un péptido GLP-2 seleccionado entre un GLP-2 de vertebrado  
 5 intestinotrófico o un GLP-2 de vertebrado intestinotrófico que se diferencia del GLP-2 de vertebrado natural porque  
 incorpora al menos una adición o sustitución de aminoácido o un aminoácido con un grupo bloqueante de aminoácido  
 del extremo C- o N-terminal, y un vehículo farmacéuticamente aceptable,

en el que el péptido GLP-2 tiene la fórmula:



15 en la que aa1, aa2, aa3, aa4, aa5, y aa6 se refiere a cualquier residuo de aminoácido, a excepción de que aa2 no sea  
 His y aa4 no sea Lys, y:

20 X sea uno o dos aminoácidos seleccionados de His, Arg, y Lys;

Y sea uno o dos aminoácidos seleccionados de His, Arg, y Lys;

m sea 0 ó 1;

25 n sea 0 ó 1;

R1 sea H o un grupo bloqueante del extremo N-terminal; y

30 R2 sea OH o un grupo bloqueante del extremo C-terminal.

2. Una composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que la composición comprende GLP-2 de verte-  
 brado intestinotrófico que se diferencia de GLP-2 de vertebrado natural porque incorpora al menos una sustitución de  
 35 aminoácido.

3. Una composición farmacéutica según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicha composición está libre de pirógenos.

4. Una composición farmacéutica según cualquier reivindicación 1 precedente, en la que dicha composición se  
 40 filtra de modo estéril.

5. La composición farmacéutica según cualquier reivindicación precedente, en la que:

45 aa1 se selecciona de Met, Leu, Ile, Val y Cys;

aa2 se selecciona de Ala, Ser, Thr, Pro, Gly, Asn, Asp, Glu y Gln;

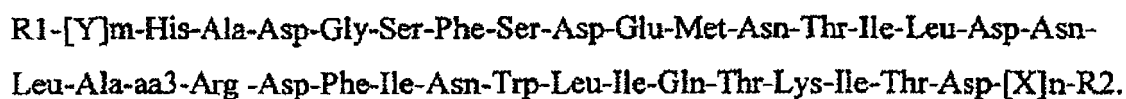
aa3 se selecciona de Ala, Ser, Thr, Pro y Gly;

50 aa4 se selecciona de His y Arg;

aa5 se selecciona de Met, Leu, Ile, Val y Cys; y

55 aa6 se selecciona de Asn, Asp, Glu, Gln, His, Arg y Lys.

6. Una composición farmacéutica según la reivindicación 5, en la que el péptido GLP-2 tiene la secuencia de  
 60 aminoácidos:



7. Una composición farmacéutica según las reivindicaciones 1, 3 ó 4, en la que el péptido GLP-2 es GLP-2 de  
 65 vertebrado.

## ES 2 334 864 T3

8. Una composición farmacéutica según la reivindicación 7, en la que el péptido GLP-2 es GLP-2 de mamífero.
9. Una composición farmacéutica según la reivindicación 8, en la que el GLP-2 es GLP-2 de rata.
- 5 10. Una composición farmacéutica según las reivindicaciones 1, 3 ó 4 en la que GLP-2 es GLP-2 de humano o GLP-2 de humano intestinotrófico que incorpora, con relación al GLP-2 de humano natural, al menos una adición o sustitución de aminoácido o un grupo bloqueante del extremo C-terminal o N-terminal.
- 10 11. Una composición farmacéutica según la reivindicación 10, en la que GLP-2 de humano intestinotrófico incorpora, con relación a GLP-2 de humano natural, al menos una sustitución de aminoácido.
12. Una composición farmacéutica según la reivindicación 10, en la que el péptido GLP-2 es GLP-2 de humano.
13. Una composición farmacéutica según cualquier reivindicación precedente, en la forma de un líquido adecuado para la administración por inyección o infusión.
- 15 14. Una composición farmacéutica según cualquier reivindicación precedente, formulada para causar la liberación lenta de dicho péptido GLP-2 después de su administración.
- 20 15. Una composición farmacéutica según cualquier reivindicación precedente, formulada para administración oral.
16. Una composición farmacéutica según cualquier reivindicación precedente, en la que GLP-2 está presente en una cantidad eficaz para promover el crecimiento del tejido gastrointestinal.
- 25 17. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en la que el péptido GLP-2 está presente en una cantidad eficaz para promover el crecimiento de islotes pancreáticos.
18. Una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de un péptido GLP-2 como se define en la reivindicación 1.
- 30 19. Una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de un péptido GLP-2 según la reivindicación 18, en la que dicho péptido GLP-2 es un péptido GLP-2 de mamífero.
- 35 20. Una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de un péptido GLP-2 según la reivindicación 19, en la que dicho péptido GLP-2 es GLP-2 de humano.
21. Un método útil para identificar nuevos péptidos intestinotróficos, que comprende las etapas de:
- 40 a) obtener un péptido GLP-2 de vertebrado intestinotrófico que tiene al menos una sustitución de aminoácido, o un aminoácido con un grupo bloqueante; y
- b) tratar a un mamífero con dicho análogo usando un régimen capaz de generar un efecto intestinotrófico cuando se utiliza para GLP-2 de rata; y
- 45 c) determinar el efecto de dicho péptido GLP-2 de vertebrado intestinotrófico sobre el peso del intestino delgado y/o sobre la altura de cripta más vellosidad y/o el tamaño de los islotes pancreáticos con relación a un mamífero control tratado de ensayo, por el cual dicho péptido intestinotrófico se identifica como uno que produce un aumento de dicho peso y/o dicha altura y/o dicho tamaño.
- 50 22. El uso de un péptido GLP-2 para fabricar una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para promover el crecimiento de tejido gastrointestinal.
- 55 23. El uso de un péptido GLP-2 para fabricar una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para promover el crecimiento y/o función del tejido del intestino delgado.
24. El uso de un péptido GLP-2 para fabricar una composición farmacéutica según cualquiera de reivindicaciones 1 a 16 para la profilaxis o el tratamiento de una afección, desorden o enfermedad gastrointestinal.
- 60 25. El uso de un péptido GLP-2 para fabricar una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para el tratamiento de una enfermedad, desorden, o afección gastrointestinal seleccionada del grupo que consiste en úlceras, desórdenes de la digestión, síndromes de malabsorción, síndrome del intestino corto, síndrome cui-de-sac, enfermedad inflamatoria del intestino, esprúe celiaco, esprúe tropical, esprúe hipogammaglobulinémico, enteritis, enteritis regional (enfermedad de Crohn), daño del intestino delgado debido a agentes tóxicos u otros agentes quimioterapéuticos y síndrome del intestino corto.
- 65

## ES 2 334 864 T3

26. El uso de un péptido GLP-2 para fabricar una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para el tratamiento del síndrome del intestino corto.

27. El uso de un péptido GLP-2 para fabricar una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, para la profilaxis de una afección gastrointestinal seleccionada del grupo que consiste en enteritis por radiación, enteritis infecciosa o post-infecciosa, enteritis regional (enfermedad de Crohn), daño del intestino delgado debido a agentes tóxicos u otros agentes quimioterapéuticos y síndrome del intestino corto.

28. El uso de un péptido GLP-2 para fabricar una composición farmacéutica según cualquiera de reivindicaciones 1 a 16 para la profilaxis del daño del intestino delgado debido a agentes quimioterapéuticos.

29. El uso de un péptido GLP-2 para la preparación de una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y 17 para promover el crecimiento de islotes pancreáticos.

30. El uso de un péptido GLP-2 para la preparación de una composición farmacéutica según la reivindicación 17 para tratar la diabetes.

31. El uso de un péptido GLP-2 según cualquiera de las reivindicaciones 22-30, en el que la composición farmacéutica es para ser administrada a seres humanos.

32. El uso de un péptido GLP-2 según cualquiera de las reivindicaciones 22-31, en el que el péptido GLP-2 debe ser administrado en una dosis de aproximadamente 100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  a 1  $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$ .

33. Un péptido GLP-2 que tiene actividad intestinotrófica y que incorpora, con relación a GLP-2 de vertebrado, al menos una adición o sustitución de aminoácido o un grupo bloqueante del extremo C-terminal o N-terminal,

en el que el péptido GLP-2 tiene la fórmula:

$$\text{R1-[Y]m-His-Ala-Asp-Gly-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-Met-Asn-Thr-aa1-Leu-Asp-aa2-Leu-Ala-aa3-aa4-Asp-Phe-Ile-Asn-Trp-Leu-aa5-aa6-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp-[X]n-R2}$$

en el que aa1, aa2, aa3, aa4, aa5, y aa6 se refiere a cualquier residuo de aminoácido, a excepción de que aa4 no sea Lys, y:

X sea uno o dos aminoácidos seleccionados de His, Arg, y Lys;

Y sea uno o dos aminoácidos seleccionados de His, Arg, y Lys;

m sea 0 ó 1;

n sea 0 ó 1;

R1 sea H o un grupo bloqueante del extremo N-terminal; y

R2 sea OH o un grupo bloqueante del extremo C-terminal.

34. El péptido GLP-2 de la reivindicación 33, que incorpora con relación a GLP-2 de vertebrado, al menos una sustitución de aminoácido.

35. Un péptido GLP-2 según la reivindicación 33 ó 34, en el que GLP-2 de vertebrado es GLP-2 de mamífero.

36. Un análogo de péptido GLP-2 según la reivindicación 35, en el que GLP-2 de mamífero es GLP-2 de humano.

37. Un envase que comprende un vial relleno de un modo estéril o ampolla que contiene una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en una cantidad que promueve el crecimiento de tejido en dosis unitaria o en cantidades multidosis, en el que el envase incorpora una etiqueta que instruye sobre el uso de su contenido para estimular tanto el crecimiento del intestino delgado como la proliferación y el aumento de células de islotes pancreáticos.

38. Una composición farmacéutica que comprende una sal farmacéuticamente aceptable de un GLP-2 según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

39. Un GLP-2 natural en vertebrados para su uso como un medicamento.

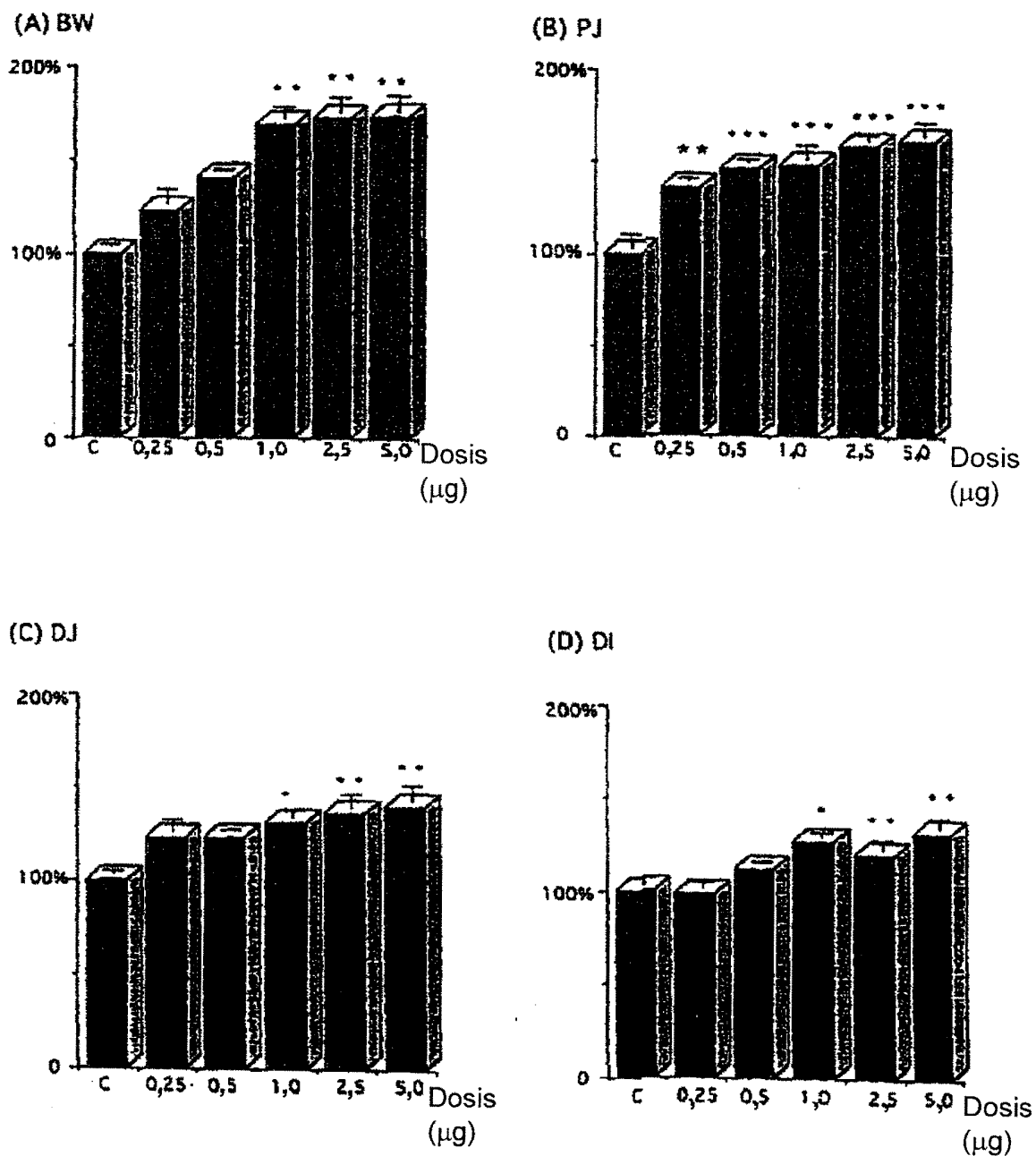
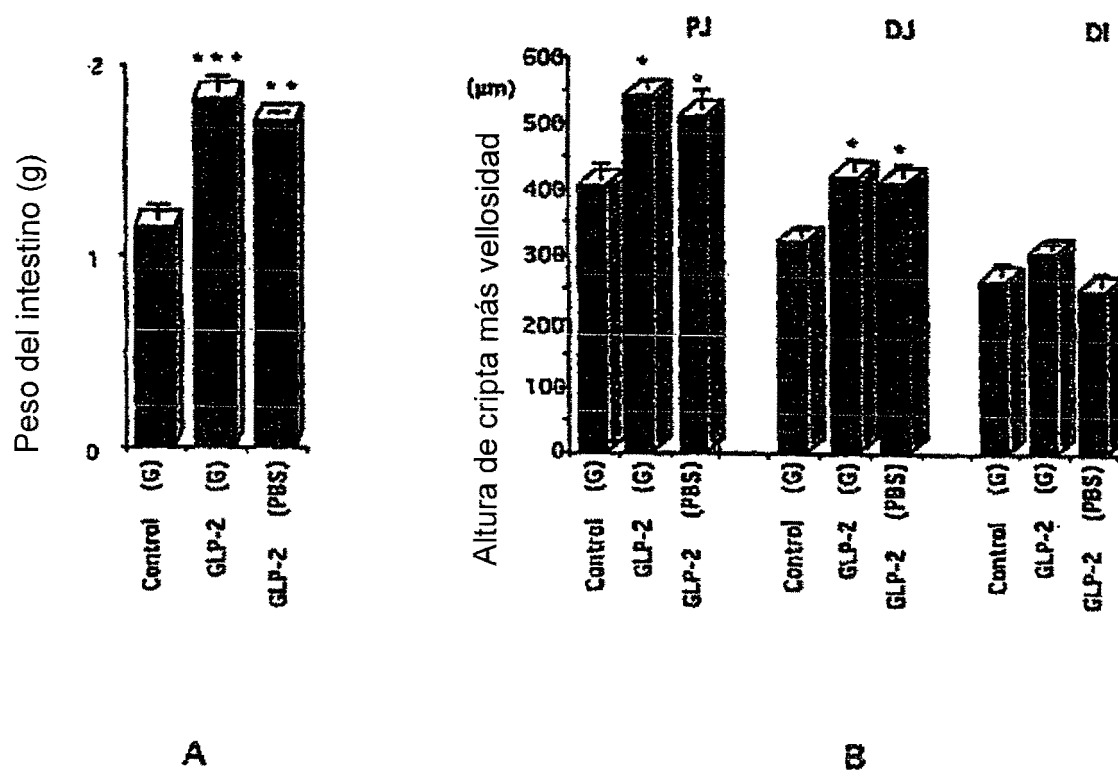


Figura 1



G=gelatina  
 PBS=solución salina tamponada de fosfato

Figura 2

Cambio en tanto por ciento en peso del intestino delgado después de la administración de GLP-2

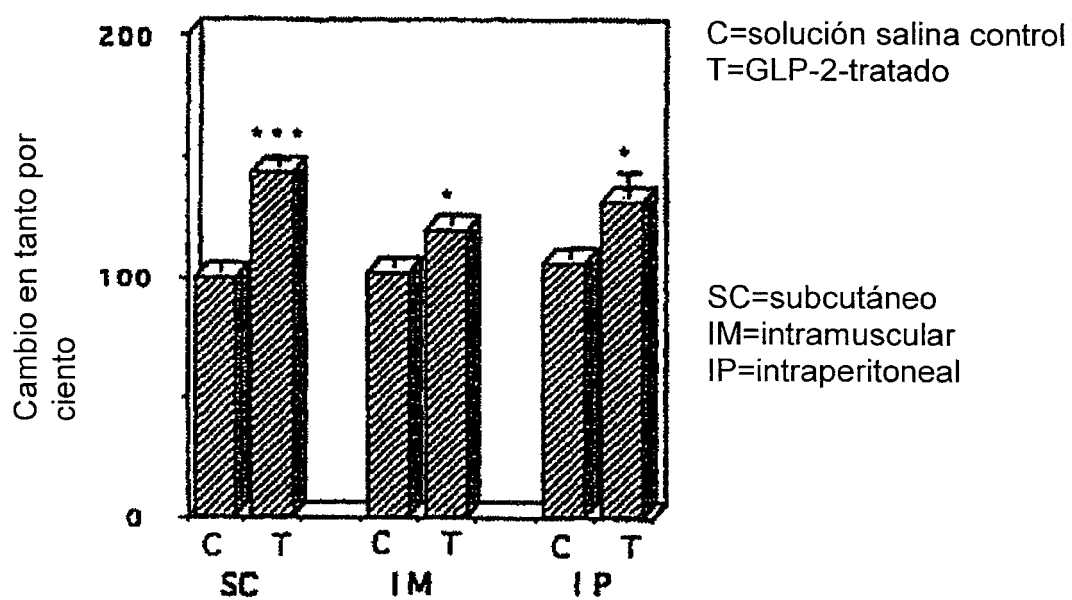


Figura 3

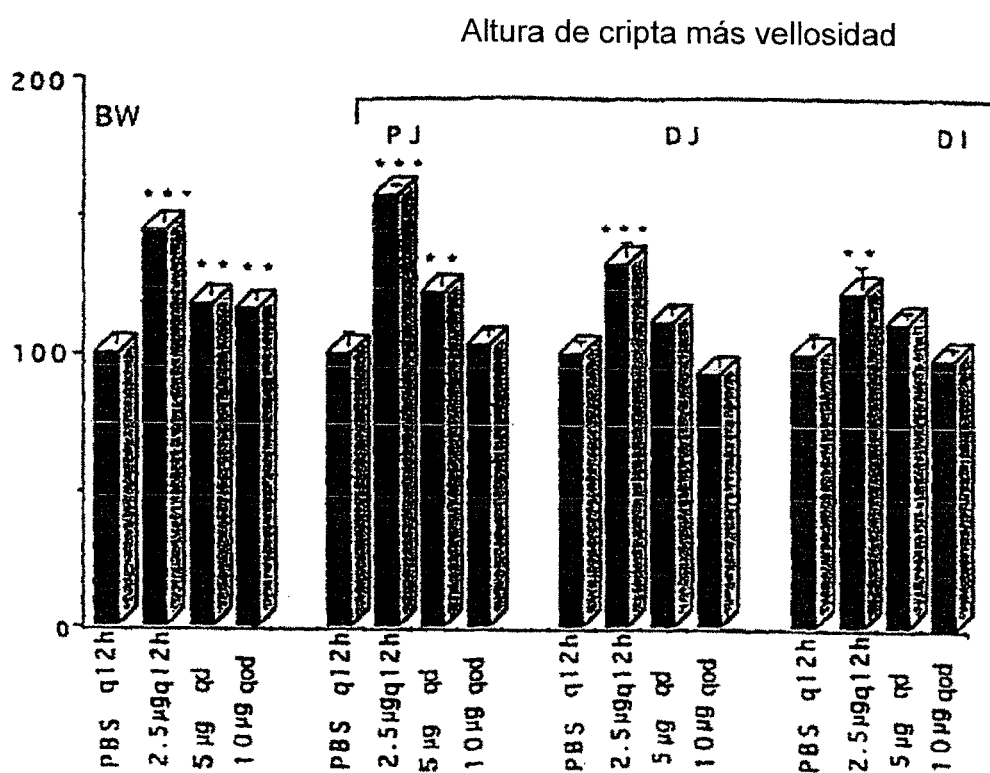


Figura 4

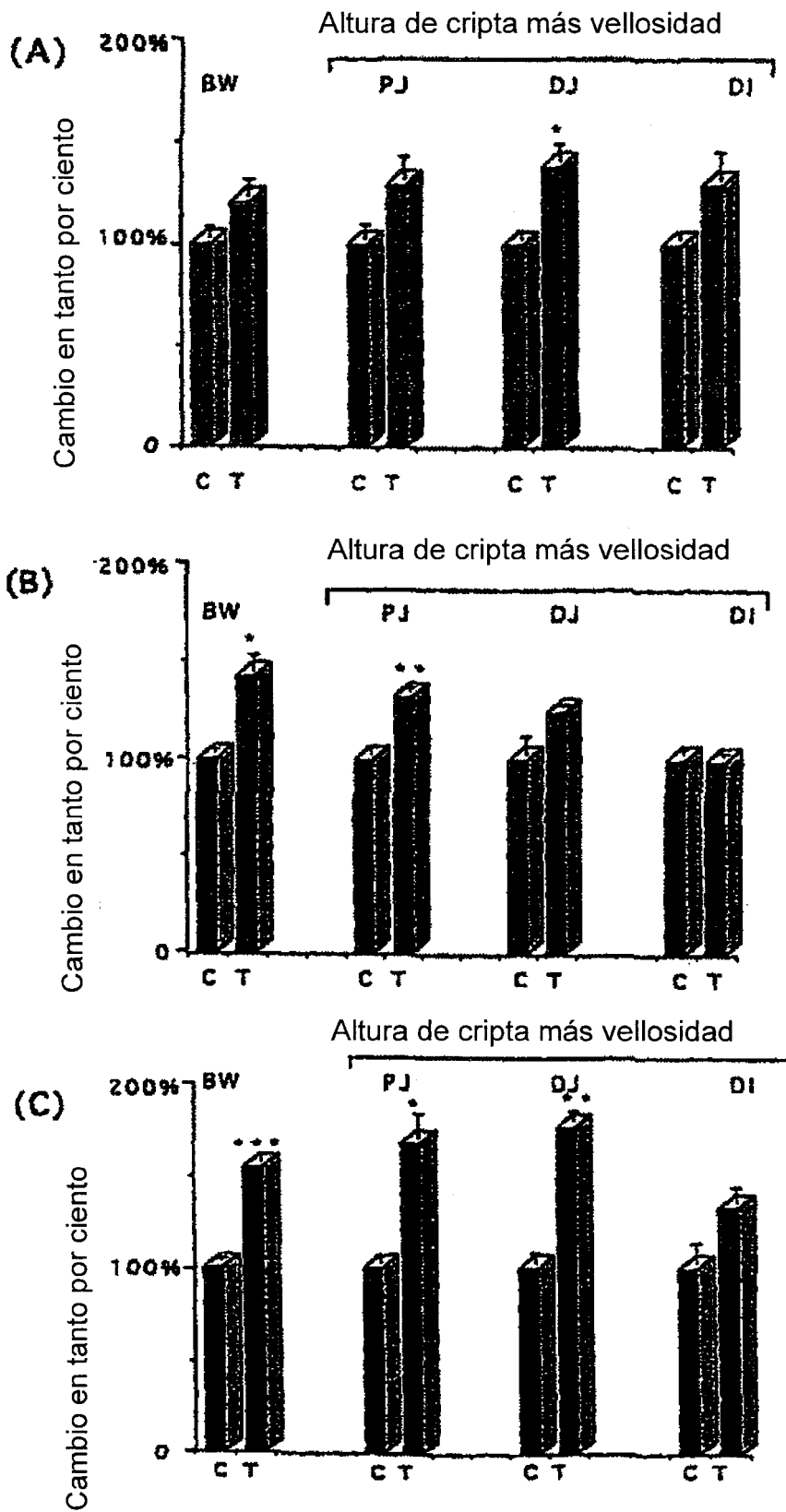


Figura 5



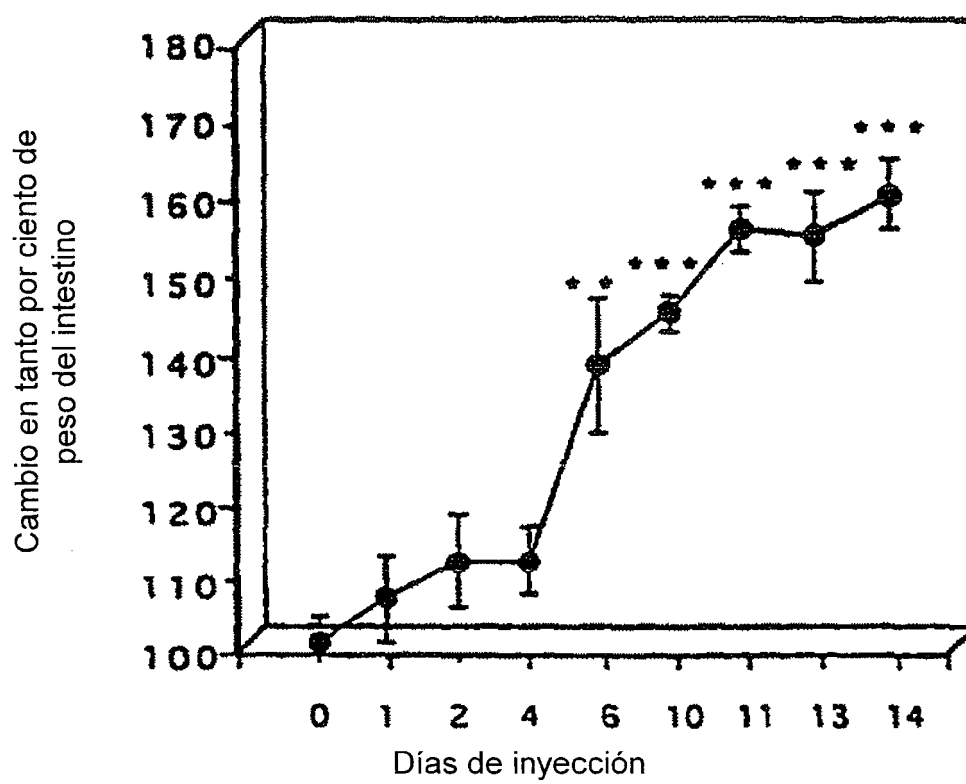


Figura 6

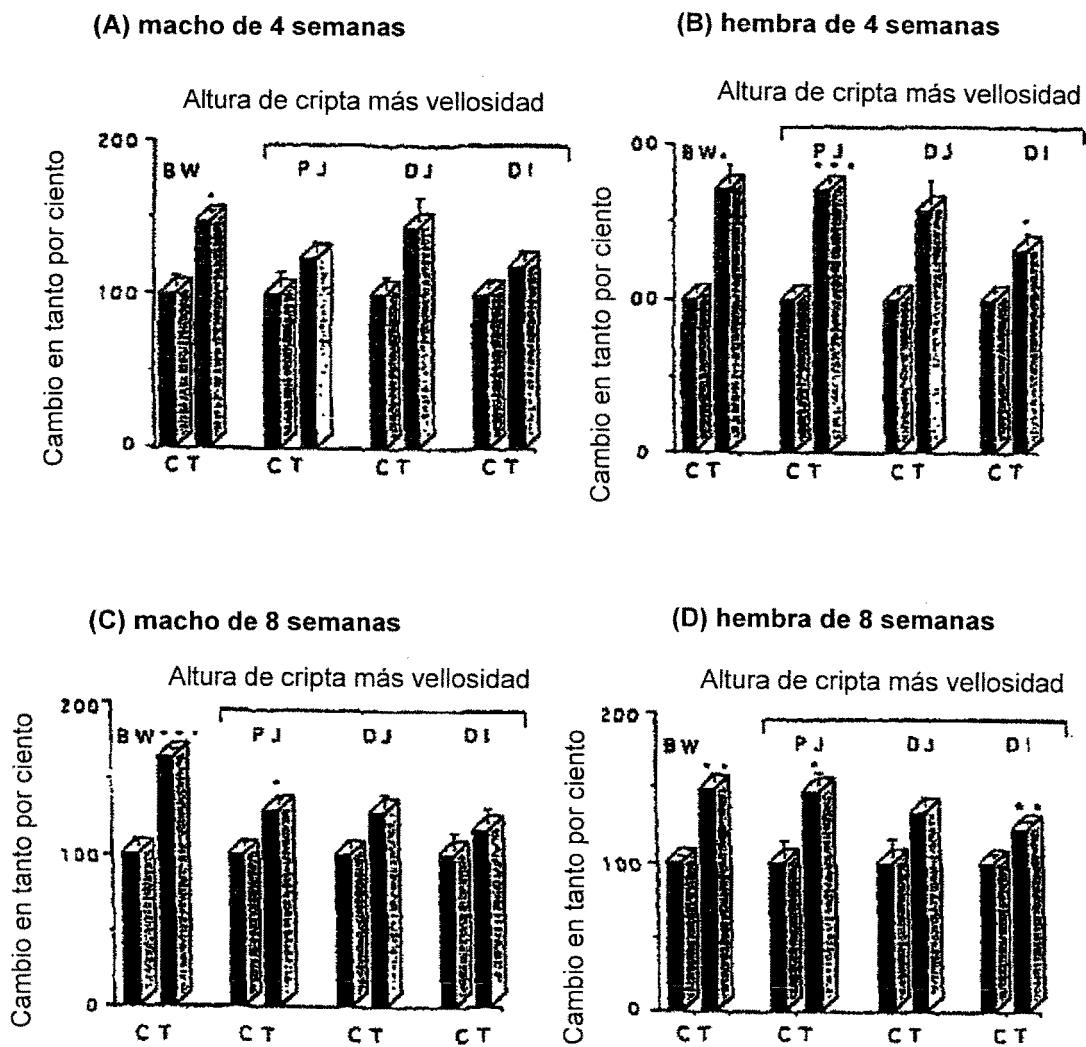


Figura 7-1

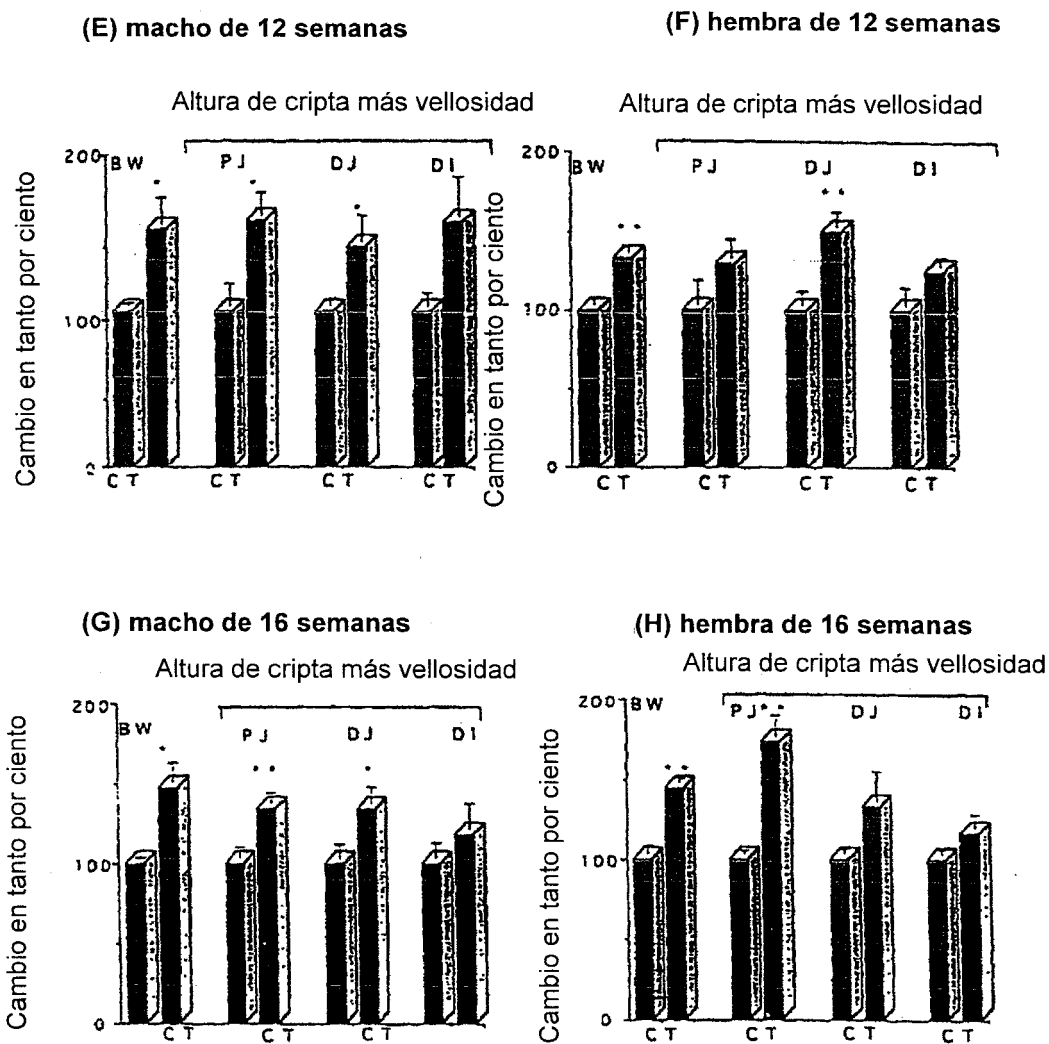


Figura 7-2

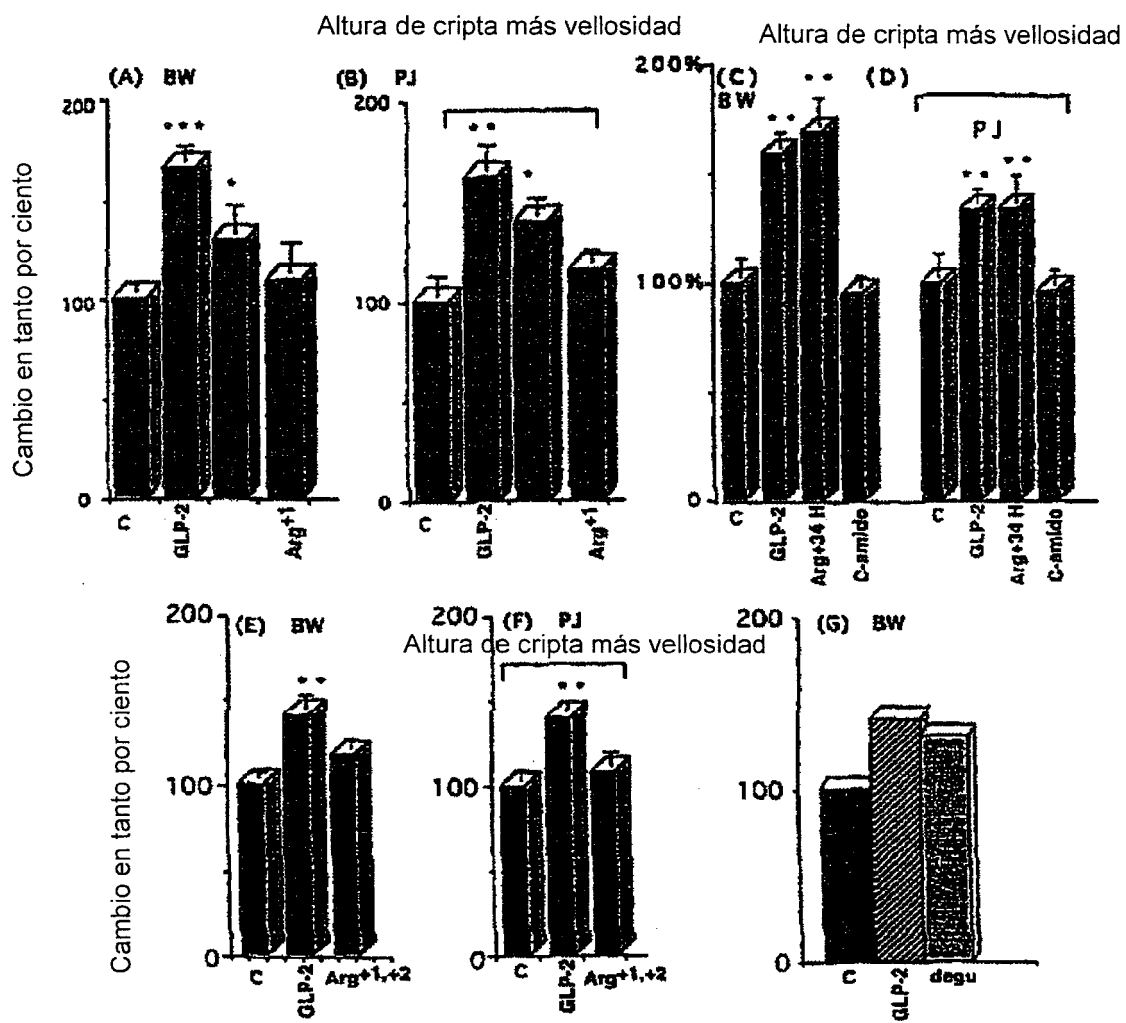


Figura 8

(E) Longitud

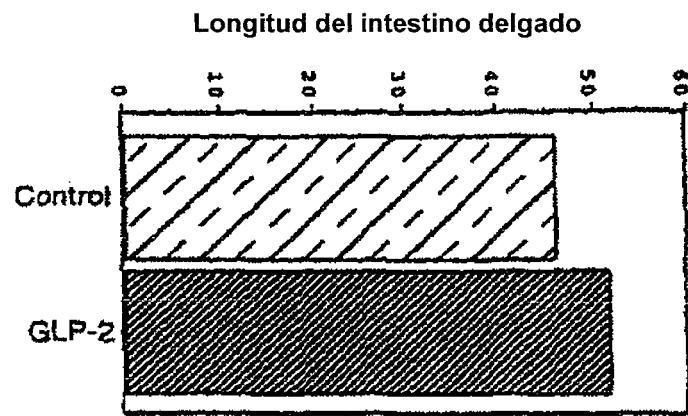


Figura 9

# ES 2 334 864 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

### (1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: Drucker, Daniel J.
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: PÉPTIDO-2 TIPO GLUCAGÓN Y SU USO TERAPÉUTICO
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 3
- 10 (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
- (A) DESTINATARIO: Pennie y Edmonds
  - (B) CALLE: 1155 Avenue of the Americas
  - 15 (C) CIUDAD: Nueva York
  - (D) ESTADO: Nueva York
  - (E) PAÍS: EE.UU.
  - (F) ZIP: 10036-2711
- 20 (v) FORMA INFORMÁTICA LEGIBLE:
- (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
  - (B) ORDENADOR: ordenador personal compatible IBM
  - 25 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
  - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versión #1.25
- (vi) DATOS DE LA PRESENTE SOLICITUD:
- 30 (A) NÚMERO DE SOLICITUD: EE.UU.
  - (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
  - (C) CLASIFICACIÓN:
- 35 (ix) INFORMACIÓN DE CONTACTO:
- (A) TELÉFONO: (202) 638-5000
  - (B) TELEFAX: (202) 638-4810
- 40 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:1:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- 45 (A) LONGITUD: 34 aminoácidos
  - (B) TIPO: aminoácido
  - (C) CADENA: sencilla
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 50 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (ix) PROPIEDAD:
- (A) NOMBRE/CLAVE: sitio modificado
  - 55 (B) POSICIÓN: 13
  - (D) OTRA INFORMACIÓN: /nota = "UN AMINOÁCIDO NEUTRO/POLAR/GRANDE/NO AROMÁTICO"
- 60 (ix) PROPIEDAD:
- (A) NOMBRE/CLAVE: sitio modificado
  - (B) POSICIÓN: 16
  - (D) OTRA INFORMACIÓN: /nota = "UN AMINOÁCIDO NEUTRO/POLAR"
- 65 (ix) PROPIEDAD:
- (A) NOMBRE/CLAVE: sitio modificado

## ES 2 334 864 T3

(B) POSICIÓN: 19

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= “UN AMINOÁCIDO NEUTRO”

(ix) PROPIEDAD:

(A) NOMBRE/CLAVE: sitio modificado

(B) POSICIÓN: 20

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota = “UN AMINOÁCIDO NEUTRO”

(ix) PROPIEDAD:

(A) NOMBRE/CLAVE: sitio modificado

(B) POSICIÓN: 27

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota = “UN AMINOÁCIDO NEUTRO/POLAR/GRANDE/NO AROMÁTICO”

(ix) PROPIEDAD:

(A) NOMBRE/CLAVE: sitio modificado

(B) POSICIÓN: 28

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota = “UN AMINOÁCIDO NEUTRO O BÁSICO”

(ix) PROPIEDAD:

(A) NOMBRE/CLAVE: sitio modificado

(B) POSICIÓN: 34

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota = “UN AMINOÁCIDO SELECCIONADO DE ARG, LYS O UNA CADENA ARG-LYS”

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA SEQ ID NO:1:

```
His Ala Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Xaa Leu Asp Xaa
1          5          10          15
Leu Ala Xaa Xaa Asp Phe Ile Asn Trp Leu Xaa Xaa Thr Lys Ile Thr
20          25          30
Asp Xaa
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 34 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido.

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) PROPIEDAD:

(A) NOMBRE/CLAVE: sitio modificado

(B) POSICIÓN: 19

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota = “UN AMINOÁCIDO NEUTRO”

(ix) PROPIEDAD:

(A) NOMBRE/CLAVE: sitio modificado

(B) POSICIÓN: 34

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota = “UN AMINOÁCIDO SELECCIONADO DE ARG, LYS O LA CADENA ARG-LYS”

## ES 2 334 864 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:2:

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

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

10

**Asp Xaa**

15 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

20 (A) LONGITUD: 33 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:3:

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

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

35 **Asp**

40

45

50

55

60

65