



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 095**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06727006 .6**  
96 Fecha de presentación : **04.05.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1877435**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.01.2008**

54 Título: **Análogos del péptido 2 tipo glucagón (GLP-2).**

30 Prioridad: **04.05.2005 US 678066 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.06.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.06.2011**

73 Titular/es: **ZEALAND PHARMA A/S**  
**Smedeland 26B**  
**2600 Glostrup, DK**

72 Inventor/es: **Larsen, Bjarne, Due;**  
**Petersen, Yvette, Miata y**  
**Ebbehøj, Kirsten**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 361 095 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

Análogos del péptido 2 tipo glucagón (GLP-2)

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a análogos del péptido 2 tipo glucagón (GLP-2) y a su uso médico, por ejemplo en la profilaxis o el tratamiento de trastornos relacionados con el estómago y el intestino y para la mejora de los efectos secundarios de la quimioterapia y la radioterapia.

10

**Antecedentes de la invención**

[0002] El GLP-2 es un péptido de 33 aminoácidos liberado tras el procesamiento post-traduccional del glucagón en las células L enteroendocrinas del intestino y en regiones específicas del tronco cerebral. Es co-secretado junto con el péptido 1 tipo glucagón (GLP-1), la oxintomodulina y la glicentina, en respuesta a la ingestión de nutrientes.

15

[0003] El GLP-2 induce un crecimiento significativo del epitelio de la mucosa del intestino delgado a través de la estimulación de la proliferación de blastocitos en las criptas y la inhibición de la apoptosis en las vellosidades (Drucker y col. Proc Natl Acad Sci USA. 1996, 93:7911-6). El GLP-2 también inhibe el vaciado gástrico y la secreción de ácidos gástricos (Wojdemann y col. J Clin Endocrinol Metab. 1999, 84:2513-7), mejora la función de la barrera intestinal (Benjamin y col. Gut. 2000, 47:112-9), estimula el transporte de hexosa intestinal mediante la regulación por aumento de los transportadores de glucosa (Cheeseman, Am J. Physiol. 1997, R 1965-71), e incrementa el flujo sanguíneo intestinal (Guan y col. Gastroenterology. 2003, 125, 136-47).

20

25

[0004] El GLP-2 se une a un único receptor acoplado a la proteína G que pertenece a la familia de las secretinas del glucagón de clase II (1). El receptor del GLP-2 sólo ha sido localizado en el intestino delgado, en el colon y en el estómago, sitios que se sabe que son sensibles al GLP-2 (Yusta y col. Gastroenterology. 2000, 119: 744-55). Sin embargo, la célula diana para la estimulación del receptor del GLP-2 en el tracto gastrointestinal sigue sin estar clara y los mediadores intracelulares aguas abajo acoplados al receptor del GLP-2 se conocen poco.

30

[0005] Los efectos beneficiosos y específicos demostrados del GLP-2 en el intestino delgado han despertado mucho interés, como el uso del GLP-2 en el tratamiento de una enfermedad o lesión intestinal (Sinclair and Drucker, Physiology 2005: 357-65). Además, se ha demostrado que el GLP-2 previene o reduce el daño epitelial de la mucosa en un gran número de modelos preclínicos de lesión de las vísceras, incluyendo mucositis inducida por quimioterapia, lesión de isquemia-reperfusión, colitis inducida por dextrano sulfato y modelos genéticos de la enfermedad inflamatoria del intestino (Sinclair and Drucker Physiology 2005: 357-65).

35

El GLP-2 se secreta en forma de péptido de 33 aminoácidos con la siguiente secuencia: H-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-OH. Se escinde rápidamente por la alanina (A) en posición 2 del extremo NH<sub>2</sub> al GLP-2 (3-33) humano inactivo mediante la enzima DPP IV. Esta rápida degradación enzimática del GLP-2 (1-33), además del aclaramiento renal da como resultado una semi-vida para el péptido de 7 minutos aproximadamente (Tavares y col., Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 278:E134-E139, 2000).

40

45

[0006] En el documento US 5.994.500 (Drucker y col.) se describen antagonistas del GLP-2 y sus efectos sobre el crecimiento del tejido gastrointestinal. Se sugiere que los antagonistas se formulen en forma de compuestos farmacéuticos para su uso en el tratamiento de la hiperplasia o para inducir hipoplasia. En el documento US 5.994.500 la estructura del GLP-2 de mamífero ha sido alterada por mutaciones, tales como sustituciones y eliminaciones.

50

[0007] Los documentos US 6.184.208; US 5.789.379 y US 6.184.201 describen análogos del GLP-2 y sus usos médicos. Todos los análogos se obtienen por sustituciones y/o eliminaciones del GLP-2 humano.

55

[0008] DaCambra y col. (Biochemistry 2000, 39, 8888-8894) describe los determinantes estructurales para la actividad del GLP-2. Ejemplos de dichos determinantes son la Phe6 y la Thr5, que son mencionados como cruciales para la unión y activación del receptor del GLP-2.

60

[0009] En el documento WO 97/39031, se describe el análogo del GLP-2, el [Gly2]GLP-2. Aquí, la alanina en posición 2 ha sido sustituida por glicina para hacer que el péptido sea resistente a la escisión con DPP IV. La sustitución de la alanina ha demostrado incrementar la estabilidad y potencia del péptido. La solicitud de patente describe cómo se puede usar el análogo del GLP-2 contra enfermedades asociadas a la inflamación y destrucción de la mucosa epitelial del intestino. Éstas incluyen la resección masiva del intestino delgado, enfermedad inflamatoria del intestino, mucositis inducida por quimioterapia y lesión isquémica.

65

[0010] El documento WO 02/066511 describe análogos del GLP-2 que tienen una semi-vida *in vivo*

prolongada y su uso como medicamentos en el tratamiento de trastornos gastrointestinales, como enfermedades inflamatorias del intestino.

5 **[0011]** El documento WO 01/41779 describe el uso de h[Gly<sub>2</sub>]GLP-2 como pretratamiento para inhibir la apoptosis inducida por quimioterapia y promover la supervivencia celular.

**[0012]** El uso del GLP-2 o análogos del GLP-2 en el tratamiento de diversas enfermedades ha sido propuesto por muchos científicos. No obstante, aún existe la necesidad de análogos del GLP-2 mejorados y estables.

## 10 **Resumen de la invención**

**[0013]** De manera amplia, la presente invención se refiere a análogos del GLP-2 que comprenden una o más sustituciones comparados con el GLP-2 de tipo natural y que tienen la propiedad de una actividad biológica *in vivo* mejorada y/o una estabilidad química mejorada, por ejemplo, como se evalúa en ensayos de estabilidad *in vitro*.

15 **[0014]** Específicamente, la invención proporciona un análogo del péptido 2 tipo glucagón (GLP-2) representado por la fórmula general:

20  $R^1-Z^1\text{-His-Gly-X3-Gly-XS-Phe-X7-Ser-Glu-X10-X11-Thr-Ile-Leu-Asp-X16-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-X24-Trp-Leu-Ile-X28-Thr-Lys-X31-X32-X33-Z}^2\text{-R}^2$

donde:

R<sup>1</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-4</sub> (por ejemplo, metilo), acetilo, formilo, benzoilo o trifluoroacetilo

X3 es Glu o Asp

X5 es Ser o Thr

25 X7 es Ser o Thr

X10 es Met, Leu, Nle, o un aminoácido sustituto de la Met oxidativamente estable

X11 es Asn, Ala, Lys o Ser

X16 es Asn o Ala

X24 es Asn o Ala

30 X28 es Gln o Ala

X31 es Ile o está eliminado

X32 es Thr o está eliminado

X33 es Asp o está eliminado

R<sup>2</sup> es NH<sub>2</sub> u OH;

35 Z<sup>1</sup> y Z<sup>2</sup> están ausentes o son independientemente una secuencia de péptidos de 3-20 aminoácidos seleccionados del grupo constituido por Ala, Leu, Ser, Thr, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Met y Om; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

40 **[0015]** En ciertas formas de realización, cuando Z<sup>1</sup> está presente R<sup>1</sup> puede ser H, y cuando Z<sup>2</sup> está presente R<sup>2</sup> puede ser OH.

**[0016]** En algunas formas de realización de la presente invención, el análogo del GLP-2 tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 63% con el GLP-2 de tipo natural (1-33) que tiene la secuencia expuesta en la introducción de la solicitud, más preferentemente una identidad de secuencia de al menos el 66% y aún más preferentemente una identidad de secuencia de al menos el 69%.

**[0017]** "Identidad de secuencia de aminoácidos del tanto por ciento (%)" con respecto a las secuencias del polipéptido GLP-2 se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia GLP-2 de tipo natural, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento de las secuencias se puede llevar a cabo por personas expertas usando técnicas muy conocidas en la materia, por ejemplo, usando programa informático disponible para el público tal como el programa informático BLAST, BLAST2 o Align, véase:

55 Altschul y col. (Methods in Enzymology, 266:480-480 (1996); <http://blast.wustl/edu/blast/README.html>) o Pearson y col. (Genomics, 46, 24, 36, 1997) y <http://molbiol.soton.ac.uk/compute/align.html> para el programa Align.

60 El porcentaje de identidad de secuencia usado en el presente documento y según la presente invención se determina usando estos programas informáticos con sus ajustes por defecto. De manera más general, la persona experta puede determinar fácilmente parámetros apropiados para determinar el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo alineamiento a lo largo de la longitud completa de las secuencias a comparar.

65 **[0018]** El análogo del GLP-2 puede comprender uno de los siguientes grupos de sustituciones con respecto a la secuencia del GLP-2 de tipo natural:

Ala16  
Ala24  
Ala28  
Ala24

5 Ala16, Ala28  
Ala24, Ala28  
Ala16, Ala24, Ala28.

10 **[0019]** El análogo del GLP-2 puede comprender uno de los siguientes grupos de sustituciones con respecto a la secuencia del GLP-2 de tipo natural:

Glu3, Thr5, Leu10, Lys11, Ala16, 24, 28  
Glu3, Thr5, Ser11, Leu10, Ala16, 24, 28  
Glu3, Ser11, Leu10, Ala16, 24, 28  
Glu3, Thr5, Leu10, Ala11, 16, 24, 28

15 Glu3, Leu10, Ala11, 16, 24, 28  
Thr7, Leu10, Ser11, Ala24  
Thr7, Leu10, Ala11, 24  
Thr7, Leu10, Lys11, Ala24  
Leu10, Ala11, 24

20 Leu10, Ser11, Ala24; o  
una eliminación en una o más posiciones X31-X33.

**[0020]** El análogo del GLP-2 puede comprender una sustitución con respecto al GLP-2 de tipo natural en las posiciones X3 y/o X24.

25 **[0021]** Ejemplos del análogo del GLP-2 incluyen:

1818 H-HGOGSFSSSELATILONLAARDFIAWLIQTKKKKKKK-NH<sub>2</sub>;  
1820 H-HGDGSFTSELATILDNLAARDFIAWLIQTKKKKKKK-NH<sub>2</sub>;  
1823 H-HGDGSFTSELKTILDNLAARDFIAWLIQTKKKKKKK-NH<sub>2</sub>;  
30 1825 H-HGDGSFSSSELATILDNLAARDFIAWLIQTK-NH<sub>2</sub>;  
1828 H-HGDGSFTSELSTILDNLAARDFIAWLIQTKKKKKKK-NH<sub>2</sub>;  
1829 H-HGDGSFSSSELSTILDNLAARDFIAWLIQTKKKKKKK-NH<sub>2</sub>;  
1832 H-HGDGSFTSELSTILDNLAARDFIAWLIQTK-NH<sub>2</sub>;  
1833 H-HGDGSFSSSELSTILDNLAARDFIAWLIQTK-NH<sub>2</sub>;  
35 1834 H-HGDGSFTSELATILDNLAARDFIAWLIQTK-NH<sub>2</sub>;  
1842 H-HGDGSFTSELKTILDNLAARDFIAWLIQTK-NH<sub>2</sub>;  
1844 H-HGEGTFSSSELSTILDALAARDFIAWLIATKITDKKKKK-NH<sub>2</sub>;  
1846 H-HGEGSFSSSELSTILDALAARDFIAWLIATKITDKKKKK-NH<sub>2</sub>;  
1848 H-HGEGTFSSSELATILDALAARDFIAWLIATKITDKKKKK-NH<sub>2</sub>;  
40 1849 H-HGEGSFSSSELATILDALAARDFIAWLIATKITDKKKKK-NH<sub>2</sub>;  
1852 H-HGEGTFSSSELKTILDALAARDFIAWLIATKITDKKKKK-NH<sub>2</sub>;  
1853 H-HGEGTFSSSELSTILDALAARDFIAWLIATKITD-NH<sub>2</sub>;  
1855 H-HGEGSFSSSELSTILDALAARDFIAWLIATKITD-NH<sub>2</sub>;  
1857 H-HGEGTFSSSELATILDALAARDFIAWLIATKITD-NH<sub>2</sub>;  
45 1858 H-HGEGSFSSSELATILDALAARDFIAWLIATKITD-NH<sub>2</sub>;  
1861 H-HGEGTFSSSELKTILDALAARDFIAWUATKITD-NH<sub>2</sub>;

y sus sales farmacéuticamente aceptables.

50 **[0022]** Además de proporcionar análogos del GLP-2 que pueden tener una estabilidad química y una actividad biológica mejoradas, ciertos compuestos descritos en el presente documento tienen una actividad que estimula el crecimiento preferencial en el intestino delgado respecto al colon. En particular, los experimentos descritos en el presente documento demuestran que la sustitución en las posiciones Asp3 y/o Ser 8 y/o Asn16 y/o Gln28 del GLP-2 de tipo natural proporcionan un incremento preferente del peso del intestino delgado cuando se administran a animales de prueba respecto al incremento de masa del colon. Estos hallazgos significan que los  
55 compuestos ejemplificados pueden ser útiles para el tratamiento de dolencias en las que es ventajoso tener un efecto que promueva un crecimiento incrementado en el intestino delgado, mientras tiene un menor efecto sobre el colon.

60 **[0023]** Dichos compuestos selectivos del intestino delgado pueden comprender sustituciones en más de una de las posiciones X3, X7, X16, X24 y X28. Así, los compuestos selectivos del intestino delgado pueden comprender más de una de las sustituciones en las que X3 es Glu, X7 es Ser, X16 es Ala, X24 es Ala y X28 es Ala. Los restos de aminoácidos en las posiciones X31, X32 y X33 pueden estar opcionalmente eliminados.

65 **[0024]** Ejemplos de compuestos de la invención que estimulan preferentemente el crecimiento epitelial en el intestino delgado incluyen 1818, 1820, 1844, 1846, 1848, 1849, 1852, 1853, 1855, 1857, 1858.

- 5 [0025] Los compuestos de la invención también pueden tener una estabilidad química incrementada, por ejemplo, frente a la hidrólisis ácida, la oxidación y la desamidación. Se cree que las sustituciones en la posición X3 pueden mejorar la estabilidad a la hidrólisis ácida. La sustitución en la posición X10 puede mejorar la estabilidad oxidativa. La sustitución en una o más de las posiciones X11, X16 y/o X24 puede incrementar la estabilidad frente a la desamidación. El análogo del GLP-2 de la invención por tanto puede presentar una estabilidad mejorada frente a la degradación en disolución ácida, frente a la desamidación, y/o frente a la degradación oxidativa, en relación al Gly2-GLP-2.
- 10 [0026] Preferentemente, el análogo del GLP-2 mantiene una pureza observada de al menos el 70% en relación a la pureza inicial en al menos una de las pruebas de degradación descritas en el Ejemplo 7 a continuación. Adicional o alternativamente, puede mantener una pureza observada de al menos el 60% en relación a la pureza inicial de una disolución de HCl 0,1 M después de 12 días. Adicional o alternativamente, puede mantener una pureza observada de al menos el 70% en relación a la pureza inicial en una disolución de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0,1 M después de 6 días.
- 15 [0027] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición que comprende un análogo del GLP-2 como se define en el presente documento, o una de sus sales o derivados, en mezcla con un vehículo. En formas de realización preferidas, la composición es una composición farmacéuticamente aceptable y el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable. El análogo del péptido GLP-2 puede ser una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del análogo del GLP-2.
- 20 [0028] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un análogo del GLP-2 como se define en el presente documento, o una de sus sales, para su uso en terapia.
- 25 [0029] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de un análogo del GLP-2, o una de sus sales o derivados para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de trastornos relacionados con el estómago y el intestino, como el tratamiento de neonatos con la función intestinal comprometida, osteoporosis, y dolencias mediadas por la DPP-IV (dipeptidilpeptidasa-IV). A modo de ejemplo, los trastornos relacionados con el estómago y el intestino incluyen úlceras, gastritis, trastornos digestivos, síndromes de malabsorción, síndrome del intestino corto, síndrome del fondo de saco, enfermedad inflamatoria del intestino, esprúe celíaco (por ejemplo, derivados de la enteropatía inducida por gluten o enfermedad celíaca), esprúe tropical, esprúe hipogammaglobulinémico, enteritis, enteritis regional (enfermedad de Crohn), colitis ulcerosa, síndrome del intestino irritable asociado a diarrea, daño del intestino delgado y síndrome del intestino corto.
- 30 [0030] Otras dolencias que se pueden tratar con los análogos del GLP-2 de la invención, o para las cuales los análogos del GLP-2 pueden ser profiláctica o terapéuticamente útiles, incluyen enteritis por radiación, enteritis infecciosa o post-infecciosa, y daño del intestino delgado debido a agentes tóxicos u otros agentes quimioterapéuticos. Esto puede requerir la administración del análogo del GLP-2 antes de, simultáneamente con o después de un ciclo de quimioterapia o radioterapia con el fin de reducir los efectos secundarios de la quimioterapia, como diarrea, calambres abdominales y vómitos, y reducir el daño estructural y funcional consecuente del epitelio intestinal como resultado de la quimioterapia o la radioterapia.
- 35 [0031] Por tanto, la invención también proporciona un kit terapéutico que comprende un fármaco quimioterapéutico para el cáncer y un análogo del GLP-2 de la presente invención, cada uno opcionalmente en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los dos agentes terapéuticos pueden estar empaquetados por separado (por ejemplo, en viales aparte) para su administración separada, o se pueden suministrar en la misma composición. Así, la invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un fármaco quimioterapéutico para el cáncer y un análogo del GLP-2 de la presente invención en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 40 [0032] En pacientes con neoplasia de la mucosa gastrointestinal, o un riesgo incrementado de neoplasia de la mucosa gastrointestinal, puede ser deseable seleccionar un compuesto para así reducir o eliminar el riesgo de los efectos secundarios reducidos como la estimulación o el agravamiento de la neoplasia de la mucosa gastrointestinal. Por ejemplo, cuando se selecciona un compuesto para el tratamiento de un paciente con neoplasia de colon (ya sea benigna o maligna), o con riesgo de desarrollar neoplasia de colon, puede ser más apropiado seleccionar un compuesto que sea selectivo para el intestino delgado sobre el color que un compuesto no selectivo o un compuesto que sea selectivo para el colon sobre el intestino delgado.
- 45 [0033] En otros aspectos, la presente invención proporciona el uso de los análogos del GLP-2 para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de la desnutrición, por ejemplo, dolencias como el síndrome de desgaste, caquexia y anorexia.
- 50 [0034] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un análogo del GLP-2 como se define en el presente documento.
- 55
- 60
- 65

**[0035]** En aspectos adicionales, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende la secuencia de ácido nucleico anterior, opcionalmente en combinación con secuencias para dirigir su expresión, y células hospedadoras transformadas con los vectores de expresión. Preferentemente, las células hospedadoras son capaces de expresar y secretar el análogo del GLP-2. En otro aspecto más, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción del análogo del GLP-2, el procedimiento que comprende el cultivo de las células hospedadoras en condiciones adecuadas para la expresión del análogo del GLP-2 y la purificación del análogo del GLP-2 producido de esta forma.

**[0036]** La invención proporciona además un ácido nucleico de la invención, un vector de expresión de la invención, o una célula hospedadora capaz de expresar y secretar un análogo del GLP-2 de la invención, para su uso en terapia. Se entenderá que el ácido nucleico, el vector de expresión y las células hospedadoras se pueden usar para el tratamiento de cualquiera de los trastornos descritos en el presente documento que se pueden tratar con los propios análogos del GLP-2. Por tanto, las referencias a una composición terapéutica que comprende un análogo del GLP-2 de la invención, o a la administración de un análogo del GLP-2 de la invención, se debe interpretar que engloba la administración de un ácido nucleico, un vector de expresión o una célula hospedadora de la invención, excepto donde el contexto requiera otra cosa.

**[0037]** En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para el tratamiento de un trastorno relacionado con el estómago y el intestino en un paciente que lo necesite mediante la administración de una cantidad eficaz de un análogo del GLP-2 como se define en el presente documento, o una de sus sales o derivados, o un ácido nucleico, un vector de expresión o una célula hospedadora de la invención. Ejemplos de trastornos relacionados con el estómago y el intestino se han proporcionado más arriba.

**[0038]** En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para el tratamiento o prevención de un efecto secundario de la quimioterapia o radioterapia en un paciente que lo necesite, el procedimiento que comprende la administración de una cantidad eficaz de un análogo del GLP-2 como se define en el presente documento, o una de sus sales o derivados, o un ácido nucleico, un vector de expresión o una célula hospedadora de la invención.

**[0039]** En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para el tratamiento o prevención de la desnutrición, por ejemplo, dolencias como el síndrome de desgaste, la caquexia y la anorexia, en un paciente que lo necesite, el procedimiento que comprende la administración de una cantidad eficaz de un análogo del GLP-2 como se define en el presente documento, o una de sus sales o derivados, o un ácido nucleico, un vector de expresión o una célula hospedadora de la invención.

**[0040]** Las formas de realización de la presente invención se describirán ahora con más detalle a modo de ejemplo y no de limitación en referencia a las Figuras acompañantes.

### **Descripción de las Figuras**

**[0041]**

**Figura 1:** Ejemplos de los datos de dosis completa-respuesta de cuatro compuestos selectivos del intestino delgado (compuestos N° 1846, 1855, 1848 y 1858) sobre la masa del intestino delgado (ID) en ratones C57BL. Los compuestos se administraron mediante inyección subcutánea b.i.d. durante tres días con las siguientes dosis: 0 (vehículo), 5, 15, 45, 135, 405 nmol/kg (n = 6/grupo de dosis). Las respuestas a cada nivel se compararon con las respuestas obtenidas en el mismo nivel de dosificación en ratones tratados por pares con un compuesto de referencia no selectivo [Gly2]GLP-2. Para corregir los cambios en el peso corporal (PC), la masa del ID se expresa en relación al PC (relación ID-PC) y la respuesta de crecimiento a cada nivel de dosificación se normalizó a la respuesta observada con el compuesto de referencia no selectivo [Gly2]GLP-2. Los resultados demostraron que en el intervalo de dosificación 5-405 nmol/kg, las relaciones de dosis-respuesta de los compuestos selectivos para el intestino delgado 1846, 1855, 1848 y 1858 fueron significativamente diferentes del compuesto de referencia no selectivo [Gly2]GLP-2 (p < 0,05 en un ANOVA de dos vías) y los cuatro compuestos estimularon el crecimiento del intestino delgado con respuestas máximas que fueron significativamente superiores a las del [Gly2]GLP-2. Los valores son las medidas ± SEM. \*: P < 0,05 con respecto a la dosis equimolar de [Gly2]GLP-2.

**Figura 2:** Ejemplos de datos de dosis completa-respuesta de cuatro compuestos selectivos del intestino delgado (compuestos N° 1846, 1855, 1848 y 1858) sobre el Índice de sensibilidad del intestino delgado (ID) con respecto al colon en ratones en relación con el compuesto de referencia no selectivo [Gly2]GLP-2. Los compuestos se administraron mediante inyección subcutánea b.i.d. durante tres días en ratones C57BL con las siguientes dosis: 0 (vehículo), 5, 15, 45, 135, 405 nmol/kg (n = 6/grupo de dosis). Las respuestas a cada nivel de dosificación se compararon con las respuestas obtenidas en el mismo nivel en ratones tratados por pares con un compuesto de referencia no selectivo [Gly2]GLP-2. El Índice de selectividad del ID-colon se calculó como la masa del ID en relación a la masa del colon y el Índice de sensibilidad a cada nivel de dosificación se normalizó a la respuesta observada con el compuesto de referencia no selectivo [Gly2]GLP-2. Los resultados demostraron que en el intervalo de dosificación 5-405 nmol/kg, las relaciones de dosis-respuesta de los compuestos selectivos para el intestino delgado

1857 y 1820 fueron significativamente diferentes del compuesto de referencia no selectivo [Gly2]GLP-2 ( $p < 0,05$  en un ANOVA de dos vías) y los compuestos 1846, 1855 y 1848 demostraron una sensibilidad máxima del intestino delgado incrementada en relación a [Gly2]GLP-2. Los valores son las medidas  $\pm$  SEM. \*:  $P < 0,05$  con respecto a la dosis equimolar de [Gly2]GLP-2.

5 **Figura 3:** Ejemplos de datos de dosis completa-respuesta de dos compuestos selectivos del intestino delgado (compuestos N° 1857, 1849 y 1820) sobre la masa del intestino delgado (ID) en ratones C57BL. Los compuestos se administraron mediante inyección subcutánea b.i.d. durante tres días con las siguientes dosis: 0 (vehículo), 5, 15, 45, 135, 405 nmol/kg ( $n = 6$ /grupo de dosis). Las respuestas a cada nivel de dosificación se compararon con las respuestas obtenidas en el mismo nivel de dosificación en ratones tratados por pares con un compuesto de referencia no selectivo [Gly2]GLP-2. Para corregir los cambios en el peso corporal (PC), la masa del ID se expresa en relación al PC (relación ID-PC) y la respuesta de crecimiento a cada nivel de dosificación se normalizó a la respuesta observada con el compuesto de referencia no selectivo [Gly2]GLP-2. Los resultados demostraron que en el intervalo de dosificación 5-405 nmol/kg, las relaciones de dosis-respuesta de los compuestos selectivos para el intestino delgado 1857, 1849 y 1820 fueron significativamente diferentes del compuesto de referencia no selectivo [Gly2]GLP-2 ( $p < 0,05$  en un ANOVA de dos vías) y ambos compuestos estimularon el crecimiento del intestino delgado con respuestas máximas que fueron significativamente superiores a las del [Gly2]GLP-2. Los valores son las medidas  $\pm$  SEM. \*:  $P < 0,05$  con respecto a la dosis equimolar de [Gly2]GLP-2.

20 **Figura 4:** Ejemplos de datos de dosis completa-respuesta de tres compuestos selectivos del intestino delgado (compuestos N° 1857, 1820 y 1849) sobre el Índice de sensibilidad del intestino delgado (ID) con respecto al colon en ratones en relación con el compuesto de referencia no selectivo [Gly2]GLP-2. Los compuestos se administraron mediante inyección subcutánea b.i.d. durante tres días en ratones C57BL con las siguientes dosis: 0 (vehículo), 5, 15, 45, 135, 405 nmol/kg ( $n = 6$ /grupo de dosis). Las respuestas a cada nivel de dosificación se compararon con las respuestas obtenidas en el mismo nivel de dosificación en ratones tratados por pares con un compuesto de referencia no selectivo [Gly2]GLP-2. El Índice de selectividad del ID-colon se calculó como la masa del ID en relación a la masa del colon y el Índice de sensibilidad a cada nivel de dosificación se normalizó a la respuesta observada con el compuesto de referencia no selectivo [Gly2]GLP-2. Los resultados demostraron que en el intervalo de dosificación 5-405 nmol/kg, las relaciones de dosis-respuesta de los compuestos selectivos para el intestino delgado 1857, 1820 y 1849 fueron significativamente diferentes del compuesto de referencia no selectivo [Gly2]GLP-2 ( $p < 0,05$  en un ANOVA de dos vías) y los tres compuestos demostraron una sensibilidad máxima del intestino delgado incrementada en relación a [Gly2]GLP-2. Los valores son las medidas  $\pm$  SEM. \*:  $P < 0,05$  con respecto a la dosis equimolar de [Gly2]GLP-2.

35 **Figura 5:** Ejemplos de datos de dosis completa-respuesta de un compuesto no selectivo ([Gly2]GLP-2), y un compuesto selectivo para el intestino delgado (compuesto 1848), sobre la masa del intestino delgado, el colon y el estómago. Los compuestos se administraron mediante inyección subcutánea b.i.d. durante tres días en ratones C57BL con las siguientes dosis: 0 (vehículo), 5, 15, 45, 135, 405 nmol/kg ( $n = 6$ /grupo de dosis). Los resultados demostraron que en el intervalo de dosificación 5-405 nmol/kg, el [Gly2]GLP-2 produjo una estimulación del crecimiento que depende de la dosis en el intestino delgado, el colon y el estómago, mientras que el compuesto 1848 sólo produjo una estimulación del crecimiento dependiente de la dosis en el intestino delgado. Los valores son las medidas  $\pm$  SEM. \*:  $P < 0,05$  en relación al vehículo.

45 **Figura 6:** El ejemplo muestra el efecto del compuesto 1846 (5, 15, 45, 135, 405 y 810 nmol/kg, sc, b.i.d.,  $n = 6$ /grupo de dosis) sobre A) la relación del intestino delgado al peso corporal (ID-PC), y B) la longitud del intestino delgado (longitud del ID) en los ratones tratados con el fármaco citostático 5-fluorouracilo (5-FU). El compuesto 1846 se administró los 3 días previos y durante 4 días, junto con el 5-FU, 50 mg/kg ip, todos los días. Como referencia, el [Gly2]GLP-2 (405 nmol/kg) se administró a un grupo de animales. También se muestran los resultados de los animales control tratados con el vehículo (PBS) o el 5-FU solo. El compuesto 1846 impidió la atrofia del intestino delgado inducida por 5-FU (masa reducida de los tejidos y acortamiento) en ratones C57BL. Los valores son las medidas  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$ , en comparación con el 5-FU.

55 **Figura 7:** El ejemplo muestra el efecto del compuesto 1848 (5, 15, 45, 135, 405 y 810 nmol/kg, sc, b.i.d.,  $n = 6$ /grupo de dosis) sobre A) la relación del intestino delgado al peso corporal (ID-PC), y B) la longitud del intestino delgado (longitud del ID) en los ratones tratados con el fármaco citostático 5-fluorouracilo (5-FU). El compuesto 1848 se administró los 3 días previos y durante 4 días, junto con el 5-FU, 50 mg/kg ip, todos los días. Como referencia, el [Gly2]GLP-2 (405 nmol/kg) se administró a un grupo de animales. También se muestran los resultados de los animales control tratados con el vehículo (PBS) o el 5-FU solo. El compuesto 1848 impidió la atrofia del intestino delgado inducida por 5-FU (masa reducida de los tejidos y acortamiento) en ratones C57BL y altas dosis del compuesto 1848 fueron más eficaces que el [Gly2]GLP-2. Los valores son las medidas  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$ , en comparación con el 5-FU. #  $P < 0,05$ , en comparación con el [Gly2]GLP-2.

65 **Figura 8:** El ejemplo muestra el efecto del compuesto 1855 (5, 15, 45, 135, y 405 nmol/kg, sc, b.i.d.,  $n = 6$ /grupo de dosis) sobre A) la relación del intestino delgado al peso corporal (ID-PC), y B) la longitud del intestino delgado (longitud del ID) en ratones tratados con el fármaco citostático 5-fluorouracilo (5-FU). El compuesto 1855 se administró los 3 días previos y durante 4 días, junto con el 5-FU, 50 mg/kg ip, todos los días. Como referencia, el

[Gly2]GLP-2 (405 nmol/kg) se administró a un grupo de animales. También se muestran los resultados de los animales control tratados con el vehículo (PBS) o el 5-FU solo. El compuesto 1855 impidió la atrofia del intestino delgado inducida por 5-FU (masa reducida de los tejidos y acortamiento) en ratones C57BL y la dosis más alta del compuesto 1855 fue más eficaz que la dosis equimolar de [Gly2]GLP-2. Los valores son las medidas  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$ , en comparación con el 5-FU. #  $P < 0,05$ , en comparación con el [Gly2]GLP-2.

**Figura 9:** El ejemplo muestra el efecto del compuesto 1857 (5, 15, 45, 135, y 405 nmol/kg, sc, b.i.d., n = 6/grupo de dosis) sobre A) la relación del intestino delgado al peso corporal (ID-PC), y B) la longitud del intestino delgado (longitud del ID) en los ratones tratados con el fármaco citostático 5-fluorouracilo (5-FU). El compuesto 1857 se administró los 3 días previos y durante 4 días, junto con el 5-FU, 50 mg/kg, ip todos los días. Como referencia, el [Gly2]GLP-2 (405 nmol/kg) se administró a un grupo de animales. También se muestran los resultados de los animales control tratados con el vehículo (PBS) o el 5-FU solo. El compuesto 1857 impidió la atrofia del intestino delgado inducida por 5-FU (masa reducida de los tejidos y acortamiento) en ratones C57BL y la dosis más alta del compuesto 1855 fue más eficaz que una dosis alta de [Gly2]GLP-2. Los valores son las medidas  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$ , en comparación con el 5-FU. #  $P < 0,05$ , en comparación con el [Gly2]GLP-2.

**Figura 10:** El ejemplo muestra los efectos del compuesto 1846 (16, 80 y 400 nmol/kg/d, sc, n = 6/grupo de dosis) en ratas macho Spague-Dawley tratadas con el fármaco citostático 5-fluorouracilo (5-FU). El compuesto 1846 se administró los 3 días previos y durante 4 días, junto con el 5-FU (75 mg/kg, ip al día). Los resultados se compararon con las respuestas en los animales control tratados con el vehículo (solución salina) o el 5-FU solo. También se muestran la solución salina y los controles de 5-FU. El compuesto 1846 impidió la atrofia del intestino delgado inducida por 5-FU (reducción de la masa del intestino delgado y acortamiento intestinal) en ratas. Los valores son las medidas  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$ , en comparación con el 5-FU solo.

**Figura 11:** En este ejemplo se ilustra el efecto terapéutico del compuesto 1846 sobre la diarrea inducida por el tratamiento con el fármaco citostático 5-fluorouracilo (5-FU). Las ratas fueron tratadas con 5-FU durante 4 días con 75 mg/kg una vez al día (días 1-4), (n = 40 ratas). La mitad de los animales recibieron un tratamiento adicional con el compuesto 1846 (400 nmol/kg, sc una vez al día) durante los últimos 3 días previos a (días -3 a -1) y durante los 4 días de tratamiento con el 5-FU (días 0-3). Las ratas se sometieron a observación dos veces al día (mañana y tarde) para determinar si el animal presentaba diarrea y la gravedad de la diarrea se puntuó según esta escala: (0) sin diarrea; (1) leve - manchas fecales alrededor del ano, (2) moderada - manchas fecales en las patas traseras y la cola, y grave (3) - manchas fecales en las extremidades anteriores y el abdomen. El día 5, el 70% aproximadamente de las ratas Sprague Dawley que recibieron el 5-FU solo había desarrollado diarrea (Figura 11A), mientras que sólo el 30% de las ratas que fueron tratadas simultáneamente con el compuesto de 1846 presentaba diarrea (Figura 11B). Estos resultados indican que el compuesto 1846 previene eficazmente las lesiones del intestino delgado y, por tanto, el desarrollo de diarrea durante el tratamiento citostático con el 5-FU.

**Figura 12:** En este ejemplo se ilustra el efecto del compuesto 1846 sobre la altura de las criptas-vellosidades epiteliales (Figura 12A) y el grosor muscular (Figura 12B) en el yeyuno (es decir, la sección media del intestino delgado). Ratas Sprague Dawley fueron tratadas por vía intravenosa con el compuesto 1846 (0,62, 3,41 ó 6,2 mg/kg una vez al día) durante 5 días (n = 6/grupo de dosis). A continuación, los animales fueron sacrificados y se tomaron biopsias del intestino delgado (1 cm) a 25 cm de distancia del esfínter pilórico. Las biopsias se fijaron, se embebieron en parafina, se cortaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las secciones teñidas se examinaron al microscopio y se midió la profundidad de la cripta, la altura de las vellosidades, la longitud de las criptas-vellosidades y el grosor muscular. Como se ilustra, el compuesto 1846 produjo un aumento en la longitud de la cripta-vellosidad en el epitelio intestinal del yeyuno que depende de la dosis, pero no tuvo ningún efecto sobre el grosor muscular del yeyuno. Estos resultados sugieren que el compuesto 1846 ejerce principalmente su acción proliferativa en el intestino delgado a través de la estimulación del crecimiento del epitelio del intestino delgado. Los valores son las medidas  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$ , en comparación con los controles del vehículo (0 mg/kg/d).

**Figura 13:** En este ejemplo se ilustra el efecto del compuesto 1848 en úlceras del intestino delgado inducidas por indometacina. Ratas Sprague Dawley fueron tratadas con el vehículo (solución salina; grupo 1) o indometacina (7 mg/kg sc, una vez al día durante dos días, grupos 2-7). La indometacina se administra sola (grupo 2) o en combinación con prednisolona (10 mg/kg sc, grupo 3) o con 8, 40 ó 200 nmol/kg del compuesto 1848 sc una vez al día (grupos 4-6). Por último, un grupo de ratas se trató con un tratamiento de combinación de prednisolona (10 mg/kg sc) y el compuesto 1848, a 200 nmol/kg sc una vez al día (grupo 7). El tratamiento con el compuesto 1848 se inició 4 días antes de la indometacina y continuó durante los dos días de tratamiento con indometacina. El día 3, las ratas fueron sacrificadas y tras la necropsia, el intestino delgado se lavó con cuidado con formol al 10% y se rellenó de formol durante un período de 5 minutos, tras lo cual el intestino se cortó abriéndolo a lo largo del borde antimesentérico y se suspendió sobre una placa de polipropileno. Cualquier resto del contenido del intestino se retiró con cuidado con un par de pinzas. Después de fijarlo durante otras 24 horas a temperatura ambiente, el tejido se enjuagó con agua Milli-Q y se tiñó su superficie durante 20 minutos con verde Alcian 3BX (Chroma), preparado como una disolución al 0,5% en ácido acético al 1% (Bie & Berntsen). Después de la eliminación del exceso de la disolución colorante con agua Milli-Q de la preparación del tejido se transfirió a alcohol al 70% y se analizó con un microscopio estereoscópico a bajo aumento (x7). Comenzando en el píloro, se escaneó el intestino delgado y se midió la forma (circular frente a lineal) y el tamaño (úlceras circulares: diámetro, úlceras lineales: largo x ancho) de

5 todas las úlceras con una regla estándar (resolución: 0,5 mm). Una úlcera se define como una zona que carece de la superficie epitelial. En la cicatrización de las úlceras sólo la zona que aún carecía de la superficie epitelial se consideró una úlcera, incluso si la estructura de las vellosidades aún no aparecía en una zona mayor. Todos los análisis se realizaron de forma ciega. Como se ilustra en la Figura 13, la indometacina causó una fuerte inducción de pequeñas úlceras intestinales (ulceración total del intestino delgado =  $333 \pm 21 \text{ mm}^2$ ). El tratamiento con prednisolona causó una reducción significativa del grado de ulceración en un 29% aproximadamente. El tratamiento con el compuesto de 1848 impidió la ulceración inducida por indometacina de una forma dependiente de la dosis y a la dosis más alta la ulceración total se redujo en casi un 50% ( $178 \pm 17 \text{ mm}^2$ ). Esta respuesta máxima al compuesto 1846 fue mayor que el efecto de la prednisolona y la adición de prednisolona en combinación con una dosis elevada del compuesto 1848 no produjo ningún efecto adicional. Estos resultados indican que el compuesto 1848 previene con eficacia la ulceración inducida por indometacina en el intestino delgado. Los valores son las medias  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$  frente a indometacina (grupo 2). #  $P < 0,05$  frente a prednisolona (grupo 3).

15 **Figura 14:** En este ejemplo se ilustra el efecto del compuesto 1848 sobre el contenido de TNF-alfa del intestino delgado en ratas con inflamación inducida por indometacina en el intestino delgado. Ratas Sprague Dawley fueron tratadas con el vehículo (solución salina; grupo 1) o indometacina (7 mg/kg sc, una vez al día durante dos días, grupos de 2-7). La indometacina se administró sola (grupo 2) o en combinación con prednisolona (10 mg/kg sc; grupo 3) o con 8, 40 ó 200 nmol/kg del compuesto 1848 sc una vez al día (grupos 4-6). Por último, un grupo de ratas fue tratado con terapia de combinación de prednisolona (10 mg/kg sc) y el compuesto 1848, a 200 nmol/kg sc una vez al día (grupo 7). El tratamiento con el compuesto 1848 se inició cuatro días antes de la indometacina y continuó durante los dos días de tratamiento con indometacina. El día 3, las ratas fueron sacrificadas y después de la necropsia, el intestino delgado se dividió en tres segmentos de igual longitud que corresponden a 1) duodeno y yeyuno proximal, 2) yeyuno medio y distal, y 3) íleon. Las muestras se congelaron inmediata e instantáneamente en  $\text{N}_2$  líquido y se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su análisis. La homogeneización y extracción de las proteínas celulares de los segmentos del intestino delgado se realizó según el siguiente procedimiento: Los segmentos de tejido se pesaron y se añadió un volumen de 1,5 ml por gramo de tejido de tampón de extracción enfriado en hielo ( $4^\circ\text{C}$ ) (Tris-HCl 10 mM (Sigma) y EDTA 1 mM (JT Baker), (pH 7,6) con azida sódica al 0,05% (Fluka), 1% de Tween-80 (Fluka), fluoruro de fenilmetilsulfonilo 2 mM (PMSF, Fluka) y 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de cada uno de los inhibidores de la proteasa aprotinina, leupeptina y pepstatina A (Roche Diagnostics)). El tejido se cortó en trozos pequeños con un par de tijeras y se homogeneizó tres veces durante 20 segundos (homogeneizador IKA Ultraturrax T25, Janke & Kunkel) a 9500 rpm con refrigeración intermitente en hielo durante 30 segundos. El homogeneizado se centrifugó a  $20.000\times$  durante 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , el sobrenadante se recogió y se almacenó a  $20^\circ\text{C}$  hasta su análisis para el TNF- $\alpha$ . Se analizaron las extracciones de proteínas del intestino delgado para el TNF- $\alpha$  usando un kit de ELISA disponible en el mercado siguiendo las instrucciones del fabricante (kit ultrasensible de ELISA para el Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  de rata, Biosource International Inc.). El ensayo tiene un límite de detección de 0,7 pg/ml. Las extracciones de proteínas se analizaron para el contenido de proteína total mediante un ensayo comercial (ensayo de proteínas DC, Bio-Rad Laboratories Ltd.). Los niveles tisulares del TNF- $\alpha$  en el intestino delgado se expresan en relación a la proteína total. El compuesto 1848 disminuyó significativamente los niveles tisulares de la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$  en el intestino delgado y este efecto fue más marcado en el segmento proximal (primer tercio del intestino delgado). El compuesto 1848 fue más eficaz que la prednisolona en los segmentos proximal y medio (segundo tercio del intestino delgado). Curiosamente, el compuesto de 1848 suprime la inflamación en el intestino delgado de manera más eficaz que la prednisolona y la prednisolona no tuvo un efecto aditivo cuando se administra en combinación con el compuesto 1848. Estos resultados sugieren que el compuesto 1848 tiene un marcado potencial anti-inflamatorio en procesos patológicos que afectan al intestino delgado. Los valores son las medias  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$  frente a indometacina (grupo 2).

### **Descripción detallada de la invención**

#### **Definiciones**

- 50 [0042] A menos que se especifique otra cosa, se dan las siguientes definiciones para términos específicos, que se usan en la memoria descriptiva escrita anterior.
- 55 [0043] A lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones se usan los códigos convencionales de una letra y tres letras para los aminoácidos naturales, así como los códigos de tres letras aceptados de manera general para otros  $\alpha$ -aminoácidos, tales como sarcosina (Sar), norleucina (Nle) y ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico (Aib). Todos los restos de aminoácidos en los péptidos de la invención preferentemente están en configuración L. No obstante, también puede haber presentes aminoácidos en configuración D.
- 60 [0044] Los compuestos preferidos de la presente invención tienen al menos una de las actividades biológicas del GLP-2, en particular la que genera el crecimiento del intestino. Esto se puede valorar en ensayos *in vivo*, por ejemplo, como se describe en los ejemplos, en los que se determina la masa del intestino, o de una de sus partes después de que un animal de prueba se haya tratado o se haya expuesto a un análogo del GLP-2.
- 65 [0045] Los análogos del GLP-2 de la presente invención tienen una o más sustituciones, eliminaciones, inversiones, o adiciones de aminoácidos comparados con el GLP-2 nativo y como se ha definido anteriormente. Esta

definición también incluye los términos sinónimos miméticos del GLP-2 y/o agonistas del GLP-2. Además, el análogo de la presente invención adicionalmente puede presentar la modificación química de una o más de las cadenas laterales de sus aminoácidos, átomos de carbono  $\alpha$ , grupo amino terminal, o grupo ácido carboxílico terminal. Una modificación química incluye, pero no está limitada a, la adición de restos químicos, la creación de nuevos enlaces, y la eliminación de restos químicos. Las modificaciones en las cadenas laterales de los aminoácidos incluyen, sin limitación, la acilación de los grupos  $\epsilon$ -amino de la lisina, la N-alquilación de la arginina, histidina, o lisina, la alquilación de los grupos carboxílicos del ácido glutámico y aspártico, y la desaminación de la glutamina o asparagina. Las modificaciones del amino terminal incluyen, sin limitación, las modificaciones des-amino, N-alquilo inferior, N-di-alquilo inferior, y N-acilo. Las modificaciones del grupo carboxi terminal incluyen, sin limitación, las modificaciones amida, alquilamida inferior, dialquilamida, y modificaciones éster de alquilo inferior. Preferentemente, en el presente documento el alquilo inferior es alquilo  $C_{1-4}$ . Por otra parte, se pueden proteger una o más cadenas laterales, o grupos terminales, mediante grupos protectores conocidos por el químico experto en péptidos. El carbono  $\alpha$  de un aminoácido puede estar monometilado o dimetilado.

**[0046]** Cuando están presentes, aminoácidos sustitutos de la Met oxidativamente estables significa uno que se selecciona del grupo constituido por Met(O) (sulfóxido de metionina), Met(O)<sub>2</sub> (metioninsulfona), Val, Ile, Asn, Glx (Glu o Gln), Tyr, Phe, Trp y preferentemente Leu, Nle, Ala, Ser, y Gly.

**[0047]** Se debe entender que los péptidos de la invención también se pueden proporcionar en forma de sal. Las sales incluyen sales farmacéuticamente aceptables como sales de adición ácida y sales básicas. Ejemplos de sales de adición ácida incluyen sales de clorhidrato, sales de citrato y sales de acetato. Ejemplos de sales básicas incluyen sales en las que el catión se selecciona entre metales alcalinos, como sodio y potasio, metales alcalinotérreos, como calcio, e iones de amonio  $^+N(R^3)_3(R^4)$ , donde  $R^3$  y  $R^4$  designan independientemente alquilo  $C_{1-6}$  opcionalmente sustituido, alqueno  $C_{2-6}$  opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, o heteroarilo opcionalmente sustituido. Otros ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 17ª edición. Ed. Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, EE.UU., 1985 y ediciones más recientes, y en la Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology.

**[0048]** Otros derivados de los análogos del GLP-2 de la invención incluyen complejos de coordinación con iones metálicos como  $Mn^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ , ésteres como los ésteres hidrolizables *in vivo*, ácidos o bases libres, hidratos, profármacos o lípidos. Los ésteres se pueden formar entre grupos hidroxilo o ácidos carboxílicos presentes en el compuesto y un par de reacción ácido carboxílico o alcohol apropiado, usando técnicas muy conocidas en la materia. Derivados que, como los profármacos de los compuestos se pueden convertir *in vivo* o *in vitro*, en uno de los compuestos parentales. Normalmente, al menos una de las actividades biológicas del compuesto estará reducida en el profármaco del compuesto, y se puede activar con la conversión del profármaco para liberar el compuesto o uno de sus metabolitos. Ejemplos de profármacos incluyen el uso de grupos protectores que se pueden retirar *in situ* liberando el compuesto activo o sirven para inhibir el aclaramiento del fármaco *in vivo*.

**[0049]** Cuando están presentes,  $Z^1$  y  $Z^2$  cada uno representa independientemente una secuencia de péptidos de 3-20 restos de aminoácidos, por ejemplo, en el intervalo de 4-15, más preferentemente en el intervalo de 4-10, en particular en el intervalo de 4-7 restos de aminoácidos, por ejemplo, de 4, 5, 6 ó 7 restos de aminoácidos, tal como 6 restos de aminoácidos. Cada uno de los restos de aminoácidos de las secuencias peptídicas Z se puede seleccionar independientemente entre Ala, Leu, Ser, Thr, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Met, Orn. Preferentemente, los restos de aminoácidos se seleccionan entre Ser, Thr, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Orn, y Met, más preferentemente entre Glu, Lys, y Met, especialmente Lys. Los aminoácidos mencionados anteriormente presentan cualquiera de las dos configuraciones D o L, pero preferentemente los aminoácidos anteriormente mencionados presentan una configuración L. Las secuencias Z particularmente preferidas son secuencias de cuatro, cinco o seis restos de lisina consecutivos, y particularmente de seis restos de lisina consecutivos. Ejemplos de secuencias Z se muestran en el documento WO 01/04156.

**[0050]** En ciertas formas de realización,  $Z^1$  está ausente. En tales casos,  $Z^2$  puede estar presente o ausente.

**[0051]** Los siguientes péptidos se describen en detalle en la sección experimental siguiente. Algunos de éstos son compuestos de la invención. Otros se incluyen con fines ilustrativos.

*Análogo del GLP-2 de referencia*

**[0052]**  
1559 H-(Gly2)hGLP-2-OH  
H-HGDGFSDEMNTILDNI-AARDFINWLIQTKITD-OH

*Ejemplos de análogos del GLP-2 de la presente invención*

**[0053]**  
1809 [Gly2, Glu3, Thr5, Leu10, Ala11, 16, 24, 28]hGLP-2-(Lys)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
HGEGPSDELATILDALAARDFIAWLIATKIDK<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
1810 [Gly2, Glu3, Thr5, Lem10, Ala11, 16, 24, 28, Ile21]hGLP-2(1-30)-(Lys) 8-NH<sub>2</sub>

- HGEGTPSDELATILOALAARIFIAWLIATK<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 1811 [Gly2, Pro6, leu10, Ala 11, 16, 24, 28]hGLP-2-NH<sub>2</sub>  
 HGDGSPSDELATILDALAARDFIAWLIATKITD-NH<sub>2</sub>  
 1812 [Gly2, Glu3, Leu10, Ala11, 24]hGLP-2-NH<sub>2</sub>  
 5 HGEFSFDELATILDNLAARDFIAWLIQTKITD-NH<sub>2</sub>  
 1813 [Gly2, leu10, Ala11, 16, 24, 28]hGLP-2-NH<sub>2</sub>  
 H-HGDGFSDELATILDALAARDFIAWLIATKITD-NH<sub>2</sub>  
 1814 [Gly2, Leu10, Ala11, 24, 28]hGLP-2-NH<sub>2</sub>  
 H-HGOGSFSOELATILONLAARDFIAWLIATKITD-NH<sub>2</sub>  
 10 1815 [Gly2, Glu3, Leu10, Ala11, 16, 24, 28]hGLP-2-NH<sub>2</sub>  
 H-HGEFSFDELATILDALAARDFIAWLIATKITD-NH<sub>2</sub>  
 1818 [Gly2, Ser8, leu10, Ala11,2A]hGLP-2(1-30)-K<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 H-HGDGFSSELATILDNLAARDFIAWLIQTK<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 15 1819 [Gly2, Leu10, Ser11, Ala24]hGLP-2(1-30)-K<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 H-HGDGFSDELSTILDNLAARDFIAWLIQTK<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 1820 [Gly2, Thr7, Ser8, Leu10, Ala11, 24]hGLP-2(1-30)-K<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 H-HGDGSFTSELATILDNLAARDFIAWLIQTK<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 1821 [Gly2, Leu10, Lys11, Ala24]hGLP-2(1-30)-K<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 H-HGDGFSDELKTILDNLAARDFIAWLIQTK<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 20 1822 [Gly2, Thr7, Leu10, Lys11, Ala24]hGLP-2(1-30)-K<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 H-HGDGSFTDELKTILDNLAARDFIAWLIQTK<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 1823 [Gly2, Thr7, Ser8, Leu10, Lys11, Ala24]hGLP-2(1-30)-K<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 H-HGDGSFTSELKTILDNLAARDFIAWLIQTK<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 25 1824 [Gly2, Thr7, Leu10, Ala11, 24]hGLP-2(1-30)-K<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 H-HGDGSFTDELATILDNLAARDFIAWLIQTK<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 1825 [Gly2, Ser8, Leu10, Ala11, 24]hGLP-2(1-30)-NH<sub>2</sub>  
 H-HGDGFSSELATILDNLAARDFIAWLIQTK-NH<sub>2</sub>  
 1826 [Gly2, Leu10, Ala24]hGLP-2-K<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 H-HGDGFSDELNTILDNLAARDFIAWLIQTKITDK<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 30 1827 [Gly2, Thr7, Leu10, Ser11, Ala24]hGLP-2(1-30)-K<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 H-HGDGSFTDELSTILDNLAARDFIAWLIQTIC<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 1828 [Gly2, Thr7, Leu10, Ser8,11, Ala24]hGLP-2(1-30)-K<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 H-HGDGSFTSELSTILDNLAARDFIAWLIQTK<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 1829 [Gly2, Leu10, Ser8,11, Ala24]hGLP-2(1-30)-K<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 35 H-HGDGFSSELSTILDNLAARDFIAWLIQTK<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 1830 [Gly2, Leu10, Ser11, Ala24]hGLP-2(1-30)-NH<sub>2</sub>  
 H-HGDGFSDELSTILDNLAARDFIAWLIQTK-NH<sub>2</sub>  
 1831 [Gly2, Thr7, Leu10, Ser11, Ala24]hGLP-2(1-30)-NH<sub>2</sub>  
 H-HGDGSFTDELSTILDNLAARDFIAWLIQTK-NH<sub>2</sub>  
 40 1832 [Gly2, Thr7, Leu10, Ser8,11, Ala24]hGLP-2(1-30)-NH<sub>2</sub>  
 H-HGDGSFTSELSTILDNLAARDFIAWLIQTK-NH<sub>2</sub>  
 1833 [Gly2, Leu10, Ser8,11, Ala24]hGLP-2(1-30)-NH<sub>2</sub>  
 H-HGDGFSSELSTILDNLAARDFIAWLIQTK-NH<sub>2</sub>  
 45 1834 [Gly2, Thr7, Ser8, Leu10, Ala11, 24]hGLP-2(1-30)-NH<sub>2</sub>  
 H-HGDGSFTSELATILDNLAARDFIAWLIQTK-NH<sub>2</sub>  
 1835 [Gly2, Leu10, Lys11, Ala24]hGLP-2(1-30)-NH<sub>2</sub>  
 H-HGDGFSDELKTILDNLAARDFIAWLIQTK-NH<sub>2</sub>  
 1836 [Gly2, Thr7, Leu10, Lys11, Ala24]hGLP-2(1-30)-NH<sub>2</sub>  
 H-HGDGSFTDELKTILDNLAARDFIAWLIQTK-NH<sub>2</sub>  
 50 1839 [Leu10, Ala11, Ala24]hGLP-2(1-33)-K<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 H-HGDGFSDELATILDNLAARDFIAWLIQTKITDK<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 1840 [Leu10, Ala11, Ala24]hGLP-2(1-33)-NH<sub>2</sub>  
 H-HGDGFSDELATILDNLAARDFIAWLIQTKITD-NH<sub>2</sub>  
 1841 [Leu10, Ala11, Ala24]hGLP-2(1-30)-NH<sub>2</sub>  
 55 H-HGDGFSDELATILDNLAARDFIAWLIQTK-NH<sub>2</sub>  
 1842 [Thr7, Ser8, Leu10, Lys11, Ala24]hGLP-2(1-30)-NH<sub>2</sub>  
 H-HGDGSFTSELKTILDNLAARDFIAWLIQTK-NH<sub>2</sub>  
 1843 [Thr7, Leu10, Ala11, Ala24]hGLP-2(1-30)-NH<sub>2</sub>  
 H-HGDGSFTDELATILDNLAARDFIAWLIQTK-NH<sub>2</sub>  
 60 1844 [Gly2, Glu3, Thr5, Ser8,11, Leu10, Ala16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-(Lys)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 H-HGEGTFSELSTILDALAARDFIAWLIATKITDK<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 1845 [Gly2, Glu3, Thr5, Leu10, Ser11, Ala16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-(Lys)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 H-HGEGTFSELSTILDALAARDFIAWLIATKITDK<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 1846 [Gly2, Glu3, Ser8,11, Leu10, Ala16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-(Lys)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 65 H-HGEFSFSELSTILDALAARDFIAWLIATKITDK<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 1847 [Gly2, Glu3, Leu10, Ser11, Ala16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-(Lys)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>

- H-HGEGSFSELSTILDALAARDFIAWLIATKITDK<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 1848 [Gly2, Glu3, Thr5, Ser8, Leu10, Ala11, 16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-(Lys)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 H-HGEGTFSSSELATILDALAARDFIAWLIATKITDK<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 1849 [Gly2, Glu3, Ser8, Leu10, Ala11, 16, 24, 28]hGLP-2(1-33).(Lys)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 5 H-HGEGSFSSSELATILDALAARDFIAWLIATKITDK<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 1850 [Gly2, Glu3, Leu10, Lys11, Ala16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-(Lys)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 H-HGEGSFSELSTILDALAARDFIAWLIATKITDK<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 1851 [Gly2, Glu3, Thr5, Leu10, Lys11, Ala16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-(Lys)<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 H-HGEGTFSELSTILDALAARDFIAWLIATKITDK<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 10 1852 [Gly2, Glu3, Thr5, Ser8, Leu10, Lys11, Ala16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-NH<sub>2</sub>  
 H-HGEGTFSSSELSTILDALAARDFIAWLIATKITDK<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 1853 [Gly2, Glu3, Thr5, Ser8, 11, Leu10, Ala16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-NH<sub>2</sub>  
 H-HGEGTFSSSELSTILDALAARDFIAWLIATKITD-NH<sub>2</sub>  
 1854 [Gly2, Glu3, Thr5, Leu10, Ser11, Ala16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-NH<sub>2</sub>  
 15 H-HGEGTFSELSTILDALAARDFIAWLIATKITD-NH<sub>2</sub>  
 1855 [Gly2, Glu3, Thr5, Ser8, Leu10, Ala11, 16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-NH<sub>2</sub>  
 H-HGEGSFSSSELSTILDALAARDFIAWLIATKITD-NH<sub>2</sub>  
 1856 [Gly2, Glu3, Ser8, 11, Leu10, Ala16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-NH<sub>2</sub>  
 H-HGEGSFSELSTILDALAARDFIAWLIATKITD-NH<sub>2</sub>  
 20 1857 [Gly2, Glu3, Leu10, Ser11, Ala16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-NH<sub>2</sub>  
 H-HGEGTFSSSELATILDALAARDFIAWLIATKITD-NH<sub>2</sub>  
 1858 [Gly2, Glu3, Ser8, Leu10, Ala11, 16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-NH<sub>2</sub>  
 H-HGEGSFSSSELATILDALAARDFIAWLIATKITD-NH<sub>2</sub>  
 25 1859 [Gly2, Glu3, Leu10, Lys11, Ala16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-NH<sub>2</sub>  
 H-HGEGSFSELSTILDALAARDFIAWLIATKITD-NH<sub>2</sub>  
 1860 [Gly2, Glu3, Thr5, Leu10, Lys11, Ala16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-NH<sub>2</sub>  
 H-HGEGTFSELSTILDALAARDFIAWLIATKITD-NH<sub>2</sub>  
 1861 [Gly2, Glu3, Thr5, Ser8, Leu10, Lys11, Ala16, 24, 28]hGLP-2(1-33)-NH<sub>2</sub>  
 HGEGTFSSSELSTILDALAARDFIAWLIATKITD

30 **[0054]** Los compuestos particularmente preferidos de la presente invención incluyen los compuestos 1834, 1846, 1847 1848, 1849, 1855, 1857 y 1858.

- 1834 H-HGDGSFTSELATILDNLAARDFIAWLIQTK-NH<sub>2</sub>  
 35 1846 H-HGEGSFSSSELSTILDALAARDFIAWLIATKITDK<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 1847 H-HGEGSFSELSTILDALAARDFIAWLIATKITDK<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 1848 H-HGEGTFSSSELATILDALAARDFIAWLIATKITDK<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 1849 H-HGEGSFSSSELATILDALAARDFIAWLIATKITDK<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub>  
 1855 H-HGEGSFSSSELSTILDALAARDFIAWLIATKITD-NH<sub>2</sub>  
 40 1857 H-HGEGTFSSSELATILDALAARDFIAWLIATKITD-NH<sub>2</sub>  
 1858 H-HGEGSFSSSELATILDALAARDFIAWLIATKITD-NH<sub>2</sub>

#### Estudios de estabilidad

45 **[0055]** La persona experta será capaz de diseñar procedimientos adecuados (por ejemplo, procedimientos cuantitativos) para la detección de los productos de degradación de los análogos del GLP-2, por ejemplo, basados en los descritos a continuación. La degradación se puede producir en forma de oxidación, hidrólisis y desamidación, dependiendo de la identidad y la posición de los aminoácidos en cualquier análogo del GLP-2 dado, y condiciones como el pH, la disolución y la temperatura. Los compuestos se pueden clasificar según su estabilidad química, donde los compuestos se incuban en condiciones de estrés (es decir, condiciones en las que es probable que se produzca la degradación) y posteriormente se pueden analizar para el contenido del péptido intacto restante. Además, el conocimiento adquirido sobre los principales productos de degradación obtenidos en condiciones de estrés será importante para cualquier desarrollo de un procedimiento analítico posterior.

#### 55 Ensayos cuantitativos para detectar análogos del GLP

**[0056]** La persona experta será capaz de diseñar procedimientos (por ejemplo, procedimientos cuantitativos) para la detección de análogos del GLP en entornos complejos o disoluciones (por ejemplo, plasma, orina, homogeneizados tisulares, homogeneizados celulares, saliva o similares) para investigar la absorción, distribución, metabolismo y excreción de los análogos del GLP después de su administración a mamíferos o como parte de estudios funcionales en sistemas celulares *in vitro*.

65 **[0057]** En una realización, un ensayo cuantitativo puede estar basado en anticuerpos generados contra los análogos del GLP o sus fragmentos. Los anticuerpos obtenidos a partir de animales inmunizados se pueden usar para ensayos cuantitativos. En un ejemplo, se puede preparar un ELISA de *sándwich* directo usando un primer anticuerpo con afinidad por una parte de la molécula inmovilizada en una placa multipocillos. A continuación se

aplica la muestra a los pocillos y el análogo del GLP es capturado por el primer anticuerpo. El segundo anticuerpo puede estar marcado con una enzima (peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina o beta-galactosidasa) o un radioisótopo. La cantidad de análogo del GLP capturado se puede detectar con la adición de un sustrato colorimétrico o el recuento directo de la emisión radiactiva o por centelleo. Alternativamente, la cantidad de análogo del GLP capturado se puede detectar indirectamente con la adición de un anticuerpo marcado con afinidad por el segundo anticuerpo. Se puede estimar la concentración en la muestra a partir de la respuesta obtenida de una curva patrón externa que contiene cantidades conocidas del análogo del GLP. Alternativamente, los anticuerpos se pueden usar para preparar un inmunoensayo de competición directa, donde un anticuerpo específico para el análogo del GLP se inmoviliza en una placa multipocillos y la muestra se incuba en los pocillos con una concentración predefinida fija de análogo del GLP marcado. El marcador puede ser una enzima, un fluoróforo, un radioisótopo o biotina y se puede detectar usando, por ejemplo, sustratos (por ejemplo, colorimétricos, fluorimétricos o quimioluminiscentes) específicos para las enzimas, centelleo o avidina unida a una enzima seguido por la detección como se ha descrito anteriormente. La cantidad de análogo del GLP marcado y unido se puede detectar con un procedimiento adecuado y la concentración del análogo del GLP presente en la muestra deriva de la respuesta obtenida a partir de la curva patrón externa como se ha descrito anteriormente.

**[0058]** En otra realización, un ensayo cuantitativo puede basarse en la metodología de cromatografía de líquidos y espectroscopía de masas hífenadas. En dicha configuración, se controla la respuesta de un fragmento específico para el análogo del GLP a estudiar tras la fragmentación del compuesto parental inducida por colisión con un gas inerte (He o Ar). Antes de la fragmentación, los componentes de la muestra se pueden separar por cromatografía de fase inversa o la muestra se puede inyectar directamente en el espectrómetro de masas. Si es adecuado, la muestra se puede someter a un tratamiento previo (es decir, la adición de inhibidores de proteasas, precipitación de proteínas, extracción en fase sólida, extracción por inmunofinidad, etc.). La concentración del análogo del GLP presente en la muestra se deriva de la respuesta obtenida a partir de una curva patrón externa como se ha descrito anteriormente, potencialmente después de la corrección de la respuesta usando un patrón interno tipo análogo del GLP a estudiar.

#### Generación de anticuerpos específicos

**[0059]** Se pueden inducir anticuerpos específicos contra los análogos del GLP o sus fragmentos en mamíferos y se pueden purificar a partir del suero. Los análogos del GLP o sus fragmentos se pueden usar directamente con un adyuvante para inmunizar conejos, ratones u otros mamíferos, o los análogos del GLP o sus fragmentos se pueden unir químicamente a una molécula portadora (es decir, hemocianina de lapa californiana, ovoalbúmina, albúmina, etc.) y se pueden inyectar con un adyuvante. Las inyecciones se pueden repetir con intervalos de 2-4 semanas durante periodos prolongados para mejorar la afinidad y selectividad de los anticuerpos. Los anticuerpos policlonales se pueden recoger directamente del suero. Para obtener anticuerpos monoclonales, los linfocitos B aislados procedentes de animales inmunizados, preferentemente ratones, se deben fusionar con células tumorales para formar hibridomas que producen anticuerpos. La detección y selección de los clones y anticuerpos adecuados se puede llevar a cabo usando análogos del GLP inmovilizados, o sus péptidos, seguido de la detección con anticuerpos marcados dirigidos contra anticuerpos. Alternativamente, la detección y selección puede estar basada en anticuerpos inmovilizados seguida de la detección con análogos del GLP marcados o sus fragmentos. En todos los casos, el marcador puede ser un radioisótopo, una enzima, un fluoróforo o biotina y se puede detectar usando, por ejemplo, sustratos (por ejemplo, colorimétricos, fluorimétricos o quimioluminiscentes) específicos para las enzimas, centelleo o avidina unida a una enzima seguida por la detección como se ha descrito anteriormente.

#### **Síntesis de análogos del GLP-2**

**[0060]** Se prefiere la síntesis de los análogos de la invención por medio de síntesis en fase sólida o en fase líquida. En este contexto, se hace referencia al documento WO 98/11125 y, entre muchos otros, Fields, GB y col., 2002, "Principles and practice of solid-phase peptide synthesis". En: Synthetic Peptides (2nd Edition) y sus Ejemplos.

**[0061]** Así, los análogos del GLP se pueden sintetizar de una serie de formas incluyendo, por ejemplo, un procedimiento que comprende:

- 55 (a) la síntesis del péptido por medio de una síntesis de péptidos en fase sólida o en fase líquida y la recuperación del péptido sintético obtenido de esta forma; o
- (b) cuando el péptido está constituido por aminoácidos de origen natural, la expresión de una construcción de ácido nucleico que codifica el péptido en una célula hospedadora y la recuperación del producto de expresión a partir de un cultivo de la célula hospedadora; o
- 60 (c) cuando el péptido está constituido de aminoácidos de origen natural, llevar a cabo la expresión *in vitro* libre de células de una construcción de ácido nucleico que codifica el péptido y la recuperación del producto de expresión; o una combinación de los procedimientos (a), (b), y (c) para obtener fragmentos del péptido, la ligación posterior de los fragmentos para obtener el péptido, y la recuperación del péptido.

**[0062]** Así, para algunos análogos de la invención puede ser ventajoso aprovechar las técnicas de ingeniería genética. Este puede ser el caso cuando el péptido es suficientemente grande (o producido en forma de

construcción de fusión) o cuando el péptido sólo incluye aminoácidos de origen natural que se pueden traducir a partir de ARN en organismos vivos.

5 **[0063]** Para los propósitos de la tecnología génica recombinante, los fragmentos de ácido nucleico que codifican los péptidos de la invención son productos químicos importantes. Por tanto, un aspecto adicional de la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un análogo del GLP-2 de la invención, donde el péptido preferentemente está constituido de aminoácidos de origen natural. Los fragmentos de ácido nucleico de la invención son fragmentos de ADN o ARN.

10 **[0064]** Los fragmentos de ácido nucleico de la invención normalmente estarán insertados en vectores adecuados para formar vectores de clonación o expresión que llevan los fragmentos de ácido nucleico de la invención; dichos nuevos vectores también son parte de la invención. Los detalles relativos a la construcción de estos vectores de la invención se describirán en el contexto de células y microorganismos transformados, a continuación. Los vectores pueden estar, dependiendo del propósito y el tipo de aplicación, en forma de plásmidos, fagos, cósmidos, mini-cromosomas, virus, pero también es un factor importante el ADN desnudo que sólo se expresa transitoriamente en ciertas células. Los vectores de clonación y expresión preferidos (vectores plasmídicos) de la invención son capaces de replicarse autónomamente, permitiendo así un gran número de copias con el fin de lograr un alto nivel de expresión o un alto nivel de replicación para la posterior clonación.

20 **[0065]** El esquema general de un vector de la invención comprende las siguientes características en dirección 5'-3' y con una unión de manera operable: un promotor para conducir la expresión del fragmento de ácido nucleico de la invención, opcionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido líder que permite la secreción (a una fase extracelular o, cuando sea aplicable, en el periplasma) o un péptido líder para múltiples usos, por ejemplo, secreción combinada, marcador de purificación y escisión enzimática en el péptido correcto o la integración en la membrana del fragmento polipeptídico, el fragmento de ácido nucleico que codifica el péptido de la invención, y opcionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia terminadora. Cuando se trabaja con vectores de expresión en cepas o líneas celulares productoras con la intención de obtener la estabilidad genética de la célula transformada, se prefiere que cuando se introduce un vector en una célula hospedadora se integre en el genoma de la célula hospedadora.

30 **[0066]** Los vectores de la invención se usan para transformar células hospedadoras para producir el péptido modificado de la invención. Dichas células transformadas, que también son parte de la invención, pueden ser células o líneas celulares cultivadas usadas para la propagación de los fragmentos de ácido nucleico y vectores de la invención, o usadas para la producción recombinante de los péptidos de la invención.

35 **[0067]** Las células transformadas preferidas de la invención son microorganismos como bacterias (tales como las especies *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), *Bacillus* (por ejemplo, *Bacillus subtilis*), *Salmonella*, o *Mycobacterium* (preferentemente no patógenas, por ejemplo, *M. bovis* BCG), levaduras (como *Saccharomyces cerevisiae*), y protozoos. Alternativamente, las células transformadas proceden de un organismo multicelular, es decir, puede ser una célula de hongo, una célula de insecto, una célula vegetal, o una célula de mamífero. También son interesantes las células procedentes de seres humanos, cf. la descripción de las líneas celulares y vectores a continuación. Con el fin de una clonación y/o expresión optimizada se prefiere que la célula transformada sea capaz de replicar el fragmento de ácido nucleico de la invención. Las células que expresan el fragmento de ácido nucleico son formas de realización útiles y preferidas de la invención; se pueden usar para la preparación a pequeña escala o a gran escala de los péptidos de la invención.

45 **[0068]** Cuando se produce el péptido de la invención por medio de células transformadas, es conveniente, aunque no esencial, que el producto de expresión se exporte al medio de cultivo o se transporte a la superficie de la célula transformada.

50 Cuando se ha identificado una célula productora eficaz, se prefiere establecer, a partir de ella, una línea celular estable que lleve el vector de la invención y que exprese el fragmento de ácido nucleico que codifica el péptido. Preferentemente, esta línea celular estable segrega o lleva el péptido de la invención, facilitando así su purificación.

55 **[0069]** En general, en relación con los hospedadores se usan vectores plasmídicos que contienen replicones y secuencias control, que proceden de especies compatibles con la célula hospedadora. Normalmente el vector lleva un sitio de replicación, así como secuencias marcadoras, que son capaces de proporcionar una selección fenotípica en las células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* normalmente se transforma usando pBR322 (pero existen muchos otros plásmidos útiles), un plásmido derivado de una especie de *E. coli* (véase, por ejemplo, Bolívar y col., 1977). El plásmido pBR322 contiene genes para la resistencia a ampicilina y tetraciclina y proporciona así un medio sencillo para la identificación de células transformadas. El plásmido pBR, u otros plásmidos o fagos microbianos también deben contener, o deben estar modificados para contener promotores, que pueden ser usados por los microorganismos procariontes para la expresión.

65 **[0070]** Los promotores usados más habitualmente en la construcción de ADN recombinante de procariontes incluyen los sistemas promotores de la p-lactamasa (penicilinas) y de la lactosa (Chang y col., 1978; Itakura y col.,

- 1977; Goeddel y col., 1979) y un sistema promotor del triptófano (*trp*) (Goeddel y col., 1979; documento EP 0 036 776 A). Aunque éstos son los usados más habitualmente, se han descubierto y utilizado otros promotores microbianos, y se han publicado detalles relativos a sus secuencias de nucleótidos, permitiendo que la persona experta pueda ligarlos funcionalmente con vectores plasmídicos (Siebwenlist y col., 1980). Además de los procariotas, también se pueden usar microbios eucariotas, tales como cultivos de levaduras, y aquí también el promotor debe ser capaz de conducir la expresión. La *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura común del pan es el microorganismo eucariota usado más habitualmente, aunque normalmente hay disponibles una serie de otras cepas. Para la expresión en *Saccharomyces*, habitualmente se usa, por ejemplo, el plásmido YRp7 (Stinchcomb y col., 1979; Kingsman y col., 1979; Tschemper y col., 1980). Este plásmido ya contiene el gen *trp1* que proporciona un marcador seleccionable para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, el ATCC No. 44076 o PEP4-1 (Jones, 1977). La presencia de la lesión *trp1* como característica del genoma de la célula de levadura hospedadora proporciona entonces un entorno adecuado para detectar la transformación mediante el crecimiento en ausencia del triptófano.
- 15 **[0071]** Secuencias promotoras adecuadas en vectores de levaduras incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzman y col., 1980.) u otras enzimas glucolíticas (Hess y col., 1968; Holland y col., 1978), como la enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, trifosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa, y glucoquinasa. En la construcción de plásmidos de expresión adecuados, las secuencias de terminación asociadas a estos genes también están ligadas al vector de expresión en 3' de la secuencia deseada a expresar para proporcionar la poliadenilación del ARNm y la terminación.
- 20 **[0072]** Otros promotores, que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada por las condiciones de crecimiento son la región promotora de la alcohol-deshidrogenasa 2, el isocitocromo C, la fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas al metabolismo del nitrógeno, y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa anteriormente mencionada, y enzimas responsables de la utilización de la maltosa y la galactosa. Cualquier vector plasmídico que contenga un promotor, un origen de replicación y secuencias de terminación compatibles con levaduras es adecuado.
- 25 **[0073]** Además de los microorganismos, también se pueden usar como hospedadores cultivos de células procedentes de organismos multicelulares. En principio, cualquiera de dichos cultivos celulares es válido, ya sea un cultivo procedente de vertebrados o invertebrados. No obstante, ha habido mayor interés en cultivos de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivos tisulares) se ha convertido en un procedimiento rutinario en los últimos años (Tissue Culture, 1973). Ejemplos de dichas líneas celulares hospedadoras útiles son las células VERO y HeLa, las líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO), y las células W138, BHK, COS-7 293, *Spodoptera frugiperda* (SF) (disponibles comercialmente como sistemas de expresión completos en, entre otros, Protein Sciences, 1000 Research Parkway, Meriden, CT 06450, EE.UU. y en Invitrogen), la línea celular de *D. melanogaster* S<sub>2</sub> disponible en Invitrogen, PO Box 2312, 9704 CH Groningen, Holanda, y las líneas celulares MDCK.
- 30 **[0074]** Los vectores de expresión para dichas células normalmente incluyen (si es necesario) un origen de replicación, un promotor localizado delante del gen a expresar, junto con todos los sitios necesarios de unión a ribosomas, sitios de procesamiento del ARN, sitio de poliadenilación, y secuencias terminadoras de la transcripción.
- 35 **[0075]** Para su uso en células de mamífero, a menudo se proporcionan las funciones de control sobre los vectores de expresión mediante material vírico. Por ejemplo, los promotores usados habitualmente proceden de polioma, adenovirus 2, y más frecuentemente del virus del simio 40 (SV40). Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 son particularmente útiles debido a que ambos se obtienen fácilmente del virus en forma de fragmento, que también contiene el origen de replicación vírico de SV40 (Fiers y col., 1978). También se pueden usar fragmentos más grandes o más pequeños que SV40, con la condición de que se incluya la secuencia de aproximadamente 250 pb que se extiende desde el sitio HindIII hacia el sitio BglII localizada en el origen de replicación vírico. Además, también es posible, y a menudo deseable, utilizar secuencias promotoras o de control asociadas normalmente a la secuencia génica deseada, siempre que dichas secuencias control sean compatibles con los sistemas de las células hospedadoras.
- 40 **[0076]** Se puede proporcionar un origen de replicación construyendo el vector para que incluya un origen exógeno, tal como el que se puede obtener de SV40 u otros virus (por ejemplo, polioma, adenovirus, VSV, BPV) o se puede proporcionar mediante el mecanismo de replicación cromosómico de la célula hospedadora. Si el vector está integrado en el cromosoma de la célula hospedadora, a menudo esto último es suficiente.
- 45 **[0077]** Con el fin de obtener rendimientos satisfactorios en un procedimiento de producción recombinante, puede ser ventajoso preparar los análogos en forma de proteínas de fusión, ya sea fusionando el péptido a un par de fusión que puede servir como marcador de afinidad (para comodidad en la purificación) y/o teniendo múltiples repeticiones del péptido. Estos procedimientos requieren la presencia de un sitio de escisión adecuado para una peptidasa, pero la persona experta sabrá cómo adaptar las construcciones genéticas subyacentes.
- 50 **[0078]** Después de la preparación recombinante, los péptidos de la invención se pueden purificar mediante
- 55
- 60
- 65

procedimientos conocidos de forma general en la materia, incluyendo cromatografía multi-etapas (técnicas cromatográficas de intercambio iónico, exclusión molecular, y cromatografía de afinidad).

5 **[0079]** Alternativamente, los péptidos constituidos de aminoácidos de origen natural se pueden preparar *in vitro* en sistemas libres de células. Esto es especialmente conveniente en los casos en que los péptidos pueden ser tóxicos para las posibles células hospedadoras. Por lo tanto, la presente invención también contempla el uso de la traducción/expresión *in vitro* libre de células con el fin de preparar los péptidos de la invención. En este contexto, se hace referencia a los kits de traducción *in vitro*, materiales, y documentación técnica de, por ejemplo, Ambion Inc., 2130 Woodward, Austin, TX 78744-1832, EE.UU.

10 **[0080]** Por último, naturalmente los procedimientos disponibles se pueden combinar para preparar de este modo, por ejemplo, análogos semisintéticos. En dicha configuración, se preparan fragmentos peptídicos usando al menos 2 procedimientos o etapas separadas, seguido por la ligación de los fragmentos para obtener el producto peptídico final.

#### 15 Composiciones farmacéuticas y administración

20 **[0081]** Los análogos del GLP-2 de la presente invención, o sus sales o derivados, se pueden formular en forma de composiciones farmacéuticas preparadas para su almacenamiento o administración, y que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido GLP-2 de la presente invención, o una de sus sales o derivados, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 **[0082]** La cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención dependerá de la vía de administración, el tipo de mamífero a tratar, y las características físicas del mamífero específico en consideración. Estos factores y sus relaciones para determinar esta cantidad son muy conocidos por los facultativos expertos en materia médica. Esta cantidad y el procedimiento de administración se pueden adaptar para conseguir una eficacia óptima y así suministrar el péptido en el intestino grueso, pero dependerá de factores tales como el peso, la dieta, la medicación simultánea y otros factores muy conocidos por los expertos en materia médica.

30 **[0083]** Está dentro de la invención proporcionar una composición farmacéutica, donde el análogo del GLP-2, o una de sus sales esté presente en una cantidad eficaz para tratar o prevenir trastornos relacionados con el estómago o el intestino.

35 **[0084]** Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención que tienen un resto ácido se pueden formar usando bases orgánicas e inorgánicas. Sales adecuadas formadas con bases incluyen sales metálicas, tales como sales de metales alcalinos o metales alcalino-térreos, por ejemplo, sales de sodio, potasio, o magnesio; sales de amonio o sales de aminas orgánicas, tales como las formadas con morfina, tiomorfolina, piperidina, pirrolidina, o una monoalquilamina, dialquilamina o trialquilamina inferior (por ejemplo, etil-*terc*-butil-, dietil-, diisopropil-, trietil-, tributil- o dimetilpropilamina), o una mono-, di- o trihidroxi alquilamina inferior (por ejemplo, mono-, di- o trietanolamina). También se pueden formar sales internas. De manera similar, cuando un compuesto de la presente invención contiene un resto básico, las sales se pueden formar usando ácidos orgánicos e inorgánicos. Por ejemplo, las sales se pueden formar a partir de los siguientes ácidos: ácido acético, propiónico, láctico, cítrico, tartárico, succínico, fumárico, maleico, malónico, mandélico, málico, ftálico, clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, nítrico, sulfúrico, metanosulfónico, naftalensulfónico, bencenosulfónico, toluensulfónico, y camforsulfónico así como otros ácidos conocidos farmacéuticamente aceptables. También se pueden formar sales de adición de aminoácidos con aminoácidos tales como lisina, glicina, o fenilalanina.

50 **[0085]** Como es evidente para alguien experto en materia médica, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de los péptidos o composiciones farmacéuticas de la presente invención variará dependiendo de la edad, el peso y la especie de mamífero tratada, los compuestos particulares empleados, el modo de administración particular y los efectos deseados y las indicaciones terapéuticas. Debido a que estos factores y sus relaciones para determinar esta cantidad son muy conocidos en materia médica, la determinación de los niveles de dosificación terapéuticamente eficaces, la cantidad necesaria para conseguir el resultado de prevención y/o tratamiento deseado de las enfermedades relacionadas con el intestino y el estómago descritas en el presente documento, así como otras indicaciones médicas descritas en el presente documento, están dentro de las competencias de la persona experta.

60 **[0086]** Como se usa en el presente documento, "una cantidad terapéuticamente eficaz" es aquella que reduce los síntomas de una dolencia o patología dada, y preferentemente que normaliza las respuestas fisiológicas en un individuo con la dolencia o la patología. La reducción de los síntomas o la normalización de las respuestas fisiológicas se pueden determinar usando procedimientos rutinarios en la materia y pueden variar con una dolencia o patología dada. En un aspecto, una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más análogos del GLP-2 o composición farmacéutica que comprende uno o más análogos del GLP-2 es una cantidad que restaura un parámetro fisiológico medible sustancialmente al mismo valor (preferentemente dentro del +30%, más preferentemente dentro del +20%, y aún más preferentemente dentro del 10% del valor) del parámetro en un individuo sin la dolencia o patología.

**[0087]** En una realización de la invención la administración de los compuestos o composición farmacéutica de la presente invención se inicia a niveles de dosificación inferiores, incrementándose los niveles de dosificación hasta que se consigue el efecto de prevención/tratamiento deseado de la indicación médica pertinente, tales como enfermedades relacionadas con el intestino y el estómago. Esto definiría una cantidad terapéuticamente eficaz. Para los péptidos de la presente invención, solos o como parte de una composición farmacéutica, dichas dosis pueden estar entre 0,01 mg/kg y 100 mg/kg de peso corporal aproximadamente, tal como entre 0,01 mg/kg y 10 mg/kg de peso corporal aproximadamente, por ejemplo entre 10-100 µg/kg de peso corporal.

**[0088]** Para un uso terapéutico, el análogo seleccionado del GLP-2 se formula con un vehículo que sea farmacéuticamente aceptable y que sea apropiado para el suministro del péptido mediante la vía de administración seleccionada. Para los propósitos de la presente invención, las vías parentales periféricas incluyen vías de administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, e intraperitoneal. Ciertos compuestos usados en la presente invención también pueden ser adecuados para su administración por vía oral, rectal, nasal o por las vías respiratorias inferiores. Éstas son las denominadas vías no parentales. La presente composición farmacéutica comprende un análogo del GLP-2 de la invención, o una de sus sales o derivados y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados son aquellos usados de manera convencional con los fármacos basados en péptidos, tales como diluyentes, excipientes y similares. Los vehículos farmacéuticamente aceptables para uso terapéutico son muy conocidos en materia farmacéutica, y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985). Por ejemplo, se puede usar solución salina estéril y tampón fosfato salino a pH ligeramente ácido o fisiológico. Los agentes tamponantes del pH pueden ser fosfato, citrato, acetato, tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), ácido N-Tris(hidroximetil)metil-3-aminopropanosulfónico (TAPS), bicarbonato de amonio, dietanolamina, histidina, que es un tampón preferido, arginina, lisina, o acetato o sus mezclas. Los intervalos de los tampones preferidos son a pH 4-8, pH 6,5-8, más preferentemente pH 7-7,5. En la composición farmacéutica se pueden suministrar conservantes, tales como *para*, *meta*, y *orto*-cresol, metil- y propilparabeno, fenol, alcohol bencílico, benzoato sódico, ácido benzoico, bencil benzoato, ácido sórbico, ácido propanoico, ésteres del ácido *p*-hidroxibenzoico. En la composición farmacéutica se pueden suministrar estabilizantes, que previenen la oxidación, desamidación, isomerización, racemización, ciclación, hidrólisis peptídica, tal como por ejemplo, ácido ascórbico, metionina, triptófano, EDTA, asparagina, lisina, arginina, glutamina y glicina. En la composición farmacéutica se pueden suministrar estabilizantes, que previenen la agregación, fibrilación y precipitación, tal como dodecilsulfato sódico, polietilenglicol, carboximetilcelulosa, ciclodextrina. En la composición farmacéutica se pueden proporcionar modificantes orgánicos para la solubilización o prevención de la agregación, tal como etanol, ácido acético o acetato y sus sales. En la composición farmacéutica se pueden proporcionar agentes isotónicos tales como sales, por ejemplo, cloruro sódico o los carbohidratos, más preferidos, por ejemplo, dextrosa, manitol, lactosa, trehalosa, sacarosa o sus mezclas.

**[0089]** En la composición farmacéutica se pueden suministrar detergentes, tales como Tween 20, Tween 80, SDS, poloxámeros, por ejemplo, Pluronic F-68, Pluronic F-127. En la composición farmacéutica se pueden suministrar colorantes e, incluso, agentes aromatizantes. En otra realización, se proporciona una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del análogo del péptido GLP-2. Se pueden usar agentes suspensores.

**[0090]** En la composición farmacéutica se pueden proporcionar modificadores orgánicos, tales como metanol, *tert*-butanol, 2-propanol, etanol, glicerol, polietilenglicol para la liofilización de un producto liofilizado. En la composición farmacéutica se pueden proporcionar agentes de relleno y agentes isotónicos para su liofilización tales como sales, por ejemplo, cloruro sódico, carbohidratos, por ejemplo, dextrosa, manitol, lactosa, trehalosa, sacarosa o sus mezclas, aminoácidos, por ejemplo, glicina, glutamato, o excipientes tales como cisteína, lecitina o seroalbúmina humana, o sus mezclas.

**[0091]** Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden formular y se pueden usar en forma de comprimidos, cápsulas o elixires para su administración por vía oral; supositorios para la administración por vía rectal; preferentemente disoluciones estériles o polvos o suspensiones estériles para la administración inyectable; y similares. La dosis y el procedimiento de administración se puede adaptar para conseguir una eficacia óptima, pero dependerá de factores tales como el peso, la dieta, la medicación simultánea y otros factores, que reconocerán los expertos en materia médica.

**[0092]** Cuando la administración deba ser parental, tal como intravenosa y subcutánea, por ejemplo, a diario, las composiciones farmacéuticas inyectables se pueden preparar en formas convencionales, ya sea disoluciones o suspensiones acuosas; liofilizadas, formas sólidas adecuadas para su reconstitución inmediatamente antes de su uso o su suspensión en un líquido antes de la inyección, o en forma de emulsiones.

**[0093]** El diluyente para la reconstitución del producto liofilizado puede ser un tampón adecuado de la lista anterior, agua, solución salina, dextrosa, manitol, lactosa, trehalosa, sacarosa, lecitina, albúmina, glutamato sódico, clorhidrato de cisteína; o agua para inyección con la adición de detergentes, tales como Tween 20, Tween 80, SDS, poloxámeros, por ejemplo, Pluronic F-68, o Pluronic F-127, polietilenglicol, y/o con la adición de conservantes tales como *para*-, *meta*-, y *orto*-cresol, metil- y propilparabeno, fenol, alcohol bencílico, benzoato sódico, ácido benzoico, bencil benzoato, ácido sórbico, ácido propanoico, ésteres del ácido *p*-hidroxibenzoico, y/o con la adición de un modificador orgánico tal como etanol, ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico o sus sales.

**[0094]** Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas inyectables pueden contener pequeñas cantidades de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes, o agentes tamponantes del pH. Se pueden utilizar preparaciones que aumentan la absorción (por ejemplo, liposomas, detergentes y ácidos orgánicos).

**[0095]** En una realización de la invención, los compuestos se formulan para su administración por infusión, por ejemplo, cuando se usan en forma de suplementos nutricionales líquidos para pacientes en terapia nutricional completamente parenteral (por ejemplo, neonatos, o pacientes que sufren caquexia o anorexia), o mediante inyección, por ejemplo, subcutánea, intraperitoneal o intravenosamente, y por consiguiente se utilizan en forma de disoluciones acuosas en forma estéril y exenta de pirógeno y opcionalmente tamponada a un pH fisiológicamente tolerable, por ejemplo, un pH ligeramente ácido o fisiológico. La formulación para la administración intramuscular puede estar basada en disoluciones o suspensiones de aceites vegetales, por ejemplo, aceite de canola, aceite de maíz o aceite de soja. Estas formulaciones basadas en aceite pueden estar estabilizadas mediante antioxidantes, por ejemplo, BHA (hidroxianisol butilado) y BHT (hidroxitolueno butilado).

**[0096]** Así, los presentes compuestos peptídicos se pueden administrar en un vehículo, tal como agua destilada o en solución salina, tampón fosfato salino, disoluciones de dextrosa al 5% o aceites. La solubilidad del análogo del GLP-2 se puede mejorar, si se desea, incorporando un potenciador de la solubilidad, tales como detergentes y emulsionantes.

**[0097]** El vehículo o portador acuoso se puede suplementar para su uso en forma de inyectables con una cantidad de gelatina que sirve para depositar el análogo del GLP-2 cerca o en el lugar de la inyección, para su liberación lenta en el sitio de acción deseado. También pueden ser útiles agentes gelificantes alternativos, tales como el ácido hialurónico, como agentes de depósito.

**[0098]** En una realización de la presente invención la formulación comprende

- a. L-histidina disuelta en agua para obtener concentraciones finales de entre 0,5 mM y 300 mM, preferentemente entre 3 y 200 mM, lo más preferentemente entre 20 y 100 mM;
- b. Manitol para obtener hasta 350 mM, preferentemente entre 30 y 300 mM, lo más preferentemente entre 100 mM y 230 mM; y
- c. Ácido acético para obtener hasta 200 mM, preferentemente entre 0,05 y 100 mM, lo más preferentemente entre 0,5 y 50 mM en disolución.

Se añade la cantidad apropiada de compuesto terapéutico para obtener concentraciones de entre 1 y 100 mg/ml, preferentemente entre 5 y 50 mg/ml, lo más preferentemente entre 10 y 30 mg/ml. El pH se ajusta a un pH final entre 4 y 8, preferentemente entre 6,5 y 7,5, lo más preferentemente entre 6,7 y 7,3. La disolución resultante se ajusta al peso objetivo, se filtra hasta esterilidad y se dispensa en alícuotas apropiadas en viales para su uso farmacéutico. La formulación se procesa posteriormente según se trate de un producto líquido o de un producto liofilizado.

**[0099]** En otra realización de la presente invención la formulación comprende

- a. L-histidina disuelta en agua para obtener concentraciones finales de entre 0,5 mM y 300 mM, preferentemente entre 3 y 200 mM, lo más preferentemente entre 20 y 100 mM de L-histidina;
- b. L-arginina para obtener hasta 200 mM, preferentemente entre 0,5 y 100 mM, lo más preferentemente entre 5 mM y 50 mM;
- c. Manitol para obtener hasta 350 mM, preferentemente entre 30 y 300 mM, lo más preferentemente entre 100 mM y 230 mM; y
- d. Ácido acético para obtener hasta 200 mM, preferentemente entre 0,05 y 100 mM, lo más preferentemente entre 0,5 y 50 mM en disolución.

Se añade la cantidad apropiada de compuesto terapéutico para obtener concentraciones de entre 1 y 100 mg/ml, preferentemente entre 5 y 50 mg/ml, lo más preferentemente entre 10 y 30 mg/ml.

El pH se ajusta a un pH final entre 4 y 8, preferentemente entre 6,5 y 7,5, lo más preferentemente entre 6,7 y 7,3. La disolución resultante se ajusta al peso objetivo, se filtra hasta esterilidad y se dispensa en alícuotas apropiadas en viales para su uso farmacéutico. La formulación se procesa posteriormente según se trate de un producto líquido o de un producto liofilizado.

**[0100]** En otra realización más de la presente invención la formulación comprende

- a. L-histidina disuelta en agua para obtener concentraciones finales de hasta 200 mM, preferentemente entre 3 y 100 mM, lo más preferentemente entre 5 y 50 mM de L-histidina;
- b. L-arginina para obtener hasta 200 mM, preferentemente entre 0,5 y 100 mM, lo más preferentemente entre 5 mM y 50 mM;

- c. Manitol para obtener hasta 350 mM, preferentemente entre 30 y 300 mM, lo más preferentemente entre 100 mM y 230 mM; y  
 d. Ácido acético para obtener hasta 200 mM, preferentemente entre 0,05 y 100 mM, lo más preferentemente entre 0,5 y 50 mM en disolución.

5 Se añade la cantidad apropiada de compuesto terapéutico para obtener concentraciones de entre 1 y 100 mg/ml, preferentemente entre 5 y 50 mg/ml, lo más preferentemente entre 10 y 30 mg/ml.  
 El pH se ajusta a un pH final entre 4 y 8, preferentemente entre 6,5 y 7,5, lo más preferentemente entre 6,7 y 7,3. La disolución resultante se ajusta al peso objetivo, se filtra hasta esterilidad y se dispensa en alícuotas apropiadas en viales para su uso farmacéutico. La formulación se procesa posteriormente según se trate de un producto líquido o de un producto liofilizado.

**[0101]** En aún otra realización más de la presente invención la formulación comprende

- 15 a. L-histidina disuelta en agua para obtener concentraciones finales de entre 0,5 mM y 300 mM, preferentemente entre 3 y 200 mM, lo más preferentemente entre 20 y 100 mM de L-histidina;  
 b. L-arginina para obtener hasta 200 mM, preferentemente entre 0,5 y 100 mM, lo más preferentemente entre 5 mM y 50 mM;  
 20 c. Manitol para obtener hasta 350 mM, preferentemente entre 30 y 300 mM, lo más preferentemente entre 100 mM y 230 mM; y  
 d. Ácido acético para obtener hasta 200 mM, preferentemente entre 0,05 y 100 mM, lo más preferentemente entre 0,5 y 50 mM en disolución.

25 Se añade la cantidad apropiada de compuesto terapéutico para obtener concentraciones de entre 1 y 100 mg/ml, preferentemente entre 5 y 50 mg/ml, lo más preferentemente entre 10 y 30 mg/ml.  
 El pH se ajusta a un pH final entre 4 y 8, preferentemente entre 6,5 y 7,5, lo más preferentemente entre 6,7 y 7,3. La disolución resultante se ajusta al peso objetivo, se filtra hasta esterilidad y se dispensa en alícuotas apropiadas en viales para su uso farmacéutico. La formulación se procesa posteriormente según se trate de un producto líquido o de un producto liofilizado.

30 **[0102]** En otra realización más de la presente invención la formulación comprende

- a. L-histidina disuelta en agua para obtener concentraciones finales de hasta 200 mM, preferentemente entre 3 y 100 mM, lo más preferentemente entre 5 y 50 mM de L-histidina;  
 35 b. L-arginina para obtener hasta 200 mM, preferentemente entre 0,5 y 100 mM, lo más preferentemente entre 5 mM y 50 mM;  
 c. Manitol para obtener hasta 350 mM, preferentemente entre 30 y 300 mM, lo más preferentemente entre 100 mM y 230 mM; y  
 40 d. Ácido acético para obtener hasta 200 mM, preferentemente entre 0,05 y 100 mM, lo más preferentemente entre 0,5 y 50 mM en disolución.

45 Se añade la cantidad apropiada de compuesto terapéutico para obtener concentraciones de entre 1 y 100 mg/ml, preferentemente entre 5 y 50 mg/ml, lo más preferentemente entre 10 y 30 mg/ml.  
 El pH se ajusta a un pH final entre 4 y 8, preferentemente entre 6,5 y 7,5, lo más preferentemente entre 6,7 y 7,3. La disolución resultante se ajusta al peso objetivo, se filtra hasta esterilidad y se dispensa en alícuotas apropiadas en viales para su uso farmacéutico. La formulación se procesa posteriormente según se trate de un producto líquido o de un producto liofilizado.

**[0103]** En otra realización más de la presente invención la formulación comprende

- 50 a. N-acetato disuelto en agua para obtener concentraciones finales de hasta 200 mM, preferentemente entre 0,5 y 100 mM, lo más preferentemente entre 5 y 50 mM de L-histidina;  
 b. Manitol para obtener hasta 350 mM, preferentemente entre 30 y 300 mM, lo más preferentemente entre 100 mM y 230 mM.

55 Se añade la cantidad apropiada de compuesto terapéutico para obtener concentraciones de entre 1 y 100 mg/ml, preferentemente entre 5 y 50 mg/ml, lo más preferentemente entre 10 y 30 mg/ml.  
 El pH se ajusta a un pH final entre 4 y 8, preferentemente entre 6,5 y 7,5, lo más preferentemente entre 6,7 y 7,3. La disolución resultante se ajusta al peso objetivo, se filtra hasta esterilidad y se dispensa en alícuotas apropiadas en viales para su uso farmacéutico. La formulación se procesa posteriormente según se trate de un producto líquido o de un producto liofilizado.

60 **[0104]** Los análogos del GLP-2 de la invención también se pueden formular en forma de dispositivo de implantación de liberación lenta para una administración prolongada y sostenida del análogo del péptido GLP-2. Dicha liberación sostenida puede estar en forma de parche colocado sobre la superficie del cuerpo. Ejemplos de formulaciones de liberación sostenida incluyen compuestos de polímeros biocompatibles, tales como ácido poli(láctico), ácido poli(láctico-co-glicólico), metilcelulosa, ácido hialurónico, ácido siálico, silicato, colágeno,

liposomas y similares. Las formulaciones de liberación sostenida pueden ser de interés particular cuando se desea proporcionar una concentración local elevada del análogo del GLP-2 de la invención.

5 **[0105]** El análogo del GLP-2 se puede utilizar en forma de vial o ampolla estéril rellena que contiene una cantidad intestinotrófica del péptido, en cantidades monodosis o multidosis. El vial o la ampolla pueden contener el análogo del GLP-2 y el vehículo deseado, como formulación lista para su administración. Alternativamente, el vial o la ampolla pueden contener el péptido GLP-2 en una forma, tal como en forma liofilizada, adecuada para su reconstitución en un vehículo adecuado, tal como agua estéril o tampón fosfato salino.

10 **[0106]** Como alternativa a las formulaciones inyectables, el análogo del GLP-2 se puede formular para su administración por otras vías. Se pueden formular formas de dosificación orales, tales como comprimidos, cápsulas y similares, según la práctica farmacéutica habitual. Según la presente invención, el análogo del GLP-2 se administra para tratar individuos que se beneficiarían del crecimiento del tejido del intestino delgado.

15 **[0107]** Las formas de dosificación nasales se pueden formular con la adición de potenciadores, tales como quitosán o detergentes tales como Tween 20, Tween 80, poloxámeros, por ejemplo, Pluronic F-68, Pluronic F-127; Brij 35, Brij 72, o cremophor EL.

20 **[0108]** Los compuestos peptídicos de la presente invención se pueden usar solos, o en combinación con compuestos que tienen un efecto antiinflamatorio. Sin estar limitado por la teoría se cree que dicho tratamiento de combinación puede reforzar los efectos beneficiosos del tratamiento de los presentes análogos peptídicos.

25 **[0109]** La dosificación y la pauta terapéutica más apropiadas para el tratamiento del paciente naturalmente variará con la enfermedad o dolencia a tratar, y según el peso del paciente y otros parámetros. Sin querer estar limitado por ninguna teoría particular, se espera que dosis, en el intervalo de  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , y una duración o frecuencia de tratamiento más corta o más prolongada puedan producir resultados terapéuticamente útiles, tales como un incremento estadísticamente significativo, en particular, sobre la masa del intestino delgado. En algunos casos, el régimen terapéutico puede incluir la administración de dosis de mantenimiento adecuadas para la prevención de la regresión tisular que se produce después de la detención del tratamiento inicial. Los tamaños de la dosificación y el régimen de dosificación más apropiados para uso en seres humanos pueden estar guiados por los resultados obtenidos por la presente invención, y se pueden confirmar en ensayos clínicos correctamente diseñados.

30

35 **[0110]** Se puede determinar una dosificación y un protocolo de tratamiento eficaces por medios convencionales, partiendo de una dosis baja en animales de laboratorio e incrementando la dosificación mientras se controlan los efectos, y también variando sistémicamente el régimen de dosificación. El facultativo debe tener en consideración numerosos factores cuando determine una dosificación óptima para un sujeto dado. Dichas consideraciones son conocidas por la persona experta.

40 **[0111]** Una dosis para seres humanos de un péptido GLP-2 según la invención puede estar, en una realización, entre 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal y día aproximadamente y 10  $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$  aproximadamente, preferentemente entre 50  $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$  aproximadamente y 5  $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$  aproximadamente 100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  y 1  $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$  aproximadamente.

#### 45 Dolencias médicas

50 **[0112]** Los péptidos de la presente invención son útiles como agentes farmacéuticos para la prevención o tratamiento de un individuo que padezca de trastornos gastro-intestinales, incluyendo el tracto gastrointestinal superior del esófago, con la administración de una cantidad eficaz de un análogo del GLP-2, o una de sus sales como se describe en el presente documento. Los trastornos relacionados con el estómago y el intestino incluyen úlceras de cualquier etiología (por ejemplo, úlceras pépticas, úlceras inducidas por fármacos, úlceras relacionadas con infecciones u otros patógenos), trastornos de la digestión, síndromes de malabsorción, síndrome del intestino corto, síndrome del fondo de saco, enfermedad inflamatoria del intestino, esprúe celíaco (por ejemplo, derivados de la enteropatía inducida por gluten o enfermedad celíaca), esprúe tropical, esprúe hipogammaglobulinémico, enteritis, colitis ulcerosa, daño del intestino delgado y diarrea/mucositis inducida por quimioterapia (CID).

55 **[0113]** Como se ha mencionado anteriormente, en general, los individuos que se beneficiarían de una mayor masa de intestino delgado y la consecución y/o mantenimiento de una estructura y una función normales de la mucosa del intestino delgado son candidatos para el tratamiento con los presentes análogos del GLP-2. Las dolencias particulares que se pueden tratar con el análogo del GLP-2 incluyen las diversas formas de esprúe, incluyendo la esprúe celíaco que resulta de una reacción tóxica a la alfa-gliadina del trigo y que puede ser el resultado de una enteropatía inducida por gluten o enfermedad celíaca, y se caracteriza por una pérdida significativa de las vellosidades del intestino delgado; esprúe tropical que resulta de una infección y se caracteriza por un aplanamiento parcial de las vellosidades; esprúe hipogammaglobulinémico que se observa habitualmente en pacientes con inmunodeficiencia variable común o hipogammaglobulinemia y se caracteriza por una reducción significativa en el peso de las vellosidades. La eficacia terapéutica del tratamiento con el análogo del GLP-2 se puede controlar mediante biopsia entérica para examinar la morfología de la vellosidad, por valoración bioquímica de

60

65

la absorción de nutrientes, por la ganancia de peso del paciente, o por la mejora de los síntomas asociados a estas dolencias.

5 **[0114]** Otras dolencias que se pueden tratar con los análogos del GLP-2 de la invención, o para las que los análogos del GLP-2 pueden ser profilácticamente útiles, incluyen además de las enteritis por radiación anteriormente mencionadas, enteritis infecciosas o post-infecciosas, y daños del intestino delgado debido a agentes quimioterapéuticos o tóxicos para el tratamiento del cáncer.

10 **[0115]** Los análogos del GLP-2 también se pueden usar para el tratamiento de la desnutrición, por ejemplo, caquexia y anorexia.

15 **[0116]** Una realización particular de la invención se refiere al uso de los presentes péptidos para la prevención y/o tratamiento del daño y la disfunción intestinal. Dicho daño y disfunción es un efecto secundario muy conocido del tratamiento de quimioterapia contra el cáncer. La administración de quimioterapia normalmente está asociada a efectos secundarios no deseados relacionados con el sistema gastrointestinal tales como mucositis, diarrea, translocación bacteriana, malabsorción, calambres abdominales, sangrado gastrointestinal y vómitos. Estos efectos secundarios son consecuencias clínicas del daño estructural y funcional del epitelio intestinal y frecuentemente hace necesario reducir la dosis y la frecuencia de la quimioterapia. La administración de los presentes agonistas del péptido GLP-2 puede aumentar el efecto trófico en las criptas intestinales y proporcionar rápidamente nuevas células para reemplazar el epitelio intestinal dañado después de la quimioterapia. El objetivo último conseguido con la administración de los presentes péptidos es reducir la morbilidad relacionada con el daño gastrointestinal de pacientes sometidos a tratamiento de quimioterapia mientras se crea el régimen de quimioterapia más óptimo para el tratamiento del cáncer. Se puede proporcionar tratamiento profiláctico o terapéutico simultáneo según la presente invención a pacientes sometidos o a punto de ser sometidos a terapia de radiación.

25 **[0117]** Los citoblastos de la mucosa del intestino delgado son particularmente susceptibles a los efectos citotóxicos de la quimioterapia debido a su elevada tasa de proliferación (Keefe y col., Gut 2000; 47: 632-7). El daño inducido por quimioterapia en la mucosa del intestino delgado a menudo se denomina clínicamente mucositis gastrointestinal y se caracteriza por el deterioro de la absorción y como barrera del intestino delgado. Por ejemplo, se ha demostrado que los agentes quimioterapéuticos usados de forma generalizada, el 5-FU, el irinotecán y el metotrexato incrementan la apoptosis que da lugar a la atrofia de la vellosidad y la hipoplasia de la cripta en el intestino delgado de roedores (Keefe y col., Gut 47: 632-7, 2000; Gibson y col., J Gastroenterol Hepatol. Sep; 18(9):1095-1100, 2003; Tamaki y col., J Int Med Res. 31(1):6-16, 2003). Se ha demostrado que los agentes quimioterapéuticos incrementan la apoptosis en las criptas intestinales a las 24 horas de su administración y posteriormente reducen el área de las vellosidades, la longitud de la cripta, las cuentas mitóticas por cripta, y la altura del enterocito tres días después de la quimioterapia en seres humanos (Keefe y col., Gut 2000; 47: 632-7). Así, cambios estructurales dentro del intestino delgado producen directamente una disfunción intestinal y en algunos casos diarrea.

40 **[0118]** La mucositis gastrointestinal después de quimioterapia contra el cáncer es un problema creciente que resulta esencialmente intratable una vez establecido, aunque remite gradualmente. Estudios realizados con fármacos citostáticos para el tratamiento del cáncer usados habitualmente, el 5-FU y el irinotecán, han demostrado que una quimioterapia eficaz con estos fármacos afecta predominantemente a la integridad y la función estructurales del intestino delgado, mientras que el colon es menos sensible y responde principalmente con la formación de moco (Gibson y col., J Gastroenterol Hepatol. Sep; 18(9):1095-1100, 2003; Tamaki y col., J Int Med Res. 31(1):6-16, 2003).

50 **[0119]** Los nuevos análogos del GLP-2 de la presente invención pueden ser útiles en el tratamiento y/o prevención de lesiones gastrointestinales y de los efectos secundarios de agentes quimioterapéuticos. Esta aplicación terapéutica potencialmente importante se puede aplicar a agentes quimioterapéuticos usados actualmente tales como, pero no limitado a: 5-FU, Altretamina, Bleomicina, Busulfán, Capecitabina, Carboplatino, Carmustina, Clorambucilo, Cisplatino, Cladribina, Crisantaspasa, Ciclofosfamida, Citarabina, Dacarbazina, Dactinomicina, Daunorubicina, Docetaxel, Doxorubicina, Epirubicina, Etopósido, Fludarabina, Fluorouracilo, Gemcitabina, Hidroxicarbamida, Idarubicina, Ifosfamida, Irinotecán, Doxorubicina liposomal, Leucovorina, Lomustina, Melfalán, Mercaptopurina, Mesna, Metotrexato, Mitomicina, Mitoxantrona, Oxaliplatino, Paclitaxel, Pemetrexed, Pentostatina, Procarbazina, Raltitrexed, Estreptozocina, Tegafur-uracilo, Temozolomida; Thiotepa, Tioguanina/Thioguanina, Topotecán, Treosulfán, Vinblastina, Vincristina, Vindesina, Vinorelbina, Bleomicina, Busulfán, Capecitabina, Carboplatino, Carmustina, Clorambucilo, Cisplatino, Cladribina, Crisantaspasa, Ciclofosfamida, Citarabina, Dacarbazina, Dactinomicina, Daunorubicina, Docetaxel, Doxorubicina, Epirubicina, Etopósido, Fludarabina, Fluorouracilo, Gemcitabina, Hidroxicarbamida, Idarubicina, Ifosfamida, Irinotecán, Doxorubicina liposomal, Leucovorina, Lomustina, Melfalán, Mercaptopurina, Metotrexato, Mitomicina, Mitoxantrona, Oxaliplatino, Paclitaxel, Pemetrexed, Pentostatina, Procarbazina, Raltitrexed, Estreptozocina, Tegafur-uracilo, Temozolomida, Thiotepa, Tioguanina/Thioguanina, Topotecán, Treosulfán, Vinblastina, Vincristina, Vindesina, y Vinorelbina.

65 **[0120]** Está contemplado que los presentes péptidos se puedan emplear en un procedimiento para el tratamiento de neonatos administrando una cantidad eficaz de un análogo del GLP-2, o una de sus sales. Las

complicaciones con la administración a neonatos debida a la falta de desarrollo del intestino se pueden superar usando los presentes agonistas del péptido.

5 [0121] En otra realización la invención describe un procedimiento para el tratamiento de dolencias mediadas por la DDP-IV (dipeptidilpeptidasa-IV) administrando a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un análogo del GLP-2, o una de sus sales. Dichas enfermedades incluyen dolencias en las que la enzima DDP-IV está expresada en exceso.

10 [0122] En una realización la composición farmacéutica se puede formular para provocar una liberación lenta de dicho análogo del GLP-2, o una de sus sales o derivados como se ha descrito anteriormente.

### **Ejemplos**

15 [0123] Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar aspectos preferidos de la invención y no se pretende que limiten el alcance de la misma.

#### **Síntesis general de péptidos**

##### *Aparatos y estrategia sintética*

20 [0124] Los péptidos se sintetizaron en discontinuo en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para la filtración usando 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) como grupo N- $\alpha$ -amino-protector y grupos de protección habituales adecuados para las funciones de las cadenas laterales.

##### *Disolventes*

25 [0125] El disolvente DMF (N,N-dimetilformamida, Riedel de-Häen, Alemania) se purificó pasándolo a través de una columna rellena con una resina de intercambio de cationes fuerte (Lewatit S 100 MB/H, ácido fuerte, Bayer AG Leverkusen, Alemania) y analizada para aminas libres antes de su uso con la adición de 3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazina (Dhbt-OH) dando lugar a un color amarillo (anión Dhbt-O<sup>-</sup>) si hay aminas libres. El disolvente DCM (diclorometano, grado analítico, Riedel de-Häen, Alemania) se usó directamente sin purificación. El acetonitrilo (grado HPLC, Lab-Scan, Dublín, Irlanda) se usó directamente sin purificación.

##### *Aminoácidos*

35 [0126] Los aminoácidos Fmoc-prottegidos se adquirieron en Advanced ChemTech (ACT) en formas con las cadenas laterales convenientemente protegidas.

##### *Reactivos de acoplamiento*

40 [0127] El reactivo de acoplamiento diisopropilcarbodiimida (DIC) se adquirió en Riedel de-Häen, Alemania.

##### *Soportes sólidos*

45 [0128] Los péptidos se sintetizaron sobre resinas TentaGel S 0,22-0,31 mmol/g. Se usaron las resinas TentaGel S-Ram, TentaGel S RAM-Lys(Boc)Fmoc (Rapp polymere, Alemania) en los casos en los que se prefería un péptido C-terminal amidado, mientras que se usaron las resinas TentaGel S PHB, TentaGel S PHB Lys(Boc)Fmoc cuando se prefería un péptido C-terminal con un ácido carboxílico libre.

##### *Catalizadores y otros reactivos*

50 [0129] La diisopropiletilamina (DIEA) se adquirió en Aldrich, Alemania, la piperidina y la piridina en Riedel-de Häen, Frankfurt, Alemania. El etanoditiol se adquirió en Riedel-de Häen, Frankfurt, Alemania. La 3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazina (Dhbt-OH), y el 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) (HOAt) se obtuvieron de Fluka, Suiza. El anhídrido acético se obtuvo de Fluka.

##### *Procedimientos de acoplamiento*

60 [0130] Los aminoácidos se acoplaron como ésteres de HOBT o HOAt generados *in situ* preparados a partir de los aminoácidos N- $\alpha$ -prottegidos apropiados y HOBT o HOAt por medio de DIC en DMF. Las acilaciones se verificaron con la prueba de la ninhidrina realizada a 80°C con el fin de prevenir la desprotección del Fmoc durante la prueba (Larsen, B. D. y Holm, A., Int. J. Peptide Protein Res. 43, 1994, 1-9).

##### *Desprotección del grupo protector N- $\alpha$ -amino (Fmoc).*

65 [0131] La desprotección del grupo Fmoc se llevó a cabo por tratamiento con piperidina al 20% en DMF (1 x 5

y 1 x 10 min), seguido del lavado con DMF (5 x 15 ml, 5 min cada vez) hasta que no se pudo detectar color amarillo después de la adición de Dhbt-OH a la DMF drenada.

#### 5 *Acoplamiento de los ésteres de HOBT*

**[0132]** Se disolvieron 3 equivalentes del aminoácido N- $\alpha$ -amino protegido en DMF junto con 3 equivalentes de HOBT y 3 eq de DIC y a continuación se añadió a la resina.

#### 10 *Escisión del péptido de la resina con un ácido*

**[0133]** Los péptidos se escindieron de la resina por tratamiento con ácido trifluoroacético al 95% (TFA, Riedel-de Hën, Frankfurt, Alemania) y agua v/v o con TFA al 95% y etanoditiol al 5% v/v a temperatura ambiente durante 2 h. Las resinas filtradas se lavaron con TFA al 95%-agua y los filtrados y los lavados se evaporaron a presión reducida. El residuo se lavó con éter y se liofilizó en ácido acético-agua. El producto en bruto liofilizado se analizó por cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) y se identificó por espectrometría de masas (MS).

#### 15 *Síntesis del péptido en discontinuo sobre la resina TentaGel (PEG-PS).*

**[0134]** La resina TentaGel (1 g, 0,23-0,24 mmol/g) se colocó en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para la filtración. La resina se empapó en DMF (15 ml), y se trató con piperidina al 20% en DMF con el fin de eliminar el grupo Fmoc inicial sobre el enlazador de la resina TentaGel S RAM o sobre el primer aminoácido de la resina TentaGel S RAM-Lys (Boc) Fmoc. La resina se drenó y se lavó con DMF hasta que no se pudo detectar nada de color amarillo después de la adición de Dhbt-OH a la DMF drenada. Los aminoácidos según la secuencia se acoplaron como ésteres de HOBT Fmoc-protegidos preformados (3 eq.) como se ha descrito anteriormente. Se prosiguió con los acoplamientos durante 2 horas, a menos que se especifique otra cosa. La resina se drenó y se lavó con DMF (5 x 15 ml, 5 minutos cada uno) a fin de eliminar el exceso de reactivo. Todas las acilaciones se verificaron mediante la prueba de la ninhidrina como se ha descrito anteriormente. Después de que la síntesis se hubo completado el péptido-resina se lavó con DMF (3 x 15 ml, 5 minutos cada uno), DCM (3 x 15 ml, 1 minuto cada uno) y, por último, con dietiléter (3 x 15 ml, 1 minuto cada uno) y se secó sobre vacío. El péptido se escindió de la resina como se ha descrito anteriormente y el producto del péptido en bruto se analizó y se purificó como se describe a continuación.

#### 20 *Condiciones de la HPLC*

**[0135]** El análisis del HPLC por gradiente se realizó usando un sistema de HPLC de Hewlett Packard HP 1100 HPLC que consta de una bomba cuaternaria HP 1100 Quaternary Pump, un muestreador automático HP 1100 Autosampler, una columna HP 1100 Column Thermostat y un detector de múltiples longitudes de onda HP 1100 Multiple Wavelength Detector. Se usó la Hewlett Packard Chemstation para el programa informático LC (rev. A.06.01) para controlar el instrumento y la toma de datos. Se usaron las siguientes columnas y el sistema tampón del HPLC:

Columna: VYDAC 238TP5415, C-18, 5 mm, 300A 150 x 4,6 mm.

Tampones: A: 0,1% de TFA en MQW; B: 0,085% de TFA, 10% de MQW, 90% de MeCN.

Gradiente:

45 0-1,5 min 0% de B

1,5-25 min 50% de B

25-30 min 100% de B

30-35 min 100% de B

35-40 min 0% de B

50 Flujo 1, ml/min, temperatura del calentador 40°C, detección UV:  $\lambda = 215$  nm.

Purificación por HPLC del péptido en bruto.

Los productos peptídicos en bruto se purificaron en la PerSeptive Biosystems VISION Workstation. Se usó el programa informático VISION 3.0 para controlar el instrumento y la toma de datos. Se usaron las siguientes columnas y el sistema tampón de HPLC:

55 Columna: Kromasil KR 100A, 10 mm C-8, 250 x 50,8 mm.

Sistema tampón: Tampones: A: 0,1% de TFA en MQW; B: 0,085% de TFA, 10% de MQW, 90% de MeCN.

Gradiente: 0-37 min. 0-40% de B

Flujo 35 ml/min, detección UV:  $\lambda = 215$  nm y 280 nm.

#### 60 *Espectroscopía de masas*

**[0136]** Los péptidos se disolvieron en súper gradiente de metanol (Labscan, Dublín, Irlanda), agua milli-Q (Millipore, Bedford, MA) y ácido fórmico (Merck, Darmstadt, Alemania) (50:50:0,1 v/v/v) para dar concentraciones entre 1 y 10 mg/ml. Las disoluciones peptídicas (20 ml) se analizaron en el modo de polaridad positivo por ESI-TOF-MS usando un espectrómetro de masas LCT (Micromass, Manchester, RU) con una precisión de  $\pm 0,1$  m/z.

*Procedimiento sintético general*

**[0137]** En todas las síntesis se colocó la resina seca TentaGel-S-Ram (1 g, 0,22-0,31 mmol/g) en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para la filtración. La resina se empapó en DMF (15 ml), y se trató con piperidina al 20% en DMF para asegurar la presencia de grupos amino no protonados en la resina. La resina se drenó y se lavó con DMF hasta que no se pudo detectar nada de color amarillo después de la adición de Dhbt-OH a la DMF drenada. Los aminoácidos según la secuencia se acoplaron como ésteres de HOBt Fmoc-protectados preformados (3 eq.) como se ha descrito anteriormente. Se prosiguió con los acoplamientos durante 2 horas, a menos que se especifique otra cosa. La resina se drenó y se lavó con DMF (5 x 15 ml, 5 minutos cada uno) a fin de eliminar el exceso de reactivo. Todas las acilaciones se verificaron mediante la prueba de la ninhidrina realizada a 80°C. Después de que la síntesis se hubo completado, el péptido-resina se lavó con DMF (3 x 15 ml, 5 minutos cada uno), DCM (3 x 15 ml, 1 minuto cada uno) y, por último, con dietiléter (3 x 15 ml, 1 minuto cada uno) y se secó sobre vacío. El péptido se escindió de la resina como se ha descrito anteriormente y se liofilizó. Después de la purificación mediante HPLC preparativa como se ha descrito anteriormente, el producto peptídico se recogió y la identidad del péptido fue confirmada por ES-MS. Este procedimiento se utilizó para la síntesis de todos los péptidos ejemplificados a continuación.

*Compuestos sintetizados*

**[0138]** Usando las técnicas anteriores se sintetizaron los compuestos 1809 a 1861 y el compuesto de referencia 1559 (H-[Gly<sub>2</sub>]<sub>h</sub>GLP-2-OH) con los procedimientos descritos anteriormente (Tabla 1).

Tabla 1. Compuestos sintetizados

Compuesto	Secuencia	PM calc	PM hallado	pureza %	Rend*
1559	H-HGDGFSFDEMTILDNLAARDFIWLIQTKITD-NH <sub>2</sub>	3749,80	3749,16	95	5,4
1809	H-HGEGTFSDELATILDALAARDFIWLIATKTDKTKKKK-NH <sub>2</sub>	4341,42	4341,62	96	46,5
1810	H-HGEGTFSDELATILDALAARDFIWLIATKTKKKK-NH <sub>2</sub>	4010,32	4010,63	91	20
1811	H-HGDGSPSDELATILDALAARDFIWLIATKITD-NH <sub>2</sub>	3494,8	3494,13	94	44,7
1812	H-HGEGFSDELATILDNLAARDFIWLIQTKITD-NH <sub>2</sub>	3658,86	3658,3	91	8
1813	H-HGDGFSDELATILDALAARDFIWLIATKITD-NH <sub>2</sub>	3544,82	3545	95	15,9
1814	H-HGDGFSDELATILDNLAARDFIWLIATKITD-NH <sub>2</sub>	3587,83	3588	92	31
1815	H-HGEGFSDELATILDALAARDFIWLIATKITD-NH <sub>2</sub>	3558,84	3559	95	33
1818	H-HGDGFSSELATILDNLAARDFIWLIQTKTKKKK-NH <sub>2</sub>	4056,26	4056,25	92	68,3
1819	H-HGDGFSDELSTILDNLAARDFIWLIQTKTKKKK-NH <sub>2</sub>	4100,25	4100,13	92	38,7
1820	H-HGDGFSSELATILDNLAARDFIWLIWTKTKKKK-NH <sub>2</sub>	4070,28	4070,38	94	63,3
1821	H-HGDGFSDELKTILDNLAARDFIWLIQTKTKKKK-NH <sub>2</sub>	4141,32	4141,5	93	57,3
1822	H-HGOGSFTDELKTILDNLAARDFIWLIQTKTKKKK-NH <sub>2</sub>	4155,33	4155,13	94	72
1823	H-HGDGFSFTSELKTILDNLAARDFIWLIQTKTKKKK-NH <sub>2</sub>	4127,34	4127,9	95	100,3
1824	H-HGDGFSFTDELATILDNLAARDFIWLIQTKTKKKK-NH <sub>2</sub>	4098,27	4098,25	95	33,9
1825	H-HGDGFSSELATILDNLAARDFIWLIQTK-NH <sub>2</sub>	3287,69	3287,75	92	82,0
1826	H-HGDGFSDELINTILDNLAARDFIWLIQTKDKTKKKK-NH <sub>2</sub>	4456,42	4456,38	93	68,9
1827	H-HGDGFSFTDELSTILDNLAARDFIWLIQTKTKKKK-NH <sub>2</sub>	4114,27	4114,63	93	20,2
1828	H-HGDGFSFTSELSTILDNLAARDFIWLIQTKTKKKK-NH <sub>2</sub>	4086,27	4086,63	94	84,5
1829	H-HGDGFSSELSTILDNLAARDFIWLIQTKTKKKK-NH <sub>2</sub>	4072,26	4072,5	95	51,8
1830	H-HGDGFSDELSTILDNLAARDFIWLIQTK-NH <sub>2</sub>	3331,68	3331,88	94	26,4
1831	H-HGDGFSFTDELSTILDNLAARDFIWLIQTK-NH <sub>2</sub>	3345,7	3345,38	94	46,0
1832	H-HGDGFSFTSELSTILDNLAARDFIWLIQTK-NH <sub>2</sub>	3317,7	3117,88	94	17,5
1833	H-HGDGFSSELSTILDNLAARDFIWLIQTK-NH <sub>2</sub>	3303,69	3304,13	97	34,5
1834	H-HGDGFSFTSELATILDNLAARDFIWLIQTK-NH <sub>2</sub>	3301,71	3301,75	94	16,0
1835	H-HGDGFSDELKTILDNLAARDFIWLIQTK-NH <sub>2</sub>	3372,75	3373,13	94	89,7
1836	H-HGDGFSFTDELKTILDNLAARDFIWLIQTK-NH <sub>2</sub>	3386,76	3386,88	92	26,0
1839	H-HGDGFSDELATILDNLAARDFIWLIQTKDKTKKKK-NH <sub>2</sub>	4413,42	4413,88	92	18,2
1840	H-HGDGFSDELATILDNLAARDFIWLIQTKITD-NH <sub>2</sub>	3644,85	3644,88	95	21,3
1841	H-HGDGFSDELATILDNLAARDFIWLIQTK-NH <sub>2</sub>	3315,69	3315,88	91	73,6
1842	H-HGDGFSFTSELKTILDNLAARDFIWLIQTK-NH <sub>2</sub>	3358,77	3358,88	97	26,3
1843	H-HGDGFSFTDELATILDNLAARDFIWLIQTK-NH <sub>2</sub>	3329,7	3329,88	90	23,6
1844	H-HGEGTFSSELSTILDALAARDFIWLIATKTDKTKKKK-NH <sub>2</sub>	4329,42	4329,63	90	46,0
1845	H-HGEGTFSDELSTILDALAARDFIWLIATKTDKTKKKK-NH <sub>2</sub>	4357,42	4357,38	93	52,5

1846	H-HGEGFSSELSTILDALAARDFIAWLIATKIDTKKKKKK-NH <sub>2</sub>	4315,41	4315,38	90	28,8
1847	H-HGEGFSDELSTILDALAARDFIAWLIATKIDTKKKKKK-NH <sub>2</sub>	4343,4	4343,5	90	59,4
1848	H-HGEGTFSELATILDALAARDFIAWLIATKIDTKKKKKK-NH <sub>2</sub>	4313,43	4313,63	90	230,0
1849	H-HGEGFSSELA-nLDALAARDFIAWLIATKIDTKKKKKK-NH <sub>2</sub>	4299,41	4299,5	97	68,0
1850	H-HGEGFSDELKTILDALAARDFIAWLIATKIDTKKKKKK-NH <sub>2</sub>	4384,46	4384,63	93	38,0
1851	H-HGEGTFDELKTILDALAARDFIAWLIATKIDTKKKKKK-NH <sub>2</sub>	4398,48	4398,38	95	90,6
1852	H-HGEGTFSELKTILDALAARDFIAWLIATKIDTKKKKKK-NH <sub>2</sub>	4370,48	4370,63	95	63,2
1853	H-HGEGTFSELSTILDALAARDFIAWLIATKID-NH <sub>2</sub>	3560,85	3560,13	97	18,0
1854	H-HGEGTFDELSTILDALAARDFIAWLIATKID-NH <sub>2</sub>	3588,85	3589,13	96	13,5
1855	H-HGEGFSSELSTILDALAARDFIAWLIATKID-NH <sub>2</sub>	3546,84	3547	96	27,3
1856	H-HGEGFSDELSTILDALAARDFIAWLIATKID-NH <sub>2</sub>	3574,83	3575	96	18,0
1857	H-HGEGTFSELATILDALAARDFIAWLIATKID-NH <sub>2</sub>	3544,86	3544,88	94	39,3
1858	H-HGEGFSSELATILDALAARDFIAWLIATKID-NH <sub>2</sub>	3530,84	3530,88	90	43,3
1859	H-HGEGFSDELKTILDALAARDFIAWLIATKID-NH <sub>2</sub>	3615,89	3615,13	90	11,4
1860	H-HGEGTFDELKTILDALAARDFIAWLIATKID-NH <sub>2</sub>	3629,91	3629,13	92	10,9
1861	H-HGEGTFSELKTILDALAARDFIAWLIATKID-NH <sub>2</sub>	3601,91	3601,13	99	16,2

\*)Rendimiento: rendimiento/g de resina

**Ejemplo 1. Síntesis del compuesto 1846**

**[0139]** H-His-Gly-Glu-Gly-Ser-Phe-Ser-Ser-Glu-Leu-Ser-Thr-Ile-Leu-Asp-Ala-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Ile-Ala-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-NH<sub>2</sub> en TentaGel S RAM-Lys (Boc) Fmoc.

5

La resina TentaGel S RAM-Lys (Boc) Fmoc seca (0,24 mmol/g, 1 g) se colocó en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para la filtración y se trató como se describe en "Síntesis de péptidos en discontinuo sobre la resina TentaGel" hasta terminar el acoplamiento de la histidina N-terminal. Se prosiguió con todos los acoplamientos durante toda la noche. Las acilaciones se verificaron como se ha descrito previamente.

10 Después de que la síntesis se hubo completado y de la desprotección del grupo Fmoc N-terminal, el péptido se escindió de la resina como se ha descrito anteriormente. Después de la purificación mediante HPLC preparativa como se ha descrito previamente, se recogieron 28,8 mg de producto peptídico con una pureza superior al 90% y la identidad del péptido se confirmó por MS (M hallada 4315,38, M calculada 4315,41).

**15 Ejemplo 2. Síntesis del compuesto 1848**

**[0140]** H-His-Gly-Glu-Gly-Phe-Thr-Ser-Ser-Glu-Leu-Ala-Ile-Thr-Leu-Asp-Ala-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Ile-Ala-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-NH<sub>2</sub> en TentaGel S RAM-Lys (Boc) Fmoc.

20 La resina TentaGel S RAM-Lys (Boc) seca Fmoc (0,24 mmol/g, 1 g) se colocó en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para la filtración y se trató como se describe en "Síntesis de péptidos en discontinuo sobre la resina TentaGel" hasta terminar el acoplamiento de la histidina N-terminal. Se prosiguió con todos los acoplamientos durante toda la noche. Las acilaciones se verificaron como se ha descrito previamente.

25 Después de que la síntesis se hubo completado y de la desprotección del grupo Fmoc N-terminal, el péptido se escindió de la resina como se ha descrito anteriormente. Después de la purificación mediante HPLC preparativa como se ha descrito previamente, se recogieron 230 mg de producto peptídico con una pureza superior al 90% y la identidad del péptido se confirmó por MS (M hallada 4313,63, M calculada 4313,43).

**Ejemplo 3. Síntesis del compuesto 1855**

30

**[0141]** H-His-Gly-Glu-Gly-Ser-Phe-Ser-Ser-Glu-Leu-Ser-Thr-Ile-Leu-Asp-Ala-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Ile-Ala-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp-NH<sub>2</sub> en TentaGel S RAM-Asp (OtBu) Fmoc.

35 La resina TentaGel S RAM-Asp (OtBu) Fmoc seca (0,2 mmol/g, 1 g) se colocó en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para la filtración y se trató como se describe en "Síntesis de péptidos en discontinuo sobre la resina TentaGel" hasta terminar el acoplamiento de la histidina N-terminal. Se prosiguió con todos los acoplamientos durante toda la noche. Las acilaciones se verificaron como se ha descrito previamente.

40 Después de que la síntesis se hubo completado y de la desprotección del grupo Fmoc N-terminal, el péptido se escindió de la resina como se ha descrito anteriormente. Después de la purificación mediante HPLC preparativa como se ha descrito previamente, se recogieron 27,3 mg de producto peptídico con una pureza superior al 96% y la identidad del péptido se confirmó por MS (M hallada 3547, M calculada 3546,84).

**Ejemplo 4. Síntesis del compuesto 1857**

45 **[0142]** H-His-Gly-Glu-Gly-Phe-Thr-Ser-Ser-Glu-Leu-Ala-Thr-Ile-Leu-Asp-Aia-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Ile-Ala-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp-NH<sub>2</sub> en TentaGel S RAM-Asp (OtBu) Fmoc.

50 La resina TentaGel S RAM-Asp (OtBu) Fmoc seca (0,2 mmol/g, 1 g) se colocó en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para la filtración y se trató como se describe en "Síntesis de péptidos en discontinuo sobre la resina TentaGel" hasta terminar el acoplamiento de la histidina N-terminal. Se prosiguió con todos los acoplamientos durante toda la noche. Las acilaciones se verificaron como se ha descrito previamente.

55 Después de que la síntesis se hubo completado y de la desprotección del grupo Fmoc N-terminal, el péptido se escindió de la resina como se ha descrito anteriormente. Después de la purificación mediante HPLC preparativa como se ha descrito previamente, se recogieron 39,3 mg de producto peptídico con una pureza superior al 94% y la identidad del péptido se confirmó por MS (M hallada 3544,88, M calculada 3544,86).

**Ejemplo 5. Síntesis del compuesto 1846 A (sal de acetato)**

**[0143]** Intercambio de contraiones entre trifluoroacetato y acetato del compuesto 1846.

60 El producto peptídico sintético purificado del compuesto 1846 se aisló como sal de trifluoroacetato, debido a la presencia de ácido trifluoroacético (0,1% v/v) en los tampones de la HPLC utilizados para la purificación del producto peptídico sintético en bruto.

**[0144]** Con el fin de intercambiar los contraiones de trifluoroacetato por acetato, se pasó una disolución del péptido a través de una columna rellena con una resina básica de intercambio iónico fuerte sobre el acetato (Dowex 1x8). Se disuelven 365 mg del compuesto 1 en 40 ml de agua. La disolución se pasa a través de una columna que contiene 40 ml de resina básica de intercambio iónico fuerte sobre el acetato (Dowex 1x8, capacidad de 1,33 mEq/ml de resina). A continuación la resina se lava con 4 x 30 ml de agua y el eluido se recoge y se liofiliza dando como resultado 312 mg de sal de acetato con una pureza según el análisis por HPLC del 97%.

#### **Ejemplo 6. Síntesis del compuesto C 1848 (sal de cloruro)**

10

**[0145]** Intercambio de contraiones entre trifluoroacetato (TFA) y cloruro (Cl) del compuesto 1846. 100 mg del compuesto 1 se disolvieron en 50 ml de ácido clorhídrico 0,1 M y la disolución resultante se liofilizó. El remanente se disolvió en 50 ml de agua y se liofilizó de nuevo dando como resultado 80 mg de la sal de cloruro con una pureza según la HPLC del 93%.

15

#### **Ejemplo 7 - Pruebas de estabilidad química**

**[0146]** Los análogos del GLP-2 se disolvieron en agua purificada y posteriormente se diluyeron en disoluciones que contienen HCl, NaOH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Las disoluciones se incubaron a 40°C para producir los productos de hidrólisis, desamidación y oxidación. Las muestras se analizaron por RP-HPLC y el porcentaje de compuesto intacto restante se determinó como una medida de la estabilidad relativa. Los principales productos de degradación se identificaron tentativamente por LC-MS. Los péptidos utilizados se enumeran en la Tabla 3.

Tabla 2. Análogos del GLP-2 probados y comparados para su estabilidad química

Compuesto N°	Lote N°	PM monoisotópico (g/mol)	Contenido en péptido (%)	Pureza por RP-HPLC (%)
ZP1559	70.30 AB y K 1A	3749,80	90	96
ZP1820	78.651A	4070,28	80	94
ZP1834	78.901A	3301,71	88	94
ZP1846	107.071A	4315,41	80	90
ZP1848	91.581A	4313,43	80	90
ZP1849	91.601A	4299,41	79	97
ZP1855	88.491A-2-1A	3546,84	89	96
ZP1857	108.01 X-1A	3544,86	89	94
ZP1858	108.05 1A	3530,84	89	90

25

El compuesto ZP1559, Gly2-GLP-2, se utilizó como referencia para los otros análogos del GLP-2 probados. En los análogos del GLP-2, las posiciones donde la secuencia difiere del compuesto de referencia ZP1559 se muestran en negrita. Las secuencias se muestran en la Tabla 3.

30

**[0147]** Los compuestos se muestran como pares según sus secuencias y con y sin la extensión -K<sub>6</sub> C-terminal.

Tabla 3. Secuencias de Gly2-GLP-2 y análogos del GLP-2

Compuesto	Secuencia
ZP1559	HGDGS FSDEM NTILD NLAAR DFINW LIQTK ITD-OH
ZP1820	HGDGS FTSEL ATILD NLAAR DFIW LIQTK K <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub>
ZP1834	HGDGS FTSEL ATILD NLAAR DFIW LIQTK-NH <sub>2</sub>
ZP1846	HGEGS FSSEL STILD ALAAR DFIW LIATK ITD K <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub>
ZP1855	HGEGS FSSEL STILD ALAAR DFIW LIATK ITD-NH <sub>2</sub>
ZP1848	HGEGT FSSEL ATILD ALAAR DFIW LIATK ITD K <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub>
ZP1857	HGEGT FSSEL ATILD ALAAR DFIW LIATK ITD-NH <sub>2</sub>
ZP1849	HGEGS FSSEL ATILD ALAAR DFIW LIATK ITD K <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub>
ZP1858	HGEGS FSSEL ATILD ALAAR DFIW LIATK ITD-NH <sub>2</sub>

**[0148]** Los compuestos químicos utilizados en el experimento se muestran en la Tabla 4.

5 Tabla 4. Compuestos químicos y reactivos utilizados para los procedimientos analíticos

Sustancia	Calidad	Proveedor	Producto
Acetonitrilo (MeCN)	Grado HPLC	Riedel-deHaen	34851
Ácido trifluoroacético (TFA)	99,9%	Pierce	28904
Ácido fórmico (FA)	98-100%	Merck	1.00264.1000
Ácido clorhídrico HCl	"Baker Analyzed"	J.T.Baker	7088
Hidróxido Sódico NaOH	"Baker Analyzed"	J.T.Baker	7098
Peróxido de hidrógeno H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	30% p/p	Sigma-Aldrich	H1009
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	99,0%	AnalaR	103025E

**[0149]** En primer lugar el agua se desmineralizó hasta una resistencia de  $\geq 18$  M $\Omega$ cm y a continuación se pasó a través de un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EE.UU.). El agua Milli-Q purificada (MQW) por último se filtró a través de un filtro estéril de 0,22  $\mu$ m (Millipak 40 Gamma Gold, Millipore).

10

**[0150]** Los análogos del GLP-2 probados y el Gly2-GLP-2 de referencia, el ZP1559, se disolvieron en agua y posteriormente se diluyeron en una disolución que contiene HCl, NaOH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Las muestras se incubaron a 40°C para generar los productos de hidrólisis, desamidación y oxidación, respectivamente. Los compuestos se analizaron por RP-HPLC para la pureza del pico principal original y por LC-MS para la confirmación de la identidad por la masa del pico principal y los principales productos de degradación.

15

*Preparación de las disoluciones de estrés:*

**[0151]**

20 HCl 0,2 M:

4 ml de MQW y 1 ml de HCl 1 M.

NaOH 0,02 M:

4 ml de MQW y 1 ml de NaOH 0,1 M.

NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0,2 M, pH 8:se disolvieron 0,79 g de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> en 50 ml de MQW.H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1%:5,8 ml de MQW y 0,2 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%25 *Disoluciones de muestra:*

**[0152]** En primer lugar los análogos del GLP-2 se disolvieron en MQW a una concentración de 4 mg/ml y a continuación se diluyeron adicionalmente en las disoluciones de estrés en una proporción de 1:1 (por ejemplo, 125  $\mu$ l más 125  $\mu$ l). Las concentraciones finales fueron de 2 mg/ml de los análogos del GLP-2 para las condiciones de estrés con HCl 0,1 M, NaOH 0,01 M, NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0,1 M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,5%, respectivamente.

30

**[0153]** Las soluciones se incubaron a 40°C en oscuridad y se diluyeron en el eluyente A a una concentración de 0,5 mg/ml (adición de 750  $\mu$ l) antes de los análisis por RP-HPLC y LC-MS.

35

Tabla 5. Condiciones para la prueba de estrés.

Disolución	HCl 0,1 M	NaOH 0,01M	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> 0,1 M	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,5%
Temperatura (°C)	40	40	40	40
Almacenamiento (días)	12	3	6	3

RP-HPLC

**[0154]** Los análisis de RP-HPLC se realizaron en un sistema de HPLC Agilent Serie 1100 bajo el control del programa informático de la ChemStation (Revisión A.08.03 [847]) de Agilent Technologies, Inc. Los datos en bruto y los resultados de la integración de los picos se depositaron en el servidor de la ChemStore C/S mediante el uso del programa informático de Agilent Technologies Revisión B01.03.

Tabla 6. Procedimiento de la RP-HPLC.

Nombre del archivo del procedimiento	P2204071.M
Columna	Vydac 218MS52, 5 µm, 300 A, 2,1 x 250 mm
Gradiente (tiempo; % de B)	0;5, 2;5, 7;15. 25;30, 45;40, 65;50, 70;100, 73;100, 75;5, 90;5
Eluyente A	0,05% de TFA, 0,05% de FA en MQW
Eluyente B	0,05% de TFA, 0,05% de FA en MeCN
Velocidad de flujo	0,200 ml/min
Volumen de inyección	20 µl
Temperatura de la columna	25°C
Temp. del muestreador automático	4°C
Detección UV	220 nm

## LC-MS

10

**[0155]** Los análisis de la LC-MS analítica se realizaron en un instrumento de HPLC Agilent Technologies 1100 que consta de un desgasificador en línea, una bomba de gradiente cuaternario, un muestreador automático, un calentador de columna, y un detector ultravioleta. El instrumento de HPLC está conectado a un espectrómetro de masas LCT Micromass (ESI-TOF) bajo el control del programa informático Masslynx 3.5, de Micromass, Reino Unido.

15

Tabla 7. Procedimiento de la LC-MS

Nombre del archivo del procedimiento	P22_04_071_003.M
Columna	Vydac 218MS52, 5 µm, 300 A, 2,1 x 250 mm
Gradiente (tiempo; % de B)	0;5, 2;5, 7;15, 25;30, 45;40, 65;50, 70;100, 73;100, 75;5, 90;5
Eluyente A	0,05% de TFA, 0,05% de FA en MQW
Eluyente B	0,05% de TFA, 0,05% de FA en MeCN
Velocidad de flujo	0,200 ml/min
Volumen de inyección	30 µl
Temperatura de la columna	25°C
Temp. del muestreador automático	4°C
Detección UV	220 nm

Tabla 8. Configuración del MS según el SOP 22-3003

Voltaje del cono	30 V
Voltaje capilar	3,1 kV
Flujo del gas nebulizador de nitrógeno	100 U/hr
Flujo del gas de desolvatación	500 L/hr
Temperatura de desolvatación	250°C
Temperatura del bloque de la fuente	100°C

- 5 **[0156]** Los resultados se presentan en la Tabla 9 en forma de pureza del compuesto medida por RP-HPLC después de la incubación en condiciones de estrés. Esta pureza es una medida del compuesto intacto remanente después de la incubación en disoluciones de estrés, en relación a la pureza medida a T = 0. Estos resultados no tienen en cuenta los posibles productos de degradación ocultos no observados por este procedimiento de RP-HPLC analítico.
- 10 **[0157]** Los principales productos de degradación en las muestras de la prueba de estrés se identificaron tentativamente mediante el procedimiento de LC-MS. No se observó ningún isómero de los compuestos parentales ni productos de degradación secundarios con este procedimiento de LC-MS analítico. Las identificaciones tentativas se enumeran en las Tablas 11 a 15.
- 15 **[0158]** Los análogos del GLP-2 probados se enumeran como pares según sus secuencias con o sin la extensión -K<sub>6</sub> C-terminal.

Tabla 9. Pureza observada de los compuestos de prueba después de su incubación en condiciones de estrés

Análogos del GLP-2	Secuencia +/- K <sub>6</sub> C-terminal	Pureza HCl 0,1 M 12 días (%)	Pureza H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,5% 3 días (%)	Pureza NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> 0,1 M 6 días (%)
ZP1559	Referencia	57	< 5	66
ZP1820	K <sub>6</sub>	45	62	85
ZP1834	-	38	53	91
ZP1846	K <sub>6</sub>	70	64	82
ZP1855	-	85	14	97
ZP1848	K <sub>6</sub>	63	68	93
ZP1857	-	86	59	96
ZP1849	K <sub>6</sub>	64	78	86
ZP1858	-	88	60	91

- 20 **[0159]** No se presentan los resultados de los compuestos incubados en NaOH, debido a que no se pudo observar ninguna diferencia en la estabilidad. Tanto los productos de degradación como el pico principal tienen la misma masa en el análisis por LC-MS; estos compuestos probablemente sufrieron una racemización con el tiempo. Los resultados de la Tabla 9 muestran que los análogos del GLP-2 probados en general son químicamente más estables que el Gly2-GLP-2 de referencia, el ZP1559.
- 25 **[0160]** Durante la hidrólisis ácida, los análogos del GLP-2 probados son más estables que el Gly2-GLP-2 de referencia, el ZP1559, excepto para el ZP1820 y el ZP1834. Esto se debe principalmente al aminoácido Asp en posición 3. La Glu en lugar de la Asp puede minimizar la escisión entre el aminoácido 3 y 4 Asp-Gly. Los otros análogos ZP del GLP-2 probados tienen aproximadamente la misma estabilidad y con una tendencia a una estabilidad ligeramente superior para los compuestos sin el -K<sub>6</sub> C-terminal, ZP1855, ZP1857 y ZP1858. Esta diferencia se explica por el aminoácido en posición 33 Asp. En el compuesto sin el -K<sub>6</sub> C-terminal, este aminoácido es C-terminal y se produce una escisión más despacio entre el aminoácido 32 y 33 Tyr-Asp que para una escisión entre el aminoácido 33 y 34 Asp-Lys. La diferencia en la estabilidad se debe a la Asp y no al -K<sub>6</sub> C-terminal.
- 35 **[0161]** En condiciones de oxidación acelerada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, véase también las Tablas 10 y 13), los análogos del GLP-2 probados son mucho más estables que el Gly2-GLP-2 de referencia, el ZP1559. Esto es debido probablemente a la oxidación de la Met en posición 10 en el ZP1559. El ZP1855 es una excepción, que presenta una baja estabilidad inexplicable. Esto podría ser específico para el lote de ZP1855 y son necesarios estudios adicionales para explicar esto.
- 40 **[0162]** La estabilidad en condiciones que promueven la desamidación (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), los análogos del GLP-2 probados son más estables que el Gly2-GLP-2 de referencia, el ZP1559. Esto es debido probablemente a varios sitios de desamidación en ZP1559, la Asn en posición 11, 16 y 24, que no están presentes en las secuencias para los análogos del GLP-2 probados.

**Identificación tentativa de productos de degradación principales por LC-MS  
[0163]**

5 Tabla 10. Sitios de escisión principales en los análogos ZP del GLP-2 y el ZP1559 de referencia

ZP1559HGD ↓ GS	FSDEM	N ↓ TILD	NLAAR	DFINW	LIQTK	ITD-OH
ZP1820HGD ↓ GS	FTSEL	ATILD	NLAAR	DFIAW	LIQTK	K <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub>
ZP1834HGD ↓ GS	FTSEL	ATILD	NLAAR	DFIAW	LIQTK	-NH <sub>2</sub>
ZP1846HGEES	FSSEL	STILD	ALAAR	DFIAW	LIATK	ITD ↓ K <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub>
ZP1855HGEES	FSSEL	STILD	ALAAR	DFIAW	LIATK	IT ↓ D -NH <sub>2</sub>
ZP1848HGEET	FSSEL	ATILD	ALAAR	DFIAW	LIATK	ITD ↓ K <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub>
ZP1857HGEET	FSSEL	ATILD	ALAAR	DFIAW	LIATK	IT ↓ D -NH <sub>2</sub>
ZP1849HGEES	FSSEL	ATILD	ALAAR	DFIAW	LIATK	ITD ↓ K <sub>6</sub> -NH <sub>2</sub>
ZP1858HGEES	FSSEL	ATILD	ALAAR	DFIAW	LIATK	IT ↓ D -NH <sub>2</sub>

**Disoluciones sometidas a estrés por HCl  
[0164]**

10 Tabla 11. Análogos del GLP-2 incubados 12 días a 40°C en HCl 0,1 M

Análogos del GLP-2	PM medido (Da)	PM teórico (Da)	Diferencia de masa (Da)	Mayor/menor abundancia Posible sugerencia de iden.
<b>ZP1559</b>	3749,88	3749,80	+0,08	Producto principal
	3732,75	Nd	-17,13	Secundario, desamidación cíclica
	3751,88	Nd	+2,00	Secundario, desamidación 2 x
<b>ZP1820</b>	4070,13	4070,28	-0,15	Producto principal A <sup>1</sup> -A <sup>36</sup>
	4071,2,5	Nd	+1,12	Secundario, desamidación
	3761,25	3761,17	+0,08	Secundario, hidrólisis A <sup>4</sup> -A <sup>36</sup>
	2526,75	2526,56	+0,19	Secundario, hidrólisis A <sup>16</sup> -A <sup>36</sup>
	3762,25	3762,16	+0,09	Secundario, hidró. A <sup>4</sup> -A <sup>36</sup> , desa.
<b>ZP1834</b>	3302,00	3301,71	+0,29	Producto principal
	3303,00	Nd	+1,00	Secundario, desamidación
	3283,88	Nd	-18,12	Secundario, desamidación cíclica
	3302,88	Nd	+0,88	Secundario, desamidación
	2992,88	2992,60	-309,12	Principal, hidró. A <sup>4</sup> -A <sup>30</sup> , desa.
	2993,88	2993,59	-308,12	Secundario, hidrólisis A <sup>4</sup> -A <sup>30</sup>
	2993,75	2993,59	-308,25	Secundario, hidrólisis A <sup>4</sup> -A <sup>30</sup>
<b>ZP1846</b>	4315,00	4315,41	+0,59	Producto principal A <sup>1</sup> -A <sup>39</sup>
	3547,50	3547,82	-0,32	Secundario, hidrólisis A <sup>1</sup> -A <sup>33</sup>
	3934,88	3935,26	-0,38	Secundario, hidrólisis A <sup>5</sup> -A <sup>33</sup>

	2755,38	2755,70	-0,32	Secundario, hidrólisis A <sup>16</sup> -A <sup>39</sup>
	2158,25	2158,37	-0,12	Secundario, hidrólisis A <sup>22</sup> -A <sup>39</sup>
	3155,16	Nd	-1160,25	Sin sugerencia
<b>ZP1855</b>	3548,13	3546,84	+1,29	Producto principal/desamida.
	3548,13	Nd	+1,29	Secundario, desamidación
	3225,13	3223,71	+1,42	Secundario, hidró. A <sup>4</sup> -A <sup>33</sup> , desa.
	3433,13	3432,79	+0,34	Secundario, hidrólisis A <sup>1</sup> -A <sup>32</sup>
	3354,50	3352,76	+1,76	Secundario, hidró. A <sup>3</sup> -A <sup>33</sup> , desa.
<b>ZP1857</b>	3544,50	3544,86	-0,36	Producto principal A <sup>1</sup> -A <sup>33</sup>
	3430,63	3430,81	-0,18	Secundario, hidrólisis A <sup>1</sup> -A <sup>32</sup>
	3351,38	3350,78	+0,60	Secundario, hidrólisis A <sup>3</sup> -A <sup>33</sup>
	3165,50	3164,71	+0,79	Secundario, hidrólisis A <sup>5</sup> -A <sup>33</sup>
	3222,50	3221,73	+0,77	Secundario, hidrólisis A <sup>4</sup> -A <sup>33</sup>
	2830,25	2829,56	+0,69	Secundario, hidrólisis A <sup>8</sup> -A <sup>33</sup>
	3545,13	Nd	+0,63	Secundario, recemización
<b>ZP1849</b>	4299,63	4299,41	+0,22	Producto principal, A <sup>1</sup> -A <sup>39</sup>
	2755,88	2755,70	+0,18	Secundario, hidrólisis, A <sup>16</sup> -A <sup>38</sup>
	3532,00	3531,82	+0,18	Secundario, hidrólisis, A <sup>1</sup> -A <sup>33</sup>
	2158,38	2159,05 2158,37	-0,67 +0,01	Secundario, hidrólisis, A <sup>1</sup> -A <sup>21</sup> o A <sup>22</sup> -A <sup>39</sup>
	3976,88	3976,29	+0,59	Secundario, hidrólisis, A <sup>4</sup> -A <sup>39</sup>
	4105,13	4105,33	-0,20	Secundario, hidrólisis, A <sup>3</sup> -A <sup>39</sup>
	3920,50	3919,27	+1,23	Secundario, hidró., A <sup>5</sup> -A <sup>39</sup> , desa.
	1561,84	1561,73	+0,11	Secundario, hidrólisis, A <sup>1</sup> -A <sup>15</sup>
<b>ZP1858</b>	3532,13	3530,84	+1,29	Producto principal/desamida.

nd = no disponible, no se calculó ni se sugirió un PM teórico.

\* la diferencia de masa es el PM medido a partir del PM teórico para el pico principal o para el compuesto sugerido.

5 **[0165]** Los resultados de la Tabla 12 demuestran que el peso molecular medido para los análogos del GLP-2 probados y el Gly2-GLP-2 de referencia, el ZP1559, se corresponden con el peso molecular teórico.

10 **[0166]** Los productos de degradación más abundantes son los procedentes de la escisión entre los aminoácidos 3 y 4; Asp y Gly en ZP1559, ZP1820 y ZP1834. Para los compuestos ZP1846, ZP1848 y ZP1849, que presentan el -K<sub>6</sub> C-terminal, se detectaron los productos de degradación correspondientes a una pérdida del -K<sub>6</sub> C-terminal (Lys<sub>6</sub>) en posición 33-39. Para los compuestos ZP1855 y ZP1857, que no presentan el -K<sub>6</sub> C-terminal, se detectaron los productos de degradación correspondientes a una pérdida de la Asp C-terminal en posición 33.

15 **[0167]** Los productos de degradación minoritarios detectados fueron la escisión entre los aminoácidos 15 y 16 (Asp y Asn o Asp y Ala), aminoácidos 4 y 5 (Gly y Ser), aminoácidos 21 y 22 (Asp y Phe).

**Disoluciones sometidas a estrés con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**  
**[0168]**

5 Tabla 12. Análogos del GLP-2 incubados 3 días a 40°C en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,5%

Análogos del GLP-2	PM medido (Da)	PM teórico (Da)	Diferencia de Masa* (Da)	Mayor/menor abundancia posible sugerencia de iden.
<b>ZP1559</b>	n.d.	3749,80	-	Nada de producto intacto
	3766,00	Nd	+ 16,2	Principal, oxidación de M
<b>ZP1820</b>	4070,63	4070,28	- 0,35	Producto principal
	4052,38	Nd	-18,25	Principal, desamidación precursor
	4086,50	Nd	+ 15,87	Secundario, oxidación de W
	4068,75	Nd	-1,88	Secundario, desamidación 2 x
<b>ZP1834</b>	3301,75	3301,71	+ 0,04	Producto principal
	3283,75	Nd	- 18,00	Principal, desamidación precursor
	3317,88	Nd	+ 16,13	Secundario, oxidación de W
<b>ZP1846</b>	3299,75	Nd	- 2,00	Secundario, desamidación 2 x
	4315,50	4315,41	+ 0,09	Producto principal
	4331,88	Nd	+ 16,38	Secundario, oxidación de W
<b>ZP1855</b>	3547,00	3546,84	+ 0,16	Producto principal
	3481,88	Nd	- 65,12	Secundario, sin sugerencia
	3410,00	Nd	- 137,00	Secundario, A <sup>2</sup> -A <sup>33</sup>
	3563,00	Nd	+ 16,00	Secundario, oxidación de W
<b>ZP1848</b>	4313,50	4313,43	+ 0,07	Producto principal
	4329,63	Nd	+ 16,13	Secundario, oxidación de W
<b>ZP1857</b>	3545,00	3544,86	+ 0,14	Producto principal
	3408,00	Nd	- 137,00	Secundario, A <sup>2</sup> -A <sup>33</sup>
	3561,00	Nd	+ 16,00	Secundario, oxidación de W
	3479,88	Nd	- 65,12	Secundario, sin sugerencia
<b>ZP1849</b>	4299,50	4299,41	+ 0,09	Producto principal
	4315,75	Nd	+ 16,25	Secundario, oxidación de W
<b>ZP1858</b>	3531,00	3530,84	+ 0,16	Producto principal
	3394,13	Nd	-136,87	Secundario, A <sup>2</sup> -A <sup>33</sup>
	3547,00	Nd	+ 16,00	Secundario, oxidación de W
	3466,00	Nd	- 65,00	Secundario, sin sugerencia

nd = no disponible, no se calculó ni se sugirió un PM teórico.

\* la diferencia de masa es el PM medido a partir del PM teórico para el pico principal o para el compuesto sugerido.

**[0169]** Los resultados de la Tabla 13 demuestran que el peso molecular medido para los análogos del GLP-2 probados y el Gly2-GLP-2 de referencia, el ZP1559, se corresponden con el peso molecular teórico. Para ZP1559, se observa un producto de degradación principal con un PM de +16 Da, que probablemente pueden ser los productos oxidados de la Met en posición 10. Para ZP1820 y ZP1834, se observa un producto de degradación principal con un PM de +18 Da. Probablemente pueden ser la pérdida de agua en el precursor para la desamidación. Además, se observan productos secundarios con un PM de -2 Da y puede ser la desamidación en dos sitios. Se observan productos secundarios con un PM +16 Da en todos los compuestos y probablemente pueden ser la oxidación del Trp. Para los compuestos ZP1855, ZP1857 y ZP1858, que son todos sin el -K<sub>6</sub> C-terminal, se detectan productos de degradación secundarios con un PM de -137 Da y de -65 Da, correspondientes a la pérdida de His en posición 1 y un producto de degradación no identificado, respectivamente.

**Disoluciones sometidas a estrés por NaOH**

20

[0170]

Tabla 13. Análogos del GLP-2 incubados 3 días a 40°C en NaOH 0,1 M

Análogos del GLP-2	PM medido (Da)	PM teórico (Da)	Diferencia de masa* (Da)	Comentarios
ZP1559	3750,38	3749,80	+ 0,58	Sin cambios en el PM
ZP1820	4070,63	4070,28	+ 0,35	Sin cambios en el PM
ZP1834	3302,00	3301,71	+ 0,29	Sin cambios en el PM
ZP1846	4315,63	4315,41	+ 0,22	Sin cambios en el PM
ZP1855	3547,25	3546,84	+ 0,41	Sin cambios en el PM
ZP1848	4313,88	4313,43	+ 0,45	Sin cambios en el PM
ZP1857	3545,13	3544,86	+ 0,27	Sin cambios en el PM
ZP1849	4299,88	4299,41	+ 0,47	Sin cambios en el PM
ZP1858	3531,13	3530,84	+ 0,29	Sin cambios en el PM

5 nd = no disponible, no se calculó ni se sugirió un PM teórico.

\* la diferencia de masa es el PM medido a partir del PM teórico para el pico principal.

[0171] Los análisis de LC-MS muestran el mismo peso molecular en todos los picos para cada compuesto. Esto significa que los productos de degradación más abundantes son probablemente la racemización de la forma L a

10 D de uno o más aminoácidos de la secuencia. El pico principal puede ocultar entonces uno o varios productos racemizados, y por tanto no se puede determinar la pureza residual del péptido intacto. No se han detectado productos de degradación importantes de la escisión.

**Disoluciones sometidas a estrés por NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>**

15 [0172]

Tabla 14. Análogos del GLP-2 incubados 6 días a 40°C en NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0,1 M a pH 8

Análogos del GLP-2	PM medido (Da)	PM teórico (Da)	Diferencia de masa* (Da)	Mayor/menor abundancia Posible sugerencia de iden.
ZP1559	3750,00	3749,80	+ 0,20	Producto principal
	3751,13	Nd	+ 1,13	Secundario, posible desamidación
	3751,13	Nd	+ 1,13	Secundario, posible desamidación
ZP1820	4070,13	4070,28	- 0,15	Producto principal
	4070,13	Nd	- 0,15	Secundario, posible racemización
ZP1834	3302,00	3301,71	+ 0,29	Producto principal
	3302,00	Nd	+ 0,29	Secundario, posible racemización
ZP1846	4315,25	4315,41	- 0,16	Producto principal
	4315,63	Nd	+ 0,38	Secundario, posible racemización
ZP1855	3547,13	3546,84	+ 0,29	Producto principal
ZP1848	4313,75	4313,43	+ 0,32	Producto principal
ZP1857	3544,75	3544,86	-0,11	Producto principal
ZP1849	4299,50	4299,41	+ 0,09	Producto principal
ZP1858	3531,00	3530,84	+ 0,16	Producto principal

nd = no disponible, no se calculó ni se sugirió un PM teórico.

20 \* la diferencia de masa es el PM medido a partir del PM teórico para el pico principal.

[0173] Los resultados de la Tabla 14 muestran que el peso molecular medio para los análogos del GLP-2 probados y el Gly2-GLP-2 de referencia, el ZP1559, se corresponden con el PM teórico. Para el ZP1559, se observan productos de degradación secundarios con un PM de +1 Da, que probablemente pueden ser productos desamidados. Para ZP1820, ZP1834 y ZP1846, se observan productos de degradación secundarios con el mismo PM que para el compuesto principal. Probablemente pueden ser productos racemizados o de desamidación. No obstante, la resolución del MS del presente instrumento no era adecuada para confirmar o descartar esto. Además, estos productos pueden estar presentes en otros compuestos, pero no se pueden detectar ya que podrían estar ocultos bajo el pico principal.

30

[0174] Todos los presentes análogos del GLP-2 probados tienen una mejor estabilidad química comparada con el compuesto de referencia Gly2-GLP-2, ZP1559, en condiciones de estrés para la hidrólisis, oxidación y desamidación. Los compuestos 1820 y 1834 son menos estables que los seis candidatos restantes debido a la

hidrólisis ácida. La estabilidad química más alta se observó cuando el aminoácido A3 era Glu en lugar de Asp.

**[0175]** No se observaron diferencias significativas en la estabilidad química de los seis candidatos restantes, excepto una estabilidad ligeramente superior sin -K<sub>6</sub>, que se debió principalmente a un sitio lábil después de la Asp y a la pérdida de -K<sub>6</sub> en candidatos que tienen el -K<sub>6</sub> C-terminal.

**Ejemplo 8. Selección para los efectos del crecimiento intestinal de los compuestos en ratones C57BL**

**[0176]** Se determinó la capacidad de los presentes compuestos para estimular el crecimiento intestinal en ratones C57BL macho. Grupos individuales (n = 6) de ratones fueron administrados con 30 nmol/kg de cada compuesto, sc, dos veces al día durante 10 días consecutivos. Con fines comparativos a otros grupos de animales se les administró una dosis equimolar de [Gly2]GLP-2 o de vehículo (tampón fosfato salino, pH 7,4) en el mismo régimen de dosificación. 24 horas después de que se hubo administrado la última dosis del compuesto, los ratones se sacrificaron y se vació y se pesó el intestino delgado (desde el píloro hasta el ciego) y el colon (intestino distal hasta el ciego). Para corregir una ligera diferencia en el peso corporal (PC), la masa del intestino delgado (ID) y del colon se expresan en relación al PC. Se ha informado de que el compuesto de referencia no selectivo [Gly2]GLP-2 estimula el crecimiento gastrointestinal en el esófago, el estómago, el intestino delgado y el colon, y para evaluar diferencias en el patrón de crecimiento inducido por los compuestos se calculó el índice de sensibilidad del intestino delgado-colon del compuesto X como:

$$\% \text{ (ID/colon)}_X / \text{(ID/colon)}_{[\text{Gly2}]\text{GLP-2}}$$

**[0177]** Los compuestos con una sensibilidad del intestino delgado-colon superior o igual a 1,05 se consideran relativamente selectivos para el intestino delgado (Tabla 15).

**[0178]** Los compuestos con una sensibilidad del intestino delgado-colon inferior o igual a 0,95 se consideran relativamente selectivos para el colon (Tabla 15).

Tabla 15. Lista de compuestos análogos del GLP-2 selectivos

Posición																															% [Gly2]GLP-2							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30		31	32	33				
Compuesto de referencia no selectivo [Gly2]GLP-2																																						
	H	G	D	G	S	F	S	D	E	M	N	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	N	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	OH	100	100	100	100
Compuestos selectivos para el intestino delgado																																						
1844	H	G	E	G	T	F	S	S	E	L	S	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	K <sub>6</sub>	NH <sub>2</sub>	106	89	119
1845	H	G	E	G	T	F	S	D	E	L	S	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	K <sub>6</sub>	NH <sub>2</sub>	105	98	107
1846	H	G	E	G	S	F	S	E	L	S	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	K <sub>6</sub>	NH <sub>2</sub>	120	102	118	
1848	H	G	E	G	T	F	S	S	E	L	A	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	K <sub>6</sub>	NH <sub>2</sub>	109	93	117
1849	H	G	E	G	S	F	S	S	E	L	A	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	K <sub>6</sub>	NH <sub>2</sub>	109	95	115
1850	H	G	E	G	S	F	S	D	E	L	K	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	K <sub>6</sub>	NH <sub>2</sub>	103	89	116
1851	H	G	E	G	T	F	S	D	E	L	K	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	K <sub>6</sub>	NH <sub>2</sub>	109	96	114
1852	H	G	E	G	T	F	S	S	E	L	K	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	K <sub>6</sub>	NH <sub>2</sub>	106	97	109
1853	H	G	E	G	T	F	S	S	E	L	S	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	NH <sub>2</sub>	101	96	105	
1855	H	G	E	G	S	F	S	S	E	L	S	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	NH <sub>2</sub>	106	88	120	
1857	H	G	E	G	T	F	S	S	E	L	A	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	NH <sub>2</sub>	117	90	130	
1858	H	G	E	G	S	F	S	S	E	L	A	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	NH <sub>2</sub>	104	96	108	
1859	H	G	E	G	S	F	S	D	E	L	K	T	I	L	D	A	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	A	T	K	I	T	D	NH <sub>2</sub>	83	73	114	
Compuestos selectivos para el colon																																						
1830	H	G	D	G	S	F	S	D	E	L	S	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	Q	T	K		NH <sub>2</sub>	100	106	94			
1831	H	G	D	G	S	F	T	D	E	L	S	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	Q	T	K		NH <sub>2</sub>	90	102	88			
1835	H	G	D	G	S	F	S	D	E	L	K	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	Q	T	K		NH <sub>2</sub>	96	105	91			
1836	H	G	D	G	S	F	T	D	E	L	K	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	Q	T	K		NH <sub>2</sub>	94	105	90			
1839	H	G	D	G	S	F	S	D	E	L	A	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	K <sub>6</sub>	NH <sub>2</sub>	112	133	84
1840	H	G	D	G	S	F	S	D	E	L	A	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	Q	T	K	I	T	D	NH <sub>2</sub>	113	131	86	
1841	H	G	D	G	S	F	S	D	E	L	A	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	Q	T	K		NH <sub>2</sub>	113	126	90			
1843	H	G	D	G	S	F	T	D	E	L	A	T	I	L	D	N	L	A	A	R	D	F	I	A	W	L	I	Q	T	K		NH <sub>2</sub>	111	130	85			

*Resultados*

**[0179]** Los efectos del crecimiento intestinal de los presentes compuestos según la invención se determinaron basándose en la capacidad de los péptidos para incrementar la masa del ID dependiente de la dosis en relación al efecto de dosis equimolares del compuesto de referencia no selectivo [Gly2]GLP-2.

**[0180]** Los hallazgos de este estudio demuestran que variantes del GLP-2 que tengan sustituciones de aminoácidos en las posiciones 8, 16, 24 y/o 28 con respecto a la secuencia del GLP-2 de tipo natural presentan una actividad biológica incrementada comparada con [Gly2]GLP-2 en ratones C57BL.

10

**Ejemplo 9. Efecto de la dosis-respuesta de compuestos seleccionados sobre el crecimiento intestinal en ratones C57BL**

**[0181]** Se seleccionaron los compuestos 1820, 1855, 1846, 1858, 1849, 1848 y 1857 como compuestos principales puesto que estos compuestos incrementaron la masa del intestino delgado en relación al [Gly2]GLP-2 (Ejemplo 8) y presentaban una estabilidad química incrementada en relación a [Gly2]GLP-2 en condiciones de estrés (Ejemplo 7). El efecto de la dosis-respuesta de los compuestos 1820, 1855, ZP1846, 1858, 1849, 1848 y 1857 sobre la masa del intestino delgado se determinó en ratones C57BL macho. A grupos individuales (n = 6) de ratones se les administró 5, 15, 45, 135 o 405 nmol/kg de cada compuesto, s.c, dos veces al día durante tres días consecutivos. Con fines comparativos a otros grupos de animales se les administró dosis equimolares de [Gly2]GLP-2 o de vehículo (tampón fosfato salino, pH 7,4) en el mismo régimen de dosificación. 24 horas después de que se hubo administrado la última dosis del compuesto, los ratones se sacrificaron y se vació y se pesó el intestino delgado (desde el píloro hasta el ciego) para determinar el efecto sobre la masa del intestino delgado.

25 *Resultados*

**[0182]** El efecto de los compuestos 1820, 1855, 1846, 1858, 1849, 1848 y 1857 sobre la masa del intestino delgado, en comparación con el efecto del compuesto de referencia, [Gly2]GLP-2, se muestra en las Figuras 1 a 5. Para cada una de las dosis probadas el efecto de [Gly2]GLP-2 sobre la masa del intestino delgado está normalizado al 100%. Los efectos del crecimiento intestinal de los compuestos 1820, 1855, 1846, 1858, 1849, 1848 y 1857 según la invención se determinaron en base a la capacidad de los péptidos de incrementar la masa del ID de forma dependiente de la dosis en relación al efecto de dosis equimolares de [Gly2]GLP-2. Basándose en estos hallazgos podemos concluir que los análogos del GLP-2 que contienen 8 sustituciones (G2, E3, T5, L10, A11, A16, A24, A28 en relación con GLP-2 1809) dan lugar a un aumento significativo en el peso del intestino delgado en comparación con ratones tratados con [Gly2]GLP-2.

**[0183]** En particular, la sustitución de la Asp3 por Glu y la Asn16 por Ala y la Gln28 por Ala produce un incremento en el peso del intestino delgado de una manera selectiva comparada con el colon (1839 ó 1840 en comparación con 1809). Por lo tanto, la sustitución de los tres aminoácidos Asp3, Asn16 y Gln28 da como resultado un incremento selectivo en el peso del intestino delgado en relación a la masa del colon.

**[0184]** Por otra parte, la sustitución de la Asp8 por serina da como resultado un incremento adicional en la selectividad, produciendo así un incremento suplementario en el peso del intestino delgado sin afectar de manera significativa al peso del colon (1818, 1820, 1844, 1846, 1848, 1849, 1852, 1853, 1855, 1858). Las Figuras 1 a 4 muestran los resultados de experimentos en los que se muestra el efecto de la dosis-respuesta de los compuestos de ejemplo 1846, 1855, 1848, 1857, 1849 sobre la relación del ID-PC a colon-PC con respecto al compuesto de referencia [Gly2]GLP-2. Para cada una de las dosis probadas el efecto de [Gly2]GLP-2 sobre la masa del intestino delgado está normalizada al 100%. Todos los compuestos ejemplificados comparten modificaciones en las posiciones 8, 16 y/o 28 y presentan una selectividad incrementada para generar el crecimiento del intestino delgado en relación al colon.

**Ejemplo 10 - Efecto de la dosis-respuesta de los compuestos 1846, 1848, 1855 y 1857 sobre la atrofia del intestino delgado en ratones a los que se les ha administrado 5-FU.**

**[0185]** La alta velocidad de proliferación de los citoblastos del intestino delgado los convierte en dianas susceptibles a los efectos citotóxicos de los agentes quimioterapéuticos usados en terapias anticancerígenas. En consecuencia, el uso clínico del agente quimioterapéutico 5-fluorouracilo (5-FU) frecuentemente está asociado a lesiones del intestino delgado (atrofia y diarrea) en pacientes con cáncer. Ya hemos demostrado que la administración ip de 50 mg/kg de 5-FU una vez al día durante cuatro días induce una atrofia significativa del intestino delgado en ratones C57BL. Se investigó el efecto de los compuestos principales, 1846, 1848, 1855 y 1857 sobre la atrofia del intestino delgado inducida por 5-FU en ratones. Los compuestos 1846, 1848, 1855 ó 1857 fueron administrados dos veces al día durante tres días antes del 5-FU y durante cuatro días junto con la administración de

5-FU. Cada uno de los compuestos principales fue administrado a cinco dosis diferentes (5, 15, 45, 135 y 405 nmol/kg) que ya se había demostrado previamente que estimula eficazmente el crecimiento del intestino delgado en ratones sanos (ejemplo 9). Con fines comparativos, un grupo de animales fue tratado con 405 nmol/kg de [Gly2]GLP-2. Para determinar el efecto del 5-FU sobre el intestino delgado, a un grupo de animales se les administró 5-FU solo y se dejan sin tratamiento (controles de 5-FU) y a otro grupo de animales sólo se les administró el vehículo (controles de PBS).

#### Resultados

10 **[0186]** El 5-FU indujo una disminución significativa en la relación ID-PC y la longitud del ID en ratones C57BL, en comparación con los controles de PBS. El efecto de la dosis-respuesta de 1846, 1848, 1855 ó 1857 en la relación ID-PC y la longitud del ID en ratones a los que se les había administrado el 5-FU se muestra en las Figuras 6-9. También se muestra en el efecto de 405 nmol/kg de [Gly2]GLP-2. Los compuestos 1846, 1848, 1855 ó 1857 previnieron la atrofia del ID inducida por 5-FU de manera dependiente de la dosis y mantuvieron el ID-PC a niveles similares a los controles de PBS. Los compuestos ZP1848, ZP1855 y ZP1857, administrados a una dosis equimolar, fueron significativamente más eficaces que 405 nmol/kg de [Gly2]GLP-2 sobre el ID-PC. Los compuestos 1848 y 1857, fueron significativamente más eficaces que 405 nmol/kg de [Gly2]GLP-2 sobre la longitud del ID.

#### 20 **Ejemplo 11. Efecto de la dosis-respuesta de 1846 sobre la atrofia del intestino delgado y diarrea en ratas SD a las que se les había administrado 5-FU.**

**[0187]** Se investigó el efecto del candidato clínico, 1846, sobre la atrofia del intestino delgado inducida por el 5-FU y la diarrea en ratas SD. Hemos demostrado previamente que la administración i.p. de 75 mg/kg de 5-FU una vez al día durante cuatro días induce una atrofia del intestino delgado y una diarrea significativas en ratas SD. El compuesto 1846 (16, 80 y 400 nmol/kg/d, n = 20 ratas/grupo de dosis) se administró dos veces al día durante tres días antes del 5-FU y durante cuatro días junto con la administración de 5-FU. En el estudio se incluyeron los controles de 5-FU y los controles de PBS. Veinticuatro horas después de que se hubo administrado la última dosis de 1846 a un subgrupo de los animales, se sacrificaron para determinar el efecto de 1846 en la atrofia del intestino delgado. Para determinar el efecto de 1846 sobre la diarrea todos los animales fueron observados dos veces al día (mañana y tarde), durante el periodo de administración y por un período adicional de seis días. En cada período de observación a cada animal se le asigna una puntuación (0, sin diarrea, 1 (leve), manchas fecales alrededor del ano, 2 (moderado), manchas fecales en las patas traseras y la cola y 3 (severo) manchas fecales en las extremidades delanteras y el abdomen) que indica si el animal presentaba diarrea y la gravedad de la diarrea.

#### 35 Resultados

**[0188]** El 5-FU indujo una disminución significativa en la relación ID-PC y la longitud del ID y la diarrea inducida, en ratas SD, con respecto a los controles de PBS. El efecto de dosis-respuesta de 1846 sobre la atrofia del intestino delgado inducida por 5-FU y la diarrea se muestra en las Figuras 10 y 11. El compuesto 1846 previno la atrofia del intestino delgado inducida por 5-FU de manera dependiente de la dosis y mantuvo el ID-PC y la longitud del ID a niveles similares a los controles. A la dosis más alta administrada (400 nmol/kg), el compuesto 1846, redujo la incidencia y la gravedad de la diarrea en ratas a las que se les había administrado 5-FU.

#### 45 **Ejemplo 12. Efecto de la dosis-respuesta del compuesto 1846 sobre la longitud de las criptas-vellosidades y el grosor muscular en el intestino delgado de ratas SD**

**[0189]** Se investigó el efecto del candidato clínico, el compuesto 1846, sobre la longitud de las criptas-vellosidades y el grosor muscular en el intestino delgado de ratas SD. El compuesto 1846 (0,62, 3,41 ó 6,2 mg/kg/día, n = 6 ratas/grupo de dosis) se administró en forma de bolo iv, una vez al día durante cinco días consecutivos. Veinticuatro horas después de que se hubo administrado la última dosis, las ratas se sacrificaron y se realizó una biopsia de 1 cm del yeyuno (30 cm distales de la unión gástrica duodenal) y del íleon (30 cm proximal de la unión ileocecal) para su procesamiento histológico.

#### Resultados

55 **[0190]** El efecto de dosis-respuesta del compuesto 1846 sobre la longitud de las criptas-vellosidades y el grosor muscular en el yeyuno y el íleon se muestra en la Figura 12. El compuesto 1846 incrementó la longitud media de las criptas-vellosidades de manera dependiente de la dosis en el yeyuno y el grosor muscular en el íleon.

**Ejemplo 13. Efecto del compuesto 1848 sobre los marcadores de la inflamación del intestino delgado en un modelo de enfermedad de Crohn inducida por indometacina**

**[0191]** La enfermedad de Crohn es una enfermedad crónica que causa inflamación episódica del intestino delgado. Se ha investigado el efecto del análogo del GLP-2, el compuesto 1848, sobre la inflamación del intestino delgado en un modelo de enfermedad de Crohn inducida por indometacina. Previamente hemos demostrado que la administración de indometacina (sc, una vez al día durante 2 días) induce la inflamación del intestino delgado caracterizada por ulceraciones y el aumento de la citoquina pro-inflamatoria, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Para determinar el efecto de ZP1848 sobre la ulceración se administró el compuesto 1848 (8,40 y 200 nmol/kg, sc, dos veces al día (9:00 y 16:00)) durante 4 días antes de la primera dosis de indometacina y durante dos días más junto con la indometacina. Se utilizó el corticoesteroide prednisolona (10 mg/kg, po) como control positivo ya que los corticoesteroides se usan habitualmente en el tratamiento de la inflamación activa en la enfermedad de Crohn. Además, a un grupo de animales se les administró tanto el compuesto 1848 (200 nmol/kg) como la prednisolona para determinar los efectos de un tratamiento combinado. Veinticuatro horas después de que se hubo administrado la última dosis de 1848, los animales se sacrificaron, el intestino delgado se limpió con cuidado y se fijó. Para determinar la extensión de la ulceración el intestino se cortó abriéndolo a lo largo del borde antimesentérico, se suspendió en una placa de polipropileno y la superficie se tiñó con verde Alcian 3BX. Comenzando en el píloro, se escaneó el intestino delgado y se midieron la forma (circular frente a lineal) y el tamaño (úlceras circulares: diámetro, úlceras lineales: largo x ancho) de todas las úlceras con una regla estándar (resolución: 0,5 mm). Una úlcera se define como una zona que carece de la superficie epitelial. Por último, se calculó el área dañada total para cada animal con la suma de las áreas de todas las úlceras individuales.

**[0192]** Para determinar el efecto de 1848 sobre las concentraciones del TNF- $\alpha$  en el intestino delgado se administró el compuesto 1848 e indometacina como se ha descrito anteriormente. No obstante, tras sacrificarlos, el intestino delgado se divide en tres segmentos de igual longitud (proximal, medio y distal). Se midieron las concentraciones de TNF- $\alpha$  en cada uno de los segmentos individuales utilizando un kit de ELISA disponible comercialmente.

**Resultados**

**[0193]** La indometacina provocó una fuerte inducción de úlceras en el intestino delgado, en comparación con el grupo control (extensión de ulceración estimada  $333 \pm 21$  mm<sup>2</sup> frente a 10 mm<sup>2</sup>). El efecto del compuesto 1846 sobre la extensión de ulceración estimada (mm<sup>2</sup>) se muestra en la Figura 13. El tratamiento con 1848 (8 nmol/kg, 40 nmol/kg y 200 nmol/kg, disminuyó significativamente la extensión de la ulceración ( $230 \pm 12$  mm<sup>2</sup>,  $216 \pm 17$  mm<sup>2</sup>, y  $178 \pm 17$  mm<sup>2</sup>, respectivamente,  $p < 0,001$  frente a la indometacina). A la dosis más alta utilizada (200 nmol/kg) el ZP1848 fue más eficaz que el control positivo, la prednisolona ( $p < 0,05$ ).

**[0194]** La indometacina provocó un aumento de 2,9 veces aproximadamente en los niveles tisulares de TNF- $\alpha$  en el segmento proximal ( $97 \pm 14$  pg/mg de proteína) en comparación con los animales control ( $34 \pm 7$  pg/mg de proteína,  $p < 0,05$  frente a indometacina). El efecto del compuesto 1846 sobre las concentraciones del TNF- $\alpha$  en el intestino delgado se muestra en la Figura 14. El tratamiento con 1848 (8, 40 ó 200 nmol/kg) redujo significativamente los niveles tisulares de TNF- $\alpha$  ( $45 \pm 14$  pg/mg de proteína,  $44 \pm 9$  pg/mg de proteína y  $45 \pm 7$  pg/mg de proteína, respectivamente) sin una diferencia significativa entre las 3 dosis.

**[0195]** La indometacina provocó un aumento de 3,2 veces aproximadamente en los niveles tisulares de TNF- $\alpha$  en el segmento medio ( $108 \pm 9$  pg/mg de proteína) en comparación con los animales control ( $34 \pm 6$  pg/mg de proteína,  $p < 0,05$  frente a indometacina). El compuesto 1848 (40 ó 200 nmol/kg) redujo significativamente los niveles tisulares de TNF- $\alpha$ , respectivamente, ( $p < 0,05$  frente a indometacina)

**[0196]** La indometacina provocó un aumento de 1,7 veces aproximadamente en los niveles tisulares de TNF- $\alpha$  en el segmento distal ( $75 \pm 5$  pg/mg de proteína) en comparación con los animales control ( $45 \pm 3$  pg/mg de proteína,  $p < 0,05$  frente a indometacina). El compuesto 1848 tuvo un efecto inhibitorio sobre los niveles de TNF- $\alpha$  en el segmento distal, pero el efecto fue menos pronunciado que en los otros segmentos. La prednisolona por sí sola no afectó significativamente a los niveles tisulares de TNF- $\alpha$  en los 3 segmentos, pero la administración de prednisolona mejora el efecto inhibitorio del compuesto 1848 (200 nmol/kg) sobre los niveles de TNF- $\alpha$  exclusivamente en el segmento distal.

**Ejemplo 14**

60 Formulación de ZP1846, 10 mg/ml en la formulación de histidina, manitol y acetato

**[0197]**

1. Echar 800 ml (WFI) de agua en un vaso de precipitados de 1 L.

2. Pesar 13,964 g de L-histidina en un vaso y añadirlos al vaso de precipitados de 1 litro.
3. Pesar 32,200 g de manitol en un vaso y añadirlos al vaso de precipitados de 1 L.
4. Añadir 629 µl de ácido acético al 100% directamente en el vaso de precipitados de 1 litro o pesar 12,58 g de una disolución de ácido acético al 5% (p/v) y añadirlos al vaso de precipitados.
- 5 6. Rellenar hasta 950 ml aproximadamente.
7. Medir el pH y ajustar a pH 6,9-7,0 con ácido acético al 10% o histidina 0,25 M si es necesario.
8. Pesar 11,312 g de la sustancia con el principio (contenido en péptido del 88,4%) y añadirlos al vaso de precipitados.
9. Rellenar hasta 1,015 kg (= aproximadamente 1000 ml) y medir el pH, la osmolaridad y la densidad.
- 10 10. Filtrar la formulación en esterilidad a través de dos filtros estériles conectados en serie.
11. Dispensar la formulación en alícuotas de 0,5 ml en una cabina de flujo laminar en viales de 2 ml aprobados farmacéuticamente.
12. Colocar parcialmente tapones crio-desechados antes de cargarlos en un liofilizador que ha sido esterilizado y enfriado previamente a 4°C.
- 15 13. Se realiza un ciclo de liofilización durante 40,5 horas que consta de las fases de congelación, templado, secado primario y secado secundario. Los viales se tapan en atmósfera de nitrógeno, mientras se encuentran en la cámara del liofilizador.
14. Los viales se clasifican y se aplican las cápsulas y cierres.

## 20 **Ejemplo 15**

**[0198]** Formulación de ZP 1846, 10 mg/ml en histidina, arginina, manitol y trehalosa

1. Echar 800 ml (WFI) de agua en un vaso de precipitados de 1 L.
- 25 2. Pesar 6,206 g de L-histidina en un vaso y añadirlos al vaso de precipitados de 1 L.
3. Pesar 3,484 g de L-arginina en un vaso y añadirlos al vaso de precipitados de 1 L.
4. Pesar 33,46 g de manitol en un vaso y añadirlos al vaso de precipitados de 1 L.
5. Pesar 11,16 g de trehalosa en un vaso y añadirlos al vaso de precipitados de 1 L.
6. Rellenar hasta 950 ml aproximadamente.
- 30 7. Medir el pH y ajustar a pH 6,9-7,0 con ácido acético al 10% o histidina 0,25 M si es necesario.
8. Pesar 11,312 g de la sustancia con el principio (contenido en péptido del 88,4%) y añadirlos al vaso de precipitados.
9. Rellenar hasta 1,015 kg (= aproximadamente 1000 ml) y medir el pH, la osmolaridad y la densidad.
10. Filtrar la formulación en esterilidad a través de dos filtros estériles conectados en serie.
- 35 11. Dispensar la formulación en alícuotas de 0,5 ml en una cabina de flujo laminar en viales de 2 ml aprobados farmacéuticamente.
12. Colocar parcialmente tapones crio-desechados antes de cargarlos en un liofilizador que ha sido esterilizado y enfriado previamente a 4°C.
13. Se realiza un ciclo de liofilización durante 40,5 horas que consta de las fases de congelación, templado, secado primario y secado secundario. Los viales se tapan en atmósfera de nitrógeno, mientras se encuentran en la cámara del liofilizador.
- 40 14. Los viales se clasifican y se aplican las cápsulas y cierres.

## REIVINDICACIONES

1. Un análogo del péptido 2 tipo glucagón (GLP-2) representado por la fórmula general:  
 $R^1-Z^1$ -His-Gly-Gly-X3-X5-FA-X7-Ser-Glu-X10-X11-Thr-Ile-Leu-Asp-X16-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-X24-Trp-Leu-  
 5 Ile-X28-Thr-Lys-X31-X32-X33-Z<sup>2</sup>-R<sup>2</sup>  
 en donde:  
 R<sup>1</sup> es hidrógeno, alquilo C<sub>1-4</sub> (por ejemplo, metilo), acetilo, formilo, benzoilo o trifluoroacetilo  
 X3 es Glu o Asp  
 X5 es Ser o Thr  
 10 X7 es Ser o Thr  
 X10 es Met, Leu, Nle, o un aminoácido sustituto de la Met oxidativamente estable  
 X11 es Asn, Ala, Lys o Ser  
 X16 es Asn o Ala  
 X24 es Asn o Ala  
 15 X28 es Gln o Ala  
 X31 es Ile o está eliminado  
 X32 es Thr o está eliminado  
 X33 es Asp o está eliminado  
 R<sup>2</sup> es NH<sub>2</sub> u OH;  
 20 Z<sup>1</sup> y Z<sup>2</sup> están ausentes o son independientemente una secuencia de péptidos de 3-20 aminoácidos seleccionados del grupo constituido por Ala, Leu, Ser, Thr, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Met y Om; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
2. El análogo del GLP-2 de la reivindicación 1, en donde el análogo del GLP-2 tiene una identidad de  
 25 secuencia de aminoácidos de al menos el 63% con el GLP-2 (1-33) de tipo natural y tiene la actividad biológica que provoca un incremento de la masa intestinal *in vivo*.
3. El análogo del GLP-2 de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el análogo del GLP-2  
 30 comprende además una sustitución con respecto a la secuencia del GLP-2 de tipo natural en una o más de las posiciones X16, X24 y X28 y, opcionalmente, una sustitución con respecto a la secuencia del GLP-2 de tipo natural en una o más de las posiciones de X3, X5, X7, X10 y X11.
4. El análogo del GLP-2 de la reivindicación 3, en donde dicha sustitución en la posición X10 es Leu, Nle,  
 35 o un aminoácido sustituto de la Met oxidativamente estable, tal como Met(O) o Met(O)<sub>2</sub>.
5. El análogo del GLP-2 de la reivindicación 4, en donde dicha sustitución en la posición X11 es Ala, Ser  
 o Lys.
6. El análogo del GLP-2 de la reivindicación 2, en donde el análogo del GLP-2 comprende uno o más de  
 40 los siguientes grupos de sustituciones:  
 Ala16  
 Ala24  
 Ala28  
 Ala16, Ala24  
 45 Ala16, Ala28  
 Ala24, Ala28  
 Ala16, Ala24, Ala28
7. El análogo del GLP-2 de la reivindicación 3, en donde el análogo del GLP-2 comprende uno o más de  
 50 los siguientes grupos de sustituciones:  
 Glu3, Thr5, Leu10, Lys11, Ala16, 24, 28  
 Glu3, Thr5, Ser11, Leu10, Ala16, 24, 28  
 Glu3, Ser11, Leu10, Ala16, 24, 28  
 Glu3, Thr5, Leu10, Ala11, 16, 24, 28  
 55 Glu3, Leu10, Ala11, 16, 24, 28  
 Thr7, Leu10, Ser11, Ala24  
 Thr7, Leu10, Ala11, 24  
 Thr7, Leu10, Lys11, Ala24  
 Leu10, Ala11, 24  
 60 Leu10, Ser11, Ala24, o  
 una eliminación en una o más de las posiciones X31-X33.

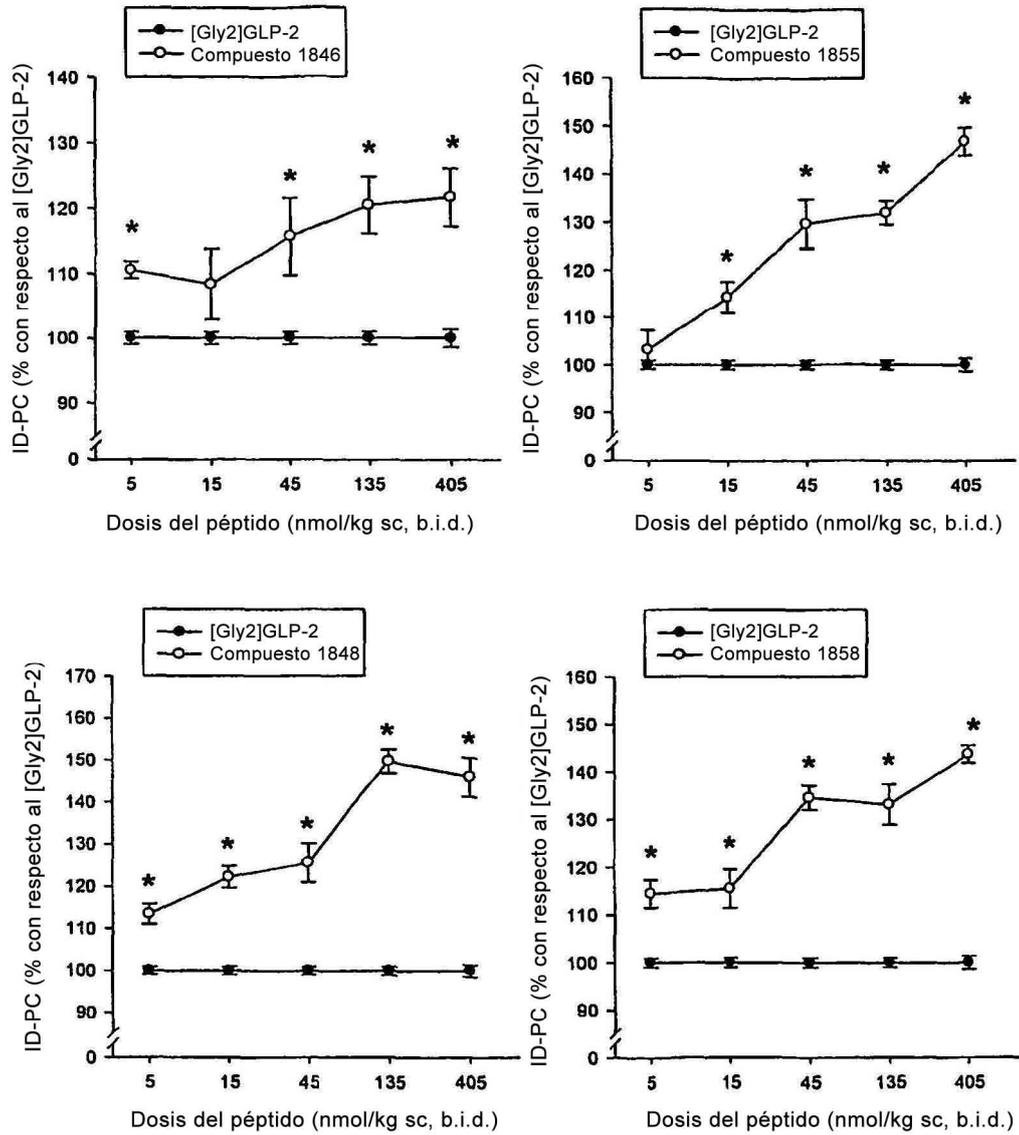
8. El análogo del GLP-2 de una de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el análogo del GLP-2 comprende una sustitución con respecto al GLP-2 de tipo natural en las posiciones X3 y/o X24.
9. El análogo del GLP-2 de la reivindicación 1, que es:  
 5 1846 H-HGEGSFSELSTILDALAARDFIAWLIATKITDKKKKKK-NH<sub>2</sub>,  
 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
10. El análogo del GLP-2 de la reivindicación 1, que es:  
 1848 H-HGEGTFSELATILDALAARDFIAWLIATKITDKKKKKK-NH<sub>2</sub>,  
 10 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
11. El análogo del GLP-2 de la reivindicación 1, que es:  
 1818 H-HGDGSFSELATILDNLAARDFIAWLIQTKKKKKKK-NH<sub>2</sub>;  
 1820 H-HGDGSFTSELATILDNLAARDFIAWLIQTKKKKKKK-NH<sub>2</sub>;  
 15 1823 H-HGDGSFTSELKTILDNLAARDFIAWLIQTKKKKKKK-NH<sub>2</sub>;  
 1825 H-HGDGSFSELATILDNLAARDFIAWLIQTK-NH<sub>2</sub>;  
 1828 H-HGDGSFTSELSTILDNLAARDFIAWLIQTKKKKKKK-NH<sub>2</sub>;  
 1829 H-HGDGSFSELSTILDNLAARDFIAWLIQTKKKKKKK-NH<sub>2</sub>;  
 1832 H-HGDGSFTSELSTILDNLAARDFIAWLIQTK-NH<sub>2</sub>;  
 20 1833 H-HGDGSFSELSTILDNLAARDFIAWLIQTK-NH<sub>2</sub>;  
 1834 H-HGDGSFTSELATILDNLAARDFIAWLIQTK-NH<sub>2</sub>;  
 1842 H-HGDGSFTSELKTILDNLAARDFIAWLIQTK-NH<sub>2</sub>;  
 1844 H-HGEGTFSELSTILDALAARDFIAWLIATKITDKKKKKK-NH<sub>2</sub>;  
 1849 H-HGEGSFSELATILDALAARDFIAWLIATKITDKKKKKK-NH<sub>2</sub>;  
 25 1852 H-HGEGTFSELKTILDALAARDFIAWLIATKITDKKKKKK-NH<sub>2</sub>;  
 1853 H-HGEGTFSELSTILDALAARDFIAWLIATKITD-NH<sub>2</sub>;  
 1855 H-HGEGSFSELSTILDALAARDFIAWLIATKITD-NH<sub>2</sub>;  
 1857 H-HGEGTFSELATILDALAARDFIAWLIATKITD-NH<sub>2</sub>;  
 1858 H-HGEGSFSELATILDALAARDFIAWLIATKITD-NH<sub>2</sub>;  
 30 1861 H-HGEGTFSELKTILDALAARDFIAWLIATKITD-NH<sub>2</sub>;  
 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
12. Un análogo del GLP-2 de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso en terapia.
- 35 13. Una composición farmacéutica que comprende un análogo del GLP-2 de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, o una de sus sales, en mezcla con un vehículo.
14. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, en donde el análogo del GLP-2 es una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable.
- 40 15. La composición farmacéutica de la reivindicación 13 o reivindicación 14, que está formulada como un líquido adecuado para su administración mediante inyección o infusión, o que está formulada para provocar la liberación lenta de dicho análogo del GLP-2.
- 45 16. El uso de un análogo del GLP-2 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de un trastorno relacionado con el estómago y el intestino.
17. El uso de la reivindicación 16, en donde el trastorno relacionado con el estómago y el intestino son úlceras, gastritis, trastornos digestivos, síndromes de malabsorción, síndrome del intestino corto, síndrome del fondo de saco, enfermedad inflamatoria del intestino, esprúe celíaco (por ejemplo, derivados de la enteropatía inducida por gluten o enfermedad celíaca), esprúe tropical, esprúe hipogammaglobulinémico, enteritis, enteritis regional (enfermedad de Crohn), colitis ulcerosa, síndrome del intestino irritable asociado a diarrea, daño del intestino delgado y síndrome del intestino corto.
- 50 18. El uso de la reivindicación 16, en donde el trastorno relacionado con el estómago y el intestino es enteritis por radiación, enteritis infecciosa o post-infecciosa, o daño del intestino delgado debido a agentes quimioterapéuticos u otros tóxicos.
- 55 19. El uso de un análogo del GLP-2 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para la preparación  
 60 de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de un efecto secundario de la quimioterapia o la radioterapia.
20. El uso de la reivindicación 19, en donde el efecto secundario es diarrea, calambres abdominales o

vómitos debidos a la quimioterapia, o daños estructurales y funcionales del epitelio intestinal como resultado de la quimioterapia o la radiación.

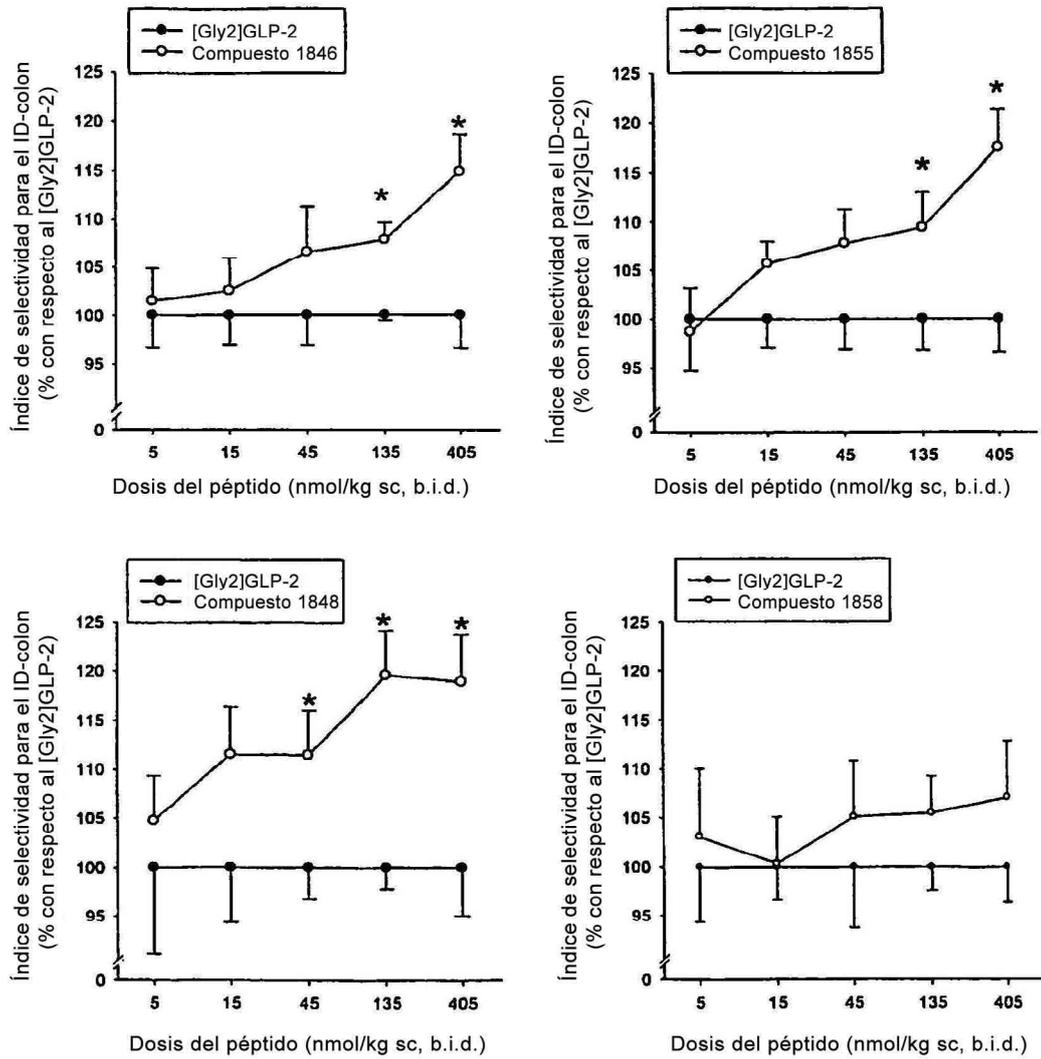
21. El uso de un análogo del GLP-2 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la función intestinal comprometida en neonatos, la osteoporosis o dolencias mediadas por la DPP-IV (dipeptidilpeptidasa-IV).  
5
22. El uso de un análogo del GLP-2 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una dolencia que implica la desnutrición.  
10
23. El uso de la reivindicación 22, en donde la dolencia que implica desnutrición es la caquexia o la anorexia.
24. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un análogo del GLP-2 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.  
15
25. Un vector de expresión que comprende la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 24, en combinación con secuencias de control para dirigir su expresión.
- 20 26. Una célula hospedadora transformada con el vector de expresión de la reivindicación 25.
27. Un procedimiento para producir el análogo del GLP-2 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, el procedimiento que comprende el cultivo de las células hospedadoras de la reivindicación 26 en condiciones adecuadas para expresar los análogos del GLP-2 y la purificación de los análogos del GLP-2 así producidos.  
25
28. Una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 24, un vector de expresión según la reivindicación 25, o una célula hospedadora según la reivindicación 26, para su uso en la terapia.
29. El uso de una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 24, un vector de expresión según la reivindicación 25, o una célula hospedadora según la reivindicación 26, en la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de un trastorno relacionado con el estómago y el intestino, o para el tratamiento y/o prevención de un efecto secundario de la quimioterapia o la radioterapia, o para el tratamiento de la función intestinal comprometida en neonatos, la osteoporosis o dolencias mediadas por la DPP-IV (dipeptidilpeptidasa-IV).  
30
30. Un análogo de GLP-2 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 24, un vector de expresión según la reivindicación 25, o una célula hospedadora según la reivindicación 26, para su uso en un procedimiento para el tratamiento y/o la prevención de un trastorno relacionado con el estómago y el intestino, para el tratamiento y/o prevención de un efecto secundario de la quimioterapia o la radioterapia, o para el tratamiento de la función intestinal comprometida en neonatos, la osteoporosis o dolencias mediadas por la DPP-IV (dipeptidilpeptidasa-IV).  
35  
40
31. El análogo del GLP-2, la molécula de ácido nucleico, el vector de expresión, o la célula hospedadora para su uso en un procedimiento para el tratamiento o la prevención según la reivindicación 30, en donde el trastorno relacionado con el estómago y el intestino son úlceras, gastritis, trastornos digestivos, síndromes de malabsorción, síndrome del intestino corto, síndrome del fondo de saco, enfermedad inflamatoria del intestino, esprúe celíaco (por ejemplo, derivados de la enteropatía inducida por gluten o enfermedad celíaca), esprúe tropical, esprúe hipogammaglobulinémico, enteritis, enteritis regional (enfermedad de Crohn), colitis ulcerosa, síndrome del intestino irritable asociado a diarrea, daño del intestino delgado y síndrome del intestino corto.  
45
32. El análogo del GLP-2, la molécula de ácido nucleico, el vector de expresión, o la célula hospedadora para su uso en un procedimiento para el tratamiento o la prevención según la reivindicación 30, en donde el trastorno relacionado con el estómago y el intestino es enteritis por radiación, enteritis infecciosa o post-infecciosa, o daño del intestino delgado debido a agentes quimioterapéuticos u otros tóxicos.  
50
33. Un análogo del GLP-2 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 24, el vector de expresión según la reivindicación 25, o la célula hospedadora según la reivindicación 26, para su uso en un procedimiento para el tratamiento o prevención de un efecto secundario de la quimioterapia o la radioterapia.  
55
34. El análogo del GLP-2, la molécula de ácido nucleico, el vector de expresión, o la célula hospedadora para su uso en un procedimiento para el tratamiento o prevención según la reivindicación 33, en donde el efecto secundario es diarrea, calambres abdominales o vómitos debidos a la quimioterapia, o daños estructurales y  
60

funcionales del epitelio intestinal como resultado de la quimioterapia o la radiación.

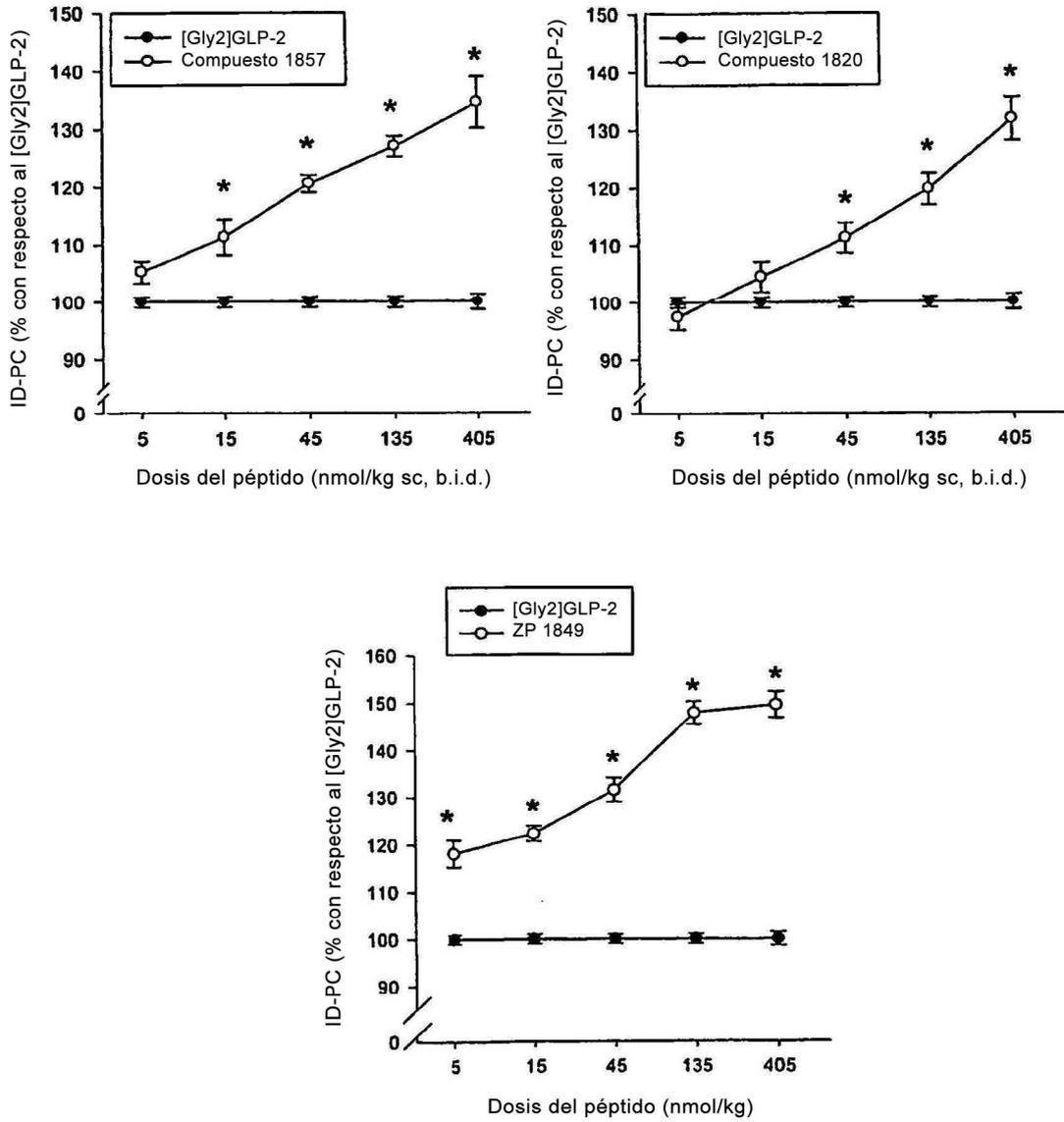
35. Un análogo del GLP-2 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 24, el vector de expresión según la reivindicación 25, o la célula hospedadora según la reivindicación 26, para su uso en un procedimiento para el tratamiento de la función intestinal comprometida en neonatos, la osteoporosis o dolencias mediadas por la DPP-IV (dipeptidilpeptidasa-IV).
36. Un kit terapéutico que comprende un fármaco para quimioterapia contra el cáncer y un análogo del GLP-2 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 24, un vector de expresión según la reivindicación 25, o una célula hospedadora según la reivindicación 26, cada uno opcionalmente en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
37. Una composición farmacéutica que comprende un fármaco para quimioterapia contra el cáncer y un análogo del GLP-2 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 24, un vector de expresión según la reivindicación 25, o una célula hospedadora según la reivindicación 26, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.



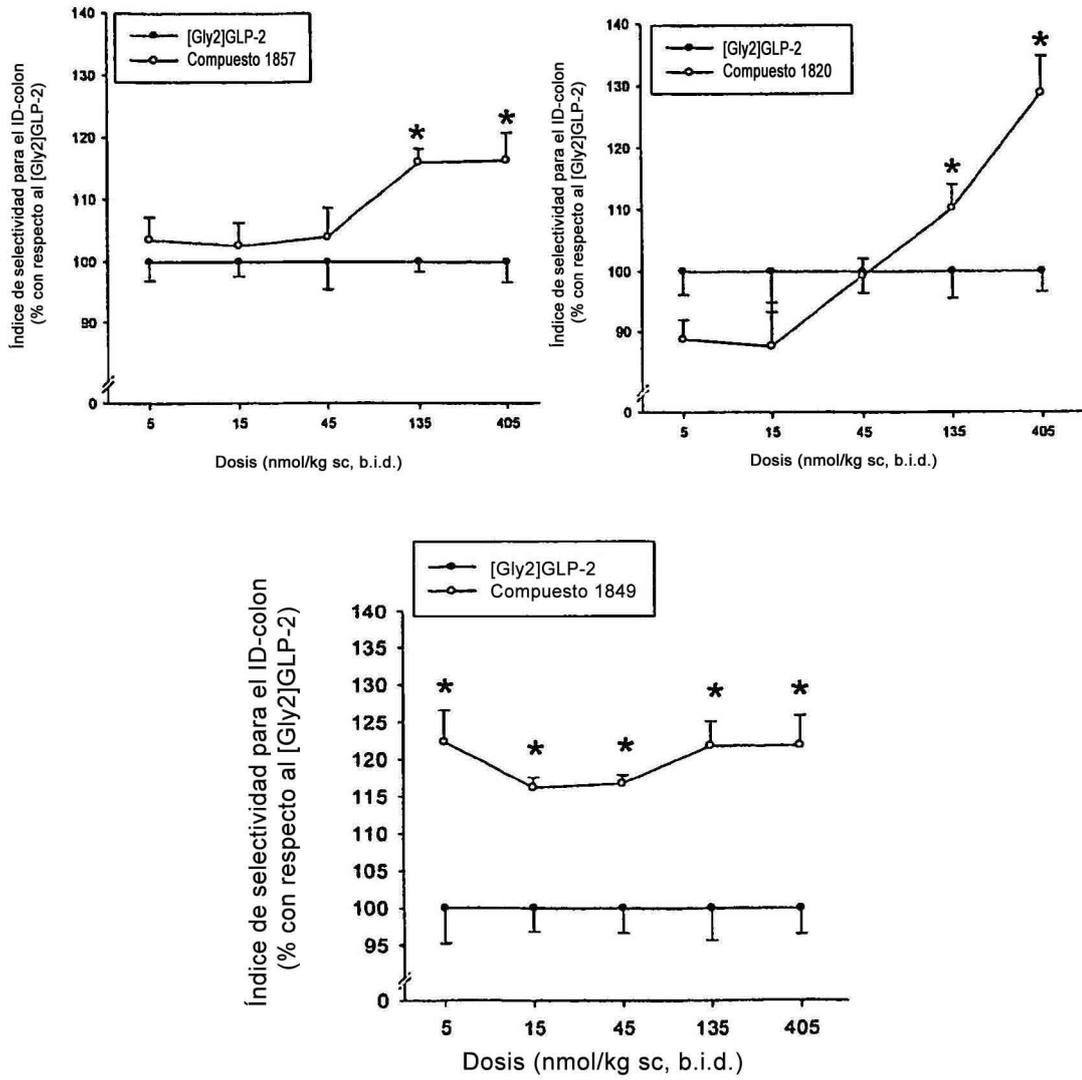
**Figura 1**



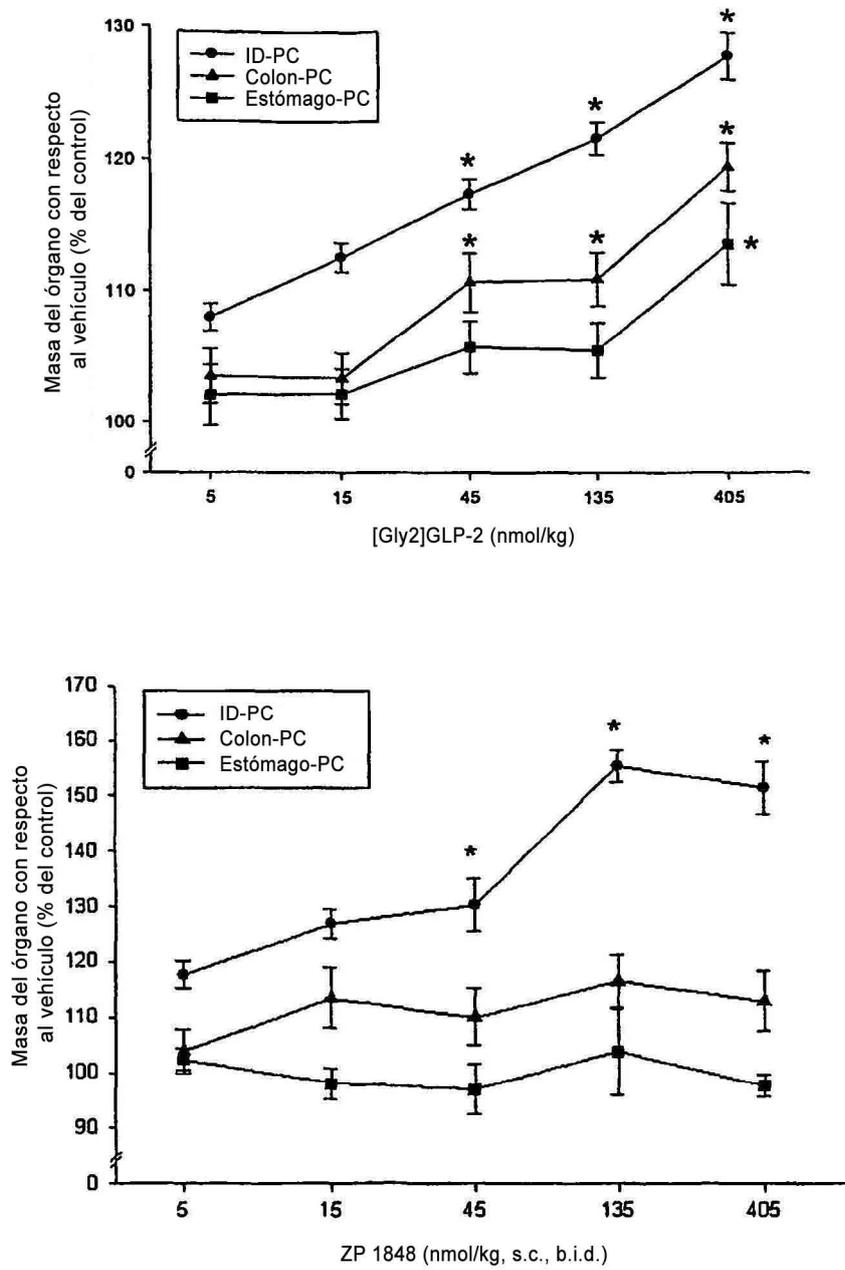
**Figura 2**



**Figura 3**

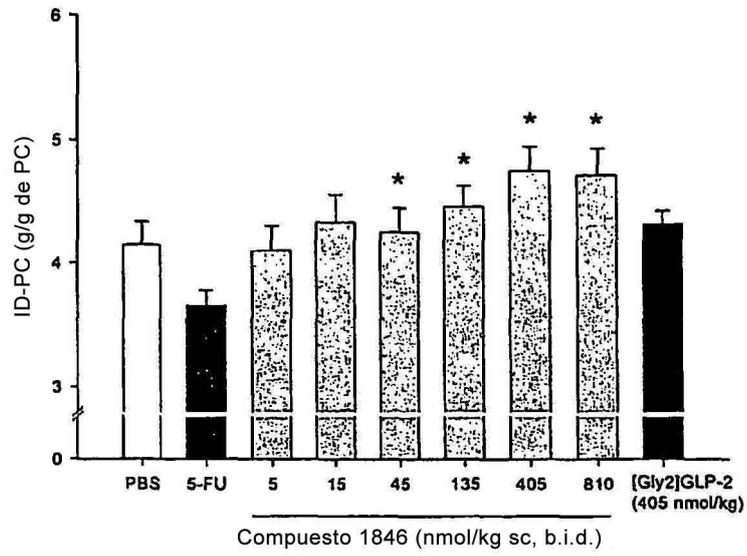


**Figura 4**

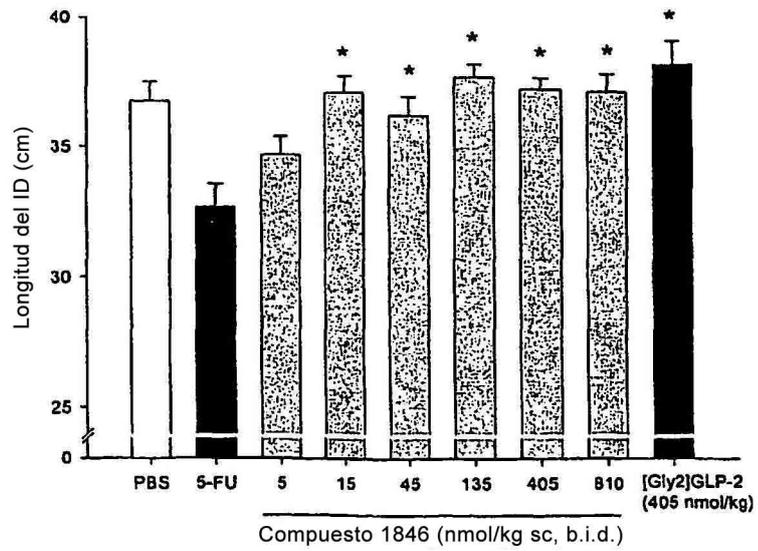


**Figura 5**

A)

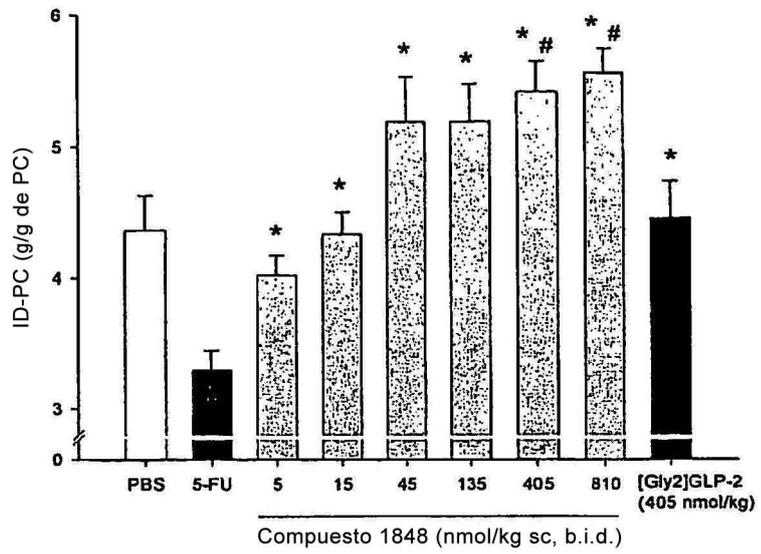


B)

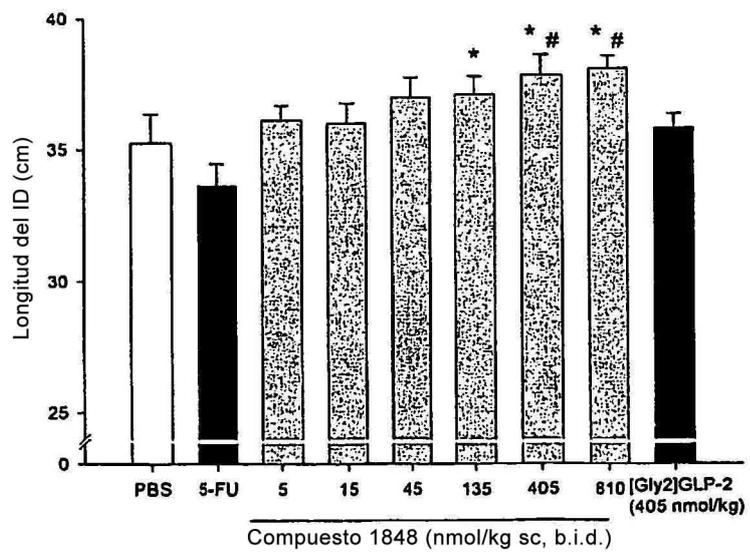


**Figura 6**

A)

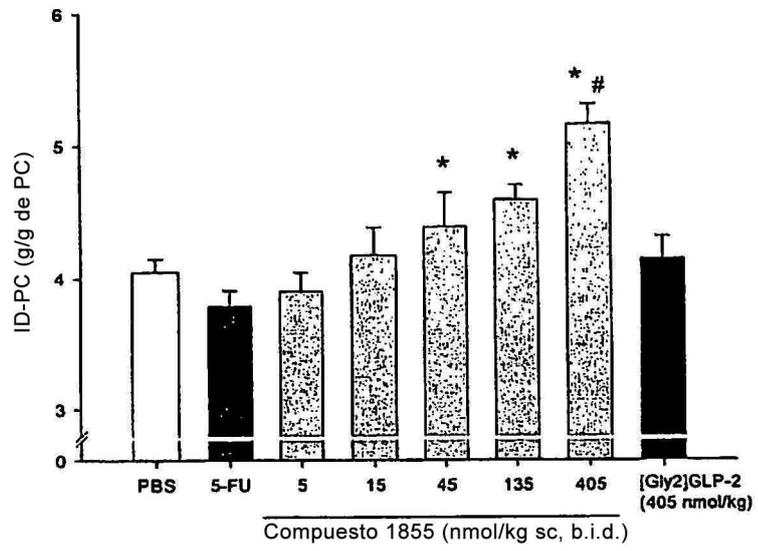


B)

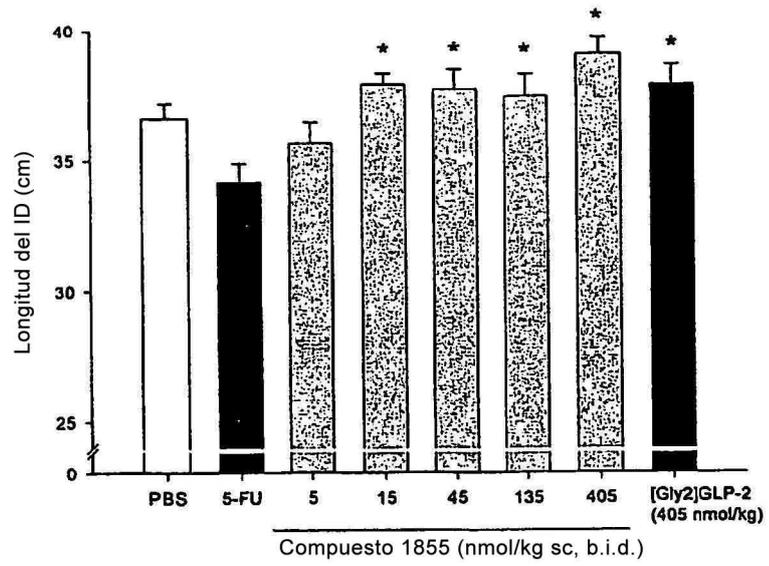


**Figura 7**

A)

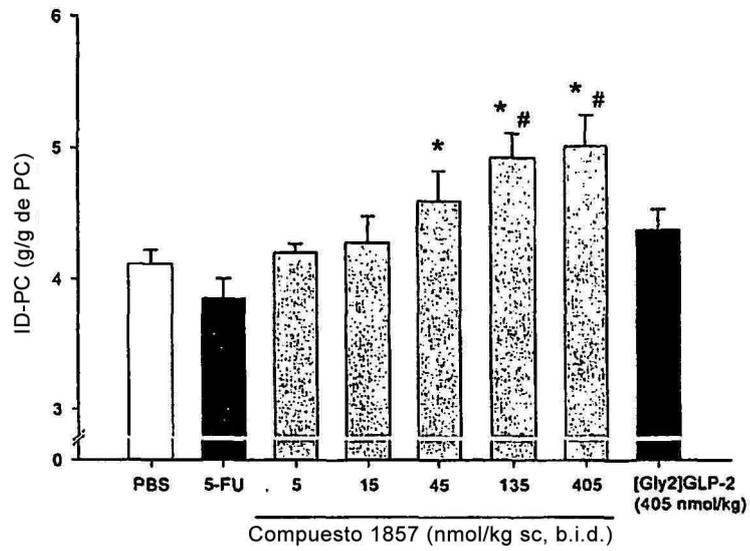


B)

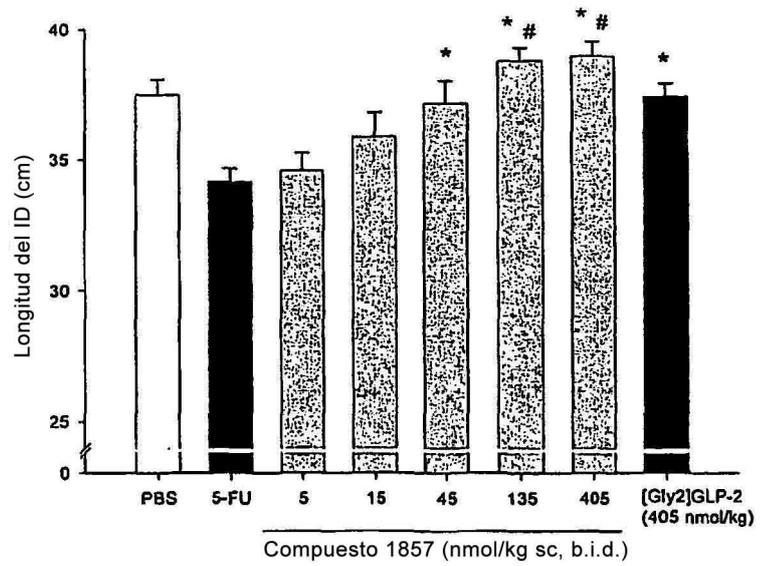


**Figura 8**

A)

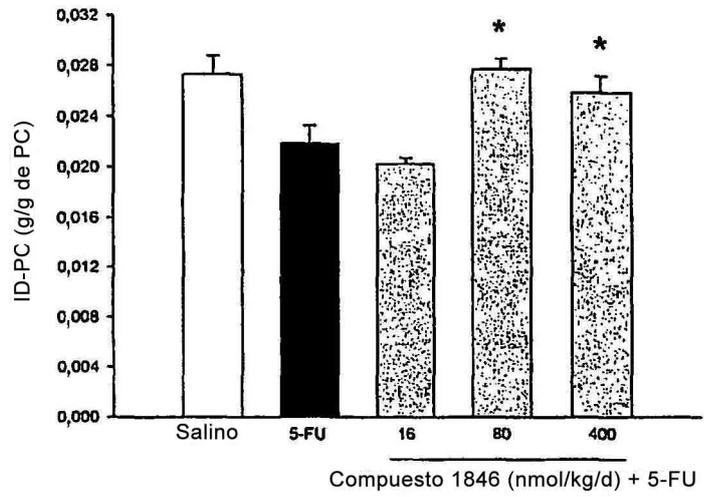


B)

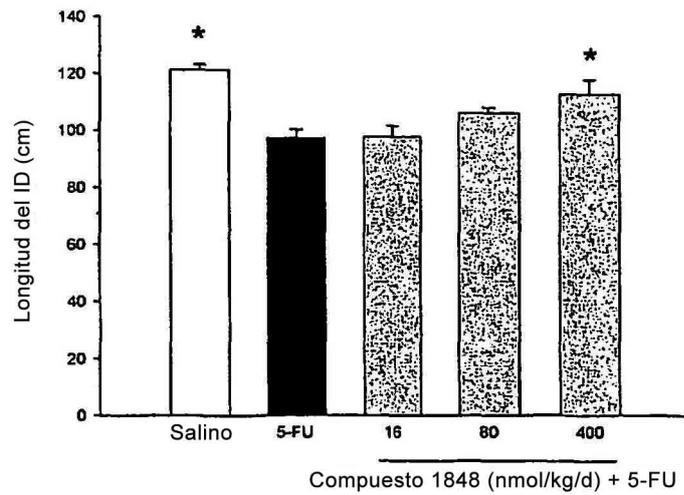


**Figura 9**

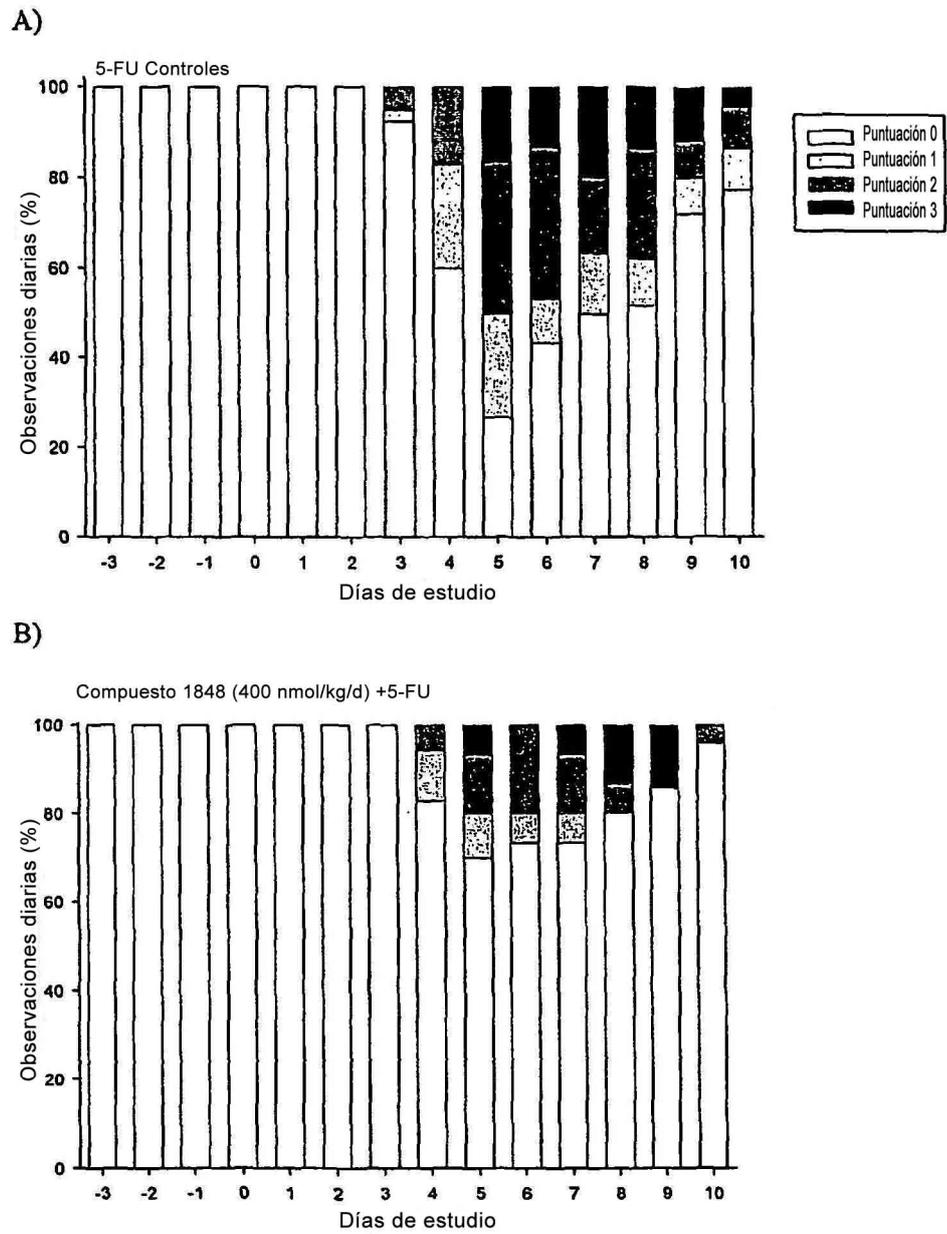
A)



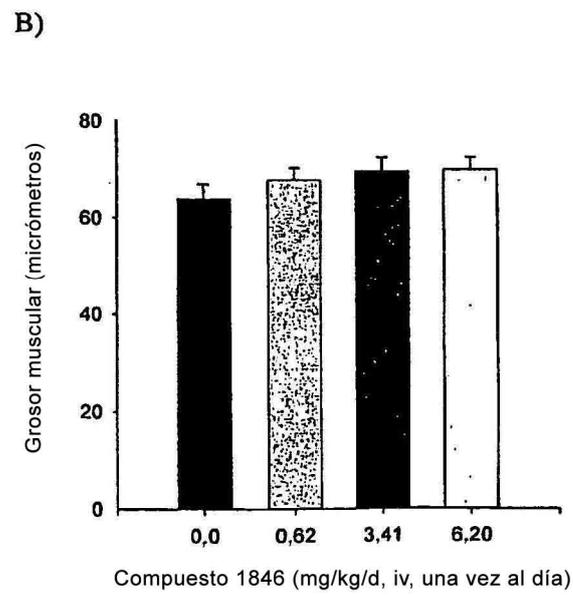
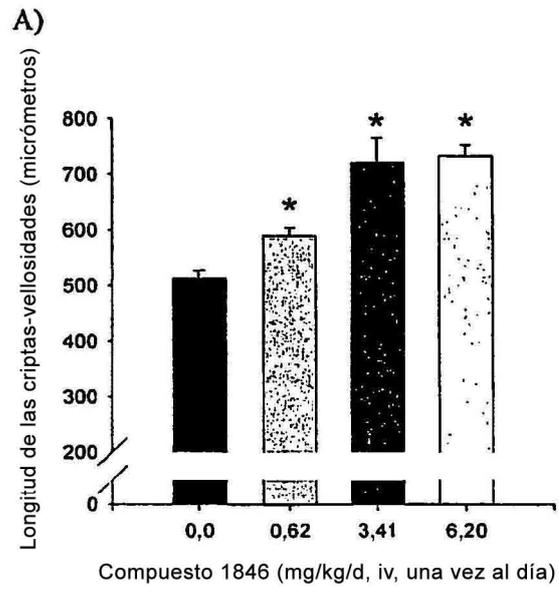
B)



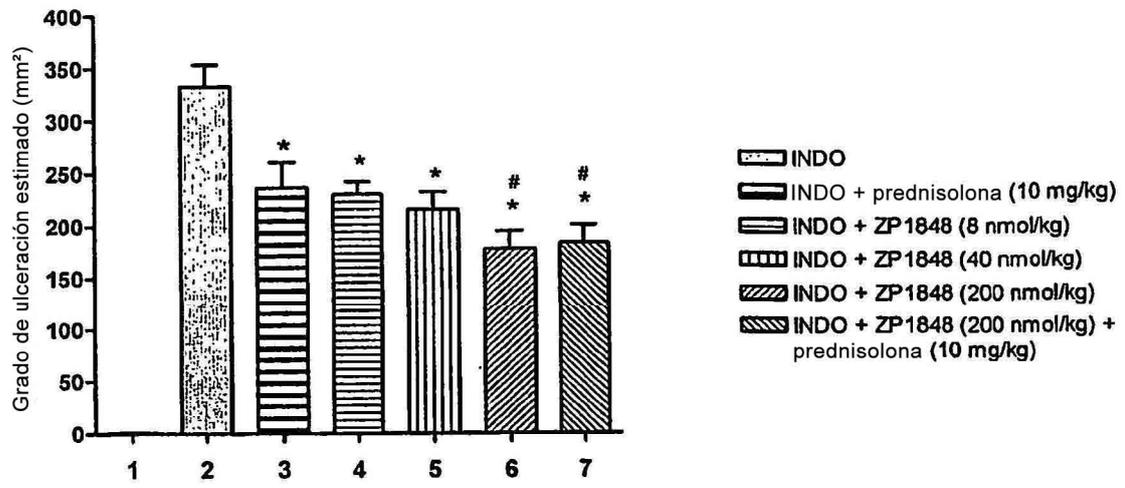
**Figura 10**



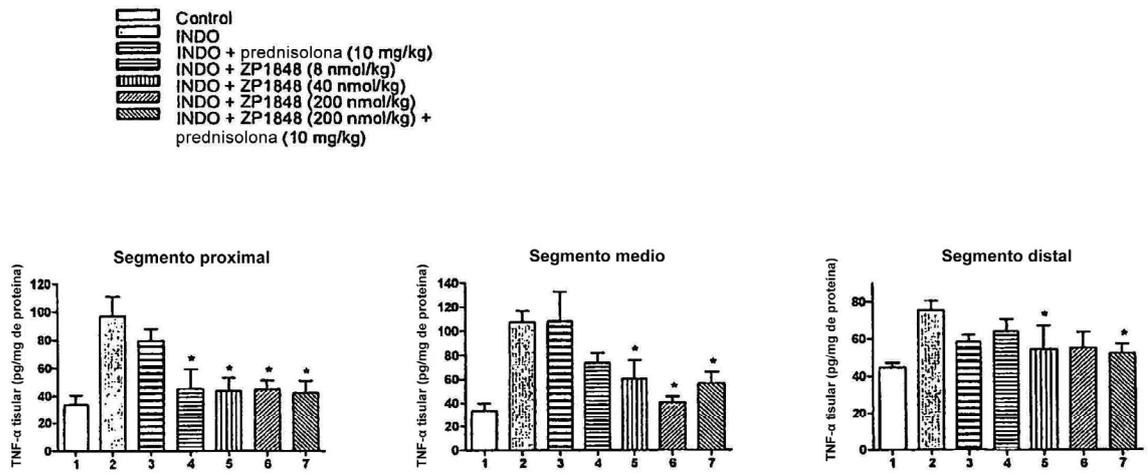
**Figura 11**



**Figura 12**



**Figura 13**



**Figura 14**