

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 289**

51 Int. Cl.:

C07K 14/605 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2005** **E 08021837 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012** **EP 2045265**

54 Título: **Polipéptidos de fusión de GLP-1 (péptido 1 de tipo glucagón) con resistencia a peptidasa incrementada**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.03.2013

73 Titular/es:

BIOCOMPATIBLES UK LTD. (100.0%)
Chapman House Farnham Business Park
Weydon Lane Farnham
Surrey GU9 8QL, GB

72 Inventor/es:

GEIGLE, PETER;
THOENES, ERIC y
WALLRAPP, CHRISTINE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 397 289 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos de fusión de GLP-1 (péptido 1 de tipo glucagón) con resistencia a peptidasa incrementada

La presente invención se refiere a nuevos miméticos de armazón de péptidos de fusión de GLP-1 que tienen extremos C prolongados, son resistentes a la inactivación por la endopeptidasa IV, se pueden expresar a niveles elevados en células animales transformadas, y p. ej. son útiles en el tratamiento de la diabetes de tipo 2.

El gen de glucagón está bien estudiado, véase p. ej. White, J.W. et al., 1986 Nucleic Acid Res. 14(12) 4719-4730. La molécula de preproglucagón como molécula precursora de elevado peso molecular se sintetiza en las células pancreáticas alfa y en las células L del yeyuno y el colon. El preproglucagón es una prohormona de 180 aminoácidos de longitud y su secuencia contiene, además de glucagón, dos secuencias de estructura relacionada: el péptido 1 de tipo glucagón (GLP-1) y el péptido 2 de tipo glucagón (GLP-2). En la molécula de preproglucagón, entre el GLP-1 y el GLP-2 se encuentra una secuencia peptídica de 17 aminoácidos (o más bien una secuencia de 15 aminoácidos más el sitio de escisión RR C terminal), péptido intermedio 2 (IP2). La secuencia del IP2 localizada entre el GLP-1 y el 2 en la molécula precursora es escindida normalmente de manera proteolítica después del aa 37 del GLP-1. El módulo de preproglucagón es por lo tanto escindido a diferentes péptidos, dependiendo de la célula, y del entorno, incluyendo GLP-1 (1-37), un péptido de 37 aminoácidos en su forma no procesada. Generalmente, este procesamiento se produce en el páncreas y en el intestino. La secuencia de GLP-1 (1-37) puede ser procesada adicionalmente de manera proteolítica en GLP-1 activo (7-37), la forma procesada de 31 aminoácidos, o GLP-1 (7-36) amida. Por consiguiente, la designación GLP-1(7-37) indica que el fragmento en cuestión comprende los residuos de aminoácido desde (e incluyendo) el número 7 hasta (e incluyendo) el número 37 cuando se cuenta a partir del extremo N terminal del péptido parental, GLP-1. La secuencia de aminoácidos de GLP-1 (7-36) amida y de GLP-1 (7-37) se proporcionan en la fórmula I:

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-X (I) que muestra GLP-1 (7-36) amida cuando X es NH₂ y GLP-1 (7-37) cuando X es Gly-OH.

GLP-1 es una hormona del intestino y es el agente insulínico endógeno más potente con acciones que incluyen la estimulación de la actividad de la adenilato ciclasa y de la proteína quinasa en las células beta. Fisiológicamente, junto con el polipéptido inhibidor gástrico de la parte superior del intestino, funciona como una hormona incretina que disminuye el nivel de glucosa en sangre. Por lo tanto, el GLP-1, secretado en respuesta a la ingesta de alimento, tiene p. ej. múltiples efectos sobre el estómago, el hígado, el páncreas y el cerebro que trabajan en concierto para regular el azúcar en sangre. Por consiguiente, el péptido 1 de tipo glucagón GLP-1 (7-36) amida, y su análogo no amidado GLP-1 (7-37) han atraído un considerable interés debido a la potencia de sus acciones sobre el metabolismo de los carbohidratos y su potencial aplicabilidad al tratamiento de la diabetes, incluyendo la diabetes de tipo 2. La diabetes de tipo 2 se caracteriza por la resistencia a la insulina, puesto que las células no responden apropiadamente cuando está presente la insulina. Este es un problema más complejo que la diabetes de tipo 1. La diabetes de tipo 2 puede pasar inadvertida durante años en un paciente antes del diagnóstico, puesto que los síntomas son típicamente más suaves (sin cetoacidosis) y pueden ser esporádicos. Sin embargo, pueden surgir graves complicaciones de la diabetes de tipo 2 inadvertida, incluyendo insuficiencia renal, y enfermedad cardíaca coronaria. Esto conduce a un incremento de la morbilidad y la mortalidad.

El GLP-1 (7-36) amida o el GLP-1 (7-37) tienen una vida en suero corta. El péptido es escindido por la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) entre los residuos 8 y 9. El péptido escindido es inactivo. De este modo el GLP-1, administrado exógenamente, tiene una vida extremadamente corta y tiene una utilidad limitada en aplicaciones terapéuticas.

Se han realizado varios intentos para sintetizar análogos estabilizados (contra DPP-IV) del GLP-1 de origen natural (GLP-1 (7-37)). En particular, el residuo 8 que in vivo es Ala, fue reemplazado por otro residuo, por ejemplo, Gly, Ser o Thr (Burcelin, R., et al. (1999) Metabolism 48, 252-258). El análogo Gly8 o G8 ha sido ampliamente sometido a ensayo, tanto como molécula sintetizada, como producida por líneas celulares diseñadas genéticamente para secretar el polipéptido mutante (Burcelin, R., et al (1999) Annals of the New York Academy of Sciences 875: 277-285). Se han introducido otras modificaciones diferentes en GLP-1 (7-37) para intensificar su estabilidad in vivo sin comprometer su actividad biológica. Sin embargo, todos estos enfoques no lograron una trascendencia terapéutica significativa debido a los considerables problemas que implicaban.

El documento 02/46227 describe las proteínas de fusión de GLP-1, que comprenden los compuestos 1 de tipo glucagón fusionados a proteínas adecuadas para prolongar la vida media in vivo de los péptidos. Concretamente, el documento WO 02/46227 describe una proteína de fusión de GLP-1 con albúmina o inmunoglobulina. De acuerdo con el documento WO 02/46227 tales proteínas se pueden utilizar para tratar la diabetes mellitus no insulino dependiente así como una variedad de otras afecciones. Sin embargo, el documento WO 02/46227 no describe proteínas de fusión que comprenden como componente (I) GLP-1 (7-35, 7-36 o 7-37) N terminal o un derivado del mismo y como componente (II) una secuencia peptídica C terminal que contiene una secuencia de acuerdo con el SEQ ID NO: 22 (RRDFPEEVAL).

Del mismo modo, la patente de los Estados Unidos US 2003/0221201 describe proteínas de fusión de transferrina y GLP-1. De un modo similar la patente de los Estados Unidos US 2003/0195154 describe una proteína de fusión de GLP-1 y transtiretina como compañero de fusión. Sin embargo, no se describen ni se sugieren más proteínas de fusión de GLP-1 en las patentes de los Estados Unidos US 2003/0221201 o US 2003/0195154, particularmente otros posibles compañeros de fusión para GLP-1, capaces de estabilizar el GLP-1 in vivo.

El documento WO 99/46283 describe un producto conjugado con péptido farmacológicamente activo que comprende una secuencia peptídica farmacológicamente activa (X), como GLP-1, y una secuencia peptídica estabilizadora (Z) de 4 a 20 residuos de aminoácido, que están unidas covalentemente a la secuencia peptídica farmacológicamente activa (X). La secuencia peptídica estabilizadora (Z) puede ser p. ej. la secuencia Lysp-Xaaq o Xaaq-Lysq, en donde p y q son números enteros en el intervalo de 1 a 14, con la condición de que p+q esté en el intervalo de 3-15, y cada Xaa se seleccione independientemente del grupo que consiste en Ser, Thr, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Arg, His, Orn, ácido 2,4-diaminobutanoico, ácido 2,3-diaminopropanoico y Met, concretamente secuencias peptídicas cortas de las fórmulas Lys3-Glu3 o Glu3-Lys3. El documento WO 99/46283 no describe proteínas de fusión que comprenden como componente (I) GLP-1 (7-35, 7-36 o 7-37) N terminal o un derivado del mismo y como componente (II) una secuencia peptídica C terminal que contiene una secuencia de acuerdo con el SEQ ID NO 22: (RRDFPEEVAI).

El documento WO 03/058203 describe un péptido de GLP-1 acoplado a un extremo C prolongado que proporciona un aumento de estabilidad. Este extremo C prolongado comprende al menos 6 aminoácidos, preferiblemente de 7 a 9 aminoácidos. El documento WO 03/058203 no describe proteínas de fusión de GLP-1 que comprenden una secuencia de acuerdo con el SEQ ID NO 22 (RRDFPEEVAI) como extremo C prolongado.

La patente de los Estados Unidos US 2004/0146985 describe una proteína de fusión de GLP-1 (7-37) que contiene múltiples copias del péptido de GLP-1 (7-37) para producir este agente terapéutico a mayor escala. La patente de los Estados Unidos US 2004/0146985 no describe una proteína de fusión de GLP-1 (7-37) que comprende como componente (I) GLP-1 (7-35, 7-36 o 7-37) N terminal o un derivado del mismo y como componente (II) una secuencia peptídica C terminal que contiene una secuencia de acuerdo con el SEQ ID NO 22: (RRDFPEEVAI).

La patente de los Estados Unidos US 5.861.284 describe péptidos de fusión de GLP-1 (7-37) y una secuencia de aminoácidos derivada del factor de crecimiento de fibroblastos en el extremo C. La invención de la patente de los Estados Unidos US 5.861.284 está dirigida particularmente a la producción de péptidos libres de cisteína, producidos por medio de una proteína de fusión que comprende una proteína que tiene cisteína en su extremo N y un péptido libre de cisteína ligado al extremo N y la posterior escisión del péptido libre de cisteína. La patente de los Estados Unidos US 5.861.284 no describe péptidos de fusión de GLP-1 (7-37) ni una secuencia peptídica que contiene una secuencia de acuerdo con el SEQ ID NO 22: (RRDFPEEVAI).

Una revisión de Kieffer et al. (Endocrine Reviews (1999) Vol. 20, No. 6, páginas 876-913) y una revisión de Drucker et al. (Mol. Endocrinol. (2003) Vol. 17, No. 2, páginas 161-171) describen la secuencia de aminoácidos del proglucagon en donde en este péptido de origen natural el péptido de GLP-1, IP-2 y el péptido de GLP-2 están fusionados. No se describen péptidos de fusión de GLP-1 (7-37, 7-36 o 7-35).

Además, una revisión de Perry et al. (Current Alzheimer Research, 2005, 2, 377-385) se refiere a la relación entre la ruta del receptor de GLP y la enfermedad de Alzheimer. No se describen péptidos de fusión de GLP-1 de acuerdo con la presente invención en Perry et al. (2005).

El documento WO 98/08871 describe varios derivados de GLP-1, en particular un derivado de GLP-1, en donde al menos un aminoácido de GLP-1 tiene un sustituyente lipofílico unido. Sin embargo, el documento WO 98/08871 no describe Péptidos de fusión de GLP-1 de GLP-1 (7-37, 7-36 o 7-35) ni una prolongación peptídica del extremo C de GLP-1.

En el documento WO/9953064, Thorens, B. describe una estrategia para crear una casete de expresión de GLP-1 multimérica que se puede incorporar a una variedad de tipos celulares que son líneas celulares inmortalizadas y cultivos de células primarias en división disponibles al público. Los ejemplos incluyen neuroesferas sensibles a EGF, células pluripotenciales progenitoras neurales sensibles a bFGF del CNS de mamíferos, mientras que el ejemplo de trabajo utiliza células de riñón de cría de hámster, BHK. Se mencionó que se habían utilizado las células transfectadas implantadas para tratar con éxito ratones diabéticos, permitiendo un control de glucosa equivalente sustancialmente a los controles no diabéticos. Sin embargo, estas técnicas no cumplen con los requisitos de un tratamiento que se administra rutinariamente a pacientes con diabetes.

Otro enfoque para estabilizar el nivel de glucosa exógena se basa en una nueva clase de medicinas conocidas como miméticos de incretina, bajo investigación para el tratamiento de la diabetes de tipo 2. La exenatida (Byetta®) es una versión sintética de un compuesto natural que se encuentra en la saliva del lagarto monstruo de Gila. En los ensayos clínicos, un mimético de incretina (exenatida) ha demostrado reducciones de azúcar en sangre y mejoras en los marcadores de la función de las células beta. Sin embargo, la exenatida muestra solo ciertos efectos de la hormona incretina humana péptido 1 de tipo glucagón (GLP-1).

En resumen, en la actualidad no existe ninguna terapia disponible para la diabetes de tipo 2 eficaz, que permita disminuir el nivel de glucosa en sangre basándose en GLP-1, en otras palabras proporcionar una terapia que refleje el espectro completo de los efectos beneficiosos conocidos para GLP-1, por ejemplo su actividad a concentraciones fisiológicas para reducir fuertemente la tasa de entrada de los nutrientes en la circulación mediante una reducción de la tasa de vaciado gástrico en sujetos obesos o su actividad estimuladora de la insulina. Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar moléculas peptídicas basadas en GLP-1 que sean biológicamente activas y resistentes a la degradación proteolítica.

La presente invención se refiere a un mimético de armazón de un péptido de fusión que comprende como componente (I) N-terminalmente

(i) GLP-1 (7-37) del SEQ ID NO: 1 o una secuencia funcional que ejerce los efectos biológicos de GLP-1 como hormona incretina, su acción antiapoptótica o sus propiedades neurotróficas y que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con GLP-1 (7-37), o

(ii) un péptido de GLP-1 modificado que consiste en la secuencia de aminoácidos de fórmula II: Xaa7-Xaa8-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa-16-Ser-Xaa-18-Xaa19-Xaa20-Glu-Xaa22-Xaa23-Ala-Xaa25-Xaa26-Xaa27-Phe-Ile-Xaa30-Trp-Leu-Xaa33-Xaa34-Xaa35-Xaa36-Xaa37, donde Xaa7 es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, 3-hidroxi-histidina, homohistidina, N-acetil-histidina, a-fluorometil-histidina, a-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina; Xaa8 es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil)carboxílico, ácido (1-aminociclobutil)carboxílico, ácido (1-aminociclopentil)carboxílico, ácido (1-aminociclohexil)carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil)carboxílico, o ácido (1-aminociclooctil)carboxílico; Xaa16 es Val o Leu; Xaa18 es Ser, Lys o Arg; Xaa19 es Tyr o Gln; Xaa20 es Leu o Met; Xaa22 es Gly, Glu o Aib; Xaa23 es Gln, Glu, Lys o Arg; Xaa25 es Ala o Val; Xaa26 es Lys, Glu o Arg; Xaa27 es Glu o Leu; Xaa30 es Ala, Glu o Arg; Xaa33 es Val o Lys; Xaa34 es Lys, Glu, Asn o Arg; Xaa35 es Gly o Aib; Xaa36 es Arg, Gly o Lys o amida o está ausente; Xaa37 es Gly, Ala, Glu, Pro, Lys, amida o está ausente,

y como componente (II) en el C terminal una secuencia peptídica de al menos 9 aminoácidos y que contiene una secuencia de acuerdo con el SEQ ID NO: 22 (RRDFPEEVAI) o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el SEQ ID NO: 22, que confiere una resistencia mejorada a la inactivación por DPP-IV del péptido de fusión,

en donde mimético de armazón muestra una modificación de uno o más de los miembros de la cadena principal (NH, CH, CO), ya sea en forma de sustitución o en forma de una inserción, y su estructura de cadena lateral es idéntica a la del péptido correspondiente.

Preferiblemente, la presente invención se refiere a un mimético de armazón de una proteína de fusión como se ha definido anteriormente, en donde el componente (I) es GLP-1 (7-35) o GLP-1 (7-36).

La presente invención se basa en el hallazgo de que el péptido de la invención resultante está protegido contra la degradación proteolítica in vivo, principalmente debida a la actividad proteolítica de la endopeptidasa IV. El péptido de la invención que tiene al menos dos componentes (I) y (II) como se ha definido anteriormente, muestra la actividad biológica de GLP-1 y, simultáneamente, confiere estabilidad a GLP-1 como su componente (I) por medio de una prolongación C-terminal.

El término "péptido de la invención", según se utiliza en la presente memoria, es un mimético de armazón de un péptido de fusión tal como se define en la presente memoria, una variante, un análogo, un fragmento o un derivado del mismo, incluyendo combinaciones, por ejemplo, un fragmento derivatizado, análogo o variante de un péptido de fusión. El término "péptido de GLP-1", según se utiliza en la presente memoria significa GLP-1 (7-35, 36 o 37), mientras que se pretende que "péptido de GLP-1 modificado" signifique cualquier análogo de GLP-1, derivado de GLP-1, variante de GLP-1 o fragmento de GLP-1, incluyendo un fragmento derivatizado, análogo o variante de GLP-1 (7-35, 36 o 37), que puede existir en cualquiera de los componentes (I) y (II) del péptido de la invención. El término "péptido de GLP-2", según se utiliza en la presente memoria significa GLP-2 (1-33, 34, o 35), mientras que se pretende que "péptido de GLP-2 modificado" signifique cualquier análogo, fragmento o variante de GLP-2, un derivado de GLP-2 o un derivado de un análogo de GLP-2, incluyendo un fragmento derivatizado, análogo o variante de GLP-2 (1-33, 34 o 35). Las variantes, análogos, fragmentos y derivados se clasifican como modificaciones de la secuencia no modificada, por ejemplo, GLP-1 (7-35, 36 ó 37) o GLP-2 (1-33, 34 o 35). En el sentido de la presente invención, cualquier variante, análogo, fragmento o derivado tiene que ser funcional, por ejemplo, tiene que ejercer el mismo efecto biológico o efectos biológicos similares a los del péptido GLP-1 no modificado.

El péptido de la invención es un mimético de armazón de un péptido de fusión o una variante, análogo, fragmento o derivado del mismo, en donde el componente (I) puede contener una secuencia que tiene al menos 80%, más preferiblemente al menos 85% y aún más preferiblemente al menos 90% de identidad de secuencia con el SEQ ID NO: 1. El SEQ ID NO: 1 representa la secuencia de aminoácidos nativa de GLP-1 (7-37) (longitud de 31 aminoácidos), que está estrictamente conservado entre mamíferos.

El segundo componente (componente (II)) como se ha definido anteriormente del mimético de armazón de un péptido de fusión de acuerdo con la invención (o más generalmente cualquier péptido de la invención incluyendo

análogos, fragmentos, variantes o derivados de péptidos de fusión) contiene típicamente una secuencia peptídica que forma una estructura de tipo giro β . Una estructura en giro β es un elemento de estructura secundaria típico de proteínas o péptidos. Está formado típicamente por cuatro aminoácidos, que revierten la dirección de la cadena principal del péptido o la proteína. La secuencia de aminoácidos del componente (II) contiene al menos nueve aminoácidos y contiene por lo menos un residuo de prolina en su secuencia. Los residuos de prolina son aminoácidos comunes dentro de la secuencia de aminoácidos tetramérica que forma el giro β . El residuo de prolina comúnmente se encuentra típicamente en la posición 2 o 3, preferiblemente 2, de la secuencia tetramérica del giro β que existe en el componente (II) del péptido de fusión.

Como se definió anteriormente, en el mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención, el componente (II) es una secuencia peptídica que contiene una secuencia de acuerdo con el SEQ ID NO: 22 (RRDFPEEVAI) (todas las secuencias de péptidos dadas en el código de una letra) o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el SEQ ID NO: 22. El SEQ ID NO: 22 es una secuencia parcial de la de secuencia de IP-2 completa (péptido 2 intermedio), que contiene 10 aminoácidos N-terminales de la secuencia de IP-2 completa de 15 aminoácidos de longitud. IP-2 es un ejemplo preferido de una secuencia peptídica que contiene giros β . Por consiguiente, otras secuencias preferidas más fuertes que están contenidas en el componente (II) son secuencias de aminoácidos parciales más largas de IP-2, tales como la secuencia de 14 aminoácidos N-terminal que existe en seres humanos (SEQ ID NO: 23 (RRDFPEEVAIVEEL)) o su contraparte murina (SEQ ID NO 24 (RRDFPEEVAIAEEL)) o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el SEQ ID NO: 23 o 24. Los más preferidos como elementos que están contenidas en el componente (II) del péptido de fusión son la secuencias de IP-2 completas que tienen los 15 aminoácidos de la secuencia de IP-2 de origen natural (SEQ ID NO: 2 (RRDFPEEVAIVEELG), humana, o SEQ ID NO 3 (RRDFPEEVAIAEELG) murina) o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con los SEQ ID NO: 2 o 3. Dentro del alcance de la presente invención también se encuentran todas las isoformas de IP2 de mamífero (variantes naturales de IP2 entre mamíferos). Se puede proporcionar más de una copia de una secuencia que incluida en el componente (II), por ejemplo, 2, 3 o incluso más copias de IP2 o un fragmento, variante o análogo o derivado de IP2.

Por consiguiente, se prefiere un mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención que contiene una secuencia de acuerdo con el SEQ ID NO: 8 (HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGRGRRDFPEEVAIAEELG), es decir GLP-1 (7-37) conectado sin ninguna secuencia conectora por medio de su extremo C a IP2 murino o de acuerdo con el SEQ ID NO: 12 (HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGRGRRDFPEEVAIVEELG), es decir GLP-1 (7-37) conectado sin ninguna secuencia conectora por medio de su extremo C a IP2 humano. También están incluidos las variantes, análogos o fragmentos del mismo que tienen una identidad de secuencia de al menos 80% con los SEQ ID NO: 8 y 12 o derivados de los mismos.

Sin vincularse a ninguna teoría, los autores de la presente invención concluyen que la inestabilidad de GLP-1 (7-35, 36 o 37), si se administra a cualquier paciente que lo necesite, se debe a su estructura tridimensional no protegida. Las proteasas pueden escindir el péptido GLP-1 (7-35, 36 o 37) y suprimir su actividad fisiológica rápidamente in vivo. Al enlazar una secuencia peptídica al extremo C de GLP-1 (7-35, 36 o 37) su estructura gana estabilidad frente a la degradación enzimática. La ganancia en estabilidad se mejora extraordinariamente, si la secuencia peptídica C-terminal adicional (que está contenida en el componente (II) del péptido de fusión de acuerdo con la invención) se vuelve a plegar debido a la presencia de un elemento estructural de giro β formado por su estructura primaria y que proporciona rigidez al componente (II). Se ha descubierto que el mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención, en virtud de su prolongación con un péptido C-terminal que contiene preferiblemente un elemento estructural de giro beta, tiene una resistencia mejorada a la inactivación de DPP-IV. El péptido C-terminal o bien no se escinde de la secuencia de GLP-1 (7-35, 36 o 37) antes de actuar sobre su receptor en las células diana o bien puede ser escindido enzimáticamente para formar GLP-1 (7-35, 36 o 37) in vivo. Independientemente de la forma exacta del péptido de la invención unido al sitio del receptor de GLP-1, el péptido de la invención ejerce su función como un compuesto insulínico activo.

Las secuencias de péptidos, que se considera que son adecuadas para estar contenidas en el componente (II) debido a una estructura primaria que forma un elemento de giro β pueden ser identificadas fácilmente mediante métodos adecuados, p. ej. espectroscópicos, p. ej. dicroísmo circular, u otros métodos conocidos para los expertos en la técnica.

El componente (II) y el componente (I) pueden estar unidos directamente o unidos por medio de una secuencia conectora. Preferiblemente, ambos componentes están directamente conectados entre sí. En caso de que estén conectados a través de un conector (o espaciador), el conector es preferiblemente un conector peptídico o un conector orgánico. Un conector peptídico tiene típicamente una longitud de 1 a 10 aminoácidos, preferiblemente de 1 a 5, incluso más preferiblemente de 1 a 3 aminoácidos, en algunos casos la secuencia conectora puede ser incluso más larga comprendiendo 11 a 50 aminoácidos. Un conector peptídico puede estar compuesto de varias secuencias de aminoácidos. Preferiblemente, un conector peptídico introducirá cierta flexibilidad estructural entre los componentes a conectar. La flexibilidad estructural se consigue por ejemplo, por tener un conector peptídico que contiene varios residuos de prolina o glicina, preferiblemente al menos 30%, más preferiblemente al menos 40% y aún más preferiblemente al menos 60% de residuos prolina y glicina dentro de la secuencia conectora. Independientemente de la secuencia específica el péptido conector puede ser preferiblemente inmunológicamente inactivo.

En una realización preferida de la presente invención, un péptido de la invención, es decir, un mimético de armazón de un péptido de fusión o sus análogos, fragmentos, variantes o derivados, contiene un tercer componente (componente (III)) que está conectado al extremo C del componente (II). El acoplamiento puede ser directo o indirecto a través de una secuencia conectora. Con respecto a la secuencia conectora se hace referencia a la descripción anterior para un conector que enlaza el componente (I) y el componente (II). Generalmente, el componente (III) comprende al menos cuatro residuos de aminoácidos, preferiblemente al menos 10 residuos de aminoácidos adicionales, más preferiblemente al menos 20, o al menos 30. En términos funcionales, el componente (III) se proporciona para mejorar aún más la estabilidad del mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención. Se espera que el componente (III) no interfiera en la función biológica del mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención que es aprox. comparable a la actividad biológica de GLP-1 (7-37).

Preferiblemente, el componente (III) mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención que comprende al menos 4, preferiblemente al menos 10, más preferiblemente al menos 20 residuos de aminoácidos adicionales de la secuencia N-terminal de una isoforma de GLP-2 de cualquier organismo mamífero (otra variante de origen natural de GLP-2 entre mamíferos), p. ej. isoformas murinas o humanas como se muestra en los SEQ ID NO: 4 y 5. El GLP-2 se produce en pro-glucagón y también está involucrado en el metabolismo de hidratos de carbono. Al igual que con la secuencia biológicamente activa incluida en el componente (I) (péptido de GLP-1), el componente (III) puede comprender también análogos, variantes o derivados de formas de origen natural de GLP-2. Alternativamente, el componente (III) puede comprender también al menos 4, preferiblemente al menos 10, más preferiblemente al menos 20 residuos de aminoácidos adicionales de la secuencia N-terminal de GLP-1 (7-37), incluyendo correspondientemente todas las isoformas de mamíferos o - como se describe en la presente memoria - todas las variantes funcionales, análogos o derivados de los mismos. En términos generales, el componente (III) puede contener cualquier forma de un péptido GLP-1 o un péptido modificado de GLP-1, que se describe en la presente memoria como adecuado para el componente (I) del mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención. En una alternativa adicional, el componente (III) también puede contener formas quiméricas de GLP-1 (7-37) y GLP-2. Una forma quimérica puede ser producida mediante el acoplamiento de GLP-1 (7-37) y GLP-2 (o fragmentos, análogos, variantes o derivados de ambos) entre sí y la posterior introducción de esta forma quimérica como componente (III) en el péptido de la invención. Preferiblemente, la forma quimérica está compuesta por una secuencia parcial de GLP-1 (7-37) y una secuencia parcial de GLP-2 conectadas. Por ejemplo, la forma quimérica puede incluir los 5-30 aminoácidos N-terminales de GLP-1 y los 5-30 aminoácidos C-terminales de GLP-2 o viceversa, por ejemplo, los aminoácidos 7 u 8 a 22, 23, 24, 25, 26, 27, o 28 de GLP-1 (7-37) y la secuencia de aminoácidos desde la posición 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 a por ejemplo el extremo C de GLP-2.

Si las modificaciones de las formas de origen natural de GLP-2 o GLP-1 (7-37), respectivamente, se utilizan como componente (III), el componente (III) contiene preferiblemente la secuencia de los SEQ ID NO: 4 o 5 o del SEQ ID NO: 1, respectivamente, o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con los SEQ ID NO: 4 o 5 o el SEQ ID NO: 1. Los derivados de estas secuencias preferidas, por ejemplo debido a modificaciones de cadena lateral o modificaciones de la cadena principal del péptido, etc. (descritos en la presente memoria como "derivados"), también se incluyen como componente (III) en la presente invención.

En otra realización, el componente (III) puede contener una pluralidad de secuencias como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, el componente (III) puede contener al menos dos, preferiblemente 2, 3, o 4 copias de GLP-1 (7-37) y/o GLP-2 o al menos dos copias de secuencias que tienen al menos 80% de identidad de secuencia con el los SEQ ID NO: 1, 4 o 5. También el componente (III) puede contener más de una copia de una versión quimérica de GLP-1 (7-37) o GLP-2, como se ha descrito anteriormente, p. ej. formando finalmente una combinación de una o varias versiones quiméricas junto con GLP-1 (7-37) y/o GLP-2 o sus modificaciones con al menos 80% de identidad de secuencia. Dentro del alcance de la presente invención también hay dos o más, preferiblemente dos componentes (III), que pueden por ejemplo estar (1) conectados por su extremo N al extremo C del componente (II) y (2) conectados por su extremo C al extremo N del componente (I) a través de un conector o directamente. Si se proporcionan dos componentes (III), estos pueden ser idénticos o diferentes.

Por consiguiente, los miméticos de armazón de péptidos de fusión de la invención que contienen tres componentes (I), (II) y (III) son particularmente preferidos. Cuatro realizaciones específicas que contienen todos estos componentes se seleccionan de un grupo que consiste en: SEQ ID NO 6 (N-GLP-1 (7-37)-IP2 (murino)-RR-GLP-1 (7-37)-C, también denominado CM1 murino en la presente memoria), SEQ ID NO 7 (N-GLP-1 (7-37)-IP2 (murino)-RR-GLP2-C, también denominado CM2 murino en la presente memoria), SEQ ID NO 10 (N-GLP-1 (7-37)-IP2 (humano)-RR-GLP-1 (7-37)-C, también denominado CM1 humano), y SEQ ID NO 11 (N-GLP-1 (7-37)-IP2 (humano)-RR-GLP-2-C), también denominado humano CM2 en la presente memoria) o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con los SEQ ID NO: 6, 7, 10, o 11 o un derivado de los mismos. Todas las secuencias 6, 7, 10 y 11 contienen un conector RR (dos residuos de arginina) en el extremo C de IP2 (componente (II)), que alternativamente también se puede descartar. El Componente (I) en cada una de las realizaciones de acuerdo con los SEQ ID NOS: 6, 7, 10 o 11 es GLP-1 (7-37), mientras que el componente (III) (en cada una de estas realizaciones conectado al extremo C del componente (II)) es o bien GLP-1 (7-37) o bien GLP-2.

Los miméticos de armazón de un péptido de fusión de la invención o un componente de los mismos pueden producirse en diversas formas modificadas. Estas formas modificadas se exponen a continuación y se describe con más detalle.

El término "sales" en la presente memoria hace referencia tanto a sales de grupos carboxilo como a sales de adición de ácido de grupos amino de los péptidos de fusión descritos anteriormente o análogos, fragmentos, derivados o variantes de los mismos. Las sales de un grupo carboxilo pueden formarse por medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, férricas o de zinc, y similares, y las sales con bases orgánicas como las formadas, por ejemplo, con aminas, tales etanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaina y similares. Las sales de adición de ácido incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales, tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos, tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Por supuesto, cualquiera de tales sales debe retener la actividad biológica de los péptidos de la invención relevante para la presente invención, es decir, la capacidad de reducir la tasa de entrada de los nutrientes en la circulación. Como se describe a continuación, las formas de sales de los péptidos pueden estar contenidas en una formulación farmacéutica.

Un "fragmento" de un péptido de fusión de acuerdo con la presente invención hace referencia a cualquier subconjunto de las moléculas, es decir, un péptido más corto que conserva la actividad biológica deseada. Los fragmentos se pueden preparar fácilmente mediante la eliminación de aminoácidos de cualquier extremo de la molécula y sometiendo a ensayo el resultante para determinar sus propiedades como incretina. Se conocen las proteasas para eliminar un aminoácido cada vez, ya sea del extremo N y/o el extremo C de un polipéptido, y así la determinación de los fragmentos que retienen la actividad biológica deseada implica únicamente una experimentación rutinaria. De forma concluyente, los fragmentos pueden deberse a deleciones de aminoácidos en los extremos del péptido y/o de aminoácidos situados dentro de la secuencia del péptido.

Además, el mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención que tiene actividad anti-diabetes de tipo 2, ya sea el propio mimético de armazón de un péptido de fusión, un análogo o variante, sal, derivado funcional y/o fragmento del mismo, también puede contener residuos de aminoácido adicional que flanquean el mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención. Siempre que la molécula resultante conserve su resistencia o estabilidad frente a proteasas y su capacidad para actuar como incretina, se puede determinar si cualquiera de tales residuos flanqueantes afecta a las características básicas y novedosas del péptido núcleo, por ejemplo, por sus efectos sobre las células del páncreas, mediante experimentación rutinaria. El término "que consiste esencialmente en", cuando se refiere a una secuencia específica, significa que pueden estar presentes residuos flanqueantes adicionales que no afectan a las características básicas y novedosas del mimético de armazón de un péptido de un fusión invención especificado. Este término no comprende sustituciones, deleciones o adiciones en la secuencia especificada.

Una "variante" de acuerdo con la presente invención hace referencia a una molécula que es sustancialmente similar al mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención completo definido anteriormente o un fragmento del mismo. Los péptidos variantes pueden prepararse convenientemente mediante síntesis química directa del péptido variante, usando métodos bien conocidos en la técnica. Por supuesto, una variante de un mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención tendría una actividad anti-diabética similar, p. ej. estimuladora de insulina, a la del correspondiente péptido de GLP-1 de origen natural.

Alternativamente, se pueden preparar variantes de secuencia de aminoácidos de los miméticos de armazón de los péptidos de fusión definidos anteriormente mediante mutaciones en los ADN que codifican los derivados sintetizados. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, deleciones de, o inserciones o sustituciones de residuos dentro de la secuencia de aminoácidos. También se puede realizar cualquier combinación de deleciones, inserciones y sustituciones para llegar al constructo final, siempre que el constructo final posea la actividad deseada. Obviamente, las mutaciones que se realizarán en el ADN que codifica el péptido variante no deben alterar el marco de lectura y preferiblemente no crearán regiones complementarias que podrían producir estructuras de ARNm secundarias.

Un "análogo" de los miméticos de armazón de los péptidos de fusión definidos anteriormente, de acuerdo con la presente invención, hace referencia a una molécula no natural que es sustancialmente similar a la molécula completa o a un fragmento activo de la misma. Dicho análogo, exhibiría la misma actividad que el correspondiente péptido de GLP-1 de origen natural.

Los tipos de sustituciones que se pueden realizar en el mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención o un componente del mismo, de acuerdo con la presente invención, se pueden basar en el análisis de las frecuencias de cambios de aminoácidos entre una proteína/péptido homólogos de especies diferentes. Basándose en dicho análisis, las sustituciones conservativas pueden definirse en la presente memoria como intercambios dentro de uno de los siguientes cinco grupos:

I. Residuos alifáticos, no polares o ligeramente polares, pequeños: Ala, Ser, Thr, Pro, Gly; II. Residuos polares cargados negativamente y sus amidas: Asp, Asn, Glu, Gln; III. Residuos polares con carga positiva: His, Arg, Lys; IV. Residuos alifáticos no polares, grandes: Met, Leu, Ile, Val, Cys; V. residuos aromáticos grandes: fenilalanina, Try, Trp.

Dentro de los grupos anteriores, las siguientes sustituciones se consideran como "altamente conservativas": Asp/Glu; His/Arg/Lys; Phe/Tyr/Trp; Met/Leu/Ile/Val. Las sustituciones semiconservativas se definen como intercambios entre dos de los grupos (I) - (IV) anteriores, que se limitan al supergrupo (A), que comprende (I), (II) y

(III) anteriores, o al supergrupo (B), que comprende (IV) y (V) anteriores. Las sustituciones no se limitan a los aminoácidos codificados genéticamente o incluso a los de origen natural.

En general, los análogos o variantes del mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención también pueden contener sustituciones de aminoácidos, p. ej., realizadas con la intención de mejorar la solubilidad (sustitución de aminoácidos hidrófobos por aminoácidos hidrófilos). En una realización de variantes/análogos del péptido GLP-1 del mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención que existe en el componente (I) y/o (III) del péptido de la invención) el péptido de GLP-1 (modificado) se caracteriza por una o más sustituciones en las posiciones 7, 8, 11, 12, 16, 22, 23, 24, 25, 27, 30, 33, 34, 35, 36, o 37 del péptido GLP-1. Como ejemplo de la siguiente nomenclatura [Arg34-GLP-1 (7-37)] designa un análogo de GLP-1 en donde la lisina de origen natural en la posición 34 ha sido sustituida por arginina.

Específicamente, el componente (I) y/o (III), de un mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención puede comprender variantes y análogos de GLP-1 (7-35, 36 o 37) que incluyen, por ejemplo, Gln9-GLP-1 (7-37), D-Gln9-GLP-1 (7-37), acetil-Lys9-GLP-1 (7-37), Thr16-Lys18-GLP-1 (7-37), y Lys18-GLP-1 (7-37), Arg34-GLP-1 (7-37), Lys38-Arg26-GLP-1 (7-38)-OH, Lys36-Arg26-GLP-1 (7-36), Arg26,34-Lys38-GLP-1 (7-38), Arg26,34-Lys38-GLP-1 (7-38), Arg26,34-Lys38-GLP-1 (7-38), Arg26,34-Lys38-GLP-1 (7-38), Arg26-Lys38-GLP-1 (7-38), Arg26-Lys38-GLP-1 (7-38), Arg26-Lys38-GLP-1 (7-38), Arg26-Lys38-GLP-1 (7-38), Arg34-Lys38-GLP-1 (7-38), Ala37-Lys38-GLP-1 (7-38), y Lys37-GLP-1 (7-37).

En otra realización de la invención, el mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención contiene como componente (I) o (III) un péptido GLP-1 modificado que comprende la secuencia de aminoácidos de la siguiente fórmula II:

Xaa7-Xaa8-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa-16-Ser-Xaa-18-Xaa19-Xaa20-Glu-Xaa22-Xaa23-Ala-Xaa25-Xaa26-Xaa27-Phe-Ile-Xaa30-Trp-Leu-Xaa33-Xaa34-Xaa35-Xaa36-Xaa37,

en donde Xaa7 es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, 3-hidroxi-histidina, homohistidina, N-acetil-histidina, a-fluorometil-histidina, a-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina; Xaa8 es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil)carboxílico, ácido (1-aminociclobutil)carboxílico, ácido (1-aminociclohexil)carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil)carboxílico, o ácido (1-aminociclooctil)carboxílico; en donde Gly es particularmente preferido; Xaa16 es Val o Leu; Xaa18 es Ser, Lys o Arg; Xaa19 es Tyr o Gln; Xaa20 es Leu o Met; Xaa22 es Gly, Glu o Aib; Xaa23 es Gln, Glu, Lys o Arg; Xaa25 es Ala o Val; Xaa26 es Lys, Glu o Arg; Xaa27 es Glu o Leu; Xaa30 es Ala, Glu o Arg; Xaa33 es Val o Lys; Xaa34 es Lys, Glu, Asn o Arg; Xaa35 es Gly o Aib; Xaa36 es Arg, Gly o Lys o amida o está ausente; Xaa37 es Gly, Ala, Glu, Pro, Lys, amida o está ausente.

En otra realización de la invención, el componente (I) y/o (III) del mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención contiene un péptido de GLP-1 modificado que comprende la secuencia de aminoácidos de la siguiente fórmula III:

Xaa7-Xaa8-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa18-Tyr-Leu-Glu-Xaa22-Xaa23-Ala-Ala-Xaa26-Glu-Phe-Ile-Xaa30-Trp-Leu-Val-Xaa34-Xaa35-Xaa36-Xaa37,

en donde Xaa7 es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, -hidroxi-histidina, homohistidina, N-acetil-histidina, a-fluorometil-histidina, a-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina; Xaa8 es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil)carboxílico, ácido (1-aminociclobutil)carboxílico, ácido (1-aminociclohexil)carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil)carboxílico, o ácido (1-aminociclooctil)carboxílico; Xaa18 es Ser, Lys o Arg; Xaa22 es Gly, Glu o Aib; Xaa23 es Gln, Glu, Lys o Arg; Xaa26 es Lys, Glu o Arg; Xaa30 es Ala, Glu o Arg; Xaa34 es Lys, Glu o Arg; Xaa35 es Gly o Aib; Xaa36 es Arg o Lys, amida o está ausente; Xaa37 es Gly, Ala, Glu o Lys, amida o está ausente.

En una realización particularmente preferida de la invención, el componente (I) y/o (III), del mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención contienen un péptido de GLP-1 (modificado), que se selecciona entre GLP-1 (7-35) GLP-1 (7-36), GLP-1 (7-36) amida, GLP-1 (7-37) o una variante, análogo o derivado del mismo. También son preferidos los péptidos de la invención que comprenden en sus componentes (I) y/o (iii) un péptido GLP-1 modificado que tiene un residuo Aib en la posición 8 o un residuo de aminoácido en la posición 7 de dicho péptido de GLP-1, que se selecciona del grupo que consiste en D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, hidroxi-histidina, homohistidina, N-acetil-histidina, α -fluorometil-histidina, α -metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina y 4-piridilalanina.

Los ejemplos de producción de sustituciones de aminoácidos en las proteínas que pueden ser utilizados para la obtención de análogos para su uso en la presente invención incluyen etapas cualesquiera de los métodos conocidos, tales como los presentados en las Patentes de los Estados Unidos RE 33.653; 4.959.314; 4.588.585 y 4.737.462, de Mark et al; 5.116.943 de Kothe et al; 4.965.195 de Namen et al; y 5.017.691 de Lee, et al, y proteínas sustituidas con lisina presentadas en la Patente de los Estados Unidos 4.904.584 (Shaw et al).

Preferiblemente, la variante o análogo, definidos anteriormente y contenidos en el componente (I), (II) y/o (III), tendrán una secuencia núcleo, que es la misma que la de la secuencia "nativa", por ejemplo, GLP-1 (7-37) o GLP-2 o un fragmento biológicamente activo del mismo o cualquier isoforma IP2, que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad con la secuencia de aminoácidos nativa y conserva la actividad biológica de la misma. Más preferiblemente al menos 90% de identidad, o lo más preferiblemente al menos 95% de identidad con la secuencia nativa. Cuando se dice que un péptido concreto tiene un porcentaje de identidad específico para un polipéptido de referencia de una longitud definida, el porcentaje de identidad es relativo al péptido de referencia. Por lo tanto, un péptido que es 50% idéntico a un polipéptido de referencia que tiene 100 aminoácidos de longitud puede ser un polipéptido de 50 aminoácidos que es completamente idéntico a una porción de 50 aminoácidos de longitud del polipéptido de referencia. También podría ser un polipéptido de 100 aminoácidos de longitud, que es 50% idéntico al polipéptido de referencia en toda su longitud. Por supuesto, otros polipéptidos cumplirán los mismos criterios. El término "identidad de secuencia" según se utiliza en la presente memoria significa que las secuencias se comparan de la siguiente manera. Las secuencias se alinean usando la Versión 9 de GAP del Grupo de Computación Genética (programa de alineamiento global), utilizando una matriz de valores por defecto (valores -4 a +11) (BLOSUM62) con una penalización por apertura de espacio de -12 (para el primer nulo de un espacio) y una penalización de extensión del espacio de -4 (por cada nulo adicional consecutivo en el espacio). Después del alineamiento, se calcula el porcentaje de identidad expresando el número de emparejamientos como el porcentaje del número de aminoácidos en la secuencia reivindicada.

Los derivados de un mimético de armazón de un péptido de fusión o un análogo, fragmento o variante del mismo también están abarcados por la presente invención. Se pretende que el término "derivados" de un mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención incluya solamente aquellos péptidos de la invención modificados que no cambian un aminoácido por otro de los veinte aminoácidos que existen comúnmente en la naturaleza. Correspondientemente, un aminoácido codificado genéticamente puede modificarse haciéndolo reaccionar con un agente de derivatización orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas de residuos o grupos amino o carboxi de residuos terminales (preferiblemente mediante modificación covalente) o mediante introducción de aminoácidos no naturales (fabricados mediante síntesis química, es decir, isómeros D de los aminoácidos codificados por el código genético, Aib (ácido α -aminoisobutírico), Abu (ácido α -aminobutírico), Tie (terc-butilglicina), p-alanina, ácido 3-aminometilbenzoico, ácido antranílico) o aminoácidos naturales que no son codificados por el código genético, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ornitina, fosfoserina, D-alanina y D-glutamina o mediante una modificación de la cadena principal peptídica mediante disposiciones alternativas de la cadena principal del péptido.

A continuación se describen las modificaciones preferidas de aminoácidos del mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención (que - como se ha definido anteriormente - también comprende variantes, análogos o fragmentos del un mimético de armazón de un péptido de fusión), que se pueden producir en un mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención en cualquier sitio (cualquier aminoácido), por ejemplo, colocado en el componente (I), (II) y/o (III).

Los residuos de cisteinilo si están presentes en cualquier forma de un mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención, p. ej. un análogo de un mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención, se hacen reaccionar muy comúnmente con alfa-haloacetatos (y las correspondientes aminas), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para dar derivados carboxilmetilados o carboxiamidometilados. Los residuos de cisteinilo también son derivatizados mediante reacción con bromotrifluoroacetona, ácido alfa-bromo-beta-(5-imidazol)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidias, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, disulfuro metil-2-piridilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercurio-4-nitrofenol, o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

Los residuos de histidilo en un mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención pueden ser derivatizados mediante reacción con procarbonato de dietilo a pH 5,5-7,0 debido a que este agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidilo. El bromuro de parabromofenacilo también es útil, la reacción se realiza preferiblemente en cacodilato sódico 0,1 M a pH 6,0. En particular, el residuo de histidina N-terminal (His7) de GLP-1 (7-37) contenido en el componente (I) y/o (III) del mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención es muy importante para la actividad insulínica de péptidos GLP-1 como muestran Suzuki et. al. (Diabetes Res.; Clinical Practice 5 (Supl. 1): S30 (1988)). Correspondientemente, el mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención puede ser modificado en His7 de su GLP-1 como parte del componente (I) y/o (III) por grupos alquilo o acilo (C1-C6), o reposición de His con estructuras anulares C5-C6 funcionalmente equivalentes. Una modificación preferida es la introducción de un radical hidrófobo en el extremo amino de His7 o su cadena lateral de histidilo.

Los residuos de lisinilo y amino terminales de un mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención p. ej. pueden hacerse reaccionar con anhídridos de ácido succínico u otros ácidos carboxílicos. La derivatización con estos agentes tiene el efecto de invertir la carga de los residuos de lisinilo. Por medio de modificaciones de acilo (C12-C18) del grupo epsilon-amino de uno o varios residuos de lisina en el mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención, se incrementa su vida media en circulación. Los residuos de arginilo p. ej., pueden ser modificados por reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilgloxal y ninhidrina. La derivatización de residuos de arginina requiere que la reacción se realice en condiciones alcalinas debido al alto pKa del grupo funcional guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina, así como con el grupo epsilon-amino de la arginina.

La modificación específica de los residuos de tirosilo per se ha sido estudiada extensamente. Muy comúnmente, se pueden utilizar N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies de tirosilo O-acetiladas y derivados e-nitro, respectivamente.

5 Los grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo) pueden modificarse selectivamente por reacción con carbodiimidias (R'NCN-R') tales como 1-ciclohexil-3-[2-morfolinil-(4-etil)]carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida.

Además, los de residuos aspartilo y glutamilo pueden convertirse en residuos de asparraginilo y glutaminilo por reacción con iones amonio.

10 Los residuos de glutaminilo y asparraginilo pueden ser desamidados a los correspondientes residuos de glutamilo y aspartilo. Alternativamente, estos residuos pueden ser desamidados en condiciones ligeramente ácidas. Cualquier forma de estos residuos cae dentro del alcance de esta invención. Los miméticos de armazón de los péptidos de fusión de la invención desamidados o sus componentes pueden experimentar una alteración de la susceptibilidad a la proteólisis con enzimas proteasa o peptidasa, sugiriendo que la desamidación puede tener un significado fisiológico en la dirección de la escisión proteolítica de un mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención. Se observa que los miméticos de armazón de los péptidos de fusión de la invención biosintéticos pueden degradarse bajo determinadas condiciones de almacenamiento, dando como resultado la desamidación en una o más posiciones del mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención. Los residuos de metionina en los miméticos de armazón de los péptidos de fusión de la invención pueden ser susceptibles a la oxidación, principalmente al sulfóxido. Como los otros derivados mencionados anteriormente, se pueden utilizar tanto péptidos de la invención desamidados y/o péptidos de la invención sulfoxidados para exhibir toda la actividad biológica.

Otros reactivos adecuados para derivatizar residuos que contienen alfa-aminoácidos incluyen imidoésteres tales como picolinimidato de metilo, fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobenzenosulfónico; O-metiliosurea; 2,4-pentanodiona, y reacción con glioxilato catalizada por transaminasa.

25 Los residuos de aminoácidos terminales de un mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención con sus grupos carboxi (extremo C) y amina (extremo N) (así como grupos carboxi o amida de cadena lateral de los aminoácidos, ver más arriba) pueden estar presentes en su forma protegida (p. ej., el extremo C por un grupo amida) y/o no protegida, utilizando grupos protectores de amino o carboxilo apropiados. Además, se pueden proporcionar sales de adición de ácido del mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención. Las sales de adición de ácidos comunes son sales de ácidos halhídricos, es decir, HBr, HI, o más preferiblemente, HCl.

30 La PEGilación de los grupos carboxilo terminales o de la cadena lateral o el grupo epsilon-amino de la lisina se produce en el mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención, confiere resistencia a la oxidación y también está dentro del alcance de la presente invención.

35 Otras modificaciones que dan como resultado derivados de miméticos de armazón de los péptidos de fusión de la invención se basan en carbohidratos y/o lípidos que pueden acoplarse covalentemente al péptido de la invención. Se prefiere acoplar lípidos y/o carbohidratos a serina, treonina, asparragina, glutamina o tirosina o glutamato o aspartato vía sus radicales reactivos de la cadena lateral. Alternativamente, los carbohidratos y/o lípidos también se pueden conectar a los radicales terminales del mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención. Además, un mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención puede estar acoplado a un radical de un péptido o proteína funcionalmente diferente, que también puede estabilizar el mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención y/o puede servir para mejorar las propiedades de transporte de un mimético de armazón un péptido de fusión de la invención en los fluidos corporales, en particular la sangre. Los péptidos o proteínas adecuados se pueden seleccionar p. ej. entre albúmina, transferrina, etc., que se acoplan directamente (como el componente IV) al mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención o a través de un péptido o secuencia conectora orgánica. Preferiblemente, estos péptidos o proteínas están conectados a uno de los extremos de un mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención.

45 Con el fin de evitar el problema de la degradación del mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención otra realización de la presente invención proporciona un isómero retro-inverso del mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención compuesto por D-aminoácidos o compuesto al menos parcialmente de D-aminoácidos. El término " isómero retro-inverso" se refiere a un isómero de un péptido lineal en donde se invierte la dirección de la secuencia y la quiralidad de cada residuo de aminoácido está invertida (véase, p. ej., Jameson et al., Nature, 368, 744-746 (1994); Brady et al., Nature, 368, 692-693 (1994)). Con respecto al péptido parental, el péptido retro-inverso es ensamblado en el orden inverso de aminoácidos, típicamente con derivados de aminoácidos F-moc. Típicamente, los péptidos brutos se pueden purificar mediante HPLC de fase inversa.

55 Como se ha definido anteriormente los miméticos de armazón de péptidos de fusión de la invención exhiben modificaciones de su cadena principal peptídica. Su cadena principal es diferente de la cadena principal de origen natural, mientras que sus estructuras de la cadena lateral son idénticas a los péptidos de fusión o sus fragmentos, variantes, derivados o análogos. Como ha definido anteriormente los miméticos de armazón de un péptido de fusión exhiben una modificación de uno o más de los miembros de la cadena principal (NH, CH, CO), ya sea como

sustitución (preferiblemente) o como inserción. Los sustituyentes son, por ejemplo (I) -O-, -S-, o -CH₂- en lugar de -NH-; (II) -N-, C-Alquilo- o -BH- en lugar de -CHR- y (III) -CS-, -CH₂-, -SO_n-, -P=O(OH)-, o -B(OH)- en lugar de -CO-. Un mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención puede ser una combinación de cada una de estas modificaciones. En particular se pueden combinar las modificaciones de cada uno de los grupos I, II y III. En un mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención cada miembro de la cadena principal puede ser modificado o, como alternativa, solo cierto número de miembros de la cadena pueden ser intercambiados por un radical de origen no natural. Preferiblemente, todos los miembros de la cadena principal de un mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención de cualquiera de -NH-, -CHR- o CO se intercambian por otro grupo de origen no natural. En caso de que el enlace amida (-NH-CO-) de la cadena principal de un mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención esté sustituido (en toda la molécula o al menos en una sola posición), los radicales de sustitución preferibles son bioisostéricos, p. ej. enlaces amida retro-inversos (-CO-NH-), hidroxiletileno (-CH(OH)-CH₂-), alqueno (CH₂=CH-), carba (CH₂-CH₂-) y/o -P=O(OH)-CH₂-). Alternativamente, se pueden producir elongaciones de la cadena principal por medio de inserciones en el mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención, p. ej., por medio de radicales que flanquean el átomo de C alfa. A cada lado del átomo C-alfa, se pueden insertar p. ej. -O-, -S-, -CH-, -NH-.

Son particularmente preferidas las estructuras de la cadena principal peptídica de oligocarbamato de los miméticos de armazón de los péptidos de fusión de la invención. El enlace amida es remplazado por un radical carbamato. Los carbonatos de aminoalquilo N-protegidos monoméricos son accesibles a través de los correspondientes aminoácidos o aminoalcoholes. Se convierten en ésteres activos, p. ej., éster p-nitrofenílico mediante el uso del radical F-moc o un grupo nitroatriloxicarbonilo fotosensible mediante síntesis en fase sólida.

Los miméticos de armazón de péptidos de fusión de la invención están protegidos contra la escisión proteolítica tal como se ha esbozado anteriormente. Están protegidos en particular contra la dipeptidil aminopeptidasa-4 (DPP-IV). El término "protegido contra DPP-IV" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a un mimético de armazón de un péptido de fusión de acuerdo con la reivindicación 1. Los miméticos de armazón de péptidos de fusión de la invención, así como sus derivados, análogos, fragmentos y variantes vuelven GLP-1 (7-35, 36 o 37) como parte del componente (I) y/o (III) del mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención resistente a la peptidasa plasmática (DPP-IV).

La resistencia de un péptido a la degradación por dipeptidil aminopeptidasa IV se determina p. ej., mediante el siguiente análisis de degradación: Las alícuotas de los péptidos se incuban a 37°C con una alícuota de dipeptidil aminopeptidasa IV purificada durante 4-22 horas en un tampón apropiado a pH 7-8 (siendo el tampón distinto de albúmina). Las reacciones enzimáticas se terminan mediante la adición de ácido trifluoroacético, y los productos de degradación del péptido se separan y se cuantifican utilizando análisis HPLC o LC-MS. Un método para realizar este análisis es: Las mezclas se aplican sobre una columna Zorbax300SB-C18 (poros de 30 nm, partículas de 5 µm) 150 x 2,1 mm y se hacen eluir a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min con un gradiente lineal de acetonitrilo en de ácido trifluoroacético al 0,1% (acetonitrilo de 0% a 100% a lo largo de 30 min). Los péptidos y sus productos de degradación se puede controlar por su absorbancia a 214 nm (enlaces peptídicos) o 280 nm (aminoácidos aromáticos), y se cuantifican mediante la integración de las áreas de sus picos. El patrón de degradación se puede determinar mediante el uso de LC-MS donde se pueden determinar los espectros de MS del pico separado. El porcentaje de compuesto intacto/degradado en un momento dado se utiliza para la estimación de la estabilidad de los péptidos frente a DPP-IV.

Un mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención se define como estabilizado frente a DPP-IV cuando es 10 veces más estable que el GLP-1 (7-37) basándose en porcentaje de compuesto intacto en un momento dado. Por lo tanto, un mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención estabilizado frente a DPP-IV es preferiblemente al menos 10, más preferiblemente al menos 20 veces más estable que el GLP-1 (7-37) tal cual. La estabilidad puede evaluarse mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica, p. ej., mediante la adición de DPP-IV a una disolución del péptido que se va a someter a ensayo y mediante la determinación de la degradación del péptido, p. ej., a lo largo del tiempo, p. ej. mediante un método espectroscópico, análisis de Transferencia Western, escrutinio con anticuerpos, etc. Paralelamente, un mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención se define como un compuesto, que ejerce el efecto de GLP-1 (7-37) mediante la unión p. ej., a su receptor nativo (receptor de GLP-1). Preferiblemente, un mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención tiene una afinidad de unión al receptor de GLP-1, que corresponde a por lo menos 10%, preferiblemente al menos 50% de la afinidad de unión del péptido GLP-1 de origen natural. La afinidad de unión se puede determinar mediante cualquier método adecuado, p. ej., resonancia de plasmón superficial, etc. Además, se prefiere, si el mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención evoca la formación de AMPc intracelular mediante su unión a su receptor extracelular, que transmita la señal a la célula.

Los miméticos de armazón de péptidos de fusión de la invención pueden ser producidos sintéticamente, usando mecanismos de síntesis de péptidos en fase sólida, similar a la forma de producción de GLP-1 (7-36) amida y GLP-1 (7-37) en la técnica y pueden ser purificados después a escala de laboratorio p. ej. mediante una sola etapa de purificación en una columna de HPLC de fase inversa o mediante métodos de cromatografía adecuados.

Sin embargo, se forma preferiblemente en células manipuladas genéticamente, ya sea en células microbianas o en líneas de células animales para producir el mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención. El

mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención puede ser aislado de las células a partir de las cuales se expresa, por ejemplo usando técnicas de separación convencionales. Así, las células se pueden cultivar en condiciones apropiadas, por ejemplo incluyendo soporte y nutrientes, in vitro, y la proteína secretada, es decir, el mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención, se recupera del medio extracelular. Las secuencias manipuladas genéticamente en las células incluyen de este modo preferiblemente secuencias líder y secuencias de péptidos señal que dirigen la secreción del mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención. Las células preferiblemente expresan proteasas capaces de escindir secuencias líder y señal, ya sea secuencias génicas endógenas o manipuladas genéticamente. En una alternativa, las secuencias génicas manipuladas genéticamente que codifican un mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención no incluyen tales secuencias líder y de péptido señal, por medio de lo cual el péptido de la invención expresado intracelularmente no será secretado, y es recuperado de las células mediante procedimientos que implican la lisis celular. En tales métodos las secuencias codificantes pueden incluir etiquetas de purificación que permiten la extracción eficaz del péptido producto del medio, cuyas etiquetas se puede escindir para liberar mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención aislado.

La invención proporciona además un ácido nucleico, que codifica el mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención, ya sea un mimético de armazón de un péptido de fusión o un fragmento, análogo o variante del mismo. Cualquier ácido nucleico que codifica un mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención es abarcado por la presente invención. Debido a la degeneración del código genético una pluralidad de secuencias de ácido nucleico pueden codificar para un mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención. Una molécula de ácido nucleico dentro del alcance de la presente invención también puede contener el ácido nucleico que codifica el mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención y, adicionalmente, además secuencias de nucleótidos (funcionales). En una realización preferida de la presente invención tal molécula de ácido nucleico puede codificar (a) toda la secuencia de aa de GLP-1 (GLP-1 (1-37) o la secuencia de GLP-1 (7-35, 36 o 37) funcional, (b) una secuencia de escisión en el extremo N de la secuencia de GLP-1 de acuerdo con (a) para cualquier proteasa, aguas arriba de (b) puede codificar una secuencia líder. En otra realización preferida, aguas arriba de la secuencia de ácido nucleico codificante de (b) la molécula de ácido nucleico puede comprender adicionalmente (c) una secuencia que codifica para péptido señal. Alternativamente, la molécula de ácido nucleico de la invención puede tener la secuencia (c) fusionada aguas arriba de (a) sin ninguna secuencia que codifica para secuencia líder (b) en medio. Preferiblemente, la secuencia líder y la secuencia del péptido señal son heterólogas para preproglucagón.

La invención proporciona adicionalmente un vector que comprende un ácido nucleico de la invención (molécula) y otros componentes funcionales para la expresión del ácido nucleico de la invención (molécula). Típicamente, el ácido nucleico de la invención (molécula) se fusionará a una secuencia promotora y, finalmente se combinará con otras secuencias reguladoras, por ejemplo una secuencia intensificadora. Para la replicación, el plásmido puede contener un origen de replicación. Con el fin de seleccionar las células transfectadas con el vector de la invención, se pueden proporcionar en el vector uno o más genes de resistencia a antibióticos (p. ej., kanamicina, ampicilina). El vector puede ser un plásmido que incluye un promotor de origen bacteriano, y genes de resistencia a antibióticos y un promotor origen, y los genes de resistencia a antibióticos para la replicación y expresión en células de mamífero. La invención proporciona además una célula anfitriona que comprende ADN de la invención introducido exógenamente capaz de traducir dicha proteína precursora. La célula anfitriona puede ser una célula anfitriona procariótica o una célula anfitriona eucariótica, p. ej., una célula de mamífero. La célula anfitriona no es una célula embrionaria humana o germinal humana.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso del mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un animal, preferiblemente un ser humano, mediante la administración de un péptido de la invención que comprende los componentes (i) y (II) y eventualmente el componente (III). También se proporciona el uso correspondiente de estos péptidos de la invención en la fabricación de un producto para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección asociadas con el metabolismo de la glucosa. Los ejemplos no limitantes del trastorno de la glucosa incluyen: diabetes mellitus de tipo I o tipo II (DMNID), o resistencia a la insulina, trastornos de peso y enfermedades o afecciones asociadas al mismo, en donde dichos trastornos de peso o afecciones asociadas incluyen obesidad, afecciones asociadas con sobrepeso, desregulación de la saciedad, reducción de los niveles plasmáticos de insulina, aumento de los niveles de glucosa en la sangre, o reducción de la masa reducida de células beta pancreáticas. Preferiblemente, en la presente se describe el uso de miméticos de armazón de péptidos de fusión de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes tipo 2 (DMNID). Como consecuencia, la presente invención se refiere a un uso del mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención p. ej. para reducir el peso de un sujeto, para reducir la saciedad de un sujeto, para aumentar los niveles de insulina en plasma postprandialmente en un sujeto, para reducir nivel de glucosa en sangre en ayunas en un sujeto, para incrementar la masa de células beta pancreáticas en un sujeto o para el tratamiento de la diabetes tipo I o II en un sujeto.

Los pacientes con otras enfermedades o trastornos pueden ser tratados mediante miméticos de armazón de péptidos de fusión la invención, es decir, péptidos de fusión o también sus análogos, fragmentos, variantes o derivados. Los miméticos de armazón de péptidos de fusión de la invención se pueden utilizar para la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos y enfermedades o afecciones asociadas a los mismos y para el tratamiento de trastornos y enfermedades o afecciones asociadas a la apoptosis. El uso del

5 mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención para el tratamiento de estos trastornos es el resultado de lo siguiente: los receptores de GLP-1, que están acoplados a la ruta del segundo mensajero AMP cíclico, se expresan a través de los cerebros de roedores y seres humanos. La quimioarquitectura de la distribución de los receptores en el cerebro no solo se correlaciona con un papel central para el GLP-1 en la regulación de la ingesta de alimentos y la respuesta al estrés aversivo. También se ha demostrado que la unión de GLP-1 a su receptor de GLP-1 ejerce propiedades neurotróficas, y ofrece protección contra la apoptosis inducida por glutamato y la lesión oxidativa en células neuronales cultivadas. Además, se demostró que el GLP-1 modifica el procesamiento de la proteína β -amiloide en cultivo celular y reduce los niveles de péptido beta-amiloide de una manera dependiente de la dosis en el cerebro in vivo. El GLP-1 es por lo tanto también conocido como regulador del sistema nervioso central.

10 Los miméticos de armazón de péptidos de fusión de la invención que imitan la actividad biológica de GLP-1 fisiológicamente activo tienen relevancia terapéutica para el tratamiento de, p. ej. la Enfermedad de Alzheimer (EA) y otras afecciones neurodegenerativas centrales y periféricas (p. ej., esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Alexander, enfermedad de Alper, Ataxia telangiectasia, enfermedad de Canavan, síndrome de Cockayne, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, esclerosis múltiple, enfermedad Sandhoff, enfermedad de Pick, Ataxia espinocerebelosa, enfermedad de Schilder y enfermedad de Parkinson).

Además, se demostró que el GLP-1 fisiológicamente activo ejerce una acción anti-apoptótica sobre diversas células, p. ej., GLP-1 es beneficioso para la conservación de la masa y la función de los islotes humanos recién aislados u otros tipos celulares. En la medida de lo posible, el mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención biológicamente activo se puede usar para tratar trastornos, que son causados por apoptosis de células o tejidos.

20 El uso de un mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención puede ser para la fabricación de una composición que se administra exógenamente, y comprende el péptido de la invención aislado. La composición resultante puede ser utilizada también para el tratamiento de los trastornos anteriores. Los trastornos descritos en la presente memoria también pueden ser tratados por las células anfitrionas, el ácido nucleico (moléculas) o los vectores de la invención o, más bien, las células anfitrionas, el ácido nucleico (moléculas) o los vectores de la invención se pueden utilizar para la preparación de un medicamento para el tratamiento de estos trastornos .

La preparación de formulaciones que contienen secuencias de miméticos de armazón de péptidos de fusión de la invención como ingredientes activos es generalmente bien conocida en la técnica, como se ilustra por medio de las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.608.251; 4.601.903; 4.599.231; 4.599.230; 4.596.792; y 4.578.770. Típicamente, tales formulaciones se preparan en forma de inyectables ya sea como disoluciones o suspensiones líquidas, que contienen preferiblemente agua (formulación acuosa) o pueden ser emulsionadas. El término "formulación acuosa" se define como una formulación que comprende al menos 50% p/p de agua. Asimismo, la expresión "disolución acuosa" se define como una disolución que comprende al menos 50% p/p de agua, y el término "suspensión acuosa" se define como una suspensión que comprende al menos 50% p/p de agua.

30 Para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o inyección en el sitio aquejado, el ingrediente activo estará en la forma de una disolución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógenos y tiene pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente incluyen un vehículo líquido tal como agua. Preferiblemente, el vehículo líquido incluirá una disolución salina fisiológica, dextrosa etanol o se pueden incluir otra disolución de sacáridos o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol o combinaciones de los mismos. Son ejemplos adicionales otros vehículos isotónicos tales como inyección de Ringer o Inyección de Ringer con Lactato añadido.

35 Si la invención hace referencia a una formulación farmacéutica que comprende una disolución acuosa de un compuesto de acuerdo con la presente invención, y un tampón, en donde dicho compuesto está presente a una concentración de 0,1 mg/ml o superior, y en donde dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 10,0, preferiblemente de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,5. Preferiblemente, el pH de la formulación es de al menos 1 unidad de pH del punto isoeléctrico del compuesto de acuerdo con la presente invención, incluso más preferible el pH de la formulación es al menos 2 unidades de pH del punto isoeléctrico del compuesto de acuerdo con la presente invención.

También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para su disolución en, o suspensión en, líquido antes de la inyección. La formulación farmacéutica puede ser una formulación liofilizada, a la que el médico o el paciente añade los disolventes y/o diluyentes antes de su uso. En otras palabras, la formulación una vez preparada, puede no ser inmediatamente administrada a un sujeto. Más bien, después de la preparación, se envasa para su almacenamiento en un estado congelado, o en una forma seca para su posterior reconstitución en una forma líquida u otra forma adecuada para la administración a un sujeto. En otra realización, la formulación farmacéutica es una formulación seca (p. ej., secada por congelación o sometida a secado de rocío) lista para su uso sin ninguna disolución previa.

50 Por "forma seca" se quiere significar que la composición farmacéutica líquida se seca ya sea mediante secado por congelación (es decir liofilización; véase, por ejemplo, Williams y Polli (1984) J. Parenteral Sci. Technol. 38: 48-59), secado de rocío (véase Masters (1991) en Spray-Drying Handbook (5ª ed; Longman Scientific and Technical, Essex, Reino Unido), págs. 491-676; Broadhead et al. (1992) Drug Devel. Ind. Pharm. 18: 1169-1206; y Mumenthaler et al. (1994) Pharm. Res. 11: 12-20), o secado al aire (Carpenter y Crowe (1988) Criobiology 25: 459-470; y Roser (1991) Biopharm. 4: 47-53). La formación de agregados por un polipéptido durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida puede afectar adversamente a la actividad biológica de ese polipéptido, dando como resultado

la pérdida de la eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Además, la formación de agregados puede causar otros problemas tales como bloqueo de tubos, membranas, o bombas cuando la composición farmacéutica que contiene el polipéptido se administra usando un sistema de infusión.

5 Es posible que puedan estar presentes otros ingredientes en la formulación farmacéutica peptídica de la presente invención. Tales ingredientes adicionales pueden incluir agentes humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes volumétricos, agentes tamponadores del pH (p. ej., tampones de fosfato o citrato o maleato), conservantes, tensioactivos, estabilizadores, modificadores de la tonicidad, agentes quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (p. ej., albúmina de suero humana, gelatina o proteínas) y/o un zwitterion (p. ej., un aminoácido tal como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina).

10 Con respecto a los estabilizadores para las formulaciones de la invención éstas pueden seleccionarse preferiblemente del grupo de polímeros de alto peso molecular o compuestos de bajo molecular. En una realización adicional de la invención el estabilizador se selecciona entre polietilenglicol (p. ej., PEG 3350), poli(alcohol vinílico) (PAV), polivinilpirrolidona, carboxi-hidroxicelulosa o derivados de los mismos (p. ej., HPC, HPC-SL, HPC-L y HPMC), ciclodextrinas, sustancias que contienen azufre tales como monoioglicerol, ácido tioglicólico, y 2-metiltoetanol, y diferentes sales (p. ej. cloruro de sodio). Cada uno de estos estabilizadores específicos constituye una realización alternativa de la invención. Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes estabilizadores adicionales, que mejoran aún más la estabilidad de un polipéptido terapéutico activo de las mismas. Los agentes estabilizantes de particular interés para la presente invención incluyen, pero no están limitados a, metionina y EDTA, que protegen al polipéptido de la oxidación de la metionina, y un tensioactivo no iónico, el cual protege al polipéptido de la agregación asociada a la congelación-descongelación o cizalladura mecánica.

Con respecto a agentes tensioactivos para formulaciones de la invención éstos pueden seleccionarse preferiblemente entre un detergente, aceite de ricino etoxilado, glicéridos poliglicolizados, monoglicéridos acetilados, ésteres de ácidos grasos y sorbitán, polímeros de bloque polioxipropileno-polioxietileno (p. ej., poloxámeros, tales como Pluronic F68, poloxámero 188 y 407, Triton X -100), ésteres de ácidos grasos y polioxietilensorbitán, OPE
25 estrellado, derivados polioxietileno y polietileno tales como derivados alquilados y alcoxilados (tweens, p. ej., Tween-20, Tween-40, Tween-80 y Brij-35), hidroxistearato de polioxietileno, monoglicéridos o derivados etoxilados de los mismos, diglicéridos o derivados polioxietilenados de los mismos, alcoholes, glicerol, lecitinas y fosfolípidos (p. ej. fosfatidilserina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, difosfatidilglicerol y esfingomielina), derivados de fosfolípidos (p. ej., ácido dipalmitoilfosfatídico) y lisofosfolípidos (p. ej. palmitoilfosfatidil-L-serina y ésteres de 1-acil-sn-glicero-3-fosfato de etanolamina, colina, serina o treonina) y alquil-, alcoxil-(alquil éster), alcoxi-(alquil éter)-
30 derivados de lisofosfatidil y fosfatidilcolinas, p. ej. derivados de lauroilo y miristoilo de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y modificaciones del grupo de cabeza polar, es decir colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol, y los de carga positiva DODAC, DOTMA, DCP, BISHOP, lisofosfatidilserina y lisofosfatidiltreonina, y glicerofosfolípidos (p. ej. cefalinas), gliceroglicolípidos (p. ej. galactopiranosido), esfingoglicolípidos (p. ej. ceramidas, gangliósidos), dodecilsulfocolina, lisolectina de huevo de gallina, derivados de ácido fusídico (p. ej. tauro-dihidrofusidato sódico etc.), ácidos grasos de cadena larga y sales de los mismos C6-C12 (p. ej. ácido oleico y ácido caprílico), acilcarnitinas y derivados, derivados N'-X-acilados de lisina, arginina o histidina, o derivados acilados de la cadena lateral de lisina o arginina, derivados N-acilados de dipéptidos que comprenden cualquier combinación de lisina, arginina o histidina y un aminoácido ácido o neutro, derivado N-acilado de un tripéptido que comprende cualquier combinación de un aminoácido neutro y dos aminoácidos cargados, DSS (docusato sódico, registro CAS n° [577-11-7]), docusato de calcio, registro CAS n° [128-49-4]), docusato potásico, registro CAS n° [7491-09-0]), SDS (dodecilsulfato sódico o laurilsulfato sódico), caprilato sódico, ácido cólico o derivados de los mismos, ácidos biliares y sales de los mismos y productos conjugados de glicina o taurina, ácido ursodesoxicólico, colato sódico, desoxicolato sódico, taurocolato sódico, glicocolato sódico, N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, tensioactivos monovalente aniónicos (alquil-aril-sulfonatos), tensioactivos zwitteriónicos (p. ej. N-alquil-N,N-dimetilamonio-1-propanosulfonatos, 3-colamido-1-propildimetil-amonio-1-propanosulfonato, tensioactivos catiónicos (bases de amonio cuaternarias) (p. ej. bromuro de cetiltrimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio), tensioactivos no iónicos (p. ej. dodecil-D-glucopiranosido), poloxaminas (p. ej. Tetronic), que son copolímeros de bloques tetrafuncionales derivados de la adición secuencial de óxido de propileno y óxido de etileno a etilendiamina, o el tensioactivo se puede seleccionar del grupo de derivados de imidazolina o mezclas de los mismos. Cada uno de estos tensioactivos específicos constituye una realización alternativa de la invención. El uso de un tensioactivo en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos en la técnica. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

55 Con respecto a los conservantes farmacéuticamente aceptables, estos se pueden seleccionar del grupo que consiste en fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, p-hidroxibenzoato de butilo, 2-feniletanol, alcohol bencílico, etanol, clorobutanol y timerosal, bronopol, ácido benzoico, imidurea, clorohexidina, deshidroacetato sódico, clorocresol, p-hidroxibenzoato de etilo, cloruro de benzetonio, clorfenesina (3p-clorfenoxipropano-1,2-diol) o mezclas de los mismos. El conservante puede estar presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 20 mg/ml. El conservante puede estar presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml o en una concentración de 5 mg/ml a 10 mg/ml o en una concentración de 10 mg/ml a 20 mg/ml. El uso de un conservante en composiciones farmacéuticas es bien conocido para el experto en la materia. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, 2000. Con

respecto a los agentes isotónicos, estos se pueden seleccionar preferiblemente del grupo que consiste en una sal (p. ej. cloruro sódico), un azúcar o alcohol de azúcar, un aminoácido (p. ej. L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (p. ej. glicerol (glicerina), 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol), polietilenglicol (p. ej. PEG 400), o mezclas de los mismos. Se puede usar cualquier azúcar tal como mono-, di- o polisacáridos, o glucanos solubles en agua incluyendo, por ejemplo, fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trealosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, hidroxietilalmidón y carboximetilcelulosa-Na. En una realización el aditivo de azúcar es sacarosa. El alcohol de azúcar se define como un hidrocarburo C4-C8 que tiene al menos un grupo -OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabitol. En una realización el aditivo de alcohol de azúcar es manitol. Los azúcares o alcoholes de azúcar mencionados antes se pueden usar individualmente o combinados. No hay un límite fijado a la cantidad usada, siempre que el azúcar o alcohol de azúcar sea soluble en la preparación líquida y no afecte de forma adversa a los efectos estabilizantes logrados usando los métodos de la invención.

Con respecto a los agentes quelantes, estos se pueden seleccionar preferiblemente entre sales de ácido etilendiaminotetracético (EDTA), ácido cítrico y ácido aspártico, y mezclas de los mismos.

Con respecto a los tampones, éstos se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste de acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrógenofosfato sódico, hidrógenofosfato disódico, fosfato sódico, y tris(hidroximetil)aminometano, hepes, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas de los mismos. Cada uno de estos tampones específicos constituye una realización alternativa de la invención.

El uso de todos los aditivos anteriormente mencionados en composiciones farmacéuticas que contienen el mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención (terapéutico) es bien conocido por los expertos en la técnica, en particular con respecto a los intervalos de concentración del mismo. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy 19a edición, 1995.

Las formulaciones que contienen el mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención se administran convencionalmente parenteralmente, mediante inyección, por ejemplo, por vía subcutánea, intradérmica, subdérmica o intramuscular. Una composición para la administración parenteral del péptido de la invención se puede preparar, por ejemplo, como se describe en el documento WO 03/002136.

Las formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios y, en algunos casos, formulaciones orales, bucales, sublinguales, intraperitoneales, intravaginales, anales e intracraneales. Para los supositorios, los aglutinantes y vehículos tradicionales pueden incluir, p. ej., polialquilenglicoles o triglicéridos; tales supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el ingrediente activo en el intervalo de 0,5% a 10%, preferiblemente 12%. Las formulaciones orales incluyen excipientes empleados normalmente tales como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, y similares. Estas composiciones adoptan la forma de disoluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen 10-95% de ingrediente activo, preferiblemente 25-70%.

Como se ha mencionado anteriormente, se pueden emplear métodos farmacéuticos adicionales para controlar la duración de la acción. Se pueden lograr preparaciones de liberación controlada mediante el uso de polímeros para complejar o adsorber un mimético de armazón de un péptido de fusión de la presente invención. La liberación controlada del ingrediente activo (mimético de armazón de un péptido de fusión) puede ejercerse por selección de macromoléculas apropiadas (por ejemplo, poliésteres, poliaminoácidos, polivinilpirrolidona, copolímeros de etilenoacetato de vinilo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, y sulfato de protamina), la concentración de las macromoléculas así como los métodos de incorporación. Tales enseñanzas se describen en las Remington Pharmaceutical Sciences (véase más arriba). Otro posible método para controlar la duración de la acción mediante preparaciones de liberación controlada, consiste en la incorporación de un péptido de la presente invención en partículas de un material polimérico tal como poliésteres, poliaminoácidos, hidrogeles, poli (ácido láctico) o copolímeros de etileno-acetato de vinilo.

Los miméticos de armazón de los péptidos de la invención se pueden formular como formas neutras o salinas. Un mimético de armazón de un péptido de fusión de la presente invención puede ser lo suficientemente ácido o lo suficientemente alcalino para reaccionar con cualquiera de una diversidad de bases orgánicas e inorgánicas, y ácidos orgánicos e inorgánicos, para formar una sal (de adición), por ejemplo, formada con los grupos amino libres del péptido. Los ácidos comúnmente empleados para formar sales de adición de ácido son ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, y similares, y ácidos orgánicos tales como ácido tartárico, ácido toluenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido oxálico, mandélico, ácido p-bromofenil-sulfónico, ácido carbónico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido benzoico. Los ejemplos de tales sales incluyen sulfato, piro-sulfato, bisulfato, sulfito, bisulfito, fosfato, monohidrogenofosfato, dihidrogenofosfato, metafosfato, pirofosfato, cloruro, bromuro, yoduro, acetato, propionato, decanoato, caprilato, acrilato, formiato, isobutirato, caproato, heptanoato, propiolato, oxalato, malonato, succinato, suberato, sebacato, fumarato, maleato, butino-1,4-dioato, hexino-1,6-dioato, benzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, ftalato, sulfonato, xilenosulfonato, fenilacetato, fenilpropionato, fenilbutirato, citrato, lactato,

5 gamma-hidroxibutirato, glicolato, tartrato, metanosulfonato, propanosulfonato. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, o férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, y similares. Las sales de adición de ácido, sales carboxilato, ésteres de alquilo inferior, y amidas de los péptidos de la invención se pueden formular de acuerdo con el documento WO 91/11457 (1991); la Patente Europea EP 0 733 644 (1996); y la Patente de los Estados Unidos U.S. 5.512.549 (1996).

10 Las formulaciones que contienen las secuencias del mimético de armazón de un péptido de fusión de la invención se administran de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. La cantidad a administrar depende del sujeto a tratar, incluyendo, p. ej., la gravedad de la enfermedad del paciente. Los intervalos de dosificación adecuados son, p. ej., del orden de varios cientos de microgramos de ingrediente activo por dosis terapéutica, con un intervalo preferido de aproximadamente 0,1 µg a 2000 µg (incluso aunque se contemplan cantidades más altas en el intervalo de 1-10 mg), tal como en el intervalo desde aproximadamente 0,5 µg a 1000 µg, preferiblemente en el intervalo de 1 µg a 500 µg y especialmente en el intervalo de aproximadamente 10 µg a 100 µg.

15 Las formulaciones que contienen los miméticos de armazón de péptidos de fusión de la invención más p. ej. excipientes adicionales, p. ej., glicina y manitol u otros aditivos, pueden comercializarse en forma liofilizada como viales. Se proporciona un vial de diluyente asociado, que permite al paciente reconstituir el producto a la concentración deseada antes de la administración de la dosis. Las formulaciones de la invención también se pueden comercializar en otras formas bien conocidas, tales como jeringas precargadas, etc.

20 La invención se ilustra adicionalmente en los ejemplos adjuntos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Creación de constructos genéticos

25 La secuencia codificante del ADNc de GLP-1 (7-37) se sintetizó sintéticamente, en una secuencia que incluía los sitios HincII y EcoRI como se indica en la Fig. 1a. Por separado se sintetizó el ADNc ilustrado en la Fig. 1b, incluyendo las secuencias codificantes de GLP-1 (7-37), IP2 y los sitios de restricción para SfoI, EcoRI y XbaI, como se ilustra en la Fig. 1 b. Para dirigir GLP-1 a la ruta secretora, se utilizó la secuencia señal heteróloga de estromelina 3 (Núm. de Acc. NM_005940). Por lo tanto el ADNc, que codifica la señal de estromelina y la secuencia líder fue amplificado mediante PCR con transcriptasa inversa a partir de ARN humano, y utilizado con el constructo de la Fig. 1 o Fig. 1b para formar el constructo mostrado en la Fig. 1c y la Fig. 1d, respectivamente.

30 El fragmento HincII/EcoRI del constructo de la Fig. 1a se clona en el sitio SfoI de la secuencia de la Fig. 1d para formar el constructo de la Fig. 1e. De manera similar, el fragmento EcoRI de la Fig. 1d se clona en el sitio EcoRI de un plásmido de expresión eucariótico, para producir el constructo mostrado en la Fig. 1f. Para formar el constructo mostrado en la Fig. 1g, el fragmento HincII/XbaI del constructo mostrado en la Fig. 1b se clona repetitivamente en el sitio SfoI/XbaI del constructo mostrado en la Fig. 1d. La Figura 1h muestra una secuencia de codones optimizados, sintetizada que codifica el líder de la estromelina y la secuencia de señal interrumpidas por una secuencia de intrón endógena acortada, fusionada a secuencias que codifican GLP-1 (7-37), IP2 y GLP-2 (1-35) humanos. La secuencia de ADN del constructo de la Fig. 1h es el SEQ ID NO: 16, mientras que el SEQ ID NO: 15 muestra también la secuencia del péptido traducido.

40 También se sintetizan las secuencias de las Figs. 1i y 1j. Estas se usan después para formar el constructo de la Fig. 1k, clonando el fragmento NaeI/BssHII de la Fig. 1j en la secuencia NaeI/BssHII linealizada de la Fig. 1h. La secuencia de ADN del constructo de la Fig. 1k es el SEQ ID NO: 14, mientras que el SEQ ID NO: 13 muestra también la secuencia del péptido traducido. El constructo de la fig. 1l se forma mediante digestión con BssHII y religación de la secuencia de la Fig. 1h. La secuencia de ADN del constructo de la Fig. 1l es el SEQ ID NO: 18, mientras que el SEQ ID NO: 17 también muestra la secuencia del péptido traducido. El constructo de la fig. 1m se forma mediante la clonación del fragmento AfeI/BssHII de la secuencia de la Fig. 1i en la secuencia afeI/BssHII linealizado de la Fig. 1h. La secuencia de ADN del constructo de la Fig. 1m es el SEQ ID NO: 20, mientras que el SEQ ID NO: 19 también muestra la secuencia del péptido traducido.

Los constructos anteriores pueden ser elaborados por un experto en la técnica utilizando mecanismos rutinarios.

50 Ejemplo 2

Transfección, selección clonal y expresión de GLP-1 de células de mamífero

55 Fuente de las células: HEK293 (línea celular de riñón embrionario humano, Núm. ACC 305, DSMZ Cell Culture Collection, Alemania), AtT20 (línea de células tumorales de glándula pituitario LAF1 de ratón, Núm. 87021902, European Cell Culture Collection, Reino Unido), células hTERT-MSC generadas por el Prof. Kassem, Hospital Universitario de Odense, Dinamarca.

Para la transfección de 106 células se utilizaron 0,5-2 µg de ADN plásmido con diferentes constructos de GLP-1. Los constructos se generaron como se describe en el Ejemplo 1. Las células HEK293 se transfectaron mediante el método de co-precipitación con fosfato de calcio convencional como se describe en Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al. 1994ff Harvard Medical School Vol. 2, Unidad 9.1). Las células AtT20 se transfectaron utilizando FuGene (Roche) como se describe en Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al. 1994ff, Harvard Medical School Vol. 2., Unidad 9.4). La transfección de células hTERT-MSC se realizó usando la tecnología Nucleofector (Amaxa), un método no viral que se basa en la combinación de parámetros eléctricos y disoluciones específicas de tipo de célula. Utilizando el dispositivo Nucleofector (programa C17) y la disolución Nucleofector VPE-1001 se han logrado eficacias de transfección >60%. Cuarenta y ocho horas después de la transfección se realizó la selección de los clones celulares con integración estable de ADN en el cromosoma mediante la adición del agente selectivo blasticidina (2 µg/ml) al medio de cultivo. De doce a quince días más tarde, los clones de células transfectadas estables pudieron ser aislados y expandidos para su caracterización.

La expresión transitoria de los distintos constructos de GLP-1 se midió en las células hTERT-MSC y HEK293. Si bien solo se puede encontrar un nivel GLP-1 activo marginal en los constructos de GLP-1 monoméricos Núm. 103 y Núm. 317 (que tiene solo una copia de GLP-1 (7-37), se puede encontrar una enorme ganancia en la expresión del constructo GLP-1 dimérico Núm. 217 (que tiene GLP-1 (7-37) como componente (I) y como componente (III)) tanto en las células hTERT-MSC como en HEK293. Los resultados se resumen en la Figura 2. Un alargamiento del constructo para el constructo de GLP-1 Núm. 159 (que tiene cuatro copias de IP2 como componente (II)) no da como resultado un incremento significativo adicional (no mostrado). Después de la transfección de las células hTERT-MSC con diferentes constructos, se seleccionaron los clones que expresan de manera estable GLP-1. Los niveles de expresión se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Constructo	clon celular	GLP activo por 106 células y hora [pmoles]
Núm. 103-GLP1(7-37)	49TM113/13	0,4
Núm. 317-GLP1(7-37)IP2-11-aa	71TM169/1	0,3
Núm. 217-GLP1(7-37)-IP2-GLP1(7-	79TM217/13	2,7
CM1		

Ejemplo 3

Análisis de Transferencia Western de Péptidos GLP-1, secretados por células de mamífero

Se separó el sobrenadante de cultivo celular de células secretoras de GLP-1 en un gradiente de SDS-PAGE de 10%-20% (120V, 90 minutos) y se transfirió a una membrana de PVDF (Membrana Immobilon-P 0,45 µm Millipore IPVH 00010) por transferencia semi-seca (2,0 mA/cm², 60 minutos). Después de la fijación con metanol y el bloqueo (BSA al 3% (p:v), Tween-20 al 0,1% (v:v) en TBS) la membrana se sometió a inmunotransferencia con 1 mg/ml de anticuerpo anti-GLP-1 (HYB 147-12, Antibodyshop) a 4°C durante la noche. Después del lavado y la incubación con 0,02 µg/ml de anticuerpo de detección (anti-IgG de ratón, conjugada con HRP, Perkin Elmer PC 2855 a 1197) a la temperatura ambiente durante 4 horas, la detección de quimioluminiscencia revela la ubicación de la proteína.

El análisis de transferencia Western se muestra en la Figura 3 (1: 100 ng de GLP-1(7-37) sintético disuelto en sobrenadante de células hTERT-MSC simuladamente transfectadas, 2: sobrenadante de células hTERT-MSC (clon 79TM217/13) que secretan GLP-1 dimérico del constructo Núm. 217, 3: sobrenadante de células AtT20 (clon 81-A-217/3) que secreta GLP-1 dimérico del constructo Núm. 217; M: marcador de proteína teñido previamente [kDa]). Los resultados demuestran que los péptidos de la invención que contienen GLP-1 (7-37) y un apéndice C-terminal (2 y 3 en la Fig. 3) son secretados a partir de las líneas celulares transfectadas y pueden ser detectados utilizando un anticuerpo anti-GLP-1, que se une a los epítomos moleculares medios de GLP-1 (7-37).

Ejemplo 4

Estabilidad en plasma in vitro de péptidos GLP-1 secretados de células humanas

Las células HEK293 y hTERT-MSC fueron transfectadas transitoriamente con constructos, que codificaban la secuencia señal heteróloga de estromelisin, que está conectada a variantes de GLP-1 que codifican los péptidos siguientes:

1: GLP-1 (7-37)

2: GLP-1 (7-37)-IP2-prolongado con 11 AA

3: GLP1 (7-37)-IP2-GLP1 (7-37)

El sobrenadante de cultivo celular, que contenía los péptidos GLP-1 secretados de células o GLP-1 (7-37) sintético (Bachem) se incubó con plasma enriquecido con linfocitos humanos que contenía actividad de dipeptidilpeptidasa a 37°C y 5% de CO₂, durante 3 o 4 horas. Se utilizó el GLP-1 (7-37) sintético en el sobrenadante de las células simuladamente transfectadas como control positivo para la actividad de DPP-IV, que se demostró que era inhibida por la adición de un inhibidor de DPP-IV (Núm. DPP4, Biotrend). El GLP activo se midió usando un ELISA para GLP-1 (Activo) (Núm. EGLP-35K, Biotrend), usando un anticuerpo que se une al epítipo N-terminal de GLP-1 (7-37) que discrimina el péptido GLP-1 (9-37) inactiva, degradado por DPP-IV.

Los resultados se muestran en las Figuras 4 (células HEK293) y 5 (células hTERT-MSC). Las células HEK293 y hTERT-MSC son ambas anfitriones eficaces para el constructo génico. La numeración de los resultados para las células transfectadas de los tipos 1 a 3 es como en el Ejemplo 3 (1: 100 ng GLP-1 (7-37) sintético disuelto en sobrenadante de células hTERT-MSC simuladamente transfectadas, 2: sobrenadante de células hTERT-MSC (clon 79TM217/13) que secreta GLP-1 dimérico del constructo Núm. 217, 3: sobrenadante de células AtT20 (clon 81-A-217/3) que secreta GLP-1 dimérico del constructo Núm. 217). Si bien el constructo 1 produce GLP-1 de tipo salvaje que es inactivado por DPP-IV de una manera similar al GLP-1 sintético, las formas de GLP-1 prolongadas C-terminalmente de la invención (2 y 3 en la Figura 4, 3 en la Figura 5) son más resistentes a la degradación y mantienen una actividad de al menos 40%. Los péptidos de GLP-1 prolongados C-terminalmente están significativamente estabilizados en plasma humano in vitro. El péptido con la secuencia de GLP-1 dimérico (3) está casi completamente estabilizado frente a la degradación con DPP-IV in vitro.

Ejemplo 5

20 Análisis de Transferencia Western de péptidos de GLP-1

Se produjeron varios péptidos de GLP-1 sintéticamente en fase sólida (syn) o recombinantes usando *E. coli* (rec). Los péptidos GLP-1 (31 ng SEQ ID NO: 1 y 10 ng de cada SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8) se separaron en un gradiente de SDS PAGE al 10% - 20% (120V, 90 minutos) y se transfirieron a una membrana de PVDF (Membrana Immobilon-P 0,45 m Millipore IPVH 00010) mediante transferencia semi-seca (2,0 mA/cm², 60 minutos). Después de la fijación con metanol y bloqueo (BSA al 3% (p:v), Tween-20 al 0,1% (v:v) en TBS) la membrana se sometió a inmunotransferencia con 1 µg/ml de anticuerpo anti-GLP-1 (HYB 147-12, Antibodyshop) a 4°C durante la noche. Después del lavado y la incubación con 0,02 g/ml de anticuerpo de detección (anti-IgG de ratón, conjugada con HRP, Perkin Elmer PC 2855 a 1197) a temperatura ambiente durante 4 horas, la detección de la quimioluminiscencia revela la ubicación de la proteína. La Fig. 6 muestra una Transferencia Western para los péptidos indicados. Se pueden dar los siguientes valores: SEQ ID NO: 1 (ID1syn) corresponde a GLP-1 (7-37), 31 aa, 3,3 kD; SEQ ID NO: 8 (ID8syn, CM3) corresponde a GLP-1 (7-37)-IP2, 46 aa, 5,1 kD; SEQ ID NO: 7 (ID7rec, CM2) corresponde a GLP-1 (7-37)-IP2-RR-GLP2, 83 aa, 9,4 kD; SEQ ID NO: 6 (ID6syn, CM1) corresponde a GLP-1 (7-37)-IP2-RR-GLP1 (7-37), 79 aa, 8,7 kD.

Ejemplo 6

35 Estabilidad en plasma humano In vitro de péptidos de GLP-1CM

Se incubaron péptidos de GLP-1 sintéticos (SEQ ID NO: 1syn, SEQ ID No: 6syn, SEQ ID No: 7rec, SEQ ID No: 8syn) a concentraciones de 20 ng/ml con plasma humano a 37°C y 5% de CO₂ durante 3 horas. La actividad dipeptidilpeptidasa del plasma se inhibió por medio de un inhibidor de DPP-IV (Núm. DPP4, Biotrend). El GLP activo se midió usando el ELISA para GLP-1 (Activo) (Núm. EGLP-35K, Biotrend).

40 En contraste con el GLP-1(7-37) nativo (SEQ ID NO: 1), los péptidos de GLP-1 prolongados C-terminalmente de la invención SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 están significativamente estabilizados en plasma humano in vitro (Fig. 7). Como control (en el lado derecho) se muestran los resultados obtenidos para los experimentos con la adición de DPP-IV. La actividad de GLP-1 se mantiene completamente en estos experimentos de control.

Ejemplo 7

45 Bioanálisis in vitro

Producción de AMP cíclico

Se cultivaron células RIN-5F (tumor de células de islotes de rata; ECACC No. 95090402) en placas de 24 pocillos durante 4 días alcanzando un 70% de confluencia. Las células se lavaron dos veces con DMEM (E15-009, PAA) antes de la adición de 0,5 ml de DMEM (E15-009, PAA) con un suplemento de HSA al 1% (Aventis), IBMX 0,2 mM (858455, Sigma) y los péptidos de ensayo. Después de una incubación de 20 minutos a 25°C las células se lavaron dos veces con PBS enfriado con hielo. El AMPc celular se extrajo mediante la adición de HCl 0,1 N que contenía Triton X-100 0,5%. El AMP cíclico se cuantificó utilizando el EIA para AMPc (pH bajo) (Cat. DE0355, R & D). Para la estimulación se han utilizado SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 6syn, SEQ ID NO: 6rec, SEQ ID No: 7rec, SEQ ID No: 8syn 3 * 10-8M.

Los resultados se muestran en la Fig. 8. La producción de 100% de AMPc se corresponde con producción basal en ausencia de GLP-1. GLP-1 se une a receptores acoplados a proteína G y estimula la producción de AMPc. Todas las moléculas probadas incrementan la producción de AMPc celular.

Ejemplo 8

5 Bioactividad in vivo

Se trataron ratones diabéticos de tipo II (C57BL/Ks-Leprdb/db, Harlan) de 11 semanas de edad con 5 µg de péptido mediante inyección subcutánea dos veces al día a las 9 am y 5 pm (n = 5 por grupo). Se midió la glucosa en sangre antes (día 0) y después del tratamiento con péptidos GLPCM (Día 2, 4, 7, 10) a las 10 am después de un periodo de ayuno durante una noche. Los datos se presentaron con respecto a los niveles de glucosa en sangre medidos el día 0.

10 Todos los péptidos de la invención sometidos a ensayo (SEQ ID NO: 6 (sintético o recombinante) y SEQ ID NO: 7 (sintético o recombinante)) tienen un efecto anti-hiperglicemia. Los mejores resultados se obtuvieron con NO ID SEQ: 6 (CM1) recombinante y SEQ ID NO: 8 (CM3) sintético. En la fig. 9 (eje y) se muestra el efecto relativo del tratamiento. La glucosa en sangre el día = 0 se ajustó a 1. Los animales no tratados experimentan un continuo
15 aumento en el nivel de glucosa en sangre con el tiempo, mientras que los animales tratados con los péptidos de la invención presentan grosso modo una disminución continua del nivel de glucosa en sangre con el tiempo.

Lista de Secuencias

HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLVKGR G

Sequence ID No.: 1

RRDFPEEVAI VEELG

5 ID de Secuencia No.: 2

RRDFPEEVAI AEELG

ID de Secuencia No.: 3

HADGSFSDEM NTILDNLAAR DFINWLIQTK ITDRK

ID de Secuencia No.: 4

10 HADGSFSDEM STILDNLATR DFINWLIQTK ITDKK

ID de Secuencia No.: 5

**HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLVKGR GRRDFPEEVA IAEELGRRHA
EGTFTSDVSS YLEGQAAKEF IAWLVKGRG**

ID de Secuencia No.: 6

**HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLVKGR GRRDFPEEVA IAEELGRRHA
DGSFSDEMST ILDNLATRDF INWLIQTKIT DKK**

ID de Secuencia No.: 7

HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLVKGR GRRDFPEEVA IAEELG

15 ID de Secuencia No.:8

**MAPAAWLRSA AARALLPPML LLLLQPPPLL ARALPPDVHH LHAERRGPOP
WHAALPSSPA PAPTQEAPR PASSLRPPRC GVPDPSDGLS ARNRQKR**

ID de Secuencia No.: 9

**HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLVKGR GRRDFPEEVA IVEELGRRHA
EGTFTSDVSS YLEGQAAKEF IAWLVKGRG**

ID de Secuencia No.: 10

**HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLVKGR GRRDFPEEVA IVEELGRRHA
DGSFSDEMNT ILDNLAARDF INWLIQTKIT DRK**

ID de Secuencia No.: 11

HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLVKGR GRRDFPEEVA IVEELG

20 ID de Secuencia No.:12

1 gatatccacc atggcccccg ccgcctggct gaggagcgcc gccgccaggg
 M A P A A W L R S A A A R A
 51 ccctgctgcc acccatgctg ctgctgctgc tgcagcccc acctctgctg
 L L P P M L L L L L Q P P P L L
 101 gcccgggccc tgcccccggt gagtgcccgc cactcgccgt ccgctcctcg
 A R A L P P
 151 ctgagggggc gccgggacag cgggctgggc ccagcggcgt atccggacgc
 201 caagaaacca gagagccagc cagatgccaa agggccctgc catgtgccgg
 251 tgccctttcc ctctccattt gccctgccac acagtgggct ggggttgca
 301 gtgtgtttgc tgacaggcca catctctaac tgtgggcat gtggacctta
 351 ggcctgacca gaccctcatg tcttctctct tcccaggacg tgcaccacct
 D V H H L
 401 gcacgccgag aggcgcggcc ctcagccctg gcacgccgcc ctgccaaagca
 H A E R R G P Q P W H A A L P S S
 451 gccctgcccc tgccccagcc acccaggagg cccccaggcc tgccagcagc
 P A P A P A T Q E A P R P A S S
 501 ctgagggcac ccaggtgcgg cgtgcctgat ccctccgatg gcctgagcgc
 L R P P R C G V P D P S D G L S A
 551 tcggaatcgg cagaagaggc acgccgaggg caccttcacc tccgacgtga
 R N R Q K R H A E G T F T S D V S
 601 gcagctacct ggagggccag gccgccaagg agttcatcgc ctggctggtg
 S Y L E G Q A A K E F I A W L V
 651 aagggcaggg gccgcagggg cttccctgag gaggtggcca tcgtggagga
 K G R G R R D F P E E V A I V E E
 701 gctgggcccg cgacacgccg agggcacctt cacctccgac gtgagcagct
 L G R R H A E G T F T S D V S S Y
 751 acctggaggg ccaggccgcc aaggagtcca tcgctggct ggtgaagggc
 L E G Q A A K E F I A W L V K G
 801 aggggctgag cgcgc
 R G *

ID de Secuencia No.: 13

1 gatatccacc atggcccccg ccgcctggct gaggagcgcc gccgccaggg ceetgctgcc
 61 acccatgctg ctgctgctgc tgcagcccc acctctgctg gcccgggccc tgcccccggt
 121 gagtgcccgc cactcgccgt ccgctcctcg ctgagggggc gccgggacag cgggctgggc
 181 ccagcggcgt atccggacgc caagaaacca gagagccagc cagatgccaa agggccctgc
 241 catgtgccgg tgccctttcc ctctccattt gccctgccac acagtgggct ggggttgca
 301 gtgtgtttgc tgacaggcca catctctaac tgtgggcat gtggacctta ggcctgacca
 361 gaccctcatg tcttctctct tcccaggacg tgcaccacct gcacgccgag aggcgcggcc
 421 ctcagccctg gcacgccgcc ctgccaaagca gccctgcccc tgccccagcc acccaggagg
 481 cccccaggcc tgccagcagc ctgagggcac ccaggtgcgg cgtgcctgat ccctccgatg
 541 gcctgagcgc tcggaatcgg cagaagaggc acgccgaggg caccttcacc tccgacgtga
 601 gcagctacct ggagggccag gccgccaagg agttcatcgc ctggctggtg aagggcaggg
 661 gccgcagggg cttccctgag gaggtggcca tcgtggagga gctgggcccg cgacacgccg
 721 agggcacctt cacctccgac gtgagcagct acctggaggg ccaggccgcc aaggagtcca
 781 tcgctggct ggtgaagggc aggggctgag cgcgc

ID de Secuencia No.: 14

1 gatatccacc atggcccccg ccgcctggct gaggagcgcc gccgccaggg
 M A P A A W L R S A A A R A
 51 ccctgctgcc acccatgctg ctgctgctgc tgcagcccc acctctgctg
 L L P P M L L L L L Q P P P L L
 101 gcccgggccc tgcccccggt gaggccccgc cactcgccgt ccgctcctcg
 A R A L P P
 151 ctgagggggc gccgggcaag cgggctgggc ccagcggcgt atccggacgc
 201 caagaaacca gagagccagc cagatgcca agggccctgc catgtgccgg
 251 tgccctttcc ctctccattt gccctgccac acagtgggct ggggttgac
 301 gtgtgtttgc tgacaggcca catctctaac tgtgggcat gtggacctta
 351 ggcctgacca gaccctcatg tcttctctct tcccaggacg tgcaccacct
 D V H H L
 401 gcacgccgag aggcgcggcc ctcagccctg gcacgccgcc ctgccaagca
 H A E R R G P Q P W H A A L P S S
 451 gccctgcccc tgccccagcc acccaggagg cccccaggcc tgccagcagc
 P A P A P A T Q E A P R P A S S
 501 ctgagggcac ccaggtgcgg cgtgcctgat ccctccgatg gcctgagcgc
 L R P P R C G V P D P S D G L S A
 551 tcggaatcgg cagaagaggc acgccgaggg caccttcacc tccgacgtga
 R N R Q K R H A E G T F T S D V S
 601 gcagctacct ggagggccag gccgcccaagg agttcatcgc ctggctggtg
 S Y L E G Q A A K E F I A W L V
 651 aagggcaggg gccgcagggc cttccctgag gaggtggcca tcgtggagga
 K G R G R R D F P E E V A I V E E
 701 gctgggcccg cgacacgccg acggcagctt cagcgacgag atgaacacca
 L G R R H A D G S F S D E M N T I
 751 tcttgacaaa cctggcccgcg cgcgacttca tcaactggct gatccagacc
 L D N L A A R D F I N W L I Q T
 801 aagatcaccg atcggaagtg agcgcgctga tatc
 K I T D R K *

ID de Secuencia No.: 15

1 gatatccacc atggcccccg ccgcctggct gaggagcgcc gccgccaggg ccctgctgcc
 61 acccatgctg ctgctgctgc tgcagcccc acctctgctg gcccgggccc tgcccccggt
 121 gaggccccgc cactcgccgt ccgctcctcg ctgagggggc gccgggcaag cgggctgggc
 181 ccagcggcgt atccggacgc caagaaacca gagagccagc cagatgcca agggccctgc
 241 catgtgccgg tgccctttcc ctctccattt gccctgccac acagtgggct ggggttgac
 301 gtgtgtttgc tgacaggcca catctctaac tgtgggcat gtggacctta ggcctgacca
 361 gaccctcatg tcttctctct tcccaggacg tgcaccacct gcacgccgag aggcgcggcc
 421 ctcagccctg gcacgccgcc ctgccaagca gccctgcccc tgccccagcc acccaggagg
 481 cccccaggcc tgccagcagc ctgagggcac ccaggtgcgg cgtgcctgat ccctccgatg
 541 gcctgagcgc tcggaatcgg cagaagaggc acgccgaggg caccttcacc tccgacgtga
 601 gcagctacct ggagggccag gccgcccaagg agttcatcgc ctggctggtg aagggcaggg
 661 gccgcagggc cttccctgag gaggtggcca tcgtggagga gctgggcccg cgacacgccg
 721 acggcagctt cagcgacgag atgaacacca tcttgacaaa cctggcccgcg cgcgacttca
 781 tcaactggct gatccagacc aagatcaccg atcggaagtg agcgcgctga tatc

ID de Secuencia No.: 16

1 gatatccacc atggcccccg ccgcctggct gaggagcgcc gccgccaggg
 M A P A A W L R S A A A R A
 51 ccctgctgcc acccatgctg ctgctgctgc tgcagcccc acctctgctg
 L L P P M L L L L L Q P P P L L

101 gcccgggccc tgccccggt gagtgcccgc cactcgccgt ccgctcctcg
 A R A L P P
 151 ctgagggggc gccgggcacg cgggctgggc ccagcggcgt atccggacgc
 201 caagaaacca gagagccagc cagatgcaa agggccctgc catgtgccgg
 251 tgccctttcc ctctccattt gccctgccac acagtgggct ggggttgac
 301 gtgtgtttgc tgacaggcca catctctaac tgtgggcat gtggacctta
 351 ggcctgacca gaccctcatg tcttctcct tcccaggacg tgcaccacct
 D V H H L
 401 gcacgccgag aggcgcggcc ctcagccctg gcacgccgcc ctgccaagca
 H A E R R G P Q P W H A A L P S S
 451 gccctgcccc tgccccagcc acccaggagg cccccaggcc tgccagcagc
 P A P A P A T Q E A P R P A S S
 501 ctgaggccac ccaggtgcgg cgtgcctgat ccctccgatg gcctgagcgc
 L R P P R C G V P D P S D G L S A
 551 tcggaatcgg cagaagaggc acgccgaggg caccttcacc tccgacgtga
 R N R Q K R H A E G T F T S D V S
 601 gcagctacct ggagggccag gccgccaagg agttcatcgc ctggctggtg
 S Y L E G Q A A K E F I A W L V
 651 aagggcaggg gccgcagggc ctccctgag gaggtggcca tcgtggagga
 K G R G R R D F P E E V A I V E E
 701 gctgggccgg cgacacgccg acggcagctt cagcgacgag atgaacacca
 L G R R H A D G S F S D E M N T I
 751 tcttggaaca cctggccgcg cgctga tat c
 L D N L A A R *

ID de Secuencia No.: 17

1 gatatccacc atggcccccg ccgcctggct gaggagcgc gccgccaggg ccctgctgcc
 61 acccatgctg ctgctgctgc tgcagcccc acctctgctg gcccgggccc tgccccggt
 121 gagtgcccgc cactcgccgt ccgctcctcg ctgagggggc gccgggcacg cgggctgggc
 181 ccagcggcgt atccggacgc caagaaacca gagagccagc cagatgcaa agggccctgc
 241 catgtgccgg tgccctttcc ctctccattt gccctgccac acagtgggct ggggttgac
 301 gtgtgtttgc tgacaggcca catctctaac tgtgggcat gtggacctta ggcctgacca
 361 gaccctcatg tcttctcct tcccaggacg tgcaccacct gcacgccgag aggcgcggcc
 421 ctcagccctg gcacgccgcc ctgccaagca gccctgcccc tgccccagcc acccaggagg
 481 cccccaggcc tgccagcagc ctgaggccac ccaggtgcgg cgtgcctgat ccctccgatg
 541 gcctgagcgc tcggaatcgg cagaagaggc acgccgaggg caccttcacc tccgacgtga
 601 gcagctacct ggagggccag gccgccaagg agttcatcgc ctggctggtg aagggcaggg
 721 acggcagctt cagcgacgag atgaacacca tcttggaaca cctggccgcg cgctgatc

ID de Secuencia No.: 18

1 gatatccacc atggcccccg ccgcctggct gaggagcgc gccgccaggg
 M A P A A W L R S A A A R A
 51 ccctgctgcc acccatgctg ctgctgctgc tgcagcccc acctctgctg
 L L P P M L L L L L Q P P P L L
 101 gcccgggccc tgccccggt gagtgcccgc cactcgccgt ccgctcctcg
 A R A L P P
 151 ctgagggggc gccgggcacg cgggctgggc ccagcggcgt atccggacgc
 201 caagaaacca gagagccagc cagatgcaa agggccctgc catgtgccgg
 251 tgccctttcc ctctccattt gccctgccac acagtgggct ggggttgac
 301 gtgtgtttgc tgacaggcca catctctaac tgtgggcat gtggacctta
 351 ggcctgacca gaccctcatg tcttctcct tcccaggacg tgcaccacct
 D V H H L

401 gcacgcccag aggcgcggcc ctcagccctg gcacgcccgc ctgccaagca
 H A E R R G P Q P W H A A L P S S
 451 gccctgcccc tgccccagcc acccaggagg cccccaggcc tgccagcagc
 P A P A P A T Q E A P R P A S S
 501 ctgaggccac ccaggtgcgg cgtgcctgat ccctccgatg gcctgagcgc
 L R P P R C G V P D P S D G L S A
 551 tcggaatcgg cagaagagge acgccgaggg caccttcacc tccgacgtga
 R N R Q K R H A E G T F T S D V S
 601 gcagctacct ggagggccag gccgccaagg agttcatcgc ctggctggtg
 S Y L E G Q A A K E F I A W L V
 651 aagggcaggg gccgcagggg cttccctgag gaggtggcca tcgtggagga
 K G R G R R D F P E E V A I V E E
 701 gctgggctga gcgcgc
 L G *

ID de Secuencia No.: 19

1 gatatccacc atggcccccg ccgacctggt gaggagcgc gccgcccagg ccctgctgcc
 61 acccatgctg ctgctgctgc tgcagcccc acctctgctg gcccgggccc tgcccccggt
 121 gagtgccgc cactgcgctg ccgctcctcg ctgagggggc gccgggcacg cgggctgggc
 181 ccagcggcgt atccggacgc caagaaacca gagagccagc cagatgcaa agggccctgc
 241 catgtgccgg tgccctttcc ctctccattt gccctgccac acagtgggct ggggttgcac
 301 gtgtgtttgc tgacaggcca catctctaac tgtgggccaat gtggacctta ggctgacca
 361 gacctcatg tcttctcct tcccaggacg tgcaccacct gcacgcccag aggcgcggcc
 421 ctcagccctg gcacgcccgc ctgccaagca gccctgcccc tgccccagcc acccaggagg
 481 cccccaggcc tgccagcagc ctgaggccac ccaggtgcgg cgtgcctgat ccctccgatg
 541 gcctgagcgc tcggaatcgg cagaagagge acgccgaggg caccttcacc tccgacgtga
 601 gcagctacct ggagggccag gccgccaagg agttcatcgc ctggctggtg aagggcaggg
 661 gccgcagggg cttccctgag gaggtggcca tcgtggagga gctgggctga gcgcgc

ID de Secuencia No.: 20

HGEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFWLWKGR G

ID de Secuencia No.: 21

5 RRDFPEEVAI

ID de Secuencia No.: 22

RRDFPEEVAI VEEL

ID de Secuencia No.: 23

RRDFPEEVAI AEEL

10 ID de Secuencia No.: 24

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Biocompatibles UK Limited
- <120> Péptidos de Fusión de GLP-1, su producción y uso
- <130> BI07P001EPT1
- 5 <140>
<141>
- <160> 27
- <170> PatentIn versión 3.3
- 10 <210> 1
<211> 31
<212> PRT
<213> Artificial
- 15 <220>
<223> Descripción de la secuencia: péptido sintético correspondiente a GLP-1 (7-37) (véase la descripción de la pág. 20)
- <400> 1
- His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly**
1 5 10 15
- Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly**
20 25 30
- 20 <210> 2
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
- <220>
<223> Descripción de la secuencia: secuencia de IP-2 completo que tiene los 15 aminoácidos de la secuencia de IP-2 de origen natural, humana; (véase la descripción de la pág. 20)
- 25 <400> 2
- Arg Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu Gly**
1 5 10 15
- 30 <210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
- <220>
<223> Descripción de la secuencia: secuencia de IP-2 completo que tiene los 15 aminoácidos de la secuencia de IP-2 de origen natural, murina; (véase la descripción de la pág. 20)
- <400> 3
- 35 **Arg Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Ala Glu Glu Leu Gly**
1 5 10 15
- <210> 4
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial
- 40 <220>
<223> Descripción de la secuencia: isoforma murina de GLP-2 (véase la descripción de la pág. 20)

<400> 4

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

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

Asp Arg Lys
 35

<210> 5
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Descripción de la secuencia: isoforma humana de GLP-2 (véase la descripción de la pág. 20)

<400> 5

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

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

Asp Lys Lys
 35

<210> 6
 <211> 79
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Descripción de la secuencia: SEQ ID No: 6 (ID6syn, CM1) corresponde a GLP-1 (7-37) - IP2 - RR - GLP-1 (7-37), 79 aa, 8,7 kD (véase la descripción de la pág. 20)

<400> 6

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Arg
 20 25 30

Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Ala Glu Glu Leu Gly Arg Arg
 35 40 45

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 50 55 60

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 65 70 75

20

<210> 7

ES 2 397 289 T3

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 5 <223> Descripción de la secuencia: SEQ ID No: 7 (ID7rec, CM2) corresponde a GLP-1 (7-37) – IP2 – RR – GLP2, 83 aa, 9,4 kD (véase la descripción de la pág. 20)

<400> 7

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Arg
 20 25 30

Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Ala Glu Glu Leu Gly Arg Arg
 35 40 45

His Ala Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Ser Thr Ile Leu Asp Asn
 50 55 60

Leu Ala Thr Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
 65 70 75 80

Asp Lys Lys

10 <210> 8
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: SEQ ID No: 8 (ID8 sin, CM3) corresponde a GLP-1 (7-37) – IP2, 46 aa, 5,1 kD;

15 <400> 8

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Arg
 20 25 30

Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Ala Glu Glu Leu Gly
 35 40 45

20 <210> 9
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia: artificial

<400> 9

Met Ala Pro Ala Ala Trp Leu Arg Ser Ala Ala Ala Arg Ala Leu Leu
 1 5 10 15

Pro Pro Met Leu Leu Leu Leu Leu Gln Pro Pro Pro Leu Leu Ala Arg
 20 25 30

Ala Leu Pro Pro Asp Val His His Leu His Ala Glu Arg Arg Gly Pro
 35 40 45

Gln Pro Trp His Ala Ala Leu Pro Ser Ser Pro Ala Pro Ala Pro Ala
 50 55 60

Thr Gln Glu Ala Pro Arg Pro Ala Ser Ser Leu Arg Pro Pro Arg Cys
 65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Pro Ser Asp Gly Leu Ser Ala Arg Asn Arg Gln Lys
 85 90 95

<210> 10
 <211> 79
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia: SEQ ID No: 10 (N-GLP-1 (7-37) – IP2 (humano) – RR – GLP-1 (7-37) – C, también denominado CM1 humano), (véase la descripción de la pág. 20)
 <400> 10

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Arg
 20 25 30

Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu Gly Arg Arg
 35 40 45

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 50 55 60

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 65 70 75

10 <210> 11
 <211> 83
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia: SEQ ID No: 11 (N – GLP-1 (7-37) – IP2 (humano) – RR – GLP-2 – C), también denominado CM2 humano en la presente memoria), (véase la descripción de la pág. 20)
 <400> 11

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Arg
 20 25 30

Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu Gly Arg Arg
 35 40 45

His Ala Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
 50 55 60

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
 65 70 75 80

Asp Arg Lys

<210> 12
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia: SEQ ID No: 12, GLP-1 (7-37) conectado sin ninguna secuencia conectora a través de su extremo C a IP2 (véase la descripción de la pág. 20)

<400> 12

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Arg
 20 25 30

Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu Gly
 35 40 45

10 <210> 13
 <211> 815
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia: (SEQ ID No: 13) representa la secuencia del péptido traducida del constructo de acuerdo con la Fig. 1k (SEQ ID No: 14), (véase la descripción de la pág. 21);

<220>
 <221> CDS
 <222> (11)..(118)

20 <220>
 <221> CDS
 <222> (387)..(809)

<400> 13

gatatccacc atg gcc ccc gcc gcc tgg ctg agg agc gcc gcc gcc agg 49
 Met Ala Pro Ala Ala Trp Leu Arg Ser Ala Ala Ala Arg
 1 5 10

gcc ctg ctg cca ccc atg ctg ctg ctg ctg ctg cag ccc cca cct ctg 97
 Ala Leu Leu Pro Pro Met Leu Leu Leu Leu Leu Gln Pro Pro Pro Leu
 15 20 25

ctg gcc cgg gcc ctg ccc ccg gtgagtgcc gccactgcc gtcgctcct 148
 Leu Ala Arg Ala Leu Pro Pro
 30 35

cgctgagggg gcgccgggca cgcgggctgg gccagcggc gtatccggac gccagaaac 208

cagagagcca gccagatgcc aaagggcct gccatgtgcc ggtgcccttt ccctctccat 268

ttgcctgcc acacagtggg ctggggttgc acgtgtgttt gctgacaggc cacatctcta 328

actgtgggcc atgtggacct taggcctgac cagacctca tgtcttctc cttccag 386

gac gtg cac cac ctg cac gcc gag agg cgc gcc cct cag ccc tgg cac 434
 Asp Val His His Leu His Ala Glu Arg Arg Gly Pro Gln Pro Trp His
 40 45 50

gcc gcc ctg cca agc agc cct gcc cct gcc cca gcc acc cag gag gcc 482
 Ala Ala Leu Pro Ser Ser Pro Ala Pro Ala Pro Ala Thr Gln Glu Ala
 55 60 65

ccc agg cct gcc agc agc ctg agg cca ccc agg tgc gcc gtg cct gat 530
 Pro Arg Pro Ala Ser Ser Leu Arg Pro Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp
 70 75 80

ccc tcc gat gcc ctg agc gct cgg aat cgg cag aag agg cac gcc gag 578
 Pro Ser Asp Gly Leu Ser Ala Arg Asn Arg Gln Lys Arg His Ala Glu
 85 90 95 100

ggc acc ttc acc tcc gac gtg agc agc tac ctg gag gcc cag gcc gcc 626
 Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala
 105 110 115

aag gag ttc atc gcc tgg ctg gtg aag gcc agg gcc cgc agg gac ttc 674
 Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Arg Arg Asp Phe
 120 125 130

cct gag gag gtg gcc atc gtg gag gag ctg gcc cgg cga cac gcc gag 722
 Pro Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu Gly Arg Arg His Ala Glu
 135 140 145

ggc acc ttc acc tcc gac gtg agc agc tac ctg gag gcc cag gcc gcc 770
 Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala
 150 155 160

aag gag ttc atc gcc tgg ctg gtg aag gcc agg gcc tga gcgcgc 815
 Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 165 170 175

<210> 14
 <211> 815
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

5

<223> Descripción de la secuencia: secuencia de ADN del constructo de acuerdo con la Fig. 1k, (véase la descripción de la pág. 21);

<400> 14

```

gatatccacc atggcccccg ccgcctggct gaggagcgcc gccgccaggg ccctgctgcc      60
accatgctg ctgctgctgc tgcagccccc acctctgctg gcccgggccc tgccccgggt      120
gagtgcccgc cactcgccgt ccgctcctcg ctgagggggc gccgggcacg cgggctgggc      180
ccagcggcgt atccggacgc caagaaacca gagagccagc cagatgcaa agggccctgc      240

gtgtgtttgc tgacaggcca catctctaac tgtgggcat gtggacctta ggcctgacca      360
gacctcatg tcttctctct tcccaggacg tgcaccacct gcacgccgag aggcgcggcc      420
ctcagccctg gcacgccgcc ctgccaagca gccctgcccc tgccccagcc acccaggagg      480
ccccaggcc tgccagcagc ctgaggccac ccaggtgagg cgtgcctgat ccctccgatg      540
gcctgagcgc tcggaatcgg cagaagaggc acgccgaggg caccttcacc tccgacgtga      600
gcagctacct ggagggccag gccgccaagg agttcatcgc ctggctggtg aagggcaggg      660
gccgcaggga cttccctgag gaggtggcca tcgtggagga gctgggcccg cgacacgccg      720

agggcacctt cacctccgac gtgagcagct acctggaggg ccaggccgcc aaggagttca      780
tcgcctggct ggtgaagggc aggggctgag cgcgc                                     815

```

5

<210> 15
 <211> 834
 <212> ADN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Descripción de la secuencia: secuencia de ADN y secuencia del péptido traducida de acuerdo con el constructo de a Fig. 1h, (véase la descripción de la pág. 22);

<220>
 <221> CDS
 <222> (11)..(118)

<220>
 <221> CDS
 <222> 387)..(821)

15

<400> 15

gatatccacc atg gcc ccc gcc gcc tgg ctg agg agc gcc gcc gcc agg 49
 Met Ala Pro Ala Ala Trp Leu Arg Ser Ala Ala Ala Arg
 1 5 10

gcc ctg ctg cca ccc atg ctg ctg ctg ctg ctg cag ccc cca cct ctg 97
 Ala Leu Leu Pro Pro Met Leu Leu Leu Leu Leu Gln Pro Pro Pro Leu
 15 20 25

ctg gcc cgg gcc ctg ccc ccg gtgagtgcc gccactgcc gtccgctcct 148
 Leu Ala Arg Ala Leu Pro Pro
 30 35

cgctgagggg gcgccgggca cgcgggctgg gcccagcggc gtatccggac gccaaagaac 208

cagagagcca gccagatgcc aaagggccct gccatgtgcc ggtgcccttt ccctctccat 268

ttgccctgcc acacagtggg ctgggggtgc acgtgtgttt gctgacaggc cacatctcta 328

actgtgggcc atgtggacct taggcctgac cagaccctca tgtcttctc cttccag 386

gac gtg cac cac ctg cac gcc gag agg cgc gcc cct cag ccc tgg cac 434
 Asp Val His His Leu His Ala Glu Arg Arg Gly Pro Gln Pro Trp His
 40 45 50

gcc gcc ctg cca agc agc cct gcc cct gcc cca gcc acc cag gag gcc 482
 Ala Ala Leu Pro Ser Ser Pro Ala Pro Ala Pro Ala Thr Gln Glu Ala
 55 60 65

ccc agg cct gcc agc agc ctg agg cca ccc agg tgc gcc gtg cct gat 530
 Pro Arg Pro Ala Ser Ser Leu Arg Pro Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp
 70 75 80

ccc tcc gat ggc ctg agc gct cgg aat cgg cag aag agg cac gcc gag 578
 Pro Ser Asp Gly Leu Ser Ala Arg Asn Arg Gln Lys Arg His Ala Glu
 85 90 95 100

ggc acc ttc acc tcc gac gtg agc agc tac ctg gag gcc cag gcc gcc 626

Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala
 105 110 115

aag gag ttc atc gcc tgg ctg gtg aag gcc agg gcc cgc agg gac ttc 674
 Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Arg Arg Asp Phe
 120 125 130

cct gag gag gtg gcc atc gtg gag gag ctg gcc cgg cga cac gcc gac 722
 Pro Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu Gly Arg Arg His Ala Asp
 135 140 145

ggc agc ttc agc gac gag atg aac acc atc ctg gac aac ctg gcc gcg 770
 Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn Leu Ala Ala
 150 155 160

cgc gac ttc atc aac tgg ctg atc cag acc aag atc acc gat cgg aag 818
 Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr Asp Arg Lys
 165 170 175 180

tga gcgcgctgat atc 834

<210> 16
 <211> 834
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>

<223> Descripción de la secuencia: secuencia de ADN del constructo de acuerdo con la Fig. 1h, (véase la descripción de la pág. 22);

<400> 16

```

gatataccacc atggcccccg cgcctggct gaggagcgcc gccgccagg ccctgctgcc      60
accatgctg ctgctgctgc tgcagcccc acctctgctg gcccgggccc tgccccgggt      120
gagtggccgc cactcgccgt ccgctcctcg ctgagggggc gccgggcacg cgggctgggc      180
ccagcggcgt atccggacgc caagaaacca gagagccagc cagatgcaa agggccctgc      240
catgtgccgg tgccctttcc ctctccattt gccctgccac acagtgggct ggggttgcac      300
gtgtgtttgc tgacaggcca catctctaac tgtgggcat gtggacctta ggcctgacca      360
gacctcatg tcttctctct tcccaggagc tgcaccacct gcacgccgag aggcgcggcc      420
ctcagccctg gcacgccgcc ctgccaagca gccctgcccc tgcccagcc acccaggagg      480
ccccaggcc tgccagcagc ctgaggccac ccagggtcgg cgtgctgat ccctccgatg      540
gcctgagcgc tcggaatcgg cagaagaggc acgccgagg cacctcacc tccgacgtga      600
gcagctacct ggagggccag gccgccaagg agttcatcgc ctggctggtg aagggcaggg      660
gccgcaggga cttccctgag gaggtggcca tcgtggagga gctgggccgg cgacacgccg      720
acggcagctt cagcgacgag atgaacacca tcttgacaa cctggccgcg cgcgacttca      780
tcaactgget gatccagacc aagatcaccg atcgggaagtg agcgcgctga tacc      834

```

5

<210> 17

<211> 780

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia: secuencia de ADN y secuencia del péptido traducida del constructo de acuerdo con la Fig. 1j, (véase la descripción de la pág. 35, 22);

<220>

<221> CDS

15 <222> (11)..(118)

<220>

<221> CDS

<222> (387)..(776)

<400> 17

gatatccacc atg gcc ccc gcc gcc tgg ctg agg agc gcc gcc gcc agg 49
 Met Ala Pro Ala Ala Trp Leu Arg Ser Ala Ala Ala Arg
 1 5 10

gcc ctg ctg cca ccc atg ctg ctg ctg ctg ctg cag ccc cca cct ctg 97
 Ala Leu Leu Pro Pro Met Leu Leu Leu Leu Leu Gln Pro Pro Pro Leu
 15 20 25

ctg gcc cgg gcc ctg ccc ccg gtgagtgcc gccactegcc gtccgctcct 148
 Leu Ala Arg Ala Leu Pro Pro
 30 35

cgctgagggg gcgccgggca cgcgggctgg gccagcggc gtatccggac gccaaagaac 208

cagagagcca gcçagatgcc aaagggccct gccatgtgcc ggtgcccttt ccctctccat 268

ttgcctgcc acacagtggg ctggggttgc acgtgtgttt gctgacaggc cacatctcta 328

actgtggggc atgtggacct taggcctgac cagaccctca tgtcttctc cttcccag 386

gac gtg cac cac ctg cac gcc gag agg cgc ggc cct cag ccc tgg cac 434
 Asp Val His His Leu His Ala Glu Arg Arg Gly Pro Gln Pro Trp His
 40 45 50

gcc gcc ctg cca agc agc cct gcc cct gcc cca gcc acc cag gag gcc 482
 Ala Ala Leu Pro Ser Ser Pro Ala Pro Ala Pro Ala Thr Gln Glu Ala
 55 60 65

ccc agg cct gcc agc agc ctg agg cca ccc agg tgc ggc gtg cct gat 530
 Pro Arg Pro Ala Ser Ser Leu Arg Pro Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp
 70 75 80

ccc tcc gat ggc ctg agc gct cgg aat cgg cag aag agg cac gcc gag 578
 Pro Ser Asp Gly Leu Ser Ala Arg Asn Arg Gln Lys Arg His Ala Glu
 85 90 95 100

ggc acc ttc acc tcc gac gtg agc agc tac ctg gag ggc cag gcc gcc 626
 Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala
 105 110 115

aag gag ttc atc gcc tgg ctg gtg aag ggc agg ggc cgc agg gac ttc 674
 Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Arg Arg Asp Phe
 120 125 130

cct gag gag gtg gcc atc gtg gag gag ctg ggc cgg cga cac gcc gac 722

Pro Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu Gly Arg Arg His Ala Asp
 135 140 145

ggc agc ttc agc gac gag atg aac acc atc ctg gac aac ctg gcc gcg 770
 Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn Leu Ala Ala
 150 155 160

cgc tga tacc 780
 Arg
 165

<210> 18
 <211> 720
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

5

ES 2 397 289 T3

<223> Descripción de la secuencia: secuencia de ADN del constructo de acuerdo con la Fig. 11, (véase la descripción de la pág. 23);

<400> 18

```

gatatccacc atggcccccg ccgcctggct gaggagcgcc gccgccaggg ccctgctgcc      60
acctatgctg ctgctgctgc tgcagcccc acctctgctg gcccgggccc tgccccgggt      120
gagtgcccgc cactcgccgt ccgctcctcg ctgagggggc gccgggcacg cgggctgggc      180
ccagcggcgt atccggacgc caagaaacca gagagccagc cagatgcca agggccctgc      240
catgtgccgg tgccctttcc ctctccattt gccctgccac acagtgggct ggggttgac      300
gtgtgtttgc tgacaggcca catctctaac tgtgggcat gtggacctta ggctgacca      360
gaccctcatg tcttctctct tcccaggacg tgcaccacct gcacgccgag aggcgcggcc      420
ctcagccctg gcacgccgcc ctgccaagca gccctgcccc tgccccagcc acccaggagg      480
ccccaggcc tgccagcagc ctgaggccac ccaggtgctg cgtgcctgat ccctccgatg      540
gcctgagcgc tcggaatcgg cagaagaggc acgccgaggg caccttcacc tccgacgtga      600
gcagctacct ggagggccag gccgccaagg agttcatcgc ctggctggtg aagggcaggg      660
acggcagctt cagcgacgag atgaacacca tcctggacaa cctggccgcg cgctgatatc      720

```

5 <210> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia: secuencia de ADN y secuencia del péptido traducidos de acuerdo con la Fig. 1m., (véase la descripción de la pág. 24);

<220>

<221> CDS
 <222> (11)..(118)

15 <220>
 <221> CDS
 <222> (387)..(710)

<400> 19

gatatccacc atg gcc ccc gcc gcc tgg ctg agg agc gcc gcc gcc agg 49
 Met Ala Pro Ala Ala Trp Leu Arg Ser Ala Ala Ala Arg
 1 5 10

gcc ctg ctg cca ccc atg ctg ctg ctg ctg ctg cag ccc cca cct ctg 97
 Ala Leu Leu Pro Pro Met Leu Leu Leu Leu Leu Gln Pro Pro Pro Leu
 15 20 25

ctg gcc cgg gcc ctg ccc ccg gtgagtgcc gccactgcc gtcgctcct 148
 Leu Ala Arg Ala Leu Pro Pro

cgctgagggg gcgccgggca cgcgggctgg gccagcggc gtatccggac gccaaagaac 208

cagagagcca gccagatgcc aaagggccct gccatgtgcc ggtgcccttt ccctctccat 268

ttgccctgcc acacagtggg ctggggttgc acgtgtgttt gctgacaggc cacatctcta 328

actgtgggcc atgtggacct taggcctgac cagaccctca tgtcttctc cttcccag 386

gac gtg cac cac ctg cac gcc gag agg cgc ggc cct cag ccc tgg cac 434
 Asp Val His His Leu His Ala Glu Arg Arg Gly Pro Gln Pro Trp His
 40 45 50

gcc gcc ctg cca agc agc cct gcc cct gcc cca gcc acc cag gag gcc 482
 Ala Ala Leu Pro Ser Ser Pro Ala Pro Ala Pro Ala Thr Gln Glu Ala
 55 60 65

ccc agg cct gcc agc agc ctg agg cca ccc agg tgc ggc gtg cct gat 530
 Pro Arg Pro Ala Ser Ser Leu Arg Pro Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp
 70 75 80

ccc tcc gat ggc ctg agc gct cgg aat cgg cag aag agg cac gcc gag 578
 Pro Ser Asp Gly Leu Ser Ala Arg Asn Arg Gln Lys Arg His Ala Glu
 85 90 95 100

ggc acc ttc acc tcc gac gtg agc agc tac ctg gag ggc cag gcc gcc 626
 Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala
 105 110 115

aag gag ttc atc gcc tgg ctg gtg aag ggc agg ggc cgc agg gac ttc 674
 Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Arg Arg Asp Phe
 120 125 130

cct gag gag gtg gcc atc gtg gag gag ctg ggc tga gcgcgc 716
 Pro Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu Gly
 135 140

<210> 20
 <211> 716
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Descripción de la secuencia: secuencia de ADN del constructo de acuerdo con la Fig. 1m, (véase la descripción de la pág. 24);

<400> 20

gatatccacc atgcccccg ccgctggtt gaggagcggc gccgccaggg ccctgctgcc 60

accatgctg ctgctgctgc tgcagcccc acctctgctg gccggggccc tgccccgggt 120

10

gagtgcccg cactcgccgt ccgctcctcg ctgagggggc gccgggcacg cgggctgggc 180
 ccagcggcgt atccggacgc caagaaacca gagagccagc cagatgcaa agggccctgc 240
 catgtgccgg tgccctttcc ctctccattt gccctgccac acagtgggct ggggttgac 300
 gtgtgtttgc tgacaggcca catctctaac tgtgggcat gtggacctta ggcctgacca 360
 gaccctcatg tcttctcct tcccaggacg tgcaccacct gcacgccgag aggcgcggcc 420
 ctcagccctg gcacgccgcc ctgccaagca gccctgccc tgccccagcc acccaggagg 480
 cccccaggcc tgccagcagc ctgaggccac ccagggtgagg cgtgcctgat ccctccgatg 540
 gcctgagcgc tcggaatcgg cagaagaggc acgccgaggg caccttcacc tccgacgtga 600
 gcagctacct ggagggccag gccgccaagg agttcatcgc ctggctggtg aagggcaggg 660
 gccgcaggga cttccctgag gaggtggcca tcgtggagga gctgggctga gcgcgc 716

<210> 21
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Descripción de la secuencia: artificial, (véase la descripción de la pág. 24);
 <400> 21

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30

10 <210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia: artificial, (véase la descripción de la pág. 24);
 <400> 22

Arg Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile
 1 5 10

20 <210> 23
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia: artificial, (véase la descripción de la pág. 24);
 <400> 23

Arg Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Val Glu Glu Leu
 1 5 10

25

<210> 24

<211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 5 <223> Descripción de la secuencia: artificial, (véase la descripción de la pág. 24);
 <400> 24

Arg Arg Asp Phe Pro Glu Glu Val Ala Ile Ala Glu Glu Leu
1 5 10

<210> 25
 <211> 31
 10 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia: secuencia de acuerdo con la fórmula (I) (véase la descripción de la pág. 1)

<220>
 15 <221> rasgo_misc
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa = NH₂, cuando la secuencia es GLP-1 (7-36) amida, o Xaa = Gly-OH, cuando la secuencia es GLP-1 (7-37) amida,
 <400> 25

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Xaa
20 25 30

20 <210> 26
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia: secuencia de acuerdo con la fórmula (II) (véase la descripción de la pág. 4)

<220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (1)..(1)
 30 <223> Xaa es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, 3-hidroxi-histidina, homohistidina, N-acetil-histidina, a-fluorometil-histidina, a-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina;

<220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (2)..(2)
 35 <223> Xaa es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, o Aib;

<220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa es alternativamente ácido (1-aminociclopropil)carboxílico, ácido (1-aminociclobutil)carboxílico, ácido (1-aminociclopentil)carboxílico, ácido (1-aminociclohexil)carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil)carboxílico, o ácido (1-aminociclooctil)carboxílico,
 40

<220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (10)..(10)
 45 <223> Xaa es Val o Leu; Xaa es Ser, Lys o Arg;
 <220>

- <221> rasgo_misc
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa es Ser, Lys o Arg;
- <220>
- 5 <221> rasgo_misc
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa es Tyr o Gln;
- <220>
- 10 <221> rasgo_misc
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa es Leu o Met;
- <220>
- 15 <221> rasgo_misc
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa es Gly, Glu o Aib;
- <220>
- <221> rasgo_misc
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa es Gln, Glu, Lys o Arg;
- 20 <220>
- <221> rasgo_misc
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa es Ala o Val;
- <220>
- 25 <221> rasgo_misc
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa es Lys o Arg;
- <220>
- 30 <221> rasgo_misc
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa es Glu o Leu;
- <220>
- 35 <221> rasgo_misc
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa es Ala, Glu o Arg;
- <220>
- <221> rasgo_misc
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa es Val o Lys;
- 40 <220>
- <221> rasgo_misc
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa es Lys, Glu, Asn o Arg;
- <220>
- 45 <221> rasgo_misc
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa es Gly o Aib;
- <220>
- 50 <221> rasgo_misc
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa es Arg, Gly o Lys o amida o está ausente;
- <220>
- 55 <221> rasgo_misc
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa es Gly, Ala, Glu, Pro, Lys, amida o está ausente;

<400> 26

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

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

- 5 <210> 27
- <211> 31
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia: secuencia de acuerdo con formula (III) (véase la descripción de la pág. 8)
- 10 <220>
- <221> rasgo_misc
- <222> (1)..(1)
- <223> Xaa es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, -hidroxi-histidina, homohistidina, N-acetil-histidina, a-fluorometil-histidina, a-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina;
- 15 <220>
- <221> rasgo_misc
- <222> (2)..(2)
- <223> Xaa es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys o Aib;
- 20 <220>
- <221> rasgo_misc
- <222> (2)..(2)
- <223> Xaa es alternativamente ácido (1-aminociclopropil)carboxílico, ácido (1-aminociclobutil)carboxílico, (1-aminociclopentil)carboxílico, ácido (1-aminociclohexil)carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil)carboxílico, o ácido (1-aminociclooctil)carboxílico;
- 25 <220>
- <221> rasgo_misc
- <222> (12)..(12)
- <223> Xaa es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys o Aib;
- 30 <220>
- <221> rasgo_misc
- <222> (12)..(12)
- <223> Xaa es alternativamente ácido (1-aminociclopropil)carboxílico, ácido (1-aminociclobutil)carboxílico, ácido (1-aminociclopentil)carboxílico, ácido (1-aminociclohexil)carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil)carboxílico, o ácido (1-aminociclooctil)carboxílico;
- 35 <220>
- <221> rasgo_misc
- <222> (16)..(16)
- <223> Xaa es Gly, Glu o Aib;
- 40 <220>
- <221> rasgo_misc
- <222> (17)..(17)
- <223> Xaa es Gln, Glu, Lys o Arg;
- 45 <220>
- <221> rasgo_misc
- <222> (20)..(20)
- <223> Xaa es Lys, Glu o Arg;
- 50 <220>
- <221> rasgo_misc

<222> (28)..(28)
 <223> Xaa es Lys, Glu o Arg;

<220>
 5 <221> rasgo_misc
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa es Gly o Aib;

<220>
 10 <221> rasgo_misc
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa es Arg o Lys, amida o está ausente;

<220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa es Gly, Ala, Glu o Lys, amida o está ausente,

15 <400> 27

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

Xaa Ala Ala Xaa Glu Phe Ile Xaa Trp Leu Val Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30

REIVINDICACIONES

1. Un mimético de armazón de un péptido de fusión que comprende como componente (I) N-terminalmente

(i) GLP-1 (7-37) del SEQ ID NO: 1 o una secuencia funcional que ejerce los efectos biológicos de GLP-1 en forma de hormona incretina, su acción anti-apoptótica o sus propiedades neurotróficas y que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con GLP-1 (7-37), o

(ii) un péptido GLP-1 modificado que consiste en la secuencia de aminoácidos de fórmula II: Xaa7-Xaa8-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa16-Ser-Xaa18-Xaa19-Xaa20-Glu-Xaa22-Xaa23-Ala-Xaa25-Xaa26-Xaa27-Phe-Ile-Xaa30-Trp-Leu-Xaa33-Xaa34-Xaa35-Xaa36-Xaa37, con lo que Xaa7 es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, 3-hidroxi-histidina, homohistidina, N-acetil-histidina, a-fluorometil-histidina, a-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina; Xaa8 es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil)carboxílico, ácido (1-aminociclobutil)carboxílico, ácido (1-aminociclopentil)carboxílico, ácido (1-aminociclohexil)carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil)carboxílico, o ácido (1-aminociclooctil)carboxílico; Xaa16 es Val o Leu; Xaa18 es Ser, Lys o Arg; Xaa19 es Tyr o Gln; Xaa20 es Leu o Met; Xaa22 es Gly, Glu o Aib; Xaa23 es Gln, Glu, Lys o Arg; Xaa25 es Ala o Val; Xaa26 es Lys, Glu o Arg; Xaa27 es Glu o Leu; Xaa30 es Ala, Glu o Arg; Xaa33 es Val o Lys; Xaa34 es Lys, Glu, Asn o Arg; Xaa35 es Gly o Aib; Xaa36 es Arg, Gly o Lys o amida o está ausente; Xaa37 es Gly, Ala, Glu, Pro, Lys, amida o está ausente,

y como componente (II) C-terminalmente una secuencia peptídica de al menos 9 aminoácidos y que contiene una secuencia de acuerdo con el SEQ ID NO: 22 (RRDFPEEVAI) o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el SEQ ID NO: 22, confiriendo una mejora de resistencia a la inactivación por DPP-IV del péptido de fusión,

en donde el mimético de armazón exhibe una modificación de uno o más miembros de la cadena principal (NH, CH, CO), en forma de una sustitución o en forma de una inserción, y su estructura de la cadena lateral es idéntica a la del péptido correspondiente.

2. Un mimético de armazón de un péptido de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cadena principal peptídica está sustituida en al menos una sola posición por enlaces amida retro-inversos (-CO-NH-), hidroxil etileno (-CH(OH)-CH₂-), alqueno (CH₂=CH-), carba (CH₂-CH₂-) y/o -P=O(OH)-CH₂-.

3. Un mimético de armazón de un péptido de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, en donde NH está sustituido con -O-, -S-, o -CH₂-; -CH- está sustituido con -N-, C-alquilo o -BH-; o -CO- está sustituido con -CS-, -CH₂-, SO_n-, -P=O(OH)- o -B(OH)-.

4. Un mimético de armazón de un péptido de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cadena principal es alargada mediante inserciones que flanquean el ácido de carbono alfa, preferiblemente -O-, -S-, -CH-, o -NH-.

5. Un mimético de armazón de un péptido de fusión de acuerdo con la reivindicación 1 a 4, en donde el componente (I) es un péptido GLP-1 modificado que comprende la secuencia de aminoácidos de fórmula III: Xaa7-Xaa8-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa18-Tyr-Leu-Glu-Xaa22-Xaa23-Ala-Ala-Xaa26-Glu-Phe-Ile-Xaa30-Trp-Leu-Val-Xaa34-Xaa35-Xaa36-Xaa37, en donde Xaa7 es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, 3-hidroxi-histidina, homohistidina, N-acetil-histidina, a-fluorometil-histidina, a-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina; Xaa8 es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil)carboxílico, ácido (1-aminociclobutil)carboxílico, ácido (1-aminociclopentil)carboxílico, ácido (1-aminociclohexil)carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil)carboxílico, o ácido (1-aminociclooctil)carboxílico; Xaa18 es Ser, Lys o Arg; Xaa22 es Gly, Glu o Aib; Xaa23 es Gln, Glu, Lys o Arg; Xaa26 es Lys, Glu o Arg; Xaa30 es Ala, Glu o Arg; Xaa34 es Lys, Glu o Arg; Xaa35 es Gly o Aib; Xaa36 es Arg o Lys, amida o está ausente; Xaa37 es Gly, Ala, Glu o Lys, amida o está ausente.

6. El mimético de armazón de un péptido de fusión de acuerdo con la reivindicación 1 a 5, en donde componente I es GLP-1(7-35) o GLP-1(7-36).

7. El mimético de armazón de un péptido de fusión de acuerdo con la reivindicación 1 a 6, en donde el componente (II) es una secuencia peptídica que contiene una secuencia de acuerdo con el SEQ ID NO: 23 (RRDFPEEVAIVEEL) o SEQ ID NO: 24 (RRDFPEEVAIAEEL) o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con los SEQ ID NO: 23 o 24.

8. El mimético de armazón de un péptido de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 anteriores, en donde el componente (II) es una secuencia peptídica que contiene una secuencia de acuerdo con el SEQ ID NO: 2 (RRDFPEEVAIVEELG) o el SEQ ID NO: 3 (RRDFPEEVAIAEELG) o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con los SEQ ID NO: 2 o 3.

9. El mimético de armazón de un péptido de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 anteriores, en donde el componente (I) y componente (II) están conectados directamente o se conectan a través de una secuencia conectora.

10. El mimético de armazón de un péptido de fusión de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la secuencia conectora tiene una longitud de 1 a 10 aminoácidos.
- 5 11. El mimético de armazón de un péptido de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el mimético de armazón de un péptido de fusión contiene una secuencia de acuerdo con el SEQ ID NO: 8 (HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRGRRRDFPEEVAIAEELG) o el SEQ ID NO: 12 (HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRGRRRDFPEEVAIVEELG) o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con los SEQ ID NO: 8 o 12.
- 10 12. El mimético de armazón de un péptido de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 anteriores, en donde el mimético de armazón de un péptido de fusión contiene otro componente (III) conectado al extremo C del componente (II).
13. El mimético de armazón de un péptido de fusión de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el componente (III) comprende al menos cuatro residuos de aminoácido, o comprende preferiblemente al menos 10 residuos de aminoácido, o comprende más preferiblemente al menos 20 residuos de aminoácido.
- 15 14. El mimético de armazón de un péptido de fusión de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en donde el componente (III) comprende al menos 4, preferiblemente al menos 10, más preferiblemente al menos 20 residuos de aminoácido de la secuencia N-terminal de GLP-2 como en el proglucagón o de GLP-1 (7-37).
15. El mimético de armazón de un péptido de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en donde el componente (III) contiene la secuencia de los SEQ ID NO: 4 o 5 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con los SEQ ID NO: 4 o 5.
- 20 16. El mimético de armazón de un péptido de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en donde el mimético de armazón de un péptido de fusión contiene una secuencia peptídica seleccionada de un grupo que consiste en: SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con los SEQ ID NO: 6, 7, 10, o 11.
- 25 17. El mimético de armazón de un péptido de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 anteriores, en donde al menos uno de los aminoácidos es derivatizado mediante modificación covalente de una cadena lateral de un aminoácido de origen natural, mediante modificación de los grupos NH₂ o carboxi terminales.
18. El mimético de armazón de un péptido de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 anteriores, en donde el mimético de armazón de un péptido de fusión comprende una proteína portadora, en particular transferrina o albúmina, como componente (IV).
- 30 19. El mimético de armazón de un péptido de fusión de acuerdo con la reivindicación 17, en donde al menos uno de los aminoácidos es derivatizado mediante un grupo lipilo o carbohidrato.
20. El mimético de armazón de un péptido de fusión de acuerdo con la reivindicación 17 o 19, en donde el residuo de His N-terminal de GLP-1 (GLP-1(7)) es modificado químicamente en su extremo NH₂ y/o en su cadena lateral de histidilo, en particular mediante un radical hidrófobo.
- 35 21. Un método para producir un mimético de armazón de un péptido de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 anteriores, mediante síntesis de péptidos en fase sólida.
22. Un mimético de armazón de un péptido de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 anteriores como medicamento para su uso en una terapia en seres humanos o animales.
- 40 23. Un mimético de armazón de un péptido de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 anteriores para su uso en el tratamiento de la diabetes mellitus de tipo I o tipo II, la resistencia a la insulina, los trastornos de peso y enfermedades o afecciones asociadas a ello.
24. Un mimético de armazón de un péptido de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 anteriores para su uso en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos y enfermedades o afecciones asociadas a ello.
- 45 25. Un mimético de armazón de un péptido de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 anteriores para su uso en el tratamiento de trastornos y enfermedades o afecciones asociadas a ello.

Fig. 1

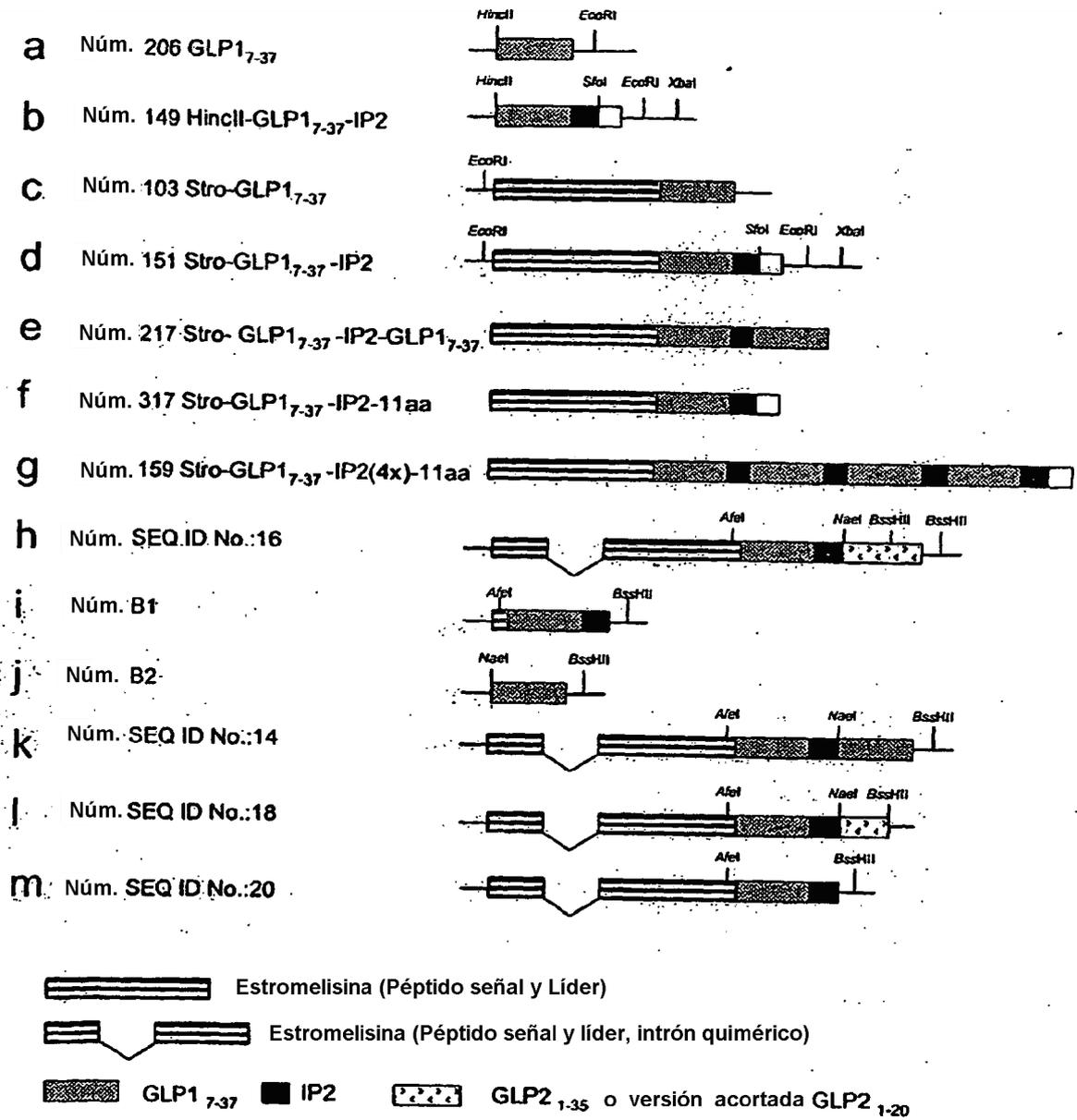


Fig. 2

GLP1 activo después de la transfección transitoria de células hTERT-MSK y HEK293

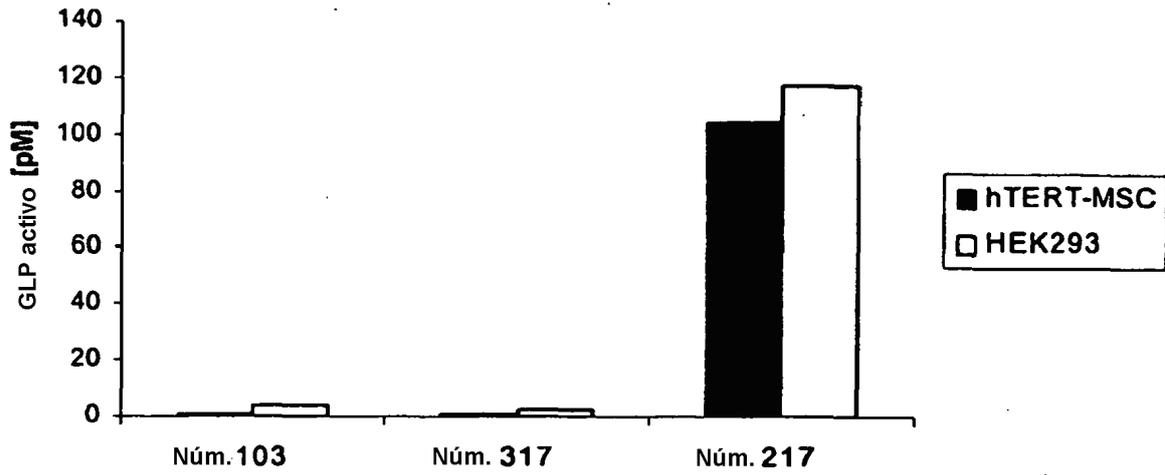


Fig. 3

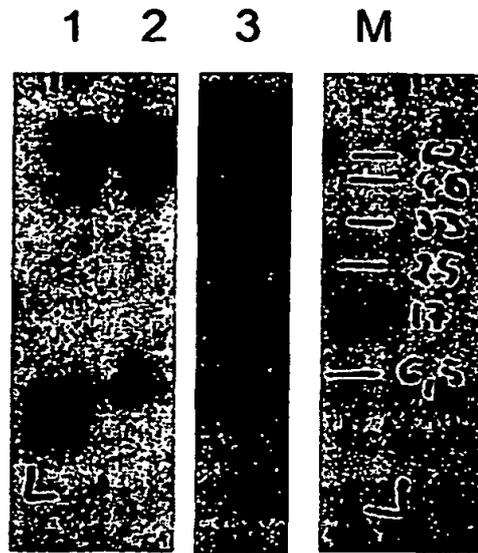


Fig. 4

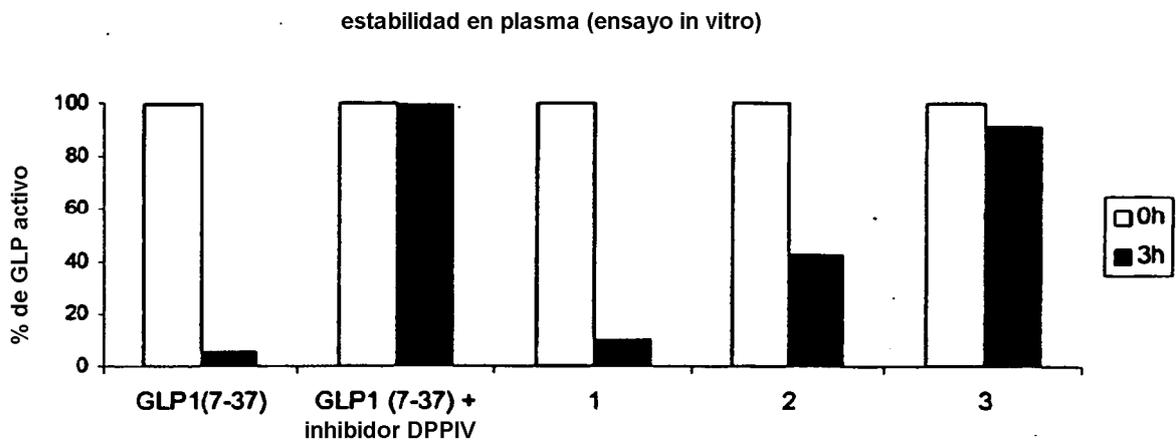


Fig. 5

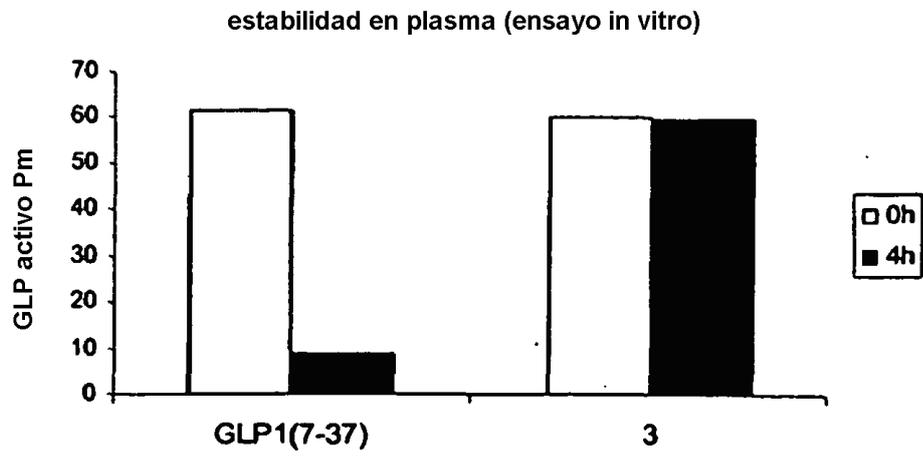


Fig. 6

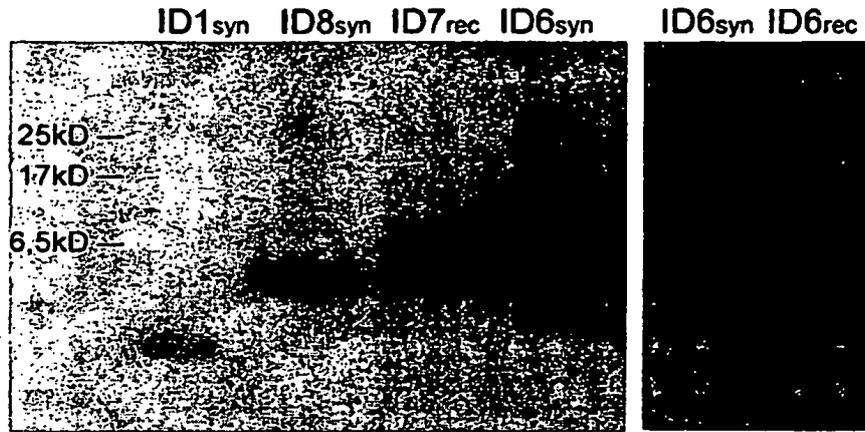


Fig. 7

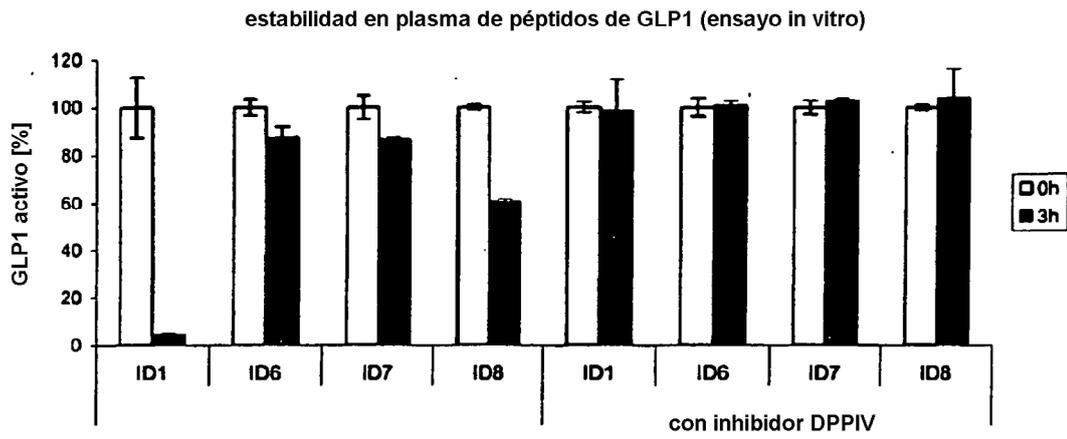


Fig. 8

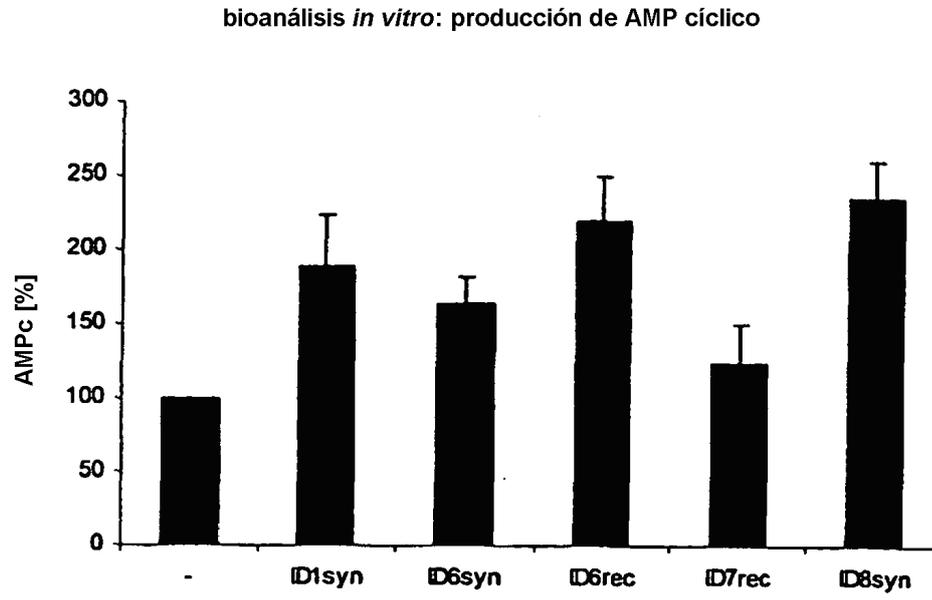


Fig. 9

