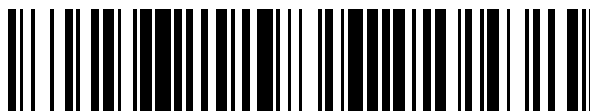


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 486 675**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/26 (2006.01)

C07K 14/605 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2010** **E 10801033 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.06.2014** **EP 2515928**

54 Título: **Análogo de péptido de oxintomodulina**

30 Prioridad:

08.06.2010 US 352576 P

22.12.2009 US 288888 P

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

19.08.2014

73 Titular/es:

ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)

**Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**ALSINA-FERNANDEZ, JORGE y
KOHN, WAYNE DAVID**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 486 675 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

Análogo de péptido de oxintomodulina

La presente invención se refiere a análogos de péptido de oxintomodulina y a sus derivados PEGilados para su uso en el tratamiento de diabetes y/o obesidad.

- 5 Oxintomodulina (OXM) es una hormona de péptido de 37 amino ácidos que se libera junto con el péptido de tipo glucagón 1 (GLP-1) a partir de células L de intestino delgado en proporción a la ingesta de nutrientes. Está formada por la secuencia completa de 29 residuos de glucagón (Gcg) con una extensión de octapéptidos en el extremo-C como resultado del procesamiento alterno específico tisular de preproglucagón. OXM endógena se degrada de forma rápida *in vivo* por medio de dipeptidil peptidasa IV y otras peptidasas.
- 10 Los distintos receptores para OXM aún no se han identificado. OXM se une y activa completamente tanto el receptor GLP-1 (GLP-1R) como el receptor de glucagón (GcgR) *in vitro* con potencias similares en los dos receptores.
- 15 OXM está implicada en la regulación de la ingesta de alimento y el peso corporal. La administración aguda de OXM a sujetos de peso normal redujo el hambre y disminuyó la cantidad de comida en un 19 %. En un estudio de 4 semanas con sujetos obesos y con sobrepeso, la administración subcutánea preprandial tres veces al día produjo una pérdida de peso de 2,3 kg en comparación con 0,5 kg en el grupo de placebo. En este ensayo, las náuseas, el efecto secundario más común asociado a la terapia basada en GLP-1 (tal como exenatida y liraglutida), fueron significativamente menos prevalentes. OXM disminuyó el uso de energía a través de la promoción de una mayor actividad física en humanos obesos y con sobrepeso, aunque el mecanismo del efecto no está claro.
- 20 OXM presenta varios retos para el desarrollo en forma de agente terapéutico comercialmente viable. Como se ha mencionado anteriormente, se degrada de forma rápida *in vivo* así como también se somete de forma rápida a depuración renal debido a su pequeño tamaño. Por tanto, resulta deseable identificar análogos de péptido de OXM con mejor estabilidad metabólica y menor tasa de depuración. Además, la actividad agonista GcgR inherente en OXM presenta un riesgo de impacto negativo sobre el control glucémico. De este modo, también resulta deseable optimizar la potencia de un análogo de péptido de OXM diseñado para uso terapéutico al tiempo que se mantiene un
- 25 equilibrio apropiado entre las actividades en GLP-1R y GcgR. La activación de GLP-1R es responsable de un efecto insulínico, aunque la activación tanto de GLP-1R como de GcgR puede jugar un papel en los efectos de pérdida de peso. Por tanto, resulta deseable producir un análogo de péptido de OXM que tenga una potente actividad insulínica y favorezca la pérdida de peso de manera que se pueda usar en el tratamiento de diabetes no insulínica y/o obesidad.
- 30 Los péptidos de OXM con sustituciones de amino ácido para mejorar la estabilidad y con modificaciones adicionales para ralentizar la depuración, tales como PEGilación y lipidación, se divulgan en los documentos WO 2008101017, WO2006134340, WO2007100535 y Pocai y col. Diabetes 58:2258-2266, 2009. Aunque estos péptidos derivados de OXM pueden representar una mejora potencial con respecto al péptido de tipo salvaje, las dosis requeridas para lograr una reducción de peso medible en un modelo con ratones obesos con dieta inducida (DIO) son normalmente mayores que las que se pueden considerar viables para comercialización farmacéutica. Por ejemplo, Pocai y col. (2009) presentaron una media de 11 g (~ 25%) de pérdida de peso tras 13 días de dosificación con 1900
- 35 nmol/kg (~ 8 mg/kg) en días alternos (QOD).
- 40 A pesar de la disponibilidad de varios péptidos de OXM y sus análogos, todavía son necesarios más análogos de péptido de OXM que se toleren bien, de acción prolongada, estables, más potentes y que tengan una proporción de actividad GcgR/GLP-1R que se haya optimizado de manera que la potencia y la actividad insulínica del péptido proporcione tratamientos eficaces para diabetes, preferentemente diabetes de tipo 2 y trastornos relacionados. También resulta deseable aportar sus análogos de péptido de OXM que proporcionen tratamientos eficaces para reducir el peso corporal. Por consiguiente, la presente invención pretende proporcionar tratamientos eficaces para diabetes y/o obesidad.
- 45 La presente invención comprende un análogo de péptido de OXM con sustituciones de amino ácido introducidas para optimizar la estabilidad metabólica y modular las actividades de GcgR/GLP-1R relativas al tiempo que se optimiza la potencia total. Además, el análogo de péptido de OXM de la presente invención se somete a PEGilación en posiciones seleccionadas para la mejora de la acción temporal, permitiendo de este modo una dosificación menos frecuente.
- 50 La presente invención proporciona un análogo de péptido de oxintomodulina que comprende la secuencia de amino ácidos:

His-(Aib)-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-

Leu-Asp-Ser-Lys-Lys-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn-
 (Aib)-Gly-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala-Cys(20kDa PEG)-Cys
 (SEC.ID. Nº.: 3)

en la que el grupo carboxilo de Cys PEGilada en la posición 39 está opcionalmente amidado.

El análogo de péptido de oxintomodulina más preferido comprende la secuencia de amino ácidos de N°. ID. SEC.: 3, en la que el grupo carboxilo de Cys PEGilada en la posición 39 está amidado.

La molécula de PEG usada en la presente invención puede ser lineal o ramificada y preferentemente es una molécula de PEG lineal.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el análogo de péptido de oxintomodulina como se ha definido anteriormente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, diluyente o excipiente. Adicionalmente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el análogo de péptido de oxintomodulina que se ha definido anteriormente, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, diluyente o excipiente y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos.

Además, la presente invención proporciona un método para tratar diabetes no insulino dependiente (tipo 2) en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un análogo de péptido de oxintomodulina como se ha definido anteriormente.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para tratar diabetes que depende de insulina (tipo 1) en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un análogo de péptido de oxintomodulina como se ha definido anteriormente.

La presente invención incluye un método para tratar la obesidad en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de análogo de péptido de oxintomodulina como se ha definido anteriormente.

Además, la presente invención incluye un método para el tratamiento de diabetes no insulino dependiente y obesidad en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un análogo de péptido de oxintomodulina como se ha definido anteriormente.

La presente invención proporciona un análogo de péptido de oxintomodulina como se ha definido anteriormente para su uso como medicamento.

De manera adicional, la presente invención proporciona un análogo de péptido de oxintomodulina como se ha definido anteriormente para su uso en el tratamiento de diabetes no insulino dependiente.

Además, la presente invención proporciona un análogo de péptido de oxintomodulina como se ha definido anteriormente para su uso en el tratamiento de diabetes que depende de insulina.

Además, la presente invención proporciona un análogo de péptido de oxintomodulina como se ha definido anteriormente para su uso en el tratamiento de obesidad.

La presente invención incluye un análogo de péptido de oxintomodulina como se ha definido anteriormente para su uso en el tratamiento de diabetes no insulino dependiente y obesidad.

La presente invención proporcionar el uso de un análogo de péptido de oxintomodulina como se ha definido anteriormente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de diabetes no insulino dependiente.

De manera adicional, la presente invención incluye el uso de un análogo de péptido de oxintomodulina como se ha definido anteriormente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de diabetes que depende de

insulina.

Además, la presente invención proporciona el uso de un análogo de péptido de oxintomodulina como se ha definido anteriormente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de obesidad.

5 Además, la presente invención proporciona el uso de un análogo de péptido de oxintomodulina como se ha definido anteriormente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de diabetes no insulino dependiente y obesidad.

Los análogos de péptido de OXM de la presente invención se unen de manera eficaz y activan tanto el receptor GLP-1 (GLP-1R) como el receptor de glucagón (GcgR).

10 También se ha descubierto que los análogos de péptido de OXM de la presente invención son más resistentes a la degradación por parte de peptidasas, en particular dipeptidil peptidasa IV que OXM de origen humano. Como resultado de ello, los análogos de péptido de OXM de la presente invención poseen una estabilidad *in vitro* mejorada frente a OXM nativa humana.

Varias realizaciones de acuerdo con la presente invención son capaces de provocar una reducción en la ingesta de alimento en personas obesas y con sobrepeso.

15 Una ventaja particular de la presente invención es que la frecuencia de efectos secundarios, tales como náuseas, que comúnmente se asocian a una terapia basada en GLP-1, tal como exenatida y liraglutida, se reduce o elimina. Por tanto, la presente invención tiene menores efectos secundarios en comparación con la terapia basada en GLP-1.

Los análogos de péptido de OXM de la presente invención tienen un efecto de pérdida de peso superior frente a la OXM humana de tipo salvaje.

20 De acuerdo con una realización de la presente invención, los análogos de péptido de oxintomodulina poseen una tolerancia mejorada frente a la glucosa y un perfil de lípidos en sujetos con diabetes de tipo 2 y/o trastornos metabólicos relacionados y la tienen de manera más eficaz que la OXM humana de tipo salvaje.

Oxintomodulina (OXM) es un co-agonista débil con una eficacia completa y potencia equilibrada en hGLP-1R y hGcgR, con valores de EC_{50} de $6,7 \pm 2,7$ nM y $4,1 \pm 1,7$ nM, respectivamente en células HEK293, que sobre-
 25 expresan de forma estable los respectivos receptores. La secuencia de OXM humana nativa se proporciona a continuación:

His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-
 Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala (SEC. ID.
 30 NO: 4)

El análogo de péptido de OXM de ID. SEC. N°: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 se encuentra amidada es un análogo de péptido de oxintomodulina completamente eficaz y potente con un EC_{50} de $59,9 \pm 4,14$ nM y $2,75 \pm 0,55$ nM frente a hGcgR y hGLP-1R, respectivamente. Por tanto, el análogo de péptido de OXM de ID. SEC. N°: 3
 35 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 se encuentra amidada tiene un equilibrio de actividades funcionales *in vitro* que es 22 veces más selectivo para hGLP-1R en comparación con hGcgR. Se observan resultados comparables para la afinidad de enlace, K_i , en la que el análogo de péptido de OXM de ID. SEC. N°: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición se encuentra amidada es 28 veces más selectivo para hGLP-1R en comparación con el hGcgR, con valores de K_i de 73 ± 23 nM y 2050 ± 70 nM, respectivamente.

La unión covalente de una o más moléculas de PEG a residuos particulares de análogo de péptido de OXM tiene como resultado un análogo de péptido de OXM PEGilado con una semivida ampliada y menor tasa de depuración, cuando se compara con el análogo de péptido de OXM no PEGilado, y una potencia *in vitro* en GLP-1R similar a la de OXM humana nativa. Debido al pequeño tamaño del análogo de péptido de OXM y el tamaño relativamente grande de la(s) molécula(s) de PEG, cabría esperar que el análogo de péptido de OXM, una vez PEGilado, pierda actividad como resultado del impedimento estérico. No obstante, se ha descubierto, que si se coloca al final del análogo de
 40 péptido de oxintomodulina en lugar de en el medio, se conserva la actividad del análogo de péptido en mayor medida. Varias sustituciones de la secuencia mejoran la potencia, compensando de este modo la pérdida de potencia debida a la PEGilación al tiempo que se mantiene una proporción apropiada de actividades en GLP-1R y GcgR. Además, se ha comprobado que es preferible la presencia de dos moléculas de PEG en el extremo C-terminal del análogo de péptido de oxintomodulina frente a un PEG individual.

50 Las secuencias de la presente invención contienen una letra individual estándar o tres códigos de letras para los veinte amino ácidos que ocurren de manera natural. Los otros códigos usados se definen a continuación:

Aib = amino ácido alfa isobutírico

PEG = polietilenglicol

PEG20K = molécula PEG con un peso molecular promedio de 20.000 Da

El término "PEG" según se usa en la presente memoria significa una molécula de polietilenglicol. En su forma típica, PEG es un polímero lineal con grupos hidroxilo terminales y tiene la fórmula $\text{HO-CH}_2\text{CH}_2\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-OH}$, en la que n es de aproximadamente 8 a aproximadamente 4000. Normalmente, n no es un valor discreto sino que constituye un intervalo con aproximadamente distribución Gausiana alrededor de un valor medio. Se puede sustituir el hidrógeno terminal por un grupo de terminación tal como un grupo alquilo o un grupo alanol. Preferentemente, PEG tiene al menos un grupo hidroxilo, más preferentemente es un grupo hidroxilo terminal. Preferentemente, este grupo hidroxilo está unido a un resto de enlace que puede reaccionar con el péptido para formar un enlace covalente. Existen numerosos derivados de PEG en la técnica (Véase, por ejemplo las patentes de EE.UU. Nos.: 5.445.090; 5.900.461; 5.932.462; 6.436.386; 6.448.369; 6.437.025; 6.448.369; 6.495.659; 6.515.100 y 6.514.491 y Zalipsky, S., Bioconjugate Chem. 6 :150-165, 1995). La molécula de PEG unida covalentemente al péptido de OXM de la presente invención puede tener un peso molecular medio de 10.000, 20.000, 30.000 ó 40.000 Dalton. Preferentemente, la molécula de PEG es de 18.000 a 22.000 Dalton. Más preferentemente, es de 19.000 a 21.000 Dalton. Del modo más preferido, es de 20.000 a 21.000 Dalton. Es incluso más preferentemente de aproximadamente 20.000 Dalton. Los reactivos de PEGilación pueden ser moléculas lineales o ramificadas y pueden estar presentes de manera singular o en tándem. Los análogos de péptido de OXM PEGilado de la presente invención preferentemente tienen moléculas de PEG en tándem unidas al extremo-C del péptido. Preferentemente, las moléculas de PEG se unen a los dos residuos de cisteína en el extremo terminal-C del péptido, por medio de una mPEG-20kDa maleimida (Figura 1) o una mPEG-20kDa yodoacetamida (Figura 2). En la Figura 1 y en la Figura 2, n es de 10 a 2500. Preferentemente, n es de 350 a 600. Más preferentemente, n es de 425 a 475.

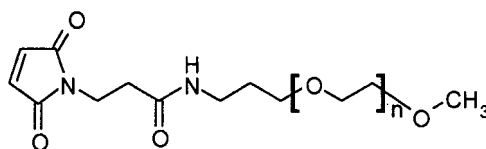


Figura 1

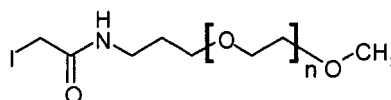


Figura 2

En particular, preferentemente las moléculas de PEG son mPEG-20kDa maleimida ($\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_3\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{-maleimida}$ (NOF Sunbright ME-200MA) y se unen a los residuos de cisteína en el extremo C del péptido. El análogo de péptido de oxintomodulina más preferido comprende la secuencia de amino ácidos de ID. SEC. N°: 3, en la que las moléculas de PEG son mPEG-20kDa maleimida ($\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_3\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{-maleimida}$ (NOF Sunbright ME-200MA), y en la que el grupo carboxi de la Cys PEGilada en la posición 39 está amidado (Figura 3). La Figura 3 contiene un código de amino ácido de letra individual convencional con la excepción de las áreas de caja en las que las estructuras para estos residuos de amino ácido se encuentran ampliadas.

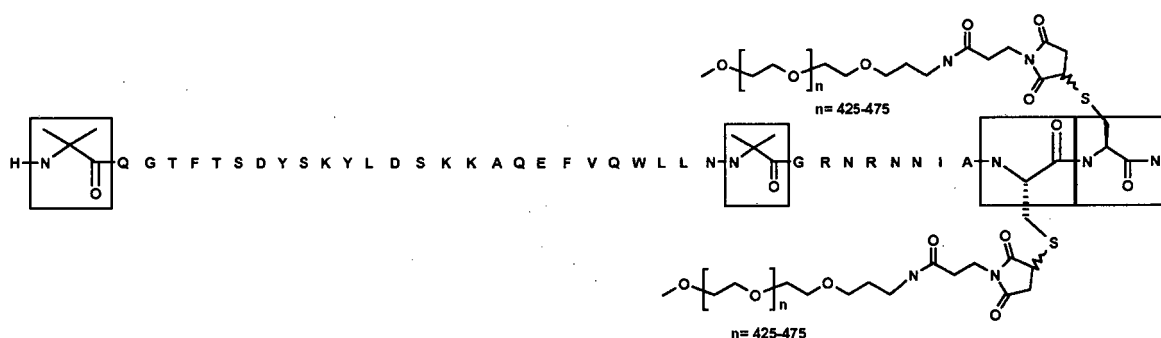


Figura 3

El término "PEGilación", según se usa en la presente memoria, significa la unión covalente de una o más moléculas de PEG, como se ha descrito anteriormente, a una molécula tal como los análogos de péptido de OXM de la presente invención.

"Actividad insulínica" se refiere a la capacidad para estimular la secreción de insulina en respuesta a niveles elevados de glucosa, provocando de este modo la captación de glucosa por parte de las células y menores niveles de glucosa en el plasma. Se puede evaluar la actividad insulínica por medio de métodos conocidos en la técnica, que incluyen experimentos *in vitro* que miden la secreción de insulina por parte de estirpes celulares de insulinoma o isletas, o en experimentos *in vivo* tales como el ensayo de tolerancia a glucosa intravenosa (IVGTT), ensayo de tolerancia a glucosa intraperitoneal (IPGTT) y ensayo de tolerancia a glucosa oral (OGTT). De manera rutinaria, la actividad insulínica se mide en humanos controlando los niveles de insulina o niveles de péptido-C.

Los análogos de péptido de OXM de la presente invención poseen una sólida actividad insulínica.

La "potencia *in vitro*", según se usa en la presente memoria, es la medición de la capacidad del análogo de péptido de OXM para activar el GLP-1R o el GcgR en un ensayo basado en células. La potencia *in vitro* se expresa como "EC₅₀" que es la concentración eficaz de compuesto que tiene como resultado un aumento medio máximo en la respuesta medida (en este caso, producción de AMP cíclico) en un experimento de dosis-respuesta.

La expresión "semi-vida en plasma" se refiere al tiempo necesario para la depuración de la mitad de las moléculas relevantes a partir del plasma. Una expresión alternativa que se usa es la "semi-vida de eliminación". Los términos "ampliada" o "prolongada" usados en el contexto de la semi-vida de plasma o semi-vida de eliminación indican que existe un aumento significativo de la semi-vida de un análogo de péptido de OXM PEGilado con respecto a la de la molécula de referencia (por ejemplo, la forma no PEGilada del péptido o del péptido nativo) como viene determinado en condiciones comparables. Cabe esperar que la semi-vida de OXM nativo en monos, por ejemplo, sea menor de 1 h. Los análogos de péptido de OXM PEGilados de la presente invención tienen una semi-vida de eliminación de al menos 24 h en monos y del modo más preferido de al menos 48 h. La semi-vida presentada en la presente memoria es la semi-vida de eliminación, que corresponde a la tasa de eliminación terminal logarítmica lineal. La persona experta en la técnica aprecia que la semi-vida es un parámetro derivado que cambia en función por un lado de la depuración y por otro, del volumen de distribución.

La expresión "agonista GLP-1R de acción prolongada", según se usa en la presente memoria, se refiere a un análogo de péptido de GLP-1 unido covalentemente a una o más moléculas de polietilenglicol (PEG). Los compuestos de GLP-1 PEGilados se divulgan en la patente de EE.UU. 7.557.183.

La depuración es la medida de la capacidad corporal para eliminar un fármaco de la circulación. A medida que disminuye la depuración debido, por ejemplo, a modificaciones de un fármaco, cabría esperar un aumento de la semi-vida. No obstante, esta relación recíproca es exacta únicamente cuando no existe cambio alguno en el volumen de distribución. Una relación aproximada útil entre la semi-vida terminal logarítmica lineal ($t_{1/2}$), depuración (C) y volumen de distribución (V) viene dada por la ecuación: $t_{1/2} \approx 0,693 (V/C)$. La depuración no indica la cantidad de fármaco que se retira sino el volumen de fluido biológico, tal como sangre o plasma, en el que se tendría que alimentar el fármaco de manera completa para responder a la eliminación. La depuración se expresa como volumen por unidad de tiempo. Preferentemente, los análogos de péptido de OXM PEGilados de la presente invención tienen un valor de depuración de 200 ml/h/kg o menos en monos, más preferentemente de 180, 150, 120, 100, 80, 60 ml/h/kg o menos y del modo más preferido de 50, 40 ó 20 ml/h/kg o menor.

Los análogos de péptido de OXM de la presente invención normalmente se administran por vía parenteral. La administración parenteral incluye, por ejemplo, administración sistémica, tal como inyección intramuscular, intravenosa, subcutánea, interdérmica o interperitoneal. El análogo de péptido de OXM se administra al sujeto junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, diluyente o excipiente, como parte de una composición farmacéutica para el tratamiento de diabetes melitus no insulínica dependiente (tipo 2), NIDDM o los trastornos comentados a continuación. La composición farmacéutica puede ser una disolución o una suspensión tal como una en la que el análogo de péptido de OXM está complejado con un catión metálico divalente tal como cinc. El análogo de péptido se puede formular también en una formulación sólida tal como por medio de liofilización o secado por pulverización, que posteriormente se reconstituye en una disolución de diluyente apropiado antes de la administración. Los vehículos farmacéuticos apropiados pueden contener ingredientes inertes que no interaccionan con el péptido o derivado de péptido. Los vehículos farmacéuticos apropiados para administración parenteral incluyen, por ejemplo, agua estéril, disolución salina fisiológica, disolución salina bacteriostática (disolución salina que contiene aproximadamente 0,9 % mg/ml de alcohol bencílico), disolución salina tamponada con fosfato, disolución de Hank, lactato de Ringer y similares. Algunos ejemplos de excipientes apropiados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, trehalosa, sorbitol y manitol y conservantes tales como fenol y m-cresol.

Se pueden emplear técnicas de formulación farmacéutica convencional, tales como las descritas en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, Easton, PA). Los análogos de péptido de OXM de la presente invención se pueden formular de manera alternativa para administración a través de la ruta bucal, oral, transdérmica, nasal o pulmonar. Los análogos de péptido de OXM de la invención se pueden formular para la liberación prolongada de manera que se mantengan los niveles en el plasma sanguíneo en el intervalo eficaz durante períodos de tiempo prolongados tras la administración.

Los análogos de péptido de OXM de la presente invención se pueden emplear para tratar diabetes, específicamente diabetes de tipo 2 (diabetes melitus no insulínica dependiente, NIDDM). Sujetos adicionales que se pueden beneficiar del tratamiento con los análogos de péptido de OXM de la presente invención incluyen aquellos con tolerancia alterada a la glucosa o glucosa alterada en ayunas, sujetos cuyo peso corporal es aproximadamente 25 % o más del peso corporal normal para la constitución y altura del cuerpo del sujeto, sujetos que tienen uno o más parientes con NIDDM, sujetos que tienen diabetes gestacional, y sujetos con trastornos metabólicos tales como los que son el resultado de una secreción menor de insulina endógena. Se puede usar el análogo de péptido de OXM para evitar que los sujetos con tolerancia alterada a la glucosa desarrollen diabetes de tipo 2, evitar el deterioro de células-β pancreáticas, inducir la proliferación de células-β, mejorar la función de las células-β, activar las células-β durmientes, favorecer la diferenciación de células para dar lugar a células-β, estimular la replicación de células-β e

inhibir la apoptosis de células- β . Otras enfermedades y trastornos que se pueden tratar o evitar usando los compuestos de la invención en métodos de la invención incluyen: Diabetes de Young de Aparición en la Madurez (MODY) (Herman, y col., Diabetes 43:40, 1994); Diabetes Adulta Autoinmunitaria Latente (LADA) (Zimmet, y col., Diabetes Med. 11:299, 1994); tolerancia alterada a la glucosa (IGT) (Expert Committee on Classification of Diabetes Mellitus, Diabetes Care 22 (Supp.1): 55, 1999); glucosa alterada en ayunas (IFG) (Charles, y col., Diabetes 40:796, 1991); diabetes gestacional (Metzger, Diabetes, 40:197, 1991); síndrome X metabólico, dislipidemia, hiperglucemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia y resistencia a la insulina.

Los análogos de péptido de OXM de la invención también se pueden usar en métodos de la invención para tratar causas secundarias de diabetes (Expert Committee on Classification of Diabetes Mellitus, Diabetes Care 22 (Supp. 1): S5, 1999). Dichas causas secundarias incluyen exceso de glucocorticoides, exceso de hormona del crecimiento, feocromocitoma y diabetes inducida por fármacos. Los fármacos que pueden inducir diabetes incluyen, pero sin limitarse a, piriminilo, ácido nicotínicos, glucocorticoides, fenitoína, hormona tiroidea, agentes β -adrenérgicos, interferon- α y fármacos usados para tratar la infección por VIH.

Los análogos de péptido OXM de la presente invención pueden ser eficaces en la supresión de la ingesta de alimento y en el tratamiento de la obesidad.

Una "cantidad eficaz" de análogo de péptido de OXM es la cantidad que tiene como resultado un efecto profiláctico y/o terapéutico deseado sin provocar efectos secundarios cuando se administra a un sujeto. Un "efecto terapéutico deseado" incluye uno o más de los siguientes: 1) una mejora del(de los) síntoma(s) asociado(s) a la enfermedad o trastorno; 2) un retraso en la aparición de los síntomas asociados a la enfermedad o trastorno; 3) una longevidad mayor en comparación con la ausencia del tratamiento; y 4) mayor calidad de vida en comparación con la ausencia del tratamiento. Por ejemplo, una "cantidad eficaz" de un análogo de péptido de OXM para el tratamiento de NIDDM es la cantidad que daría como resultado un control de la concentración de glucosa en sangre mayor que en ausencia del tratamiento, dando como resultado de este modo un retraso en la aparición de las complicaciones diabéticas tales como retinopatía, neuropatía, o enfermedades renales. Una "cantidad eficaz" de un análogo de péptido de OXM para la prevención de NIDDM, por ejemplo en sujetos con tolerancia alterada a la glucosa o glucosa alterada en ayunas es la cantidad que provocaría el retraso, en comparación con la ausencia del tratamiento, de la aparición de niveles elevados de glucemia que requieren el tratamiento con fármacos antihiper glucémicos tales como sulfonilureas, tiazolidindionas, insulina y/o bisguanidinas.

La "cantidad eficaz" de un análogo de péptido de OXM administrada a un sujeto también depende del tipo y gravedad de la enfermedad y de las características del sujeto, tales como salud general, edad, sexo, peso corporal y tolerancia a fármacos. La dosis de análogo de péptido de OXM eficaz para normalizar la glucosa en la sangre del sujeto depende de un número de factores, entre los cuales se incluyen, sin limitación, el sexo del sujeto, peso y edad, la gravedad de la incapacidad para regular la glucemia, la ruta de administración y la biodisponibilidad, el perfil farmacocinético del péptido, la potencia y la formulación.

Preferentemente, una dosis típica de una vez a la semana de los análogos de péptido de OXM PEGilados de la presente invención varía de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 1000 mg (peso total del conjugado). Más preferentemente, la dosis de una vez a la semana varía de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 100 mg, o de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 30 mg. Del modo más preferido, la dosis de una vez a la semana varía de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 30 mg, o de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 5 mg.

Un "sujeto" es un mamífero, preferentemente un humano, pero también puede ser un animal, incluyendo animales de compañía (por ejemplo, perros, gatos, y similares), animales de granja (por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, caballos y similares) y animales de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, cobayas y similares).

A continuación se describen varias características y realizaciones preferidas de la presente invención únicamente a modo de ejemplos.

Ejemplo 1: Síntesis de Péptido

Se genera el análogo de péptido de acuerdo con ID. SEC. N°: 1 y ID. SEC. N°: 2 de la presente invención por medio de síntesis de péptido de fase sólida en un sintetizador automatizado de péptidos de Protein Technologies Inc. Symphony o Applied Biosystems 433A. La síntesis se lleva a cabo en una resina de poliestireno de amida Fmoc-Rink (Rapp Polymere Tubingen, Alemania) con una sustitución de aproximadamente 0,7 mmol/g. La síntesis se lleva a cabo usando una estrategia de grupo protector de cadena principal de Fmoc. Los derivados de cadena lateral de aminoácido usados son: Arg(Pbf), Asn(Trt), Asp(OtBu), Cys(Trt), Gln(Trt), Glu(OtBu), His(Trt), Lys(Boc), Ser(OtBu), Thr(OtBu), Trp(Boc) y Tyr(OtBu). El acoplamiento se lleva a cabo con aproximadamente 10 equivalentes de aminoácido activado con diisopropilcarbodiimida (DIC) e hidroxibenzotriazol (HOBt) (proporción molar 1:1:1) en dimetilformamida (DMF) o N-metil pirrolidinona (NMP). El acoplamiento se lleva a cabo durante 45 a 90 minutos a temperatura ambiente.

La escisión concomitante de la resina y la retirada del grupo protector de cadena lateral se llevan a cabo en una disolución que contiene ácido trifluoroacético (TFA): triisopropilsilano: 3,6-dioxa-1,8-octano-ditiol: metanol: anisol

90:4:2:2:2 (v/v) durante 1,5 a 2 horas a temperatura ambiente. Se filtra la disolución y se concentra hasta < 2 ml, y se precipitan los péptidos con éter dietílico frío, se re-disuelve en 30-40 ml de acetonitrilo de 10 % y se purifica sobre una columna de cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) de fase inversa de C₁₈ (normalmente de Waters Symmetry Prep 7 µm, 19 x 300 mm) con un caudal de 12-15 ml/min. Se eluyen las muestras con un gradiente de AB lineal de dos etapas de 0 a 25 % de B durante 20 minutos seguido de 25 a 75 % de B durante 100 minutos en el que A = 0,05 % de TFA/agua y B = 0,05 % de TFA/acetonitrilo. Generalmente, el producto se eluye a 30-35 % de acetonitrilo. Se confirma la pureza y el peso molecular del péptido en un sistema de cromatógrafo de líquidos-espectrómetro de masas de Agilent 1100 Serie (LC-MS) con un detector de MS de cuadrupolo individual. Se lleva a cabo la separación HPLC analítica en una columna Zorbax Eclipse XDB-C8, 5 micrómetros, 4,6 mm de diámetro interno x 15 cm, con un gradiente lineal de AB de 6 a 60 % de B durante 15 minutos en el que A = 0,05 % de TFA/H₂O y B = 0,05 % de TFA/acetonitrilo y el caudal es de 1 ml/min. Se purifica el análogo de péptido hasta > 95 % de pureza y se confirma que tiene un peso molecular que corresponde al valor calculado dentro de 1 unidad de masa atómica (uma).

Ejemplo 2: PEGilación de péptido que contiene dos residuos Cys con mPEG-MAL-20kDa

Se pesa el análogo de péptido liofilizado (ID. SEC. N°: 2) generado de acuerdo con el Ejemplo 1 (normalmente 30-50 mg). Se pesa un equivalente 2,1 veces molar de mPEG-20kDa maleimida (CH₃O(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)₃-NHCO(CH₂)₂-maleimida) (NOF Sunbright ME-200MA) y se combina con el péptido. Se disuelven los reaccionantes en una mezcla de agua/acetonitrilo 50/50 (v/v) hasta una concentración de péptido de aproximadamente 20 mg/ml. Se diluye la disolución de análogo de péptido dos veces con acetato de amonio 100 mM, ácido etilendiaminotetracético 10 mM (EDTA), pH 7. Posteriormente se agita la mezcla resultante a temperatura ambiente. Se controla la mezcla de reacción por medio de HPLC analítica de fase inversa (la separación de HPLC analítica se hace en una columna Waters Symmetry Shield C18, 3,5 micrómetros, 4,6 mm de diámetro interno, x 10 cm a 50 °C con un gradiente de A lineal de dos etapas de 0 a 30 % de B durante 5 minutos y de 30 a 90 % de A durante los 30 minutos posteriores en el que A = 0,05 % de TFA/H₂O y B = 0,05 % de TFA/acetonitrilo y el caudal es de 1 ml/min), y normalmente tras 1-2 horas de tiempo de reacción, se muestra la desaparición casi completa del pico de péptido. Aparecen dos picos debidos a péptido mono- y di-PEGilado, constituyendo normalmente el péptido di-PEGilado 90-95 % del área total de pico. Posteriormente, se diluye la muestra hasta aproximadamente 20 ml con agua y se purifica como en el Ejemplo 1 con un gradiente de AB lineal de dos etapas de 0 a 30 % de B durante 20 minutos seguido de 30 a 80 % de B durante 100 minutos. Generalmente, el producto eluye a 35-40 % de acetonitrilo. El péptido purificado se cuantifica por medio de absorbancia ultravioleta (UV) a 280 nm usando un coeficiente de extinción molar calculado en base a la secuencia de péptidos. El rendimiento tras la purificación está dentro del intervalo de 70 a 80 %, basado en la cantidad de péptido de partida.

Ejemplo 3: Ensayo de Unión de Receptor de Glucagón (hGcGR)

El ensayo de unión de receptor de glucagón utiliza el receptor de glucagón humano clonado (hGcGR) (Lok S, Kuijper JL, Jelinek LJ, Kramer JM, Whitmore TE, Sprecher CA, Mathewes S, Grant FJ, Biggs SH, Rosenberg GB, y col. Gene 140 (2), 203-209 (1994)) aislado a partir de membranas de 293HEK. Se subclona ADNc de hGcGR para dar lugar al plásmido de expresión pHd (expresión trans-actividad de proteína C humana recombinante completamente gamma-carboxilada, un factor antitrombótico. Grinnell, B. W., Berg, D.T., Walls, J y Yan, S.B. Bio/Technology 5: 1189-1192 (1987)). Este ADN de plásmido se somete a transfección en células 293HEK y se selecciona con 200 µg/ml de higromicina.

Se preparan membranas de plasma brutas usando células procedentes de cultivo en suspensión. Se someten las células a lisis sobre hielo en un tampón hipotónico que contiene Tris 25 mM, pH 7,5, MgCl₂ 1 mM, ADNasa 1, 20 µg/ml, e inhibidores Completos de Roche sin EDTA. Se homogeneiza la suspensión celular con un homogeneizador de dounce de vidrio usando un triturador de teflón para 25 lotes. Se centrifuga la fracción homogeneizada a 4 °C a 1800 x g durante 15 minutos. Se recoge el sobrenadante, se re-suspende la pella en tampón hipotónico y se re-homogeneiza. Se centrifuga la mezcla a 1800 x g durante 15 minutos. Se combina el segundo sobrenadante con el primer sobrenadante. Se centrifugan los sobrenadantes combinados a 1800 x g durante 15 minutos para clarificar. Se transfiere el sobrenadante clarificado a tubos de alta velocidad y se centrifuga a 25000 x g durante 30 minutos a 4 °C. Se re-suspende la pella de membrana en tampón de homogeneización y se almacena en forma de alícuotas congeladas a -80 °C hasta su uso.

Se somete el glucagón a radioyodado por medio de un procedimiento de lactoperoxidasa-I¹²⁵ y se purifica por medio de HPLC de fase inversa en un PerkinElmer/NEN (NEX207). La actividad específica es de aproximadamente 2200 Ci/mmol. Se lleva a cabo la determinación K_D por medio de competición de homólogos en lugar de unión de saturación debido al elevado contenido de propanol en el material de glucagón marcado con I¹²⁵. Se estima que K_D es 2,62 nM y se usa para calcular los valores de K_i para todos los compuestos sometidos a ensayo.

Se lleva a cabo el ensayo de unión de receptor usando un Ensayo de Proximidad de Centelleo (SPA) con perlas de aglutinina de germen de trigo (WGA) previamente bloqueado con albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos de 1 % (BSA). El tampón de unión contiene ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico 25 mM (HEPES), pH 7,4, CaCl₂ 2,5 mM, MgCl₂ 1 mM, BSA libre de ácido graso de 0,1 %, Tween 20 de 0,003 % e Inhibidores Completos de Roche sin EDTA. Se disuelve glucagón en HCl 0,01 N a 1 mg/ml y se congela inmediatamente a -80 °C en alícuotas

de 30 μ l. Se diluye una alícuota de glucagón y se usa en el ensayo de unión en 1 hora. Se disuelve el análogo de péptido de OXM en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) y se diluye de forma seriada en el tampón de unión. A continuación, se transfieren 10 μ l de compuestos diluidos o PBS al interior de placas de ensayo de parte inferior transparente de Coming 3632 que contienen 40 μ l de tampón de unión de ensayo o glucagón frío ((NSB) de unión no específico a 1 μ M final). Posteriormente, se añaden 90 μ l de membranas (3 μ g/pocillo), 50 μ l de glucagón marcado con I^{125} (concentración final de 0,15 nM en la reacción) y 50 μ l de perlas de WGA (150 μ g/pocillo). Se sellan las placas, se mezclan en el extremo y se leen con un contador de centelleo de MicroBeta tras 12 horas de tiempo de sedimentación a temperatura ambiente.

Los resultados se calculan como porcentaje unión de glucagón marcado con I^{125} en presencia del compuesto. La concentración absoluta de IC_{50} del compuesto procede de regresión no lineal del porcentaje de unión específica de glucagón marcado con I^{125} frente a la concentración de compuesto añadido. La dosis IC_{50} se convierte en K_i usando la ecuación de Cheng-Prusoff (Cheng Y., Prusoff W.H., Biochem. Pharmacol. 22, 3099-3108, 1973). El K_i del análogo de péptido de OXM de ID. SEC. N°: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 se encuentra amidado fue de 2050 ± 70 nM para la unión de hGcgR.

Ejemplo 4: Ensayo de Unión de Receptor de Péptido 1 de Tipo Glucagón (hGLP-1-R)

El ensayo de unión de receptor GLP-1 usa receptor 1 de péptido de tipo glucagón humano clonado (hGLP-1) (Graziano MP, Hey PJ, Borkowski D, Chicchi GG, Strader CD, Biochem Biophys Res Commun. 1993 Oct 15; 196(1): 141-6) aislado a partir de membranas 293HEK. Se subclona ADNc de gGLP-1 para dar lugar al plásmido de expresión pHd (expresión de trans-actividad de proteína C humana recombinante completamente gamma-carboxilada, un factor antitrombótico. Grinnell, B. W., Berg, D.T., Walls, J y Yan, S.B. Bio/Technology 5: 1189-1192 (1987)). Este ADN de plásmido se somete a transfección en células 293HEK y se selecciona con 200 μ g/ml de higromicina.

Se preparan membranas de plasma brutas usando células procedentes de cultivo en suspensión. Se someten las células a lisis sobre hielo en un tampón hipotónico que contiene Tris 25 mM, pH 7,5, $MgCl_2$ 1 mM, ADNasa 1, 20 μ g/ml, e inhibidores Completos de Roche sin EDTA. Se homogeneiza la suspensión celular con un homogeneizador de dounce de vidrio usando un triturador de teflón para 25 lotes. Se centrifuga la fracción homogeneizada a 4 $^{\circ}$ C a 1800 x g durante 15 minutos. Se recoge el sobrenadante, se re-suspende la pella en tampón hipotónico y se re-homogeneiza. Se centrifuga la mezcla a 1800 x g durante 15 minutos. Se combina el segundo sobrenadante con el primer sobrenadante. Se centrifugan los sobrenadantes combinados a 1800 x g durante 15 minutos para clarificar. Se transfiere el sobrenadante clarificado a tubos de alta velocidad y se centrifuga a 25000 x g durante 30 minutos a 4 $^{\circ}$ C. Se re-suspende la pella de membrana en tampón de homogeneización y se almacena en forma de alícuotas congeladas a -80 $^{\circ}$ C hasta su uso.

Se somete el glucagón a radioyodado por medio de un procedimiento de lactoperoxidasa- I^{125} y se purifica por medio de HPLC de fase inversa en un PerkinElmer/NEN (NEX308). La actividad específica es de aproximadamente 2200 Ci/mmol. Se lleva a cabo la determinación K_D por medio de competición de homólogos en lugar de unión de saturación debido al elevado contenido de propanol en el material de GLP-1 marcado con I^{125} . Se estima que K_D es 0,96 nM y se usa para calcular los valores de K_i para todos los compuestos sometidos a ensayo.

Se lleva a cabo el ensayo de unión de receptor usando un Ensayo de Proximidad de Centelleo (SPA) con perlas de aglutinina de germen de trigo (WGA) previamente bloqueado con BSA libre de ácido graso de 1 % (ICN). El tampón de unión contiene HEPES 25 mM, pH 7,4, $CaCl_2$ 2,5 mM, $MgCl_2$ 1 mM, BSA libre de ácido graso de 0,1 %, Tween 20 de 0,003 % e Inhibidores Completos de Roche sin EDTA. Se disuelve GLP-1 en PBS a 1 mg/ml y se congela inmediatamente a -80 $^{\circ}$ C en alícuotas de 30 μ l. Se descongelan las alícuotas de GLP-1, se diluyen y se usan en ensayos de unión en 1 hora. Se disuelve el análogo de péptido de OXM en PBS y se diluye de forma seriada en el tampón de unión. A continuación, se transfieren 10 μ l de compuestos diluidos o PBS al interior de placas de ensayo de parte inferior transparente de Coming 3632 que contienen 40 μ l de tampón de unión de ensayo o GLP-1 frío (NSB a 1 μ M final). Posteriormente, se añaden 90 μ l de membranas (1 μ g/pocillo), 50 μ l de GLP-1 marcado con I^{125} (concentración final de 0,15 nM en la reacción) y 50 μ l de perlas de WGA (150 μ g/pocillo). Se sellan las placas, se mezclan en el extremo y se leen con un contador de centelleo de MicroBeta tras 12 horas de tiempo de sedimentación a temperatura ambiente.

Los resultados se calculan como porcentaje unión de GLP-1 marcado con I^{125} en presencia del compuesto. La concentración absoluta de IC_{50} del compuesto procede de regresión no lineal del porcentaje de unión específica de GLP-1 marcado con I^{125} frente a la concentración de compuesto añadido. La dosis IC_{50} se convierte en K_i usando la ecuación de Cheng-Prusoff (Cheng Y., Prusoff W.H., Biochem. Pharmacol. 22, 3099-3108, 1973). El K_i del análogo de péptido de OXM de ID. SEC. N°: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 se encuentra amidado fue de 73 ± 23 nM para la unión de hGLP-1R.

Ejemplo 5: Ensayo Funcional de receptor de glucagón (hGcgR) estimulado con cAMP

El ensayo funcional de glucagón estimulado con cAMP usa la misma estirpe celular que expresa hGcgR clonado que se usa para el ensayo de unión de HGlucR descrito anteriormente en el Ejemplo 3. Se estimulan las células con

análogo de péptido de OXM, y se cuantifica el cAMP generado dentro de la célula usando un Ensayo Homogéneo de Proximidad Luminiscente Amplificado (Alpha Screen) de Perkin Elmer (6760625R). Brevemente, cAMP inducido en las células compite por la unión de cAMP biotinilado del estuche para una perla de aceptor de anticuerpo anti-cAMP revestido y una perla de donante revestido con estreptavidina. A medida que aumenta el nivel de cAMP dentro de la célula, tiene lugar una alteración del complejo de perla de aceptor-perla de donante de cAMP biotinilado y disminuye la señal que se observa.

Se recolectan las células de hGcgR-HEK293 a partir de las placas de cultivo tisular sub-confluentes con Disolución de Disociación Celular Libre de Enzimas (Specialty Media 5-004-B). Se someten las células a formación de pellas a una velocidad baja y se lavan 3 veces con tampón de ensayo [HEPES 25 mM en disolución salina tamponada de Hank (HBSS)- con Mg y Ca (GIBCO, 14025-092) con BSA Libre de Ácidos Grasos de 0,1 %], posteriormente se diluye hasta una concentración final de 125.000 células por ml. Se añade cAMP biotinilado procedente del estuche de Alpha Screen a las células diluidas a una concentración final de 1 unidad/0,04 ml. También se añade un inhibidor de fosfodiesterasa, IBMX (250 mM en sulfóxido de dimetilo (DMSO)), a las células diluidas hasta una concentración final de 500 μ M. Inicialmente se disuelve glucagón en HCl 0,01 N a 1 mg/ml y se congela de forma inmediata a -80 °C. Tras descongelar, se debe usar el glucagón en 1 hora. Se diluyen de forma seriada el glucagón, patrón de cAMP y análogo de péptido de OXM en un tampón de ensayo hasta una concentración final 6 X. Se lleva a cabo el ensayo funcional en placas de Costar de poliestireno, blancas, de bajo volumen de 96 pocillos (3688). La reacción comienza añadiendo 0,01 ml de los péptidos diluidos, glucagón o cAMP a 0,04 ml de la mezcla celular. Tras una hora a temperatura ambiente, se detiene la reacción por medio de la adición de 0,03 ml de Tampón de Lisis [HEPES de 10 mM, pH 7,4, NP40 de 1 % y BSA libre de ácidos grasos de 0,01 % que contiene 1 unidad cada una/0,03 ml de perlas de aceptor y donante procedentes del estuche de Alpha Screen]. La adición del tampón de lisis se lleva a cabo en oscuridad para evitar el blanqueado de las perlas de detección. Se enrollan las placas en papel metalizado, se agitan de manera intensa durante 1 minuto y posteriormente se dejan equilibrar durante la noche a temperatura ambiente. Se leen las placas en un instrumento Perkin Elmer Envision. Se convierten las unidades de Alpha Screen en pmoles de cAMP generados por pocillo, en base a la curva de patrón de cAMP. Se convierten los pmol de cAMP generados en cada pocillo en un porcentaje de la respuesta máxima observada con el control de glucagón. El valor de EC₅₀ procede del análisis de regresión no lineal usando la respuesta máxima en porcentaje vs a la concentración de péptido añadido. El análogo de péptido de OXM de ID. SEC. N°: 3 en la que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada, tal como OXM de tipo salvaje, fue completamente eficaz y potente en hGcgR con EC₅₀ de 59,9 $\pm$ 4,14 nM.

Ejemplo 6: Ensayo Funcional de Receptor de Péptido 1 de Tipo Glucagón (hGLP-1R) Estimulado con cAMP

El ensayo funcional de GLP-1 estimulado con cAMP usa la misma estirpe celular que expresa hGLP-1R clonado que se usa para el ensayo de unión de hGLP-1R descrito anteriormente en el Ejemplo 4. Se estimulan las células con análogo de péptido de OXM, y se cuantifica el cAMP generado dentro de la célula usando un Ensayo Homogéneo de Proximidad Luminiscente Amplificado (Alpha Screen) de Perkin Elmer (6760625R). Brevemente, cAMP inducido en las células compite por la unión de cAMP biotinilado del estuche para una perla de aceptor de anticuerpo anti-cAMP revestido y una perla de donante revestido con estreptavidina. A medida que aumenta el nivel de cAMP dentro de la célula, tiene lugar una alteración del complejo de perla de aceptor-perla de donante de cAMP biotinilado y disminuye la señal que se observa.

Se recolectan las células de hGLP-1R-HEK293 a partir de las placas de cultivo tisular sub-confluentes con Disolución de Disociación Celular Libre de Enzimas (Specialty Media 5-004-B). Se someten las células a formación de pellas a una velocidad baja y se lavan 3 veces con tampón de ensayo [HEPES 25 mM en HBSS-con Mg y Ca (GIBCO, 14025-092) con BSA Libre de Ácidos Grasos de 0,1 %], posteriormente se diluye hasta una concentración final de 125.000 células por ml. Se añade cAMP biotinilado procedente del estuche de Alpha Screen a las células diluidas a una concentración final de 1 unidad/0,04 ml. También se añade un inhibidor de fosfodiesterasa, IBMX (250 mM en DMSO), a las células diluidas hasta una concentración final de 500 μ M. Se almacena GLP-1 a 1 mg/ml en PBS en forma de alícuotas congeladas a -80 °C. Se diluyen de forma seriada GLP-1, patrón de cAMP y análogo de péptido de OXM en un tampón de ensayo hasta una concentración final 6 X. Se lleva a cabo el ensayo funcional en placas de Costar de poliestireno, blancas, de bajo volumen de 96 pocillos (3688). La reacción comienza añadiendo 0,01 ml de análogo de péptido de OXM diluido, GLP-1 o cAMP a 0,04 ml de la mezcla celular. Tras una hora a temperatura ambiente, se detiene la reacción por medio de la adición de 0,03 ml de Tampón de Lisis [HEPES de 10 mM, pH 7,4, NP40 de 1 % y BSA libre de ácidos grasos de 0,01 % que contiene 1 unidad cada una/0,03 ml de perlas de aceptor y donante procedentes del estuche de Alpha Screen]. La adición del tampón de lisis se lleva a cabo en oscuridad para evitar el blanqueado de las perlas de detección. Se enrollan las placas en papel metalizado, se agitan de manera intensa durante 1 minuto y posteriormente se dejan equilibrar durante la noche a temperatura ambiente. Se leen las placas en un instrumento Perkin Elmer Envision. Se convierten las unidades de Alpha Screen en pmoles de cAMP generados por pocillo, en base a la curva de patrón de cAMP. Se convierten los pmol de cAMP generados en cada pocillo en un porcentaje de la respuesta máxima observada con el control de GLP-1. El valor de EC₅₀ procede del análisis de regresión no lineal usando la respuesta máxima en porcentaje vs a la concentración de péptido añadido. El análogo de péptido de OXM de ID. SEC. N°: 3 en la que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidado, tal como OXM de tipo salvaje, fue completamente eficaz y potente en hGLP-1R con EC₅₀ de 2,75 $\pm$ 0,55 nM.

Ejemplo 7: Efectos sobre la ingesta de alimento, peso corporal y composición corporal en ratones obesos

inducidos con dieta (DIO)

Se usan ratones obesos inducidos con dieta machos de tres a cuatro meses de edad (DIO) C57BL/6. Se mantienen los animales de forma individual en una instalación a temperatura controlada (24 °C) con un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad (se encienden las luces a las 22:00), con acceso libre al agua y alimento. Tras 2 semanas de aclimatación a la instalación, se aleatorizan los ratones en grupos de tratamiento (n = 8-10/grupo), presentando cada grupo un peso medio corporal y masa de grasa similares. Antes del experimento, se inyectan una disolución de vehículo sub-cutáneamente (sc) a los ratones y se pesan durante 2 días para aclimatarlos a los procedimientos.

Se administra el vehículo o el análogo de péptido de OXM (intervalos de dosis 6,7-20 mole/kg) disuelto en el vehículo por medio de inyección sc a un ratón DIO a voluntad 30-90 minutos antes de la aparición del ciclo de oscuridad cada 3 días durante 2 a 4 semanas. Se miden el peso corporal y el peso de alimento más la tolva al mismo tiempo. Se calcula el alimento consumido en las 24 horas anteriores por medio de la resta del peso actual de alimentos más la tolva a partir del peso del día anterior. Se calculan los cambios absolutos en el peso corporal restando el peso corporal del animal antes de la primera inyección. En los días 1, 14 y 28 se mide la masa de grasa total por medio de resonancia magnética nuclear (RMN) usando un instrumento de Echo Medical System (Houston, TX). Se calcula la masa libre de grasa restando la masa de grasa del peso corporal total.

Estudio 1: Tratamiento de dos semanas

Se administra el análogo de péptido de OXM de ID. SEC. N°: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 se encuentra amidada *in vivo* por medio de inyección subcutánea a un individuo C57BL6 obeso inducido por dieta macho de 4 meses de edad (DIO). Se inyecta el análogo de péptido de OXM una vez cada 3 días durante 2 semanas a dosificaciones de 15 nmol/kg y se compara con el ratón tratado con vehículo y animales tratados con el control positivo (7,5 nmol/kg de un agonista de GLP-1R de acción prolongada inyectada cada 3 días).

El tratamiento con análogo de péptido de OXM de ID. SEC. N°: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada produjo una reducción dependiente de la dosis en la ingesta de alimento y peso corporal. Al final del período de estudio de 2 semanas, se redujo la ingesta de alimento acumulada en el grupo de 15 nmol/kg en 27 % en comparación con el grupo de vehículo. La pérdida acumulada de peso del grupo tratado con 7,5 mol/kg fue similar a la observada con el control positivo, que fue de aproximadamente una reducción de 9 % cuando se compara con el grupo de vehículo. La pérdida de peso acumulada controlada por vehículo del grupo tratado con 15 nmol/kg fue de 18 %. El análisis de la composición corporal mostró que la pérdida de peso fue principalmente debida a la pérdida de masa de grasa (Tabla 1).

Tabla 1

Cambio de peso en ratones DIO durante un período de tratamiento de 14 días (media $\pm$ SEM; n = 8)			
Dosis de análogo de péptido de OXM de ID. SEC. N°: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada (nmol/kg)	Pérdida de peso total (g de cambio de peso durante 14 días)	Ingesta total de alimento (g totales durante 14 días)	Pérdida de masa de grasa (cambio de peso de grasa en g durante 14 días)
0 (vehículo)	1,0 $\pm$ 0,5	40,7 $\pm$ 1,3	0,3 $\pm$ 0,3
7,5	-3,1 $\pm$ 0,4*	35,08 $\pm$ 0,8*	-2,2 $\pm$ 0,3*
15	-6,1 $\pm$ 0,9*	29,8 $\pm$ 1,5*	-3,9 $\pm$ 0,7*

Estos datos muestran que el análogo de péptido de OXM de ID. SEC. N°: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada disminuyó la ingesta acumulada de alimento y el peso corporal en estudios con ratones DIO de 14 días, en comparación con los ratones tratados con el vehículo. El peso corporal menor fue principalmente debido a una reducción en la masa de grasa. $p < 0,05$ frente al vehículo (Ensayo de Dunnett).

Estudio 2: Tratamiento de cuatro semanas

Se administra el análogo de péptido de OXM de ID. SEC. N°: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 se encuentra amidada (6,7 ó 20 nmol/kg) y control positivo (7,5 ó 22,5 nmol/kg de una agonista de GLP-1R de acción prolongada) cada 3 días por medio de inyección sub-cutánea a individuos C57BL/6 obesos inducidos por dieta macho de 4 meses de edad (DIO) durante 4 semanas.

El tratamiento con dosis elevadas del análogo de péptido de OXM de ID. SEC. N°: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada disminuyó significativamente la ingesta de alimento. A dosis bajas, el análogo de péptido

de OXM de ID. SEC. Nº: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada disminuyó el peso corporal en un grado similar al que se observa en el grupo de control positivo. A la dosis de 20 nmol/kg, el análogo de péptido de OXM de ID. SEC. Nº: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada provocó una pérdida de peso significativamente mayor en comparación con 22,5 nmol/kg del control positivo. La reducción máxima de peso (aproximadamente 25 % del peso corporal inicial) se logró tras 15 días de tratamiento. El análisis de composición de peso confirmó que la pérdida de peso asociada al análogo de péptido de OXM y el control positivo fue principalmente debido a la pérdida de masa de grasa (Tabla 2).

El efecto del análogo de péptido de OXM de ID. SEC. Nº: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada se evalúa adicionalmente con calorimetría indirecta en los días 21 a 23. Los animales tratados con el análogo de péptido de OXM de ID. SEC. Nº: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada (20 nmol/kg) tuvieron un gasto energético significativamente más elevado que los controles tratados con el vehículo (gasto energético medio de 24 horas en el día 21 aumentó en 18 %). El análogo de péptido de OXM de ID. SEC. Nº: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada no tuvo como resultado un cambio significativo en el nivel de actividad motora con respecto al control de vehículo.

Tras completar el estudio, los niveles de insulina en plasma y colesterol fueron en todos los grupos tratados significativamente más bajos que en los controles tratados con el vehículo, mientras que únicamente el grupo tratado con la dosis elevada de análogo de péptido de OXM de ID. SEC. Nº: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada tuvo niveles de leptina significativamente menores. Todos los grupos tratados con péptido tuvieron niveles de adiponectina en plasma más elevados que los controles tratados con el vehículo, pero únicamente el grupo tratado con la dosis elevada de análogo de péptido de OXM de ID. SEC. Nº: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada tuvo una diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 2

Cambio de peso en ratones DIO durante un período de tratamiento de 28 días (media $\pm$ SEM; n = 9)			
Dosis de análogo de péptido de OXM de ID. SEC. Nº: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada (nmol/kg)	Pérdida de peso total (g de cambio de peso durante 28 días)	Ingesta total de alimento (g totales durante 14 días)	Pérdida de masa de grasa (cambio de peso de grasa en g durante 28 días)
0 (vehículo)	0,8 $\pm$ 0,2	39,2 $\pm$ 0,8	0,5 $\pm$ 0,1
6,7	-2,0 $\pm$ 0,4*	36,0 $\pm$ 1,1	-0,7 $\pm$ 0,2*
20,0	-11,1 $\pm$ 0,9*	26,1 $\pm$ 1,4*	-7,5 $\pm$ 0,7*

Estos datos muestran que el análogo de péptido de OXM de ID. SEC. Nº: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada disminuyó la ingesta acumulada de alimento y el peso corporal en estudios con ratones DIO de 28 días, en comparación con los ratones tratados con el vehículo. El menor peso corporal fue principalmente debido a la reducción de la masa de gras. $p^* < 0,05$ frente al vehículo (ensayo de Dunnett).

Ejemplo 8: Efectos sobre la oscilación de glucemia durante el ensayo de tolerancia de glucosa oral o un ensayo de tolerancia de glucosa intraperitoneal tras un tratamiento de 2 semanas o 4 semanas en ratones DIO, respectivamente

Cincuenta y seis horas después de la última inyección como se describe en el Ejemplo 7 (Estudio 1) en ratones DIO, se alimentaron ratones durante 16 horas antes del comienzo del ensayo de tolerancia a glucosa. En el momento 0, se proporcionó a los animales 2 g/kg de dextrosa por medio de alimentación con sonda nasogástrica o inyección intraperitoneal (IP). Se recogió sangre por medio de extracción venosa de cola en el momento 0, 15, 30, 60 y 120 minutos tras prueba de tolerancia a la glucosa. Se mide la concentración de glucosa por medio de un glucómetro. Todas las dosis de análogo de péptido de OXM de ID. SEC. Nº: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada así como el control positivo redujeron de forma significativa la glucemia en todos los momentos de tiempo antes y después de la prueba de tolerancia a glucosa oral en comparación con los controles tratados con vehículo (Tabla 3).

Se lleva a cabo un ensayo de tolerancia a glucosa intraperitoneal (IPGTT) en el día 29, 3 días después de la última inyección como se describe en el Ejemplo 7 (Estudio 2) en ratones DIO. La dosis baja del análogo de péptido de OXM de ID. SEC. Nº: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada disminuyó la glucemia en ayunas con respecto a los controles tratados con vehículo pero tuvo un escaso efecto sobre los niveles de glucosa tras la prueba de tolerancia a glucosa IP. La dosis elevada del análogo de péptido de OXM de ID. SEC. Nº: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada y ambas dosis del control positivo redujeron significativamente la

glucemia en todos los momentos de tiempo antes y después de la prueba de tolerancia a glucosa IP cuando se compara con los controles tratados con vehículo (Tabla 4).

Tabla 3

Efectos del análogo de péptido de OXM de ID. SEC. N°: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada sobre la oscilación de glucemia tras la administración de un carga de glucosa oral.		
Datos proporcionados en forma de área bajo la curva de glucosa (= valores integrados desde t + 0 a 120 minutos) (n = 8)		
Dosis de análogo de péptido de OXM de ID. SEC. N°: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada (nmol/kg)	Glucosa AUC (mg*min/dL)	
	MEDIA	SEM
0 (vehículo)	27771	1434
7,5	17722*	1009
15	17518*	1686

- 5 Los datos muestran que después de un tratamiento de 2 semanas en ratones DIO con el análogo de péptido de OXM de ID. SEC. N°: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada, se produjo una disminución significativa de la oscilación de glucemia tras una carga de glucosa oral. La significancia estadística se evaluó por medio del ensayo de Dunnett (*p< 0,05 frente al vehículo).

Tabla 4

Efectos del análogo de péptido de OXM de ID. SEC. N°: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada sobre la oscilación de glucemia tras una carga de glucosa (ip) intraperitoneal.		
Datos proporcionados en forma de área bajo la curva de glucosa (= valores integrados desde t + 0 a 120 minutos) (n = 6)		
Dosis de análogo de péptido de OXM de ID. SEC. N°: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada (nmol/kg)	Glucosa AUC (mg*min/dL)	
	MEDIA	SEM
0 (vehículo)	35518	1969
6,7	30073	3389
20,0	19264*	1894

- 10 Estos datos muestran que después de un tratamiento de 4 semanas en ratones DIO con el análogo de péptido de OXM de ID. SEC. N°: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada, se produjo una disminución significativa de la oscilación de glucemia tras una carga de glucosa intraperitoneal (ip). La significancia estadística se evaluó por medio del ensayo de Dunnett (*p< 0,05 frente al vehículo).

15 **Ejemplo 9: Efectos sobre la oscilación de glucemia durante el ensayo de tolerancia de glucosa interaperitoneal en ratones delgados**

- 20 Se usan ratones C57BL/6 de nueve semanas de edad en el estudio. Se aleatorizaron los animales en grupos basados en peso corporal alimentado. Se inyectó a los animales un vehículo o análogo de péptido de OXM (dosis de 5,0-15,0 nmol/kg) 16 horas antes del comienzo del ensayo. Se retira el alimento en el momento de la inyección de péptido o vehículo. En el momento 0, se proporciona a los animales 2 g/kg de dextrosa por medio de inyección IP. Se recoge sangre por medio de extracción venosa de cola en el momento 0, 3, 6, 12 y 30 minutos tras la prueba de tolerancia a glucosa. Se mide la concentración de glucosa por medio de un glucómetro. Se mide la insulina por

medio de Mesoscale.

La dosis elevada del análogo de péptido de OXM de ID. SEC. N°: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada disminuyó significativamente la oscilación de glucemia en comparación con los controles tratados con vehículo (Tabla 5). Ambas dosis del análogo de péptido de OXM de ID. SEC. N°: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada aumentaron significativamente las concentraciones de insulina en plasma cuando se compara con los controles tratados con vehículo (Tabla 6).

Tabla 5

Efectos del análogo de péptido de OXM de ID. SEC. N°: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada sobre la oscilación de glucemia tras un ensayo de tolerancia de glucosa intraperitoneal (ip) en ratones delgados.		
Datos proporcionados en forma de área bajo la curva de glucosa (= valores integrados desde t + 0 a 30 minutos)) (n = 6)		
Dosis de análogo de péptido de OXM de ID. SEC. N°: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada (nmol/kg)	Glucosa AUC (mg*min/dL)	
	MEDIA	SEM
Vehículo	8718	496
5	7059	476
15	6103*	530

Estos datos muestran que el análogo de péptido de OXM de ID. SEC. N°: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada redujo significativamente la oscilación de glucemia tras el ensayo de tolerancia a glucosa intraperitoneal (ip) en ratones delgados. Se evaluó la significancia estadística por medio de ensayo de Dunnett (*p< 0,05 frente al vehículo).

Tabla 6

Efectos del análogo de péptido de OXM de ID. SEC. N°: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada sobre el nivel de insulina en plasma tras un ensayo de tolerancia de glucosa intraperitoneal (ip) en ratones delgados.		
Datos proporcionados en forma de área bajo la curva de insulina (= valores integrados desde t + 0 a 30 minutos)) (n = 6)		
Dosis de análogo de péptido de OXM de ID. SEC. N°: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada (nmol/kg)	Insulina AUC (mg*min/dL)	
	MEDIA	SEM
0 (vehículo)	8,14	1,13
5	30,67*	4,76
15	45,26*	6,78

Estos datos muestran que el análogo de péptido de OXM de ID. SEC. N°: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada aumentó significativamente la oscilación de insulina tras el ensayo de tolerancia a glucosa intraperitoneal (ip) en ratones delgados. Se evaluó la significancia estadística por medio de ensayo de Dunnett (*p< 0,05 frente al vehículo).

Ejemplo 10: Efectos de la oscilación de glucemia durante el ensayo de tolerancia de glucosa oral (OGTT) o ensayo de tolerancia de glucosa interaperitoneal (ip) (IPGTT) en ratones ob/ob

Se mantuvieron ratones ob/ob macho de dos a tres meses de edad de forma individual en una instalación con temperatura controlada (24 °C) con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (luces encendidas a las 2200 horas) y con acceso libre a agua y alimento convencional. Tras al menos 2 semanas de aclimatación a la instalación, se mide la glucemia en ayunas de 3 horas por medio de extracción venosa de cola a las 9 AM. No se usan ratones con glucemia por debajo de 180 mg/dL. Se aleatorizan el resto de animales en grupos de tratamiento (N=6-7/grupo), presentando cada grupo un nivel de glucemia media similar. Se proporciona a los ratones acceso libre al alimento hasta el momento de la inyección. Se inyectó a los animales 7,5 mol/kg de análogo de péptido de OXM a las 4 PM del mismo día. Se retira el alimento en el momento de la inyección. Se lleva a cabo OGTT (Tabla 7) o IPGTT (Tabla 8) 16 horas después de cada inyección de péptido. En el momento 0, se proporciona a los animales 2 g/kg de dextrosa por medio de sonda nasogástrica oral (Tabla 7) o inyección intraperitoneal (Tabla 8). Se recoge sangre por medio de extracción de vena de cola en los minutos 0, 15, 30, 60 y 120 tras la prueba de tolerancia a glucosa. Se mide la concentración de glucosa por medio de un glucómetro.

Una inyección individual de péptido de OXM de ID. SEC. Nº: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada normalizó la glucemia en ratones ob/ob. Los niveles de glucemia en todos los momentos medidos tras la prueba de tolerancia a glucosa fueron significativamente menores que el grupo de control de vehículo.

Tabla 7

Efectos del análogo de péptido de OXM de ID. SEC. Nº: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada sobre la oscilación de glucemia tras ensayo de tolerancia de glucosa oral en ratones ob/ob.		
Datos proporcionados en forma de área bajo la curva de glucosa (= valores integrados desde t + 0 a 120 minutos)) (n = 7)		
Dosis de análogo de péptido de OXM de ID. SEC. Nº: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada (nmol/kg)	Glucosa AUC (mg*min/dL)	
	MEDIA	SEM
0 (vehículo)	23938	1629
7,5	12266*	1215

Los datos muestran que el análogo de péptido de OXM de ID. SEC. Nº: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada redujo significativamente la glucemia tras el ensayo de tolerancia a glucosa oral en ratones ob/ob. La significancia estadística se evaluó por medio del ensayo de Dunnett (*p<0,05 frente al vehículo).

Tabla 8

Efectos del análogo de péptido de OXM de ID. SEC. Nº: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada sobre la oscilación de glucemia tras ensayo de tolerancia a glucosa intraperitoneal (ip) en ratones ob/ob.		
Datos proporcionados en forma de área bajo la curva de glucosa (= valores integrados desde t + 0 a 120 minutos)) (n = 6)		
Dosis de análogo de péptido de OXM de ID. SEC. Nº: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada (nmol/kg)	Glucosa AUC (mg*min/dL)	
	MEDIA	SEM
0 (vehículo)	37894	1482
7,5	18878*	3224

Los datos muestran que el análogo de péptido de OXM de ID. SEC. Nº: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada redujo significativamente la glucemia tras el ensayo de tolerancia a glucosa intraperitoneal (ip) en ratones ob/ob. La significancia estadística se evaluó por medio del ensayo de Dunnett (*p<0,05 frente al vehículo).

Ejemplo 11: Efectos agudos sobre FGF21 en plasma, niveles de triglicéridos y expresión genética hepática en ratones C57BL/6 macho obesos inducidos por dieta

Con el fin de investigar las rutas metabólicas que se modulan por medio del tratamiento con análogo de péptido de OXM de ID. SEC. N°: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada independientemente del peso corporal, se administran el análogo de péptido de OXM y un control positivo (un agonista de GLP-1R de acción prolongada) por medio de inyección sub-cutánea a ratones obesos inducidos por dieta macho de 3 meses (DIO). El día antes del estudio, se aleatorizan los ratones en grupos de tratamiento (N =7/grupo), presentando cada grupo un peso medio corporal similar. La misma noche (aproximadamente 10 PM) se colocan los animales en jaulas limpias y se dosifican con el vehículo o el análogo de péptido de OXM por medio de inyección sub-cutánea. Se administran el análogo de péptido de OXM y los controles a 22 nmol/kg. Se retira el alimento en el momento de la inyección de péptido o vehículo. A la mañana siguiente (aproximadamente a las 10 AM), se sacrifican los animales para recoger el plasma y el tejido hepático. Se miden las concentraciones de glucosa y triglicéridos usando un analizador químico de sangre Hitachi. Se determina la expresión genética por medio de RT-PCR. Se miden los niveles de malonil-CoA y acetil-CoA por medio de HPLC.

Tras una inyección individual, la glucosa en plasma disminuyó significativamente con respecto al control de vehículo en todos los grupos de tratamiento. El nivel de triglicéridos en plasma disminuyó con respecto al control de vehículo únicamente en ratones tratados con el análogo de péptido de OXM de ID. SEC. N°: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada pero no en aquellos tratados con el agonista de GLP-1R de acción prolongada. Las concentraciones de malonil-CoA y acetil-CoA en hígado disminuyeron significativamente en 63 % y 30 %, respectivamente, frente al control de vehículo, tras el tratamiento con el análogo de péptido de OXM de ID. SEC. N°: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada. El tratamiento con el análogo de péptido de OXM de ID. SEC. N°: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada alteró la expresión de varios genes hepáticos incluyendo un aumento de la expresión génica de pgc-1 α en 7 veces y una disminución del gen de ChREBP y PCSK9 en 52 % y 61, respectivamente. Además, la expresión génica FGF21 fue inducida 17 veces, lo que corresponde a un aumento de 6 veces en FGF-21 circulante tras el tratamiento agudo con el análogo de péptido de OXM de ID. SEC. N°: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada. Todos los cambios fueron específicos para los ratones tratados con el análogo de péptido de OXM de ID. SEC. N°: 3 en el que Cys(PEG20k) en la posición 39 está amidada.

Listado de Secuencias

His-(Aib)-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Lys-Lys-
Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn-(Aib)-Gly-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-
Ile-Ala (SEC.ID. N°: 1)

His-(Aib)-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Lys-Lys-
Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn-(Aib)-Gly-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-
Ile-Ala-Cys-Cys (SEC.ID. N°: 2)

His-(Aib)-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Lys-Lys-
Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn-(Aib)-Gly-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-
Ile-Ala-Cys(PEG20K)-Cys(PEG20K) (SEC.ID. N°: 3)

en la que Cys(PEG20k) en la posición 39 está opcionalmente amidada.

5 His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-
Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-
Ile-Ala (SEC . ID . N° : 4)

His-(Aib)-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Lys-Lys-
Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn-(Aib)-Gly-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-
Ile-Ala- Xaa₃₈-Xaa₃₉ (SEC . ID . N° : 5)

10 en la que Xaa₃₈ es Cys, Cys-PEG o se encuentra ausente; y
Xaa₃₉ es Cys, Cys-PEG o se encuentra ausente.

REIVINDICACIONES

1.- Un análogo de péptido de oxintomodulina que comprende la secuencia de amino ácidos:

5 His-(Aib)-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Lys-Lys-
Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn-(Aib)-Gly-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-
Ile-Ala- Xaa₃₈-Xaa₃₉ (SEC. ID. N° : 5)

en la que Xaa₃₈ es Cys, Cys-PEG o se encuentra ausente; Xaa₃₉ es Cys, Cys-PEG o se encuentra ausente;
y en la que el amino ácido C-terminal está opcionalmente amidado.

10 2. Un análogo de péptido de oxintomodulina de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la secuencia de amino ácidos:

His-(Aib)-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Lys-Lys-
Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn-(Aib)-Gly-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-
15 Ile-Ala-Cys-Cys (SEC. ID. N° : 2)

en la que el residuo de Cys en la posición 38 está opcionalmente PEGilado; y en la que el residuo de Cys en la posición 39 está opcionalmente PEGilado; y el grupo carboxilo del Cys en la posición 39 está opcionalmente amidado.

20 3. El análogo de péptido de oxintomodulina de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el análogo está PEGilado con una molécula de PEG de aproximadamente 40 kDa unida al grupo tiol del residuo de Cys bien en la posición 38 o en la posición 39.

4. El análogo de péptido de oxintomodulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el análogo esta PEGilado sobre el tiol de ambos residuos de Cys en las posiciones 38 y 39 con una molécula de PEG de aproximadamente 20 kDa en cada caso y comprende la secuencia de amino ácidos:

25 His-(Aib)-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Lys-Lys-
Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn-(Aib)-Gly-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-
Ile-Ala-Cys(PEG20K)-Cys(PEG20K) (SEC. ID. N° : 3)

en la que el grupo carboxilo de Cys PEGilada en la posición 39 está opcionalmente amidado.

30 5. El análogo de péptido de oxintomodulina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la molécula de PEG es lineal.

6. El análogo de péptido de oxintomodulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el grupo carboxilo del residuo Cys en la posición 39 está amidado.

35 7. El análogo de péptido de oxintomodulina de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el residuo de Cys en posición 39 está ausente, y el residuo Cys en la posición 38 está PEGilado con una molécula de PEG de aproximadamente 40 kDa y está opcionalmente amidado.

8. Una composición farmacéutica que comprende el análogo de péptido de oxintomodulina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y un vehículo aceptable farmacéuticamente, diluyente o excipiente.

40 9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, que comprende el análogo de péptido de oxintomodulina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos.

10. El análogo de péptido de oxintomodulina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso como medicamento.

11. El análogo de péptido de oxintomodulina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en el tratamiento de diabetes no insulino dependiente.
12. El análogo de péptido de oxintomodulina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en el tratamiento de la obesidad.
13. El análogo de péptido de oxintomodulina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en el tratamiento de diabetes no insulino dependiente u obesidad.