

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 512 141**

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 10799178 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014 EP 2515927**

54 Título: **Análogo peptídico de oxintomodulina**

30 Prioridad:

08.06.2010 US 352569 P

22.12.2009 US 288884 P

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

23.10.2014

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 2 512 141 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 peptídico de oxintomodulina

La presente invención se refiere a análogos peptídicos de oxintomodulina y a derivados pegilados de los mismos para su uso en el tratamiento de diabetes y/u obesidad.

5 La oxintomodulina (OXM) es una hormona peptídica de 37 aminoácidos, que se libera junto con el péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) a partir de las células L del intestino delgado, en proporción a la ingestión de nutrientes. Está compuesta por la secuencia de 29 restos completa de glucagón (Gcg), con una extensión de octapéptido en el extremo C-terminal, como resultado de un procesamiento alternativo específico de tejido del preproglucagón. La OXM endógena se degrada rápidamente *in vivo*, mediante la dipeptidil peptidasa IV y mediante otras peptidasas.

10 Aún no se han identificado receptores bien definidos para la OXM. La OXM se une a y activa totalmente, tanto al receptor de GLP-1 (GLP-1R), como al receptor de glucagón (GcgR) *in vitro*, con potencias similares en los dos receptores.

15 La OXM está implicada en la regulación de la ingesta de alimentos y del peso corporal. La administración aguda de OXM a seres humanos con peso normal redujo la sensación de hambre y el tamaño de las comidas en un 19 %. En un estudio de 4 semanas realizado con sujetos con sobrepeso y obesos, la administración subcutánea preprandial tres veces al día de OXM produjo una pérdida de peso de 2,3 kg en comparación con 0,5 kg en el grupo de placebo. En este estudio, las náuseas, el efecto secundario más común asociado con la terapia basada en GLP-1 (tal como exenatida y liraglutida), fueron significativamente menos prevalentes. La OXM aumentaba el uso de energía mediante la promoción de una mayor actividad física en seres humanos con sobrepeso y obesos, aunque el mecanismo del efecto no está claro.

20

25 La OXM presenta varios desafíos para el desarrollo en un agente terapéutico viable comercialmente. Como se menciona anteriormente, se degrada rápidamente *in vivo*, además de estar sometida a un rápido aclaramiento renal debido a su pequeño tamaño. Por esta razón, es conveniente identificar análogos peptídicos de OXM con una estabilidad metabólica mejorada y una tasa de aclaramiento reducida. Además, la actividad agonista de GcgR inherente en la OXM, presenta un riesgo de afectar negativamente al control glucémico. De este modo, también es conveniente optimizar la potencia de un análogo peptídico de OXM diseñado para uso terapéutico, mientras se mantiene un equilibrio apropiado entre las actividades del GLP-1R y del GcgR. La activación del GLP-1R es responsable de un efecto insulínico, mientras que la activación tanto de GLP-1R como de GcgR puede jugar un papel en los efectos de pérdida de peso. Por esta razón, es conveniente producir un análogo peptídico de OXM que tenga una potente actividad insulínica y que favorezca la pérdida de peso, de manera que se pueda utilizar en el tratamiento de la diabetes que no depende de la insulina y/o en casos de obesidad.

30

35 En los documentos WO 2008101017, WO2006134340, WO2007100535, y en Pocaí y col. Diabetes 58:2258-2266, 2009, se desvelan péptidos de OXM con sustituciones de aminoácidos para mejorar la estabilidad, junto con modificaciones adicionales para ralentizar el aclaramiento, tales como la pegilación o lipidación. Aunque estos péptidos derivados de OXM pueden representar una mejora potencial sobre el péptido de tipo silvestre, las dosis necesarias para lograr una reducción de peso considerable en un modelo de obesidad inducida por la dieta (DIO) de ratón, son normalmente más altas que las que puedan considerarse viables para su comercialización farmacéutica. Por ejemplo, Pocaí y col. (2009) informó de una pérdida de peso en promedio de 11 g (~25 %) después de 13 días de dosificación con 1900 nmol/kg (~8 mg/kg) cada dos días (QOD).

40 A pesar de la disponibilidad de varios péptidos de OXM y de análogos de los mismos, aún existe la necesidad de análogos peptídicos de OXM más potentes, estables, de acción prolongada y que se toleren bien, con una proporción de actividad de GcgR/GLP-1R que se haya optimizado de tal manera que la potencia y la actividad insulínica del péptido proporcione tratamientos eficaces para la diabetes, preferentemente para la diabetes de tipo 2 y para trastornos relacionados. También es recomendable proporcionar análogos peptídicos de OXM de los mismos, que proporcionen tratamientos eficaces para reducir el peso corporal. Por consiguiente, la presente invención busca proporcionar tratamientos eficaces para la diabetes y/o la obesidad.

45

50 La presente invención comprende un análogo peptídico de OXM con sustituciones de aminoácidos que se introducen para optimizar la estabilidad metabólica y para modular las actividades relativas de GcgR/GLP-1R, mientras se optimiza la potencia total. Adicionalmente, el análogo peptídico de OXM de la presente invención se pegila en posiciones seleccionadas para mejorar la acción del tiempo, permitiendo así una dosificación menos frecuente.

La presente invención proporciona un análogo peptídico de oxintomodulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

1
5
10
 His- (D-Ser) -Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp- (1-Nal) -Ser-Lys-Tyr-
15
20
25
 Leu-Asp-Glu-Lys-Ala-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn-
30
35
 (Aib) -Ala-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala-Cys (20kDa PEG) -
 Cys (20kDa PEG) (SEC ID N°: 3)

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

El análogo peptídico de oxintomodulina más preferente comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3, en la que el grupo caboxilo de la Cys pegilada en la posición 39 está amidado.

5 La molécula de PEG que se usa en la presente invención puede ser lineal o ramificada y es preferentemente una molécula de PEG lineal.

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

Además, la presente invención proporciona un procedimiento para el tratamiento de la diabetes no dependiente de insulina (tipo 2) en un sujeto con esa necesidad, que comprende la administración al sujeto con esa necesidad de una cantidad eficaz de un análogo peptídico de oxintomodulina como se define anteriormente.

Adicionalmente, la presente invención proporciona un procedimiento para el tratamiento de la diabetes dependiente de insulina (tipo 1), en un sujeto con esa necesidad, que comprende la administración al sujeto con esa necesidad de una cantidad eficaz de un análogo peptídico de oxintomodulina, como se define anteriormente.

20 La presente invención incluye un procedimiento para tratar la obesidad en un sujeto con esa necesidad, que comprende la administración al sujeto con esa necesidad de una cantidad eficaz de un análogo peptídico de oxintomodulina, como se define anteriormente

Además, la presente invención incluye un procedimiento para el tratamiento de la diabetes no dependiente de la insulina y de la obesidad en un sujeto con esa necesidad, que comprende la administración al sujeto con esa necesidad de una cantidad eficaz de análogo peptídico de oxintomodulina, como se define anteriormente.

La presente invención proporciona un análogo peptídico de oxintomodulina, como se define anteriormente, para su uso como un medicamento.

30 Adicionalmente, la presente invención proporciona un análogo peptídico de oxintomodulina, como se define anteriormente, para su uso en el tratamiento de diabetes no dependiente de insulina.

Además, la presente invención proporciona un análogo peptídico de oxintomodulina, como se define anteriormente, para su uso en el tratamiento de la diabetes dependiente de insulina.

35 Además, la presente invención proporciona un análogo peptídico de oxintomodulina, como se define anteriormente, para su uso en el tratamiento de la obesidad.

La presente invención incluye un análogo peptídico de oxintomodulina, como se define anteriormente, para su uso en el tratamiento de la diabetes no dependiente de insulina y de la obesidad.

La presente invención proporciona el uso de un análogo peptídico de oxintomodulina, como se define anteriormente, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes no dependiente de la insulina.

45 Adicionalmente, la presente invención incluye el uso de un análogo peptídico de oxintomodulina, como se define anteriormente, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes dependiente de insulina.

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

5 Además, la presente invención proporciona el uso de un análogo peptídico de oxintomodulina, como se define anteriormente, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes no dependiente de insulina y de la obesidad.

10 Los análogos peptídicos de OXM de la presente invención, se unen eficazmente a y activan tanto el receptor de GLP-1 (GLP-1R) como el receptor de glucagón (GcgR).

15 También se ha comprobado que los análogos peptídicos de OXM de la presente invención son más resistentes a la degradación mediante peptidasas, en particular la dipeptidil peptidasa IV que la OXM humana nativa. Como resultado, los análogos peptídicos de OXM de la presente invención poseen una estabilidad *in vivo* mejorada frente a la OXM humana nativa.

Diversas realizaciones de acuerdo con la presente invención son capaces de causar una reducción en la ingesta de alimentos en sujetos con sobrepeso y obesos.

20 Una ventaja particular de la presente invención es que la frecuencia de efectos secundarios tales como náuseas, que están comúnmente asociadas con la terapia basada en GLP-1, tal como la exenatida y la liraglutida, se reduce o se elimina. Por consiguiente, la presente invención tiene menos efectos secundarios en comparación con la terapia basada en GLP-1.

25 Los análogos peptídicos de OXM de la presente invención también tienen un efecto de pérdida de peso superior frente a la OXM humana de tipo silvestre.

30 La oxintomodulina (OXM) es un coagonista débil con plena eficacia y potencia equilibrada en el hGLP-1R y en el hGcgR, con valores de CE_{50} de aproximadamente $6,7 \pm 2,7$ nM y $4,1 \pm 1,7$ nM, respectivamente, en células HEK293 que sobreexpresan de forma estable los respectivos receptores. La secuencia de la OXM humana nativa se da 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 N°: 4)

35 El análogo peptídico de OXM de la SEC ID N°: 3, en el que la Cys (PEG20k) de la en la posición 39 está amidada, es un análogo peptídico de oxintomodulina plenamente eficaz y potente, con una CE_{50} de $60,0 \pm 2,97$ nM y de $6,58 \pm 0,87$ nM contra el hGcgR y el hGLP-1R, respectivamente. El análogo peptídico de OXM de la SEC ID N°: 3, en el que la Cys (PEG 20k) en la posición 39 está amidada, tiene un equilibrio de las actividades funcionales *in vitro* que es ~9 veces más selectivo para el hGLP-1R en comparación con el hGcgR. Se observan resultados comparables para las afinidades de unión, K_i , donde el análogo peptídico de OXM de la SEC ID N°: 3 en el que la Cys (PEG 20k) de la posición 39 está amidada, es 3,6 veces más selectivo para el hGLP-1R en comparación con el hGcgR, con valores de K_i de 1540 ± 158 nM y 5500 ± 350 nM, respectivamente.

45 La unión covalente de una o más moléculas de PEG a restos particulares del análogo peptídico de OXM, da como resultado un análogo peptídico de OXM pegilado con una semivida ampliada y una tasa de aclaramiento reducida, cuando se compara con la del análogo peptídico de OXM no pegilado, y la potencia *in vitro* en el GLP-1R es similar a la de la OXM humana nativa. Dado el pequeño tamaño del análogo peptídico de OXM y el tamaño relativamente grande de la molécula o las moléculas de PEG, se esperaría que el análogo peptídico de OXM, una vez pegilado, perdiese actividad como resultado de un impedimento estérico. Se ha descubierto, sin embargo, que si se coloca en el extremo del análogo peptídico de oxintomodulina en lugar de en el medio, la actividad del análogo peptídico se conserva en mayor medida. Varias sustituciones en la secuencia aumentan la potencia, lo que compensa la pérdida de potencia debido a la pegilación mientras se mantiene una proporción apropiada de actividades en el GLP-1R y en el GcgR. Además, se ha descubierto, que la presencia de dos moléculas de PEG en el extremo C-terminal del análogo peptídico de OXM es preferente a un solo PEG.

55 Las secuencias de la presente invención contienen los códigos estándar de una sola letra o de tres letras para los veinte aminoácidos que se producen naturalmente. Los otros códigos usados son los definidos a continuación:

60 d o D = la isoforma D (que no se produce naturalmente) del aminoácido respectivo, por ejemplo, D-Ser = D-Serina, dS = D-Serina

Aib = ácido alfa aminoisobutírico

1-Nal = 1-naftilalanina

PEG = polietilenglicol

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

65

El término "PEG", como se usa en el presente documento, 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. Típicamente, n no es un valor discreto, sino que constituye un intervalo con una distribución aproximadamente gaussiana alrededor de un valor medio. El hidrógeno terminal puede estar sustituido con un grupo de protección, tal como un grupo alquilo o alcohol. Preferentemente, la molécula de PEG tiene al menos un grupo hidroxilo, más preferentemente es un grupo hidroxilo terminal. Este grupo hidroxilo se une preferentemente a un resto de engarce, que puede reaccionar con el péptido para formar un enlace covalente. En la técnica existen numerosos derivados de PEG. (Véanse, por ejemplo, las Patentes N^o: 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 aproximadamente 10.000, 20.000, 30.000, o 40.000 daltons. La molécula de PEG es preferentemente de 18.000 a 22.000 daltons. Más preferentemente, de 19.000 a 21.000 daltons. Es aún más preferente que sea de 20.000 a 21.000 daltons. Y aún más preferentemente es de aproximadamente 20.000 daltons. Los reactivos de pegilación pueden ser moléculas lineales o ramificadas y pueden estar presentes individualmente o en tándem. Los análogos peptídicos de OXM pegilados de la presente invención, tienen preferentemente moléculas de PEG en tándem unidas al C-terminal del péptido. Las moléculas de PEG están preferentemente unidas a los dos restos de cisteína en el extremo C-terminal del péptido mediante una mPEG-maleimida de 20 kDa (Figura 1) o mediante una mPEG-yodoacetamida de 20 kDa (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.

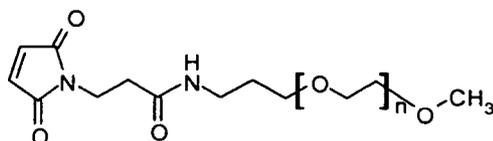


Figura 1

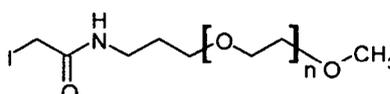


Figura 2

En particular, las moléculas de PEG son preferentemente mPEG-maleimida de 20kDa ($\text{CH}_3\text{O(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{NHCO(CH}_2\text{)}_2\text{-maleimida}$) (NOF Sunbright ME-200MA) y están unidas a los dos restos de cisteína en el extremo C-terminal del péptido. El análogo peptídico de oxintomodulina más preferido comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N^o: 3, en la que las moléculas de PEG son mPEG-maleimida de 20kDa ($\text{CH}_3\text{O(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{NHCO(CH}_2\text{)}_2\text{-maleimida}$) (NOF Sunbright ME-200MA), y en las que el grupo carboxilo de la Cys pegilada en la posición 39 (Figura 3) está amidada. La Figura 3 contiene el código de aminoácidos estándar de una sola letra con la excepción de las áreas con un recuadro en las que se han ampliado las estructuras de esos restos de aminoácidos.

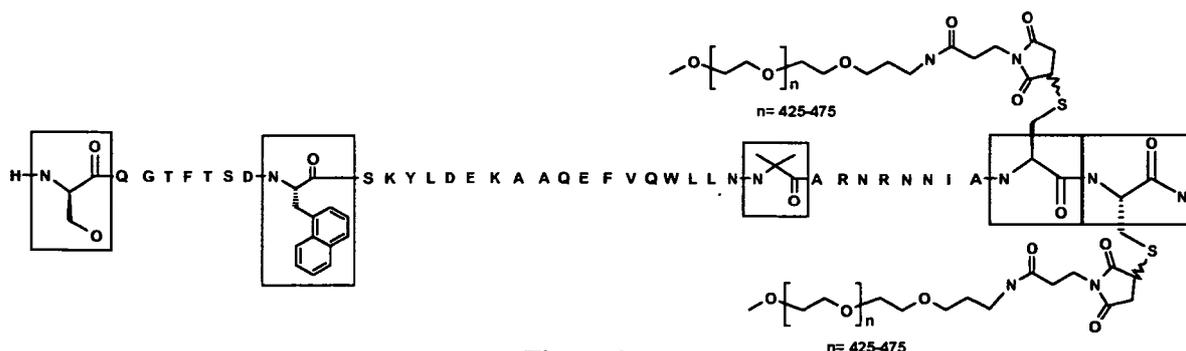


Figura 3

El término "pegilación", como se usa en el presente documento, significa la unión covalente de una o más moléculas de PEG, como se describe anteriormente, a una molécula tal como los análogos peptídicos de OXM de la presente invención.

La "actividad insulínica" se refiere a la capacidad de estimular la secreción de insulina en respuesta a niveles elevados de glucosa, provocando de este modo la absorción de glucosa por las células y la disminución de los niveles de glucosa en el plasma. La actividad insulínica se puede evaluar por procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen experimentos *in vitro* que miden la secreción de insulina por líneas celulares de insulinoma o islotes, o experimentos *in vivo* tales como la prueba de tolerancia a la glucosa intravenosa (PTGIV), prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT), y prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO). La actividad insulínica se mide rutinariamente en seres humanos mediante la medición de los niveles de péptido C o insulina

en plasma. Los análogos peptídicos de OXM de la presente invención poseen una robusta actividad insulínica.

La "potencia *in vitro*", como se usa en el presente documento, es la medida de la capacidad que tiene el análogo peptídico de OXM para activar el GLP-1R o el GcgR en un ensayo basado en células. La potencia *in vitro* se expresa como la "CE₅₀", que es la concentración eficaz de compuesto que da como resultado la mitad del aumento máximo en la respuesta medida (en este caso, en la producción de AMP cíclico) en un experimento de dosis-respuesta.

El término "semivida plasmática" se refiere al tiempo necesario para que la mitad de las moléculas relevantes se eliminen del plasma. Un término alternativo que se usa es "semivida de eliminación". Los términos "extendido" o "más largo", que se usa en el contexto de la semivida en plasma o de la semivida de eliminación, indican que hay un aumento significativo en la semivida de un análogo peptídico de OXM pegilado, en relación a la de la molécula de referencia (por ejemplo, la forma no pegilada del péptido o del péptido nativo) como se determina bajo condiciones comparables. La semivida de la OXM nativa en monos, por ejemplo, se espera que sea de menos de 1 hora. Los análogos peptídicos de OXM pegilados de la presente invención tienen una semivida de eliminación de al menos 24 horas en monos, y preferentemente de al menos 48 horas. La semivida que se informa en el presente documento es la semivida de eliminación, que corresponde a la tasa log-lineal terminal de eliminación. La persona experta en la materia apreciará que la semivida es un parámetro derivado que cambia como una función tanto del aclaramiento como del volumen de distribución.

El término "agonista de acción prolongada de GLP-1R", como se usa en el presente documento, se refiere a un análogo peptídico de GLP-1 unido covalentemente a una o más moléculas de polietilenglicol (PEG). En la Patente de los Estados Unidos 7.557.183 se desvelan compuestos pegilados de GLP-1.

Aclaramiento es la medida de la capacidad del cuerpo para eliminar un fármaco de la circulación. A medida que el aclaramiento disminuye debido, por ejemplo, a las modificaciones de un fármaco, sería de esperar que la semivida aumentara. Sin embargo, esta relación recíproca solamente es exacta cuando no hay ningún cambio en el volumen de distribución. Una relación aproximada útil entre la semivida log-lineal terminal ($t_{1/2}$), aclaramiento (C), y el volumen de distribución (V), viene dada por la ecuación: $t_{1/2} \sim 0,693 (V/C)$. El aclaramiento, no indica cuánto fármaco se está eliminando, sino el volumen de fluido biológico, tal como la sangre o el plasma, que tendría que estar completamente liberado de fármaco para suponer la eliminación. El aclaramiento se expresa como volumen por unidad de tiempo. Los análogos peptídicos de OXM pegilados de la presente invención preferentemente tienen un valor de aclaramiento de 200 ml/h/kg o menos en monos, más preferentemente de 180, 150, 120, 100, 80, 60 ml/h/kg o menos, y más preferentemente de 50, 40 o 20 ml/h/kg o menos.

Los análogos peptídicos de OXM de la presente invención se administrarán normalmente por vía parenteral. La administración parenteral incluye, por ejemplo, la administración sistémica, tal como por inyección intramuscular, intravenosa, subcutánea, intradérmica o intraperitoneal. El análogo peptídico se administra al sujeto conjuntamente con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, como parte de una composición farmacéutica para el tratamiento de la diabetes mellitus no dependiente de insulina (tipo 2), NIDDM, o los trastornos relacionados que se analizan a continuación. La composición farmacéutica puede ser una solución o una suspensión del análogo peptídico de OXM, tal como una en la que el análogo peptídico de OXM forma complejos con un catión metálico divalente tal como el zinc. El análogo peptídico también puede formularse en una formulación sólida, tal como por liofilización o secado por pulverización, que se reconstituye después en una solución diluyente adecuada antes de administrarse. Los vehículos farmacéuticos adecuados pueden contener ingredientes inertes que no interaccionan con el péptido o con el derivado del péptido. Los vehículos farmacéuticos adecuados para la administración parenteral incluyen, por ejemplo, agua estéril, solución salina fisiológica, solución salina bacteriostática (solución salina que contiene alcohol bencílico aproximadamente al 0,9 % mg/ml), solución salina tamponada con fosfato, solución de Hank, lactato de Ringer y similares. Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, trehalosa, sorbitol y manitol, y conservantes tales como fenol y m-cresol.

Se pueden emplear técnicas de formulación farmacéutica convencionales tales como las que se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, Easton, PA). Los análogos peptídicos de OXM de la presente invención pueden formularse, como alternativa, para la administración por vía bucal, oral, transdérmica, nasal o pulmonar. Los análogos peptídicos de OXM de la invención pueden formularse para la liberación prolongada, de manera que los niveles de plasma en sangre se mantengan en el intervalo eficaz durante periodos de tiempo prolongados después de la administración.

Los análogos peptídicos de OXM de la presente invención se pueden emplear para tratar la diabetes, específicamente la diabetes de tipo 2 (diabetes mellitus no dependiente de insulina o NIDDM). Los sujetos adicionales que se pueden beneficiar del tratamiento con análogos peptídicos de OXM de la presente invención incluyen los que tienen alteración de la tolerancia a la glucosa o alteración de la glucosa en ayunas, sujetos cuyo peso corporal está por encima del peso corporal normal para la estatura y constitución corporal en aproximadamente un 25 % o más, sujetos que tienen uno o más progenitores con NIDDM, sujetos que han tenido diabetes gestacional, y sujetos con trastornos metabólicos como los derivados de una secreción de insulina endógena disminuida. El análogo peptídico de OXM se puede usar para prevenir que sujetos con una alteración de la tolerancia a la glucosa desarrollen una diabetes de tipo 2, prevenir el deterioro de las células β pancreáticas, inducir la proliferación de

células β , mejorar la función de las células β , activar las células β latentes, promover la diferenciación de las células en células β , estimular la replicación de las células β , e inhibir la apoptosis de las células β . Otras de las enfermedades y condiciones que pueden tratarse o prevenirse usando compuestos de la invención en procedimientos de la invención incluyen: diabetes juvenil de inicio en la madurez (MODY) (Herman, y col. Diabetes 43:40, 1994); diabetes autoinmune latente del adulto (DALA) (Zimmet, y col. Diabetes Med. 11:299, 1994); alteración de la tolerancia a la glucosa (ATG) (Expert Committee on Classification of Diabetes Mellitus, Diabetes Care 22 (Supp. 1):S5, 1999); alteración de la glucosa en ayunas (AGA) (Charles, y col. Diabetes 40:796, 1991); diabetes gestacional (Metzger, Diabetes, 40:197, 1991); síndrome metabólico X, dislipidemia, hiperglucemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, y resistencia a la insulina.

Los análogos peptídicos de OXM de la invención pueden también usarse en procedimientos de la invención para tratar causas secundarias de la diabetes (Expert Committee on Classification of Diabetes Mellitus, Diabetes Care 22 (Supp. 1):S5, 1999). Tales causas secundarias incluyen exceso de glucocorticoides, exceso de hormona del crecimiento, feocromocitoma, y diabetes inducida por fármacos. Los medicamentos que pueden inducir diabetes incluyen, pero no están limitados a, pirimilil, ácido nicotínico, glucocorticoides, fenitoína, hormona tiroidea, agentes β adrenérgicos, α -interferón y fármacos usados para tratar la infección por VIH.

Los análogos peptídicos de OXM de la presente invención pueden ser efectivos en la supresión de la ingesta de alimentos y en el tratamiento de la obesidad.

Una "cantidad eficaz" de un análogo peptídico de OXM es la cantidad que produce un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado sin causar efectos secundarios inaceptables, cuando se administra a un sujeto. Un "efecto terapéutico deseado" incluye uno o más de los siguientes: 1) una mejora del síntoma o de los síntomas asociados con la enfermedad o la condición; 2) un retraso en la aparición de los síntomas asociados con la enfermedad o condición; 3) un aumento de la longevidad en comparación con la ausencia del tratamiento; y 4) una mayor calidad de vida en comparación con la ausencia del tratamiento. Por ejemplo, una "cantidad eficaz" de un análogo peptídico de OXM para el tratamiento de NIDDM es la cantidad que daría lugar a un mayor control de la concentración de glucosa en sangre que en ausencia del tratamiento, produciendo de este modo un retraso en la aparición de complicaciones diabéticas tales como retinopatía, neuropatía o enfermedad renal. Una "cantidad eficaz" de un análogo peptídico de OXM para la prevención del NIDDM, por ejemplo en sujetos con alteración de la tolerancia a la glucosa o con alteración de la glucosa en ayunas, es la cantidad que retrasaría, en comparación con la ausencia de tratamiento, la aparición de niveles de glucosa en sangre elevados que requieren tratamiento con fármacos antihiper glucémicos, tales como las sulfonilureas, las tiazolidinodionas, la insulina y/o las bisguanidinas.

Una "cantidad efectiva" de un análogo peptídico de OXM que se administra a un sujeto también dependerá del tipo y de la gravedad de la enfermedad y de las características del sujeto, tal como la salud general, edad, sexo, peso corporal y tolerancia a los fármacos. La dosis de análogo peptídico de OXM eficaz para normalizar la glucosa en sangre de un sujeto dependerá de varios factores entre los que se incluyen, sin limitación, el sexo del sujeto, el peso y la edad, la gravedad de la incapacidad para regular la glucosa en sangre, la vía de administración y la biodisponibilidad, el perfil farmacocinético del péptido, la potencia, y la formulación.

Una típica dosis semanal para los análogos peptídicos de OXM pegilados de la presente invención preferentemente variará de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 1000 mg (peso total del conjugado). Más preferentemente, la dosis semanal variará de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 100 mg, o de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 30 mg. Aún más preferentemente, la dosis semanal variará de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 30 mg, o de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 5 mg.

Un "sujeto" es un mamífero, preferentemente un ser humano, pero también puede ser un animal, incluyendo a los 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).

Varias características y realizaciones preferentes de la presente invención, se describirán ahora sólo a modo de ejemplos.

55 **Ejemplo 1: Síntesis del péptido**

El análogo peptídico de acuerdo con la SEC ID N^o: 1 y la SEC ID N^o: 2 de la presente invención se genera mediante síntesis de péptidos en fase sólida en un sintetizador de péptidos automático Protein Technologies Inc. Symphony o Applied Biosystems 433A. La síntesis se realiza sobre resina de poliestireno amida Fmoc-Rink (Rapp Polymere Tubingen, Alemania) con la sustitución de aproximadamente 0,7 mmol/g. La síntesis se realiza usando la estrategia de grupo protector de cadena principal Fmoc. Los derivados de la cadena lateral de aminoácidos que se usan 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 dimetilfomamida (DMF) o N-metil pirrolidinona (NMP). El acoplamiento se lleva a cabo durante 45 a 90 minutos a temperatura ambiente.

La escisión correspondiente de la resina y la eliminación del grupo protector de la cadena lateral se llevan a cabo en una solución que contiene ácido trifluoroacético (TFA): triisopropilsilano: 3,6-dioxa-octano-1,8-diol: metanol: anisol 90:4:2:2:2 (v/v) durante 1,5 horas a 2 horas a temperatura ambiente. La solución se filtra y se concentra a < 2 ml, y los péptidos se precipitan con éter dietílico frío, se redisuelven en 30-40 ml de acetonitrilo al 10 % y se purifican sobre una columna de cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa C₁₈ (HPLC) (típicamente un Waters SymmetryPrep de 7 µm, 19 x 300 mm) a una velocidad de flujo de 12-15 ml/min. Las muestras se eluyen con un gradiente AB lineal en dos etapas de 0 a 25 % de B durante 20 minutos, seguido de 25 a 75 % de B durante 100 minutos, donde A = 0,05 % de TFA/agua y B = 0,05 % de TFA/acetonitrilo. El producto generalmente se eluye en acetonitrilo al 30-35 %. La pureza del péptido y el peso molecular se confirman con un sistema de cromatografía líquida-espectrometría de masas (CL-EM) Agilent 1100 Series con un único detector de EM simple cuadrupolo. La separación analítica de HPLC se realiza en un Zorbax Eclipse XDB-C8, de 5 micrómetros, con una columna de 4,6 mm d.i. x 15 cm, con un gradiente lineal AB del 6 al 60 % de B durante 15 minutos en el que A = TFA al 0,05 %/H₂O and B = TFA al 0,05 %/acetonitrilo y el caudal es de 1 ml/min. El análogo peptídico se purifica a > 95 % de pureza y se confirma que tiene un peso molecular correspondiente al valor calculado dentro de 1 unidad de masa atómica (amu).

Ejemplo 2: Pegilación del péptido que contiene dos restos de Cys con mPEG-MAL-20kDa.

El análogo peptídico liofilizado (SEC ID N^o: 2) generado de acuerdo con el ejemplo 1 se pesa (típicamente de 30-50 mg). Se pesa un equivalente molar de 2,1 veces de mPEG-maleimida de 20kDa (CH₃O(CH₂CH₂O)_n-(CH₂)₃NHCO(CH₂)₂-maleimida) (NOF Sunbright ME-200MA) y se combina con el péptido. Los reactivos se disuelven en una mezcla de agua/acetonitrilo de 50/50 (v/v) a una concentración del péptido de aproximadamente 20 mg/ml. La solución del análogo peptídico se diluye dos veces con acetato de amonio 100 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 10 mM, pH 7. La mezcla resultante se agita a continuación a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se controla mediante HPLC de fase inversa analítica (la separación de HPLC analítica se hace sobre una columna Waters Symmetry Shield C18, de 3,5 micrómetros, 4,6 mm d.i. x 10 cm a 50 °C con un gradiente lineal de AB en dos etapas de 0 a 30% de B durante 5 minutos y de 30 a 90 % de B durante los 30 minutos posteriores en los cuales A = TFA al 0,05 %/H₂O and B = TFA al 0,05 %/acetonitrilo y la velocidad de flujo es de 1 ml/min), y típicamente después de 1-2 horas de tiempo de reacción, muestra desaparición casi completa del pico de péptido. Aparecen dos picos debido al péptido mono- y di-pegilado, constituyendo típicamente el péptido di-pegilado el 90-95 % del área total de picos. La muestra se diluye a continuación hasta aproximadamente 20 ml con agua y se purifica como en el Ejemplo 1, con un gradiente lineal AB en dos etapas de 0 a 30 % de B durante 20 minutos, seguido de 30 a 80 % de B durante 100 minutos. El producto generalmente se eluye en 35-40 % de acetonitrilo. El péptido purificado se cuantifica mediante la absorción ultravioleta (UV) a 280 nm usando un coeficiente de extinción molar calculado, en base a la secuencia del péptido. El rendimiento después de la purificación está en el intervalo de 70 a 80 %, en base a la cantidad del péptido de partida.

Ejemplo 3: Ensayo de unión al receptor de glucagón (hGcgR)

El ensayo de unión al receptor de glucagón utiliza receptores de glucagón clonados de seres humanos (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)), aislados a partir de membranas de 293HEK. El ADNc de hGlucR se subclona en el plásmido de expresión pH_D (expresión transactivada de una proteína C humana recombinante completamente gamma-carboxilada, un factor antitrombótico. Grinnell, B.W., Berg, D.T., Walls, J. and Yan, S.B. Bio/Technology 5: 1189-1192 (1987)). Este ADN de plásmido se transfeció dentro de células 293HEK con 200 µg/ml de higromicina.

Las membranas plasmáticas brutas se preparan usando células procedentes de un cultivo en suspensión. Las células se lisan en hielo en tampón hipotónico que contiene Tris HCl 25 mM, pH 7,5, MgCl₂ 1 mM, ADNasa 1, 20 µg/ml, e inhibidores completos de Roche sin EDTA. La suspensión celular se homogeneiza con un homogeneizador Dounce de vidrio, usando una mano de mortero de teflón durante 25 golpes. Se centrifuga el homogeneizado a 4 °C a 1800 x g durante 15 minutos. El sobrenadante se recoge y el sedimento se resuspende en tampón hipotónico y se vuelve a homogeneizar. La mezcla se centrifuga a 1800 x g durante 15 minutos. El segundo sobrenadante se combina con el primer sobrenadante. Los sobrenadantes combinados se centrifugan a 1800 x g durante 15 minutos para aclarar. El sobrenadante clarificado se transfiere a tubos de alta velocidad y se centrifuga a 25000 x g durante 30 minutos a 4 °C. El sedimento de membrana se resuspende en un tampón de homogeneización y se almacena como alícuotas congeladas en un congelador a - 80 °C hasta su uso.

El glucagón se radioyoda mediante el procedimiento de ¹²⁵I-lactoperoxidasa y se purifica mediante HPLC de fase inversa en Perkin-Elmer/NEN (NEX207). La actividad específica es aproximadamente de 2200 Ci/mmol. La determinación de K_D se realiza mediante competición homóloga, en lugar de mediante unión por saturación, debido al alto contenido de propanol en el material de glucagón marcado con ¹²⁵I. Se estima que la K_D es de 2,62 nM y se usa para calcular valores de K_i para todos los compuestos ensayados.

El ensayo de unión al receptor se lleva a cabo usando un ensayo de proximidad de centelleo (SPA) con perlas de aglutinina de germen de trigo (WGA) previamente bloqueadas con albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos (BSA) al 1%. El tampón de unión contiene ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetasulfónico (HEPES) 25 mM, pH 7,4,

CaCl₂ 2,5 mM, MgCl₂ 1 mM, BSA libre de ácidos grasos al 0,1 %, Tween20 al 0,003 %, e inhibidores completos de Roche sin EDTA. El glucagón se disuelve en HCl 0,01 N a 1 mg/ml y se congela inmediatamente a -80 °C en alícuotas de 30 µl. Las alícuotas de glucagón se diluyen y se usan en el ensayo de unión en el plazo de 1 hora. El análogo peptídico de OXM se disuelve en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se diluye en serie en tampón de unión. A continuación se añaden 10 µl de compuestos diluidos o se transfiere PBS dentro de placas de ensayo con fondo transparente Coming 3632, que contienen 40 µl de tampón de unión de ensayo o glucagón frío (unión no específica (NBS) a una concentración final 1 µM). A continuación, se añaden 90 µl de membranas (3 mg/pocillo), 50 µl de ¹²⁵I-Glucagón (concentración final de la reacción 0,15 nM), y 50 µl de perlas de WGA (150 µg/pocillo). Las placas se sellan, se mezclan dándolas la vuelta, y se leen con un contador de centello MicroBeta después de un tiempo de sedimentación de 12 h a temperatura ambiente.

Los resultados se calculan como un porcentaje de la unión específica del ¹²⁵I-glucagón en presencia del compuesto. La concentración CI₅₀ del compuesto se obtiene mediante regresión no-lineal del porcentaje de unión específica de ¹²⁵I-glucagón frente a la concentración de compuesto añadido. La dosis de CI₅₀ se convierte en Ki usando la ecuación de Cheng-Prusoff (Cheng Y., Prusoff W. H., Biochem. Pharmacol. 22, 3099-3108, 1973). La Ki del análogo peptídico de OXM de la SEC ID N°: 3 en el que la Cys (PEG 20k) en la posición 39 está amidada fue de 5500 ± 350 nM para la unión de hGcGR.

Ejemplo 4: Ensayo de unión al receptor del péptido 1 similar al glucagón (hGLP-1-R)

El ensayo de unión al receptor de GLP-1, usa el receptor del péptido 1 similar al glucagón humano (hGLP-1R) clonado (Graziano MP, Hey PJ, Borkowski D, Chicchi GG, Strader CD, Biochem Biophys Res Commun. 1993 Oct 15;196(1):141-6) aislado de membranas 293HEK. El ADNc del hGLP-1R se subclona en el plásmido de expresión pHD (expresión transactivada de una proteína C humana recombinante completamente gamma-carboxilada, un factor antitrombótico. Grinnell, B.W., Berg, D.T., Walls, J. and Yan, S.B. Bio/Technology 5: 1189-1192 (1987)). Este ADN de plásmido se transfecta en células 293HEK y se selecciona con 200 µg/ml de higromicina.

Las membranas plasmáticas brutas se preparan usando células procedentes de cultivo en suspensión. Las células se lisan en hielo en tampón hipotónico que contiene Tris HCl 25 mM, pH 7,5, MgCl₂ 1 mM, ADNasa 1, 20 µg/ml, e inhibidores completos de Roche sin EDTA. La suspensión celular se homogeneiza con un homogeneizador Dounce de vidrio, usando una mano de mortero de teflón durante 25 golpes. Se centrifuga el homogeneizado a 4 °C a 1800 x g durante 15 minutos. El sobrenadante se recoge y el sedimento se resuspende en tampón hipotónico y se vuelve a homogeneizar. La mezcla se centrifuga a 1800 x g durante 15 minutos. El segundo sobrenadante se combina con el primer sobrenadante. Los sobrenadantes combinados se centrifugan a 1800 x g durante 15 minutos para aclarar. El sobrenadante clarificado se transfiere a tubos de alta velocidad y se centrifuga a 25000 x g durante 30 minutos a 4 °C. El sedimento de membrana se resuspende en un tampón de homogeneización y se almacena como alícuotas congeladas a -80 °C, hasta su uso.

El péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) se radioyoda mediante el procedimiento de ¹²⁵I-lactoperoxidasa y se purifica mediante HPLC de fase inversa en Perkin-Elmer/NEN (NEX308). La actividad específica es aproximadamente 2200 Ci/mmol. La determinación de K_D se realiza mediante competición homóloga, en lugar de mediante unión de saturación, debido al alto contenido de propanol en el material de ¹²⁵I-GLP-1. Se estima que la K_D es de 0,96 nM y se usa para calcular valores de Ki para todos los compuestos ensayados.

El ensayo de unión al receptor se lleva a cabo usando un ensayo de proximidad de centelleo (SPA) con perlas de aglutinina de germen de trigo (WGA) previamente bloqueadas con BSA libre de ácidos grasos al 1 % (ICN). El tampón de unión contiene HEPES 25 mM, pH 7,4, CaCl₂ 2,5 mM, MgCl₂ 1 mM, BSA libre de ácidos grasos al 1 %, Tween20 al 0,003 %, e inhibidores completos de Roche sin EDTA. El GLP-1 se disuelve en PBS a 1 mg/ml y se congela inmediatamente a -80 °C en alícuotas de 30 µl. Las alícuotas de GLP-1 se diluyen y se usan en ensayos de unión en el plazo de 1 hora. El análogo peptídico de OXM se disuelve en PBS y se diluye en serie en tampón de unión. A continuación se añaden 10 µl de compuestos diluidos o se transfiere PBS dentro de placas de ensayo con fondo transparente Coming 3632 que contienen 40 µl de tampón de unión de ensayo o GLP-1 frío (NBS a una concentración final 1 µM). A continuación, se añaden 90 µl de membranas (1 µg/pocillo), 50 µl de ¹²⁵I-GLP-1 (concentración final de la reacción 0,15 nM), y 50 µl de perlas de WGA (150 µg/pocillo). Las placas se sellan, se mezclan dándolas la vuelta, y se leen con un contador de centello MicroBeta después de un tiempo de sedimentación de 12 h a temperatura ambiente.

Los resultados se calculan como un porcentaje de la unión a ¹²⁵-GLP-1 específica en la presencia del compuesto. La concentración CI₅₀ del compuesto se obtiene mediante regresión no lineal del porcentaje de unión específica de ¹²⁵I-GLP-1 frente a la concentración del compuesto añadido. La concentración CI₅₀ se convierte en Ki usando la ecuación de Cheng-Prusoff (Cheng Y., Prusoff W. H., Biochem. Pharmacol. 22, 3099-3108, 1973). La Ki del análogo peptídico de OXM de la SEC ID N°: 3 en el que la Cys (PEG 20k) de la posición 39 está amidada fue de 1540 ± 158 nM para la unión a hGLP-1R.

Ejemplo 5: Ensayo funcional de AMPc estimulado por el receptor de glucagón.

El ensayo funcional de AMPc estimulado por glucagón usa la misma línea celular que expresa el hGcgR clonado que el usado para el ensayo de unión a hGcgR descrito anteriormente en el Ejemplo 3. Las células se estimulan con el análogo peptídico de OXM, y el AMPc generado dentro de la célula se cuantifica usando un ensayo homogéneo de proximidad luminiscente amplificado (Alpha Screen) de Perkin Elmer (6760625R). En resumen, el AMPc inducido dentro de la célula compite por la unión del AMPc biotinilado del kit a una perla aceptora de anticuerpos anti-AMPc recubierta y una perla donante recubierta con estreptavidina. Según aumenta el nivel de AMPc dentro de la célula, ocurre una interrupción del complejo de perla aceptora-AMPc biotinilado-perla donante, y disminuye la señal que se observa.

Las células hGcgR-HEK293 se cosechan a partir de placas de cultivo de tejido sub-confluyente con una solución de disociación de células libres de enzimas, (Specialty Media 5-004-B). Las células se sedimentan a baja velocidad y se lavan 3 veces con tampón de ensayo [HEPES 25 mM en solución salina tamponada de Hank (HBSS)-con Mg y Ca (GIBCO, 14025-092) con BSA libre de ácidos grasos al 0,1 %] y después se diluyen a una concentración final de 125.000 células por ml. Se añade AMPc biotinilado a partir del kit Alpha Screen a las células diluidas a la 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 a una concentración final de 500 uM. El glucagón se disuelve inicialmente en HCl 0,01 N a 1 mg/ml y se congela inmediatamente a -80 °C. Tras la descongelación, el glucagón se debe utilizar en el plazo de 1 hora. El glucagón, el patrón de AMPc y el análogo peptídico de OXM se diluyen en serie en un tampón de ensayo a una concentración final de 6X. El ensayo funcional se realiza en Placas Costar (3688) de poliestireno, de 96 pocillos, de bajo volumen, blanca. La reacción se inicia mediante la adición de 0,01 ml del análogo peptídico de OXM diluido, glucagón o AMPc en 0,04 ml de la mezcla de células. Después de una hora a temperatura ambiente, la reacción se detiene mediante la adición de 0,03 ml de tampón de lisis [HEPES 10 mM, pH 7,4, 1% de NP40, y 0,01% de BSA libre de ácidos grasos que contiene 1 unidad por cada / 0,03 ml de perlasceptoras y donantes del Kit Alpha Screen]. La adición del tampón de lisis se lleva a cabo en la oscuridad para evitar la decoloración de las perlas de detección. Las placas se envuelven en papel de aluminio, se agitan suavemente durante 1 minuto y luego se dejan equilibrar durante la noche a temperatura ambiente. Las placas se leen en un instrumento Perkin-Elmer Envision. Las unidades Alpha Screen se convierten en pmoles de AMPc generados por pocillo, basándose en la curva patrón de AMPc. Los pmoles de AMPc que se generan en cada pocillo se convierten en un porcentaje de la respuesta máxima observada con el control de glucagón. Se obtiene un valor de CE₅₀ por análisis de regresión no lineal, utilizando el porcentaje de respuesta máxima frente a la concentración de péptido añadido. El análogo peptídico de OXM de la SEC ID N^o: 3 en el que la Cys (PEG20K) en la posición 39 está amidada, como en la OXM de tipo silvestre, fue totalmente eficaz y potente en hGcgR con una CE₅₀ de 60,0 ± 2,97 nM.

Ejemplo 6: Ensayo funcional de AMPc estimulado por el receptor de péptido 1 similar al glucagón (hGLP-1)

El ensayo funcional de AMPc estimulado por GLP-1 usa la misma línea celular que expresa hGLP-1R clonado que se usó para el ensayo de unión a hGLP-1 R descrito anteriormente en el Ejemplo 4. Las células se estimulan con el análogo peptídico de OXM y el AMPc generado dentro de la célula se cuantifica usando el Ensayo Homogéneo de Proximidad Luminiscente Amplificado (Alpha Screen) de Perkin Elmer (6760625R). Brevemente, el AMPc inducido dentro de la célula compite para unirse con el AMPc biotinilado del kit a una perla aceptora con anticuerpo anti-AMPc recubierta y una perla donante recubierta de estreptavidina. Según aumenta el nivel de AMPc dentro de la célula, se produce una interrupción del complejo perla aceptora-AMPc biotinilado-perla donante y disminuye la señal que se observa.

Las células hGcgR-HEK293 se cosechan a partir de placas de cultivo de tejido sub-confluyente con una solución de disociación de células libre de enzimas, (Specialty Media 5-004-B). Las células se sedimentan a baja velocidad 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 al 0,1 %] y después se diluyen a una concentración final de 125.000 células por ml. Se añade AMPc biotinilado procedente del kit Alpha Screen a las células diluidas a la concentración final de 1 unidad/0,04 ml. También se añade un inhibidor de fosfodiesterasa, IBMX (250 mM en DMSO), a las células diluidas a una concentración final de 500 µM. El GLP-1 se almacena a 1 mg/ml en PBS como alícuotas congeladas a -80°C. El GLP-1, el patrón de AMPc y el análogo peptídico de OXM se diluyen en serie en un tampón de ensayo a una concentración final de 6X. El ensayo funcional se realiza en Placas Costar (3688) de poliestireno, de 96 pocillos, de bajo volumen, blancas. La reacción se inicia mediante la adición de 0,01 ml del análogo peptídico de OXM diluido, GLP-1 o AMPc en 0,04 ml de la mezcla de células. Después de una hora a temperatura ambiente, la reacción se detiene mediante la adición de 0,03 ml de tampón de lisis [HEPES 10 mM, pH 7,4, 1% de NP40, y 0,01% de BSA libre de ácidos grasos que contiene 1 unidad por cada / 0,03 ml de perlasceptoras y donantes del Kit Alpha Screen]. La adición del tampón de lisis se lleva a cabo en la oscuridad para evitar la decoloración de las perlas de detección. Las placas se envuelven en papel de aluminio, se agitan suavemente durante 1 minuto y luego se dejan equilibrar durante la noche a temperatura ambiente. Las placas se leen en un instrumento Perkin-Elmer Envision. Las unidades Alpha Screen se convierten en pmoles de AMPc generados por pocillo, basándose en la curva patrón de AMPc. Los pmoles de AMPc que se generan en cada pocillo se convierten en un porcentaje de la respuesta máxima observada con el control de GLP-1. Se obtiene un valor de CE₅₀ por análisis de regresión no lineal,

utilizando el porcentaje de respuesta máxima frente a la concentración de péptido añadido. El análogo peptídico de OXM de la SEC ID N°: 3 en el que la Cys (PEG20K) en la posición 39 está amidada, como en la OXM de tipo silvestre, fue totalmente eficaz y potente en hGLP-1R con una CE₅₀ de 6,58 ± 0,87 nM.

5 Ejemplo 7: Efectos sobre la ingesta de alimento, peso corporal y composición corporal en ratones con obesidad inducida por la dieta (DIO)

10 Se alojan ratones de tres a cuatro meses de edad con obesidad inducida por la dieta (DIO) individualmente en una instalación con temperatura controlada (24 °C) con un ciclo de 12h de luz/oscuridad (la luz se enciende a las 22:00 h), y se les deja acceso libre al alimento y al agua. Después de aclimatarse durante 2 semanas a la instalación, los ratones se asignan al azar a grupos de tratamiento (n= 8-10/grupo), teniendo cada grupo un peso corporal medio y una masa de grasa similares. En los ratones se inyecta por vía subcutánea (sc) una solución de vehículo y se pesan durante 2 días para aclimatarlos a los procedimientos.

15 Se administra vehículo o análogo peptídico de OXM (intervalo de dosis 7,5-30 nmol/kg) disuelto en el vehículo mediante inyección sc a ratones DIO alimentados ad libitum 30-90 minutos antes del inicio del ciclo de oscuridad, cada 3 días, durante 2 semanas (en dos estudios repetidos). Se mide al mismo tiempo el peso corporal y el peso de la comida más del peso de la tolva. La comida que se consume las 24 horas anteriores se calcula restando el peso actual del alimento más el de la tolva del correspondiente al día anterior. Los cambios absolutos en el peso corporal se calculan restando el peso corporal del animal antes de la primera inyección. En los días 1 y 14, se mide la masa de grasa total mediante resonancia magnética nuclear (RMN), utilizando un instrumento del Echo Medical System (Houston, TX). La masa libre de grasa se calcula restando la masa de grasa del peso corporal total.

Estudio 1

25 El análogo peptídico de OXM de la SEC ID N°: 3 en el que la Cys (PEG20k) en la posición 39 está amidada se administra mediante inyección subcutánea a ratones macho con obesidad inducida por la dieta (DIO), de 4 meses de edad. Se inyecta el análogo peptídico una vez cada 3 días durante 2 semanas en dosis de 7,5, 15 y 30 nmol/kg y se comparan con ratones tratados con vehículo y con los animales tratados con control positivo (7,5 nmol/kg de un agonista de GLP-1R de acción prolongada que se inyecta cada 3 días).

35 El tratamiento con el análogo peptídico de OXM de la SEC ID N°: 3 en el que la Cys (PEG20k) en la posición 39 está amidada produjo una reducción dependiente de la dosis en la ingesta de alimentos y del peso corporal. Al final del periodo de estudio de 2 semanas, la ingesta de alimentos acumulada en los grupos de 15 y 30 nmol/kg se redujo en un 21 % y en un 27 %, respectivamente, en comparación con el grupo de vehículo. La pérdida de peso acumulativa del grupo 7,5 nmol/kg fue similar a la observada con el control positivo, que es una reducción de aproximadamente 6% en comparación con el grupo del vehículo. La pérdida de peso acumulativo controlada con vehículo de los grupos 15 y 30 nmol/kg fue de un 10 % y de un 15 % respectivamente. El análisis de la composición corporal mostró que la pérdida de peso fue debida principalmente a la pérdida de masa de grasa (Tabla 1).

40

Tabla 1

Cambio de peso en ratones DIO durante un período de tratamiento de 14 días (media ± SEM; n = 8)			
Dosis del análogo peptídico de OXM de la SEC ID N°: 3 en el que la Cys (PEG20k) en la posición 39 está amidada (nmol/kg)	Pérdida general de peso (g de cambio de peso durante 14 días)	Ingesta total de alimentos (g totales durante 14 días)	Pérdida de masa de grasa (g de cambio de peso de la grasa durante 14 días)
0 (Vehículo)	0,7 ± 0,2	39,6 ± 0,7	0,4 ± 0,2
7,5	-1,7 ± 0,3*	36,5 ± 1,2*	-1,1 ± 0,3*
15	-3,5 ± 0,3*	31,4 ± 0,9*	-2,7 ± 0,2*
30	-5,6 ± 0,4*	29,0 ± 1,3*	-4,0 ± 0,3*

Estudio 2

45 El análogo peptídico de OXM de la SEC ID N°: 3, en el que la Cys (PEG20k) en la posición 39 está amidada (7,5 o 22,5 nmol/kg) y el control positivo (7,5 o 22,5 nmol/kg de un agonista de GLP-1R de acción prolongada) se administran cada 3 día por inyección subcutánea a ratones macho con obesidad inducida por la dieta (DIO) de 4 meses de edad, durante 2 semanas.

50 Todos los grupos tratados mostraron una disminución significativa en la ingesta de alimentos acumulativa en relación a los controles de vehículo. El análogo peptídico de OXM y el control positivo disminuyeron el peso corporal en grados similares, aproximadamente un 5 % y un 10 % para las dosis bajas y altas, respectivamente. El análisis

de la composición corporal confirmó que la pérdida de peso asociada con el análogo peptídico de OXM y el control positivo se debían principalmente a la pérdida de grasa corporal (Tabla 2).

Tabla 2

Cambio de peso en DIO durante un período de tratamiento de 14 días (media \pm SEM; n = 10)			
Dosis del análogo peptídico de OXM de la SEC ID N°: 3 en el que la Cys (PEG20k) en la posición 39 (nmol/kg) está amidada	Pérdida general de peso (g de cambio de peso durante 14 días)	Ingesta total de alimentos (g totales durante 14 días)	Pérdida de masa de grasa (g cambio de peso de la grasa durante 14 días)
0 (Vehículo)	0,1 \pm 0,2	38,8 \pm 0,5	0,0 \pm 0,2
7,5	-2,5 \pm 0,3*	33,3 \pm 0,6*	-1,6 \pm 0,2*
22,5	-5,2 \pm 0,2*	28,7 \pm 0,6*	-3,8 \pm 0,2*

5 Estos datos muestran que el análogo peptídico de OXM de la SEC ID N°: 3 en la que la Cys (PEG20k) en la posición 39 está amidada disminuye la ingesta de alimentos acumulativa y el peso corporal en dos estudios repetidos de 14 días con ratones DIO, en comparación con los ratones tratados con vehículo. La disminución del peso corporal se debió principalmente a la reducción de masa de grasa. * $p < 0,05$ frente al vehículo (prueba de Dunnett).

10 **Ejemplo 8: Efectos sobre la excursión de la glucosa en sangre durante una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal o durante una prueba de tolerancia a la glucosa oral después de 2 semanas de tratamiento en ratones DIO.**

15 Cincuenta y seis horas después de la quinta inyección, como se describe en el Ejemplo 7 en ratones DIO, los ratones se dejan en ayunas durante 16 horas antes del comienzo de la prueba de tolerancia a la glucosa. En el tiempo 0, se les da a los animales 2 g/kg de dextrosa por sonda oral (Tabla 3, Estudio 1) o por inyección intraperitoneal (IP) (Tabla 4, Estudio 2). Se recoge sangre mediante el sangrado de la vena de la cola en los minutos 0, 15, 30, 60 y 120, después de exposición a la glucosa. La concentración de glucosa se mide mediante un glucómetro. Todas las dosis del análogo peptídico de OXM de la SEC ID N°: 3 en la que la Cys (PEG20k) en la posición 39 está amidada, así como el control positivo, redujeron significativamente la glucosa en sangre en todos los puntos de tiempo medidos antes y después de la exposición a la glucosa oral en comparación con los controles tratados con vehículo.

Tabla 3

Efectos del análogo peptídico de OXM de SEC ID N°: 3 en el que la Cys (PEG20k) en la posición 39 está amidada en la excursión de glucosa en sangre, tras la administración de una carga oral de glucosa. Datos dados como el área bajo la curva de glucosa (= valores integrados a partir de t + 0 a 120 min) (n = 7)		
Dosis del análogo peptídico de OXM de SEC ID N°: 3 en el que la Cys (PEG20k) en la posición 39 está amidada (nmol/kg)	AUC de glucosa (mg*min/dl)	
	MEDIA	SEM
0 (Vehículo)	24786	1127
7,5	13802*	264
15	12668*	209
30	13056*	293

25 Estos datos muestran que el análogo peptídico de SEC ID N°: 3 en el que la Cys (PEG20k) en la posición 39 está amidada disminuyó significativamente la excursión de glucosa en sangre tras la administración de una carga oral de glucosa. El significado estadístico se evaluó, mediante la prueba de Dunnett. (* $p < 0,05$ frente al vehículo)

Tabla 4

Efectos del análogo peptídico de OXM en el que la Cys (PEG20k) en la posición 39 está amidada en la excursión de glucosa en sangre tras la administración de una carga de glucosa intraperitoneal (ip) Datos dados como el área bajo la curva de glucosa (= valores integrados a partir de t + 0 a 120 min) (n = 6)		
Dosis del análogo peptídico de OXM de SEC ID N°: 3 en el que la Cys (PEG20k) en la posición 39 está amidada (nmol/kg)	AUC de glucosa (mg*min/dl)	
	MEDIA	SEM
0 (Vehículo)	32148	894
7,5	19198*	2521
22,5	15720*	1054

Estos datos muestran que el análogo peptídico de OXM de la SEC ID N°: 3 en el que la Cys (PEG20k) en la posición 39 está amidada redujo significativamente la excursión de glucosa en sangre tras la administración de una carga de glucosa intraperitoneal (ip). El significado estadístico se evaluó mediante la prueba de Dunnett. (* p<0,05 frente al vehículo)

Ejemplo 9: Efectos sobre la excursión de glucosa en sangre durante una prueba de tolerancia a la glucosa por vía intraperitoneal en ratones delgados.

Se usaron para el estudio ratones machos de nueve semanas C57BL/6. Los animales se asignaron al azar en grupos basándose en el peso corporal postprandial. Se inyectó a los animales vehículo o análogo peptídico de OXM (dosis 5,0 – 15,0 nmol/kg) 16 horas antes del comienzo de la prueba. La comida se retira en el momento de la inyección del péptido o del vehículo. En el tiempo 0, se les da a los animales 2 g/kg de dextrosa mediante una inyección IP. Se recoge la sangre mediante sangrado de la vena de la cola, 0, 3, 6, 12, y 30 minutos después de la exposición a la glucosa. La concentración de la glucosa se mide por un glucómetro. La insulina se mide por mesoescala.

Ambas dosis del análogo peptídico de OXM de SEC ID N°: 3 en el que la Cys (PEG20k) en la posición 39 está amidada redujeron significativamente la excursión de glucosa en sangre (Tabla 5) y aumentaron significativamente las concentraciones de insulina en plasma (Tabla 6) en comparación con los controles tratados con vehículo.

Tabla 5

Efectos del análogo peptídico de OXM de la SEC ID N°: 3 en el que la Cys (PEG20k) en la posición 39 está amidada en la excursión de glucosa en sangre tras la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (ip) en ratones delgados Datos dados como el área bajo la curva de glucosa (= valores integrados a partir de t + 0 a 30 min) (n = 6)		
Dosis del análogo peptídico de OXM de SEC ID N°: 3 en el que la Cys (PEG20k) en la posición 39 está amidada (nmol/kg)	AUC de glucosa (mg*min/dl)	
	MEDIA	SEM
Vehículo	9816	532
5	6287*	720
15	6881*	331

Estos datos muestran que el análogo peptídico de SEC ID N°: 3 en el que la Cys (PEG20k) en la posición 39 está amidada disminuyó significativamente la excursión de glucosa en sangre tras una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (ip) en ratones delgados. El significado estadístico se evaluó mediante la prueba de Dunnett. (* p<0,05 frente al vehículo)

Tabla 6

Efectos del análogo peptídico de OXM de la SEC ID N°: 3 en el que la Cys (PEG20k) en la posición 39 está amidada en concentración de insulina en plasma tras la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (ip) en ratones delgados		
Datos dados como el área bajo la curva de insulina (= valores de insulina en plasma integrados a partir de t + 0 a 30 min) (n = 6)		
Dosis del análogo peptídico de OXM de SEC ID N°: 3 en el que la Cys (PEG20k) en la posición 39 está amidada (nmol/kg)	AUC de glucosa (mg*min/dl)	
	MEDIA	SEM
0 (Vehículo)	9,44	0,80
5	33,29*	5,88
15	58,32*	8,86

5 Estos datos muestran que el análogo peptídico de OXM de SEC ID N°: 3 en el que la Cys (PEG20k) en la posición 39 está amidada, aumentó significativamente el valor de AUC de la insulina en plasma tras una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (ip) en ratones delgados. Significado estadístico evaluado mediante la prueba de Dunnett. (* p<0,05 frente al vehículo).

Ejemplo 10: Efectos en la excursión de glucosa en sangre durante una prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT) o una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (ip) (IPGTT) en ratones obesos (ob/ob)

10 Se alojan ratones machos ob/ob de dos a tres meses de edad individualmente en una instalación con temperatura controlada (24 °C) con un ciclo de 12 h de luz/oscuridad (la luz se enciende a las 22:00 horas), y se les deja acceso libre al alimentos y al agua. Después de aclimatarse durante al menos 2 semanas a la instalación, se mide la glucosa en sangre tras tres horas en ayunas mediante sangrado de la vena de la cola a las 9:00 AM. Los ratones con un nivel de glucosa en sangre por debajo de los 180 mg/dl no se usan. El resto de los animales se asignan al azar a grupos de tratamiento (N = 7/grupo), teniendo cada grupo un nivel medio similar de glucosa en sangre. A los ratones se les da acceso al alimento hasta el momento de la inyección. En los animales se inyecta vehículo, 7,5 nmol/kg o 15 nmol/kg de análogo peptídico de OXM a las 16:00 h del mismo día. La comida se retira en el momento de la inyección. Se realiza una OGTT (Tabla 7) o una IPGTT (Tabla 8) 16 horas después de la inyección del péptido. En el tiempo 0, se les da a los animales 2 g/kg de dextrosa por sonda oral (Tabla 7) o mediante inyección intraperitoneal (tabla 8). Se recoge la sangre mediante sangrado de la vena de la cola en los minutos 0, 15, 30, 60 y 120 después de la exposición a la glucosa. La concentración de glucosa se mide con un glucómetro. Una sola inyección del análogo peptídico de SEC ID N°: 3 en el que la Cys (PEG20k) en la posición 39 está amidada normalizó la glucosa en sangre en los ratones ob/ob. Los niveles de glucosa en todos los puntos de tiempo medidos después de la exposición de glucosa fueron significativamente más bajos que en el grupo control con vehículo.

Tabla 7

Efectos del análogo peptídico de OXM en el que la Cys (PEG20k) en la posición 39 está amidada en la excursión de glucosa en sangre tras la prueba de tolerancia a la glucosa oral en ratones ob/ob		
Datos dados como el área bajo la curva de glucosa (= valores integrados a partir de t + 0 a 120 min) (n = 7)		
Dosis del análogo peptídico de OXM de SEC ID N°: 3 en el que la Cys (PEG20k) en la posición 39 está amidada (nmol/kg)	AUC de glucosa (mg*min/dl)	
	MEDIA	SEM
0 (Vehículo)	32885	5341
7,5	12103*	1864
15	14837*	2322

25 Los datos muestran que el análogo peptídico de OXM de la SEC ID N°: 3, en el que la Cys (PEG20k) en la posición 39 está amidada, redujo significativamente la excursión de glucosa en sangre tras la prueba de tolerancia a la glucosa oral en ratones ob/ob. El significado estadístico se evaluó mediante la prueba de Dunnett. (* p<0,05 frente al vehículo)

30

Tabla 8

Efectos del análogo peptídico de OXM de SEC ID N°: 3 en el que la Cys (PEG20k) en la posición 39 está amidada, en la excursión de glucosa en sangre tras la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (ip) en ratones ob/ob Datos dados como el área bajo la curva de glucosa (= valores integrados a partir de t + 0 a 120 min) (n =7)		
Dosis del análogo peptídico de OXM de SEC ID N°: 3 en el que la Cys (PEG20k) en la posición 39 está amidada (nmol/kg)	AUC de glucosa (mg*min/dl)	
	MEDIA	SEM
0 (Vehículo)	37894	1482
7,5	16944*	1821

Estos datos muestran que el análogo peptídico de OXM de la SEC ID N°: 3, en el que la Cys (PEG20k) en la posición 39 está amidada, redujo significativamente la excursión de glucosa en sangre tras la prueba de la tolerancia a la glucosa intraperitoneal (ip) en ratones ob/ob. El significado estadístico se evaluó mediante la prueba de Dunnett. (* p<0,05 frente al vehículo)

Ejemplo 11: Efectos agudos en la glucosa en plasma, niveles de triglicéridos, y expresión génica hepática en ratones macho C57BL/6 con obesidad inducida por la dieta

Para poder investigar las rutas metabólicas que se modulan mediante el tratamiento con el análogo peptídico de OXM de la SEC ID N°: 3 en el que la Cys (PEG20k) en la posición 39 está amidada independientemente de los cambios debidos a la pérdida de peso, el análogo peptídico de OXM y un control positivo (un agonista de GLP-1R de acción prolongada) se administran mediante inyección subcutánea a ratones macho con obesidad inducida por la dieta (DIO) de 3 meses de edad. El día antes del estudio, los ratones se asignan al azar en grupos de tratamiento (N= 7/grupo), teniendo cada grupo una media similar de peso corporal. La misma noche (aproximadamente a las 22:00 h), los animales se colocan en jaulas limpias y se les administra una dosis de vehículo, 22,5 nmol/kg de análogo peptídico de OXM, o 22,5 nmol/kg del control positivo mediante inyección subcutánea. Se retira la comida en el momento de la inyección del péptido o del vehículo. A la mañana siguiente (aproximadamente a las 10:00 h), se sacrifican los animales para recoger plasma y tejido hepático. Se miden las concentraciones de glucosa y de triglicéridos usando un analizador de química sanguínea Hitachi. La expresión génica se determina mediante RT-PCR. Los niveles de malonil-CoA reductasa se miden por HPLC.

Después de una sola inyección, la glucosa en plasma disminuyó significativamente en relación al control con vehículo en todos los grupos de tratamiento. El nivel de triglicéridos en plasma disminuyó en relación al control con vehículo solamente en los ratones tratados con el análogo peptídico de OXM de la SEC ID N°: 3 en el que la Cys (PEG20k) en la posición 39 está amidada, pero no en aquellos que habían sido tratados con el agonista de GLP-1R de acción prolongada. Adicionalmente, la expresión génica de pgc-1 α hepático aumentó significativamente en un 45 % y las concentraciones de malonil-coA hepática se redujeron significativamente en un 30 % en los ratones tratados con el análogo peptídico de OXM de la SEC ID N°: 3 en el que la Cys (PEG20k) en la posición 39 está amidada, en relación a los controles de vehículo. El análogo peptídico de OXM de la SEC ID N°: 3 en el que la Cys (PEG20k) en la posición 39 está amidada, disminuyó significativamente la expresión génica de PCSK9 hepática en relación a los controles de vehículo.

Listado de secuencias

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

His-(D-Ser)-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-(1-Nal)-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Ala-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn-(Aib)-Ala-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala-Cys-Cys (SEC ID N°: 2)

His-(D-Ser)-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-(1-Nal)-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Ala-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn-(Aib)-Ala-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala-Cys(PEG20k)-Cys(PEG20k) (SEC ID N°: 3)

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

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-(D-Ser)-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-(1-Nal)-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Ala-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn-(Aib)-Ala-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala- Xaa₃₈-Xaa₃₉ (SEC ID N°: 5)

5

En el que Xaa₃₈ es Cys, Cys-PEG, o está ausente; y Xaa₃₉ es Cys, Cys-PEG, o está ausente

REIVINDICACIONES

1. Un análogo peptídico de oxintomodulina que comprende la secuencia de aminoácidos:

**His-(D-Ser)-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-(1-Nal)-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-
Lys-Ala-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn-(Aib)-Ala-Arg-Asn-Arg-
Asn-Asn-Ile-Ala- Xaa₃₈-Xaa₃₉ (SEC ID N°: 5)**

5 en la que Xaa₃₈ es Cys, Cys-PEG, o está ausente; Xaa₃₉ es Cys, Cys-PEG, o está ausente; y en el que el aminoácido C-terminal está amidado opcionalmente.

2. Un análogo peptídico de oxintomodulina de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos:

**His-(D-Ser)-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-(1-Nal)-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-
Lys-Ala-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn-(Aib)-Ala-Arg-Asn-Arg-
Asn-Asn-Ile-Ala-Cys-Cys (SEC ID N°: 2)**

10 en la que el resto Cys en la posición 38 está opcionalmente pegilado; y en el que el resto Cys en la posición 39 está opcionalmente pegilado; y el grupo carboxilo de la Cys en la posición 39 está opcionalmente amidado.

15 3. El análogo peptídico de oxintomodulina de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el análogo está pegilado sobre el tiol del resto Cys en la posición 38 o en la posición 39 con una molécula de PEG de aproximadamente 40 kDa.

4. El análogo peptídico de oxintomodulina de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el análogo está pegilado sobre el tiol tanto de los restos Cys en la posición 38 como en la posición 39, con una molécula de PEG de aproximadamente 20 kDa en cada caso, y comprende la secuencia de aminoácidos:

**His-(D-Ser)-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-(1-Nal)-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-
Lys-Ala-Ala-Gln-Glu-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Leu-Asn-(Aib)-Ala-Arg-Asn-Arg-
Asn-Asn-Ile-Ala-Cys(PEG20k)-Cys(PEG20k) (SEC ID N°: 3)**

20 en la que el grupo carboxilo del resto Cys en la posición 39 está opcionalmente amidado.

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

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

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

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

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

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

35 11. El análogo peptídico de oxintomodulina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en el tratamiento de la diabetes no dependiente de insulina.

12. El análogo peptídico de oxintomodulina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en el tratamiento de la obesidad.

40 13. El análogo peptídico de oxintomodulina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en el tratamiento de la diabetes no dependiente de la insulina o de la obesidad.