

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 434**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)

**A61K 38/22** (2006.01)

**A61K 38/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2008 E 08798997 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2193142**

54 Título: **Composiciones y métodos de uso de péptidos proislotes y análogos de los mismos**

30 Prioridad:

**30.08.2007 US 969019 P**

**12.10.2007 US 979526 P**

**03.12.2007 US 991964 P**

**26.02.2008 US 31479 P**

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

**22.04.2015**

73 Titular/es:

**CUREDM GROUP HOLDINGS, LLC (100.0%)  
1201 N. MARKET STREET, SUITE 701  
WILMINGTON, DE 19801, US**

72 Inventor/es:

**LEVETAN, CLARESA S. y  
GARSKY, VICTOR, M.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 534 434 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**

Composiciones y métodos de uso de péptidos proislotes y análogos de los mismos

Se describen péptidos proislotes diseñados para aumentar su solubilidad, biodisponibilidad y resistencia en suero a la escisión por proteasas mejorando así su eficacia como agente terapéutico y los métodos de uso de los mismos.

5 El documento US2007/087971 describe péptidos proislotes humanos.

Se proporcionan péptidos proislotes modificados según se definen en la reivindicación 1.

En una realización, los péptidos proislotes están bloqueados con un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal.

10 En una realización, los HIP y sus derivados están bloqueados con un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal (HIP3 Bloqueado (SEQ ID NO: 5), HIP1 Bloqueado (SEQ ID NO: 6) e HIP2 Bloqueado (SEQ ID NO: 7)). Tales modificaciones parecen volver la secuencia de menos susceptible a la escisión por proteasa en suero con aquellas proteasas que normalmente reconocen los extremos libres, aumentando de ese modo eficazmente la Tmax y la biodisponibilidad del péptido. Los péptidos modificados de esta manera muestran una mayor eficacia requiriendo de ese modo dosis menores cuando se administran, por ejemplo, mediante las rutas IV, IM, SubQ o intraperitoneal.

15 Otras realizaciones proporcionan compuestos de péptidos proislotes Optimizados, incluyendo HIP Optimizados (SEQ ID NO: 5 a 17 y 19), para su administración solos o combinados con otros agentes terapéuticos para estimular la regeneración de células de los islotes pancreáticos. En diversas realizaciones, se puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de péptido proislotes Optimizado solo, o combinado con insulina, combinado con insulina y otro agente, y combinado con uno o más agentes distintos de insulina.

20 Otras realizaciones proporcionan formulaciones farmacéuticas y formas de dosificación unitarias de compuestos de péptidos proislotes Optimizados, incluyendo HIP optimizado. En una realización, la formulación farmacéutica proporcionada contiene HIP Optimizado solo o combinado con uno o más de otros ingredientes farmacéuticos activos (API). En una realización, los API son uno o varios agentes en las preparaciones solubles de liposomas que permiten administrar el HIP Optimizado mediante una variedad de rutas, incluyendo subcutáneamente, intramuscularmente, intravenosamente, e incluso oralmente, dependiendo de la formulación seleccionada. En una  
25 realización, la formulación es para la administración sistémica general, pero en otras realizaciones, la formulación comprende un agente de direccionamiento para la administración dirigida a lugares, receptores, células, tejidos, órganos o sistemas de órganos específicos dentro de un sujeto.

30 En otras realizaciones, los péptidos se pueden utilizar para el tratamiento de una patología asociada con el deterioro de la función pancreática en un sujeto que necesite semejante tratamiento. Se pueden administrar uno o más agentes para estimular la regeneración de las células de los islotes pancreáticos, además de los compuestos de péptidos proislotes Optimizados, incluyendo HIP Optimizado. En un aspecto de esta realización, los agentes se seleccionan entre HIP o péptidos relacionados con HIP distintos de HIP Optimizada, amilina/Pramlintida (SYMLIN™), exendina-4 (EXENATIDE™), GIP, GLP-1, agonistas del receptor de GLP-1, análogos de GLP-1,  
35 péptido INGAP de hámster y péptidos relacionados, Liraglutida (NN2211), y un inhibidor de la dipeptidil peptidasa, que bloquea la degradación de GLP-1.

40 En otra realización, los péptidos se pueden utilizar para el tratamiento de una patología asociada con el deterioro de la función pancreática en un sujeto que necesite tal tratamiento. También se describen las etapas de (1) intensificación de control glicémico; (2) administración por vía oral de la vitamina D3 (colecalfiferol) o vitamina D2 (ergocalciferol) para mantener los niveles de 25-hidroxivitamina por encima de 40 ng/ml; (3) administración de una o más terapias inmunitarias para proteger la nueva formación de células de los islotes, incluyendo la administración de agentes inmunosupresores; (4) administración de compuestos de péptidos proislotes Optimizados, incluyendo HIP Optimizado combinado con insulina, pero disminuyendo la insulina administrada en el tiempo; y (5) administración repetida de una terapia para la protección de los islotes, preferiblemente sobre una base de 3 a 24 meses,  
45 dependiendo de la terapia inmunitaria seleccionada, además de la etapa de administración de HIP optimizado.

50 En otra realización, los péptidos se pueden utilizar para el tratamiento de una patología asociada con el deterioro de la función pancreática en un sujeto que necesite tal tratamiento. También se describe un método que comprende una o más de las etapas de: (1) intensificación de control glicémico; (2) administración por vía oral de la vitamina D3 (colecalfiferol) para mantener los niveles de 25-hidroxivitamina por encima de 40 ng/ml; (3) administración de un agente para estimular la regeneración de los islotes pancreáticos, además de compuestos de péptidos proislotes Optimizados, incluyendo HIP Optimizado, incluyendo, pero no limitado a HIP y análogos de HIP distintos de HIP optimizado; (4) administración simultánea de un agente seleccionado del grupo que consiste en amilina/Pramlintida (SYMLIN™), exendina-4 (EXENATIDE™; BYETTA™), gastrina, factor de crecimiento epidérmico y análogo del factor de crecimiento epidérmico GIP, GLP-1, agonistas del receptor de GLP-1, análogos de GLP-1, INGAP,

Liraglutida (NN2211), y un inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV, que bloquea la degradación de GLP-1; y (5) reducción, o disminución, de la administración de otra terapia de la diabetes.

En otra realización, los péptidos se pueden utilizar para el tratamiento de una patología asociada con el deterioro de la función pancreática en un sujeto que necesite tal tratamiento. También se describe un método que comprende, además de la administración de compuestos de péptidos proislotes optimizados, incluyendo HIP Optimizado, la etapa de administración de uno o más agentes que inhiben, bloquean, o destruyen las células autoinmunitarias que se dirigen a los islotes pancreáticos. Tales terapias se han denominado "terapias inmunitarias" más arriba. En diversos aspectos de esta realización, los agentes que inhiben, bloquean, o destruyen las células autoinmunitarias que se dirigen a los islotes pancreáticos se seleccionan del grupo que consiste de los siguientes proporcionados individualmente o combinados entre sí. Anticuerpos anti-CD-3 que incluyen hOKT3γ1 (Ala-Ala) (Teplizumab); ChAglyCD3 que dirige la respuesta inmunitaria y bloquea específicamente los linfocitos T que causan la muerte de las células beta en la diabetes tipo 1; el Antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico, CLTA-4-Ig (Abatacept); Sirolimus (rapamicina) solo o combinado con Tacrolimus (FK506) o IL-2 (Rapamune); Rapamune solo o combinado con Proleukin (aldesleukina); una proteína de choque térmico 60 (DiaPep277); una vacuna anti-Ácido Glutámico Descarboxilasa 65 (GAD65), la vacuna de células dendríticas supresora de diabetes, GSK189075, fármacos de diazóxido y estatinas, incluyendo atorvastatina utilizada como agente para preservar función de las células beta, Micofenolato de Mofetilo solo o combinado con Daclizumab; el agente anti-CD20, Rituximab; Campath-1H (Anticuerpos Anti-CD52), lisofilina; globulina anti-linfocito T policlonal (ATG/Timoglobulina), factor estimulador de colonias de Granulocitos, Neulasta (Pegfilgrastim), vitamina D, con suplemento tanto de 25 hidroxilo como de 1,25 hidroxivitamina D; Vacuna IBC-VSO, que es una forma metabólicamente inactiva, sintético de insulina diseñada para evitar la destrucción de las células beta del páncreas; interferón alfa; una vacuna que utiliza células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> específicas del antígeno o cualquier agente o agentes diseñados para suprimir el ataque inmunológico sobre las células beta en los islotes de Langerhans, Prochymal (Células Madre Humanas Adultas), el anti-inflamatorio Anakinra y el agente antiinflamatorio, Desoxiespergualina, un agente anti-inflamatorio que bloquea la producción de citoquinas proinflamatorias e inhibe las células T y células B, estos agentes o agentes similares se pueden utilizar en las terapias combinadas que utilizan células T reguladoras, ya sea directamente o mediante el uso de inmunoterapia para detener la destrucción de las células productoras de insulina.

En otra realización, los péptidos se pueden utilizar para el tratamiento de una patología asociada con el deterioro de la función pancreática en un sujeto que necesite tal tratamiento, en donde al menos un síntoma de la patología asociada con el deterioro de la función pancreática se trata o se reduce como resultado de la administración de compuestos de péptidos proislotes Optimizados, incluyendo HIP Optimizado. En un aspecto de esta realización, el síntoma se selecciona entre bajos niveles de insulina o actividad de insulina, resistencia a la insulina, hiperglicemia, nivel de hemoglobina A1C mayor de 6,0%, micción frecuente, sed excesiva, hambre extrema, pérdida o ganancia inusual de peso, sobrepeso, aumento de la fatiga, irritabilidad, visión borrosa, picazón en los genitales, molestias y dolores extraños, boca seca, piel seca o con picor, impotencia, infecciones vaginales por levaduras, mala curación de cortes y raspaduras, infecciones excesivas o inusuales, pérdida o empeoramiento del control de la glicemia, fluctuaciones de la glucosa en sangre, fluctuaciones del glucagón en sangre, y fluctuaciones de triglicéridos en sangre, con hiperglicemia que conduce en última instancia a complicaciones microvasculares y macrovasculares, que incluyen síntomas visuales que conducen a ceguera, deterioro renal acelerado que puede conducir a insuficiencia renal que requiere diálisis y trasplante renal y neuropatía que conduce a úlceras y amputaciones del pie. Adicionalmente, estudios recientes han demostrado una reducción del riesgo tanto microvascular como macrovascular/cardiovascular entre los pacientes con diabetes tipo 1 que han mejorado el control glucémico.

En otra realización, los péptidos se pueden utilizar para el tratamiento de una patología asociada con el deterioro de la función pancreática en un sujeto que necesite tal tratamiento. La patología asociada con deterioro de la función pancreática es una cualquiera de diabetes tipo 1, diabetes tipo 1 de inicio reciente, diabetes tipo 2, diabetes autoinmune latente del adulto, pre-diabetes, alteración de la glucosa en ayunas, tolerancia alterada a la glucosa, síndrome de resistencia a la insulina, síndrome metabólico/síndrome dismetabólico, sobrepeso, obesidad, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, trastornos de la alimentación, ciclos anovulatorios y síndrome del ovario poliquístico.

También se describen anticuerpos que se unen selectivamente a compuestos de péptidos proislotes Optimizados, incluyendo HIP Optimizado. En un ejemplo, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En otro ejemplo, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. Tales anticuerpos se pueden utilizar en métodos de diagnóstico, cuyos métodos comprenden detectar niveles de HIP Optimizado en el suero o en tejidos de un mamífero. En una realización, el método de diagnóstico se utiliza para controlar el tratamiento con HIP Optimizado para asegurar que se están logrando niveles terapéuticamente eficaces en un paciente que recibe semejante terapia.

Las realizaciones de la descripción también proporcionan kits para el tratamiento de un paciente que tiene diabetes tipo 1 o tipo 2 u otra afección en la que existen niveles aberrantes de insulina, perturbación en el metabolismo de la glucosa o resistencia a la insulina, que comprenden una dosis terapéuticamente eficaz de compuestos de péptidos proislotes Optimizados, incluyendo HIP optimizado y opcionalmente al menos un agente para la estimulación de los receptores de GLP-1 o aumentar los niveles de GLP-1, promover la regeneración de células beta, aumentar la

saciedad, disminuir la ingesta de alimentos y la pérdida de peso, ya sea en el mismo paquete o en un paquete separado, e instrucciones para su uso. Las realizaciones adicionales proporcionan un kit para medir compuestos de péptidos proislotes Optimizados, incluyendo niveles de HIP Optimizado en una muestra, comprendiendo el kit un anticuerpo para el péptido proislotes Optimizado, incluyendo anticuerpo específico de HIP Optimizado y opcionalmente compuestos de péptidos proislotes Optimizados, incluyendo HIP Optimizado y opcionalmente un método de marcaje.

#### H. Descripción de los dibujos

El archivo de esta patente contiene al menos una fotografía o dibujo ejecutado en color. Las copias de los dibujos o fotografías en color serán proporcionadas por la Oficina de Patentes y Marcas previo pedido y pago de la cuota necesaria.

Para una comprensión más completa de la naturaleza y ventajas de la presente invención, debe hacerse referencia a la siguiente descripción detallada tomada en conexión con los dibujos adjuntos, en los cuales:

La Fig. 1 es un gráfico que representa los niveles de insulina después de la incubación en cultivo con tejido ductal pancreático humano con HIP1, HIP2 e HIP3.

La Fig. 2 es un gráfico que representa los requerimientos de insulina en ratones tratados con HIP1, HIP2 e HIP3.

La Fig. 3 es un gráfico que representa la reducción media de la glucosa desde el período inicial en ratones tratados con HIP1, HIP2 e HIP3.

La Fig. 4A es un gráfico que representa el número de islotes en ratones tratados con HIP2 e HIP3. La Fig. 4B ofrece imágenes representativas de inmunotinción de insulina en ratones tratados con placebo e HIP y los islotes teñidos de insulina se señalan en color amarillo para diferenciar estas estructuras de las células sanguíneas autofluorescentes. Barra de escala = 50  $\mu$ m en todas las imágenes.

La Fig. 5 es una tinción inmunofluorescente para insulina en tejido pancreático de ratón tratado con HIP.

La Fig. 6 es un gráfico que representa la vida media de HIP liberado intramuscularmente en ratas.

La Fig. 7 es un gráfico que representa la vida media de HIP liberado subcutáneamente en ratas.

La Fig. 8 es un gráfico que representa la estabilidad in vitro de HIP 2 e HIP 2B en plasma con el tiempo.

La Fig. 9A es un análisis de Transferencia Western que demuestra la expresión de insulina humana a partir de células PANC-1 en condiciones no reductoras y reductoras en respuesta a la incubación con diversos HIP e HIP Optimizados. La Fig. 9B son Tinciones de Ponceau en condiciones no reductoras y reductoras en respuesta a la incubación con diversos HIP e HIP Optimizados.

La Fig. 10A demuestra células PANC-1 tratadas con péptidos HIP2 e HIP Optimizados durante cuatro días, con imágenes tomadas el día 7 a un aumento de 200X. La Fig. 10B demuestra la progresión de los cambios de morfología en las células PANC-1 a lo largo de 7 días (control, HIP2 e HIP2B), con imágenes tomadas los días 1, 2, 3, 5 y 7 a un aumento de 200X. La Fig. 10C demuestra el progreso de los cambios morfológicos de las células PANC-1 tratadas con el control e HIP Optimizados (Dímero HIP2 e HIP2 PEG).

La Fig. 11 es una tinción para CK19 y DAP1 para mostrar los núcleos y la insulina en las células pancreáticas humanas tras la administración de HIP2B.

La Fig. 12 es un gráfico que representa los niveles de glucosa de tres ratones NOD después del tratamiento con placebo y lisofilina (LSF), HIP 2 y LSF, e HIP2B y LSF.

La Fig. 13 es una doble tinción inmunohistoquímica de anticuerpo Cy3 de células PANC-1 después del tratamiento con péptidos HIP e HIP Optimizado 150  $\mu$ M durante 48 horas, lo que demuestra la traslocación del receptor de HIP desde membrana celular de las células PANC-1 al citoplasma tras la estimulación con HIP e HIP Optimizado.

La Fig. 14 demuestra la exposición ajustada de células PANC-1 en SFM y TSFM con péptidos HIP e HIP2B Optimizado.

La Fig. 15 demuestra la evaluación repetida del impacto de péptidos HIP2 Optimizados sobre células PANC-1 utilizando análisis inmunofluorescentes lo que indica que HIP2B interactúa con el receptor de HIP (EXTL), dando como resultado la inmersión del receptor de HIP desde la membrana citoplásmica en el citoplasma al núcleo tras la estimulación con HIP.

La Fig. 16 demuestra una Transferencia Western de HIP2B Optimizado que aumenta el tiempo de traslocación del receptor de HIP (EXTL3) desde la membrana citoplásmica al núcleo en células PANC-1.

La Fig. 17 es un gráfico que representa los niveles medios diarios de glucosa en un Modelo de Ratón Diabético STZ después de la administración de HIP2, HIP2B y placebo.

Fig. 18 es un gráfico que representa los niveles diarios de glucosa entre grupos de ratones tratados con HIP2B (verde) y de control (púrpura) y placebo.

5 La Fig. 19 es un gráfico que representa los niveles de glucosa entre grupos de ratones tratados con HIP2B (amarillo), HIP2 (verde) y control (azul) al principio y al final de la intervención.

La Figura 20 demuestra el impacto de HIP2B Optimizado que restaura los niveles de glucosa en ayunas a intervalos no diabéticos y a niveles inferiores a los de los niveles de glucosa del período inicial antes del tratamiento con STZ.

10 La Figura 21 demuestra los resultados del ensayo de tolerancia a la glucosa entre grupos de tratamiento al cierre del estudio con niveles de glucosa más bajos observados en el grupo de tratamiento con HIP2B Optimizado.

La Figura 22 demuestra los resultados de un estudio de análisis de respuesta a la dosis de HIP2B Optimizado en ratones convertidos en diabéticos con STZ para comparar los efectos de HIP2B Optimizado sobre el control de glucosa cuando se libera a diferentes dosificaciones en un modelo de diabetes en ratón con el fin de determinar la dosificación potencial mínima que produce la máxima eficacia.

15 La Figura 23 ilustra el impacto de diferentes concentraciones de HIP2B en la atenuación de la diabetes.

La Figura 24 demuestra el análisis farmacocinético de HIP2B, HIP2 y INGAP después de la administración subcutánea e intravenosa a ratas Sprague Dawley a 4 mg/kg.

La Fig. 25 demuestra el análisis farmacocinético de HIP2B Optimizado liberado subcutáneamente.

### 1. Descripción detallada

20 Antes de describir las presentes composiciones y métodos, se debe entender que esta invención no se limita a los procedimientos, composiciones, o metodologías concretos descritos, ya que estos pueden variar. También se debe entender que la terminología utilizada en la descripción tiene el propósito de describir las versiones o realizaciones concretas solamente, y no pretende que limite el alcance de la presente invención que estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se definan lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en  
25 la presente memoria tienen los mismos significados comúnmente entendidos por un experto normal en la técnica.

La insulina ha sido, desde 1922, la principal, si no la única terapia disponible para el tratamiento de la diabetes tipo 1 y otras afecciones relacionadas con la carencia o la disminución de la eficacia o la producción de insulina. Sin embargo, los pacientes diabéticos con insulina no tienen un metabolismo normal de la glucosa, ya que la insulina es solo parte de la función pancreática perdida y aberrante.

30 Hasta la fecha, no ha habido ninguna terapia individual o combinada que se haya utilizado con éxito para tratar los mecanismos subyacentes de la enfermedad de diabetes tipo 1 o tipo 2. El desarrollo de un tratamiento satisfactorio que estimule la regeneración de las células productoras de insulina en el páncreas representará un avance significativo del tratamiento para los pacientes con diabetes. Alguna bibliografía utiliza erróneamente el término "células de los islotes" para referirse ya sea solo para las células beta o a los islotes completos. Sin embargo, es  
35 importante distinguir entre las células beta e islotes debido a que algunos tratamientos alternativos tratan de aumentar el número de células beta, mientras que no ha habido tratamientos disponibles para reemplazar endógenamente islotes enteros distintos del trasplante de islotes.

A pesar de décadas de investigación y del advenimiento del trasplante de islotes de páncreas en 1974 y más recientes afirmaciones de éxito derivadas del Protocolo de Edmonton para el trasplante de islotes, estos enfoques  
40 no han tenido mucho éxito en los Estados Unidos. Por ejemplo, a los cuatro años del trasplante, menos de 10% de los pacientes que han recibido trasplantes de islotes permanece independiente de la insulina. Adicionalmente, existe una tasa de 18% de efectos secundarios graves. Está bien establecido que al inicio de la diabetes tipo 1, los pacientes que ya han perdido la mayoría de sus islotes y el número de islotes sigue disminuyendo constantemente. Sin embargo, estudios más recientes han encontrado que en el momento del diagnóstico de la diabetes tipo 2, los  
45 pacientes muestran una pérdida de al menos 50% de la masa y el número de islotes. Al igual que con los pacientes de tipo 1, el número y la masa de islotes sigue disminuyendo, no a partir del ataque autoinmunitario, sino debido a que las células beta se "queman" de manera efectiva. Aunque esta disminución se produce más rápidamente en los pacientes de tipo 1, todavía hay una disminución de 10-20% por año entre los pacientes de tipo 2.

En un páncreas que funciona normalmente, un pequeño número de islotes mueren de forma natural diariamente y son reemplazados según sea necesario para mantener los niveles de glucosa bajo control. En promedio, este proceso regenerativo conocido como neogénesis de islotes reemplaza los islotes a una velocidad de aproximadamente 2%  
50 por mes, en pacientes no diabéticos, la masa de células beta en el interior de los islotes existentes se puede

expandir o contraer en función de las necesidades de insulina del individuo. Este proceso, referido como "proliferación de células beta" no ocurre en los pacientes con diabetes tipo 1 y es limitado en pacientes de tipo 2.

5 El estudio de la neogénesis de los islotes no es nuevo. En 1920, se informó de que una piedra pancreática obstructiva daba como resultado la atrofia de la mayor parte de los páncreas, pero un aumento de los islotes. Fue entonces cuando se planteó la hipótesis de que la ligación (unión) de los conductos pancreáticos podría conducir a la identificación de una sustancia que podría ser útil en el tratamiento de la diabetes. Los cirujanos ligaron los conductos pancreáticos de niños diabéticos con la esperanza de producir sustancias que formarían nuevos islotes. Aunque los efectos positivos de estos procedimientos fueron de corta duración, demostraron el potencial para la restauración de los islotes en el hombre.

10 Los estudios de ligación de los conductos pancreáticos que estaban destinados a crear un modelo en hámster de pancreatitis dieron como resultado la formación de muchos nuevos islotes. Esta investigación condujo al aislamiento de un péptido de hámster denominado Péptido Asociado con la Neogénesis de Islotes, o INGAP. En el desarrollo clínico de INGAP, se demostró adicionalmente que se podrían diferenciar nuevos islotes humanos a partir de las células progenitoras de islotes de tipo células madre que residen en todo el páncreas adulto incluso décadas después de la inicio de la diabetes de tipo 1.

Aparte del concepto de utilización la ligación de los conductos para producir nuevos islotes, se llevó a cabo una investigación referente a la regeneración potencial de islotes durante el embarazo. Se ha informado de que los islotes se formaban en la embriogénesis tardía y se estableció que la población de islotes continúa creciendo después del nacimiento a través de un proceso de metamorfosis a partir de tejido ductal circundante.

20 La forma principal en la que los pacientes con diabetes tipo 1 o diabetes de tipo 2 de fase tardía controlan su enfermedad es mediante la administración de insulina, ya sea a través de inyección subcutánea o mediante el uso de una bomba de infusión subcutánea. Además de las obvias desventajas de estilo de vida, el tratamiento con insulina no coincide con los mecanismos normales de control del organismo y por lo tanto no controla completamente las fluctuaciones de glucosa. Como se muestra mediante el gráfico adjunto, incluso los pacientes diabéticos de tipo 1 mejor controlados no tienen nada remotamente parecido a un metabolismo normal de la glucosa. Esto se debe a que la secreción de insulina es solo una parte de la función pancreática perdida.

30 Los investigadores han evaluado si la producción endógena de insulina puede ser estimulada por un tratamiento con fármacos. Por ejemplo, a lo largo de las últimas décadas, se han estudiado varias terapias en las que un péptido implicado en el metabolismo de la glucosa, o análogos de tales péptidos, se han administrado a pacientes diabéticos. Estas terapias incluyen la administración de péptidos con secuencias de aminoácidos similares a las de péptido-1 de tipo glucagón (GLP-1), y tales péptidos incluyen: análogos de receptor de GLP-1, Exendina-4, Exenatida/BYETTA™, que deriva del Monstruo de Gila, Januvia™, péptido inhibidor gástrico/polipéptido Insulinotrópico Dependiente de Glucosa (GIP), compuestos homólogos a GLP-1, tales como Liraglutida (NN2211), Inhibidores Dipeptidil Peptidasa-4, que inhiben la rotura de GLP-1, Gastrina, Factor de Crecimiento Epidérmico y Análogos del Factor de Crecimiento Epidérmico y Péptido Asociado a la Neogénesis de los Islotes derivado de Hámster (INGAP).

40 Ninguno de estos tratamientos ha demostrado ser eficaz en la reversión de los mecanismos subyacentes de la diabetes. Generación de nuevos islotes no solo forma células beta productoras de insulina, también forma las otras células implicadas en el metabolismo de la glucosa. En consecuencia, si se generan suficientes nuevos islotes, el paciente es finalmente capaz de recuperar el control glucémico. Por lo tanto, la neogénesis de islotes presenta la posibilidad no solo de tratar, sino en realidad revertir la diabetes.

45 Para que cualquier agente de neogénesis de células de los islotes sea eficaz, el páncreas debe ser "elástico" con respecto a su capacidad para generar nuevas células de los islotes. La prueba de la elasticidad del páncreas con respecto a la generación de nuevos islotes pancreáticos durante toda la vida en respuesta a la muerte o apoptosis de los islotes pancreáticos ha reemplazado el concepto hace mucho tiempo de que el número de estructuras de los islotes productoras de insulina se fija en el nacimiento y se mantiene durante toda la vida, mientras que la plasticidad y la capacidad de las células beta para proliferar dentro de islotes existentes han sido bien establecidas. Actualmente se acepta que la neogénesis de los islotes pancreáticos se produce a partir de células pancreáticas preexistentes a través de la diferenciación de las células progenitoras que encontradas entre las fracciones tanto endocrinas como exocrinas del páncreas. Los datos demuestran que, incluso décadas después de la aparición de la diabetes tipo 1, los islotes pancreáticos se pueden regenerar.

55 Por ejemplo, los pacientes con diabetes tipo 1 son capaces de producir niveles normales de péptido C durante el embarazo. Varios equipos han encontrado un aumento paradójico de los niveles de péptido C durante el primer trimestre del embarazo en el rango normal en hasta un tercio de todas las pacientes tipo 1 embarazadas. Este aumento del C-péptido se acompaña de una reducción significativa en los requerimientos de insulina siendo capaces algunas pacientes de interrumpir transitoriamente la insulina durante el primer trimestre de embarazo. Este aumento en el péptido C durante el embarazo que se produce en del plazo de 10 semanas de gestación entre las pacientes, a

pesar de un péptido C no medible antes del embarazo, implica la restauración del funcionamiento de las estructuras de los islotes. Se plantea la hipótesis de que la neogénesis de los islotes que se produce durante el embarazo es el resultado del aumento concomitante de la producción de esteroides endógenos y de una regulación a la baja del sistema inmunitario que evita el ataque inmunitario sobre el feto, lo que probablemente también juega un papel en la supresión del ataque de los linfocitos sobre los islotes. Junto con la supresión inmunitaria, también se especula que existe una regulación al alza de los factores promotores del crecimiento de los islotes maternos durante el embarazo para compensar la disminución del valor teórico de glucosa materna durante el embarazo. Los modelos animales han demostrado también que la neogénesis de los islotes precede al desarrollo de la expansión de células beta durante el embarazo y se ha demostrado que las células progenitoras pancreáticas humanas se diferencian en islotes. Del mismo modo, se han observado que pacientes que han estado durante un largo período en inmunosupresión para un trasplante de riñón regeneran islotes productores de insulina.

A lo largo de la última década, se han realizado pruebas clínicas para evaluar el impacto de una serie de moduladores inmunitarios que pueden detener la destrucción de las células beta del páncreas. Los anticuerpos anti-CD3 tales como hOKT3γ1 (Ala-Ala) y ChAglyCD3 que dirigen la respuesta inmunitaria y bloquean específicamente los linfocitos T que causan la muerte de las células beta en la diabetes tipo 1 se han utilizado para este propósito, al igual que los tratamientos que implican la administración de Sirolimus (rapamicina), Tacrolimus (FK506), una proteína de choque térmico 60 (DiaPep277™), una vacuna anti-Acido Glutámico Descarboxilasa 65 (GAD65), Micofenolato Mofetilo solo o combinado con Daclizumab, el agente anti-CD20, globulina Anti-linfocito T policlonal (ATG), Iisofilina, Rituximab, Campath-1H (anticuerpo Anti-CD52), vitamina D, vacuna IBC-VSO, que es una forma metabólicamente inactiva, sintético de la insulina diseñada para evitar la destrucción de las células beta del páncreas, y la vacunación con interferón-α que utiliza células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> reguladoras específicas del antígeno. Estos enfoques terapéuticos están destinados a utilizar las células T reguladoras, ya sea directamente o a través del uso de la inmunoterapia para detener la destrucción de las células productoras de insulina. El propósito de estas pruebas es determinar la capacidad de estos agentes para preservar la función de los islotes mediante la prevención del ataque inmunitario adicional sobre las células beta de los islotes del páncreas.

Adicionalmente, estudios recientes han encontrado que la vitamina D puede jugar un importante papel inmunomodulador en la prevención de la diabetes de tipo 1. Hasta 54,7% de la población de los Estados Unidos, independientemente de la latitud, tienen bajos niveles de 25-hidroxivitamina D. Se ha demostrado que la deficiencia de vitamina D, no solo está asociada con el aumento del riesgo de diabetes tipo 1 y se observa en el inicio del diagnóstico de tipo 1, sino que también se observa comúnmente entre pacientes con diabetes tanto tipo 1 como 2. Se recomienda el mantenimiento de niveles superiores a 40 ng/ml para mantener la función inmunitaria normal. No se han observado efectos adversos con dosis de hasta 10.000 UI/día.

Las siguientes definiciones se proporcionan para ayudar al lector. A menos que se definan lo contrario, se pretende que todos los términos de la técnica, anotaciones y otros términos científicos o médicos o terminología utilizada en la presente memoria tengan los significados comúnmente entendidos por los expertos en las técnicas químicas y médicas. En algunos casos, los términos con significados comúnmente comprendidos se definen en la presente memoria para mayor claridad y/o para una pronta referencia, y no se debe considerar necesariamente que la inclusión de tales definiciones en la presente memoria represente una diferencia sustancial con respecto a la definición del término en su acepción general en la técnica.

También se debe observar que, según se utiliza en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno", "una" y "el" y "la" incluyen la referencia al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a un "fibroblasto" es una referencia a uno o más fibroblastos y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "aproximadamente" significa más o menos 10% del valor numérico del número con el que se está utilizando. Por lo tanto, aproximadamente 50% significa en el intervalo de 45% - 55%. Según se utiliza en la presente memoria, "péptido proislotes" se refiere a proteínas o péptidos derivados de tales proteínas que estimulan la neogénesis de las células de los islotes, incluyendo, pero no limitados a, REG3A humano (SEQ ID NO: 1), REG3G humano (SEQ ID NO: 28), REG1A humano, REG1B humano, REG4 humano, INGAP de hámster (SEC ID NO: 27), REG2 de hámster, REG3G de hámster, REG1 de rata, PAP/REG3B de rata, PAP3 de rata, REG3G de rata, Reg1 de ratón, REG2 de ratón, REG3A de ratón, REG3B de ratón, REG3G de ratón, REG3S de ratón, REG4 de ratón, PTP bovino, chimpancé, vaca, perro, oveja y análogos y homólogos de tales proteínas y fragmentos peptídicos derivados de dichas proteínas u homólogos de los mismos. Las secuencias de proteínas de tales péptidos proislotes están disponibles al público. Los péptidos Proislotes incluyen adicionalmente péptidos que son fragmentos de REG3A, INGAP o proteínas homólogas que contienen la secuencia de catorce aminoácidos activa de HIP2 (o la secuencia correspondiente para cada homólogo) (véase la Tabla 1 de más abajo) y son menos de 150 aminoácidos, menos de 125 aminoácidos, menos de 100 aminoácidos, menos de 75 aminoácidos, menos de 50 aminoácidos o menos de 25 aminoácidos. Los ejemplos de tales péptidos (que proporcionan la secuencia de catorce aminoácidos activa) incluyen, pero no se limitan a, los siguientes:

ES 2 534 434 T3

Tabla 1

REG3A Humano	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	T	E	P	N	G	SEQ ID NO: 4
Chimp	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	S	E	P	D	G	SEQ ID NO: 60
INGAP Hámster	I	G	L	H	D	P	S	H	G	T	L	P	N	G	SEQ ID NO: 61
REG3A Ratón	I	G	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	SEQ ID NO: 62
REG3 Rata Noruega	I	W	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	SEQ ID NO: 63
Vaca	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	D	A	SEQ ID NO: 64
Perro	M	G	L	H	D	P	T	E	G	Y	E	P	N	A	SEQ ID NO: 65
Oveja	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	N	A	SEQ ID NO: 66
REG1A Humano	I	G	L	H	D	P	K	K	N	R	R	W	H	W	SEQ ID NO: 67
REG1B Humano	I	G	L	H	D	P	K	K	N	R	R	W	H	W	SEQ ID NO: 68
REG1 Rata	I	G	L	H	D	P	K	N	N	R	R	W	H	W	SEQ ID NO: 69
REG1 Ratón	T	G	L	H	D	P	K	R	N	R	R	W	H	W	SEQ ID NO: 70
REG2 Ratón	T	G	L	H	D	P	K	S	N	R	R	W	H	W	SEQ ID NO: 71
REG2 Hámster	I	G	L	H	D	P	K	N	N	R	R	W	H	W	SEQ ID NO: 72
REG3 Rata	I	W	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	SEQ ID NO: 73
PAP/REG3B Rata	I	G	L	H	D	P	T	L	G	G	E	P	N	G	SEQ ID NO: 74
PAP3 Rata	I	G	L	H	D	P	T	L	G	Q	E	P	N	R	SEQ ID NO: 75
REG3A Ratón	I	G	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	SEQ ID NO: 76



ES 2 534 434 T3

REG3B Ratón	I	G	L	H	D	P	T	L	G	A	E	P	N	G	SEQ ID NO: 77
REG3G Ratón	I	G	L	H	D	P	T	L	G	Y	E	P	N	R	SEQ ID NO: 78
REG3G Rata	I	G	L	H	D	P	T	L	G	Q	E	P	N	R	SEQ ID NO: 79
REG3G Hámster	I	G	L	H	D	P	T	L	G	Q	E	P	N	G	SEQ ID NO: 80
REG3G Humano	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	S	E	P	D	G	SEQ ID NO: 81
REG3S Ratón	I	G	L	H	D	L	S	L	G	S	L	P	N	E	SEQ ID NO: 82
PTP Bovino	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	A	N	A	SEQ ID NO: 83
INGAP Hámster	I	G	L	H	D	P	S	H	G	T	L	P	N	G	SEQ ID NO: 84
REG4 Humano	I	G	L	H	D	P	Q	K	R	Q	Q	W	Q	W	SEQ ID NO: 85
REG4 Ratón	I	G	L	H	D	P	Q	K	K	Q	L	W	Q	W	SEQ ID NO: 86
Chimp	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	S	E	P	D	G	SEQ ID NO: 87
Vaca	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	D	A	SEQ ID NO: 88
Perro	M	G	L	H	D	P	T	E	G	Y	E	P	N	A	SEQ ID NO: 89
Oveja	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	N	A	SEQ ID NO: 90

5 Tales fragmentos peptídicos incluyen, pero no se limitan a, péptidos HIP1, HIP2, HIP3, INGAP (SEC ID NO: 26), y homólogos de los mismos, identificados a continuación. Se han encontrado un gen humano similar al gen de rata en el hombre, que es referido como gen Reg, y es el gen sobre la que se ha encontrado HIP en seres humanos y una alta homología entre especies de Péptido proslotes Humano y otras especies de mamíferos. El siguiente diagrama de homología de especies demuestra que la secuencia relacionada con HIP se conserva exquisitamente a lo largo de la evolución. Es probable que cada una de estas secuencias tenga cierta eficacia en seres humanos, pero ninguna está emparejada exactamente con la secuencia activa humana de HIP.

Homología de especie

ES 2 534 434 T3

REG3A Humano	W	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	T	E	P	N	G	E	SEQ ID NO: 30
Chimp.	W	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	S	E	P	D	G	G	SEQ ID NO: 31
INGAP Hámster	W	I	G	L	H	D	P	S	H	G	T	L	P	N	G	S	SEQ ID NO: 32
REG3A Ratón	W	I	G	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	G	SEQ ID NO: 33
REG3 Rata																	
Noruega	W	I	W	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	G	SEQ ID NO: 33
Vaca	W	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	D	A	G	SEQ ID NO: 34
Perro	W	M	G	L	H	D	P	T	E	G	Y	E	P	N	A	D	SEQ ID NO: 35
Oveja	W	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	N	A	G	SEQ ID NO: 36

La tabla anterior compara un tramo de dieciséis aminoácidos de un péptido humano que contiene la secuencia HIP2 de catorce aminoácidos en comparación con otras especies.

5

REG3A humano	W	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	T	E	P	N	G	SEQ ID NO: 3
Chimp	W	I	G	L	H	D	P	T	Q	G	S	E	P	D	G	SEQ ID NO: 38
INGAP hámster	W	I	G	L	H	D	P	S	H	G	T	L	P	N	G	SEQ ID NO: 39
REG3A ratón	W	I	G	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	SEQ ID NO: 40
REG3 rata Noruega	W	I	W	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	SEQ ID NO: 41
Vaca	W	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	D	A	SEQ ID NO: 42
Perro	W	N	G	L	H	D	P	T	E	G	Y	E	P	N	A	SEQ ID NO: 43
Oveja	W	I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	N	A	SEQ ID NO: 44
REG3A Humano		I	G	L	H	D	P	T	Q	G	T	E	P	N	G	SEQ ID NO: 4
Chimp		I	G	L	H	D	P	T	Q	G	S	E	P	D	G	SEQ ID NO: 45
INGAP hámster		I	G	L	H	D	P	S	H	G	T	L	P	N	G	SEQ ID NO: 46

REG3A ratón			I	G	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G		SEQ ID NO: 47
REG3 rata Noruega			I	W	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G		SEQ ID NO: 48
Vaca			I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	D	A		SEQ ID NO: 49
Perro			M	G	L	H	D	P	T	E	G	Y	E	P	N	A		SEQ ID NO: 50
Oveja			I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	N	A		SEQ ID NO: 51
REG3A Humano			I	G	L	H	D	P	T	Q	G	T	E	P	N	G	E	SEQ ID NO: 2
Chimp			I	G	L	H	D	P	T	Q	G	S	E	P	D	G	G	SEQ ID NO: 52
INGAP hámster			I	G	L	H	D	P	S	H	G	T	L	P	N	G	S	SEQ ID NO: 27
REG3A ratón			I	G	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	G	SEQ ID NO: 53
REG3 rata Noruega			I	W	L	H	D	P	T	M	G	Q	Q	P	N	G	G	SEQ ID NO: 54
Vaca			I	G	L	H	D	P	T	E	S	E		P	D	A	G	SEQ ID NO: 55
Perro			M	G	L	H	D	P	T	E	G	Y	E	P	N	A	D	SEQ ID NO: 56
Oveja			I	G	L	H	D	P	T	E	G	S	E	P	N	A	G	SEQ ID NO: 57

Según se utiliza en la presente memoria, "péptido proislotes Optimizado" se refiere a las variaciones de un péptido proislotes, incluyendo, pero no limitado a, REG3A humano, REG3G humano, REG1A humano, REG1B humano, REG4 humano, INGAP de hámster, REG2 de hámster, REG3G de hámster , REG1 de rata, PAP/REG3B de rata, PAP3 de rata, REG3G de rata, REG1 de ratón, REG2 de ratón, REG3A de ratón, REG3B de ratón, REG3G de ratón, REG3S de ratón, REG4 de ratón, PTP bovino, HIP1, HIP2 y/o HIP3, en donde el péptido ha sido modificado para aumentar la estabilidad, solubilidad o biodisponibilidad de tales péptidos como se define en la reivindicación 1. Para los propósitos de esta descripción, la estabilidad se refiere a la resistencia del péptido a la degradación por proteasas en suero que se dirigen y degradan péptidos proislotes no Optimizados, REG3A, REG3G, INGAP, péptido REG3G, péptido INGAP, HIP1, HIP2 y/o HIP3 u homólogos de tales péptidos. Asimismo, para los propósitos de esta descripción, la biodisponibilidad se refiere a la cantidad de péptido disponible para uso terapéutico in vivo por las células diana, las rutas y/o los mecanismos sistémicos basados en la capacidad del péptido para evitar la degradación por proteasas y otras rutas sistémicas que degradan los péptidos proislotes no Optimizados, REG3A humano, REG3G humano, REG1A humano, REG1B humano, REG4 humano, INGAP de hámster, REG2 de hámster, REG3G de hámster, REG1 de rata, PAP/REG3B de rata, PAP3 de rata, REG3G de rata, REG1 de ratón, REG2 de ratón, REG3A de ratón, REG3B de ratón, REG3G de ratón, REG3S de ratón, REG4 de ratón, PTP bovino, chimpancé, vaca, perro, oveja y análogos y homólogos de tales proteínas, HIP1, HIP2 y/o HIP3 u homólogos de tales péptidos. Preferiblemente, los péptidos proislotes Optimizados se refieren al péptido REG3G, péptido INGAP, HIP3, HIP 1 y/o HIP 2 u homólogos que son bloqueados por la adición de un grupo amida C-terminal y un grupo acetilo N-terminal, pegilados, y una combinación de los mismos.

Según se utiliza en la presente memoria, "HIP optimizado" se refiere a las variaciones de HIP, HIP1 y/o HIP2 el donde el péptido ha sido modificado para aumentar la estabilidad, solubilidad o biodisponibilidad de HIP, HIP1 o H1P2 como se define en la reivindicación 1. Para los propósitos de esta descripción, la estabilidad se refiere a la resistencia del péptido a la degradación por proteasas en suero que se dirigen y degradan HIP3, HIP1 y/o HIP2 no Optimizados. Asimismo, para los propósitos de esta descripción, la biodisponibilidad se refiere a la cantidad de péptido disponible para uso terapéutico in vivo por las células diana, las rutas y/o los mecanismos sistémicos basados en la capacidad del péptido para evitar la degradación por proteasas y otras rutas sistémicas que degradan HIP3, HIP1 y/o HIP2 no Optimizados. Preferiblemente, HIP optimizado se refiere a HIP3, HIP 1 y/o HIP 2 que son bloqueados por la adición de un grupo amida C-terminal y un grupo acetilo N-terminal, pegilados, y una combinación de los mismos.

Según se utiliza en la presente memoria, "tratar" una afección o paciente se refiere a tomar medidas para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos. Para los propósitos de esta descripción, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio o mejora de uno o más síntomas de la diabetes, disminución del grado de la enfermedad, retraso o ralentización del progreso de la enfermedad, mejora, paliación o estabilización del estado de la enfermedad, y otros resultados beneficiosos descritos a continuación. Los síntomas de la diabetes incluyen niveles bajos o insuficientes de insulina o actividad insulínica, micción frecuente, sed excesiva, hambre extrema, pérdida inusual de peso, aumento de la fatiga, irritabilidad, visión borrosa, picazón genital, molestias y dolores extraños, boca seca, piel seca o con picor, impotencia, infecciones vaginales por levadura, mala curación de cortes y raspaduras, infecciones excesivas o inusuales, hiperglicemia, pérdida de control de la glicemia, fluctuaciones de la glucosa en sangre postprandial, fluctuaciones en el glucagón en sangre, fluctuaciones en los triglicéridos en la sangre. La diabetes puede ser diagnosticada por métodos bien conocidos por un experto normal en la técnica. Por ejemplo, comúnmente, los diabéticos tienen un resultado de glucosa en sangre en plasma de más de 126 mg/dL de glucosa. La prediabetes, que también se puede tratar por medio de las composiciones y métodos descritos en la presente memoria, se diagnostica comúnmente en pacientes con un nivel de glucosa en sangre entre 100 y 125 mg/dL de glucosa. Otros síntomas también se pueden utilizar para diagnosticar la diabetes, enfermedades y afecciones relacionadas, y enfermedades y afecciones afectadas por la disminución de la función pancreática.

Según se utiliza en la presente memoria, "reducción" de un síntoma o síntomas (y los equivalentes gramaticales de esta expresión) significa la disminución de la gravedad o frecuencia de los síntomas, o la eliminación de los síntomas.

El término "inhibir" incluye la administración de un compuesto de la presente descripción para prevenir la aparición de los síntomas, el alivio de los síntomas o la eliminación de la enfermedad, afección o trastorno.

Según se utiliza en la presente memoria, una "patología asociada con el deterioro de la función pancreática" es aquella en la que la patología está asociada con una disminución de la capacidad de un sujeto en el páncreas del sujeto para producir y/o secretar hormonas y/o citoquinas. Preferiblemente esta hormona o citoquina es la insulina. Las patologías que se asocian con el deterioro de la función pancreática incluyen la diabetes tipo 1, diabetes tipo 1 de nuevo inicio, diabetes tipo 2, diabetes latente autoinmune de la edad adulta, pre-diabetes, alteración de la glucosa en ayunas, tolerancia alterada a la glucosa, síndrome de resistencia a la insulina, síndrome metabólico, sobrepeso, obesidad, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, trastornos de la alimentación y síndrome de ovario poliquístico.

Según se utiliza en la presente memoria, "administrar" o "administración de un fármaco o agente terapéutico a un sujeto (y equivalentes gramaticales de esta expresión) incluyen tanto la administración directa, incluyendo la auto-administración, directamente en o sobre un tejido diana o administrar un agente terapéutico a un sujeto mediante el cual el agente terapéutico tiene un impacto positivo sobre el tejido al que está dirigido, como la administración indirecta, incluyendo el acto de prescripción de un fármaco. Por ejemplo, según se utiliza en la presente memoria, un médico que indica a un paciente que se auto-administre un fármaco y/o proporciona a un paciente una prescripción para un fármaco está administrando el fármaco al paciente.

Según se utiliza en la presente memoria, un "sujeto" o "paciente" es un mamífero, típicamente un ser humano, pero opcionalmente un animal mamífero de importancia veterinaria, incluyendo pero no limitado a, caballos, ganado vacuno, ovejas, perros, y gatos.

Según se utiliza en la presente memoria, una "manifestación" de una enfermedad se refiere a un síntoma, signo, estado anatómico (p. ej., carencia de células de los islotes), estado fisiológico (p. ej., nivel de glucosa), o informe (p. ej., nivel de triglicéridos) característico de un sujeto con la enfermedad.

Según se utiliza en la presente memoria, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un fármaco o agente es una cantidad de un fármaco o agente que, cuando se administra a un sujeto con una enfermedad o afección tendrá el efecto terapéutico deseado, p. ej., alivio, mejora, paliación o eliminación de una o más manifestaciones de la enfermedad o afección en el sujeto. El efecto terapéutico completo no se produce necesariamente por la administración de una dosis y puede ocurrir solo después de la administración de una serie de dosis. Por lo tanto, una cantidad terapéuticamente eficaz se puede administrar en una o más administraciones.

Según se utiliza en la presente memoria, una "cantidad profilácticamente eficaz" de un fármaco es una cantidad de fármaco que, cuando se administra a un sujeto, tendrá el efecto profiláctico deseado, p. ej., prevenir o retrasar la aparición (o reaparición) de la enfermedad o síntomas, o reducir la probabilidad de la aparición (o reaparición) de enfermedades o síntomas. El efecto profiláctico completo no se produce necesariamente por la administración de una dosis y puede ocurrir solo después de la administración de una serie de dosis. Por lo tanto, una cantidad profilácticamente eficaz puede administrarse en una o más administraciones.

Por "farmacéuticamente aceptable", se entiende que el vehículo, diluyente o excipiente debe ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial para el receptor de los mismos.

Según se utiliza en la presente memoria, "TID", "QD" y "QHS" tienen su significado corriente de "tres veces al día", "una vez al día", y "una vez antes de acostarse", respectivamente.

- La administración de un agente "combinado con" incluye la administración paralela (administración de ambos agentes al paciente a lo largo de un período de tiempo, tal como la administración de un anticuerpo monoclonal y una hormona peptídica tal como una hormona incretina o un análogo en días alternos durante un mes), la co-administración (en la que los agentes se administran aproximadamente al mismo tiempo, p. ej., en el plazo de aproximadamente unos pocos minutos a unas pocas horas entre sí), y la co-formulación (en la que los agentes se combinan o se componen en una sola forma de dosificación adecuada para administración oral, subcutánea o parenteral).
- 5 Los "inhibidores de DPP-4", son inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4.
- "INGAP de hámster" es un péptido asociado a la neogénesis de los islotes no humano que tiene la secuencia Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Ser-His-Gly-Thr-Leu-Pro-Asn-Gly-Ser (SEQ ID NO: 26). Este péptido es un fragmento de la proteína INGAP de hámster que tiene la secuencia Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Ser-His-Gly-Thr-Leu-Pro-Asn-Gly-Ser (SEQ ID NO: 27).
- 15 "GIP" es el péptido inhibidor gástrico, también conocido como polipéptido insulínico dependiente de glucosa.
- "GLP-1" es el péptido 1 de tipo glucagón.
- "HIP3" (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu (SEQ ID NO: 2)) es un Péptido proislotes Humano en forma purificada, sintética, o recombinante. HIP3 tiene un peso molecular de aproximadamente 1564,6.
- "HIP1" (Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly (SEQ ID NO: 3)) es un Péptido proislotes Humano en forma purificada, sintética, o recombinante.
- 20 "HIP2" (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly (SEQ ID NO: 4)) es un Péptido proislotes Humano en forma purificada, sintética, o recombinante. HIP2 tiene un peso molecular de aproximadamente 1435,5.
- HIP3 Bloqueado o HIP3B (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-NH<sub>2</sub>) (SEQ ID NO: 5)) es de un Péptido proislotes Humano que ha sido bloqueado con un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal, en forma purificada, sintética, o recombinante. HIPB tiene un peso molecular de aproximadamente 1605,7.
- 25 HIP 1 Bloqueado (Ac-Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-NH<sub>2</sub>) (SEQ ID NO: 6)) es un Péptido proislotes Humano que ha sido bloqueado con un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal, en forma purificada, sintética, o recombinante.
- HIP2 Bloqueado o HIP2B (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-NH<sub>2</sub>) (SEQ ID NO: 7)) es un ser Péptido proislotes Humano que ha sido bloqueado con un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal, en forma purificada, sintética, o recombinante. HIP2B tiene un peso molecular de aproximadamente 1476,6.
- 30 Péptido INGAP Bloqueado o INGAPB es un Péptido INGAP que ha sido bloqueado con un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal, en forma purificada, sintética, o recombinante.
- 35 HIP3Cys (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-Cys) (SEQ ID NO: 8)) es un Péptido proislotes Humano que tiene un residuo de cisteína C-terminal adicional, en forma purificada, sintética o recombinante (comparativo).
- HIP 1 Cys (Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys) (SEQ ID NO: 9)) es un Péptido proislotes Humano que tiene un residuo de cisteína C-terminal adicional, en forma purificada, sintética o recombinante (comparativo).
- 40 HIP2Cys (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys) (SEQ ID NO: 10)) es un Péptido proislotes Humano que tiene un residuo de cisteína C-terminal adicional, en forma purificada, sintética o recombinante (comparativo).
- Péptido INGAPCys o INGAPCys es un Péptido INGAP que tiene un residuo de cisteína C-terminal adicional, en forma purificada, sintética o recombinante (comparativo).
- 45 Dímero HIP3Cys (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys)<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 11)) es un dímero Péptido proislotes Humano en donde cada monómero ha sido modificado para incluir un residuo de cisteína C-terminal, en forma purificada, sintética, o recombinante. El dímero se forma a través de la creación de un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína de los monómeros individuales (comparativo).

- Dímero HIP1Cys (Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-Cys)<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 12)) es un dímero del Péptido proslotes Humano en donde cada monómero ha sido modificado para incluir un residuo de cisteína C-terminal, en forma purificada, sintética, o recombinante. El dímero se forma a través de la creación de un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína de los monómeros individuales (comparativo).
- 5 Dímero HIP2Cys (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys)<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 13)) es un dímero de Péptido proslotes Humano en donde cada monómero ha sido modificado para incluir un residuo de cisteína C-terminal, en forma purificada, sintética, o recombinante. El dímero se forma a través de la creación de un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína de los monómeros individuales. HIP2 tiene un peso molecular de aproximadamente 1435,5 (comparativo).
- 10 Dímero INGAPCys es un dímero de Péptido INGAP en donde cada monómero ha sido modificado para incluir un residuo de cisteína N-terminal, en forma purificada, sintética, o recombinante (comparativo).
- HIP3Cys Bloqueado (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-Cys-NH<sub>2</sub>) (SEQ ID NO: 14)) es un Péptido proslotes Humano que ha sido modificado para incluir un residuo de cisteína C-terminal y ha sido bloqueado con un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal, en forma purificada, sintética, o recombinante.
- 15 HIP1Cys Bloqueado (Ac-Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys-NH<sub>2</sub>) (SEQ ID NO: 15)) es un Péptido proslotes Humano que ha sido modificado para incluir un residuo de cisteína C-terminal y ha sido bloqueado con un grupo acetilo N-terminal y una grupo amida C-terminal, en forma purificada, sintética, o recombinante.
- 20 HIP2Cys Bloqueado (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys-NH<sub>2</sub>) (SEQ ID NO: 16)) es un Péptido proslotes Humano que ha sido modificado para incluir un residuo de cisteína C-terminal y ha sido bloqueado con un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal, en forma purificada, sintética, o recombinante.
- 25 INGAPCys Bloqueado es Péptido INGAP que ha sido modificado para incluir un residuo de cisteína C-terminal y ha sido bloqueado con un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal, en forma purificada, sintética, o recombinante.
- Dímero HIP3Cys Bloqueado (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-Cys-NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 17) es un dímero de Péptido proslotes Humano en donde cada monómero ha sido modificado para incluir un residuo de cisteína C-terminal y ha sido bloqueado con un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal, en forma purificada, sintética, o recombinante. El dímero se forma a través de la creación de un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína de los monómeros individuales.
- 30 Dímero HIP1Cys Bloqueado (Ac-Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys-NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 18) es un dímero de Péptido proslotes Humano en donde cada monómero ha sido modificado para incluir un residuo de cisteína C-terminal y ha sido bloqueado con un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal, en forma purificada, sintética, o recombinante. El dímero se forma a través de la creación de un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína de los monómeros individuales.
- 35 Dímero HIP2Cys Bloqueado o Dímero HIP2B Cys (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys-NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 19) es un dímero de Péptido proslotes Humano en donde cada monómero ha sido modificado para incluir un residuo de cisteína C-terminal y ha sido bloqueado con un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal, en forma purificada, sintética, o recombinante. El dímero se forma a través de la creación de un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína de los monómeros individuales. El dímero HIP2B Cys tiene un peso molecular de aproximadamente 3157,5.
- 40 Dímero INGAPCys Bloqueado es dímero de Péptido INGAP en donde cada monómero ha sido modificado para incluir un residuo de cisteína C-terminal y ha sido bloqueado con un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal, en forma purificada, sintética, o recombinante. El dímero se forma a través de la creación de un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína de los monómeros individuales.
- 45 HIP3CysPEG (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-Cys (PEG)) (SEQ ID NO: 20) es un péptido proslotes humano que ha sido modificado para incluir un residuo de cisteína C-terminal que se ha unido covalentemente a un constructo de PEG de 40 kD activado con maleimida dimérica, en forma purificada, sintética, o recombinante (Comparativo).
- 50 HIP1CysPEG (Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys (PEG)) (SEQ ID NO: 21) es un Péptido proslotes Humano que ha sido modificado para incluir un residuo de cisteína C-terminal al que se ha unido covalentemente a un constructo de PEG de 40 kD activado con maleimida dimérica, en forma purificada, sintética, o recombinante (Comparativo).

HIP2CysPEG (Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys (PEG)) (SEQ ID NO: 22) es un Péptido proislotes Humano que ha sido modificado para incluir un residuo de cisteína C-terminal al que se ha unido covalentemente a un constructo de PEG de 40 kD activado con maleimida dimérica, en forma purificada, sintética, o recombinante (Comparativo).

5 INGAPCysPEG es Péptido INGAP que ha sido modificado para incluir un residuo de cisteína C-terminal al que se ha unido covalentemente un constructo de PEG de 40 kD activado con maleimida dimérica, en forma purificada, sintética, o recombinante (Comparativo).

10 HIP3CysBloqueadoPEG (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Glu-Cys(PEG)-NH<sub>2</sub>) (SEQ ID NO: 23) es un Péptido proislotes Humano que ha sido bloqueado con un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal, y modificado para incluir un residuo de cisteína C-terminal al que se ha unido covalentemente un constructo de PEG de 40 kD activado con maleimida dimérica, en forma purificada, sintética, o recombinante.

15 HIP1CysBloqueadoPEG (Ac-Trp-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys(PEG)-NH<sub>2</sub>) (SEQ ID NO: 24) es un Péptido proislotes Humano que ha sido bloqueado con un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal, y modificado para incluir un residuo de cisteína C-terminal al que se ha unido covalentemente un constructo de PEG de 40 kD activado con maleimida dimérica, en forma purificada, sintética, o recombinante.

20 [00114J HIP2CysBloqueadoPEG o HIP2B Cys-PEG (Ac-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Thr-Gln-Gly-Thr-Glu-Pro-Asn-Gly-Cys(PEG)-NH<sub>2</sub>) (SEQ ID NO: 25) es un Péptido proislotes Humano que ha sido bloqueado con un grupo acetilo N-terminal y un grupo amida C-terminal, y modificado para incluir un residuo de cisteína C-terminal al que se ha unido covalentemente un constructo de PEG de 40 kD activado con maleimida dimérica, en forma purificada, sintética, o recombinante. HIP2B Cys(PEG) tiene un peso molecular de aproximadamente 44782.

INGAPCysBloqueado PEG es un Péptido INGAP que ha sido bloqueado con un grupo acetilo C-terminal y un grupo amida N-terminal, y modificado para incluir un residuo de cisteína C-terminal al que se ha unido covalentemente un constructo de PEG de 40 kD activado con maleimida dimérica, en forma purificada, sintética, o recombinante (Comparativo).

25 REG3G es un precursor de la proteína 3 gamma derivada de islotes en regeneración humana tiene la secuencia MLPPMALPSVSWMLLSCILLCQVQGEETQKELPSRISCPKGSKAYGSPCYALFLSPKSWMDADLACQKRPSGKLV SVLSGAEGSFVSSLVRSISNSYSYIWIGLHDPTQGSEPDGDGWEWSSTDVMNYFAWEKNPSTILNPGHCGSLSRST GFLKWKDYNCDAKLPYVCKFKD (SEQ ID NO: 28). El péptido REG3G es un péptido precursor de la proteína 3 gamma derivada de islotes en regeneración humana derivado de REG3G que tiene la secuencia IGLHDPTQGSEPDG (SEQ ID NO: 29). Otros péptidos REG3G son WIGLHDPTQGSEPDG (SEQ ID NO: 58) e IGLHDPTQGSEPDGD (SEQ ID NO: 59).

35 Las realizaciones de la presente descripción proporcionan estrategias detalladas para optimizar la estabilidad y solubilidad de los péptidos proislotes, incluyendo HIP, para un mejor uso como agente terapéutico. HIP es un fragmento peptídico de la proteína alfa 3 derivada de islotes en regeneración humana (REG3A) (NM\_138937.1), también conocido como precursor de proteína asociada a la pancreatitis (NP--002571) situado en el cromosoma 2, ubicación 2p12 posición 79240075 (SEQ ID NO: 1). HIP3, HIP1 e HIP2 inducen o estimulan la neogénesis de islotes en células progenitoras residentes en el páncreas. Estos agentes de neogénesis utilizados de acuerdo con los métodos de la presente descripción dan como resultado formas Optimizadas de péptidos proislotes, incluyendo HIP, que demuestran un aumento de la estabilidad, solubilidad y eficacia *in vivo* cuando se utilizan como agente terapéutico para tratar enfermedades. Estas enfermedades incluyen, pero no se limitan a la diabetes mellitus (diabetes tipo 1), la diabetes tipo 2 (diabetes mellitus no insulino dependiente y diabetes de comienzo en la edad adulta, diabetes de la infancia y adolescencia que requieren insulina), y Diabetes Autoinmune Latente del Adulto (LADA).

45 Las realizaciones de la descripción también proporcionan composiciones farmacéuticas y terapias para el tratamiento de la disfunción pancreática, incluyendo la diabetes tipo 1 y tipo 2, con tales composiciones. En una realización, estas composiciones comprenden péptidos proislotes Optimizado, incluyendo HIP Optimizado como se define en la reivindicación 1. En otra realización, estas composiciones incluyen péptidos proislotes Optimizados, incluyendo HIP Optimizado y otros agentes que afectan al metabolismo de la glucosa. Incluidos entre estos otros agentes se encuentran agentes que intervienen en la neogénesis de los islotes pancreáticos y agentes que inhiben, bloquean, o destruyen las células autoinmunitarias que se dirigen a las células de los islotes pancreáticos. En una realización, las terapias descritas en la presente memoria se llevan a la práctica mediante la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de péptidos proislotes Optimizados, incluyendo HIP Optimizado, a un mamífero que necesite tal terapia. En otra realización, las terapias descritas en la presente memoria se llevan a la práctica mediante la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de péptidos proislotes Optimizados, incluyendo HIP Optimizado, a un mamífero que necesite tal terapia combinado con otro agente (tal como una hormona o compuesto) que afecta al metabolismo de la glucosa, incluyendo pero no limitado a hormonas o compuestos que están implicados en la regeneración de células beta, la saciedad, y el vaciado gástrico, tales como GLP-1, GIP,

análogos del receptor de GLP-1, análogos de GLP-1, e Inhibidores Dipeptidil Peptidasa-4, que evitan la destrucción de GLP-1, y agentes que inhiben, bloquean o destruyen las células autoinmunitarias que se dirigen a las células pancreáticas. En esta última realización, el HIP Optimizado y el otro agente pueden administrarse por separado o se pueden mezclar primero para proporcionar una composición combinada y administrar simultáneamente.

- 5 El análisis con micromatrices de la expresión génica en ratones NOD ha mostrado la regulación al alza de los genes Reg específicamente en la neogénesis de los islotes. Además, se ha sabido que los genes Reg se regulan al alza en el desarrollo fetal tardío para poblar el páncreas de un ser humano en desarrollo para mantener su propio metabolismo de la glucosa postparto. Se ha demostrado que el trasplante simultáneo de tejido fetal con células epiteliales pancreáticas no endocrinas (NEPEC) dan como resultado la estimulación de nuevas estructuras de los islotes a partir de la población de NEPEC. La regulación al alza de Reg en el material fetal co-trasplantado era probable el estímulo para este efecto.

Los estudios in vivo han demostrado que HIP1, HIP2 e HIP3, cuando son introducidos en ratones diabéticos, estimulan la diferenciación de células progenitoras en el páncreas a nuevas estructuras de islotes.

- 15 Aunque es eficaz en la neogénesis de las estructuras de los islotes, sigue existiendo la necesidad de optimizar los péptidos proislotes, incluyendo variantes de HIP, con el fin de mejorar su solubilidad, estabilidad y biodisponibilidad para la administración como agentes terapéuticos. Las modificaciones de los péptidos proislotes, incluyendo las variantes de la HIP, que disminuirán sus posibilidades de degradación de proteasas aumentarán su eficacia reduciendo así la dosificación necesaria para un efecto terapéutico positivo. Estas modificaciones dan como resultado lo que se ha etiquetado como "péptidos proislotes Optimizados" o "HIP Optimizado".

- 20 En una realización, los péptidos proislotes Optimizados, incluyendo HIP Optimizado, son proporcionados por la presente descripción en forma purificada, sintética, o recombinante y son útiles para su administración como se describe en la presente memoria para inducir la neogénesis de islotes pancreáticos.

- Adicionalmente, los péptidos proislotes Optimizados, incluyendo HIP Optimizado, se pueden almacenar de forma estable durante largos períodos de tiempo. HIP Optimizado es estable durante meses cuando se almacena a 20°C en solución salina isotónica.

- 25 En una realización específica, los péptidos proislotes Optimizados, incluyendo HIP Optimizado, son funcionalmente hiperactivos, es decir, capaces de exhibir una actividad mayor de una o más de las actividades funcionales asociadas con REG3A, otros péptidos HIP, y homólogos de HIP no humanos, tales como el INGAP de hámster.

- 30 Debido a la degeneración de las secuencias codificantes de nucleótidos, se puede utilizar en la práctica de la presente descripción una variedad de secuencias de ADN que codifican secuencias de aminoácidos iguales o sustancialmente similares a los péptidos proislotes Optimizados, incluyendo HIP Optimizado, para preparar vectores de expresión para la producción de péptidos proislotes Optimizados recombinantes, incluyendo variantes de HIP Optimizados. Estas incluyen, pero no se limitan a, secuencias de ácidos nucleicos que comprenden la totalidad o porciones de péptidos proislotes Optimizados, incluyendo HIP Optimizado, que son alterados por la sustitución de diferentes codones que codifican un residuo de aminoácido igual o funcionalmente equivalente dentro de la secuencia, produciendo de ese modo un cambio silencioso. Los péptidos proislotes Optimizados, incluyendo HIP Optimizado, y derivados de los mismos incluyen, pero no se limitan a, aquellos que contienen, como secuencia de aminoácidos primaria, la totalidad o parte de las secuencias de aminoácidos de los péptidos proislotes Optimizados, incluyendo variantes de HIP Optimizado, incluyendo secuencias alteradas en las que se sustituyen residuos de aminoácidos funcionalmente equivalentes por residuos dentro de la secuencia dando como resultado un cambio silencioso. Por ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos dentro de la secuencia se pueden sustituir por otro aminoácido de una polaridad similar que actúa como un equivalente funcional, dando como resultado una alteración silenciosa. Los sustitutos de un aminoácido dentro de la secuencia se pueden seleccionar entre otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparragina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (alcalinos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Los péptidos proislotes Optimizados, incluyendo los derivados de HIP Optimizado, también incluyen, pero no se limitan a, aquellos que contienen, como secuencia de aminoácidos primaria, toda o parte de la secuencia de aminoácidos del péptido proislotes, incluyendo HIP, incluyendo secuencias alteradas en las que los residuos de aminoácido son sustituidos por residuos con propiedades químicas similares. En una realización específica, se sustituyen 1, 2, 3, 4, o 5 aminoácidos de HIP Optimizado dando como resultado análogos y/o derivados de HIP optimizado.

- 55 También se describen proteínas quiméricas o de fusión. Según se utiliza en la presente memoria, una "proteína quimérica" o "proteína de fusión" comprende péptidos proislotes Optimizados, incluyendo HIP Optimizado, o un análogo o derivado del mismo conectado operativamente a un péptido no proislotes o polipéptido HIP o un análogo o derivado de los mismos. Dentro de la proteína de fusión, el péptido proislotes Optimizado o HIP y el polipéptido no



proislotes o HIP están "conectados operativamente", es decir se fusionan en marco entre sí. El polipéptido no proislotes o HIP se pueden fusionar al extremo N-terminal o C-terminal del péptido proislotes Optimizado o HIP. Por ejemplo, la proteína de fusión puede ser HIP optimizado que contiene una secuencia señal heteróloga en su extremo N-terminal. En ciertas células anfitrionas (p. ej., células anfitrionas de mamífero), la expresión y/o secreción de HIP Optimizado o un análogo o derivado del mismo se puede incrementar mediante el uso de una secuencia señal heteróloga. En otro ejemplo más, la proteína de fusión es una proteína de fusión de HIP Optimizado-inmunoglobulina en la que la secuencia de la HIP Optimizado está fusionada a secuencias derivadas de un miembro de la familia de proteínas inmunoglobulinas. La proteína de fusión de HIP Optimizado-inmunoglobulina se puede incorporar a composiciones farmacéuticas y administrar a un sujeto para inhibir una respuesta inmunológica de acuerdo con la presente descripción.

Los péptidos proislotes Optimizados, incluyendo HIP Optimizado, para uso como se describe en la presente memoria pueden ser modificados químicamente con el propósito de mejorar la biodisponibilidad, y/o aumentar la eficacia, la solubilidad y la estabilidad. Por ejemplo, la proteína puede estar conectada covalentemente o no covalentemente a albúmina, transferrina o radicales de polietilenglicol adicionales (PEG).

Los péptidos proislotes Optimizados, incluyendo HIP Optimizado, para su uso como se describe en la presente memoria se pueden producir mediante mecanismos de ADN recombinante convencionales de acuerdo con las enseñanzas de la presente memoria y conocidos en la técnica. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias polipeptídicas se pueden ligar entre sí en marco de acuerdo con los mecanismos convencionales, p. ej., mediante el empleo de terminales de extremos romos o escalonados para la ligación, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos apropiados, rellenado de extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar una unión no deseable, y ligación enzimática. Además, el gen de fusión se puede sintetizar por medio de mecanismos convencionales incluyendo sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, se puede llevar a cabo la amplificación por PCR de los fragmentos génicos utilizando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que posteriormente pueden hibridarse y reamplificarse para generar una secuencia génica quimérica. Por otra parte, se encuentran disponibles en el mercado muchos vectores de expresión que ya codifican un radical de fusión (p. ej., un polipéptido GST). Se puede clonar un ácido nucleico que codifica HIP optimizado en un vector de expresión de manera que el radical de fusión está conectado en marco a HIP Optimizado. La proteína de fusión puede ser un HIP Optimizado fusionado a una etiqueta de His o etiqueta epitópica (p. ej., V5) para ayudar a la purificación y detección del HIP Optimizado, recombinante o para enmascarar la respuesta inmunitaria en un sujeto. Las secuencias cortas de aminoácidos de HIP Optimizado hacen también fácilmente posible la producción sintética de estos péptidos valiosos, y se encuentra disponible en el mercado una variedad de aparatos automatizados para la síntesis de péptidos, y los métodos de síntesis para la síntesis de péptidos que no requieren la automatización son conocidos desde hace tiempo y se pueden utilizar de acuerdo con las enseñanzas de la presente memoria para preparar HIP Optimizado.

En algunas realizaciones, los péptidos proislotes Optimizados, incluyendo HIP Optimizado, se pueden modificar de manera que tengan una vida media *in vivo* prolongada utilizando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el fragmento Fc de la IgG humana o moléculas poliméricas inertes tales como polietilenglicol de alto peso molecular (PEG) se pueden anclar a HIP Optimizado con o sin un conector multifuncional ya sea a través de conjugación específica de sitio del PEG al extremo N- o C-terminal de la proteína ya sea a través de grupos épsilon-amino presentes en los residuos de lisina. Se utilizará la derivatización de polímeros lineales o ramificados que dé como resultado una pérdida mínima de actividad biológica. El grado de conjugación puede ser controlado estrechamente mediante SDS-PAGE y espectrometría de masas para garantizar la conjugación adecuada de las moléculas de PEG a HIP Optimizado. El PEG que no ha reaccionado se puede separar de los productos conjugados de HIP Optimizado-PEG mediante cromatografía de exclusión por tamaño o de intercambio iónico. Los productos conjugados derivatizados de PEG se pueden someter a ensayo para determinar su eficacia *in vivo* utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Las realizaciones de la presente descripción proporcionan formulaciones de péptidos proislotes modificados, incluyendo formulaciones de HIP Optimizado, y terapias basadas en proislotes Optimizados o en HIP para su uso en el tratamiento de la diabetes y otras diversas indicaciones que implican el deterioro la función pancreática.

En una realización, un péptido proislotes se optimiza mediante la adición de un grupo amida C-terminal y un grupo acetilo N-terminal bloqueando de esta manera eficazmente la actividad proteolítica por las proteasas que reconocen y se degradan extremos libres de los péptidos en el suero y dando como resultado compuestos de péptidos proislotes Optimizados.

En una realización, HIP3, HIP1 y/o HIP2 se optimizan mediante la adición de un grupo amida C-terminal y un grupo acetilo N-terminal bloqueando de esta manera eficazmente la actividad proteolítica por las proteasas que reconocen y se degradan extremos libres de péptidos en el suero y dando como resultado compuestos de HIP Optimizado HIP3 bloqueado (SEQ ID NO: 5), HIP1 Bloqueado (SEQ ID NO: 6) e HIP2 bloqueado (SEQ ID NO: 7), respectivamente. Estos grupos bloqueadores añadidos fueron preparados mediante Síntesis de Péptidos en Fase Sólida (SPPS). La

premia fundamental de la síntesis en fase sólida es que los aminoácidos se pueden ensamblar a un péptido de cualquier secuencia deseada, mientras que un extremo de la cadena se ancla a un soporte insoluble. Como se mencionó anteriormente, en la SPPS práctica el extremo carboxilo terminal del péptido está conectado al polímero. Después de la secuencia deseada de aminoácidos haya sido conectada sobre el soporte, se puede aplicar un reactivo para escindir la cadena peptídica del soporte y liberar el péptido bruto en la disolución. Todas las reacciones implicadas en la síntesis se llevan a término si fuera posible, de modo que se pueda obtener un producto homogéneo.

Cuando el extremo C de un péptido es una amida, el derivado es una amida peptídica. Las amidas peptídicas son derivados extremadamente importantes, ya que muchas hormonas peptídicas de origen natural están presentes en forma de amidas. Para sintetizar amidas peptídicas en fase sólida se han desarrollado resinas en fase sólida que producen amidas peptídicas directamente tras la escisión. Cuando el extremo N es un grupo acetilo, el péptido se ensambla desde el extremo C al extremo N. El extremo N es acetilado a continuación, utilizando anhídrido acético en presencia de una base.

El péptido proislotes Optimizado o HIP se puede utilizar para tratar cualquier mamífero, incluyendo seres humanos y animales, que padecen una enfermedad, síntoma o afección relacionados con una disminución de la producción o secreción de insulina debido a la pérdida o disminuido de función de las células beta o la necesidad de una mayor producción de insulina que puede ser proporcionada al sujeto a través de la diferenciación de nuevas estructuras de islotes a partir de células progenitoras que utilizan los compuestos de HIP Optimizado y métodos de tratamiento. Tales enfermedades y afecciones incluyen la diabetes mellitus de tipo 1, diabetes de tipo 2, pre-diabetes, alteración de la glucosa en ayunas, hiperinsulinemia en ayunas, incluyendo pero no limitada a los pacientes con diabetes de tipo 1a o pacientes con diabetes autoinmune latente de la edad adulta, que pueden manifestar anticuerpos (anticuerpos anti-GAD65, anticuerpos anti-islotes, o anticuerpos anti-insulina) o aquellos pacientes con diabetes de tipo 1 con deficiencia de insulina sin autoinmunidad dirigida hacia las células beta (diabetes de tipo 1b) tipo. Por otra parte, las realizaciones de la presente descripción se pueden llevar a la práctica con un beneficio terapéutico para los pacientes recién diagnosticados de diabetes de tipo 1, los hermanos y los parientes de primer grado de los pacientes con diabetes de tipo 1, y las personas con anticuerpos positivos y otras afecciones autoinmunitarias que indican una predisposición a la diabetes de tipo 1. En una realización, los péptidos descritos en la presente memoria se proporcionan para revertir la diabetes de tipo 1 en un paciente que necesite tal tratamiento.

Las terapias combinadas y las composiciones relacionadas también se pueden emplear como terapia coadyuvante para la terapia con insulina en diabetes tipo 1 en niños y adultos, para mejorar los cambios de glucosa en los pacientes con diabetes, y en pacientes con una diabetes mal controlada, hipoglicemia asintomática, e hipoglicemia recurrente en la diabetes tipo 1.

El péptido proislotes Optimizado o HIP y las composiciones relacionadas se pueden usar para tratar pacientes que tienen diabetes tipo 2 recién diagnosticada, diabetes tipo 2 en niños y adultos con hiperglicemia, diabetes tipo 2 en tratamiento concurrente con insulina, terapias diabéticas orales u otras terapias diabéticas subcutáneas, y diabetes tipo 2 mal controlada. En algunos pacientes, tanto niños como adultos, las composiciones descritas en la presente memoria pueden revertir la diabetes tipo 1 y 2. Las composiciones descritas en la presente memoria también se pueden utilizar para tratar tanto a niños como adultos que tienen formas atípicas de diabetes y pacientes que tienen las condiciones de hiperglicemia postprandial.

El péptido proislotes Optimizado o HIP y las composiciones relacionadas también se pueden utilizar para tratar a pacientes que son niños, así como los pacientes adultos, que necesitan pérdida de peso, reducción de los triglicéridos, colesterol LDL, incluyendo pero no limitados a lograr la pérdida de peso o tratar la obesidad, sobrepeso en pacientes que tienen diabetes, así como aquellos que no tienen diabetes tipo 1 o 2. En una realización, las composiciones descritas en la presente memoria se utilizan para tratar un paciente que tiene obesidad mórbida. En otras realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria se utilizan para tratar a un paciente que tiene obesidad mórbida o pacientes que tienen anorexia, bulimia, u otros trastornos de la alimentación.

Las terapias Optimizadas con un agente único y las composiciones relacionadas también se pueden utilizar para tratar a niños y adultos que tienen síndrome dismetabólico o síndrome metabólico, así como pacientes que muestran las condiciones de síndromes de dolor neuropático secundario a metabolismo alterado de la glucosa, y aquellos con hipertrigliceridemia con y sin diabetes, e hipertrigliceridemia postprandial. En una realización, estos péptidos se proporcionan para tratar el síndrome de ovario poliquístico en una paciente que necesite tal tratamiento.

Otros pacientes que pueden beneficiarse del péptido proislotes Optimizado o HIP incluyen niños y pacientes adultos con diagnóstico de afecciones tales como hiperglicemia en ayunas, pre-diabetes, alteración de la glucosa en ayunas, tolerancia alterada a la glucosa, y condiciones de hiperglicemia en general.

El péptido proislotes Optimizado o HIP o las composiciones relacionadas también se pueden utilizar para tratar a pacientes con síndromes de dolor neuropático y neuropatía, independientemente de si el paciente ha sido diagnosticado como diabético.

El péptido proislotes Optimizado o HIP y las composiciones relacionadas también se pueden utilizar para tratar a pacientes que tienen pancreatitis recurrente o cáncer de páncreas y se pueden utilizar en todas las modalidades destinadas a lograr nuevas estructuras de los islotes derivadas de células progenitoras en el páncreas.

En una realización, el agente que estimula la diferenciación de los islotes a partir de células progenitoras pancreáticas a estructuras de islotes productoras de insulina se selecciona entre péptido proislotes Optimizado o HIP. En otra realización, una combinación de péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP, y otro agente estimula la neogénesis de células de los islotes. Este agente adicional puede ser, por ejemplo, amilina y/o un análogo, incluyendo, pero no limitado a Pramlintida (SYMLIN™), análogos del receptor de GLP-1, exendina-4 (EXENATIDE™), Liraglutida (NN2211), GLP-1, análogos de GLP-1, GIP, GLP-1, INGAP de hámster, otras hormonas miméticas de incretinas, y/o compuestos y agentes que actúan de manera similar, y agentes que prolongan la vida media o aumentan el nivel o la actividad de cualquiera de los compuestos y agentes anteriores, tales como, p. ej., inhibidores de dipeptidil peptidasa-4, que retrasan la degradación de GLP-1. Existen numerosos miméticos de GLP-1 que actúan a través de la actividad agonística directa sobre los receptores de GLP-1 o mediante la inhibición de la degradación de GLP-1. Estos agentes son útiles en ciertas realizaciones de la presente descripción. Los miméticos de GLP-1 se pueden utilizar junto con HIP y/o una terapia inmunitaria dirigida para el tratamiento de la diabetes tipo 1, y, se pueden utilizar para mejorar el control glicémico, aumentar la saciedad, retrasar la absorción de glucosa intestinal y dar lugar a una inversión de los mecanismos subyacentes que dan como resultado la diabetes tipo 1. Estos agentes pueden prevenir el progreso de la tolerancia alterada a la glucosa en la diabetes; prevenir la pre-diabetes, el progreso de alteración de la glucosa en ayunas a la tolerancia alterada a la glucosa y diabetes; revertir la diabetes tipo 2 recién diagnosticada; tratar la diabetes tipo 2, y tratar o prevenir el sobrepeso, la obesidad, el síndrome del ovario poliquístico, y los síndromes del dolor neuropático.

Los agentes y las formulaciones farmacéuticas útiles en la práctica de la presente descripción logran la diferenciación de islotes pancreáticos a partir de células progenitoras en el páncreas adulto e incluyen los descritos para otros fines en las siguientes referencias, cada una de los cuales se incorpora a la presente memoria como referencia: Rosenberg et al., 1992, *Adv. Exp. Med. Biol.* 321: 95-104; Mar. 1996, *Diabetologia* 39(3): 256-62; Jul. 1996, *Pancreas* 13(1): 38-46; y Nov. 2004, *Ann. Surg.* 240(5): 875-84; Vinik et al., Jun. 1997, *Horm. Metab. Res.* 29(6): 278-93. La estimulación satisfactoria de la regeneración de islotes o la diferenciación de células progenitoras pancreáticas se puede demostrar a través del aumento de producción y/o secreción de insulina en un sujeto.

En una realización, se emplean amilina o un análogo de amilina tal como Symlin™ o Pramlintida antes de la administración o en la administración concomitante con HIP Optimizado. La amilina se puede administrar antes de la regeneración de los islotes y continuar a lo largo de la administración durante el período de regeneración de los islotes de acuerdo con las enseñanzas de la referencia Young et al., 1997, *Curr. Opin. Endocrin. Diabetes* 4: 282-290. En una realización, la amilina y/o un análogo, incluyendo, pero no limitado a, pramlintida, se administran por vía subcutánea para optimizar el control glicémico antes del inicio del HIP Optimizado y a continuación se pueden utilizar solo o combinado con otros péptidos estimuladores de los islotes, tales como HIP Optimizado o un HIP Optimizado. En una realización, la amilina o pramlintida se dosifican a 0,3-0,8 microgramos por kilogramo de peso del paciente, en una realización, esta dosis se administra por vía subcutánea antes de las comidas, por ejemplo, QHS y 3 AM. En una realización, la dosis terapéuticamente eficaz se suministra por vía subcutánea o a través de un dispositivo/bomba de infusión y/o un sistema de liberación transdérmico, intranasal, bucal, con microagujas, método de encapsulación oral. En otra realización, la dosis terapéuticamente eficaz se administra utilizando formulaciones de liberación sostenida que requieren la administración mediante inyección u otro método de liberación no más frecuentemente de una vez a la semana, una vez cada 2 semanas o una vez al mes. Como se señaló anteriormente, en algunas realizaciones, la amilina o pramlintida se administran conjuntamente con otro agente estimulador de los islotes.

En una realización, se emplea un análogo del receptor de GLP-1, incluyendo exendina-4 o un análogo de exendina 4 en el método con HIP Optimizado a dosis de 5-10 mcg con las comidas. La exendina-4 puede ser formulada y administrada para los propósitos de la presente descripción de acuerdo con las enseñanzas de las siguientes referencias: Alcantara et al., 1998, *Cell Biochem. Funct.* 16 (1): 51-6; Dupre et al., 2004, *J Clin. Endocrin. Metab.* 89 (7): 3469-73; Edwards et al., 1999, *Diabetes* 48: 86-93; y Xu et al., 1999, *Diabetes* 48: 2270-76. En una realización, la exendina-4 se dosifica en el intervalo de 5-10 microgramos antes de las comidas. En una realización, la exendina-4 se administra por vía subcutánea solo o junto con HIP Optimizado y/u otros péptidos estimuladores de los islotes. En una realización, la dosis terapéuticamente eficaz se administra por vía subcutánea. En otra realización, la liberación de exendina-4 es a través de métodos de encapsulación transdérmica, bucal, oral, sistemas de liberación intranasales o con microagujas. En otra realización, la dosis terapéuticamente eficaz está contenida en una formulación de liberación sostenida que requiere la administración no más frecuentemente de una vez a la semana, una vez cada 2 semanas, o una vez al mes. En una realización, la exendina-4 se administra simultáneamente con HIP Optimizado u otro agente de neogénesis de células de los islotes o de transformación de células progenitoras entre pacientes con diabetes tipo 1 o 2, o aquellos con obesidad, sobrepeso, síndrome de resistencia a la insulina, alteración de la glucosa en ayunas, prediabetes, síndrome del ovario poliquístico, síndrome metabólico o trastornos de la alimentación.

GIP y GLP-1 pertenecen a la familia de hormonas de crecimiento de la incretina (véanse las referencias Creutzfeldt, 1979, *Diabetologia* 16: 75-85; Creutzfeldt y Ebert, 1985, *Diabetologia* 28: 565-573; Holst et al., 2001, *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Supl.* 234: 75-85; y Vilsboll et al., Jun 2003, *J. Clin. Endocrin. Metab.* 88 (6): 2706-13, y en una realización, se emplea una hormona incretina o un análogo con o sin el uso concomitante de HIP Optimizado en el método para estimular la diferenciación a islotes a partir de células progenitoras en el páncreas adulto.

En diversas realizaciones, se emplean GIP o un análogo de GIP con el péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP. GIP se puede formular y administrar para los propósitos de la presente descripción de acuerdo con las enseñanzas de las siguientes referencias: Andersen et al., 1978, *J. Clin. Invest.* 62: 152-161; Creutzfeldt et al., Feb. 1980 *Diabetes* 29 (2): 140-5; Dupre et al., 1973, *J. Clin. Endocrin. Metab.* 37: 826- 828; Ebert et al., 1980, *Clinical Gastroenterology* 9 (3): 679-98; Elahi et al., 1979, *Am. J. Physiol.* 237: E185-E191, y 1994, *Regulatory Peptide* 51 (1): 63-74; Krarup et al., Jun. 1983, *J. Clin. Endocrin. Metab.* 56 (6): 1306-1312; Krarup et al., 1987, *Metabolism* 36 (7): 677-82; Krarup et al., 1988, *Acta Med. Scand.* 225 (5): 437-41; Lynn et al., 2003, *FASEB* 17: 19-93; Meir et al., 2002, *Regulatory Peptides* 107: 1-3; y Nauk et al., 1993, *J. Clin. Endocrin. Metab.* 76 (4): 912-7.

En una realización, GIP se administra intravenosamente o subcutáneamente combinado con el péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP y se dosifica a 2-10 nanogramos por kilogramo de peso del paciente para proporcionar una infusión continua de 30 minutos mediante liberación intravenosa o subcutánea comenzando 3-5 minutos antes de las comidas, antes de acostarse, y comenzando a las 3 AM. En una realización GIP se administra por vía subcutánea antes de las comidas, QHS, y 3 AM. En una realización, GIP se administra oralmente o utilizando un dispositivo de infusión o sistemas de liberación transdérmico, bucal, intranasal o con microagujas. En otra realización, se emplea una formulación de liberación sostenida que requiere administración de inyecciones no más frecuentemente de una vez cada semana, una vez cada 2 semanas, o una vez al mes. Las composiciones adecuadas para la administración de GIP se describen para otros fines en la referencia Jones et al. 6 de Nov. 1989 *Diabetes Res. Clin. Pract.* 7 (4): 263-9.

En diversas realizaciones, se emplea GLP-1 o un análogo, o un agonista del receptor de GLP-1 o un Inhibidor de la Dipeptidil Peptidasa-4 combinado con el péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP, en el método para estimular la diferenciación de islotes a partir de células progenitoras, se pueden formular y administrar GLP-1, agonistas del receptor GLP-1, análogos de GLP-1 e inhibidores de DPP-4 para los propósitos de la presente descripción de acuerdo con las enseñanzas de las siguientes referencias: Elahi et al., 1994, *Regulatory Peptides* 51(1): 63-74; Gutniak et al., 1994, *Diabetes Care* 17: 1039-1044; Kreymann et al., 1987, *Lancet* 2: 1300-1304; Larsen et al., 1996, *Diabetes* 45 (Supl. 2): 233A (Resumen); Larsen et al., 2001, *Diabetes Care* 24(8): 1416-1421; List et al., 2004, *Am. J. Physiol Endocrin. Metab.* 286(6): E875-81; Lugari et al., 2000, *Horm. Metab. Res.* 32: 424-428; Márquez et al., Mar 1998, *Cell. Biochem. Funct.* 16(1): 51-6; Meier et al., Marzo de 2004, *Critical Care Medicine* 32(3): 848-851; Meneilly et al., 2003, *Diabetes Care* 26: 2835-41; Nauk et al., 1996, *Diabetologia* 39(12): 1546-1553; Thorens et al., Dic. 1995 *Diabetes Metab.* 21(5): 311-8; Vilsboll et al., 2003, *J. Clin. Endocrin. Metab.* 88(6): 2706-13; Wang et al., 1997, *J. Clin. Invest.* 99: 2883-2889; y Zander et al., 2002, *Lancet* 359: 824-30.

En diversas realizaciones, se administra por vía subcutánea GLP-1, un agonista del receptor de GLP-1, o un análogo de GLP-1 o se administran oralmente inhibidores de DPP-4 combinados con péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP, y se dosifican en el intervalo de 400-800 mg por día a 8-20 mg por kilogramo de peso del paciente. En una realización GLP-1 se administra por vía oral o por vía subcutánea antes de las comidas, QHS. En una realización, GLP-1 se administra utilizando un dispositivo de infusión subcutánea continua a una velocidad de 1-30 ng/kilogramo de peso corporal/minuto o un sistema de liberación transdérmico, bucal, o con microagujas para proporcionar una infusión continua durante 30 minutos mediante liberación por vía intravenosa o subcutánea comenzando 3-5 minutos antes de las comidas, antes de acostarse, y comenzando a las 3 AM. En otra realización, se emplea una formulación de liberación sostenida que requiere una administración de inyecciones no más frecuentemente de una vez cada semana, una vez cada 2 semanas, o una vez al mes.

En una realización, se administra por vía subcutánea Liraglutida (NN2211) combinada con el péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP a dosis de 10-40 microgramos por kilogramo de peso corporal. En otra realización la Liraglutida se administra por vía subcutánea antes de las comidas, QHS, y a las 3 AM. En otra realización, la Liraglutida se administra utilizando un dispositivo de infusión o un sistema de liberación transdérmico, bucal, o con microagujas para proporcionar una infusión continua durante 30 minutos mediante liberación intravenosa o subcutánea comenzando 3-5 minutos antes de las comidas, antes de acostarse, y a partir de las 3 AM. En otra realización, se emplea una formulación de liberación sostenida que requiere la administración de inyecciones no más frecuentemente de una vez cada semana, una vez cada 2 semanas, o una vez al mes.

En una realización de las terapias combinadas, la Liraglutida o NN2211 se administra a una dosis de aproximadamente 20 microgramos por kg de peso del paciente al día combinada con el péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP. Esta dosis proporcionará a los pacientes la capacidad de reducir la insulina en embolada antes de las comidas en 10-20%, con reducción de las fluctuaciones y disminución de la glucosa postprandial, el glucagón y los triglicéridos. La administración de Liraglutida de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria se puede utilizar para mejorar el control glicémico, medido, por ejemplo y sin limitación,

mediante la hemoglobina A1C en la diabetes tipo 1; para prevenir el progreso de la tolerancia alterada a la glucosa en la diabetes; para prevenir el progreso de la alteración de la glucosa en ayunas a tolerancia alterada a la glucosa y diabetes; para revertir la diabetes tipo 2 recién diagnosticada; y para el tratamiento de la diabetes tipo 2.

- 5 En una realización de la terapia combinada, la Liraglutida o NN2211 se administra a una dosis de aproximadamente 20 microgramos por kg de peso del paciente a un paciente adulto en la mañana, aproximadamente 4 horas antes de la ingesta de alimentos, y al acostarse durante tres semanas consecutivas durante la terapia con péptido proislotes Optimizado o HIP. Para los pacientes que inician el tratamiento con niveles de péptido C inferiores a 1,0 ng/mL, se controlan los niveles de péptido C, y cuando suben por encima de 0,5 ng/ml, se administra el anticuerpo hOKT3g1 (ala-ala) durante 12 días consecutivos.
- 10 En las terapias combinadas, la exendina-4 o la exendina-4 sintética u otro análogo de GLP-1, agonista del receptor de GLP-1, o Inhibidor de dipeptidil peptidasa-4 se administran antes de las comidas solos o con el péptido proislotes Optimizado o HIP u otro agente de diferenciación de islotes para mejorar el control glicémico antes de o durante el inicio de terapias con HIP Optimizado. Tales agentes, cuando se liberan antes de las comidas pueden dar como resultado una reducción de la necesidad de insulina de al menos 20% y se llevará a cabo una disminución apropiada de la insulina y medicaciones para la diabetes mientras se administra HIP Optimizado. A medida que se liberan HIP
- 15 Optimizado y/u otros agentes en pacientes de tipo 1 y de tipo 2, tendrá lugar una disminución cuidadosa de la insulina y otros medicamentos para la diabetes para proteger contra la hipoglicemia a medida que las nuevas células de los islotes se diferencian a partir de las células progenitoras. En última instancia, la insulina y las medicaciones para la diabetes, incluyendo HIP Optimizado, se disminuirán, a medida que el páncreas se vuelve a poblar con nuevos islotes funcionales. Para los pacientes que inician el tratamiento con niveles de péptido C menores de
- 20 aproximadamente 1,0 ng/ml, se controlan los niveles de péptido C, y cuando suben por encima de 0,5 ng/ml, se producirá el control cuidadoso y la disminución de las dosis de insulina exógena.

- Entre los pacientes con diabetes tipo 1, antes del inicio de la utilización del péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP, y/u otros compuestos peptídicos (SYMLIN™, INGAP de hámster, GLP-1, agonistas del receptor de GLP-1, análogos de GLP-1, inhibidores de DPP-4 se administrará (antes, durante o después) la terapia inmunitaria para proteger los islotes recién formados. Por ejemplo, el anticuerpo hOKT3g1 (ala-ala) se administra durante 12 días consecutivos con su eficacia demostrada después del primer tratamiento a los 24 meses, mientras que se pueden administrar un anticuerpo monoclonal humanizado similar, ChAglyCD3 durante 6 días consecutivos, y después
- 25 repetir anualmente. El compuesto GAD65 de Diamyd se libera en dos inyecciones subcutáneas, con un mes de diferencia. Se ha demostrado que DiaPep277™, una proteína de choque térmico 60, tiene éxito entre los pacientes con diabetes de nuevo diagnóstico utilizando una inyección subcutánea de 1 mg con 40 mg de manitol en aceite vegetal al inicio del estudio, 1 mes y 6 meses. Basándose en el inmunomodulador seleccionado, se determinará la ciclicidad del tratamiento. En otra realización, se utilizan en la terapia combinada DiaPep277™, una vacuna contra la proteína de choque térmico 60, y vacuna IBC-VSO, que es una forma metabólicamente inactiva, sintética de insulina
- 30 diseñada para evitar la destrucción de las células beta del páncreas, interferón-alfa, o vacunación usando células T reguladoras específicas de antígeno CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> o un agente similar. En otra realización, se utilizan agentes inmunomoduladores, incluyendo, pero no limitados a, agentes de inmunoterapia anti-CD3 y globulina anti-linfocitos T policlonal, combinados con HIP Optimizado. Tales agentes también incluyen: Sirolimus (rapamicina), Tacrolimus (FK506), una proteína de choque térmico 60 (DiaPep277™), vacuna anti-Ácido Glutámico Descarboxilasa 65 (GAD65), Micofenolato de Mofetilo solo o combinado con Daclizumab, agente anti-CD20 Rituximab, Campath-1H (anticuerpo anti-CD52) y/o vitamina D.
- 35
- 40

- Algunas células autoinmunitarias se dirigen a las células beta pancreáticas y por lo tanto desempeñan un papel causal en algunas de las enfermedades y afecciones tratables de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. Véanse las referencias Bach et al., 2001, *Ann. Rev. Immun.* 19: 131-161; Lernmark et al., *Endocrin. Metab. Clin. N. Am.* 20(3): 589-617; y Mathis et al., Dic. 2001 *Nature* 414 (6865): 792-798.
- 45

- Los métodos anteriores de tratamiento que implican la introducción de agentes inmunológicos entre pacientes con diabetes tipo 1, protegen solo las células de los islotes que aún no han sido destruidas por el ataque inmunitario y no atienden a la necesidad de repoblar el páncreas con nuevas estructuras de los islotes con células beta totalmente funcionales. Estos métodos combinan la modulación inmunitaria generalizada y específica dirigida a la reducción de
- 50 destrucción de las células beta y una metodología de diferenciación de nuevas células de los islotes a partir de células progenitoras dentro del páncreas adulto.

- Los péptidos de la presente descripción se pueden emplear con agentes que inhiben específicamente la actividad de o bloquean o destruyen las células autoinmunitarias que eligen como diana las células beta pancreáticas que producen insulina, amilina, o glucagón. Tales agentes incluyen péptidos inmunomoduladores que detienen la
- 55 destrucción de las células de los islotes pancreáticos. Por ejemplo, uno de tales agentes es un anticuerpo monoclonal que puede retrasar el progreso de la pérdida de células de los islotes o ralentizar o detener la aparición de la diabetes de tipo 1. Los anticuerpos anti-CD3 constituyen una clase general de agentes útiles en los métodos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CD3 adecuados para los propósitos de la presente descripción incluyen el anticuerpo TRX4 (Ala-Ala y ChAglyCD3) en desarrollo por TolerRx y el anticuerpo

- anti-CD3 humanizado descrito en la referencia Herold et al., 30 May 2002, *NEJM* 346(22): 1692-1698. En una realización, el anticuerpo anti-CD3 humanizado es liberado por vía intravenosa, 14 días por año a una dosis de 1 a 1,42 µg/kg en el día 1, 5,67 µg/kg el día 2, 11,3 µg/kg el día 3, 22,6 µg/kg el día 4 y 45,4 µg/kg los días 5-14. Estas terapias se pueden repetir anualmente siguiendo el uso de 3-6 meses de HIP Optimizado, mientras que la insulina se va disminuyendo a medida que se produce la formación de nuevas células de los islotes. Durante la fase de tratamiento con HIP Optimizado, se puede continuar con la vitamina D y el uso de Pramlintida/Symmlin™. Tras la interrupción del péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP, y la terapia con insulina, se puede repetir la modulación inmunitaria anualmente para los anticuerpos anti-CD3, aunque un estudio reciente ha encontrado que su eficacia continúa durante tanto como 24 meses.
- 5
- 10 En otra realización, el compuesto inmunomodulador es una proteína de choque térmico que puede detener o ralentizar la destrucción de las células de los islotes. Tales proteínas incluyen DiaPep277™, una proteína de choque térmico en desarrollo por DeveloGen AG. En una realización, DiaPep277™ es liberada por vía subcutánea, administrando 1 mg en 40 mg de manitol en aceite vegetal subcutáneamente al inicio y en el plazo de un mes y a continuación dos veces a intervalos de 3 meses. En una realización de la terapia combinada, el péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP se administra simultáneamente con DiaPep277™ como sigue. DiaPep277™ se administra primero por vía subcutánea a una dosis de aproximadamente 1 mg, aproximadamente 30 días antes del inicio de la terapia basada en el péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP. A continuación se lleva a cabo una segunda administración de DiaPep277™ en el momento (90 días después de la primera administración) de iniciar la terapia basada en HIP Optimizado.
- 15
- 20 En otra realización, el compuesto inmunomodulador es Globulina Anti-linfocitos T policlonal (ATG). Se administran cuatro dosis de ATG. La primera dosis de ATG es 9 mg/kg de peso corporal, a continuación se administrarán 3 dosis consecutivas de 3 mg/kg por vía intravenosa a lo largo de 4 horas. Una hora antes de la primera administración de ATG, se realizará una prueba de tolerancia cutánea (0,2 ml de la disolución final). En una realización de la terapia combinada, la ATG se libera antes de la utilización de HIP Optimizado. La última dosis de ATG se libera un mínimo de 14 días antes del inicio de HIP Optimizado. Se puede requerir una segunda administración de ATG en base a mediciones trimestrales de anticuerpos anti-GAD65 y otros marcadores inmunológicos que sugieren el ataque autoinmunitario a los 24 meses después del tratamiento inicial con ATG. Se puede requerir un tratamiento más temprano si hay un aumento significativo de anticuerpos autoinmunes dirigidos hacia el páncreas.
- 25
- 30 El péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP se pueden liberar mediante inyección subcutánea, por vía oral a través vesículas dirigidas al hígado, u otro agente liposomal, o a través de infusión subcutánea continua de 24 horas a una dosis terapéuticamente eficaz, como se ha descrito anteriormente. En una realización, la dosis diaria es de aproximadamente 5 a 20 mg por kg de peso corporal del paciente por 24 horas. En una realización, la dosis diaria es de ~600 a 800 mg. La terapia basada en el péptido proislotes Optimizado se continúa durante un período de 3-6 meses y se controla estrechamente mediante la producción de péptido C. La inmunoterapia se liberará cíclicamente basándose en el agente inmunológico seleccionado. Por ejemplo, DiaPep277™ se administra a intervalos de 3 meses durante un total de 6 meses, e inicialmente se liberaría 3 meses antes de la terapia basada en HIP Optimizado.
- 35
- 40 Los agentes inmunomoduladores útiles en los métodos descritos en la presente memoria se pueden formular, administrar, y dosificar como se conoce en la técnica o como se describe en la presente memoria. A continuación se describen las formulaciones farmacéuticas y protocolos adicionales de dosificación y administración para la práctica de los métodos descritos en la presente memoria.
- 45 Las composiciones de péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP, p. ej., y las sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos son de forma sinérgica o aditiva eficaces para diferenciar las células progenitoras a nuevas células de los islotes en el tratamiento de la diabetes o trastornos similares cuando se combinan con otros diversos compuestos. Estos compuestos incluyen péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP, amilina y/o un análogo, incluyendo, pero sin limitarse a Symmlin/Pramlintida, GLP-1, agonistas del receptor de GLP-1, tales como exendina-4, Liraglutida (NN2211), análogos de GLP-1, Inhibidores de Dipeptidil Peptidasa-4, GIP, INGAP de hámster, y otras hormonas miméticas de incretina, y/o compuestos y agentes que actúan de manera similar, y agentes que prolongan la vida media o aumentan el nivel o actividad de cualquiera de los compuestos y agentes anteriores, tales como, por ejemplo, inhibidores de la dipeptidil peptidasa, que retrasan la degradación de GLP-1, y agentes que inhiben, bloquear o destruyen las células autoinmunitarias que se dirigen a las células beta incluyendo, pero no limitados a: anticuerpos anti-CD-3, incluyendo hOKT31 (Ala-Ala) y ChAglyCD3, ATG, Sirolimus (rapamicina), Tacrolimus (FK506), una proteína de choque térmico 60 (DiaPep277™) una vacuna anti-Ácido Glutámico Descarboxilasa 65 (GAD65), Micofenolato de Mofetilo solo o combinado con Daclizumab, el agente anti-CD20
- 50
- 55 Rituximab, Campath-1H (Anticuerpo Anti-CD52), lisofilina, y vitamina D, vacuna IBC-VSO que es una forma metabólicamente inactiva, sintética de insulina diseñada para evitar la destrucción de las células beta pancreáticas, y vacunación con interferón-α utilizando células T reguladoras específicas de antígenos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> o un agente similar diseñado para evitar la destrucción de las células beta del páncreas. En esta última realización, la vacunación con interferón-α utilizando células T reguladoras específicas del antígeno CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> o un agente similar se utiliza

en la terapia combinada para la utilización de células T reguladoras, ya sea directamente o mediante el uso de inmunoterapia anti-CD3.

5 Los compuestos tales como el Sirolimus (rapamicina), Tacrolimus (FK506), anticuerpo TRX4, anticuerpo humanizado anti-CD3, anticuerpo anti-GAD65 DYAMID™ y DiaPep277™ también son eficaces sinérgicamente o aditivamente cuando se añaden a la utilización de HIP Optimizado o un agente para diferenciar células progenitoras a nuevas células de islotes en el tratamiento de la diabetes o trastornos similares.

10 Una mejora en un régimen terapéutico con fármacos se puede conseguir mediante la administración combinada de dos agentes que tienen efecto terapéutico, si la interacción de los dos o más agentes es tal que su efecto combinado reduce la incidencia de eventos adversos (EA) de cualquiera o de ambos agentes utilizados en la terapia simultánea. Esta reducción en la incidencia de efectos adversos puede ser el resultado, p. ej., de la administración de dosis más bajas de cualquiera o ambos agentes utilizados en la terapia simultánea. Por ejemplo, si el efecto del fármaco A por sí solo es de 25% y tiene una incidencia de eventos adversos de 45% cuando se utiliza a la dosis marcada; y el efecto del fármaco B solo es de 25% y tiene una incidencia de eventos adversos de 30% cuando se utiliza a la dosis marcada, pero cuando los dos fármacos se combinan a dosis más bajas que las marcadas de cada uno, si el efecto general es de 35% y la tasa de incidencia adversa es de 20%, hay una mejora en el régimen terapéutico del fármaco. Las terapias combinadas proporcionadas por la presente descripción incluyen las que exhiben tales mejoras.

#### Composiciones farmacéuticas, dosificación y administración

20 En realizaciones preferidas, los péptidos proislotes Optimizados, incluyendo HIP, se liberan a una concentración de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 mg/kg/día, más preferiblemente en inyecciones subcutáneas divididas en seres humanos. De este modo, un individuo de 60 kg recibiría potencialmente 60 mg/día divididos en dos a tres dosis de 20 mg suministradas después de las comidas. En otras realizaciones preferidas, los péptidos proislotes Optimizados, incluyendo HIP, también se pueden suministrar por medio de un método de encapsulación oral con dosis en el intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 mg/kg/día, preferiblemente suministrados por vía oral en dosis divididas después de las comidas.

25 Basándose en estudios de fluctuación de dosis (Ejemplo 13) utilizando HIP2 e HIP2B optimizado a intervalos de dosificación de 1000 microgramos dos veces al día a 0,1 microgramos por día suministrados IP a ratones convertidos en diabéticos con STZ, HIP2B se pudo utilizar a una dosificación de aproximadamente 10% de la de HIP2 y el equivalente de aproximadamente 1 mg/kg en comparación con 10 mg/kg (600 mg/día) de dosificación utilizado en pruebas humanas de INGAP derivado de hámster (Figura 23).

Por ejemplo, en algunos aspectos, las diversas realizaciones están dirigidas a una composición farmacéutica que comprende un compuesto, como se ha definido anteriormente, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, o una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un compuesto como se ha definido anteriormente.

35 Los compuestos descritos en la presente memoria se pueden administrar de la manera convencional por medio de cualquier ruta, en la que sean activos. La administración puede ser sistémica, tópica, u oral. Por ejemplo, la administración puede ser, pero no estar limitada a, las rutas parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, oral, bucal, u ocular, o por vía intravaginal, mediante inhalación, mediante inyecciones de depósito, o mediante implantes. Por lo tanto, los modos de administración para los compuestos de la presente descripción (ya sea solos o combinados con otros fármacos) pueden ser, pero no se limitan a, sublingual, inyectable (incluyendo de acción corta, depósito, implante y formas de pélets inyectados por vía subcutánea o intramuscular), o mediante el uso de cremas vaginales, supositorios, pesarios, anillos vaginales, supositorios rectales, dispositivos intrauterinos y formas transdérmicas, tales como parches y cremas.

40 Los modos específicos de administración dependerán de la indicación. La selección de la ruta de administración y el régimen de dosificación específicas deberá ser ajustada o valorada por el médico clínico de acuerdo con métodos conocidos por el médico clínico con el fin de obtener la respuesta clínica óptima. La cantidad de compuesto que se va a administrar es la cantidad que es terapéuticamente eficaz. La dosificación que se vaya a administrar dependerá de las características del sujeto que esté siendo tratado, p. ej., el animal concreto tratado, la edad, peso, la salud, los tipos de tratamiento simultáneo, si los hubiera, y la frecuencia de los tratamientos, y puede ser fácilmente determinada por un experto en la técnica (p. ej., por el médico clínico).

45 Las formulaciones farmacéuticas que contienen los compuestos de la presente descripción y un vehículo adecuado puede ser formas de dosificación sólidas que incluyen, pero no se limitan a, comprimidos, cápsulas, sellos, pélets, píldoras, polvos y gránulos; formas de dosificación tópica que incluyen, pero no se limitan a, disoluciones, polvos, emulsiones fluidas, suspensiones fluidas, semisólidos, pomadas, pastas, cremas, geles y jaleas y espumas; y formas de dosificación parenteral que incluyen, pero no se limitan a, disoluciones, suspensiones, emulsiones, y polvo seco; que comprenden una cantidad eficaz de un polímero o copolímero de la presente descripción. También se conoce en la técnica que los ingredientes activos pueden estar contenidos en tales formulaciones con diluyentes, cargas,

disgregantes, aglutinantes, lubricantes, agentes tensioactivos, portadores hidrófobos, portadores solubles en agua, emulsionantes, tampones, humectantes, hidratantes, solubilizantes, conservantes y similares farmacéuticamente aceptables. Los medios y métodos para la administración son conocidos en la técnica y un artesano puede remitirse a diversas referencias farmacológicas para la orientación. Por ejemplo, se pueden consultar *Modern Pharmaceutics*, Banker & Rhodes, Marcel Dekker, Inc. (1979); y Goodman & Gilman's *The Pharmaceutical Basis of Therapeutics*, sexta edición, MacMillan Publishing Co., Nueva York (1980).

Los compuestos de la presente descripción se pueden formular para la administración parenteral mediante inyectables, p. ej., mediante inyección en embolada o de infusión continua. Los compuestos se pueden administrar por vía subcutánea mediante infusión continua durante un periodo de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 24 horas. Las formulaciones para inyectables se pueden presentar en formas de dosificación unitarias, p. ej., en ampollas o en recipientes de dosis múltiples, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizadores y/o dispersantes.

Para la administración oral, los compuestos se pueden formular fácilmente mediante la combinación de estos compuestos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales portadores permiten que los compuestos descritos en la presente memoria sean formulados en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares, para la ingestión oral por el paciente que se vaya a tratar. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener añadiendo un excipiente sólido, moliendo opcionalmente la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir los coadyuvantes adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, cargas tales como azúcares, incluyendo, pero no limitados a, lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, pero no limitadas a, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, y polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como, pero no limitados a, polivinilpirrolidona entrecruzada, agar, o ácido alginico o una sal del mismo tal como alginato de sodio.

Los núcleos de grageas pueden proporcionarse con recubrimientos adecuados. Para este propósito, se pueden utilizar disoluciones de azúcares concentradas usarse, que puede contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes o mezclas de disolventes orgánicos adecuados. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de las grageas para su identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

Las preparaciones farmacéuticas que se pueden utilizar oralmente incluyen, pero no se limitan a, cápsulas de ajuste por presión elaboradas de gelatina, así como cápsulas selladas blandas elaboradas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste por presión pueden contener los ingredientes activos mezclados con cargas tales como, p. ej., lactosa, aglutinantes tales como, p. ej., almidones y/o lubricantes tales como, p. ej., talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizadores. Todas las formulaciones para administración oral deben estar a las dosis adecuadas para dicha administración.

Para la administración bucal, las composiciones pueden adoptar la forma de, p. ej., comprimidos o pastillas formuladas de una manera convencional.

Para la administración por inhalación, los compuestos para uso de acuerdo con la presente descripción se suministran convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, p. ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de, p. ej., gelatina para uso en un inhalador o insuflador se pueden formular conteniendo una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Los compuestos de la presente descripción también se pueden formular en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, p. ej., que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas previamente, los compuestos de la presente descripción también se pueden formular como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden administrar mediante implantación (por ejemplo subcutáneamente o intramuscularmente) o mediante inyección intramuscular.

Las inyecciones de depósito se pueden administrar en aproximadamente 1 a aproximadamente 6 meses o intervalos más largos. Así, por ejemplo, los compuestos se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos



adecuados (por ejemplo en forma de una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o en forma de derivados poco solubles, por ejemplo, en forma de una sal poco soluble.

5 En la administración transdérmica, los compuestos de la presente descripción, por ejemplo, se pueden aplicar a un apósito, o se pueden aplicar mediante sistemas transdérmicos, terapéuticos que en consecuencia se suministran al organismo.

Las composiciones farmacéuticas de los compuestos también pueden comprender portadores o excipientes sólidos o en fase de gel adecuados. Los ejemplos de tales vehículos o excipientes incluyen, pero no se limitan a carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como, p. ej., polietilenglicoles.

10 Los compuestos de la presente descripción también se pueden administrar combinados con otros ingredientes activos, tales como, p. ej., coadyuvantes, inhibidores de proteasas, u otros fármacos o compuestos compatibles cuando se contempla que dicha combinación es deseable o ventajosa para la consecución de los efectos deseados de los métodos descritos en la presente memoria.

#### Métodos de preparación de HIP Optimizado

15 Los mecanismos conocidos en la técnica se pueden utilizar en la síntesis y purificación de HIP Optimizado, incluyendo, pero no limitados a, síntesis química de novo y purificación por precipitación, adsorción (p. ej., cromatografía en columna, adsorbentes de membrana, columnas de flujo radial, adsorción por lotes, cromatografía líquida de alto rendimiento, cromatografía de intercambio iónico, adsorbentes inorgánicos, adsorbentes hidrofóbicos, cromatografía de afinidad de metal inmovilizado, cromatografía de afinidad), o filtración en gel, electroforesis, reparto  
20 en fase líquida, reparto en detergente, extracción con disolvente orgánico, y ultrafiltración. Durante la purificación, la actividad biológica de péptidos proislotes Optimizados, incluyendo HIP, puede ser controlada por medio de uno o más análisis *in vitro* o *in vivo*. La pureza del péptido proislotes optimizado se puede analizar mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como, pero no limitado a, electroforesis en gel. Véase Scopes, más arriba. En algunas realizaciones, el péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP, empleado en una composición descrita en la presente memoria puede estar en el intervalo de 80 a 100 por ciento de la proteína total en mg, o al menos 80%,  
25 al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos el 98% de la proteína total en mg. En una realización, el péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP empleado en una composición es al menos 99% de la proteína total. En otra forma de realización, el péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP se purifica hasta una homogeneidad evidente, analizada, p. ej., mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio. En una  
30 realización, el péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP se sintetiza y se somete a ensayo mediante HPLC hasta una pureza mayor que 95%.

Se pueden utilizar métodos conocidos en la técnica para producir péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP de forma recombinante. Una secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP se puede insertar en un vector de expresión para su propagación y expresión en células anfitrionas.

35 Un constructo de expresión, según se utiliza en la presente memoria, se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP asociado operablemente con una o más regiones reguladoras que permiten la expresión de un HIP Optimizado en una célula anfitriona apropiada. "Asociado operablemente" se refiere a una asociación en la que las regiones reguladoras y el péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP que se va a expresar se unen y se colocan de tal manera que permiten la transcripción, y en última  
40 instancia, la traducción.

Las regiones reguladoras que son necesarias para la transcripción del péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP pueden ser proporcionada por el vector de expresión. También se puede proporcionar un codón de inicio de la traducción (ATG), si se va a expresar una secuencia génica del péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP que carece de su codón de iniciación cognado. En un sistema de constructo compatible con el anfitrión, los factores de  
45 transcripción celulares, tales como la ARN polimerasa, se unirán a las regiones reguladoras sobre el constructo de expresión para efectuar la transcripción de la secuencia del péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP en el organismo anfitrión. La naturaleza precisa de las regiones reguladoras necesarias para la expresión génica puede variar de célula anfitriona a célula anfitriona. Generalmente, se requiere un promotor que sea capaz de unirse a la ARN polimerasa y promover la transcripción de una secuencia de ácido nucleico asociada operablemente. Tales  
50 regiones reguladoras pueden incluir aquellas secuencias no codificantes 5' implicadas en el inicio de la transcripción y la traducción, tales como la caja TATA, la secuencia de protección terminal, la secuencia CAAT, y similares. La región no codificante 3' de la secuencia codificante puede contener secuencias reguladoras de la terminación de la transcripción, tales como terminadores y sitios de poliadenilación.

55 Con el fin de anclar secuencias de ADN con funciones reguladoras, tales como promotores, a una secuencia de péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP o para insertar una secuencia génica de péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP en el sitio de clonación de un vector, los enlazadores o adaptadores que proporcionan los sitios de restricción compatibles apropiados se puede ligar a los extremos de los ADNc por mecanismos bien

conocidos en la técnica. La escisión con una enzima de restricción puede estar seguida de la modificación para crear extremos romos digiriendo de nuevo o rellenando los extremos de ADN monocatenario antes de la ligación. Alternativamente, se puede introducir un sitio para una enzima de restricción deseada en un fragmento de ADN mediante amplificación del ADN utilizando la PCR con cebadores que contienen el sitio para la enzima de restricción deseada.

Un constructo de expresión que comprende una secuencia de péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP asociada operablemente con regiones reguladoras se puede introducir directamente en las células anfitrionas apropiadas para la expresión y la producción de un péptido proislotes, incluyendo HIP Optimizado sin clonación adicional. Los constructos de expresión también pueden contener secuencias de ADN que facilitan la integración de una secuencia de péptido proislotes, incluyendo HIP Optimizado en el genoma de la célula anfitriona, p. ej., a través de recombinación homóloga. En este caso, no es necesario emplear un vector de expresión que comprenda un origen de replicación adecuado para las células anfitrionas apropiadas se propaguen y expresen el péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP en las células anfitrionas.

Se puede utilizar una variedad de vectores de expresión, incluyendo, pero no limitados a, plásmidos, cósmidos, fagos, fagémidos o virus modificados. Tales sistemas de expresión en anfitriones representan vehículos mediante los cuales las secuencias codificantes de un gen de un péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP pueden producirse y posteriormente purificarse, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, expresar péptidos proislotes Optimizados, incluyendo HIP *in situ*. Estos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias (p. ej., *E. coli* y *B. subtilis*) transformados con ADN de bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o vectores de expresión de ADN cosmídico que contienen secuencias codificantes de péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP; levaduras (p. ej., *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con vectores de expresión recombinantes que contienen secuencias codificantes de péptidos proislotes, incluyendo HIP Optimizado; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (p. ej., baculovirus) que contienen secuencias codificantes de péptidos proislotes Optimizados, incluyendo HIP; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (p. ej., virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (p. ej., plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP; o sistemas de células de mamífero (p. ej., células COS, CHO, BHK, 293, NS0 y 3T3) que albergan constructos de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamíferos (p. ej., promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (p. ej., el promotor tardío de adenovirus; el promotor del virus vaccinia de 7,5K). Preferiblemente, se utilizan células bacterianas tales como *Escherichia coli* y células eucarióticas para la expresión de un péptido proislotes Optimizado recombinante, incluyendo HIP. Por ejemplo, se pueden utilizar células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO) con un vector que porta un elemento promotor del gen temprano intermedio principal de citomegalovirus para la expresión eficaz de una secuencia de péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP.

En sistemas bacterianos, se pueden seleccionar ventajosamente diversos vectores de expresión dependiendo del uso previsto para el péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP que se vaya a expresar. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de un péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP, para la generación de composiciones farmacéuticas de un péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP, pueden ser deseables vectores que dirijan la expresión de altos niveles de productos de proteínas de fusión que sean fácilmente purificados. Los vectores incluyen, pero no se limitan a, vector de expresión de *E. coli* pCR2.1 TOPO (Invitrogen); vectores pIN, y similares. También se pueden utilizar series de vectores como pFLAG (Sigma), pMAL (NEB) y pET (Novagen) para expresar las proteínas foráneas como proteínas de fusión con el péptido FLAG, proteína male-, o CBD-. Estas proteínas recombinantes pueden ser dirigidas al espacio periplásmico para su plegamiento correcto y maduración. La parte fusionada se puede utilizar para la purificación por afinidad de la proteína expresada. La presencia de sitios de escisión para proteasas específicas como enteroquinasa permite escindir el péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP o un análogo o derivado del mismo. Los vectores pGEX también se pueden utilizar para expresar proteínas foráneas como proteínas de fusión con glutatión 5-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y se pueden purificar fácilmente a partir de células lisadas mediante adsorción y unión a cuentas de glutatión-agarosa de la matriz, seguido de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se diseñan para incluir sitios de escisión para trombina o proteasa factor Xa de modo que el producto génico diana clonado pueda liberarse del radical de GST.

En un sistema de insecto, se pueden utilizar muchos vectores para expresar genes foráneos, p. ej., virus de la poliedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes foráneos. El virus crece en células como células de *Spodoptera frugiperda*. Una secuencia codificante de péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP se puede clonar individualmente en regiones no esenciales (p. ej., el gen de la poliedrina) del virus y colocar bajo control de un promotor de AcNPV (p. ej., el promotor de la poliedrina).

En las células anfitrionas de mamífero, se pueden utilizar diversos sistemas de expresión basados en virus. En los casos en los que se utiliza un adenovirus como vector de expresión, se puede ligar una secuencia codificante de un péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP de interés a un complejo de control de la transcripción/traducción de

adenovirus, p. ej., el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico puede insertarse después en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (p. ej., la región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar el péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP en anfitriones infectados. También pueden ser necesarias señales de inicio específicas para una traducción eficaz de las secuencias codificantes del péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP insertado. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de inicio debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para asegurar la traducción del inserto completo. Estas señales de control de la traducción y codones de iniciación exógenos pueden tener diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión se puede intensificar mediante la inclusión de elementos intensificadores de la transcripción, terminadores de transcripción, y similares apropiados.

Además, se puede escoger una cepa de célula anfitriona que module la expresión de las secuencias insertadas, o modifique y procese el producto génico de la forma específica deseada. Tales modificaciones (p. ej., glicosilación) y procesamiento (p. ej., escisión) de productos proteicos pueden ser importante para la función de la proteína. Diferentes células anfitrionas tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento post-traducciona y la modificación de proteínas y productos génicos. Se pueden seleccionar líneas celulares o sistemas anfitriones apropiados para asegurar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína foránea expresada. Para este fin, se pueden utilizar células anfitrionas eucarióticas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario y la modificación post-traducciona del producto génico, p. ej., glicosilación y fosforilación del producto génico. Tales células anfitrionas de mamífero incluyen, pero no se limitan a, células PC12, CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT2O y T47D, NS0 (una línea celular de mieloma murino que no produce endógenamente ninguna cadena de inmunoglobulina), CRL7O3O y HsS78Bst. La expresión en un sistema bacteriano o de levadura se puede utilizar si se encuentra que las modificaciones post-traduccionales no son esenciales para una actividad deseada de HIP Optimizado.

Para la producción de alto rendimiento a largo plazo, de péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP procesado correctamente, se prefiere la expresión estable en células. Las líneas celulares que expresan de forma estable péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP se pueden modificar genéticamente mediante el uso de un vector que contiene un marcador seleccionable. A modo de ejemplo, pero no de limitación, tras la introducción de los constructos de expresión, se puede permitir que las células modificadas se desarrollen durante 1-2 días en un medio enriquecido y, a continuación, se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el constructo de expresión confiere resistencia a la selección y puede, dependiendo del constructo vector y de la célula anfitriona empleados, permitir que las células integren de forma estable el constructo de expresión en sus cromosomas y crezcan en cultivo y se expandan a líneas celulares. Tales células pueden ser cultivadas durante un largo período de tiempo mientras optimizado péptido proislotes, incluyendo HIP es expresado de forma continua.

Se pueden utilizar diversos sistemas de selección, incluyendo pero no limitados a, resistencia a antibióticos (marcadores de tipo Neo, que confiere resistencia a geneticina, o G-418; Zeo, para la resistencia a zeocina; y BSD, por la resistencia a blasticidina); resistencia a antimetabolitos (marcadores de tipo dhfr, que confiere resistencia al metotrexato; gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico; e hygro, que confiere resistencia a la higromicina. Además, se pueden utilizar líneas celulares mutantes, incluyendo, pero no limitadas a, células tk-, hgprt- o aprt-, combinadas con vectores que portan los genes correspondientes para la timidina quinasa, hipoxantina, guanina o adenina fosforribosil-transferasa. Se pueden aplicar rutinariamente los métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante para seleccionar el clon recombinante deseado, 150:1.

Las células recombinantes se pueden cultivar en condiciones convencionales de temperatura, tiempo de incubación, densidad óptica y composición del medio. Sin embargo, las condiciones para el crecimiento de las células recombinantes pueden ser diferentes de aquellas para la expresión del péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP. También se pueden usar condiciones y medios de cultivo modificados para mejorar la producción de péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP. Se puede aplicar cualquier mecanismo conocido en la técnica para establecer las condiciones óptimas para la producción de péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP.

Una alternativa a la producción de péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP mediante técnicas recombinantes o purificación a partir de fuentes naturales es la síntesis de péptidos. Por ejemplo, se puede sintetizar un HIP optimizado completo, o una proteína que corresponde a una porción de HIP Optimizado, mediante el uso de un sintetizador de péptidos. Se puede utilizar la síntesis de péptidos convencional u otros protocolos de síntesis bien conocidos en la técnica.

Se pueden sintetizar proteínas que tienen la secuencia de aminoácidos del péptido proislotes Optimizado, incluyendo HIP mediante síntesis de péptidos en fase sólida. Durante la síntesis, se añaden paso a paso aminoácidos protegidos en N- $\alpha$  que tienen cadenas laterales protegidas a una cadena polipeptídica en crecimiento unida por su extremo C-terminal a un soporte polimérico insoluble, es decir, cuentas de poliestireno. Las proteínas se sintetizan uniendo un grupo amino de un aminoácido desprotegido en N- $\alpha$  a un grupo  $\alpha$ -carboxilo de un aminoácido protegido en N- $\alpha$  que ha sido activado haciéndolo reaccionar con un reactivo tal como

5 diciclohexilcarbodiimida. El anclaje de un grupo amino libre al carboxilo activado conduce a la formación del enlace peptídico. Los grupos protectores de N- $\alpha$  más comúnmente utilizados incluyen Boc, que es lábil en medio ácido, y Fmoc, que es lábil en medio alcalino. Los detalles de las químicas, las resinas, los grupos protectores, los aminoácidos protegidos y los reactivos apropiados son bien conocidos en la técnica y por tanto no se comentan en detalle en la presente memoria.

La purificación del péptido proislotes optimizado, incluyendo HIP resultante se lleva a cabo usando procedimientos convencionales, tales como HPLC preparativa utilizando cromatografía de penetración en gel, de reparto y/o de intercambio iónico. La elección de matrices y tampones apropiados es bien conocida en la técnica y por lo tanto no se describe con detalle en la presente memoria.

10 Con la anterior descripción detallada de los reactivos y métodos de la invención, se proporcionan los siguientes ejemplos para ilustrar diversos aspectos de la invención.

### Ejemplo 1

15 Actividad de HIP *in vitro*. Los estudios *in vitro* se llevaron a cabo en el Laboratorio de islotes Humanos de la Universidad de Pennsylvania. Se cultivaron islotes pancreáticos humanos y fracciones ductales a lo largo de 10 días y a continuación se trataron en un estudio ciego. Se utilizaron métodos de radioinmunoanálisis para medir los niveles de insulina en los cultivos pancreáticos humanos tratados con un péptido de secuencia alterada que sirve como control negativo, HIP3, HIP1, HIP2 e INGAP derivado hámster que sirven como control positivo. Los péptidos fueron sintetizados por Bachem BioScience (95% de pureza, grado para investigación).

20 Los cultivos por duplicado se trataron el día 10 y el día 12 y a continuación se lisaron para la detección del contenido de insulina después de 1 semana de tratamiento con péptidos HIP, control e INGAP. Durante el cultivo de 10 días, la producción de insulina disminuye y después tras el tratamiento con los péptidos HIP, de nuevo se produce insulina.

25 El gráfico de la fracción ductal mostrado en la Fig. 1 representa los niveles de insulina sobre el eje y medido mediante radioinmunoanálisis después de la incubación en cultivo con tejido ductal pancreático humano. El gráfico de la fracción de islotes indica los niveles de insulina después de la incubación en el tejido de islotes pancreáticos humano. Los niveles de insulina en el momento inicial son significativamente más altos en la fracción de islotes en el momento inicial que en las fracciones ductales en el momento inicial.

30 Los tejidos ductales y de islotes se separaron utilizando el método de Ricordi. Ni el cultivo de células ductales ni el de islotes tuvieron una naturaleza completamente homogénea. Los estudios también sugieren que las células progenitoras, que son la diana para HIP, se encuentran en los cultivos tanto de islotes como ductales. Los estudios se repitieron con hallazgos similares mostrados en el siguiente diagrama, con un incremento tan alto como de cuatro veces en los niveles de insulina mediante radioinmunoanálisis entre el tejido ductal humano cultivado con HIP2.

35 Estudios repetidos confirmaron el aumento de insulina tanto en cultivos de células ductales predominantemente humanas como en cultivos de islotes, con niveles de insulina en el momento inicial de manera sistemática aproximadamente 1/3 más bajos en los cultivos ductales en el momento inicial en comparación con los cultivos de islotes, con aumentos similares en el contenido de insulina después de la incubación con péptidos HIP en comparación con un control negativo.

### Ejemplo 2

40 Estudios *in vivo*. HIP3, HIP1 e HIP2 ha sido el objeto de estudios *in vivo* en ratones. Los estudios han demostrado que estas variantes de HIP, cuando se introducen en ratones diabéticos, estimulan la diferenciación de células progenitoras en el páncreas a nuevas estructuras de islotes. Se ha desarrollado un modelo de diabetes en ratón (Rosenberg et. al., 2004). El número de sujetos se seleccionó para producir un número suficiente de animales diabéticos para el estudio y los animales fueron asignados al azar a grupos de estudio. A todos los animales se les administraron dosis por medio de inyecciones intraperitoneales dos veces al día (am y pm) durante 28 días consecutivos. El momento de la administración de la dosis se mantuvo constante ( $\pm$  2 horas) durante la fase de dosificación. Después de la confirmación de que los ratones se habían vuelto diabéticos (glucosa en sangre mayor de 16,7 mmol/L (300 mg/dL) durante al menos 1 semana, se administraron las dosis a los ratones.

45 A los ratones se les inyectó intraperitonealmente estreptozocina a 40 mg/kg en tampón de citrato, pH 4,5, durante 5 días consecutivos en un intento de volverlos diabéticos. Los ratones deben haber tenido la glucosa en sangre por encima de 16,7 mmol/L (300 mg/dL) durante al menos 1 semana para ser considerados diabético. Si el nivel de glucosa en sangre en cualquier animal aumentaba por encima de 400 mg/dL, el animal era tratado con insulina. Cada 3 días, a la misma hora cada día, se hizo un corte en la cola y se recogió una gota de sangre. Las mediciones de glucosa se determinaron utilizando un medidor de glucosa. Las asignaciones de grupo y los niveles de dosis fueron los siguientes en la Tabla 1:

Tabla 2.

Grupo	Tratamiento	Nivel de dosis	Volumen de dosis	Número de animales
1	Vehículo	0	100 µl	6
2	HIP3	250 µg	100 µl	6
3	HIP1	250 µg	100 µl	6
4	HIP2	250 µg	100 µl	6

Los criterios de valoración del estudio incluyeron los siguientes: cambios en la glucosa; cambios en los requerimientos de insulina; e histología de los páncreas post-mortem.

- 5 Cambios en los requerimientos de insulina. Se observaron reducciones significativas tanto en los requerimientos de insulina como en la tasa de disminución de los requerimientos de insulina entre los ratones tratados con HIP, como se muestra en la Fig. 2. Los ratones tratados con HIP 2 estuvieron completamente libres de insulina el día 21.

- 10 Cambios en los niveles de glucosa. Hubo una reducción media de la glucosa desde el momento inicial en comparación con los controles en todos los grupos tratados con HIP y esta reducción fue significativa en todos los grupos tratados con HIP, como se muestra en la Fig. 3. Hubo una glucosa media 14,7% inferior entre HIP 1 y el control, una glucosa media de 29,4% inferior entre HIP 2 y el control, y una glucosa media 57,3% inferior entre HIP3 y el grupo control. Los datos indican una tasa significativamente más rápida de disminución de los requerimientos de insulina entre todos los grupos de ratones tratados con HIP en comparación con los ratones diabéticos de control. Hubo un número significativamente mayor de islotes después del tratamiento HIP observado en los páncreas de los ratones, que se seccionaron y revisaron en cada ratón estudiado. Los páncreas fueron evaluados por un histólogo ciego para los ejemplares con los siguientes datos en la Tabla 3.

Tabla 3.

	Islotes totales (% de incremento)	Masa de islotes total (µm <sup>2</sup> ) (% de incremento )
Placebo	280	854364
HIP2	454 (62%)	2161782 (153%)
HIP3	410 (46%)	1703513 (99%)

- 20 La diferencia en el número de islotes entre HIP y el placebo fue estadísticamente significativa ( $p = 0,022$ ). Incluso hubo un aumento más profundo en la zona de los islotes entre los ratones tratados HIP y el grupo tratado con placebo. La zona de los islotes en el grupo tratado con HIP2 fue de 360.297 µm (2) en comparación con 142.394 µm (2) en el grupo tratado con placebo con 283.918 µm (2) en el grupo tratado con HIP3 ( $p = 0,05$ ), como se muestra en la Fig. 4A. La Fig. 4B demuestra que HIP2B aumenta número de islotes en ratones diabéticos, (a) imágenes representativas de la inmunotinción de insulina en ratones con placebo y tratados con HIP, (b) los islotes de insulina teñida se representan en color amarillo para diferenciar estas estructuras de células de la sangre auto-fluorescentes.

25 La tinción inmunofluorescente para la insulina realizada también en páncreas de ratón demuestra un mayor grado de tinción de insulina en los ratones tratados con HIP, como se muestra en la Fig. 5. Este tejido de páncreas de ratón se cosechó y se fijó en PFA al 4%, se bloqueó y se seccionó. Objetivo 10X, 1,6 Optivar.

### Ejemplo 3

- 30 El siguiente ejemplo describe métodos ilustrativos para sintetizar y purificar HIP e HIP Optimizado.

La síntesis de péptidos HIP fue mediante el procedimiento en fase sólida general de Merrifield (Merrifield, RB 1963, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154) utilizando la química de protección con Fmoc convencional (Fields, G.B. y Noble, R.L. 1990, Int. J. Peptide Protein Res. 35, 161-214) .

- 35 El péptido protegido unido a la resina se escindió y se desprotegió mediante tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) en presencia de un captador para proporcionar el producto bruto. El producto peptídico purificado se obtuvo mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (HPLC).

La derivatización de los péptidos con polietilenglicol (PEG) puede consistir en la introducción de unidades de PEG discretas en un intervalo de peso molecular de 300 a 43.000.

Ejemplo A: Ac-IGLHDPTQGTEPNG-NH<sub>2</sub> (HIP2B) (SEQ ID NO: 7).

5 Partiendo de la resina amídica de Rink, resina 4-[2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil]fenoxi, se introducen secuencialmente aminoácidos Fmoc protegidos y se acoplan utilizando HOBt y DCC (N-hidroxibenzotriazol y dicitclohexilcarbodiimida). La desprotección de Fmoc de la resina de partida y el grupo protector Fmoc de cada aminoácido se consiguió con piperidina al 20% en dimetilformamida. Después de la eliminación del grupo protector Fmoc del aminoácido N-terminal, Ile, el péptido protegido unido a la resina se acetiló con anhídrido acético al 20% en cloruro de metileno. La desprotección de los grupos de cadena lateral y la escisión del péptido de la resina se  
10 lograron con ácido trifluoroacético al 95% con agua al 2,5% y triisopropilsilano al 2,5%. Después de un tratamiento de una hora, el péptido se precipitó de la solución de escisión con éter dietílico, se filtró y se secó.

15 Purificación. El producto bruto se purificó por cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (HPLC) sobre un soporte C-18 utilizando TFA al 0,1% en agua y TFA al 0,1% en acetonitrilo como tampones A y B respectivamente. Se utilizó un gradiente creciente de tampón B para eluir el producto. El intercambio de TFA residual por acetato se logró volviendo a aplicar las fracciones de producto sobre una columna HPLC C-18, lavando con NH<sub>4</sub>OAc 0,1 M acuoso y eluyendo el producto con un gradiente de ácido acético al 1% en agua y acetonitrilo como fase móvil. Las fracciones de producto puras se reunieron y se liofilizaron. La identidad y la homogeneidad del péptido se confirmaron mediante de composición de aminoácidos, HPLC analítica y análisis espectral de masas.

20 Ejemplo B: IGLHDPTQGTEPNG (HIP2) (SEQ ID NO: 4) Comparativo. Partiendo de Resina Fmoc-Gly-Wang, se ensambló la secuencia peptídica como en el Ejemplo A. El extremo amino terminal no se acetiló para proporcionar el péptido con un extremo amino y carboxilo terminal libre desbloqueado. El producto purificado se aisló como en el Ejemplo A.

25 Ejemplo C: (Ac-IGLHDPTQGTEPNGC-NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (Dímero HIP2B Cys) (SEC ID NO: 19) (Comparativo). La síntesis del péptido en su forma de tiol libre fue la descrita en el Ejemplo A. El producto bruto se oxidó para formar el dímero disolviendo aproximadamente 2 g de péptido con 2 ml de ácido acético y dilución con ~500 ml de agua destilada, el pH se ajustó a ~8,2 mediante la adición de una disolución de NH<sub>4</sub>OH al 20% gota a gota. La disolución se dejó agitando durante la noche a temperatura ambiente. La reacción no se llegó a completar durante la noche. Para completar la reacción se añadió una disolución al 1% de ferricianuro de potasio hasta que persistió un color verde amarillento permanente. La reacción se consideró completa según se determinó mediante la prueba de Ellman y análisis de HPLC. Después, la disolución de péptido oxidado se agitó con 3-5 g de resina de intercambio iónico AG-1 X2 (forma de cloruro) durante 30 minutos, se filtró y el pH se ajustó a ~5 con ácido acético antes de la purificación mediante HPLC.

30 Ejemplo D: (IGLHDPTQGTEPNGC)<sub>2</sub> (Dímero HIP2 Cys) (SEQ ID NO: 13) Comparativo. Partiendo de resina Fmoc-Cys(Trt)-Wang se preparó la secuencia peptídica como en el Ejemplo 2. La precipitación en éter del producto bruto, la oxidación a dímero y la purificación mediante HPLC se lograron como se ha descrito en el Ejemplo C.

Ejemplo E: Ac-IGLHDPTQGTEPNGC-NH<sub>2</sub> (HIP2B Cys) (SEQ ID NO: 16) Comparativo. La síntesis y purificación de la secuencia primaria monomérica se lleva a cabo como en el Ejemplo A.

35 El siguiente ejemplo describe un método ilustrativo para la preparación de HIP bloqueados. Los péptidos bloqueados HIP se prepararon mediante Síntesis Peptídica en Fase Sólida (SPPS). La premisa fundamental de la síntesis en fase sólida es que los aminoácidos se pueden ensamblar en un péptido de cualquier secuencia deseada, mientras un extremo de la cadena esté anclado a un soporte insoluble. Como se mencionó anteriormente, en la SPPS práctica el extremo carboxilo del péptido está conectado al polímero. Después de que la secuencia deseada de aminoácidos se haya conectado al soporte, se puede aplicar un reactivo para escindir la cadena de péptido del soporte y liberar el péptido bruto a la disolución. Todas las reacciones implicadas en la síntesis se llevan hasta la  
40 finalización si fuera posible, de modo que se pueda obtener un producto homogéneo.

45 Cuando el extremo C-terminal de un péptido es una amida el derivado es una amida peptídica. Las amidas peptídicas son derivados extremadamente importantes, ya que muchas hormonas peptídicas de origen natural están presentes en forma de amida. Para sintetizar amidas peptídicas se han desarrollado resinas en fase sólida que producen amidas peptídicas directamente tras la escisión. Cuando el extremo N-terminal es un grupo acetilo, el péptido es ensamblado del extremo C al extremo N. El extremo N es acetilado a continuación, utilizando anhídrido acético en presencia de una base.

50 Se utilizan derivados de Fmoc-aminoácidos para construir la secuencia. Después de que la secuencia deseada de aminoácidos se haya conectado al soporte, el péptido es acetilado, se filtrado y se secado. La resina peptídica acetilada se escinde a continuación con captadores que contienen ácido Trifluoroacético (TFA) para liberar el péptido del soporte, así como todos los grupos protectores. La purificación se lleva a cabo a continuación sobre el material bruto utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Ejemplo F: Ac-IGLHDPTQGTEPNGC(PEG)-NH<sub>2</sub> (HIP2B Cys-PEG) (SEQ ID NO: 25) Comparativo. La forma purificada monomérica del péptido del Ejemplo 5 (1,1 equivalente) se disolvió en tampón de acetato (0,1 M, pH = 6,5). Se preparó una disolución (1 equivalente) de polietilenglicol derivatizado con maleimida (PEG maleimida) en agua destilada y se añadió a la disolución peptídica con agitación. El pH de la disolución resultante se ajustó a ~6,5 con una disolución de NH<sub>4</sub>OH diluida, se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, se aciduló con unas pocas gotas de ácido acético y se purificó mediante HPLC.

Ejemplo G: IGLHDPTQGTEPNGC(PEG) (HIP2 Cys-PEG) (SEQ ID NO: 22) Comparativo. Partiendo de resina Fmoc-Cys(Trt)-Wang, la síntesis y purificación de la secuencia primaria es la descrita en el Ejemplo B. La derivatización con PEG maleimida seguido de purificación por HPLC es como en el Ejemplo F.

Ejemplo H: (PEG)-IGLHDPTQGTEPNG (PEG-HIP2) (SEQ ID NO: 91) Comparativo. Se preparó la secuencia peptídica unida a la resina primaria como en el Ejemplo 2. Después de la desprotección de Fmoc de la Ile N-terminal la resina peptídica protegida se derivatizó con ácido PEG-carboxílico usando HOBT y DCC como agentes de acoplamiento. La escisión y la purificación del (PEG)-péptido de la resina fue como se describe en el Ejemplo A.

#### Ejemplo 4

El siguiente ejemplo ilustra la farmacocinética de la administración intramuscular y subcutánea de HIP1, que se escinde a HIP2.

Se evaluó la farmacocinética de liberación de HIP con 20 ratas utilizando 5 ratas por ruta de administración. De una manera similar a los descubrimientos con INGAP derivado de hámster, la ruta intramuscular (IM) proporcionó una mejor concentración en sangre del material, pero las determinaciones de la vida media fueron de menos de 30 minutos mediante las mediciones de ELISA, como se muestra en la Figura 6.

La ruta de administración subcutánea (SQ) mostró una vida media ligeramente más larga, como se muestra en la Figura 7, pero los niveles detectados mediante ELISA fueron menores que mediante la ruta IM. La ruta IM proporciona una vida media ligeramente más larga en la sangre que la SQ.

#### Ejemplo 5

El siguiente ejemplo muestra la estabilidad del péptido HIP2B en un estudio de congelación y descongelación.

Procedimiento Experimental. El estudio se inició con dos grupos de ocho muestras de cada uno. Un grupo se mantiene a 4-8°C y el otro a 25°C, como parte de un estudio de estabilidad de 2 meses. Cada muestra contiene 4,57 miligramos de HIP2B en 5 microlitros de agua destilada. Se retira una muestra de cada grupo de temperatura y se coloca en un congelador a menos 20°C, para su almacenamiento, cada siete días hasta que se puede realizar el análisis LC/MS. Se evaluaron una serie de muestras después de 1, 2, y 3 semanas en el estudio de estabilidad frente a una muestra de control de HIP2B que se había preparado al inicio del estudio y se almacenaron a -20°C. Después de tres semanas de ensayo de estabilidad a cada una de las temperaturas descritas anteriormente, todas las muestras se mantuvieron sin cambios según lo determinado mediante LC/MS y por lo tanto se consideraron estables a 1, 2, y tres semanas. Estos estudios de estabilidad de congelación-descongelación sugieren que se produce un cambio de carbono en la unión de Pro-Asn en la secuencia de HIP cuando se almacena en dimetil sulfóxido (DMSO), la secuencia se mantiene estable durante varios meses cuando se almacena en disolución salina isotónica a -20°C.

#### Ejemplo 6

HIP Optimizado demuestra una mayor estabilidad del péptido frente a las proteasas del suero in vitro a lo largo del tiempo (T).

[00244J Los péptidos se incubaron en plasma humano, a 37°C. Las incubaciones de las muestras se realizaron a lo largo de un período de 1 hr. Se utilizaron puntos temporales Individuales de 1, 5, 10, 30, y 60 minutos para seguir las reacciones. La desactivación de las proteasas de plasma en cada punto temporal se logró calentando las muestras a 100°C durante 1 min. Después de la elaboración, las muestras de plasma tratado se evaluaron mediante cromatografía de fase inversa en serie con un espectrómetro de masas, HPLC/LC-MS, frente a las muestras de control.

El plasma tratado con HIP y péptidos HIP Optimizados se evaluó a lo largo de 1, 5, 10, 30 y 60 minutos. Para cada punto temporal se pipetearon 0,70 ml de plasma en un tubo de ensayo de 10 ml. A cada uno se le añadieron 0,30 ml de una disolución de partida de HIP o péptido HIP optimizado (1,66 mg/ml) preparada en solución salina tamponada con fosfato. Las muestras de plasma/péptido se incubaron a 37°C para cada punto temporal seguido de calentamiento a 100°C para inactivar la actividad proteolítica de las proteasas plasmáticas. Después de la inactivación, las muestras se diluyeron con 1 ml de H<sub>2</sub>O, se centrifugaron y el líquido sobrenadante se retiró para el análisis.

- Las muestras se analizaron en una columna de fase inversa C-18 (50 mm x 2,0 mm) utilizando TFA al 0,07% en H<sub>2</sub>O como tampón A y TFA al 0,07% en acetonitrilo como tampón B. Se utilizó un gradiente lineal de A al 98%/B al 2% que progresaba a A al 30%/B al 70% a lo largo de 10 min a una velocidad de flujo de 0,4 ml/min. El eluyente se controló mediante UV a una longitud de onda de 220 nm y mediante espectroscopia de masas. Se utilizaron comparaciones de los perfiles cromatográficos de los péptidos tratados con plasma (37°C) frente a las muestras de referencia de péptidos y controles de plasma para determinar la estabilidad relativa del péptido al tratamiento del plasma. Controles
- 5 T = 0: Plasma (0,7 ml), más disolución de partida de péptido (0,3 ml), calentar a 100°C 1 min., añadir 1 ml de H<sub>2</sub>O, centrifugar.
- 10 Control de fondo de plasma: 0,7 ml de plasma más PBS (0,3 ml), calentar a 100°C 1 min., añadir 1 ml de H<sub>2</sub>O, centrifugar.
- Péptido de referencia tratado con calor: disolución de partida péptido (0,3 ml) más 0,7 ml de PBS, calentar a 100°C 1 min, añadir 1 ml de H<sub>2</sub>O.
- Péptido de referencia sin calor: disolución de partida de péptido (0,3 ml) añadir 0,7 ml de PBS más 1 ml de H<sub>2</sub>O.
- 15 **Resultados.**
- HIP2 (IGLHDPTQGTEPNG) (SEQ ID NO: 4) (Comparativo). La evidencia de la proteólisis por la aparición de un nuevo componente (~5%) es evidente después de solo 1 min. de incubación con HIP2. El nuevo componente continúa aumentando a lo largo del tiempo. A los 30 minutos. representa ~50% y a los 60 min. la concentración es ~70%. El metabolito principal se identifica como GLHDPTQGTEPNG (SEQ ID NO: 92), lo que indica la pérdida primaria de la isoleucina N-terminal. Además, hay evidencia de la presencia de una pequeña cantidad de HDPTQGTEPNG (SEQ ID NO: 93) como resultado de la pérdida de IGL.
- 20 HIP2B (Ac-IGLHDPTQGTEPNG-NH<sub>2</sub>) (SEQ ID NO: 7) La forma de C-amida N-acetilada de HIP2 parece ser completamente estable a las proteasas de plasma después de 1 h de incubación a 37°C.
- HIP3 (IGLHDPTQGTEPNGE) (SEQ ID NO: 3) (Comparativo). La proteólisis de HIP3 es más lenta con respecto a la de HIP2. Después de 60 min. la concentración de partida de HIP3 es de ~50%. El principal metabolito identificado es HDPTQGTEPNG (SEQ ID NO: 93), lo que indica una pérdida de IG.
- 25 HIP3B (Ac-IGLHDPTQGTEPNGE-NH<sub>2</sub>) (SEQ ID NO: 5) La forma bloqueada de HIP3 es completamente estable hasta 1 hr de incubación en plasma.
- Dímero HIP2B Cys (Ac-IGLHDPTQGTEPNGC-NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 19) (Comparativo)
- 30 Este compuesto parece ser estable a las proteasas plasmáticas durante al menos 1 hr. Sin embargo, el tratamiento con calor a 100°C de las muestras incubadas, así como el control T =0, indica la conversión de la sustancia de partida a un aducto de cistina cuya estructura es
- Ac-IGHDPTQGTEPNGC(C)-NH<sub>2</sub>. (SEQ ID NO: 94) (Comparativo) La conversión parece deberse al desplazamiento por cisteína, a partir de plasma, cuando las muestras se calientan a 100°C.
- 35 HIP2B Cys-PEG (Ac-IGLHDPTQGTEPNGC(PEG)-NH<sub>2</sub>) (SEQ ID NO: 22). Este constructo de elevador peso molecular es estable a las proteasas plasmáticas hasta durante 1 hr.
- Resultados. La proteólisis de los péptidos HIP2 e HIP2B en plasma se muestra en la Fig. 8. Los resultados de HIP2 mostraron aparición de un nuevo componente (~5%) después de solo 1 minuto de incubación en plasma. Este nuevo componente continúa aumentando con el tiempo y representa y el metabolito principal se identifica como la secuencia de HIP2 con pérdida primaria de la isoleucina N-terminal y en segundo lugar la pérdida de los tres primeros aminoácidos. HIP2B parecía completamente estable a las proteasas plasmáticas después de 1 hora de incubación a 37°C. Las formas bloqueadas de HIP2 e HIP3 referidas como HIP2B e HIP3B son claramente más estables a las proteasas plasmáticas hasta durante 1 hr con respecto a las estructuras no bloqueadas. El dímero y los derivados PEG de HIP2B también son muy estables.
- 40
- 45 **Ejemplo 7**
- Utilizando una técnica de crecimiento de una línea celular inmortalizada humana establecida a partir de células epitelioides pancreáticas humanas conocida como PANC-1, se evaluó el impacto in vitro del impacto de los HIP e HIP optimizados sobre la producción de insulina. Esta línea celular demuestra la capacidad de diferenciarse en otros tipos de células pancreáticas tras la señalización apropiada. Por lo tanto, se utilizaron células PANC-1 como sustituto para las células progenitoras de origen natural del páncreas.
- 50



Las células Panc-1 se sembraron en matraces T75 en medio DMEM que contenía suero bovino fetal al 10%. Las células se incubaron a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5% durante 24 horas y a continuación se trataron con los HIP a una concentración final de 167 nM. Este tratamiento se realizó una vez al día durante cuatro días. El quinto día, las células se rompieron para obtener los productos lisados celulares. En estos extractos celulares se determinaron los niveles de proteína total, y se utilizaron 50 microgramos de la proteína total para realizar el análisis de transferencia de Western. Las muestras que contenían 50 microgramos de proteínas se diluyeron en tampón de carga que contenía o no 5% del agente reductor beta-mercaptoetanol, y se cargaron en cada pocillo del gel. Después de la electroforesis y la transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa, la presencia de insulina se detectó mediante el uso como anticuerpo principal el anticuerpo anti-insulina de pollo policlonal (Ab14042, dilución 1/2000), y como anticuerpo secundario el anti-pollo conjugado con HRP policlonal de conejo (dilución 1/1000 para el gel NIT y 1/2000 para el gel PANC-1).

La Fig. 9 es el análisis de Transferencia Western que demuestra la expresión de insulina humana a partir de células PANC-1 en respuesta a la incubación con HIP e HIP Optimizado. El panel debajo de la etiqueta A demuestra bandas para la insulina en las células Panc-1, cuando las muestras se cargaron en condiciones no reductoras. Los resultados indican que HIP2, HIP2B e HIP2 dimerizado estimulan más la producción de insulina que el HIP2 PEGilado o de control. En condiciones reductoras, los enlaces disulfuro que conectan las dos cadenas polipeptídicas de la insulina se reducen y, por tanto, la cadena se separa y, en estas condiciones, el anticuerpo para la insulina no reacciona con la insulina. En contraste con las condiciones no reductoras, la molécula de insulina está completa y es reconocida por el anticuerpo.

La Fig. 9B muestra la proteína total contenida en las mismas membranas que en la Fig. 9A. La determinación de los niveles de proteína total a través de la tinción de Ponceau demuestra que las diferentes calles contienen cantidades similares de proteínas. Se determinaron los niveles de proteína total en las células NIT-1 y PANC-1, y se utilizaron 50 microgramos de proteína total para realizar el análisis de Transferencia Western. Las muestras que contenían 50 microgramos de proteínas se diluyeron en tampón de carga que contenía o no 5% del agente reductor beta-mercaptoetanol, y se cargaron en cada pocillo del gel.

La tinción de Ponceau demostró que las diferencias en la expresión de insulina que respondían a diferentes HIP e HIP Optimizados no están relacionadas con la cantidad de proteína cargada en los pocillos. Asimismo, la carencia de señal de la insulina, p. ej., la membrana en condiciones reductoras, no se atribuye a la carencia de proteína.

### Ejemplo 8

Efectos de los péptidos HIP e HIP optimizados sobre la morfología celular de las líneas celulares PANC-1. Las células se trataron con péptidos HIP e HIP Optimizados durante cuatro días. En la Fig. 10A, tomada el día 7 a un aumento de 200X, se pueden observar diferencias morfológicas entre las condiciones de control y las células tratadas HIP e HIP optimizados con células histológicamente más diferenciadas, concretamente en las células tratadas con HIP2B. Fig. 10B muestra el progreso de los cambios en la morfología celular a lo largo de 7 días, con el control en la parte superior, HIP2 en el medio, e HIP2B en la parte inferior. Las fotografías fueron tomadas los días 1, 2, 3, 5, y 7 a un aumento de 200X. Si bien las células tratadas de control no parecían experimentar ningún cambio, las células tratadas con HIP2 e HIP2B se desviaban significativamente de su apariencia inicial. La Fig. 10C demuestra el progreso de los cambios morfológicos cuando se tratan con Dímero de HIP2 e HIP2 PEG cultivos de células PANC-1. En general, las células tratadas de control no sufrieron ningún cambio visual significativo, las células tratadas con HIP2 e HIP2B se desvían significativamente de su apariencia inicial.

### Ejemplo 9

Actividad HIP 2B en cultivo de tejido pancreático humano. El Laboratorio de Islotes Humanos de la Universidad de Pennsylvania demostró el impacto de los péptidos HIP e HIP Optimizados en cultivos de células ductales pancreáticas humanas. La fracción ductal de las células pancreáticas humanas se cultivó durante 10 días en una matriz de colágeno y a continuación se trató cada dos días con HIP2B. Las células se marcaron mediante doble tinción con anticuerpo para CK19, un marcador de tejido ductal, y tinción DAPI para mostrar los núcleos y la insulina. Como se muestra en la Fig.11, las células experimentaron cambios morfológicos que indujeron la expresión de insulina en células por otra parte negativas a la insulina.

### Ejemplo 10

Datos piloto del impacto de péptidos HIP e HIP optimizados en un modelo diabético no obeso.

En consonancia con los datos en los ratones tratados con STZ (más arriba) de aumento de la masa, área y número de los islotes, el modelo de ratón NOD piloto demostró evidencia preliminar del potencial de HIP Optimizado para proporcionar una mejor eficacia en términos de neogénesis de los islotes tal como se mide mediante los niveles de péptido C en ratones después del tratamiento con HIP durante 39 días.

El modelo diabético no obeso (NOD) se utiliza como un modelo para la diabetes autoinmune tipo 1. Esta forma de diabetes es la más complicada ya que el daño subyacente al páncreas y su producción de insulina se deben al ataque autoinmunitario. Por lo tanto, con el fin de mostrar la neogénesis de los islotes definitiva en esta forma de diabetes se debe utilizar un agente tolerancia inmunitaria combinado con HIP. El modelo de ratón NOD es un modelo extremadamente difícil, ya que muchos de los ratones pueden llegar a ser diabéticos solo transitoriamente y entrar en remisión, mientras otros desarrollan diabetes severa. El calendario de actuación en este modelo de ratón transgénico es difícil de determinar.

En un estudio preliminar que utilizaba el agente de la tolerancia inmunitaria, lisofilina (LSF) en fase de desarrollo, tres ratones NOD se convirtieron en diabéticos y se asignaron al azar a placebo más LSF, HIP2 más LSF e HIP2B más LSF. Como se muestra en la Fig. 12, del grupo que recibió LSF en el momento apropiado, los dos tratados con HIP respondieron con constante mejora de los niveles de glucosa durante el estudio en comparación con los ratones NOD tratados solo con LSF que tuvieron elevaciones graduales de la glucosa durante todo el estudio. Aunque no es un estudio estadísticamente significativo, estos datos proporcionan una evidencia muy convincente para la búsqueda de la combinación de un agente de tolerancia inmunitaria e HIP para la diabetes tipo 1.

### Ejemplo 11

Impacto de HIP2B e HIP2 sobre el receptor de HIP. Los siguientes conjuntos de estudios demuestran que HIP2B es tan eficaz como HIP2 en la interacción con el receptor de membrana citoplásmica para HIP y el tráfico desde el receptor al núcleo. El receptor para Péptido Prolislotos Humano se marcó utilizando un método de doble anticuerpo en una línea celular pancreática humana estable. El primer anticuerpo era un anticuerpo policlonal de conejo y el segundo era un anti-conejo de cabra marcado con colorante fluorescente Cy3.

Estas células crecen normalmente en medio carente de suero y cuando son tratadas con tripsina, se desestabilizan y se vuelven competentes para experimentar cambios de desarrollo. Las células se cultivaron en medio carente de suero (SFM) con y sin HIP, y en medio carente de suero con tripsina (TSFM). Esto es para demostrar que la simple desestabilización, no activa los cambios de desarrollo.

Cuando se tratan con HIP en condiciones estables, no se producen cambios. Cuando se tratan con HIP en condiciones de desarrollo competentes, el receptor marcado responde a la presencia de HIP siendo encapsulado por la membrana citoplasmática y movido a la membrana nuclear donde se reciben las señales para la diferenciación.

Cuando se tratan con HIP en condiciones estables, no se producen resultados. Cuando se tratan con HIP en condiciones de desarrollo competentes, el receptor marcado responde a la presencia de HIP siendo encapsulado por la membrana citoplasmática y movido a la membrana nuclear donde se reciben las señales para la diferenciación.

La Fig. 13 demuestra que células PANC-1 tratadas con tripsina e incubadas en medio libre de suero se diferencian a agregados de células de los islotes. El receptor de HIP es regulado al alza durante la diferenciación de las células pancreáticas humanas y parece interactuar con HIP2 e HIP2B interactúa con el receptor de HIP. HIP2 e HIP2B optimizado estimulan el tráfico desde el receptor de HIP en la membrana citoplasmática al núcleo de las células estimulando la diferenciación de las células progenitoras pancreáticas a nuevos islotes productores de insulina.

La Fig. 14 muestra el anticuerpo anti- receptor de HIP humano de conejo marcado con Cy3 en (A) TSFM solo y (B) TSFM con 150  $\mu$ M (HIP2B Optimizado) durante 48 horas. HIP estimula que la proteína unida a la membrana del receptor sea envuelta por la membrana citoplasmática y transportada a la membrana nuclear.

La Fig. 15 muestra análisis inmunofluorescentes repetidos del impacto de HIP2B Optimizado sobre el receptor de HIP (EXTL3). Los paneles superiores indican la tinción de inmunofluorescencia con Cy3 de EXTL3 (rojo). En el panel inferior las imágenes de inmunotinción con Cy3 de EXTL3 se han superpuesto a la tinción con DAPI (azul) de los núcleos. Las células se cultivaron en medio de crecimiento convencional como control y se compararon con las células cultivadas medio carente de suero (SFM) en presencia o ausencia de HIP. Las flechas de color amarillas muestran ejemplos de la expresión superficial de EXTL3 desarrollado en medio de crecimiento convencional. Los bordes de las celdas están bien definidos indicando la expresión superficial de EXTL3 sobre la membrana plasmática. Las flechas de color amarillo delimitan los bordes de la célula, mientras que los núcleos se muestran en color azul. Las imágenes centrales son las células cultivadas en SFM. EXTL3 se localiza en el citoplasma como se indica mediante la tinción citoplásmica con Cy3. Las flechas de color verde muestran la carencia de tinción en la posición de los núcleos. Las flechas de color verde en la imagen inferior de las células cultivadas en SFM muestran tinción de color azul intenso con DAPI de los núcleos indicando una carencia de EXTL3 en el núcleo. En la imagen superior de las células cultivadas en SFM e HIP, la presencia de inmunotinción con EXTL3 en el núcleo indicada por las flechas de color azul sugiere una traslocación de EXTL3 al núcleo. En la imagen inferior de las células cultivadas en SFM e HIP, las flechas de color azul indican la posición de los núcleos. En la imagen inferior, hay un solapamiento de la tinción EXTL3-Cy3 y la tinción nuclear con DAPI que corrobora la localización nuclear de EXTL3 (flechas de color azul). Barra de escala = 20  $\mu$ m en todas las imágenes.

La Figura 16 muestra que HIP2B optimizado mejora la traslocación del receptor de HIP (EXTL3) de la membrana citoplásmica al núcleo en las células PANC-1. Análisis de transferencia Western de los niveles de HIP (EXTL3) en fracciones citosólicas y nucleares aisladas en los puntos temporales indicados. El análisis de transferencia Western demuestra que los niveles más altos de receptores HIP (EXTL3) nucleares se observaron a las 6 horas del cultivo en SFM sin HIP. La adición de HIP2 e HIP2B al medio de cultivo aumentó la traslocación nuclear de EXTL3, demostrada por los niveles nucleares más altos de esta proteína a los 30 minutos. Estas comparaciones demuestran que en presencia de HIP, se mejora el tiempo de traslocación de EXTL3 desde el compartimento citoplasmático al núcleo y que la traslocación nuclear de EXTL3 puede ser modulada por la presencia de HIP. Las transferencias Western producen resultados repetidos utilizando estas células y puntos temporales.

10 **Ejemplo 12**

En un estudio aleatorizado, controlado con placebo de HIP2, HIP2B vs. placebo, se trataron ochenta (80) ratones con STZ para inducir diabetes. Los ratones se controlaron hasta que alcanzaron un nivel de hiperglicemia compatible con la aparición de la diabetes. Los niveles de glucosa en el momento inicial para los ratones de la intervención promediaron 300 +/- 6 mg/dl y no hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles de glucosa entre los grupos de intervención con HIP y el grupo placebo (P = 0,301).

Después de 36 días, todos los ratones tratados HIP dejaron de depender de la insulina y las glucosas mostraron una tendencia a la baja de manera significativa en comparación con el grupo de placebo. Ratones seleccionados al azar se sacrificaron durante el curso del estudio de la inmunohistoquímica en sus páncreas. Se pusieron en marcha los análisis de péptido C en suero. Después de 39 días de intervención, los ratones restantes se someterán a ensayo todos los días para determinar los niveles de glucosa y la salud en general durante los siguientes 60 días.

La evaluación preliminar demuestra que el tratamiento con HIP da como resultado una reducción del 38,7% en comparación con el placebo (p <0,05). Además, la estabilización de HIP2 para formular HIP2B no disminuyó la actividad in vivo.

Como se muestra en la Figura 17, el tratamiento con HIP dio como resultado niveles de glucosa que eran 116 mg/dl más bajos que con placebo (↓,38,7% p <0,05). Todos los ratones tratados con HIP dejaron de depender de la insulina. 56% (9/16) de los ratones tratados con HIP tuvieron niveles de glucosa <230 mg/dL. 9% (1/11) de los ratones tratados con placebo tuvieron niveles de glucosa <230 mg/dL. HIP 2B es significativamente más estable *in vitro* en suero a 37 grados. HIP 2B también tiene una vida media más larga en solución salina. Las modificaciones de HIP 2 para formar HIP 2B no disminuyeron la actividad in vivo.

Para evaluar el potencial terapéutico de HIP2B, se utilizó un modelo de ratón de diabetes inducida por STZ. A sesenta ratones C57BL/6J se les inyectó por vía intraperitoneal STZ a 50 mg/kg en tampón de citrato, pH 4,5, durante 5 días consecutivos para volverlos diabéticos. Los ratones se distribuyeron al azar en el estudio cuando el nivel de glucosa en sangre fue ≥ 200 mg/dl durante dos días consecutivos. La glucosa en sangre se controló diariamente utilizando una gota de sangre obtenida de un corte realizado en la punta de la cola. Las mediciones de glucosa se determinaron utilizando un medidor de glucosa. Si el nivel de glucosa en sangre en cualquier animal aumentaba a ≥ 324 mg/dl, el animal se trataba con insulina (1 unidad por día, insulina glargina, por vía intramuscular) hasta que la glucosa en sangre cayó por debajo de 324 mg/dL. Se llevó un registro de la dosificación de insulina, de manera que se pudieran realizar comparaciones de los requerimientos de insulina. Tres animales adicionales no fueron tratados con STZ y se utilizaron para establecer los valores no diabéticos en el momento inicial.

Los animales fueron asignados en tres grupos, como se muestra en la Tabla 4. A los animales diabéticos se les inyectaron por vía intraperitoneal dos veces al día (a.m. y p.m.) durante 39 días consecutivos, ya sea vehículo de control, HIP2 (300 µg) o HIP2B (300 µg). Los ratones de cada uno de los grupos de tratamiento (Grupos 1-3) se sacrificaron el Día 39. La tarde antes de su sacrificio, todos los ratones se mantuvieron en ayunas con un nivel de glucosa en la mañana medido antes del sacrificio, que fue considerado como un nivel de glucosa en ayunas. Los grupos de animales restantes se mantuvieron sin intervención médica desde el día 40-60. Estos recibieron mediciones diarias de glucosa en la mañana y administración de insulina, cuando corresponda. Los criterios de valoración del estudio incluyeron los siguientes: 1) cambios en la glucosa en sangre y 2) cambios en las necesidades de insulina.

50 Tabla 4: Distribución al azar de ratones convertidos en diabéticos con STZ

Grupo	Tratamiento	Dosificación	Nivel de dosis	Volumen de dosis	Número de animales
1	Vehículo	2 inyecciones i.p. diariamente x39 días	0	100 µl	20

Grupo	Tratamiento	Dosificación	Nivel de dosis	Volumen de dosis	Número de animales
2	HIP2	2 inyecciones i.p. diariamente x39 días	300 µg	100 µl	20
3	HIP2B	2 inyecciones i.p. diariamente x39 días	300 µg	100 µl	20

5 A lo largo del transcurso del estudio, ambos grupos con HIP2 e HIP2B tuvieron una disminución significativa en los niveles de glucosa en sangre con respecto al grupo control. Sin embargo, no hubo diferencia en el nivel de glucosa en sangre entre los dos grupos con HIP. La Figura 17 demuestra que sobre el día 36, las Modificaciones en HIP 2 para formar HIP 2B no habían disminuido la actividad in vivo. El tratamiento HIP dio como resultado niveles de glucosa que fueron 116 mg/dL menores que con placebo ( $\downarrow$ , 38,7%  $p < 0,05$ ). Todos los ratones tratados con HIP dejaron de depender de la insulina. Cincuenta y seis (56)% (9/16) de los ratones tratados con HIP tuvieron niveles de glucosa  $< 230$  mg/dL. Nueve (9)% (1/11) de los ratones tratados con Placebo tuvieron niveles de glucosa  $< 230$  mg/dL.

10 La Figura 17 es un gráfico que representa los niveles medios de glucosa diarios en un modelo de ratón diabético por STZ después de la administración de HIP2, HIP2B y placebo. El nivel medio de glucosa en el momento inicial fue de 300 mg/dl + 2 mg/dl, sin diferencias significativas entre los grupos tratados con placebo o HIP ( $p = 0,301$ ).

15 La Figura 18 es un gráfico que representa los niveles de glucosa diarios entre los grupos de ratones tratados con HIP2B (verde) y control (púrpura) y placebo. Las pendientes de las líneas de cada grupo (Figura 18) representan la tasa de cambio en los niveles de glucosa, a lo que los autores de la presente invención hacen referencia como "velocidad de regeneración". El tratamiento con HIP2B dio como resultado una tasa de caída (velocidad de regeneración) en los niveles de glucosa de -0,602 en comparación con la tasa de aumento de los niveles de glucosa en el grupo tratado con placebo que tenía una tasa de aumento de glucosa de +0,381 en el transcurso del estudio de días 1-39.

20 La Figura 19 demuestra las diferencias en la glucosa entre el día 1 y el día 38 del estudio que compara HIP2B, HIP2 y placebo. La Figura 19 muestra la mejora del control de la glucosa entre los grupos de ratones tratados que reciben HIP2B Optimizado (amarillo), HIP2 (verde) y control (azul) al principio y al final de la intervención. El grupo control tuvo un incremento medio desde el momento inicial de 28,9 mg/dl a 334,6 mg/dl. Los grupos con HIP2B e HIP2 tuvieron reducciones significativas a partir del momento inicial con un nivel de glucosa medio no en ayunas de 235,3 mg/dl en el grupo HIP2B ( $p = 0,024$  del control) y 231,6 mg/dl en el grupo con HIP2 ( $p = 0,029$  del control).

25 La Figura 20 demuestra los niveles de glucosa en ayunas al término estudio entre los grupos de tratamiento. El grupo de tratamiento con HIP2B Optimizado tuvo una glucosa en ayunas al final del estudio de 106,7 mg/dl  $\pm$  0,58 mg/dl ( $p = 0,046$ ) en comparación con los controles tratados con placebo con una glucosa media en ayunas de 258,00 + 84,5 mg/dl. Los ratones tratados con HIP2 no bloqueado tuvieron una glucosa media en ayunas de 115,3 mg/dl + 16,5 mg/dl ( $p = 0,050$ ) en comparación con el grupo tratado con placebo.

La Figura 21 demuestra los resultados del ensayo de tolerancia a la glucosa realizado en animales después del curso del tratamiento y antes de su sacrificio. HIP 2B Optimizado es significativamente más estable *in vitro* en suero a 37 grados. El HIP 2B Optimizado también tiene una vida media más larga en solución salina. Las modificaciones en HIP 2 para formar HIP 2B no disminuyeron la actividad in vivo

### 35 Ejemplo 13

Para evaluar el potencial terapéutico y la dosis mínima eficaz de HIP2B necesaria mejorar significativamente el control glicémico, se llevó a cabo un estudio de dosis-respuesta utilizando modelo de ratón de diabetes inducida por STZ.

35 La Figura 22 muestra los resultados de un análisis de respuesta a la dosis de HIP2B llevado a cabo para evaluar y comparar los efectos de HIP2B Optimizado sobre el control de la glucosa cuando se libera a diferentes dosificaciones en un modelo de diabetes en ratones con el fin de determinar la dosificación potencial más baja que producía la máxima eficacia. Este estudio fue un ensayo aleatorio para determinar el impacto de cinco concentraciones de HIP2B sobre el control glicémico y la atenuación de la diabetes en un modelo de ratón tratado con STZ. Los grupos de tratamiento oscilaron de un máximo de 1.000 microgramos BID a 0,1 microgramos BID de HIP2B optimizado en 100 µl de solución salina isotónica. Los seis grupos de estudio se enumeran a continuación.

Artículo de Ensayo	Dosificación equivalente en el hombre (60 kg)	Dosis/día en Ratón = mg/kg/día (peso de ratón ~20 gramos)
1	100 mg kg día 6000 mg día	1000 mcg 100 µl BID = 2 mg día = 100 mg kg día
2	10 mg kg día 600 mg día	100 mcg 100 µl BID = 0,2 mg día = 10 mg kg día
3	1 mg kg día 60 mg día	10 mcg 100 µl BID = 0,02 mg día = 1 mg kg día
4	0,1 mg kg día 6 mg día	1 mcg 100 µl BID = 0,002 mg día = 0,1 mg kg día
5	0,01 mg kg día 0,6 mg día	0,1 mcg 100 µl BID = 0,0002 mg día = 0,01 mg kg día
6	Placebo salino	Placebo salino 100 µl BID

5 Los niveles de glucosa se verificaron diariamente en los ratones a ~0900 a 1100, con independencia de los patrones de alimentación de los ratones. Debido a las posibles variaciones de la glucosa en el momento de las mediciones diarias de glucosa, se calcularon los valores medios de glucosa móviles de cinco días diariamente en cada grupo de tratamiento. El impacto de las concentraciones de HIP2B se evaluó mediante 1) los niveles medios de glucosa y 2) el grado al cual las diferentes concentraciones de HIP2B atenúan el desarrollo de toxicidad de la glucosa según se determinó por excursiones de glicémicas entre los grupos de intervención en comparación con el grupo control.

10 La Figura 22 representa el estudio de respuesta a la dosis llevado a cabo en ratones tratados con STZ y confirma que las eficacias entre los ratones diabéticos tratados con 10, 100 y 1000 microgramos BID son equivalentes. A una dosificación de menos de 1 mg/kg hubo una señal de disminución de la eficacia en ratones que correspondía a niveles de dosificación de 0,1 y 0,01 mg/kg.

15 HIP2B optimizado es distinto en muchos aspectos de las terapias tradicionales tales como la insulina para el tratamiento de la diabetes. HIP2B inicia una cascada de señalización que conduce a la neogénesis de los islotes. En contraste con la insulina, en la que la eficacia de la respuesta se mide principalmente por su inmediata capacidad de disminución de la glucosa, la respuesta farmacodinámica de cualquier agente de neogénesis de los islotes se mide a lo largo de días y semanas. Por lo tanto, la eficacia de los agentes neogénesis de los islotes, tales como HIP2B y INGAP se puede evaluar no solo por la restauración a largo plazo de control de la glicemia después de la dosificación diaria repetida, sino también por la atenuación de la hiperglicemia, y/o la velocidad a la que se consigue la euglicemia. Todos los grupos de tratamiento con HIP se acercaron a la euglicemia.

20 La respuesta de atenuación por la dosis se calculó como el cambio en la glucosa media con la mayor respuesta posible igual a la extensión máxima a la que la diabetes se atenúa. En esta evaluación, los autores de la presente invención informan del cambio en la respuesta por dosis unitaria calculado por la diferencia en las excursiones glicémicas máximas en cada grupo de tratamiento durante todo el estudio en comparación con la de las excursiones glicémicas del grupo de control. El grupo de control no tuvo atenuación de la enfermedad y logró 100% de inducción de la enfermedad. La medida en que las dosis de HIP2B atenúan este efecto se describe como % de atenuación% de la enfermedad en cada grupo de tratamiento con respecto al grupo con placebo.

30 La Figura 23 ilustra el impacto de diferentes concentraciones de HIP2B en la atenuación de la diabetes. Cada uno de los tres niveles de tratamiento más altos atenúa la gravedad de la diabetes en la misma medida. Las dos dosis de tratamiento más bajas de HIP (0,1 y 1 microgramos por día liberadas BID) no mostraron una respuesta tan como lo hicieron las tres dosis más altas.

35 A niveles de dosificación de 0,1 y 1 microgramos BID, la respuesta a HIP2B mostró una atenuación de la enfermedad por encima de la del placebo. A medida que aumentaba la concentración de HIP2B a 10 microgramos BID, se produjeron la mayor eficacia y atenuación de la diabetes. A niveles de dosificación de 1000, 100, y 10 microgramos BID, la diabetes fue atenuada entre 60-70% del máximo estado de enfermedad observado en el grupo

con placebo. A partir de estos resultados, los autores de la presente invención concluyen que el nivel de dosificación más bajo de HIP2B que proporcionará una eficacia óptima se encuentra en el intervalo de 1-10 microgramos BID en ratones o una dosis equivalente en seres humanos de 0,5-1,0 mg/kg en los seres humanos (30-60 mg BID). Esta dosis es aproximadamente 1/10 de la dosis utilizada en los ensayos con INGAP en Fase2B (600 mg/día).

## 5 Ejemplo 14

Se llevó a cabo un estudio farmacocinético para confirmar la mejora de la biodisponibilidad que se había alcanzado con la estructura de HIP2B Optimizado. El estudio de biodisponibilidad absoluta y farmacodinámico se llevó a cabo en ratas Sprague Dawley después de la administración intravenosa y subcutánea de HIP2 (Figura 24), HIP2B Optimizado e INGAP. El propósito fue determinar la absorción, la biodisponibilidad absoluta y los niveles en plasma de HIP2, HIP2B Optimizado e INGAP en ratas macho después de dos rutas de administración diferentes.

A seis grupos de cinco ratas Sprague Dawley macho se les administraron HIP2, HIP2B o INGAP por las rutas intravenosa y subcutánea como sigue en la tabla a continuación.

Grupo	Ruta de Administración	Artículo de Ensayo	Conc. Nom (mg/ml)	Vol Dosis	Nivel Dosis Nom (mg/kg)
1	Subcutánea	HIP2	2	2	4
2	Intravenosa	HIP2	2	2	4
3	Subcutánea	HIP2B	2	2	4
4	Intravenosa	HIP2B	2	2	4
5	Subcutánea	INGAP	2	2	4
6	Intravenosa	INGAP	2	2	4

Se recogieron diez muestras de plasma de sangre seriadas (0,03 ml cada una) de un catéter de la vena yugular de cinco animales por grupo a los 5, 10, 15, 30 minutos, 45 minutos, seguido de las muestras a 1, 2, 3, 8, y 24 horas después de la dosificación. El plasma se recogió en tubos que contenían EDTA. Tras la recogida, las muestras se mantuvieron refrigeradas en acumuladores de frío antes de la centrifugación y transfirieron a tubos de microcentrifuga pre-etiquetados para su almacenamiento a -70°C o menos.

Se añadieron muestras de plasma de rata de 200 µl cada una a un tubo de microcentrifuga que contenía 1 ml de acetonitrilo (ácido trifluoroacético al 0,07%, TFA) y se agitaron con un mezclador de vórtice durante 1 min. seguido de centrifugación para eliminar las proteínas del plasma precipitadas. La disolución de sobrenadante se retiró y se evaporó, utilizando un Speed Vac, hasta sequedad. Al tubo de microcentrifuga que contenía el sedimento seco se le añadieron 200 µl de acetonitrilo:agua 20:80 (que contenía TFA al 0,07%). La muestra se centrifugó para eliminar cualquier material insoluble y la disolución de sobrenadante se transfirió a viales analíticos para el análisis LC/MS MS. El espectrómetro de masas se calibró para detectar el ion/los iones hijos más abundantes observados para cada una de las respectivas muestras de referencia de HIP2B (M = 286,0), HIP2 (M = 287,1) e INGAP (M = 212,2, 356,1, 373,9). Las muestras de plasma con HIP2B Optimizado, HIP2 e INGAP se analizaron en una columna de fase inversa C-18 (50 mm x 2,0 mm, Varian Pursuit XRS3) utilizando TFA al 0,07% en H<sub>2</sub>O como tampón A y TFA al 0,07% en acetonitrilo como tampón B. Se utilizó un gradiente lineal de A al 98%/B al 2% que progresaba a B al 100% a lo largo de 9 minutos a una velocidad de flujo de 0,4 ml/min.

Los siguientes controles de plasma se trataron como se ha descrito anteriormente y se utilizaron para establecer una curva de concentración patrón:

1. plasma blanco como un control de fondo

2. Cinco muestras de plasma patrón que contenían  $6,7 \times 10^4$ ,  $6,7 \times 10^3$ ,  $6,7 \times 10^2$ , 67 y 6,7 ng/ml de HIP2B, HIP2 e INGAP

También se analizaron muestras de dosificación retenidas de HIP2B Optimizado, HIP2 e INGAP mediante LC/MSMS con el fin de determinar la concentración de cada una en el momento de la inyección. El análisis confirmó que la concentración, dentro del error experimental, era de 2 mg/ml. Todos los animales parecían normales en todo momento después de la dosificación y después de cada ruta de administración.

HIP2 e INGAP: Después de la administración intravenosa o subcutánea de HIP2, se observaron niveles muy bajos de HIP2 solo cinco minutos después de la dosificación estando todas las muestras posteriores estar por debajo del límite de cuantificación. Después de la administración intravenosa o subcutánea de INGAP, todas las muestras de

plasma medida estuvieron por debajo del límite inferior de cuantificación. Como resultado, los parámetros farmacocinéticos de plasma para HIP2 e INGAP después de la administración de dosis intravenosas y subcutáneas no se pudieron calcular.

5 Después de la administración intravenosa de HIP2B, las concentraciones en plasma de HIP2B disminuyeron de manera monofásica, con una semivida en plasma en fase terminal media de 0,19 horas (11 minutos). La  $C_{max}$  media fue de 8237 ng/ml que se produjo en el primer punto temporal de muestreo de 5 minutos. Se estimó que la  $C_0$  media fue de 18805 ng/ml. El  $AUC_{0-\infty}$  media fue de 2231 ng\*h/ml. El aclaramiento en plasma medio aparente fue de 1,9 l/h/kg, con un volumen medio de distribución aparente de 0,48 l/kg.

10 Después de la administración subcutánea de HIP2B Optimizado, el HIP2B absorbido disminuyó de una manera monofásica con una semivida en plasma en fase terminal media de 0,34 horas (20 minutos). El  $AUC_{0-\infty}$  media fue de 1932 ng\*h/ml. Cl/F media aparente fue de 2,1 l/h/kg, con una  $V_2/F$  media aparente de 1 l/kg. La biodisponibilidad subcutánea absoluta de HIP2B fue de 87%. La Figura 25 demuestra que en la farmacocinética de la administración subcutánea de HIP2B Optimizado, los niveles en plasma de HIP2B optimizado fueron detectables hasta 2 horas con un  $t_{1/2,e}$  de ~20 minutos.

15 Las concentraciones en plasma de INGAP fueron indetectables en cualquier punto temporal lo que indica que INGAP es rápidamente aclarado y/o metabolizado. Los niveles en plasma de HIP2B Optimizado son significativamente más altos con respecto a HIP2 o INGAP tras la administración dosis subcutáneas. Basándose en perfiles plasmáticos cromatográficos de LC/MS multi-pico observados, es mucho menos probable que el HIP2B Optimizado sea rápidamente metabolizado in vivo en comparación con HIP2 e INGAP. La biodisponibilidad de H1P2B es de 87%.

20 La Figura 24 muestra el análisis LC/MS MS de muestras de HIP2B Optimizado, HIP2 e INGAP derivadas de plasma de rata como parte de un análisis PK en el que se administraron dosis de HIP2B, HIP2 e INGAP por vía subcutánea o mediante inyección intravenosa a 4 mg/kg.

25 Tras la administración subcutánea, los niveles de HIP2B fueron detectables hasta 1,5 horas. El  $T_{1/2}$  es de aproximadamente 0,5 horas. Se detectaron niveles muy bajos de HIP2 a los 5 minutos sin una detección posterior después de 5 min. Basándose en el perfil cromatográfico de LC/MS multi-pico observado, el HIP2B optimizado es metabolizado menos rápidamente in vivo en comparación con HIP2.

Las concentraciones de INGAP fueron indetectables en cualquier punto temporal, lo que indica que es rápidamente aclarado y metabolizado. La siguiente tabla resume estos datos.

30 Análisis comparativo PK

Péptido	Ruta	Dosis (mg/kg)	$C_0$ (ng/ml)	$C_{max}$ (ng/ml)	$T_{max}$ (h)	$C_{1h}$ (ng/ml)	$AUC_{0-\infty}$ (ng*h/ml)	$T_{1/2}$ (h)	F
HIP2B	SQ	4	na	2739	0,167	611,5	1932	0,34	0,87
	IV	4	18805	8237	0,083	114	1614,3	0,19	na
HIP2	SQ	4	na	32	0,083	0	2,7	0,02	0,01
	IV	4	18805	29	0,083	0	441,9	0,02	na
INGAP	SQ	4	na	0	na	0	0,0	<0,025	0,00
	IV	4	18805	0	na	0	439,5*	<0,025	na

n=5; na, no aplicable

\* extrapolado

Los autores de la presente invención llegaron a la conclusión de que los niveles en plasma de HDP2B optimizado son significativamente más altos con respecto a HIP2 o INGAP después de la administración subcutánea.

35 Los niveles en plasma de HIP2B son significativamente más altos con respecto a HIP o INGAP después de la administración IV. Después de la inyección intravenosa, el HIP2B optimizado muestra un agotamiento dependiente del tiempo con concentraciones indetectables en torno a los 45 min. El  $T_{1/2}$  es de aproximadamente 9 minutos. HIP2 solo se observó en el punto temporal de 5 minutos e INGAP fue indetectable en cualquier punto temporal, lo que indica ambos son rápidamente aclarados y/o metabolizados.

Aunque la presente invención ha sido descrita con considerable detalle con referencia a ciertas realizaciones preferidas de la misma, son posibles otras versiones.



LISTA DE SECUENCIAS

- <110> CureDM, Inc. Levetan, Claresa S.
- <120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE USO DE PÉPTIDOS PROISLOTES Y ANÁLOGOS DE LOS MISMOS
- 5 <130> 132163.00502
- <150> US 60/969.019
- <151>30-08-2007
- 10 <150> US 60/979.526
- <151>12-10-2007
- <150> US 60/991.964
- <151> 03-12-2007
- 15 <150> US 61/031.479
- <151> 26-02-2008
- <160> 94
- 20 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 25 <211> 528
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- 30 <400> 1

atgctgcctc	ccatggccct	gcccagtgta	tcttggatgc	tgctttcctg	cctcatgctg	60
ctgtctcagg	ttcaagggtga	agaaccccag	agggaaactgc	cctctgcacg	gatccgctgt	120
cccaaaggct	ccaaggccta	tggtcccccac	tgctatgcct	tgtttttgtc	accaaaatcc	180
tggacagatg	cagatctggc	ctgccagaag	cggccctctg	gaaacctggt	gtctgtgctc	240
agtggggctg	agggatcctt	cgtgtcctcc	ctggtgaaga	gcattggtaa	cagctactca	300
tacgtctgga	ttgggctcca	tgaccccaca	cagggcaccg	agcccaatgg	agaaggttgg	360
gagtggagta	gcagtgatgt	gatgaattac	tttgcatggg	agagaaatcc	ctccaccatc	420
tcaagccccg	gccactgtgc	gagcctgtcg	agaagcacag	catttctgag	gtggaaagat	480
tataactgta	atgtgaggtt	accctatgtc	tgcaagttca	ctgactag		528

- <210> 2
- 35 <211> 15
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 2

Ile	Gly	Leu	His	Asp	Pro	Thr	Gln	Gly	Thr	Glu	Pro	Asn	Gly	Glu
1				5					10					15

- <210> 3
- <211> 15
- <212> PRT
- 45 <213> Homo sapiens
- <400> 3

ES 2 534 434 T3

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly  
 1 5 10 15

<210> 4  
 <211> 14  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 4  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly  
 1 5 10

10 <210> 5  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <220>  
 <221> SITIO  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACILACIÓN

20 <220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (15)..(15)

25 <400> 5  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu  
 1 5 10 15

30 <210> 6  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

35 <220>  
 <221> SITIO  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACILACIÓN

40 <220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (15)..(15)

<400> 6  
 Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly  
 1 5 10 15

45 <210> 7  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

50 <220>  
 <221> SITIO  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACILACIÓN

55 <220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (14)..(14)

<400> 7  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly  
 1 5 10

60

<210> 8  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 5 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 8  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Cys  
 1 5 10 15  
  
 <210> 9  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 10 <400> 9  
  
 Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys  
 1 5 10 15  
  
 <210> 10  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 10  
 20 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys  
 1 5 10 15  
  
 <210> 11  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 25 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <221> DISULFURO  
 <222> (15)..(15)  
 30 <400> 11  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys  
 1 5 10 15  
  
 <210> 12  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <221> DISULFURO  
 <222> (17)..(17)  
 40 <400> 12  
 Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu  
 1 5 10 15  
  
 Cys  
 45 <210> 13  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 50 <220>  
 <221> DISULFURO  
 <222> (15)..(15)

ES 2 534 434 T3

<400> 13  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys  
 1 5 10 15

5 <210> 14  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <220>  
 <221> SITIO  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACILACIÓN

15 <220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (16)..(16)

<400> 14  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Cys  
 20 1 5 10 15

<210> 15  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25 <220>  
 <221> SITIO  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACILACIÓN

30 <220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (16)..(16)

35 <400> 15  
 Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys  
 1 5 10 15

40 <210> 16  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

45 <220>  
 <221> SITIO  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACILACIÓN

50 <220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (15)..(15)

<400> 16  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys  
 55 1 5 10 15

<210> 17  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

60

<220>  
 <221> SITIO  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACILACIÓN  
 5  
 <220>  
 <221> DISULFURO  
 <222> (16)..(16)  
 10  
 <220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (16)..(16)  
 <400> 17  
 15 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Cys  
 1 5 10 15  
 <210> 18  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 20 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> SITIO  
 <222> (1)..(1)  
 25 <223> ACILACIÓN  
 <220>  
 <221> DISULFURO  
 <222> (16)..(16)  
 30  
 <220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (16)..(16)  
 35 <400> 18  
 Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys  
 1 5 10 15  
 <210> 19  
 <211> 15  
 40 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> SITIO  
 <222> (1)..(1)  
 45 <223> ACILACIÓN  
 <220>  
 <221> DISULFURO  
 <222> (15)..(15)  
 50  
 <220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (15)..(15)  
 55 <400> 19  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys  
 1 5 10 15  
 <210> 20  
 <211> 16  
 60 <212> PRT

ES 2 534 434 T3

<213> Homo sapiens

<220>  
 <221> SITIO  
 5 <222> (16)..(16)  
 <223> PEGILACIÓN

<400> 20  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Cys  
 1 5 10 15

10 <210> 21  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <220>  
 <221> SITIO  
 <222> (16)..(16)  
 <223> PEGILACIÓN

20 <400> 21  
 Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys  
 1 5 10 15

25 <210> 22  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

30 <220>  
 <221> SITIO  
 <222> (15)..(15)  
 <223> PEGILACIÓN

35 <400> 22  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys  
 1 5 10 15

40 <210> 23  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

45 <220>  
 <221> SITIO  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACILACIÓN

50 <220>  
 <221> SITIO  
 <222> (16)..(16)  
 <223> PEGILACIÓN

55 <220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (16)..(16)

60 <400> 23  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Cys  
 1 5 10 15

<210> 24  
 <211> 16

ES 2 534 434 T3

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5 <220>  
 <221> SITIO  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACILACIÓN

10 <220>  
 <221> SITIO  
 <222> (16)..(16)  
 <223> PEGILACIÓN

15 <220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (16)..(16)

<400> 24  
 Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys  
 1 5 10 15

20 <210> 25  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25 <220>  
 <221> SITIO  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACILACIÓN

30 <220>  
 <221> SITIO  
 <222> (15)..(15)  
 <223> PEGILACIÓN

35 <220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (15)..(15)

40 <400> 25  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys  
 1 5 10 15

45 <210> 26  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Mesocricetus auratus

50 <400> 26  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly Ser  
 1 5 10 15

55 <210> 27  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Mesocricetus auratus

60 <400> 27  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly Ser  
 1 5 10 15

<210> 28  
 <211> 175

ES 2 534 434 T3

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 28  
Met Leu Pro Pro Met Ala Leu Pro Ser Val Ser Trp Met Leu Leu Ser  
1 5 10 15  
Cys Leu Ile Leu Leu Cys Gln Val Gln Gly Glu Glu Thr Gln Lys Glu  
20 25 30  
Leu Pro Ser Pro Arg Ile Ser Cys Pro Lys Gly Ser Lys Ala Tyr Gly  
35 40 45  
Ser Pro Cys Tyr Ala Leu Phe Leu Ser Pro Lys Ser Trp Met Asp Ala  
50 55 60  
Asp Leu Ala Cys Gln Lys Arg Pro Ser Gly Lys Leu Val Ser Val Leu  
65 70 75 80  
5 Ser Gly Ala Glu Gly Ser Phe Val Ser Ser Leu Val Arg Ser Ile Ser  
85 90 95  
Asn Ser Tyr Ser Tyr Ile Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly  
100 105 110  
Ser Glu Pro Asp Gly Asp Gly Trp Glu Trp Ser Ser Thr Asp Val Met  
115 120 125  
Asn Tyr Phe Ala Trp Glu Lys Asn Pro Ser Thr Ile Leu Asn Pro Gly  
130 135 140  
His Cys Gly Ser Leu Ser Arg Ser Thr Gly Phe Leu Lys Trp Lys Asp  
145 150 155 160  
Tyr Asn Cys Asp Ala Lys Leu Pro Tyr Val Cys Lys Phe Lys Asp  
165 170 175

10 <210> 29  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

15 <400> 29  
Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly  
1 5 10

20 <210> 30  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 30  
Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu  
1 5 10 15

25 <210> 31  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Pan troglodytes

30 <400> 31



ES 2 534 434 T3

Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly Gly  
 1 5 10 15  
 <210> 32  
 <211> 16  
 5 <212> PRT  
 <213> Mesocricetus auratus  
 <400> 32  
 Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly Ser  
 1 5 10 15  
 10 <210> 33  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 15 <400> 33  
 Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly Gly  
 1 5 10 15  
 20 <210> 34  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus  
 <400> 34  
 Trp Ile Trp Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly Gly  
 25 1 5 10 15  
 <210> 35  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 30 <213> Bos taurus  
 <400> 35  
 Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asp Ala Gly  
 1 5 10 15  
 35 <210> 36  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Canis familiaris  
 40 <400> 36  
 Trp Met Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Tyr Glu Pro Asn Ala Asp  
 1 5 10 15  
 <210> 37  
 <211> 16  
 45 <212> PRT  
 <213> Ovis aries  
 <400> 37  
 Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asn Ala Gly  
 1 5 10 15  
 50 <210> 38  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Pan troglodytes  
 55 <400> 38  
 Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly  
 1 5 10 15

ES 2 534 434 T3

<210> 39  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 5 <213> Mesocricetus auratus  
  
 <400> 39  
 Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly  
 10 1 5 10 15  
  
 <210> 40  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 15 <213> Mus musculus  
  
 <400> 40  
 Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly  
 1 5 10 15  
 20 <210> 41  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus  
  
 25 <400> 41  
 Trp Ile Trp Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly  
 1 5 10 15  
  
 <210> 42  
 <211> 15  
 30 <212> PRT  
 <213> Bos taurus  
  
 <400> 42  
 Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asp Ala  
 1 5 10 15  
 35 <210> 43  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Canis familiaris  
  
 40 <400> 43  
 Trp Met Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Tyr Glu Pro Asn Ala  
 1 5 10 15  
  
 <210> 44  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Ovis aries  
  
 <400> 44  
 50 Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asn Ala  
 1 5 10 15  
  
 <210> 45  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 55 <213> Pan troglodytes  
  
 <400> 45  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly  
 1 5 10

<210> 46  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Mesocricetus auratus  
 5  
 <400> 46  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly  
 1 5 10  
 <210> 47  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 47  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly  
 1 5 10  
 <210> 48  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus  
 <400> 48  
 Ile Trp Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly  
 1 5 10  
 <210> 49  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Bos taurus  
 <400> 49  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asp Ala  
 1 5 10  
 <210> 50  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Canis familiaris  
 <400> 50  
 Met Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Tyr Glu Pro Asn Ala  
 1 5 10  
 <210> 51  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Ovis aries  
 <400> 51  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asn Ala  
 1 5 10  
 <210> 52  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Pan troglodytes  
 <400> 52  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly Gly  
 1 5 10 15  
 <210> 53

ES 2 534 434 T3

<211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 5 <400> 53  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly Gly  
 1 5 10 15  
 <210> 54  
 <211> 15  
 10 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus  
 <400> 54  
 Ile Trp Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly Gly  
 1 5 10 15  
 15 <210> 55  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Bos taurus  
 20 <400> 55  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Ser Glu Pro Asp Ala Gly  
 1 5 10  
 25 <210> 56  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Canis familiaris  
 <400> 56  
 30 Met Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Tyr Glu Pro Asn Ala Asp  
 1 5 10 15  
 <210> 57  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 35 <213> Ovis aries  
 <400> 57  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asn Ala Gly  
 1 5 10 15  
 40 <210> 58  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 45 <400> 58  
 Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly  
 1 5 10 15  
 <210> 59  
 <211> 15  
 50 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 59  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly Asp  
 1 5 10 15  
 55 <210> 60  
 <211> 14  
 <212> PRT

ES 2 534 434 T3

<213> Pan troglodytes

<400> 60  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly  
 1 5 10

5

<210> 61  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Mesocricetus auratus

10

<400> 61  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly  
 1 5 10

15

<210> 62  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

20

<400> 62  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly  
 1 5 10

25

<210> 63  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus

30

<400> 63  
 Ile Trp Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly  
 1 5 10

35

<210> 64  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Bos taurus

40

<400> 64  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asp Ala  
 1 5 10

45

<210> 65  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Canis familiaris

50

<400> 65  
 Met Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Tyr Glu Pro Asn Ala  
 1 5 10

55

<210> 66  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Ovis aries

60

<400> 66  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asn Ala  
 1 5 10

65

<210> 67  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

ES 2 534 434 T3

<400> 67  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Lys Lys Asn Arg Arg Trp His Trp  
 1 5 10

5 <210> 68  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 68  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Lys Lys Asn Arg Arg Trp His Trp  
 1 5 10

15 <210> 69  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus

20 <400> 69  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Lys Asn Asn Arg Arg Trp His Trp  
 1 5 10

25 <210> 70  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

30 <400> 70  
 Thr Gly Leu His Asp Pro Lys Arg Asn Arg Arg Trp His Trp  
 1 5 10

35 <210> 71  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

40 <400> 71  
 Thr Gly Leu His Asp Pro Lys Ser Asn Arg Arg Trp His Trp  
 1 5 10

45 <210> 72  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Mesocricetus auratus

50 <400> 72  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Lys Asn Asn Arg Arg Trp His Trp  
 1 5 10

55 <210> 73  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus

<400> 73  
 Ile Trp Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly  
 1 5 10

<210> 74  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus

<400> 74

ES 2 534 434 T3

1 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Leu Gly Gly Glu Pro Asn Gly  
 5

<210> 75  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus

10 <400> 75  
 1 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Leu Gly Gln Glu Pro Asn Arg  
 5 10

<210> 76  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

15 <400> 76  
 1 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Met Gly Gln Gln Pro Asn Gly  
 5 10

20 <210> 77  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

25 <400> 77  
 1 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Leu Gly Ala Glu Pro Asn Gly  
 5 10

30 <210> 78  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

35 <400> 78  
 1 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Leu Gly Tyr Glu Pro Asn Arg  
 5 10

40 <210> 79  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus

45 <400> 79  
 1 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Leu Gly Gln Glu Pro Asn Arg  
 5 10

<210> 80  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Mesocricetus auratus

50 <400> 80  
 1 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Leu Gly Gln Glu Pro Asn Gly  
 5 10

<210> 81  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

55 <400> 81

ES 2 534 434 T3

Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly  
 1 5 10

<210> 82  
 <211> 14  
 5 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 82  
 Ile Gly Leu His Asp Leu Ser Leu Gly Ser Leu Pro Asn Glu  
 1 5 10

10 <210> 83  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Bos taurus

15 <400> 83  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Ala Asn Ala  
 1 5 10

20 <210> 84  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Mesocricetus auratus

<400> 84  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly  
 25 1 5 10

<210> 85  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 30 <213> Homo sapiens

<400> 85  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Gln Lys Arg Gln Gln Trp Gln Trp  
 1 5 10

35 <210> 86  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

40 <400> 86  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Gln Lys Lys Gln Leu Trp Gln Trp  
 1 5 10

<210> 87  
 <211> 14  
 45 <212> PRT  
 <213> Pan troglodytes

<400> 87  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Ser Glu Pro Asp Gly  
 1 5 10

50 <210> 88  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Bos taurus

55 <400> 88



Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asp Ala  
 1 5 10

<210> 89  
 <211> 14  
 5 <212> PRT  
 <213> Canis familiaris

<400> 89  
 Met Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Tyr Glu Pro Asn Ala  
 1 5 10

10 <210> 90  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Ovis aries

15 <400> 90  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Glu Gly Ser Glu Pro Asn Ala  
 1 5 10

20 <210> 91  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25 <220>  
 <221> SITIO  
 <222> (1)..(1)  
 <223> PEGILACIÓN

30 <400> 91  
 Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly  
 1 5 10

35 <210> 92  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 92  
 Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly  
 1 5 10

40 <210> 93  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

45 <400> 93  
 His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly  
 1 5 10

50 <210> 94  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

55 <220>  
 <221> SITIO  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACILACIÓN

<220>  
 <221> AMIDACIÓN

<222> (15)..(15)

<220>

<221> SITIO

5 <222> (15)..(15)

<223> ADUCTO DE CISTEÍNA

<400> 94

10 Ile Gly His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Cys Cys  
1 5 10 15

## REIVINDICACIONES

1. Un péptido proislotes seleccionado del grupo que consiste en un péptido HIP1 (SEQ ID NO: 3), un péptido HIP2 (SEQ ID NO: 4), un péptido HIP3 (SEQ ID NO: 2), un péptido REG3A humano (SEQ ID NO: 30), un péptido REG3G humano (SEQ ID NO: 81), un péptido REG1A humano (SEQ ID NO: 67), un péptido REG1B humano (SEQ ID NO: 68), un péptido REG4 humano (SEQ ID NO: 85), un péptido INGAP hámster (SEQ ID NO: 27, 32, 39, o 46), un péptido REG2 de hámster (SEQ ID NO: 72), un péptido REG3G de hámster (SEQ ID NO: 80), un péptido REG1 de rata (SEQ ID NO: 69), un péptido PAP/REG3B de rata (SEQ ID NO: 74), un péptido PAP3 de rata (SEQ ID NO: 75), un péptido REG3G de rata (SEQ ID NO: 79), un péptido REG1 de ratón (SEQ ID NO: 70), un péptido REG2 de ratón (SEQ ID NO: 71), un péptido REG3A de ratón (SEQ ID NO: 33, 40, 47, o 53), un péptido REG3B de ratón (SEQ ID NO: 77), un péptido REG3G de ratón (SEQ ID NO: 78), un péptido REG3S de ratón (SEQ ID NO: 82), un péptido REG4 de ratón (SEQ ID NO: 86), un péptido PTP bovino (SEQ ID NO: 83), un péptido REG3 de rata Noruega (SEQ ID NO: 34, 41, 48, o 54), un péptido de chimpancé de acuerdo con el SEQ ID NO: 31, un péptido de chimpancé de acuerdo con el SEQ ID NO: 38, un péptido de chimpancé de acuerdo con el SEQ ID NO: 45, un péptido de chimpancé de acuerdo con el SEQ ID NO: 52, un péptido de chimpancé de acuerdo con el SEQ ID NO: 60, un péptido bovino de acuerdo con el SEQ ID NO: 35, un péptido bovino de acuerdo con el SEQ ID NO: 42, un péptido bovino de acuerdo con el SEQ ID NO: 49, un péptido bovino de acuerdo con el SEQ ID NO: 55, un péptido bovino de acuerdo con el SEQ ID NO: 88, un péptido canino de acuerdo con el SEQ ID NO: 36, un péptido canino de acuerdo con el SEQ ID NO: 43, un péptido canino de acuerdo con el SEQ ID NO: 50, un péptido canino de acuerdo con el SEQ ID NO: 56, un péptido ovino de acuerdo con el SEQ ID NO: 37, un péptido ovino de acuerdo con el SEQ ID NO: 44, un péptido ovino de acuerdo con el SEQ ID NO: 51, un péptido ovino de acuerdo con el SEQ ID NO: 57, en donde el péptido proislotes comprende una modificación de optimización, y en donde dicha modificación de optimización es un grupo amida C-terminal y un grupo acetilo N-terminal.
2. El péptido de la reivindicación 1, en donde dicho péptido comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 25.
3. Una composición farmacéutica que comprende un excipiente farmacéutico y el péptido proislotes reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 en una cantidad terapéuticamente eficaz.
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, en donde dicha cantidad terapéuticamente eficaz es de 0,5 a 5 mg/kg/día.
5. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz es de 60 a aproximadamente 180 mg/día.
6. El péptido proislotes reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, para su uso en la estimulación de la neogénesis de los islotes o la estimulación de la regeneración de las células de los islotes pancreáticos.
7. El péptido reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicho péptido es para la administración combinada con un agente de regeneración de las células de los islotes pancreáticos, seleccionado opcionalmente entre los péptidos proislotes humanos, análogos de péptidos proislotes humanos, amilina, pramlintida, exendina-4, GIP, GLP-1, agonistas del receptor de GLP-1, análogos de GLP-1, péptido INGAP de hámster, liraglutida, e inhibidor de dipeptidil peptidasa.
8. El péptido proislotes reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, para su uso en el tratamiento de una patología asociada con deterioro de la función pancreática en un sujeto.
9. El péptido reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la patología asociada con deterioro de la función pancreática se selecciona entre diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 1 de nuevo inicio, diabetes de tipo 2, diabetes autoinmune latente de la edad adulta, pre-diabetes, alteración de la glucosa en ayunas, tolerancia alterada a la glucosa, síndrome de resistencia a la insulina, síndrome metabólico/síndrome dismetabólico, sobrepeso, obesidad, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, trastornos de la alimentación, ciclos anovulatorios y síndrome de ovario poliquístico.
10. El péptido reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho péptido es para la administración combinada con un agente que inhibe, bloquea, o destruye las células autoinmunitarias que se dirigen a las células endocrinas pancreáticas, opcionalmente seleccionados entre uno o más de los siguientes agentes: los anticuerpos anti-CD-3 que incluyen hOKT3γ1 (Ala-Ala) (teplizumab); ChAglyCD3 que dirige la respuesta inmunitaria y bloquea específicamente los linfocitos T que causan la muerte de las células beta en la diabetes de tipo 1; el antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico, CLTA-4 Ig (Abatacept); Sirolimus (Rapamicina) solo o combinado con Tacrolimus (FK506) o IL-2 (Rapamune); Rapamune solo o combinado con Proleukin (aldesleukina); una proteína de choque térmico 60 (DiaPep277); una vacuna anti-Ácido Glutámico Descarboxilasa 65 (GAD65); lisofilina, IBC-VSO, vacuna, interferón-alfa, vacuna de células T reguladoras específicas de antígeno CD4+CD25+; la vacuna de células dendríticas supresora de la diabetes, GSK189075,

5 fármacos de diazóxido y estatinas, incluyendo atorvastatina utilizada como un agente para preservar la función de las células beta, Micofenolato de Mofetilo solo o combinado con Daclizumab; el agente anti-CD20, Rituximab; Campath-1H (anticuerpo anti-CD52), lisofilina; la globulina anti-linfocito T policlonal (ATG/Timoglobulina), el factor estimador de las colonias de granulocitos, Neulasta (Pegfilgrastim), Vitamina D, con suplemento tanto de 25 hidroxido como de 1,25 hidroxivitamina D; la vacuna IBC-VSO, que es una forma metabólicamente inactiva, sintética de la insulina diseñada para evitar la destrucción de las células beta del páncreas; interferón alfa; una vacuna que utiliza células T reguladoras CD4+CD25+ específicas del antígeno o cualquier agente o agentes diseñados para suprimir el ataque inmunitario en las células beta de los islotes de Langerhans, Prochymal (Células Madre Humanas Adultas), el anti-inflamatorio Anakinra y el agente antiinflamatorio, Desoxiespergualina, un agente anti-inflamatorio que bloquea la producción de citoquinas proinflamatorias e inhibe las células T y las células B.

10

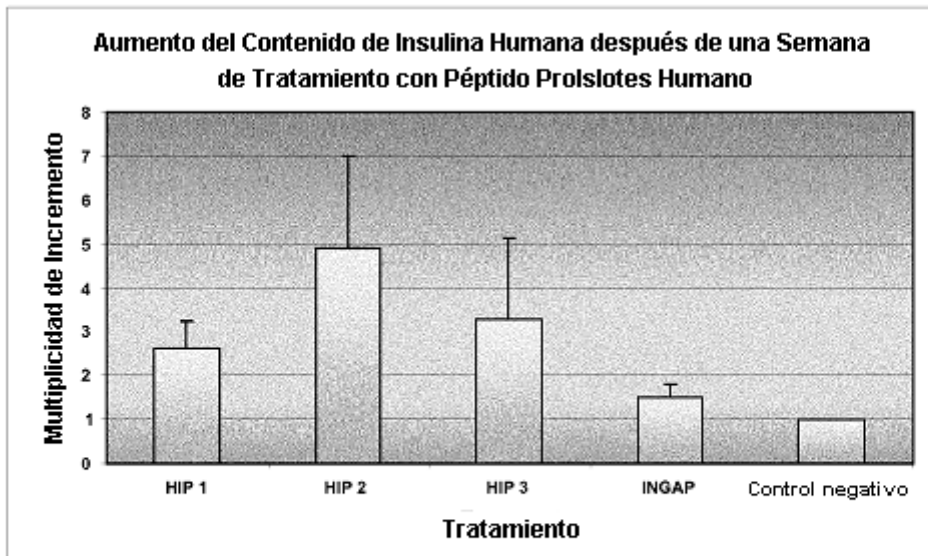


Fig. 1

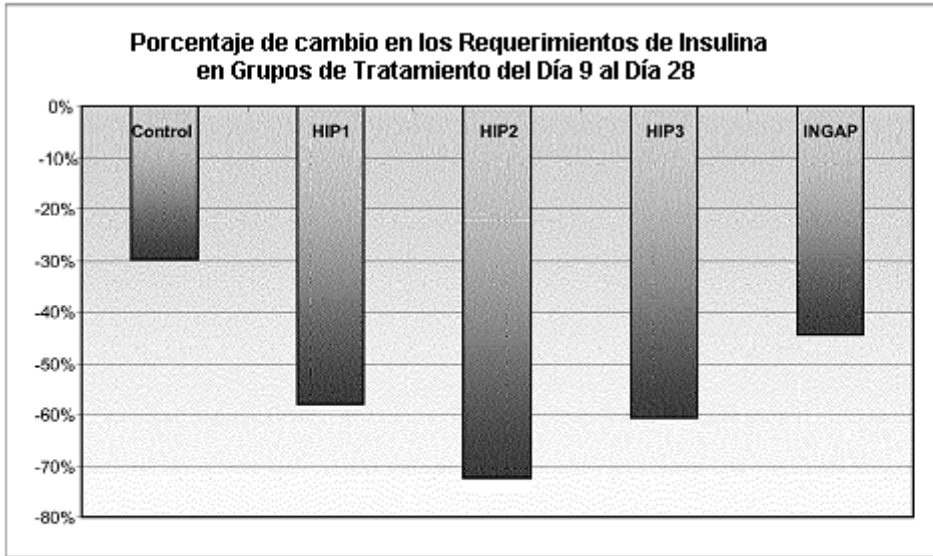


Fig. 2

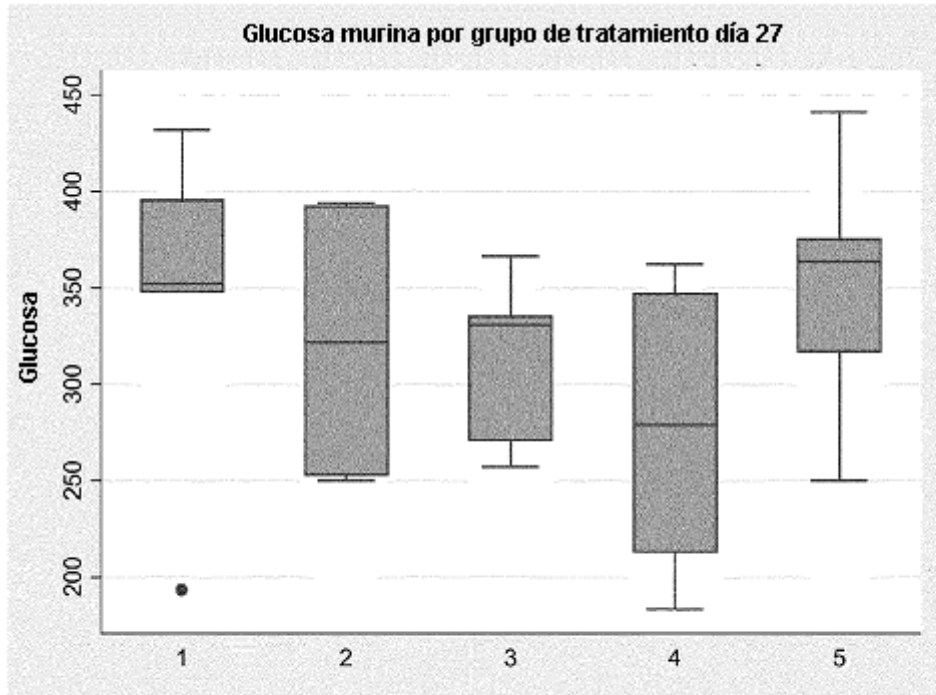


Fig. 3

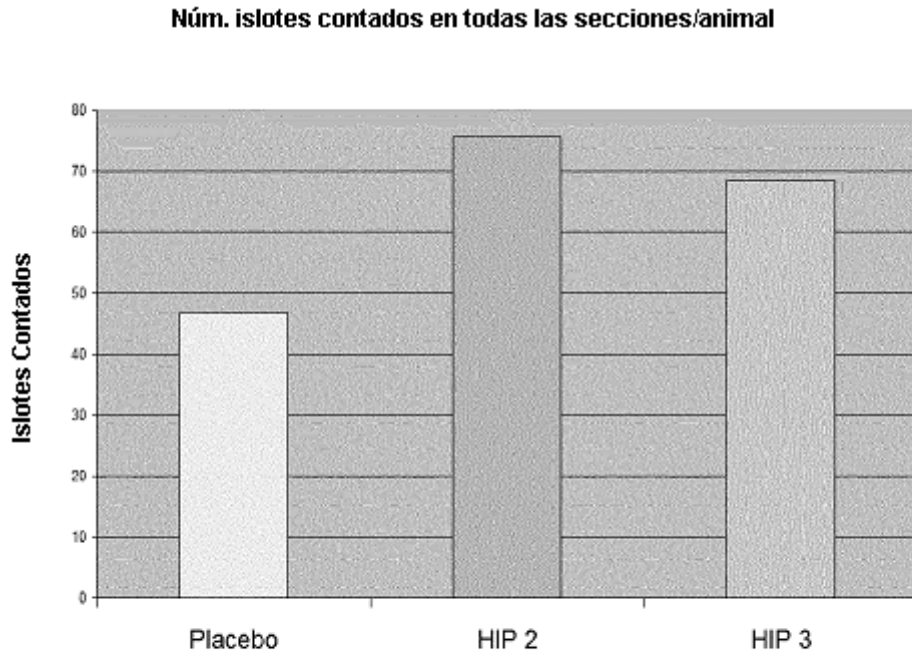


Fig. 4A



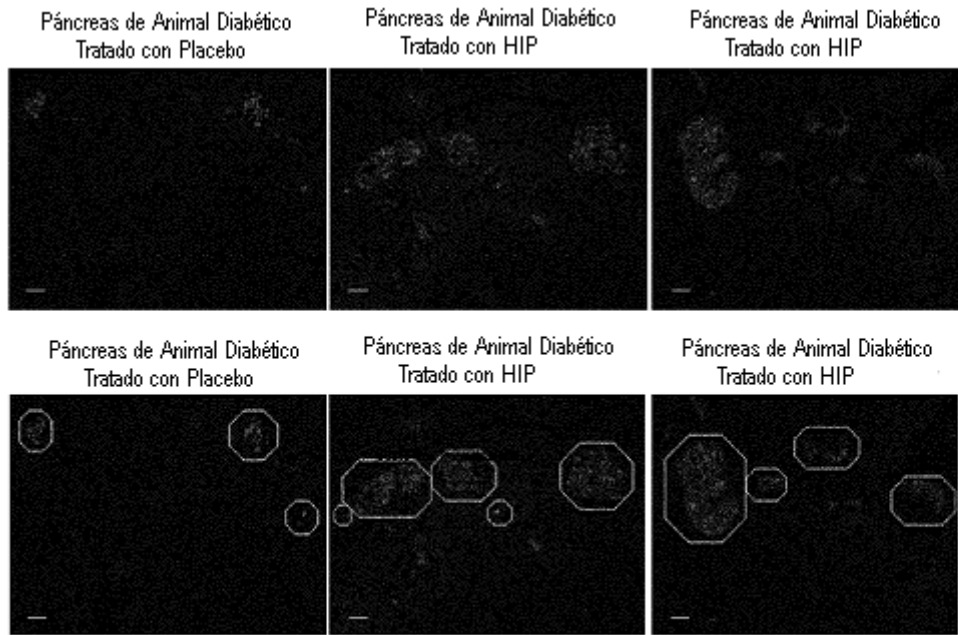


Fig. 4B

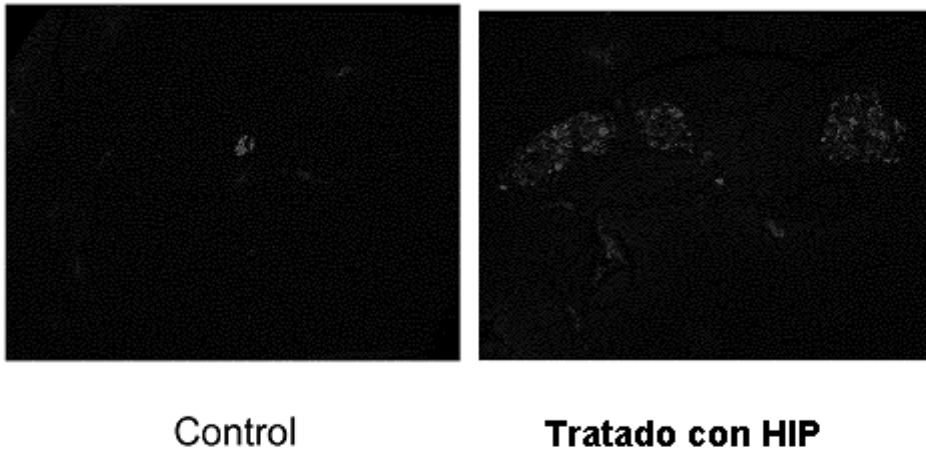


Fig. 5

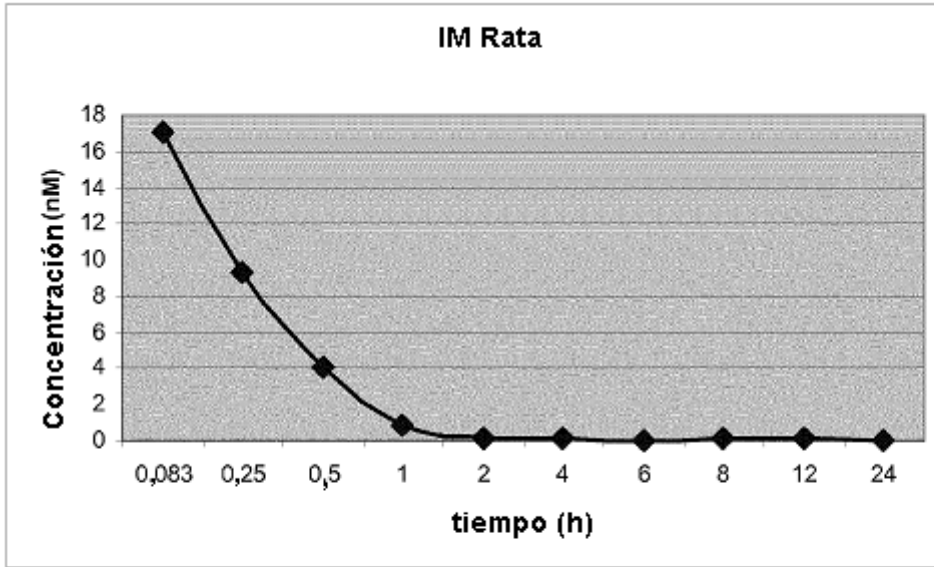


Fig. 6

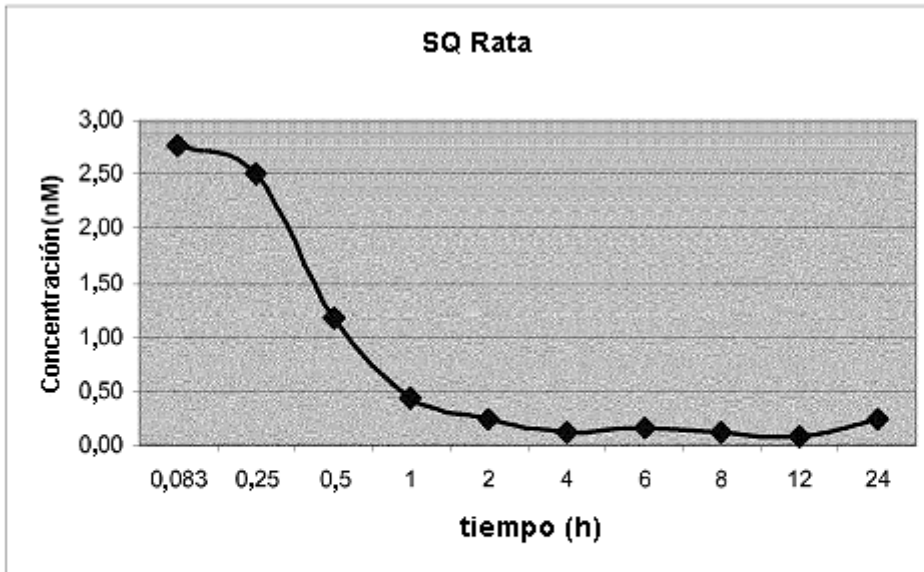


Fig. 7

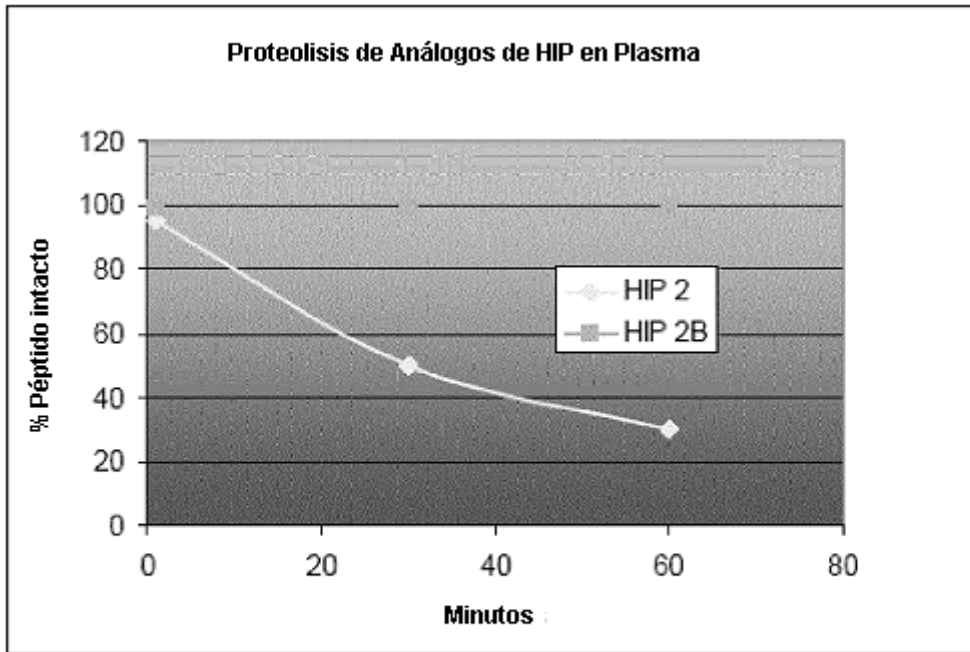


Fig. 8

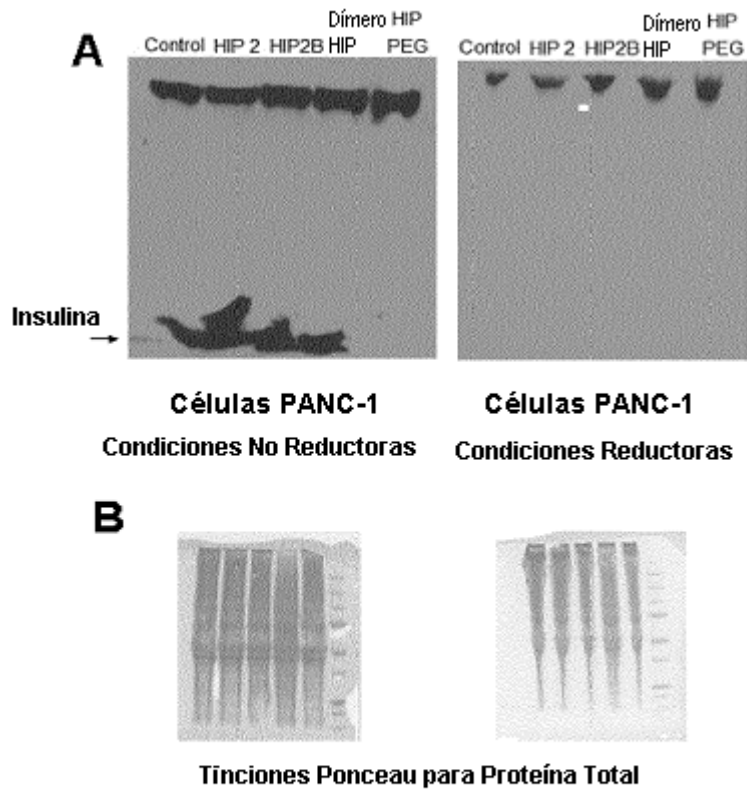


Fig. 9

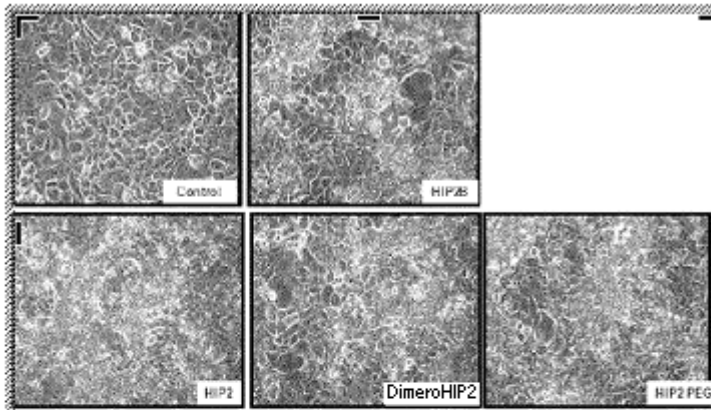


Fig. 10A

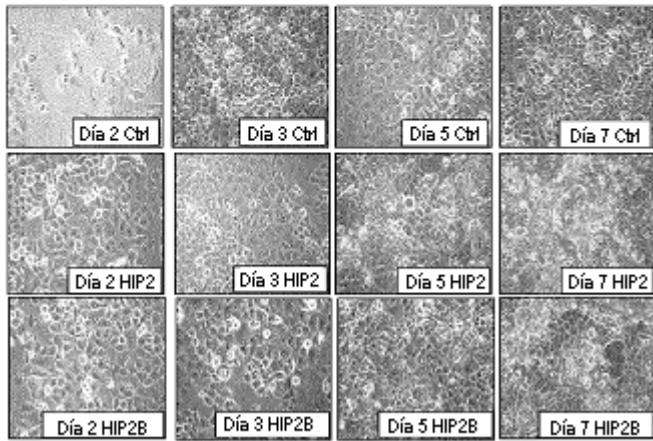


Fig. 10B

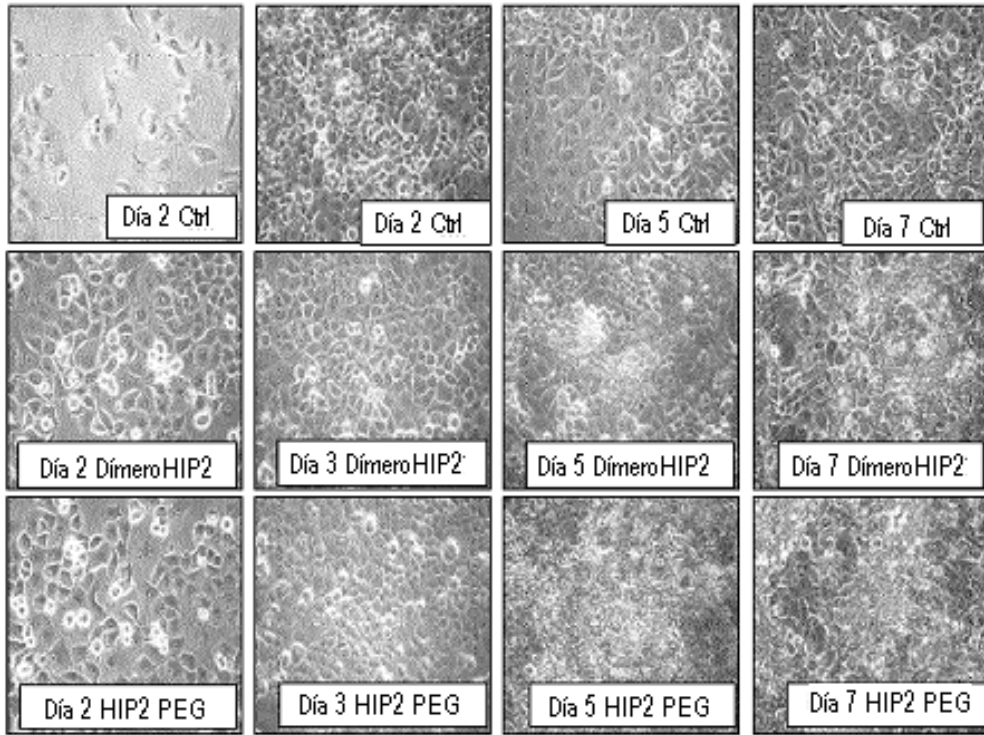


Fig. 10C



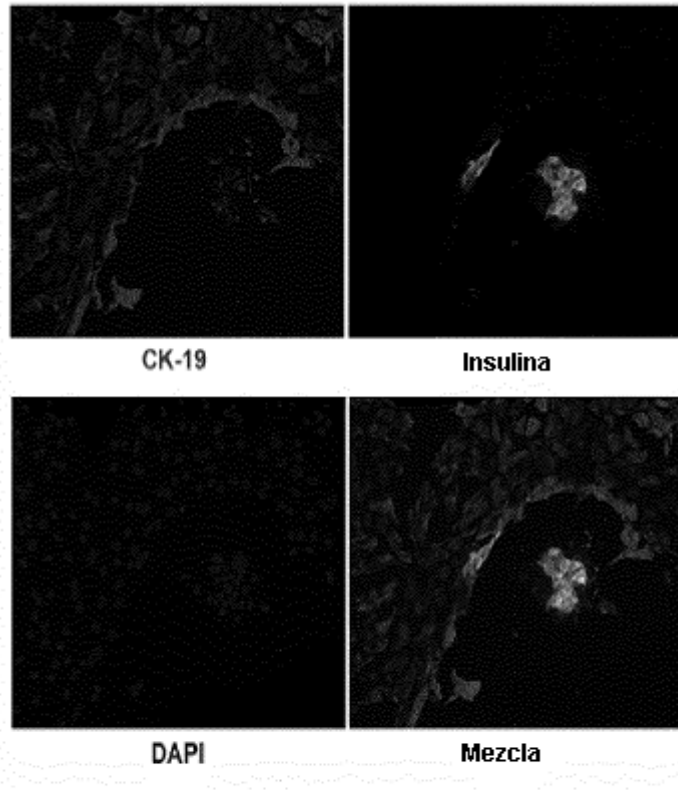


Fig. 11

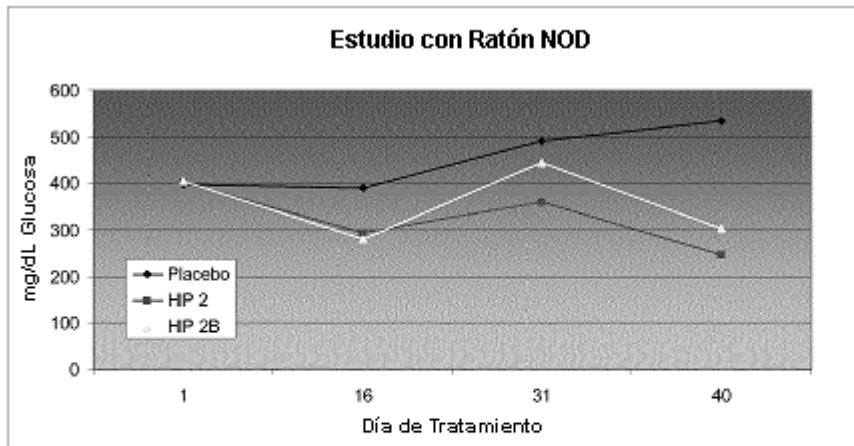


Fig. 12

**Traslacion de Receptor de HIP tras la Estimulacion de HIP y HIP Optimizado**

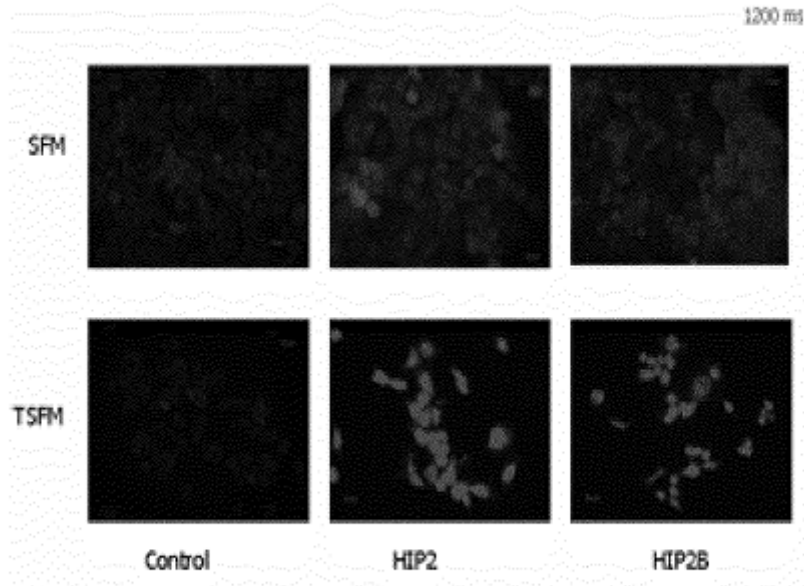
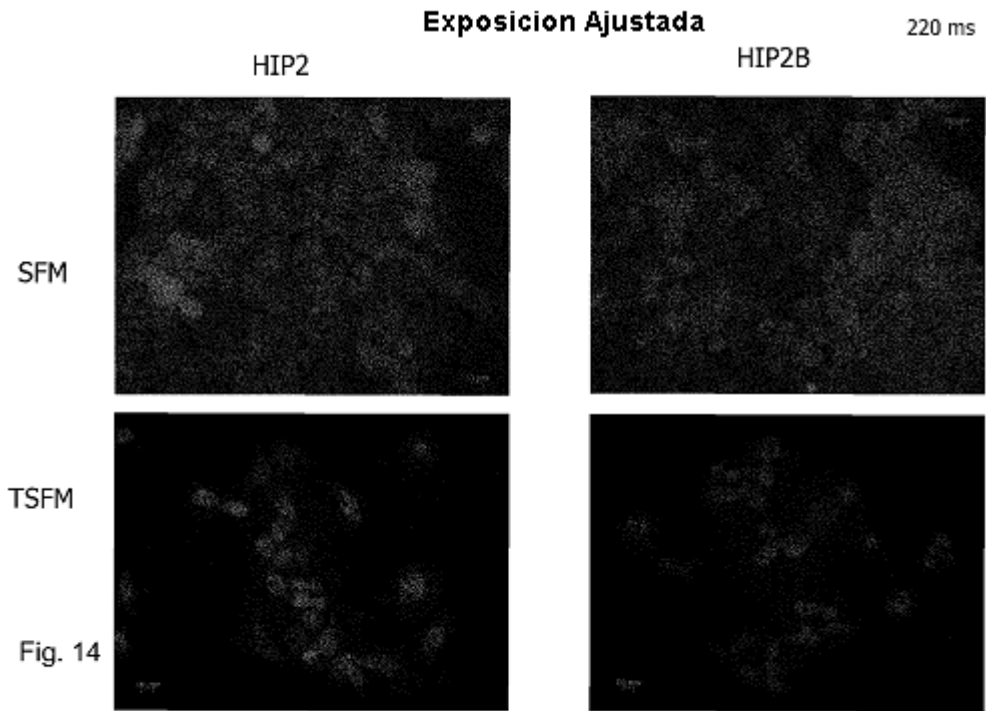


Fig. 13



**Traslación de receptor de HIP de membrana citoplásica a núcleo  
tras la estimulación con Péptidos HIP2 Optimizados**

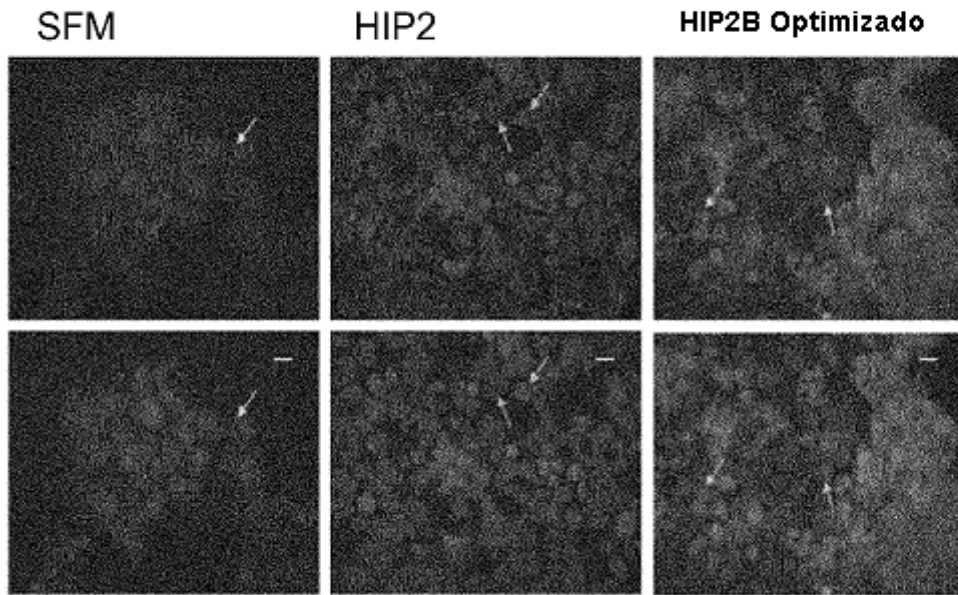


Fig. 15

**Impacto de HIP2B Optimizado sobre el tiempo de traslocación desde el citoplasma al núcleo**

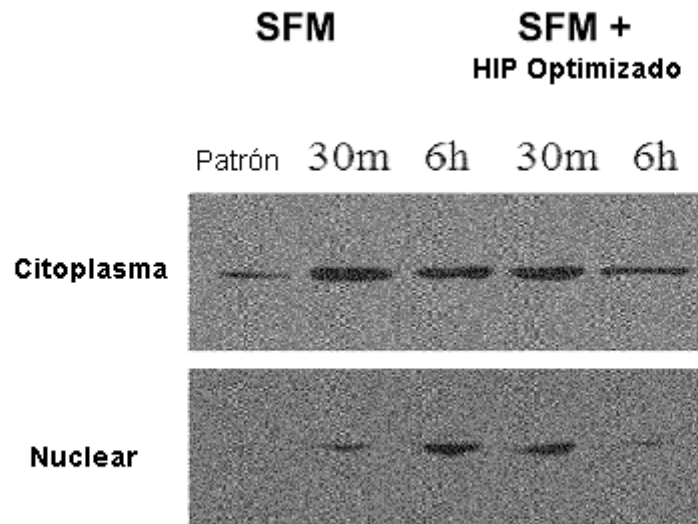
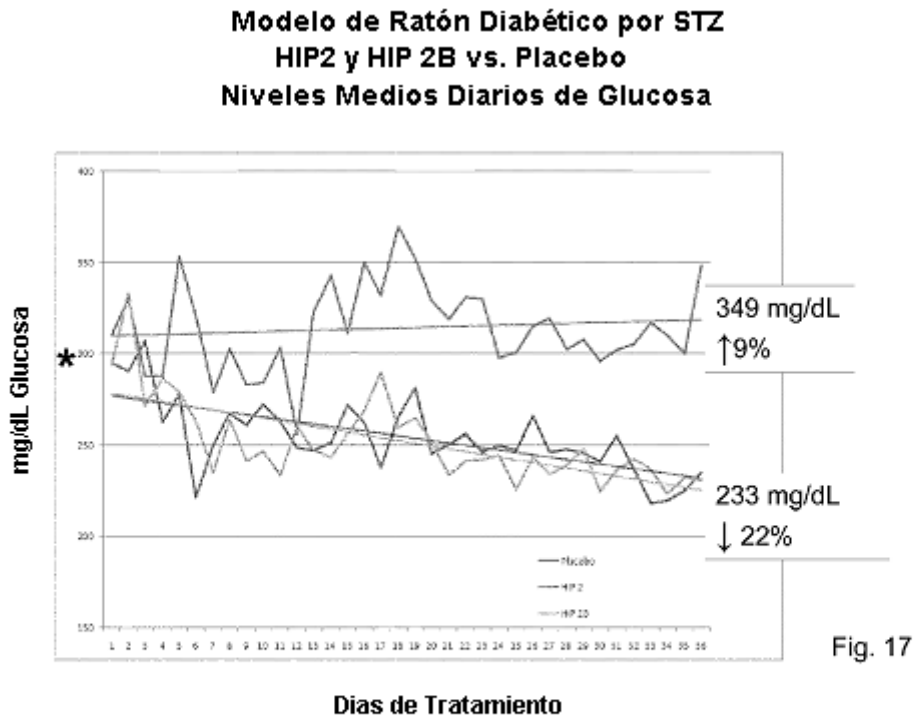


Fig.16



\* Glucosa media en el momento inicial 300  $\pm$  2% mg/dL con diferencias no significativas entre grupos ( $p=0,301$ )

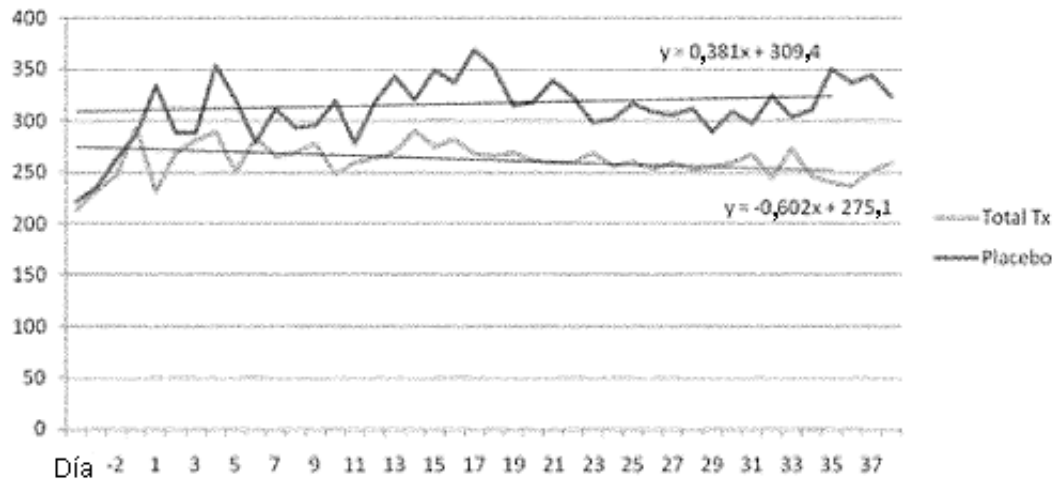


Fig. 18



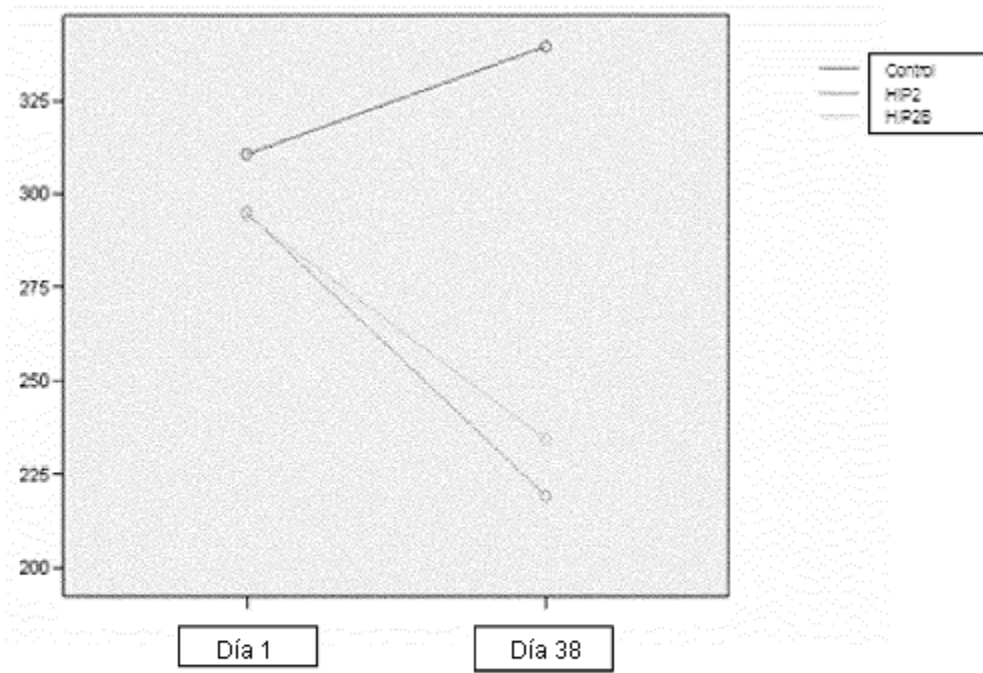


Fig. 19

**Niveles de glucosa en ayunas (mg/dL) despues del tratamiento con HIP2B Optimizado**

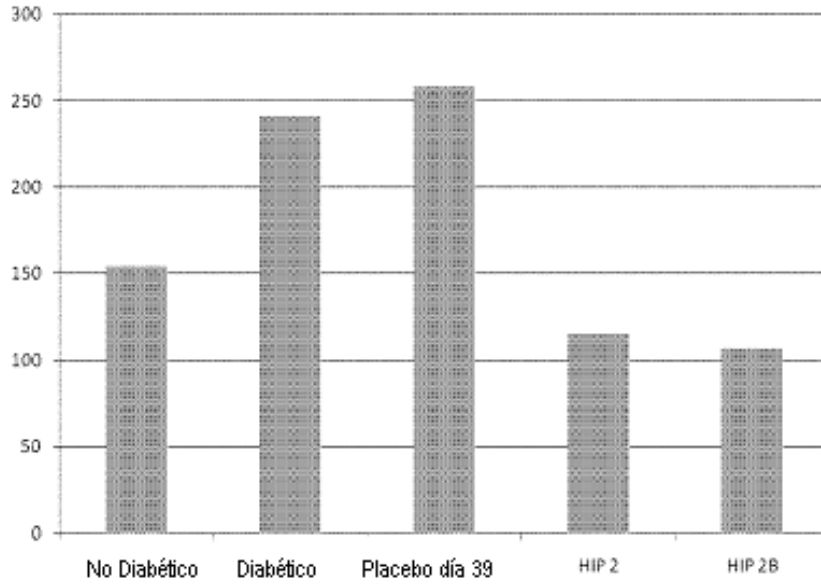


Fig. 20

**Resultados del Ensayo de Tolerancia a la Glucosa después de la Administración de HIP2B Optimizado**

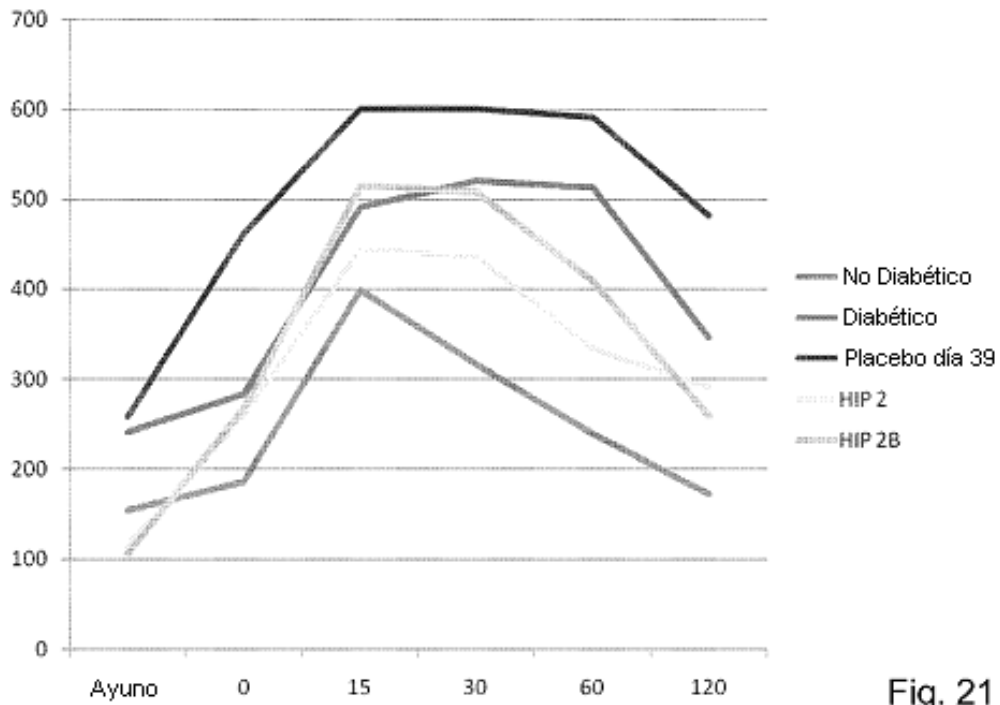


Fig. 21

CureDM Confidential

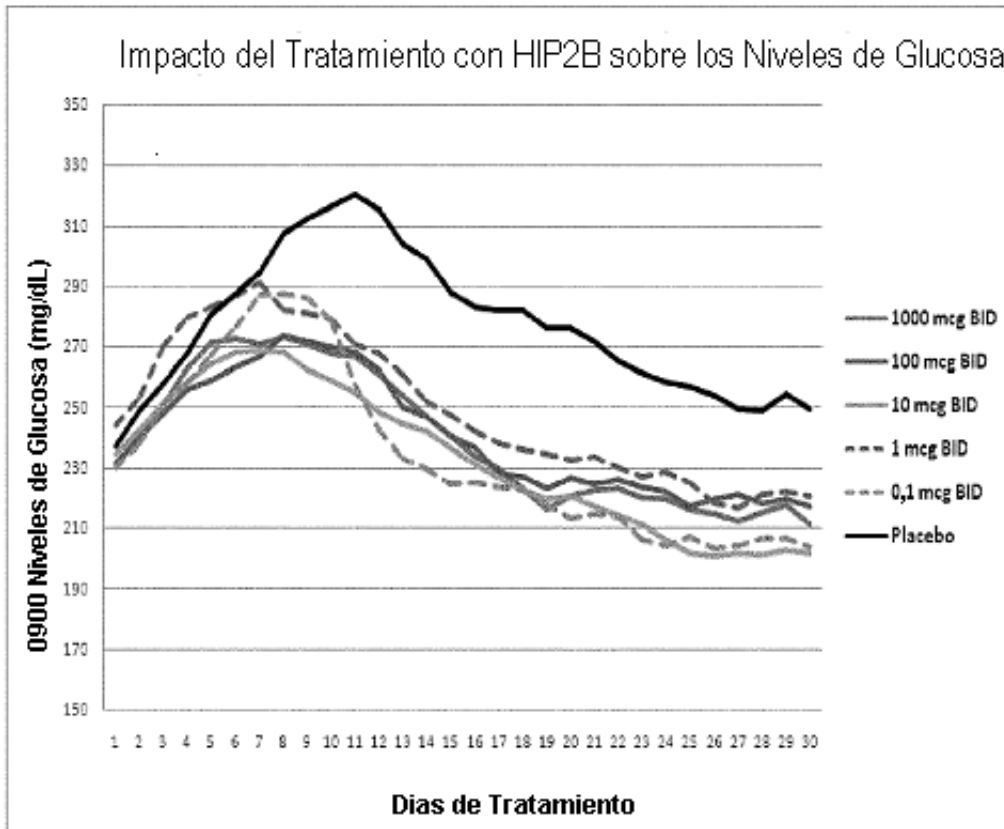


Fig. 22

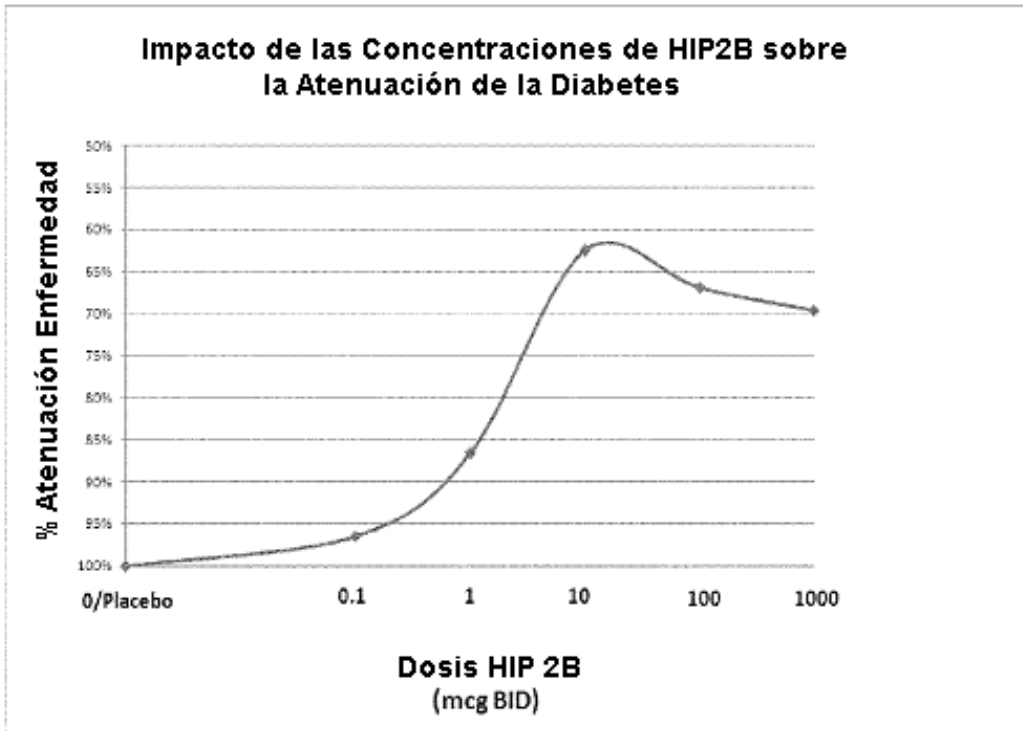


Fig. 23

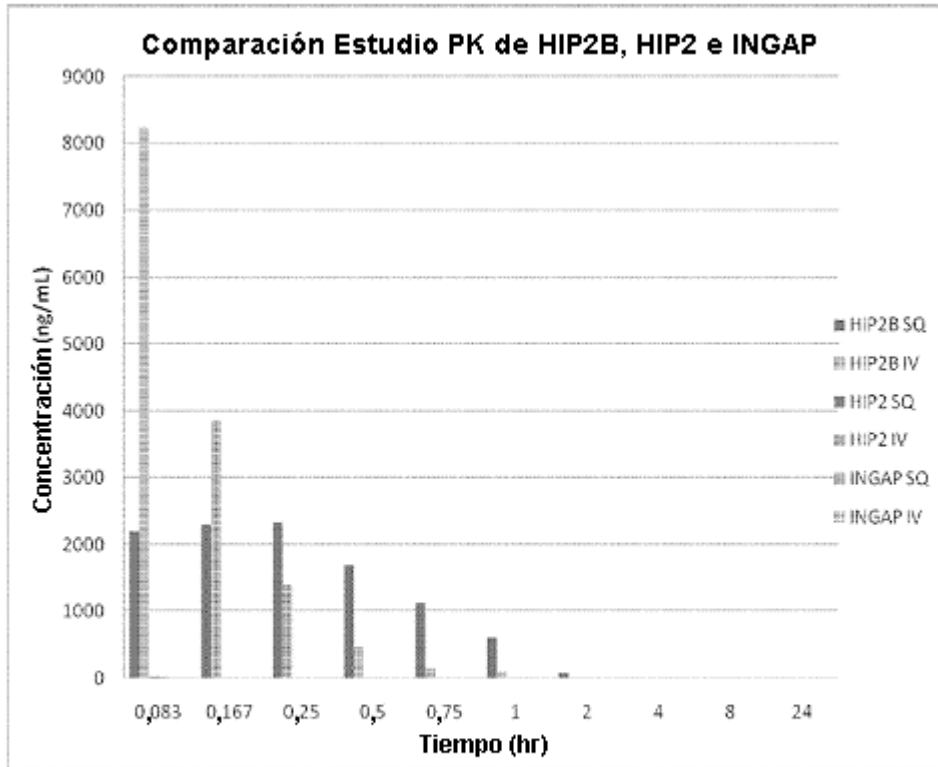


Fig. 24

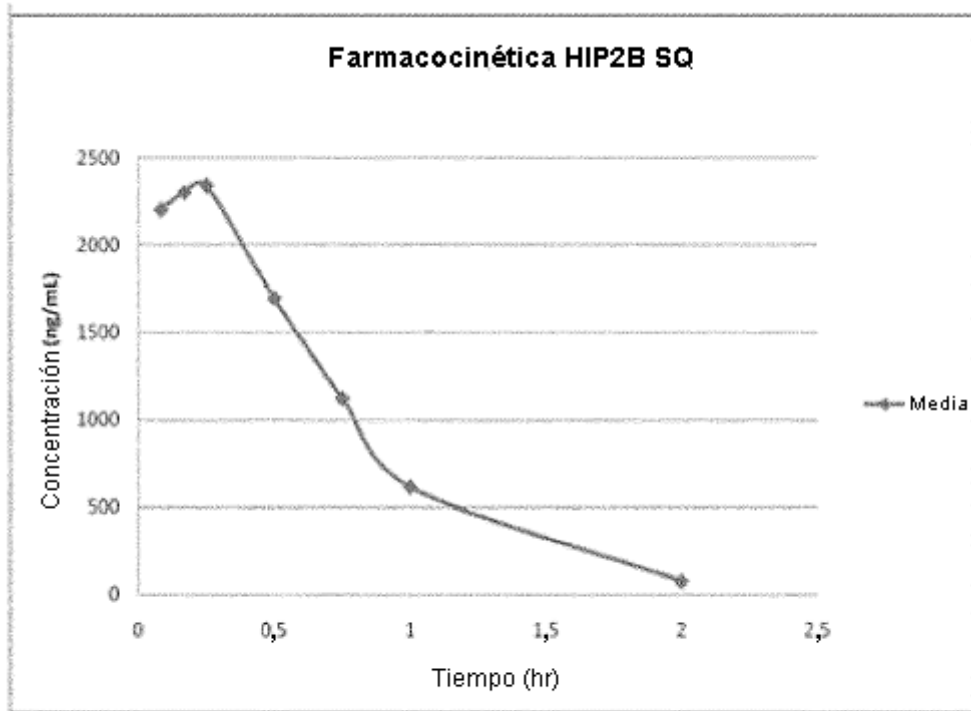


Fig. 25