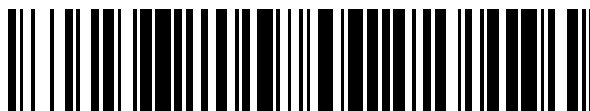


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 805**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

A61K 38/23 (2006.01)

C07K 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2012 E 12846423 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016 EP 2773365**

54 Título: **Análogos de péptidos para tratar enfermedades y trastornos**

30 Prioridad:

02.11.2011 US 201161554771 P

21.12.2011 US 201161578620 P

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

19.10.2016

73 Titular/es:

KEYBIOSCIENCE AG (100.0%)

Spichermatt 30

6370 Stans, CH

72 Inventor/es:

MEHTA, NOZER M.;

STERN, WILLIAM;

STURMER, AMY M.;

KARSDAL, MORTEN ASSER y

HENRIKSEN, KIM

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 586 805 T3

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

DESCRIPCIÓN

Análogos de péptidos para tratar enfermedades y trastornos

5 Campo

Las modalidades descritas en la presente descripción se relaciona con un mimético de calcitonina, y describe su uso en el tratamiento de varias enfermedades y trastornos, que incluyen, pero sin limitarse a diabetes (Tipo I y Tipo II), exceso de peso corporal, excesivo consumo de alimentos y síndrome metabólico, la regulación de los niveles de glucosa en sangre, la regulación de la respuesta en las pruebas de tolerancia a la glucosa, la regulación de la ingestión de alimentos, el tratamiento de osteoporosis y el tratamiento de osteoartritis.

10

Antecedentes

15

En todo el mundo, existen aproximadamente 250 millones de diabéticos y el número se proyecta que se duplique en las próximas dos décadas. Más de 90 % de esta población padece de diabetes mellitus tipo 2 (T2DM). Se estima que solamente 50-60 % de personas afectadas con T2DM o en estadios precedentes a la T2DM declarada se diagnostican actualmente.

20

T2DM es una enfermedad heterogénea caracterizada por anomalías en el metabolismo de los carbohidratos y las grasas. Las causas de T2DM son multifactoriales e incluyen tanto elementos genéticos como ambientales que afectan la función de las células β y la sensibilidad a la insulina en tejidos tales como músculos, hígado, páncreas y tejido adiposo. Como una consecuencia se observa secreción de insulina deteriorada y aparejado por una progresiva decadencia en la función de las células β y resistencia crónica a la insulina. La incapacidad del páncreas endocrino para compensar por la resistencia periférica a la insulina conduce a hiperglicemia y aparición de la diabetes clínica. La resistencia tisular al consumo de glucosa mediado por insulina se reconoce ahora como un factor determinante patofisiológico principal de T2DM.

25

30

Un criterio de éxito para la intervención óptima de T2DM es la reducción de los niveles de glucosa en sangre, que puede ser tanto la reducción crónica de los niveles de glucosa en sangre, como el aumento de la capacidad para tolerar altos niveles de glucosa después de la ingestión de alimentos, descrito por niveles inferiores del pico de glucosa y aclaramiento más rápido. Ambas de estas situaciones ejercen menos presión en la producción y función de insulina de las células β.

35

La diabetes Tipo I se caracteriza por una pérdida de la capacidad para producir insulina en respuesta a la ingestión de alimentos y por tanto una incapacidad para regular la glucosa en sangre hasta un nivel fisiológico normal.

40

La estructura física de los huesos puede comprometerse por una variedad de factores, que incluyen enfermedad y lesión. Una de las enfermedades de los huesos más comunes es la osteoporosis, que se caracteriza por baja masa ósea y deterioro estructural del tejido óseo, lo que conduce a la fragilidad de los huesos y un aumento de la susceptibilidad a fracturas, particularmente de la cadera, columna y muñeca. La osteoporosis se desarrolla cuando existe un desequilibrio, tal que la tasa de resorción ósea excede la tasa de formación ósea. Administrar una cantidad efectiva de un agente anti-resorptivo, tal como calcitonina, ha mostrado prevenir la resorción de huesos.

45

Las enfermedades inflamatorias o degenerativas, que incluyen enfermedades de las articulaciones, por ejemplo osteoartritis (OA), artritis reumatoide (RA) o artritis reumatoide juvenil (JRA), e incluyen inflamación que resulta de la respuesta autoinmune, por ejemplo lupus, espondilitis anquilosante (AS) o esclerosis múltiple (MS), pueden conducir a la pérdida sustancial de movilidad debido al dolor y destrucción de la articulación. El cartílago que recubre y amortigua los huesos dentro de las articulaciones puede degradarse con el tiempo lo que deja así, indeseablemente, el contacto directo de dos huesos que puede limitar el movimiento de un hueso en relación a otro y/o causar daño a uno por el otro durante el movimiento de la articulación. El hueso subcondral justo debajo del cartílago puede además degradarse. Administrar una cantidad efectiva de un agente anti-resorptivo, tal como calcitonina, puede prevenir la resorción de huesos.

55

Resumen

La presente invención se relaciona con un péptido AcCSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRTDVGANAP-NH₂ sec. con núm. de ident.: 15, que se referirá en la presente descripción como 'mimético de calcitonina 1' o 'UGP302'. Dicho péptido es un mimético de calcitonina.

60

La presente descripción incluye una formulación farmacéutica de un péptido tal para la administración enteral, por ejemplo para tratar la diabetes tipo I, la diabetes tipo II, o el síndrome metabólico, o para mitigar la resistencia a insulina, o para reducir un nivel indeseablemente alto de glucosa en suero en ayunas, o para reducir un nivel indeseablemente alto de glucosa máxima en suero, o para reducir un nivel indeseablemente alto de insulina máxima en suero, o para

reducir un nivel indeseablemente alto de respuesta a la prueba de tolerancia a la glucosa, o para tratar la osteoporosis, o para tratar la osteoartritis. La formulación puede comprender además un portador que sirve para facilitar la administración enteral efectiva de dicho compuesto activo.

5 Preferentemente, dicha formulación se formula para administración al tracto digestivo.

Preferentemente, dicho portador comprende 5-CNAC, SNAD, o SNAC.

10 Además, el péptido puede formularse en una composición farmacéutica para administración oral que comprende partículas revestidas de ácido cítrico, y en donde las partículas revestidas de ácido cítrico aumentan la biodisponibilidad oral del péptido.

15 Otros péptidos de calcitonina descritos en la presente descripción pero no reivindicados incluyen los que tienen las secuencias sec. con núm. de ident.:11, sec. con núm. de ident.:12, sec. con núm. de ident.:13, sec. con núm. de ident.:14, sec. con núm. de ident.:17 and sec. con núm. de ident.:18.

Además se describe un método que incluye administrar al paciente una cantidad efectiva de dicho péptido de sec. con núm. de ident.:15, para un efecto de reducción de peso en el paciente.

20 Además se describe un método que incluye administrar al paciente una cantidad efectiva de un péptido de sec. con núm. de ident.:15 para efectuar un mejoramiento en el control de la glicemia en el paciente, que puede ser un mejoramiento en el control de la glicemia postprandial.

Breve descripción de las figuras

25

Las modalidades descritas en breve se explicarán adicionalmente con referencia a las figuras adjuntas, que ilustran los principios de las modalidades descritas actualmente.

30 La Figura 1A, Figura 1B, Figura 1C, y Figura 1D muestran el efecto de la administración oral crónica de calcitonina de salmón ("sCT") frente a la de UGP 302 en el peso corporal y la ingestión de alimentos en ratas DIO, como se mide en el Ejemplo 1;

35 La Figura 2A y Figura 2B muestran el efecto de sCT oral frente a UGP 302 oral en la tolerancia a la glucosa durante OGTT en ratas DIO como se mide en el Ejemplo 1;

La Figura 3 muestra el efecto de sCT oral frente a UGP 302 oral en la glicemia en ayunas en ratas DIO como se mide en el Ejemplo 1;

40 La Figura 4A y Figura 4B muestran el efecto de sCT oral frente a UGP 302 oral en el peso corporal y la ingestión de alimentos en ratas DIO observadas en el Ejemplo 2 a una primera dosis;

La Figura 5A y Figura 5B muestran el efecto de sCT oral frente a UGP 302 oral en el peso corporal y la ingestión de alimentos en ratas DIO observadas en el Ejemplo 2 a una segunda dosis;

45 La Figura 6A y Figura 6B muestran el efecto de sCT oral frente a UGP 302 oral en el peso corporal y la ingestión de alimentos en ratas DIO observadas en el Ejemplo 2 a una tercera dosis;

La Figura 7A y Figura 7B muestran el efecto de sCT oral frente a UGP 302 oral en una primera dosis sobre la tolerancia a la glucosa durante OGTT en ratas DIO como se mide en el Ejemplo 2;

50

La Figura 8A y Figura 8B muestran el efecto de sCT oral frente a UGP 302 oral en una segunda dosis sobre la tolerancia a la glucosa durante OGTT en ratas DIO como se mide en el Ejemplo 2;

55 La Figura 9A, Figura 9B, Figura 9C, Figura 9D, Figura 9E, y Figura 9F muestran el efecto de sCT oral frente a tres UGPs orales sobre el peso corporal y la ingestión de alimentos en ratas DIO, medida en el Ejemplo 3;

La Figura 10A, Figura 10B, Figura 10C, Figura 10D, Figura 10E, y Figura 10F muestran el efecto de sCT oral frente a tres UGPs orales sobre los niveles de glucosa en una prueba de tolerancia a la glucosa en ratas DIO como se mide en el Ejemplo 3;

60

La Figura 11 muestra los resultados de unión para seis compuestos UGP a receptores celulares de calcitonina T47D, medido en el Ejemplo 4; y

La Figura 12A y Figura 12B muestran el consumo de alimentos (12A) y las mediciones del cambio de peso (12B) para UGP 282, como se mide en el Ejemplo 5;

5 La Figura 13A y Figura 13B muestran el consumo de alimentos (13A) y las mediciones del cambio de peso (13B) para UGP 283, como se mide en el Ejemplo 5;

La Figura 14A y Figura 14B muestran el consumo de alimentos (14A) y las mediciones del cambio de peso (14B) para UGP 284, como se mide en el Ejemplo 5;

10 La Figura 15A y Figura 15B muestran el consumo de alimentos (15A) y las mediciones del cambio de peso (15B) para UGP 298, como se mide en el Ejemplo 5;

15 La Figura 16A y Figura 16B muestran el consumo de alimentos (16A) y las mediciones del cambio de peso (16B) para UGP 302, como se mide en el Ejemplo 5;

La Figura 17A y Figura 17B muestran el consumo de alimentos (17A) y las mediciones del cambio de peso (17B) para UGP 303, como se mide en el Ejemplo 5;

20 La Figura 18 y Figura 19 muestran, respectivamente, la reducción de la resorción ósea y la resorción del cartílago producido por el tratamiento con UGP302 en ratas.

Descripción detallada

25 Las calcitoninas son altamente conservadas en un amplio rango de especies. La calcitonina nativa completa es de 32 aminoácidos de longitud. Las secuencias de ejemplos de calcitoninas se exponen a continuación:

30	Salmón	CSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRNTGSGTP sec. con núm. de ident.:1
	Ratón	CGNLSTCMLGTYTQDLNKFHTFPQTSIGVEAP sec. con núm. de ident.:2
35	Pollo	CASLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRTDVGAGTP sec. con núm. de ident.:3
	Anguila	CSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRTDVGAGTP sec. con núm. de ident.:4
40	Rata	CGNLSTCMLGTYTQDLNKFHTFPQTSIGVGAP sec. con núm. de ident.:5
	Caballo	CSNLSTCVLGTYTQDLNKFHTFPQTAIGVGAP sec. con núm. de ident.:6
45	Canino-1	CSNLSTCVLGTYSKDLNHFHTFSGIGFGAETP sec. con núm. de ident.:7
	Canino-2	CSNLSTCVLGTYTQDLNKFHTFPQTAIGVGAP sec. con núm. de ident.:8
50	Porcino	CSNLSTCVLSAYWRNLNHFHFRFSGMGFGPETP sec. con núm. de ident.:9
55	Humano	CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP sec. con núm. de ident.:10

60 Las modalidades de la presente descripción se refieren a miméticos de calcitonina. Las secuencias de aminoácidos de los miméticos de calcitonina de la presente descripción se encuentran en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Mimético de calcitonina ("CM")	Secuencia de aminoácidos	sec. con núm. de ident.:
UGP281	AcCSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRTDVGANTY-NH ₂	11
UGP283	AcCSNLSTCVLGRLSQELHRLQTFPRTDVGANTAcY	12
UGP284	PrCSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRTNTGSGTP-NH ₂	13
UGP298	SuccCSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRTNTGSGTP-NH ₂	14
UGP302 (CM1)	AcCSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRTDVGANAP-NH ₂	15
UGP303	KCSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRTDVGANTY-NH ₂	16
UGP306	SuccCSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRTDVGANAY-NH ₂	17
UGP1000	C _m SNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRTDVGANXaaXaa _a	18

En algunas modalidades, la cisteína en la posición 1 de los miméticos de calcitonina discutido antes se modifica ("C_m") para reducir la carga positiva del primer aminoácido. Por ejemplo, un grupo acetilo (sec. con núms.de ident.: 11, 12 y 15), grupo propionilo (sec. con núm. de ident.: 13), o grupo succinilo (sec. con núms.de ident.: 14 y 17) pueden sustituirse en cisteína-1. En algunas modalidades, el aminoácido en la última posición ("Xaa_a") (posición 32 en las sec. con núms.de ident.: 11, 13-15 y 17-18 o la posición 33 en la sec. con núm. de ident.: 16) pueden incluir un grupo amidado "NH₂". Formas alternativas de reducción de carga positiva incluyen, pero sin limitarse a, la PEGilación basada en polietilenglicol, o la adición de otro aminoácido, tal como ácido glutámico o ácido aspártico en el extremo N-terminal. Alternativamente, otros aminoácidos pueden añadirse al N-terminal de péptidos discutidos antes, que incluyen, pero sin limitarse a, lisina, glicina, formilglicina, leucina, alanina, acetil alanina, y dialanil. Un ejemplo de un aminoácido añadido a la N-terminal de péptidos incluye la sec. con núm. de ident.:16, en donde se ha añadido una lisina.

"Xaa" en la sec. con núm. de ident.: 18 en la Tabla 1 puede ser cualquier aminoácido de origen natural. En una modalidad Xaa en la posición 31 se selecciona de uno de treonina o alanina. En una modalidad Xaa en la posición 32 se selecciona de uno de tirosina o prolina. Así, las sec. con núms.de ident.: 11, 15, 16 y 17, están abarcadas por la sec. con núm. de ident.: 18.

Como los expertos en la técnica apreciarán, los péptidos que tienen una pluralidad de residuos de cisteína frecuentemente forman un puente disulfuro entre dos de tales residuos de cisteína. Todos estos péptidos expuestos en la presente descripción se definen como que incluyen opcionalmente uno o más de dichos puentes disulfuro. Aunque los miméticos de calcitonina pueden existir en forma de ácido libre, se prefiere que se amide el aminoácido C-terminal. Los solicitantes esperan que tal amidación pueda contribuir a la eficacia y/o la biodisponibilidad del péptido. Una técnica preferida para la fabricación de versiones amidadas de los miméticos de calcitonina de la presente descripción es hacer reaccionar precursores (que tienen glicina en el lugar del grupo amino C-terminal del producto amidado deseado) en la presencia de la monooxigenasa de alfa-amidación de peptidilglicina de acuerdo con técnicas conocidas en donde los precursores se convierten en productos amidados en las reacciones descritas, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos núm. 4,708,934 y la Publicación de Patente Europea núm. 0 308 067 y 0 382 403. La producción recombinante se prefiere tanto para el precursor como la enzima que cataliza la conversión del precursor en calcitonina de salmón. Dicha producción recombinante se discute en *Biotechnology*, Vol. 11 (1993) págs. 64-70, que describe además una conversión de un precursor a un producto amidado. El producto recombinante informado es idéntico a la calcitonina de salmón natural, y a la calcitonina de salmón producida mediante el uso de la solución y la síntesis química de péptidos en fase sólida. La producción de productos amidados también puede llevarse a cabo mediante el uso del proceso y la enzima de amidación expuesto por Consalvo, et al en la patente de Estados Unidos núm. 7,445,911; Miller et al, la patente de los Estados Unidos núm. 2006/0292672; Ray et al, 2002, *Protein Expression and Purification*, 26:249-259; y Mehta, 2004, *Biopharm. International*, Julio, págs. 44-46.

La producción de los péptidos amidados preferidos puede proceder, por ejemplo, mediante la producción de precursor extendido con glicina en *E. coli* como una proteína de fusión soluble con la glutatión-S-transferasa, o por expresión directa del precursor de acuerdo con la técnica descrita en la patente de Estados Unidos núm. 6,103,495. Tal precursor de glicina extendido tiene una estructura molecular que es idéntica al producto amidado deseado, excepto en el extremo C-terminal (donde el producto termina --X-NH₂, mientras que el precursor termina --X-Gly, X que es el residuo de aminoácido C-terminal del producto). Una enzima de alfa amidación descrita en las publicaciones anteriormente cataliza la conversión de precursores a producto. Esa enzima se produce preferentemente de forma recombinante, por ejemplo, en células de ovario de hámster chino (CHO), como se describe en los artículos de *Biotechnology* y *Biopharm.* citados anteriormente.

Formas de ácido libre de agentes activos peptídicos de la presente descripción pueden producirse de la misma manera, excepto sin incluir una glicina C-terminal en el "precursor", cuyo precursor es en cambio el producto peptídico final y no requiere la etapa de amidación.

Excepto donde se indique lo contrario, la dosis preferida de los miméticos de calcitonina de la presente descripción es idéntica tanto para fines terapéuticos como profilácticos. Las dosis deseadas se discuten en más detalle, abajo, y difieren en dependencia del modo de administración.

5 Excepto donde se indique lo contrario o donde sea evidente a partir del contexto, las dosificaciones en la presente descripción se refieren a peso de compuestos activos no afectados por excipientes farmacéuticos, diluyentes, portadores u otros ingredientes, aunque tales ingredientes adicionales se incluyen deseablemente, como se muestra en los ejemplos en la presente descripción. Cualquier forma de dosificación (cápsula, tableta, inyección o lo similar) comúnmente usada en la industria farmacéutica para la administración de agentes activos de péptidos es adecuado para uso en la presente invención, y los términos "excipiente", "diluyente" o "portador" incluye tales ingredientes no activos que típicamente se incluyen, junto con ingredientes activos en tales formas de dosificación en la industria. Una forma de dosificación oral preferida se discute en más detalle, abajo, pero no debe considerarse el modo exclusivo de administración de los agentes activos de la presente descripción.

15 Los miméticos de calcitonina de la presente descripción pueden administrarse a un paciente para tratar una serie de enfermedades o trastornos. Como se usa en la presente descripción, el término "paciente" se refiere a cualquier organismo perteneciente al reino Animalia. En una modalidad, el término "paciente" se refiere a vertebrados, con mayor preferencia, mamíferos que incluyen humanos.

20 En consecuencia, la presente descripción incluye la descripción de un método de tratamiento de diabetes tipo I, diabetes tipo II o síndrome metabólico, la obesidad, o de supresión del apetito, o para mitigar resistencia a la insulina, o para reducir un nivel indeseablemente alto de glucosa en suero en ayunas, o para reducir un nivel indeseablemente alto de glucosa máxima en suero, o para reducir un nivel indeseablemente alto de insulina máxima en suero, o para reducir una respuesta indeseablemente grande a una prueba de tolerancia a la glucosa, o para el tratamiento de osteoporosis, o para el tratamiento de la osteoartritis.

25 Como se usa en la presente descripción, el término "control de la glicemia" se refiere a los niveles típicos de azúcar en la sangre (glucosa) en una persona con diabetes mellitus. El porcentaje de hemoglobina que se glicosila (medido como hemoglobina A1c) se usa como una medida aproximada de control de la glicemia a largo plazo. Como se usa en la presente descripción, el término "mejora del control glicémico" se refiere a la capacidad de un mimético de la calcitonina de la presente descripción para reducir el porcentaje de hemoglobina que está glicosilada.

30 Hay una serie de medidas reconocidas en la técnica de intervalo normal de peso corporal en vista de un número de factores tales como el género, la edad y la altura. Un paciente que necesita del tratamiento o de prevención establecidos en la presente descripción incluyen aquellos pacientes cuyo peso corporal excede las normas reconocidas o que, debido a la herencia, factores ambientales u otro factor de riesgo reconocido, están en mayor riesgo que la población general de volverse sobrepeso u obeso. De acuerdo con la presente descripción, se contempla que los miméticos de calcitonina pueden usarse para tratar la diabetes, donde el control de peso es un aspecto del tratamiento.

35 Tales métodos incluyen administración enteral a un paciente que necesita de esto para el tratamiento de dicha condición de una cantidad farmacéuticamente efectiva del péptido de sec. con núm. de ident.:15.

40 Tales métodos incluyen la administración parenteral a un paciente que necesita de esto para el tratamiento de dicha condición de una cantidad farmacéuticamente efectiva del péptido. Para la administración parenteral (que incluye inyección intraperitoneal, subcutánea, intravenosa, intradérmica o intramuscular), pueden emplearse soluciones del péptido, ya sea en aceite de sésamo o de cacahuete o en propilenglicol acuoso, por ejemplo. Las soluciones acuosas deben tamponarse adecuadamente (preferentemente pH mayor de 8) si es necesario y el diluyente líquido primero debe hacerse isotónico. Estas soluciones acuosas son adecuadas para fines de inyección intravenosa. Las soluciones oleosas son adecuadas para fines de inyección intraarticular, intramuscular y subcutánea. La preparación de todas estas soluciones en condiciones estériles se completa fácilmente mediante técnicas farmacéuticas estándar bien conocidas por los expertos en la técnica. Para la aplicación parenteral, los ejemplos de preparaciones adecuadas incluyen soluciones, preferentemente soluciones oleosas o acuosas, así como también suspensiones, emulsiones, o implantes, que incluyen supositorios. Los péptidos pueden formularse en forma estéril en formatos múltiples o de dosis única tal como estar dispersos en un portador fluido tal como solución salina fisiológica estéril o 5% de soluciones de dextrosa salina usada comúnmente con los inyectables.

45 Dicho método puede incluir una etapa preliminar de determinar si el paciente sufre una de la afección indicada, y/o una etapa subsiguiente de determinar en qué medida dicho tratamiento es efectivo en la mitigación de la afección en dicho paciente, por ejemplo, en cada caso, llevar a cabo una prueba de tolerancia a la glucosa oral o nivel de azúcar en la sangre en reposo.

50 Para un mejor control sobre el peso del paciente, para producir una pérdida de peso o una prevención de la ganancia de peso, el compuesto activo se administra preferentemente al menos dos veces por día, por ejemplo de 2-4 veces por día.

Las formulaciones de compuesto activo pueden contener una dosis unitaria adecuada para una programación tal de administración. Los compuestos activos pueden administrarse con vista de controlar el peso de un paciente que se somete a tratamiento para la diabetes o síndrome metabólico.

5 Las formulaciones enterales orales son para ingestión por deglución para la posterior liberación en el intestino por debajo del estómago, y por lo tanto la administración a través de la vena portal al hígado, en oposición a las formulaciones que se mantienen en la boca para permitir la transferencia al torrente sanguíneo a través de las rutas sublingual o bucal.

10 Las formas de dosificación adecuadas para uso en la presente descripción incluyen tabletas, minitables, cápsulas, gránulos, comprimidos, polvos, sólidos efervescentes y formulaciones sólidas masticables. Tales formulaciones pueden incluir gelatina que es preferentemente gelatina hidrolizada o gelatina de bajo peso molecular. Tales formulaciones pueden obtenerse por liofilización de una solución acuosa homogénea que comprende calcitonina o un fragmento o conjugado de esta y gelatina hidrolizada o gelatina de bajo peso molecular y procesar adicionalmente el material sólido
15 a 15000 Daltons. Tales formulaciones pueden incluir un compuesto portador de protección, tales como 5-CNAC u otros como se describe en la presente descripción.

20 Aunque se prefieren formulaciones orales, tales como tabletas y cápsulas, composiciones para uso en la presente descripción pueden tener la forma de jarabes, elixires o lo similar y supositorios o lo similar. La administración oral es generalmente la ruta de administración de elección, ya que es conveniente, relativamente fácil y generalmente indolora, que resulta en un mayor cumplimiento del paciente en relación con otros modos de suministro. Sin embargo, barreras biológicas, químicas y físicas tales como variar el pH en el tracto gastrointestinal, poderosas enzimas digestivas, y membranas gastrointestinales impermeables a agentes activos, hace problemática la administración oral de calcitonina
25 como péptidos a mamíferos, por ejemplo la administración oral de calcitoninas, que son de hormonas polipeptídicas de cadenas largas secretadas por las células parafoliculares de la glándula tiroides en mamíferos y por la glándula ultimobranquial de aves y peces, que originalmente fue difícil debido, al menos en parte, a la insuficiente estabilidad de la calcitonina en el tracto gastrointestinal, así como también la incapacidad de calcitonina para transportarse fácilmente a través de las paredes intestinales hacia el torrente sanguíneo.

30 Las formulaciones orales adecuadas, sin embargo, se describen a continuación.

Tratamiento de los pacientes

35 El mimético de la calcitonina de la presente descripción puede administrarse a una dosis adecuada para mantener los niveles séricos del mimético en pacientes entre 5 y 500 picogramos por mililitro, preferentemente entre 10 y 250 picogramos por mililitro. Los niveles séricos pueden medirse mediante técnicas de radioinmunoensayo conocidas en la técnica. El médico tratante puede monitorizar la respuesta del paciente, y después puede alterar la dosis algo para representar el metabolismo individual del paciente y la respuesta. La liberación casi simultánea se consigue mejor
40 mediante la administración de todos los componentes de la presente descripción como una sola pastilla o cápsula. Sin embargo, la descripción incluye además, por ejemplo, dividir la cantidad requerida del mimético de calcitonina entre dos o más tabletas o cápsulas que pueden administrarse conjuntamente de forma que en conjunto proporcionan la cantidad necesaria de todos los ingredientes. "Composición farmacéutica," como se usa en la presente descripción incluye pero sin limitarse a una dosificación completa apropiada para una administración particular a un paciente sin tener en cuenta
45 si una o más tabletas o cápsulas (u otras formas de dosificación) se recomiendan en una administración dada.

El mimético de la calcitonina de la presente descripción puede formularse para la administración oral mediante el uso de los métodos empleados en los productos de Unigene Enteripep®. Estos pueden incluir los métodos como se describe en la patente de Estados Unidos núm. 5,912,014, la patente de Estados Unidos núm. 6,086,918, la patente de Estados Unidos núm. 6,673,574, la patente de Estados Unidos núm. 7,316,819, la patente de Estados Unidos núm. 8,093,207, y la Publicación de Estados Unidos núm. 2009/0317462. Particularmente, se puede incluir el uso de la conjugación del compuesto con una translocasa de membrana tal como el dominio de transducción de proteína de la proteína TAT del VIH, coformulación con uno o más inhibidores de la proteasa, y/o un agente reductor de pH que puede revestirse y/o un vehículo protector resistente al ácido y/o un potenciador de la absorción que puede ser un surfactante.
50

55 En una modalidad, el mimético de calcitonina de la presente descripción se formula preferentemente para la administración oral de una manera conocida en la Publicación de Patente de Estados Unidos núm. 2009/0317462. Una forma de dosificación oral preferida de acuerdo con la presente descripción se expone en la Tabla 2 a continuación:

60

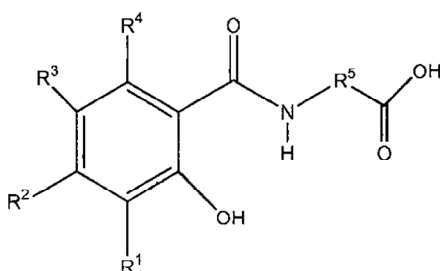
Tabla 2

	AGENTE ACTIVO O EXCIPIENTE	FUNCIÓN
5	Un mimético calcitonina seleccionado de una de las sec. con núm. de ident.:11 - sec. con núm. de ident.:18	Agente activo
	Partículas de Ácido Cítrico Revestidas	Inhibidor de proteasas
	Lauroilcarnitina	Mejoradores de absorción
10	Polímero no iónico	Subcapa
	Eudragit L30D-55	Recubrimiento entérico

15 El mimético de calcitonina de la presente descripción puede formularse para administración enteral, especialmente oral, administración por mezcla con un compuesto portador adecuado. Los compuestos portadores adecuados incluyen los descritos en patente de Estados Unidos núm. 5,773,647 y patente de Estados Unidos núm. 5866536 y entre estos, 5-CNAC (ácido N-(5-clorosaliciloil)-8-aminocaprílico, comúnmente como su sal disódica) es particularmente efectivo. Otros portadores preferidos o agentes de entrega son SNAD (sal sódica de ácido 10-(2-Hidroxibenzamido)decanoico) y SNAC (sal sódica de ácido N-(8-[2-hidroxibenzoil]amino)caprílico). En una modalidad, una composición farmacéutica de la

20 presente invención comprende una cantidad efectiva de entrega del portador tal como 5-CNAC, es decir, una cantidad suficiente para suministrar el compuesto para el efecto deseado. Generalmente, el portador tal como 5-CNAC está presente en una cantidad de 2.5 % a 99.4 % en peso, con mayor preferencia 25 % a 50 % en peso de la composición total.

25 Además, el documento WO 00/059863 describe las sales disódicas de la Fórmula I



40 en donde

R^1 , R^2 , R^3 , y R^4 son independientemente hidrógeno, -OH, -NR⁶R⁷, halógeno, C₁-C₄ alquilo, o C₁-C₄ alcoxi;

45 R^5 es un alquilenos C₂-C₁₆ C sustituido o no sustituido, alquilenos C₂-C₁₆ C sustituido o no sustituido, (alquil)arileno C₁-C₁₂ sustituido o no sustituido, o alquilenos (C₁-C₁₂ aril sustituido o no sustituido); y R^6 y R^7 son independientemente hidrógeno, oxígeno, o alquilo C₁-C₄; y los hidratos y solvatos de estos como particularmente eficaces para la administración oral de agentes activos, tales como calcitoninas, por ejemplo calcitonina de salmón, y estos pueden usarse en la presente descripción.

50 Las formulaciones entéricas preferidas que usan opcionalmente 5-CNAC micronizado pueden ser generalmente como se describe en el documento WO2005/014031.

55 El compuesto puede formularse para la administración oral mediante el uso de los métodos empleados en el producto Capsitonina de Bone Medical Limited. Estos pueden incluir los métodos incorporados en formulaciones Axxcess. Más particularmente, el ingrediente activo puede encapsularse en una cápsula entérica capaz de soportar el tránsito a través del estómago. Esto puede contener el compuesto activo junto con un potenciador de la absorción de alcohol aromático hidrofílico, por ejemplo como se describe en el documento WO02/028436. De una manera conocida el recubrimiento entérico puede llegar a ser permeable de una manera sensible al pH, por ejemplo, a un pH desde 3 hasta 7. El documento WO2004/091584 describe además métodos de formulación adecuados que usan potenciadores de la

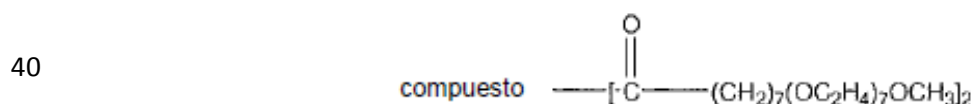
60 absorción de alcohol aromático.

El compuesto se puede formular usando los métodos vistos en los productos Oramed, que pueden incluir la formulación con ácido graso omega-3 como se ve en el documento WO2007/029238 o como se describe en la patente US5,102,666.

Generalmente, pueden usarse las sales farmacéuticamente aceptables (especialmente sales de mono o disodio), solvatos (por ejemplo, solvatos de alcohol) e hidratos de estos portadores o agentes de entrega.

5 La administración oral de las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la descripción puede llevarse a cabo con regularidad, por ejemplo, una o más sobre una base diaria o semanal; intermitentemente, por ejemplo, de forma irregular durante un día o una semana; o de forma cíclica, por ejemplo, regularmente por un período de días o semanas seguido de un período sin administración. La forma de dosificación de las composiciones farmacéuticas de las modalidades descritas en la presente puede ser cualquier forma conocida, por ejemplo, formas de dosificación líquidas o sólidas. Las formas de dosificación líquidas incluyen soluciones, emulsiones, suspensiones, jarabes y elixires. Además del compuesto activo y el portador tal como 5-CNAC, las formulaciones líquidas pueden incluir además excipientes inertes usados comúnmente en la técnica tales como, agentes de solubilización, por ejemplo, etanol; aceites tales como aceites de semilla de algodón, de ricino y de sésamo; agentes humectantes; agentes emulsionantes; agentes de suspensión; edulcorantes; saborizantes; y disolventes tales como agua. Las formas de dosificación sólidas incluyen cápsulas, cápsulas de gel blando, tabletas, cápsulas oblongas, polvos, gránulos u otras formas sólidas de dosificación oral, todas las cuales pueden prepararse por métodos bien conocidos en la técnica. Las composición farmacéuticas pueden comprender adicionalmente aditivos en cantidades empleadas habitualmente, que incluyen, pero sin limitarse a, un ajustador de pH, un conservante, un saborizante, un agente enmascarador del sabor, una fragancia, un humectante, un tonificador, un colorante, un surfactante, un plastificante, un lubricante tal como estearato de magnesio, un auxiliar de flujo, un auxiliar de la compresión, un solubilizante, un excipiente, un diluyente tal como celulosa microcristalina, por ejemplo Avicel PH 102 suministrado por FMC Corporation, o cualquier combinación de estos. Otros aditivos pueden incluir sales tampón de fosfato, ácido cítrico, glicoles, y otros agentes dispersantes. La composición puede incluir uno o más inhibidores de la enzima, tales como actinonina o epiactinonina y derivados de estos; aprotinina, Trasylol e inhibidor Bowman-Birk. Además, un inhibidor de transporte, es decir, una glicoproteína [rho] tal como Cetopofina, puede estar presente en las composiciones de la presente descripción. Las composiciones farmacéuticas sólidas de la presente descripción pueden prepararse por métodos convencionales, por ejemplo mediante combinación de una mezcla del compuesto activo, el portador tal como 5-CNAC, y cualquier otro ingrediente, amasar, y llenar en cápsulas o, en lugar de llenar en cápsulas, moldear seguido adicionalmente de formación de tabletas o moldear por compresión para dar tabletas. Además, una dispersión sólida puede formarse por métodos conocidos, seguido por procesamiento adicional para formar una tableta o cápsula. Preferentemente, los ingredientes en las composiciones farmacéuticas de la presente descripción se mezclan homogéneamente o uniformemente por toda la forma de dosificación sólida.

Alternativamente, el compuesto activo puede formularse como un conjugado con dicho portador, que puede ser un oligómero como se describe enUS2003/0069170, por ejemplo.



45 Tales conjugados pueden administrarse en combinación con un ácido graso y una sal biliar tal como se describe allí.

Los conjugados con polietilenglicol (PEG) pueden usarse, como se describe por ejemplo en Mansoor et al.

Alternativamente, los compuestos activos pueden mezclarse con nitroso-N-acetil-D, L-penicilamina (SNAP) y solución de Carbopol o con taurocolato y solución Carbapol para formar una emulsión mucoadhesiva.

50 El compuesto activo puede formularse mediante la carga en nanocápsulas de quitosano como se describe en Prego et al (opcionalmente modificado con PEG como en Prego Prego C, Torres D, Fernandez-Megia E, Novoa-Carballal R, Quiñoá E, Alonso MJ.) quitosano o nanopartículas lipídicas revestidas con PEG como se describe en Garcia-Fuentes et al. Las nanopartículas de quitosano para este propósito pueden modificarse con iminotiolano como se describe en Guggi et al. Ellas pueden formularse en emulsiones de agua/aceite/agua como se describe en Dogru et al. La biodisponibilidad de los compuestos activos puede aumentarse mediante el uso de taurodesoxicolato o lauroil carnitina como se describe en Sinko et al o en Song et al. Generalmente, las nanopartículas adecuadas como portadores se discuten en de la Fuente et al y pueden usarse en la presente descripción.

60 Otras estrategias adecuadas para la formulación oral incluyen el uso de un sistema transitorio potenciador de la permeabilidad (TPE) como se describe en WO2005/09478 de Chiasma Ltd. El TPE hace uso de una suspensión oleosa de partículas hidrófilas sólidas en un medio hidrófobo para proteger la molécula de medicamento de la inactivación por el ambiente hostil gastrointestinal (GI) y al mismo tiempo actúa en la pared GI para inducir la penetración de sus moléculas de carga del medicamento.

Además se incluye el uso de glutati3n o compuestos que contienen numerosos grupos tiol como se describe en US2008/0200563 para inhibir la acci3n de las bombas de eflujo en la membrana mucosa. Ejemplos pr3cticos de tales t3cnicas se describen adem3s en Caliceti, P. Salmaso, S., Walker, G. y Bernkop-Schn3rch, A. (2004) 'Development and in vivo evaluation of an oral insulin-PEG delivery system.' Pat Eur. J. Pharm. Sci., 22, 315-323, en Guggi, D., Krauland, A.H., y Bernkop-Schn3rch, A. (2003) 'Systemic peptide delivery via the stomach: in vivo evaluation of an oral dosage form for salmon calcitonin'. J. Control. Rel. 92,125-135, y en Bernkop-Schn3rch, A., Pinter, Y., Guggi, D., Kahlbacher, H., Schoffmann, G., Schuh, M., Schmerold, I., Del Curto, M.D., D'Antonio, M., Esposito, P. y Huck, Ch. (2005) 'The use of thiolated polymers as carrier matrix in oral peptide delivery' - Proof of concept. J. Control. Release, 106, 26-33.

El compuesto activo puede formularse en microesferas sin costura como se describe en el documento WO2004/084870 donde el ingrediente farmac3utico activo se solubiliza como una emulsi3n, microemulsi3n o suspensi3n, formulado en miniesferas; y de forma variable revestido ya sea por tecnolog3as de revestimiento convencionales o novedosas. El resultado es un medicamento encapsulado en forma de "presolubilizada", que cuando se administra por v3a oral proporciona para el instante predeterminado o de liberaci3n sostenida del medicamento activo a lugares espec3ficos y en tasas espec3ficas a lo largo del tracto gastrointestinal. En esencia, la presolubilizaci3n del medicamento mejora la previsibilidad de su perfil cin3tico mientras simult3neamente mejora la permeabilidad y estabilidad del medicamento.

Uno puede emplear nanoc3psulas revestidas con quitosano como se describe en US2009/0074824. La mol3cula activa administrada con esta tecnolog3a se protege dentro de las nanoc3psulas, ya que son estables frente a la acci3n del fluido g3strico. Adem3s, las propiedades mucoadhesivas del sistema aumenta el tiempo de adhesi3n a las paredes del intestino (se ha comprobado que hay un retraso en el tr3nsito gastrointestinal de estos sistemas) lo que facilita una absorci3n m3s efectiva de la mol3cula activa.

Los m3todos desarrollados por TSRI Inc. pueden usarse. Estos incluyen la Tecnolog3a de solubilizaci3n hidrof3lica (HST) en la que la gelatina, un extracto de col3geno de origen natural que porta tanto cargas positivas como negativas, reviste las part3culas del ingrediente activo contenido en micelas de lecitina y evita su agregaci3n o aglutinaci3n. Esto resulta en una humectabilidad mejorada de part3culas de medicamento hidr3fobo a trav3s de interacciones polares. Adem3s, la lecitina anfif3lica reduce la tensi3n superficial entre el fluido de disoluci3n y la superficie de la part3cula.

El ingrediente activo puede formularse con cucurbiturilos como excipientes.

Alternativamente, puede emplearse la tecnolog3a GIPET de Merrion Pharmaceuticals para producir tabletas con recubrimiento ent3rico que contienen el ingrediente activo con un potenciador de la absorci3n que puede ser un 3cido graso de cadena media o un derivado de 3cido graso de cadena media como se describe en US2007/0238707 o un p3ptido de translocaci3n de membrana como se describe en US7268214.

Uno puede emplear la tecnolog3a GIRESTTM que consiste en una forma de dosificaci3n de liberaci3n controlada dentro de una bolsa inflable, que se coloca en una c3psula de medicamento para la administraci3n oral. Tras la disoluci3n de la c3psula, un sistema generador de gases infla la bolsa en el est3mago. En los ensayos cl3nicos la bolsa se ha demostrado que se retiene en el est3mago durante 16-24 horas.

Alternativamente, el activo se puede conjugar con un modificador de protecci3n que permita resistir la degradaci3n enzim3tica en el est3mago y facilitar su absorci3n. El activo puede conjugarse covalentemente con un derivado metoxi polietilenglicol de glicol3pidos monodispersos, de cadena corta que se cristaliza y se liofiliza en el ingrediente farmac3utico activo en seco despu3s de la purificaci3n. Tales m3todos se describen en la patente US5438040 and at www.biocon.com.

Uno puede emplear adem3s una ves3cula dirigida al h3gado (HDV) para la entrega activa. Una HDV puede consistir en liposomas ((≤ 150 nm de di3metro) que encapsulan el activo, que adem3s contienen una mol3cula orientada a los hepatocitos en su bicapa lip3dica. La mol3cula de orientaci3n dirige la entrega de los activos encapsulados para las c3lulas del h3gado y por lo tanto relativamente menudas cantidades del activo se requieren para el efecto. Esta tecnolog3a se describe en US2009/0087479 y adem3s en www.diasome.com.

El activo puede incorporarse en una composici3n que contiene adicionalmente un medio hidr3filo sustancialmente no acuoso que comprende un alcohol y un codisolvente, en asociaci3n con un glic3rido parcial de cadena media, opcionalmente en mezcla con unas especies de PEG de cadena larga como se describe en US2002/0115592 en relaci3n a la insulina.

Alternativamente, puede hacerse uso de parches intestinales como se describe en Shen Z, Mitragotri S, Pharm Res. 2002 abril; 19(4):391-5 'Intestinal patches for oral drug delivery'.

El activo puede incorporarse en una matriz erosionable formada a partir de un hidrogel mezclado con un pol3mero hidr3fobo como se describe en la patente de Estados Unidos n3m. 7189414.

Los niveles de dosificación oral adecuados para seres humanos adultos a tratar puede estar en el intervalo de 0,05 a 5 mg, preferentemente de aproximadamente 0.1 a 2.5 mg.

5 La frecuencia de dosificación del tratamiento de los pacientes puede ser de 1 a seis veces al día, por ejemplo de dos a cuatro veces al día. El tratamiento deseablemente se mantendrá durante un período prolongado de al menos 6 semanas, preferentemente al menos 6 meses, preferentemente al menos un año, y, opcionalmente, de por vida.

10 Los tratamientos de combinación para las condiciones pertinentes pueden llevarse a cabo mediante el uso de una composición de acuerdo con la presente descripción y la administración por separado de uno o más de otros agentes terapéuticos. Alternativamente, la composición de acuerdo con la presente descripción puede incorporar uno o más de otros agentes terapéuticos para la administración combinada.

15 Las terapias de combinación de acuerdo con la presente descripción incluyen combinaciones de un compuesto activo tal como se describe con la insulina, GLP-2, GLP-1, GIP, o la amilina, o generalmente con otros antidiabéticos. Así las terapias de combinación, que incluyen coformulaciones pueden hacerse con sensibilizadores de insulina que incluyen biguanidas, tales como Metformina, Buformina y Fenformina, TZD's (PPAR) tales como Balaglitazona, Pioglitazona, Rivoglitazona, Rosiglitazona y Troglitazona, doble agonistas de PPAR tal como Aleglitazar, Muraglitazar y Tesaglitazar, secretagogos que incluyen sulfonilureas tales como carbutamida, cloropropamida, gliclazida, tolbutamida, tolazamida, glipizida, glibenclamida, gliburida, gliquidona, glicopiramida y Glimepirida, Meglitinidas/glinidas (K+) tales como Nateglinida, Repaglinida y Mitiglinida, análogos de GLP-1 tales como Exenatida, Liraglutida y Albiglutida, inhibidores de DPP-4 tal como Alogliptina, Linagliptina, Saxagliptina, Sitagliptina y Vildagliptina, análogos de insulina o formulaciones especiales tales como (de acción rápida) la insulina lispro, insulina aspart, insulina glulisina, (de acción prolongada), la insulina glargina, insulina detemir, insulina inhalable Exubra e insulina NPH, y otros, que incluyen inhibidores de la alfa-glucosidasa tales como acarbosa, miglitol y Voglibosa, análogos de amilina, tales como pramlintida, inhibidores de SGLT2, tales como dapagliflozina, Remogliflozin y Sergliflozin, así como también las misceláneas que incluyen Benfluorex y Tolrestat.

30 Otras combinaciones incluyen la coadministración o coformulación con leptina. La resistencia a la leptina es un componente bien establecido de la diabetes tipo 2; sin embargo, las inyecciones de leptina han fracasado hasta ahora para mejorar esta condición. En contraste, no hay evidencia de apoyo que la amilina, y por lo tanto las moléculas con capacidades similares a la amilina, como los miméticos de la calcitonina de salmón, son capaces de mejorar la sensibilidad a la leptina. La combinación amilina/leptina ha demostrado un efecto sinérgico sobre el peso corporal y la ingestión de alimentos, y además resistencia a la insulina [Kusakabe T et al].

35 En los siguientes ejemplos, se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números usados (por ejemplo cantidades, temperatura, etc.) pero algunos errores y desviaciones experimentales deberían explicarse. A menos que se indique lo contrario, las partes son las partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura es en grados centígrados, y la presión es la atmosférica o cercana.

40 **EJEMPLOS**

Ejemplo 1

45 Efecto crónico del mimético de calcitonina 1 (CM1) en comparación con sCTAnimals

50 El estudio se realizó en ratas macho Levin-DIO (sensibles a la dieta) y Levin-DR (resistentes a la dieta) (TacLevin: CD (SD) DIO) (Taconic, Hudson, NY, U.S.A.) obtenidas a la edad de 6-7 semanas. A su llegada, las ratas DIO se les dio dieta alta en grasas (60 kcal %) (#D12495, Research Diets Inc., New Brunswick, NJ., Estados Unidos) y mantuvieron la misma dieta durante 16 semanas antes y durante el experimento. Las ratas DR recibieron la dieta baja en grasa y sirvieron como grupo de control. Los animales se alojaron por pares a lo largo del estudio. Las ratas se manipularon y predosificaron una vez al día con MilliQ H2O durante 2-3 semanas antes del inicio experimental para reducir la hiperglicemia inducida por el estrés. Los parámetros en la línea base se registraron en una condición de ayuno (6 h). Las ratas se distribuyeron aleatoriamente en grupos de tratamiento basados en el peso corporal en ayunas (PC) y la glucosa en plasma en ayunas (FPG). El peso corporal, ingestión de alimentos y agua se registraron una vez por semana durante el período de estudio.

Compuesto

60 La solución oral sCT o mimético de calcitonina 1 se preparó en el día de la dosificación mediante la mezcla de un portador con el compuesto dado en base a los siguientes cálculos:

5-CNAC (vehículo):

ES 2 586 805 T3

Los animales tratados con 5-CNAC oral recibieron una dosis de 150 mg/kg disueltos en milliQ H2O.

5

Nivel de dosificación para 5-CNAC:	150 mg/kg
Volumen de dosificación	5 ml/kg
Concentración del compuesto:	30 mg/ml

10 sCT/ mimético de calcitonina 1:

Los animales tratados con sCT oral o mimético de calcitonina 1 oral recibieron dosis de 1,0 mg/kg en combinación con 150 mg/kg de 5-CNAC

15 - todo disuelto en milliQ H2O.

20

Nivel de dosificación para sCT/mimético de calcitonina 1:	1,0 mg/kg
Volumen de dosificación:	5 ml/kg
Concentración del compuesto:	0,2 mg/kg

Administración oral del medicamento por sonda (p.o.) b.i.d. (7-8 am y 3-4 pm) durante el período de estudio y como dosis única por la mañana antes del comienzo de OGTT.

25

La alimentación por sonda oral de glucosa durante OGTT se preparó por el siguiente cálculo:

D-Glucosa:

30

Los animales recibieron 2 g/kg en dosis única disuelto en milliQ H2O.

35

Nivel de dosificación de D-glucosa:	2 g/kg
Volumen de dosificación:	4 ml/kg
Concentración del compuesto:	500 mg/ml

40

Condiciones Experimentales

45

<u>línea base</u>	<u>Semana 1</u>	<u>Semana 2</u>	<u>Semana 3</u>	<u>Semana 4</u>
FPG	BW	BW	BW	BW
BW	Alimento	Alimento	Alimento	Alimento
B		FPG		FPG
		B		B
		OGTT		

50

FPG Glucosa en plasma en ayunas

BW peso corporal

B Sangre

OGTT Prueba de tolerancia a la glucosa oral

55

OGTT seguido de ayuno toda la noche (16 h):

60

-30	0	15	30	60	120	240 min
D	G	B	B	B	B	B
B	B	BG	BG	BG	BG	BG
BG	BG					

D = Medicamento; BG = Glucosa en sangre; B = Sangre; G = Glucosa

La extracción de sangre y la glicemia se midieron mediante punción venosa de la cola caliente.

5 Los niveles de glucosa de sangre entera se determinaron con un medidor de glucosa en sangre ACCU-CHEK® Avia (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suiza). La sangre (aprox 300 µl) se recoge en un tubo de plasma 1 ml MiniCollect K3EDTA (Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Alemania), se invierte, y se almacena en hielo. Los tubos se centrifugan 3000 × g (5000 rpm en centrífuga de mesa) durante 10 minutos a 4 °C y se obtuvo el plasma. Las muestras de plasma se almacenan a -20 °C hasta su análisis. Se obtiene un total de ~ 2.5 ml de sangre durante OGTT (~ 0.3% de peso corporal).

Grupos experimentales

Intervención	Compuesto	Conc.	Número
Vehículo oral	5-CNAC	150 mg/kg	n = 10
sCT oral	5-CNAC + sCT	150 mg/kg + 1 mg/kg	n = 10
Mimético de calcitonina oral 1	5-CNAC + mimético de calcitonina 1	150 mg/kg 1 mg/kg	n = 10

Estadísticas

25 El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguido por la prueba de Dunnet post hoc para la comparación múltiple. Se realizó la prueba t de Student para comparar dos grupos apareados. Todos los análisis se realizaron mediante el uso del software GRAPHPAD PRISM (GraphPad Prism, San Diego, CA. (Estados Unidos). El área incremental bajo la curva (iAUC) durante OGTT se calculó por el método trapezoidal. Un valor de P < 0,05 se consideró significativo. Todos los datos se presentan como media ± error estándar de la media (SEM).

30 3. Resultados

Características de línea base

35 Los resultados se resumen en la Figura 1 (ingestión de alimentos y peso corporal), la Figura 2 (OGTT) y Figura 3 (FPG). Las Figura 1A, Figura 1B, Figura 1C, y Figura 1D el efecto de la calcitonina de salmón oral crónica ("sCT") frente a la administración oral de UGP 302 en el peso corporal y la ingestión de alimentos en ratas DIO como se mide en el Ejemplo 1. La Figura 2A y Figura 2B muestran el efecto de sCT oral frente a UGP 302 oral en la tolerancia a la glucosa durante OGTT en ratas DIO como se mide en el Ejemplo 1. La Figura 3 muestra el efecto de sCT oral frente a UGP 302 oral en la glicemia en ayunas en ratas DIO como se mide en el Ejemplo 1;

40 Una dosis de oral de sCT/UGP302 - mimético de calcitonina 1 que contiene 1 mg/kg del compuesto, se aplicó mediante sonda dos veces al día a cuatro grupos de ratas durante 4 semanas. Un grupo con vehículo oral sirvió como control del régimen de dosificación, respectivamente. * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 vs vehículo. Los datos se presentan como medias ± SEM.

45 La dieta alta en grasas *ad libitum* durante 16 semanas indujo fenotipo obeso pronunciado en ratas sensibles a la dieta (DIO) al comparar el peso corporal de sus compañeros de camada resistentes a la dieta (DR) (P < 0,001) (Tabla 1). La glicemia en ayunas de 6 horas no fue diferente entre DIO y DR. En contraste, el área bajo la curva (AUC) de los cálculos durante OGTT fue significativamente mayor en ratas DIO comparado con las ratas DR, lo que demuestra la intolerancia a la glucosa inducida por la dieta alta en grasas (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros metabólicos en ratas DIO y DR

	Resistentes a la dieta (DR)	Sensibles a la dieta (DIO)
Peso corporal (g)	609,5 ± 24,5	841,8 ± 22,9***
Glucosa en plasma en ayunas (mM)	6,5 ± 0,1	6,8 ± 0,2
AUC en glucosa en sangre en OGTT (mM*min)	625,1 ± 20,5	914,3 ± 44,6***

AUC, área bajo la curva; OGTT, prueba de tolerancia a la glucosa oral. Los datos son medias ± SEM (n=12/DR, n=24/DIO).

Peso corporal e ingestión de alimentos

5 Durante la primera semana de tratamiento la administración de sCT oral redujo significativamente la ingestión de alimentos en comparación con las ratas tratadas con vehículo oral. Por otra parte, SCT oral protegió contra la ganancia
 10 adicional en el peso corporal como se observa para el grupo con vehículo oral (Figura 1). Así, estas observaciones confirman la acción anoréxica fuerte aguda inducida por la aplicación de sCT oral en ratas DIO. Curiosamente, desde la semana 2 de tratamiento y durante todo el período de estudio, la ingestión de alimentos se normalizó en ratas tratadas con sCT oral y se asemejó a la ingestión por vehículo oral que resulta en una falta de diferencia con respecto a la
 15 ingestión de alimentos acumulada al final del estudio. Esto confirma previamente los informes que sugieren un efecto transitorio de la sCT oral sobre el consumo de energía. Sin embargo, durante todo el período de estudio, la sCT oral mantuvo el efecto protector sobre la ganancia de peso corporal y redujo significativamente el peso corporal respecto al valor basal en comparación con vehículo oral al final del estudio (Figura 1). Esto está en línea con un efecto posiblemente endógeno de la sCT oral sobre el gasto de energía para regular crónicamente el balance energético.

20 Generalmente, la aplicación oral del mimético de calcitonina 1 se asemejó a la fuerte acción anoréxica de sCT oral durante la semana inicial de tratamiento y redujo significativamente la ingestión de alimentos y protegió contra la ganancia de peso corporal en comparación con el grupo con vehículo oral (Figura 1).

25 Como se observa para sCT oral, el mimético de calcitonina 1 ejerce un efecto transitorio sobre la ingestión de alimentos, a pesar de que la ingestión de alimentos tendió a reducirse si se compara con sCT oral durante el período de estudio. Así, después de cuatro semanas de tratamiento la ingestión de alimentos acumulativa se redujo significativamente con el mimético de calcitonina 1 en comparación con vehículo oral. Además, cuando se compara con sCT oral, se observó una reducción significativa más pronunciada en el peso corporal lo que sugiere superioridad en cuanto al efecto sobre el balance de energía.

25 Tolerancia a la glucosa

30 Los resultados se muestran en la Figura 2. Una dosis de sCT oral/mimético de calcitonina 1 que contiene 1 mg/kg de compuesto se aplicaron mediante sonda dos veces al día a cuatro grupos de ratas durante 4 semanas. Un grupo con vehículo oral sirvió como control del régimen de dosificación. OGTT se realizó a continuación de las 2 semanas de tratamiento después del ayuno toda la noche.*** P < 0,001 vs vehículo. Los datos se presentan como medias ± SEM.

35 La sCT oral redujo significativamente la iAUC de glucosa durante la OGTT después de 2 semanas de tratamiento en comparación con vehículo oral (Figura 2), lo que confirma así el control de la glicemia postprandial ejercida por la aplicación oral de sCT como se demostró anteriormente. En general, el mimético de calcitonina 1 demostró una reducción significativa similar el iAUC como se observa para sCT oral, aunque sin clara superioridad para sCT oral en este respecto.

40 Glicemia en ayunas

45 A continuación de 2 y 4 semanas de tratamiento, la aplicación de sCT oral no fue significativamente diferente de las ratas tratadas con vehículo oral, que está en contraste con las observaciones previamente en ratas macho DIO, en donde se observa una reducción de 1-1.5 mM en la glicemia en ayunas típicamente a continuación del tratamiento crónico. Para el mimético de calcitonina 1, se observó una tendencia a la superioridad en la glicemia en ayunas durante todo el período de estudio en comparación con vehículo oral o sCT oral.

Ejemplo 2

50 Efectos a largo plazo y agudo de sCT oral frente a mimético de calcitonina 1 oral

Animales

55 El estudio se realizó en ratas macho Levin-DIO (sensibles a la dieta) y Levin-DR (resistentes a la dieta) (TacLevin: CD (SD) DIO) (Taconic, Hudson, NY, Estados Unidos) obtenidas a la edad de 6-7 semanas. A su llegada, las ratas DIO se les dio dieta alta en grasas (60 kcal %) (#D12495, Research Diets Inc., New Brunswick, NJ., Estados Unidos) y mantuvieron la misma dieta durante 12 semanas antes y durante el experimento. Las ratas DR recibieron la dieta baja en grasa y sirvieron como grupo de control. Los animales se alojaron por pares a lo largo del estudio. Las ratas se manipularon y predosificaron una vez al día con MilliQ H2O durante 2-3 semanas antes del inicio experimental para reducir la hiperglicemia inducida por el estrés. En el día antes del inicio del estudio los animales se les dio una dosis
 60 única de vehículo. Los parámetros en la línea base se registraron en una condición de ayuno toda la noche (16 h). Las ratas se distribuyeron aleatoriamente en grupos de tratamiento basados en el peso corporal en ayunas (PC) y la glucosa en plasma en ayunas (FPG). El peso corporal, ingestión de alimentos y agua se registraron antes y al final del estudio.

Compuestos

Se preparó solución de sCT oral/mimético de calcitonina 1 en el día de la dosificación mediante la mezcla del portador con el compuesto dado en base a los siguientes cálculos:

5 5-CNAC (vehículo):

Los animales tratados con 5-CNAC oral recibieron una dosis de 150 mg/kg disueltos en milliQ H2O.

10

Nivel de dosificación para 5-CNAC:	150 mg/kg
Volumen de dosificación	5 ml/kg
Concentración del compuesto:	30 mg/ml

15 sCT/mimético de calcitonina 1:

Los animales tratados con sCT oral o mimético de calcitonina 1 oral recibieron dosis de 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg o 2.0 mg/kg en combinación con 150 mg/kg de 5-CNAC, todo disuelto en milliQ H2O.

20

Nivel de dosificación para sCT/mimético de calcitonina 1:	0,5 mg/kg
Volumen de dosificación	5 ml/kg
Concentración del compuesto:	0,1 mg/kg
Nivel de dosificación para sCT/mimético de calcitonina 1:	1,0 mg/kg
Volumen de dosificación	5 ml/kg
Concentración del compuesto:	0,2 mg/kg
Nivel de dosificación para sCT/mimético de calcitonina 1:	2,0 mg/kg
Volumen de dosificación	5 ml/kg
Concentración del compuesto:	0,4 mg/ml

25

30

35

La administración del medicamento se les dio por sonda b.i.d. oral (p.o.) (7-8 am y 3-4 pm) durante el período de estudio y como dosis única por la mañana antes del comienzo de OGTT.

40 La alimentación por sonda oral de glucosa durante OGTT se preparó por el siguiente cálculo:

D-Glucosa:

Los animales recibieron 2 g/kg en dosis única disuelto en milliQ H2O.

45

Nivel de dosificación de D-glucosa:	2 g/kg
Volumen de dosificación	4 ml/kg
Concentración del compuesto:	500 mg/ml

50

Condiciones Experimentales

Prueba aguda - Período de Tratamiento para 0,5 mg/kg, 1 mg/kg y 2 mg/kg:

55

Día 0	Día 1-2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
1 ^{ra} OGTT	Descanso	Pre-dosis	Tratamiento	Tratamiento	Tratamiento	2 ^{da} OGTT
Todos los Vehículos	Sin manipulación	Todos los Vehículos	(b.i.d)	(b.i.d)	(b.i.d)	Dosis única

60

A continuación de la (1^{ra}) OGTT inicial, los animales se distribuyeron aleatoriamente en grupos de tratamiento basados en FBG y BW. Los animales serán tratados previamente (b.i.d.) 3 días antes de la 2^{da} OGTT. La dosificación se llevará a cabo en la mañana (7-8 am) y la tarde (3-4 pm).

5 El estudio se realizó en un diseño de superposición de x con cada animal que es su propio control.

OGTT seguido de ayuno toda la noche (16 h):

10	-30	0	15	30	60	120	240 min
	D	G	B	B	B	B	B
	B	B	BG	BG	BG	BG	BG
15	BG	BG					

D = Medicamento; BG = Glucosa en sangre; B = Sangre; G = Glucosa

La extracción de sangre y la glicemia se midieron mediante punción venosa de la cola caliente.

20 Los niveles de glucosa de sangre entera se determinaron con un medidor de glucosa en sangre ACCU-CHEK® Avia (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suiza). La sangre (aprox 300 µl) se recoge en un tubo de plasma 1 ml MiniCollect K3EDTA (Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Alemania), se invierte, y se almacena en hielo. Los tubos se centrifugan 3000 × g (5000 rpm en centrifuga de mesa) durante 10 minutos a 4 °C y se obtuvo el plasma. Las muestras de plasma se almacenan a -20 °C hasta su análisis. Se obtiene un total de ~ 2.5 ml de sangre durante OGTT (~ 0.3% de peso corporal).

Grupos experimentales

30	Intervención	Compuesto	Conc.	Número
	Vehículo oral	5-CNAC	150 mg/kg	(4 grupos de n = 8) diseño con superposición de X con 0,5 mg/kg
35	sCT oral	5-CNAC + sCT	150 mg/kg + 0,5 mg/kg	n = 8
	Mimético de calcitonina oral 1	de 5-CNAC + mimético de calcitonina 1	150 mg/kg + 0,5 mg/kg	n = 8
40	Vehículo oral	5-CNAC	150 mg/kg	(4 grupos de n = 8) diseño con superposición de X con 1 mg/kg
	sCT oral	5-CNAC + sCT	150 mg/kg + 1 mg/kg	n = 8
45	Mimético de calcitonina oral 1	de 5-CNAC + mimético de calcitonina 1	150 mg/kg 1 mg/kg	n = 8
	Vehículo oral	5-CNAC	150 mg/kg	(4 grupos de n = 8) diseño con superposición de X con 2 mg/kg
50	sCT oral	5-CNAC + sCT	150 mg/kg + 2 mg/kg	n = 8
	Mimético de calcitonina oral 1	de 5-CNAC + mimético de calcitonina 1	150 mg/kg 2 mg/kg	n = 8

55 Estadísticas

El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguido por la prueba de Dunnet post hoc para la comparación múltiple. Se realizó la prueba t de Student para comparar dos grupos apareados. Todos los análisis se realizaron mediante el uso del software GRAPHPAD PRISM (GraphPad Prism, San Diego, CA. (Estados Unidos). El área incremental bajo la curva (iAUC) durante OGTT se calculó por el método trapezoidal. Un valor de P < 0,05 se consideró significativo. Todos los datos se presentan como media ± error estándar de la media (SEM).

60 3. Resultados

Características de línea base

La dieta alta en grasas *ad libitum* durante 12 semanas indujo fenotipo obeso pronunciado en ratas sensibles a la dieta (DIO) al comparar el peso corporal de sus compañeros de camada resistentes a la dieta (DR) ($P < 0,001$) (Tabla 1). La glicemia en ayunas no fue diferente entre DIO y DR. En contraste, el área bajo la curva (AUC) de los cálculos durante OGTT fue significativamente mayor en ratas DIO comparado con las ratas DR, lo que demuestra la intolerancia a la glucosa inducida por la dieta alta en grasas (Tabla 2).

Tabla 2 Parámetros metabólicos en ratas DIO y DR

	Resistentes a la dieta (DR)	Sensibles a la dieta (DIO)
Peso corporal (g)	609,5 ± 24,5	813,6 ± 9,8***
Glucosa en plasma en ayunas (mM)	5,8 ± 0,1	5,8 ± 0,2
AUC en glucosa en sangre en OGTT (mM*min)	648,8 ± 27,3	888,4 ± 64,3***

AUC, área bajo la curva; OGTT, prueba de tolerancia a la glucosa oral. Los datos son medias ± SEM (n=12/DR, n=24/DIO).

Peso corporal e ingestión de alimentos

Tres dosis diferentes de sCT oral/mimético de calcitonina 1 que contiene 0,5, 1 y 2 mg/kg de compuesto se aplicaron mediante sonda dos veces al día a 4 grupos de ratas durante 3 días. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ vs sCT oral.

Los resultados se presentan en la Figura 4, Figura 5, y Figura 6 como medias ±SEM. La Figura 4A y Figura 4B muestran el efecto de sCT oral frente a UGP 302 oral en el peso corporal y la ingestión de alimentos en ratas DIO observadas en el Ejemplo 2 a una primera dosificación. La Figura 5A y Figura 5B muestran el efecto de sCT oral frente a UGP 302 oral en el peso corporal y la ingestión de alimentos en ratas DIO observadas en el Ejemplo 2 a una segunda dosificación. La Figura 6A y Figura 6B muestran el efecto de sCT oral frente a UGP 302 oral en el peso corporal y la ingestión de alimentos en ratas DIO observadas en el Ejemplo 2 a una tercera dosificación;

sCT oral dependiente de la dosis disminuyó el peso corporal y la ingestión de alimentos a continuación del período de tratamiento a corto plazo y se confirmó así la acción anoréxica inducida por la orientación del receptor de la amilina tal como se observó anteriormente. En general, el mimético demostró superioridad dependiente de la dosis a sCT oral con respecto a la reducción en el peso corporal como se ilustra en la Figura 4, Figura 5 y Figura 6. La aplicación del mimético de calcitonina 1 a 0,5 mg/kg demostró diferencia significativa con 0,5 mg/kg de sCT oral. La ingestión de alimentos para el mimético mostró una tendencia reducida dependiente de la dosis en comparación con sCT oral.

Tolerancia a la glucosa

Tres dosis diferentes de sCT oral/mimético de calcitonina 1 que contiene 0,5, 1 y 2 mg/kg de compuesto se aplicaron mediante sonda dos veces al día a 4 grupos de ratas durante 3 días antes de la OGTT. El montaje experimental fue un diseño cruzado. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs vehículo oral. Los resultados se presentan en la Figura 7 y Figura 8 como medias ±SEM. La Figura 7A y Figura 7B muestran el efecto de sCT oral frente a UGP 302 oral en una primera dosis de tolerancia a la glucosa durante la OGTT en ratas DIO como se mide en el Ejemplo 2. La Figura 8A y Figura 8B muestran el efecto de sCT oral frente a UGP 302 oral en una segunda dosis de tolerancia a la glucosa durante la OGTT en ratas DIO como se mide en el Ejemplo 2.

La sCT oral redujo significativamente el iAUC de glucosa durante la OGTT de dosis de 0,5, 1 y 2 mg/kg en comparación con el vehículo oral, lo que confirma así el control de la glicemia postprandial ejercida por la aplicación oral de sCT como previamente se demostró. El mimético de calcitonina 1 demostró una reducción similar de manera significativa en la iAUC como se observa para sCT oral, aunque sin una clara superioridad con sCT oral dentro de los diversos UGPs.

Ejemplo 3

Efectos agudos y a largo plazo de la sCT oral frente a UGP284, UGP298 y UGP302

Animales

El estudio se realizó en ratas macho Levin-DIO (sensibles a la dieta) y Levin-DR (resistentes a la dieta) (TacLevin: CD (SD) DIO) (Taconic, Hudson, NY, Estados Unidos) obtenidas a la edad de 6-7 semanas. A su llegada, las ratas DIO se les dio dieta alta en grasas (60 kcal %) (#D12495, Research Diets Inc., New Brunswick, NJ., Estados Unidos) y mantuvieron la misma dieta durante 12 semanas antes y durante el experimento. Las ratas DR recibieron la dieta baja

en grasa y sirvieron como grupo de control. Los animales se alojaron por pares a lo largo del estudio. Las ratas se manipularon y predosificaron una vez al día con MilliQ H2O durante 2-3 semanas antes del inicio experimental para reducir la hiperglicemia inducida por el estrés. En el día antes del inicio del estudio los animales se les dio una dosis única de vehículo. Los parámetros en la línea base se registraron en una condición de ayuno toda la noche (16 h). Las ratas se distribuyeron aleatoriamente en grupos de tratamiento basados en el peso corporal en ayunas (PC) y la glucosa en plasma en ayunas (FPG). El peso corporal, ingestión de alimentos y agua se registraron antes y al final del estudio.

Compuesto

Se preparó solución de sCT oral/UGP en el día de la dosificación mediante la mezcla del portador con el compuesto dado en base a los siguientes cálculos:

5-CNAC (vehículo):

Los animales tratados con 5-CNAC oral recibieron una dosis de 150 mg/kg disueltos en milliQ H2O.

Nivel de dosificación para 5-CNAC:	150 mg/kg
Volumen de dosificación	5 ml/kg
Concentración del compuesto:	30 mg/ml

(sCT/UGP284/UGP298/UGP302)

Los animales tratados con sCT oral o UGP284/UGP298/UGP302 oral recibieron dosis de 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg o 2.0 mg/kg en combinación con 150 mg/kg de 5-CNAC, todo disuelto en milliQ H2O.

Nivel de dosificación para sCT/UGP284/UGP298/UGP302:	0,5 mg/kg
Volumen de dosificación	5 ml/kg
Concentración del compuesto:	0,1 mg/kg
Nivel de dosificación para sCT/UGP284/UGP298/UGP302:	1,0 mg/kg
Volumen de dosificación	5 ml/kg
Concentración del compuesto:	0,2 mg/kg
Nivel de dosificación para sCT/UGP284/UGP298/UGP302:	2,0 mg/kg
Volumen de dosificación	5 ml/kg
Concentración del compuesto:	0,4 mg/ml

La administración del medicamento se les dio por sonda b.i.d. oral (p.o.) (7-8 am y 3-4 pm) durante el período de estudio y como dosis única por la mañana antes del comienzo de OGTT.

La alimentación por sonda oral de glucosa durante OGTT se preparó por el siguiente cálculo:

D-Glucosa:

Los animales recibieron 2 g/kg en dosis única disuelto en milliQ H2O.

Nivel de dosificación de D-glucosa:	2 g/kg
Volumen de dosificación	4 ml/kg
Concentración del compuesto:	500 mg/ml

Condiciones Experimentales

Prueba aguda - Período de Tratamiento para 0,5 mg/kg, 1 mg/kg y 2 mg/kg:

ES 2 586 805 T3

	Día 0	Día 1-2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
	1 ^{ra} OGTT	Descanso	Pre-dosis	Tratamiento	Tratamiento	Tratamiento	2 ^{da} OGTT
5	Todos los Vehículos	Sin manipulación	Todos los Vehículos	(b.i.d)	(b.i.d)	(b.i.d)	Dosis única

10 A continuación de la (1^{ra}) OGTT inicial, los animales se distribuyeron aleatoriamente en grupos de tratamiento basados en FBG y BW. Los animales se trataron previamente (b.i.d.) 3 días antes de la 2^{da} OGTT. El estudio se realizó en un diseño de superposición de x con cada animal que es su propio control.

OGTT seguido de ayuno toda la noche (16 h):

15	-30	0	15	30	60	120	240 min
	D	G	B	B	B	B	B
	B	B	BG	BG	BG	BG	BG
20	BG	BG					

D = Medicamento; BG = Glucosa en sangre; B = Sangre; G = Glucosa

25 La extracción de sangre y la glicemia se midieron mediante punción venosa de la cola caliente. Los niveles de glucosa de sangre entera se determinaron con un medidor de glucosa en sangre ACCU-CHEK® Avia (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suiza). La sangre (aprox 300 µl) se recoge en un tubo de plasma 1 ml MiniCollect K3EDTA (Greiner-Bio-One GmbH, Frickenhausen, Alemania), se invierte, y se almacena en hielo. Los tubos se centrifugan 3000 x g (5000 rpm en centrífuga de mesa) durante 10 minutos a 4 °C y se obtuvo el plasma. Las muestras de plasma se almacenan a -20 °C hasta su análisis. Se obtiene un total de ~ 2,5 ml de sangre durante OGTT (~ 0,3% de peso corporal).

30 Grupos experimentales

Intervención	Compuesto	Conc.	Número
35 Vehículo oral	5-CNAC	150 mg/kg	(4 grupos de n = 8) diseño con superposición de X con 0,5 mg/kg
sCT oral	5-CNAC + sCT	150 mg/kg + 0,5 mg/kg	n = 8
40 UGP284 Oral	5-CNAC + UGP284	150 mg/kg 0,5 mg/kg	n = 8
UGP298 oral	5-CNAC + UGP298	150 mg/kg 0,5 mg/kg	n = 8
45 UGP302 oral	5-CNAC + UGP302	150 mg/kg 0,5 mg/kg	n = 8
Vehículo oral	5-CNAC	150 mg/kg	(4 grupos de n = 8) diseño con superposición de X con 1 mg/kg

50

55

60

Intervención	Compuesto	Conc.	Número
5 sCT oral	5-CNAC + sCT	150 mg/kg +	n = 8
		1 mg/kg	
10 UGP284 Oral	5-CNAC + UGP284	150 mg/kg	n = 8
		1 mg/kg	
10 UGP298 oral	5-CNAC + UGP298	150 mg/kg	n = 8
		1 mg/kg	
15 UGP302 oral	5-CNAC + UGP302	150 mg/kg	n = 8
		1 mg/kg	
Vehículo oral	5-CNAC	150 mg/kg	(4 grupos de n = 8) diseño con superposición de X con 2 mg/kg
20 sCT oral	5-CNAC + sCT	150 mg/kg +	n = 8
		2 mg/kg	
20 UGP284 Oral	5-CNAC + UGP284	150 mg/kg	n = 8
		2 mg/kg	
25 UGP298 oral	5-CNAC + UGP298	150 mg/kg	n = 8
		2 mg/kg	
25 UGP302 oral	5-CNAC + UGP302	150 mg/kg	n = 8
		2 mg/kg	

30

Estadísticas

El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguido por la prueba de Dunnet post hoc para la comparación múltiple. Se realizó la prueba t de Student para comparar dos grupos apareados. Todos los análisis se realizaron mediante el uso del software GRAPHPAD PRISM (GraphPad Prism, San Diego, CA. (Estados Unidos). El área incremental bajo la curva (iAUC) durante OGTT se calculó por el método trapezoidal. Un valor de P < 0,05 se consideró significativo. Todos los datos se presentan como media ± error estándar de la media (SEM).

3. Resultados

40

Características de línea base

La dieta alta en grasas *ad libitum* durante 12 semanas indujo fenotipo obeso pronunciado en ratas sensibles a la dieta (DIO) al comparar el peso corporal de sus compañeros de camada resistentes a la dieta (DR) (P < 0,001) (Tabla 3). La glicemia en ayunas no fue diferente entre DIO y DR. En contraste, el área bajo la curva (AUC) de los cálculos durante OGTT fue significativamente mayor en ratas DIO comparado con las ratas DR, lo que demuestra la intolerancia a la glucosa inducida por la dieta alta en grasas (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros metabólicos en ratas DIO y DR

50

	Resistentes a la dieta (DR)	Sensibles a la dieta (DIO)
Peso corporal (g)	609,5 ± 24,5	813,6 ± 9,8***
Glucosa en plasma en ayunas (mM)	5,8 ± 0,1	5,8 ± 0,2
AUC en glucosa en sangre en OGTT (mM*min)	648,8 ± 27,3	888,4 ± 64,3***

55

AUC, área bajo la curva; OGTT, prueba de tolerancia a la glucosa oral. Los datos son medias ± SEM (n=12/DR, n=24/DIO).

60

Peso corporal e ingestión de alimentos

sCT oral dependiente de la dosis disminuyó el peso corporal y la ingestión de alimentos a continuación del período de tratamiento a corto plazo y se confirmó así la acción anoréxica inducida por la orientación del receptor de la amilina tal

como se observó anteriormente. En general, todos los miméticos de UGP demostraron la superioridad dependiente de la dosis con sCT oral con respecto a la reducción en el peso corporal como se ilustra en Figura 9. La aplicación de UGP302 a 0,5 mg/kg demostró diferencia significativa con 0,5 mg/kg de sCT oral. Para UGP284, se observó diferencia significativa en la dosis de 2 mg/kg cuando se compara con 2 mg/kg de sCT oral. Finalmente, UGP298 tanto a dosis de 1 mg/kg como 2 mg/kg fueron significativamente diferentes en comparación con sCT oral en dosis similares (Figura 9). La Figura 9A, Figura 9B, Figura 9C, Figura 9D, Figura 9E, y Figura 9F muestran el efecto de tres dosis diferentes de sCT/UGP284/UGP298/UGP302 oral que contienen 0,5, 1 y 2 mg/kg de compuesto se aplicaron mediante sonda dos veces al día a 4 grupos de ratas durante 3 días. * P < 0,05, ** P < 0,01 vs sCT oral. Los datos se presentan como medias ± SEM.

Tolerancia a la glucosa

La Figura 10A, Figura 10B, Figura 10C, Figura 10D, Figura 10E, y Figura 10F muestran el efecto de sCT oral frente a UGPs oral en la tolerancia a la glucosa durante la OGTT en ratas DIO. Tres dosis diferentes de sCT/UGP284/UGP298/UGP302 que contiene 0,5, 1 y 2 mg/kg de compuesto se aplicaron mediante sonda dos veces al día a 4 grupos de ratas durante 3 días antes de la OGTT. El montaje experimental fue un diseño cruzado. * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 vs vehículo oral. Los datos se presentan como medias ± SEM.

Todos UGPs demostraron una reducción significativa similar en la iAUC como se observa para sCT oral (Figura 10).

En conclusión, la aplicación de UGP284, UGP298 y UGP302 a dosis de 0,5, 1 y 2 mg/kg demostraron la superioridad de dosis equivalentes de sCT oral en cuanto al balance de energía en ratas macho DIO. Además, UGP284, UGP298 y UGP302 a dosis de 0,5, 1 y 2 mg/kg produjeron una mejora en la tolerancia a la glucosa durante la OGTT.

Ejemplo 4

Unión de los análogos de sCT a Receptores de Calcitonina de células T47D

Los análogos de sCT en varias concentraciones se probaron en un bioensayo de T47D (línea de células epiteliales de mama humanas). Esta línea celular se conoce que tiene los siguientes receptores: calcitonina, andrógeno, progesterona, glucocorticoide, prolactina y estrógeno. Los resultados se presentan en la Figura 11 como % de unión de AMPc con respecto a sCT que se fijó en 100 % la unión del AMPc a una concentración de 1000 pg/ml. Se puede observar que UGP302 proporciona el más alto nivel de unión de todos los compuestos ensayados y que proporciona un mayor nivel de unión de sCT.

Ejemplo 5

Consumo de Alimentos y cambio de peso en ratas alimentadas con análogos de sCT

Las ratas macho Sprague-Dawley se alojaron individualmente en jaulas en las que se invirtió el ciclo de luz/oscuridad. A las ratas se le permitió comer ad libitum. El consumo de alimentos y el peso de ratas se controlaron diariamente durante cada estudio. Las ratas se inyectaron por vía intramuscular con un placebo de solución salina o el péptido indicado a la dosis especificada en solución salina. Los datos en las tablas siguientes se resumen como el cambio medio en el consumo de alimentos en relación con el día antes de comenzar el tratamiento (día-1) y como el cambio medio en peso con respecto al día antes de comenzar el tratamiento.

Los resultados se muestran en las Figuras 12, 13, 14, 15, 16 y 17. La Figura 12A y Figura 12B muestra el consumo de alimentos (Figura 12A) y las mediciones del cambio de peso (Figura 12B) para UGP 282, medido en el Ejemplo 5. La Figura 13A y Figura 13B muestra el consumo de alimentos (Figura 13A) y las mediciones del cambio de peso (Figura 13B) para UGP 283, medido en el Ejemplo 5. La Figura 14A y Figura 14B muestra el consumo de alimentos (Figura 14A) y las mediciones del cambio de peso (Figura 14B) para UGP 284, medido en el Ejemplo 5. La Figura 15A y Figura 15B muestra el consumo de alimentos (Figura 15A) y las mediciones del cambio de peso (Figura 15B) para UGP 298, medido en el Ejemplo 5. La Figura 16A y Figura 16B muestra el consumo de alimentos (Figura 16A) y las mediciones del cambio de peso (Figura 16B) para UGP 302, medido en el Ejemplo 5. La Figura 17A y Figura 17B muestra el consumo de alimentos (Figura 17A) y las mediciones del cambio de peso (Figura 17B) para UGP 303, medido en el Ejemplo 5.

Se puede observar que todos los compuestos ensayados inducen la pérdida de peso y reducen la ingestión de alimento.

Ejemplo 6

Marcadores de la Osteoporosis y la Osteoartritis

El efecto de sCT/mimético de calcitonina sobre la pérdida de hueso y cartílago se estudió en ratas DIO. Los animales se dosificaron como se describe en la tabla de abajo, y 2 horas después del tratamiento se tomaron muestras de sangre de mediante punción venosa de la cola caliente.

5 Los niveles séricos de CTX-I, como una indicación de la resorción ósea, se midieron mediante el uso de RatLaps™ ELISA, and los niveles séricos de CTX-II, como una indicación de la degradación de cartílagos, se midieron mediante el uso de ELISA Serum PC Cartilaps™.

10 Grupos experimentales

10

Intervención	Compuesto	Conc.	Número
Vehículo oral	5-CNAC	150 mg/kg	n = 8
sCT oral	5-CNAC + sCT	150 mg/kg + 1 mg/kg	n = 8
Mimético de calcitonina oral de sec. con núm. de ident.:18	5-CNAC + sec. con núm. de ident.:15	150 mg/kg 1 mg/kg	n = 8

15

20

Los resultados se ven en la Figura 18 y Figura 19, donde un mimético de calcitonina de sec. con núm. de ident.: 18 muestra un efecto más fuerte en la reducción tanto de la resorción ósea como la degradación del cartílago que hace sCT.

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> NU-Co Desarrollado por GMBH
 Mehta, Nozer M
 Sturmer, Amy M.
 Stern, William
 Karsdal, Morten Asser
 Henriksen, Kim

10 <120> Miméticos de Calcitonina para el Tratamiento de Enfermedades y Trastornos

<130> 133302-465034/PCT

15 <140> Aún no asignado
 <141> 2012-11-02

<150> 61/554, 771
 <151> 2011-11-02

20 <150> 61/578,620
 <151> 2011-12-21

<160> 18

25 <170> Patentado en versión 3.5

<210> 1
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Salmón

30 <400> 1

Cys Ser Asn Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Lys Leu Ser Gln Glu Leu
 1 5 10 15

35 **His Lys Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Asn Thr Gly Ser Gly Thr Pro**
 20 25 30

40 <210> 2
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Ratón

45 <400> 2

Cys Gly Asn Leu Ser Thr Cys Met Leu Gly Thr Tyr Thr Gln Asp Leu
 1 5 10 15

50 **Asn Lys Phe His Thr Phe Pro Gln Thr Ser Ile Gly Val Glu Ala Pro**
 20 25 30

55 <210> 3
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Pollo

60

ES 2 586 805 T3

<400> 3

5 Cys Ala Ser Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Lys Leu Ser Gln Glu Leu
1 5 10 15

10 His Lys Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Asp Val Gly Ala Gly Thr Pro
20 25 30

<210> 4

<211> 32

15 <212> PRT

<213> Anguila

<400> 4

20 Cys Ser Asn Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Lys Leu Ser Gln Glu Leu
1 5 10 15

25 His Lys Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Asp Val Gly Ala Gly Thr Pro
20 25 30

<210> 5

<211> 32

30 <212> PRT

<213> Rata

<400> 5

35 Cys Gly Asn Leu Ser Thr Cys Met Leu Gly Thr Tyr Thr Gln Asp Leu
1 5 10 15

40 Asn Lys Phe His Thr Phe Pro Gln Thr Ser Ile Gly Val Gly Ala Pro
20 25 30

<210> 6

<211> 32

45 <212> PRT

<213> Caballo

<400> 6

50 Cys Ser Asn Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Thr Tyr Thr Gln Asp Leu
1 5 10 15

55 Asn Lys Phe His Thr Phe Pro Gln Thr Ala Ile Gly Val Gly Ala Pro
20 25 30

<210> 7

<211> 32

60 <212> PRT

<213> Canino

<400> 7

ES 2 586 805 T3

Cys Ser Asn Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Thr Tyr Ser Lys Asp Leu
1 5 10 15

Asn Asn Phe His Thr Phe Ser Gly Ile Gly Phe Gly Ala Glu Thr Pro
20 25 30

5

<210> 8
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Canino

<400> 8

Cys Ser Asn Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Thr Tyr Thr Gln Asp Leu
1 5 10 15

Asn Lys Phe His Thr Phe Pro Gln Thr Ala Ile Gly Val Gly Ala Pro
20 25 30

20

<210> 9
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Porcino

<400> 9

Cys Ser Asn Leu Ser Thr Cys Val Leu Ser Ala Tyr Trp Arg Asn Leu
1 5 10 15

Asn Asn Phe His Arg Phe Ser Gly Met Gly Phe Gly Pro Glu Thr Pro
20 25 30

35

<210> 10
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Humano

<400> 10

Cys Gly Asn Leu Ser Thr Cys Met Leu Gly Thr Tyr Thr Gln Asp Phe
1 5 10 15

Asn Lys Phe His Thr Phe Pro Gln Thr Ala Ile Gly Val Gly Ala Pro
20 25 30

50

<210> 11
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción Sintética

60

<220>
 <221> MOD_RES

ES 2 586 805 T3

<222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (32)..(32)
 <223> AMIDACIÓN

10 <400> 11
Cys Ser Asn Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Lys Leu Ser Gln Glu Leu
1 5 10 15

15 **His Lys Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Asp Val Gly Ala Asn Thr Tyr**
20 25 30

20 <210> 12
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Construcción Sintética

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (32)..(32)
 <223> ACETILACIÓN

40 <400> 12
Cys Ser Asn Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Arg Leu Ser Gln Glu Leu
1 5 10 15

45 **His Arg Leu Gln Thr Phe Pro Arg Thr Asp Val Gly Ala Asn Thr Tyr**
20 25 30

50 <210> 13
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Construcción Sintética

60 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> propionilo

60 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (32)..(32)
 <223> AMIDACIÓN

ES 2 586 805 T3

<400> 13

5 **Cys Ser Asn Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Lys Leu Ser Gln Glu Leu**
 1 5 10 15

10 **His Lys Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Asn Thr Gly Ser Gly Thr Pro**
 20 25 30

<210> 14
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Construcción Sintética

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Succinilo

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (32)..(32)
 <223> AMIDACIÓN

30 <400> 14

30 **Cys Ser Asn Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Lys Leu Ser Gln Glu Leu**
 1 5 10 15

35 **His Lys Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Asn Thr Gly Ser Gly Thr Pro**
 20 25 30

40 <210> 15
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Construcción Sintética

50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (32)..(32)
 <223> AMIDACIÓN

60 <400> 15

60 **Cys Ser Asn Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Lys Leu Ser Gln Glu Leu**
 1 5 10 15

His Lys Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Asp Val Gly Ala Asn Ala Pro
 20 25 30

<210> 16
 <211> 33
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Construcción Sintética

 10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (33)..(33)
 <223> AMIDACIÓN

 15 <400> 16

Lys Cys Ser Asn Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Lys Leu Ser Gln Glu
1 5 10 15

 20 **Leu His Lys Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Asp Val Gly Ala Asn Thr**
20 25 30

 25 **Tyr**

 <210> 17
 <211> 32
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Construcción Sintética

 35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Succinilo

 40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (32)..(32)
 <223> AMIDACIÓN

 45 <400> 17

Cys Ser Asn Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Lys Leu Ser Gln Glu Leu
1 5 10 15

His Lys Leu Gln Thr Tyr Pro Arg Thr Asp Val Gly Ala Asn Ala Tyr
20 25 30

 55 <210> 18
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 60 <220>
 <223> Construcción Sintética

ES 2 586 805 T3

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> La Cisteina puede modificarse con un grupo acetilo, un grupo propionilo, o un grupo succinilo.

5

<220>
 <221> CARACT_MISC.
 <222> (31)..(31)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

10

<220>
 <221> CARACT_MISC.
 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

15

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (32)..(32)
 <223> Amidado opcionalmente

20

<400> 18

Cys	Ser	Asn	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Lys	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu
1				5					10					15	

25

His	Lys	Leu	Gln	Thr	Tyr	Pro	Arg	Thr	Asp	Val	Gly	Ala	Asn	Xaa	Xaa
			20					25					30		

30

Reivindicaciones

1. Un péptido AcCSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRTDVGANAP-NH₂ sec. con núm. de ident.: 15.
- 5 2. El péptido como se reivindica en la reivindicación 1, en donde el péptido se formula para la administración enteral.
3. El péptido como se reivindica en la reivindicación 1, en donde el péptido se formula para la administración parenteral.
- 10 4. El péptido como se reivindica en la reivindicación 1, en donde el péptido se formula con un portador para la administración oral, y en donde el portador aumenta la biodisponibilidad oral del péptido.
- 15 5. El péptido como se reivindica en la reivindicación 4, en donde el portador comprende 5- CNAC, SNAD, o SNAC.
- 20 6. El péptido como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el péptido se formula en una composición farmacéutica para la administración oral que comprende partículas de ácido cítrico revestidas, y en donde las partículas de ácido cítrico revestidas aumentan la biodisponibilidad oral del péptido.

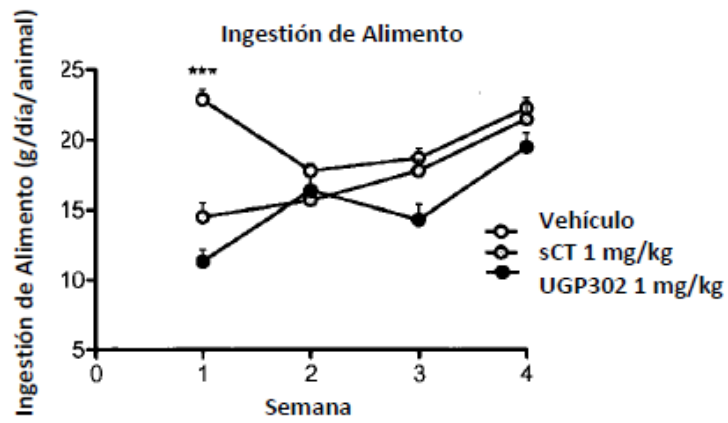


FIGURA 1A

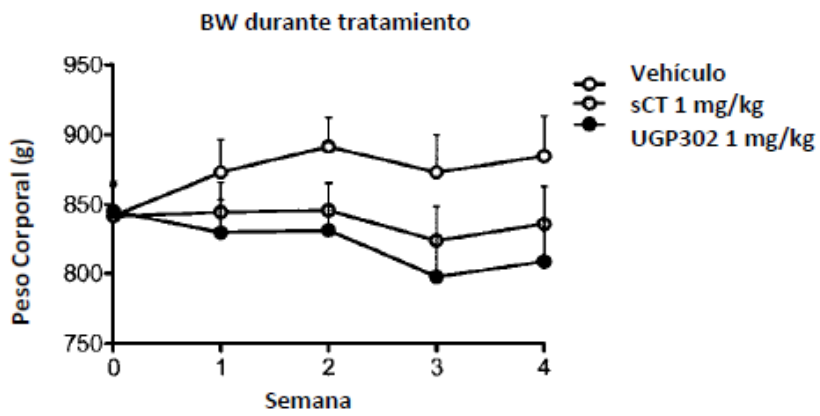
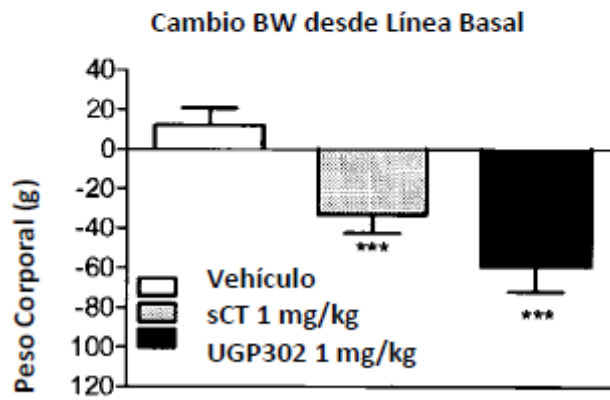
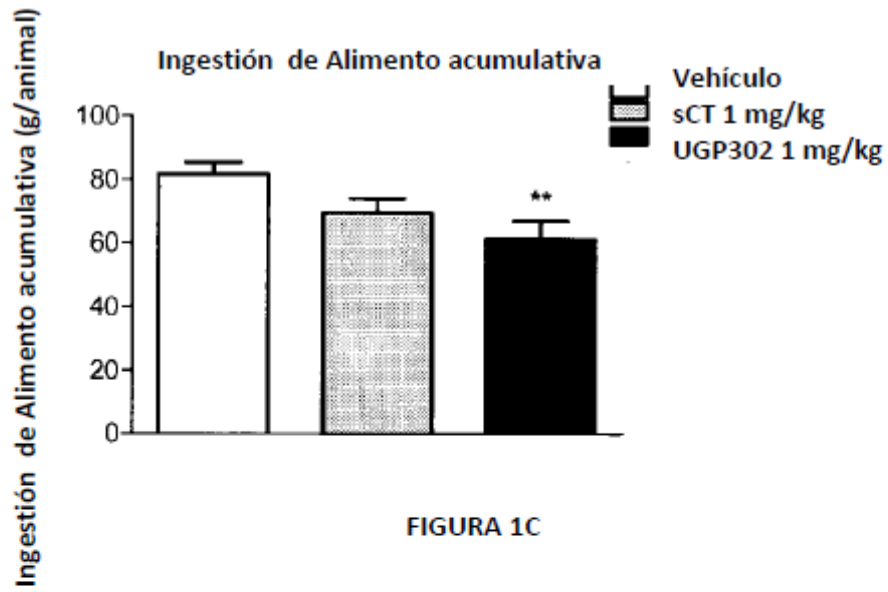


FIGURA 1B



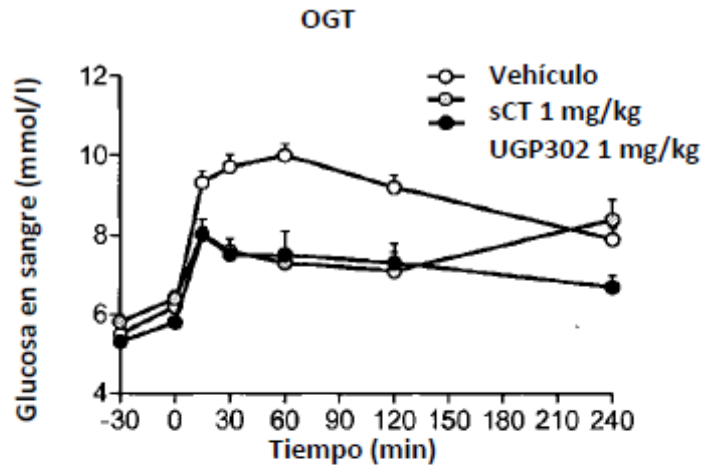
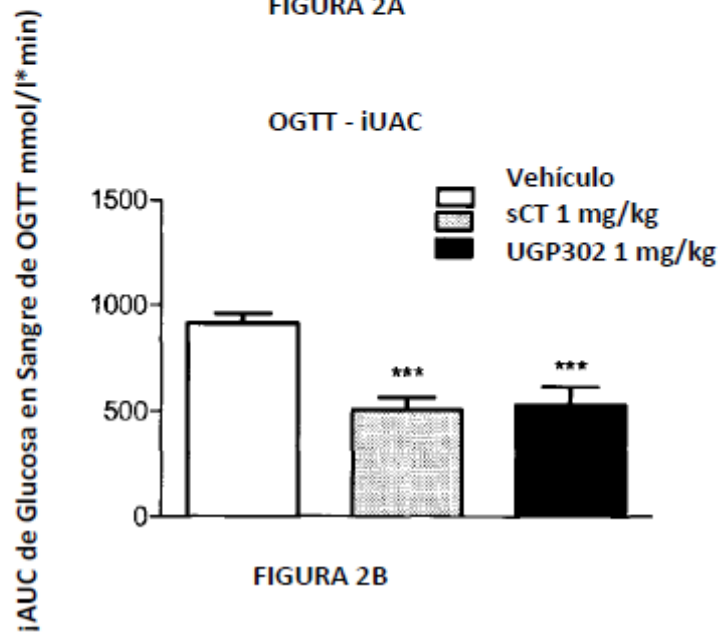


FIGURA 2A



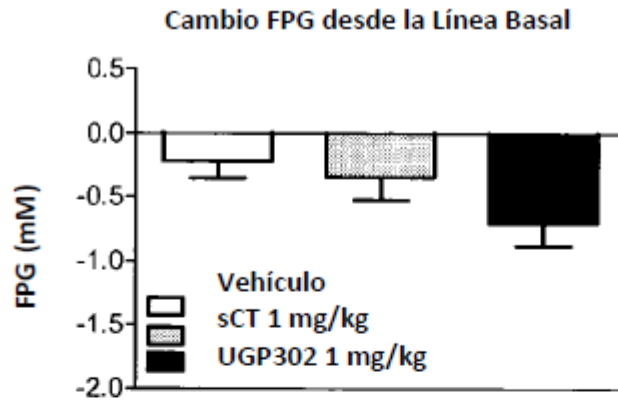


FIGURA 3

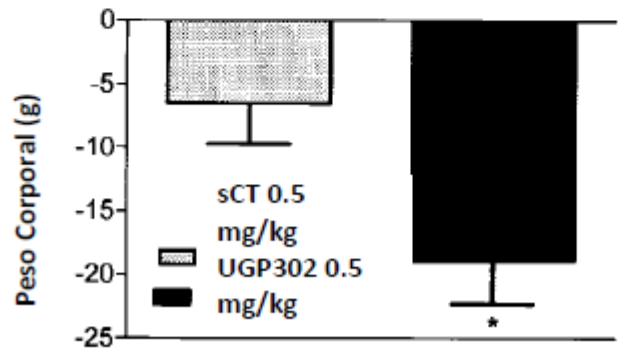


FIGURA 4A

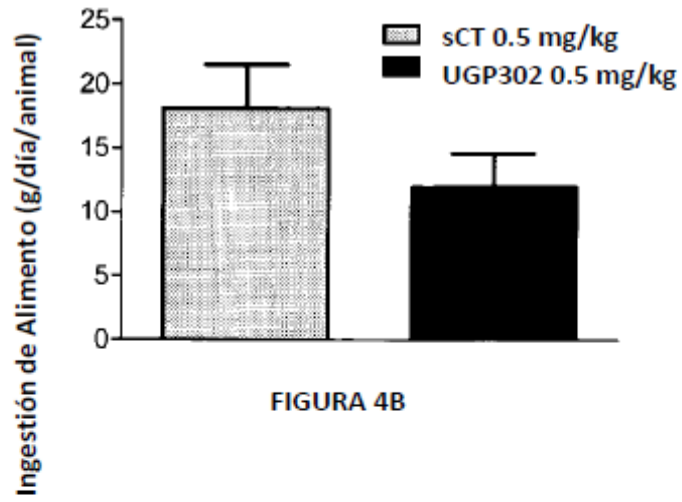


FIGURA 4B

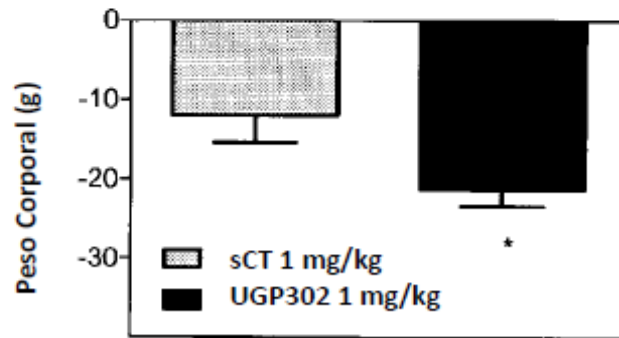


FIGURA 5A

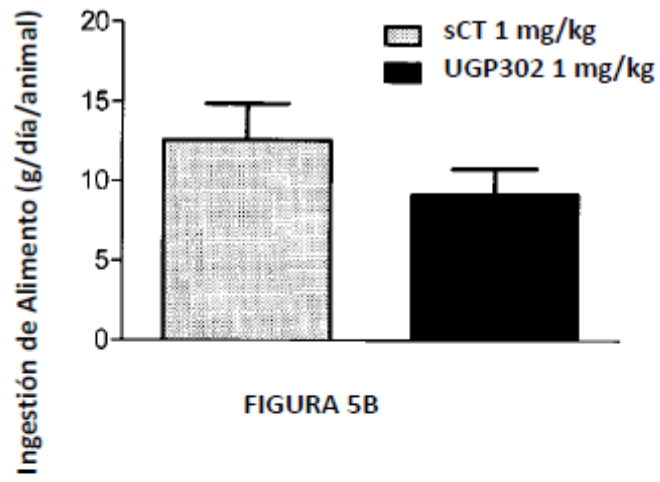


FIGURA 5B

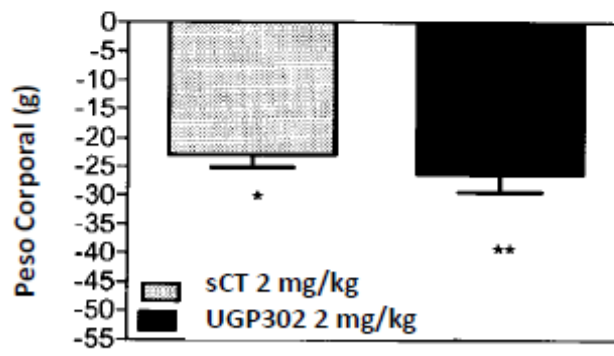


FIGURA 6A

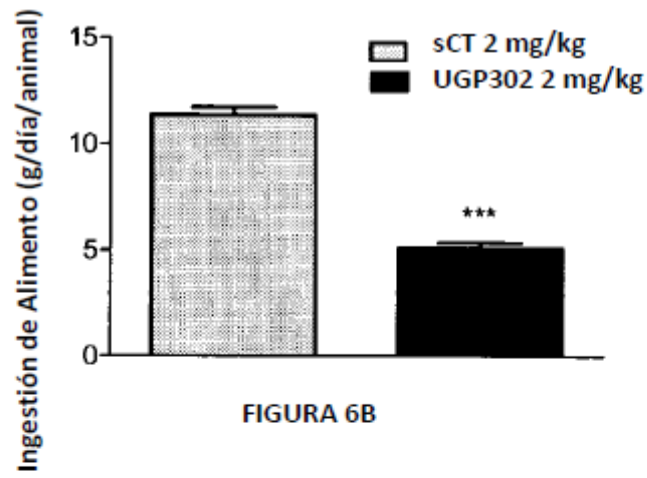


FIGURA 6B

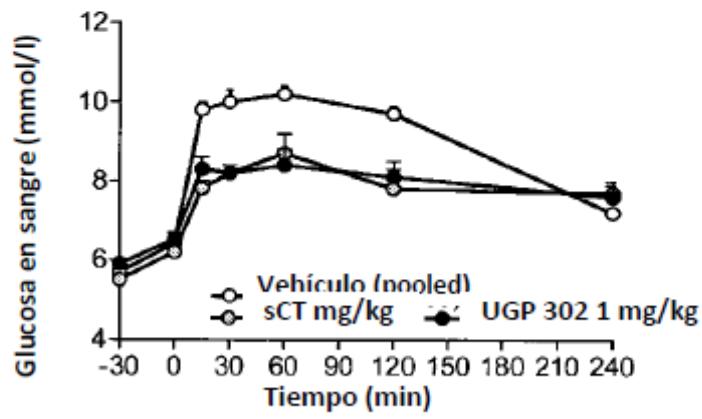
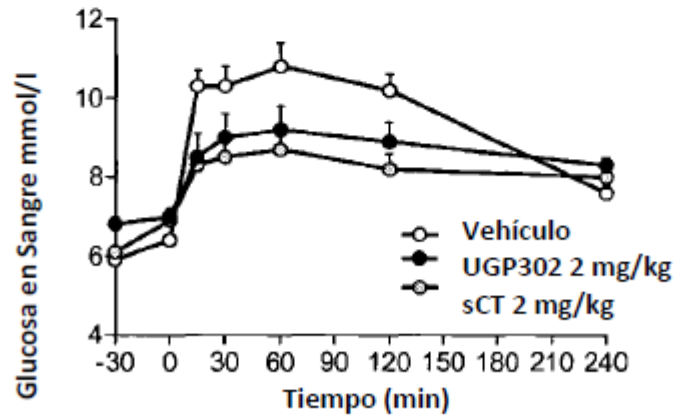
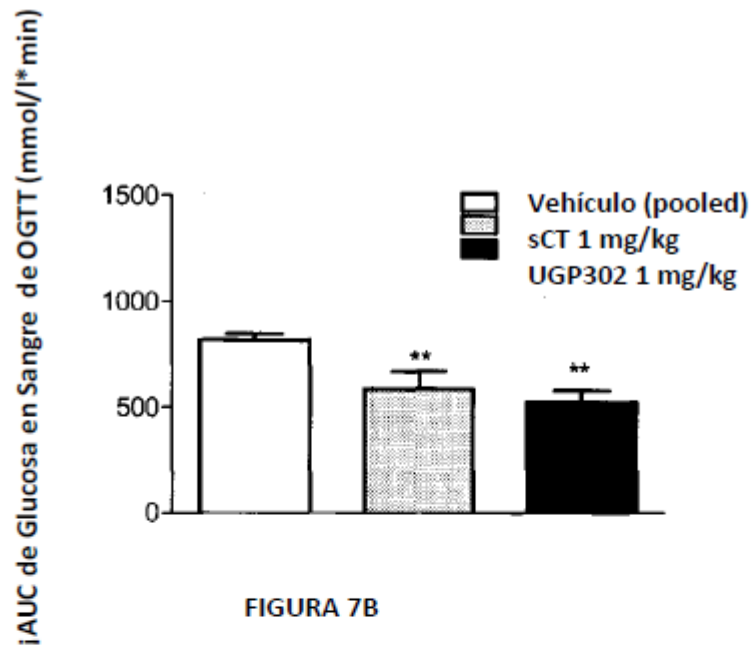
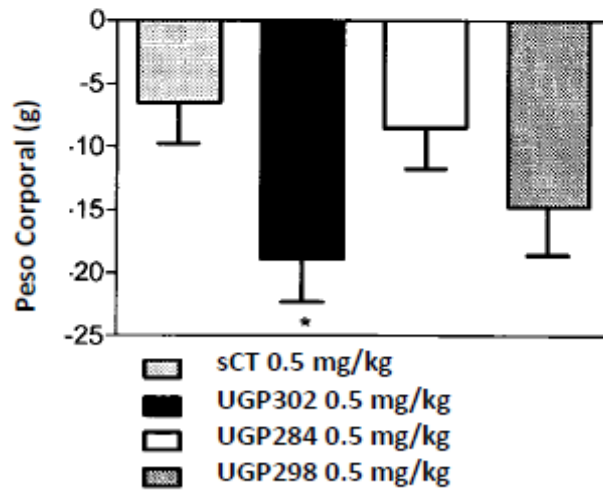
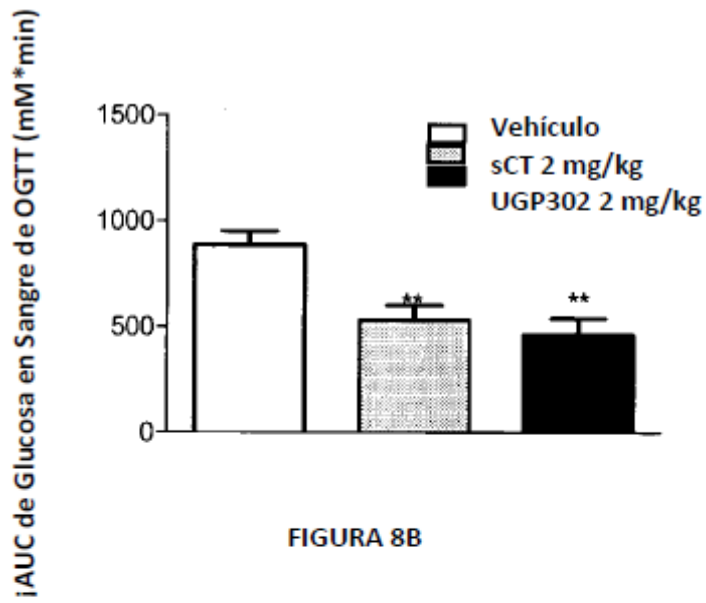
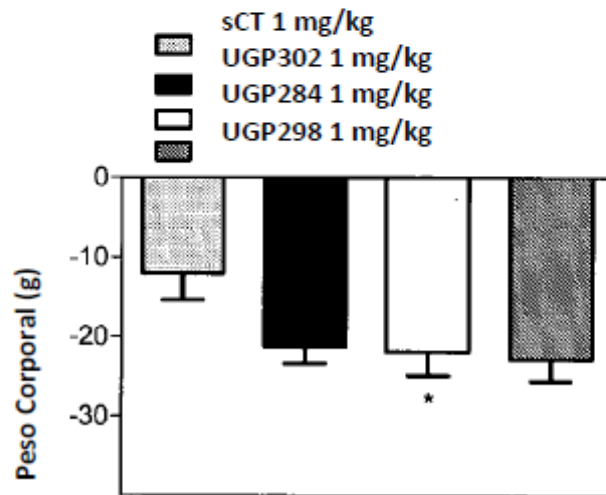
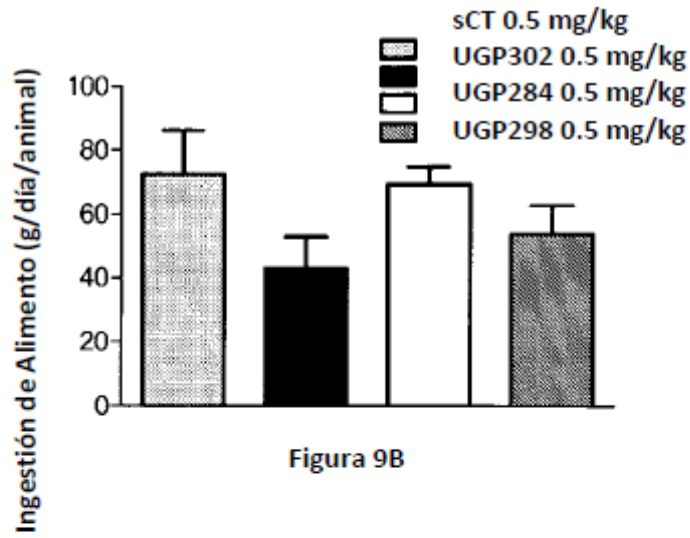


FIGURA 7A







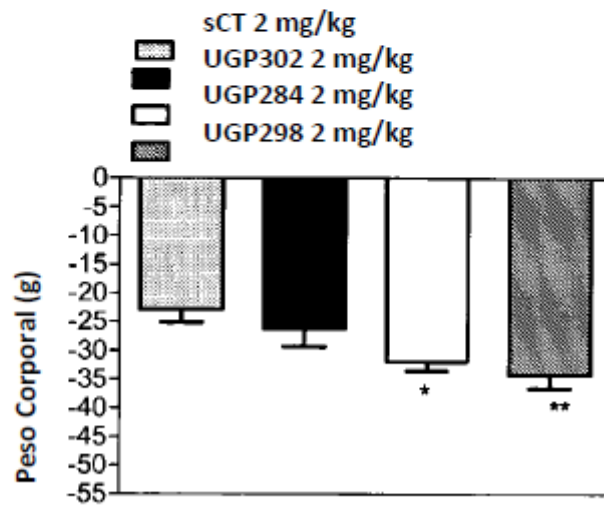
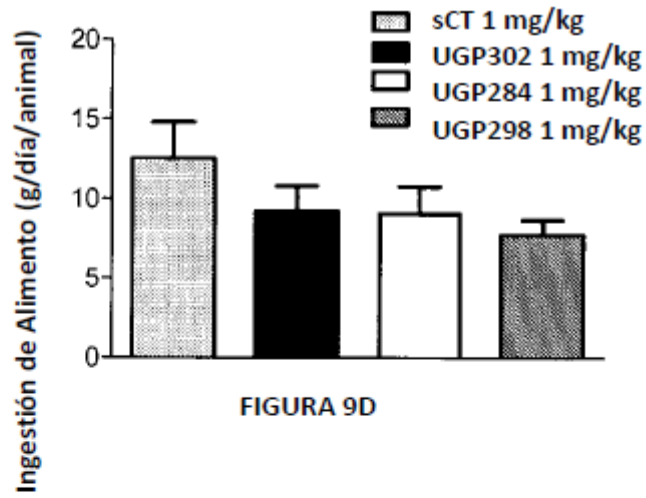
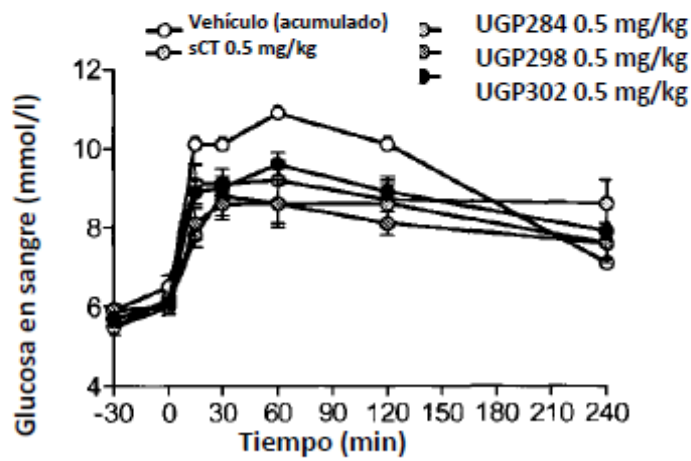
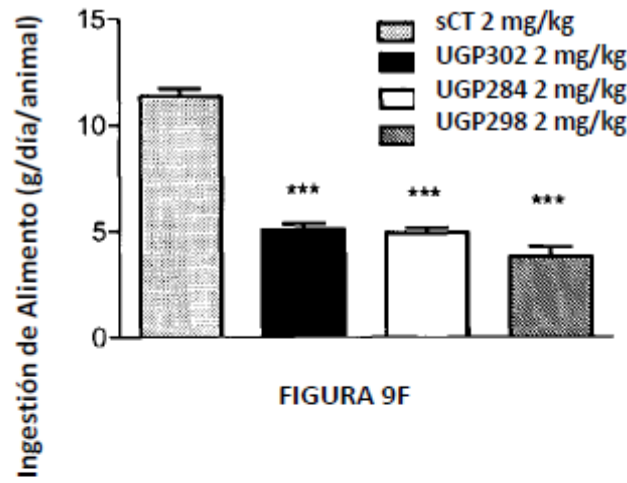
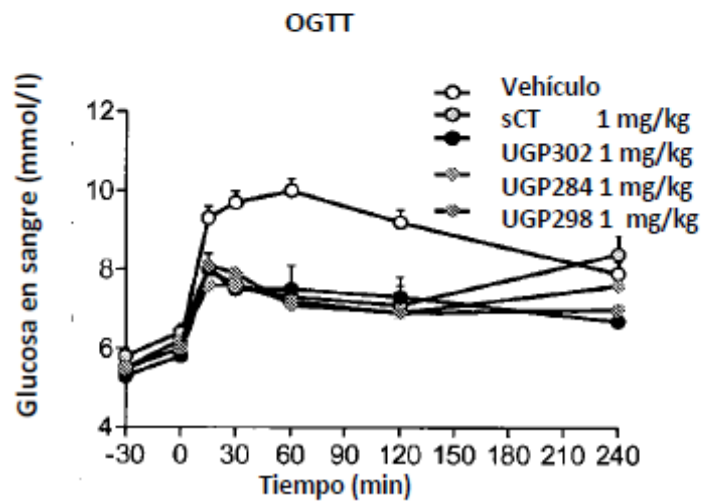
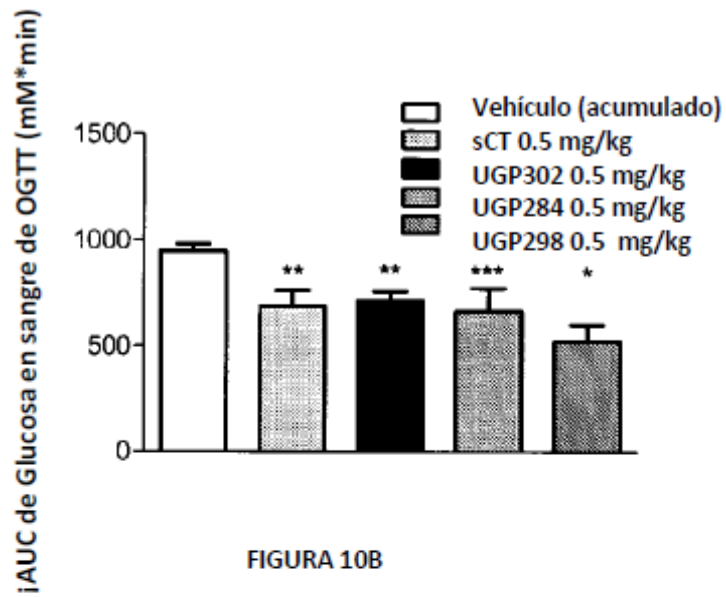
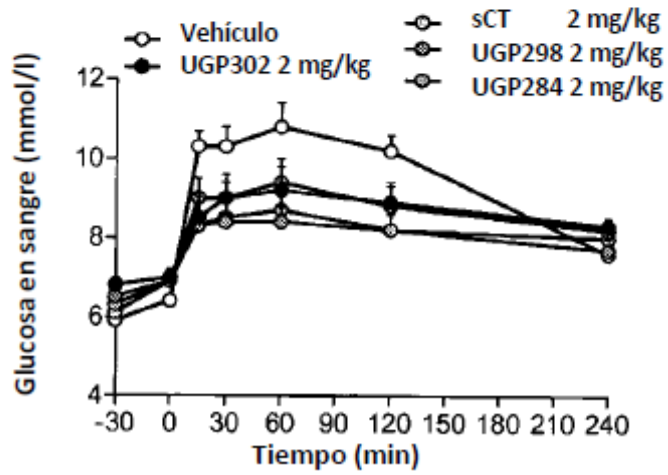
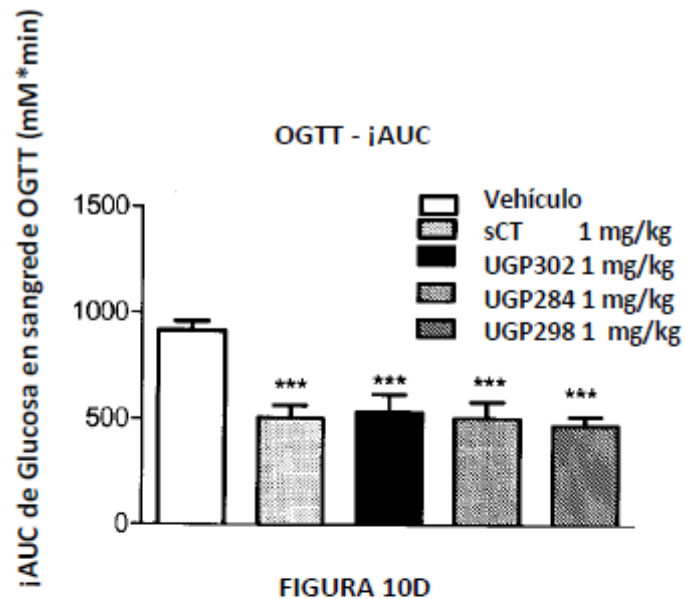


FIGURA 9E







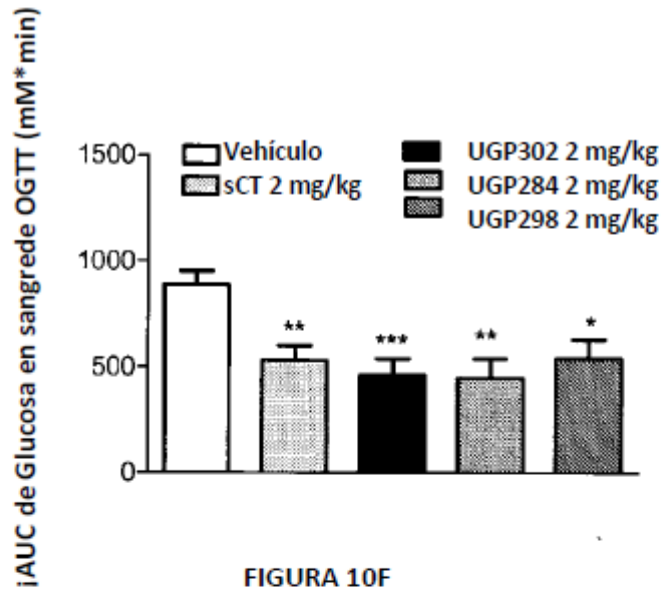


FIGURA 10F

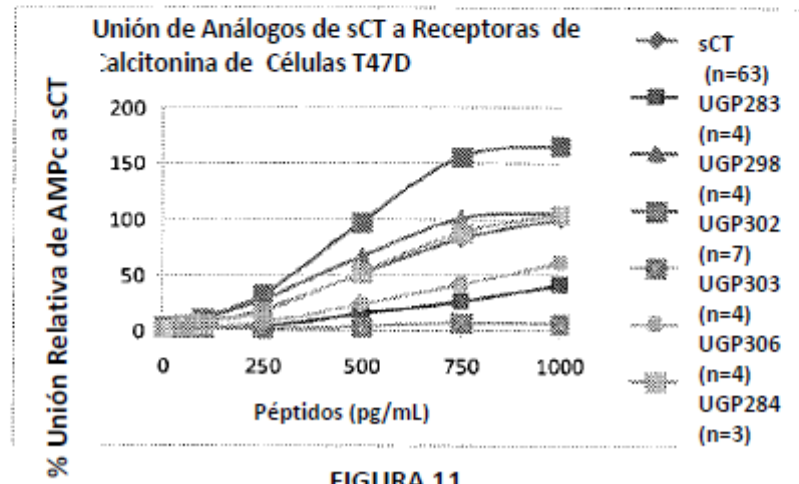
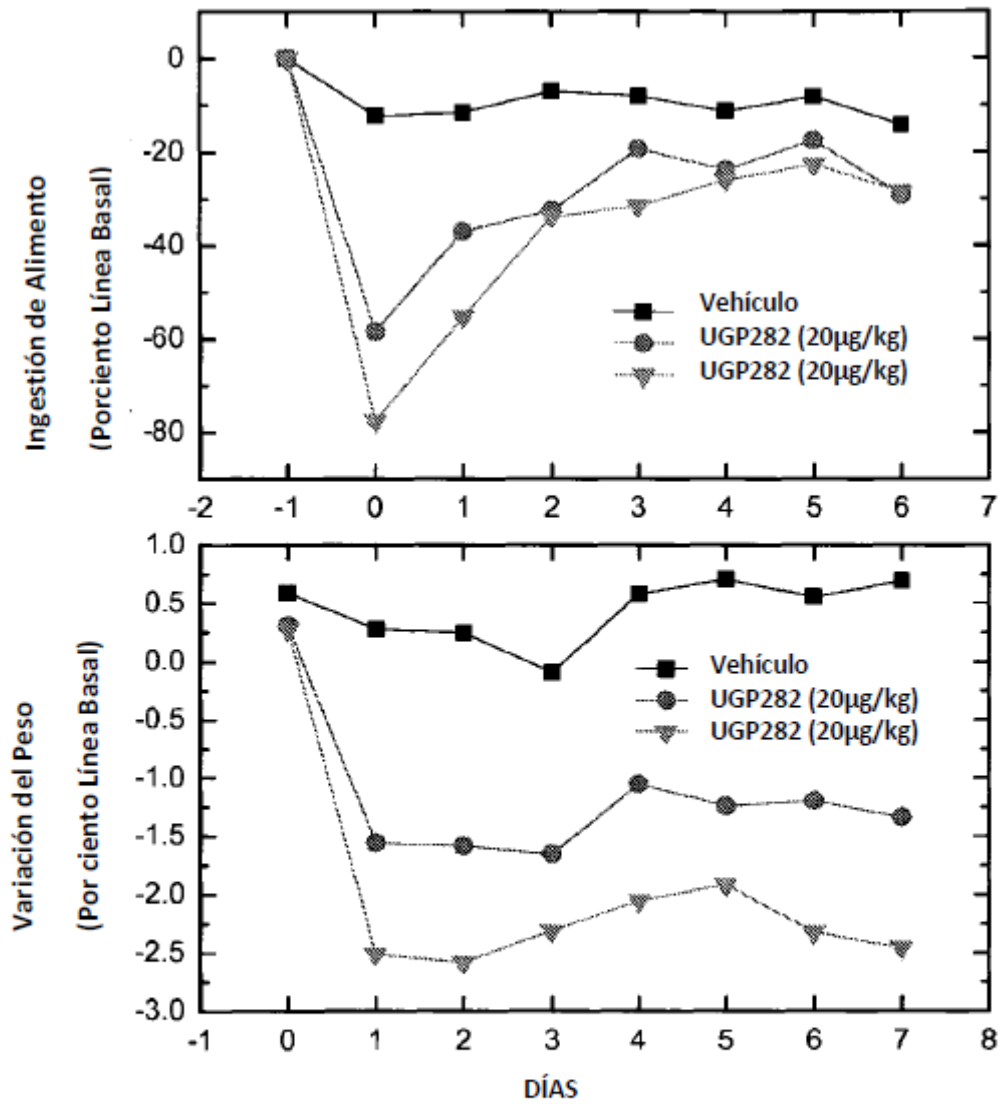
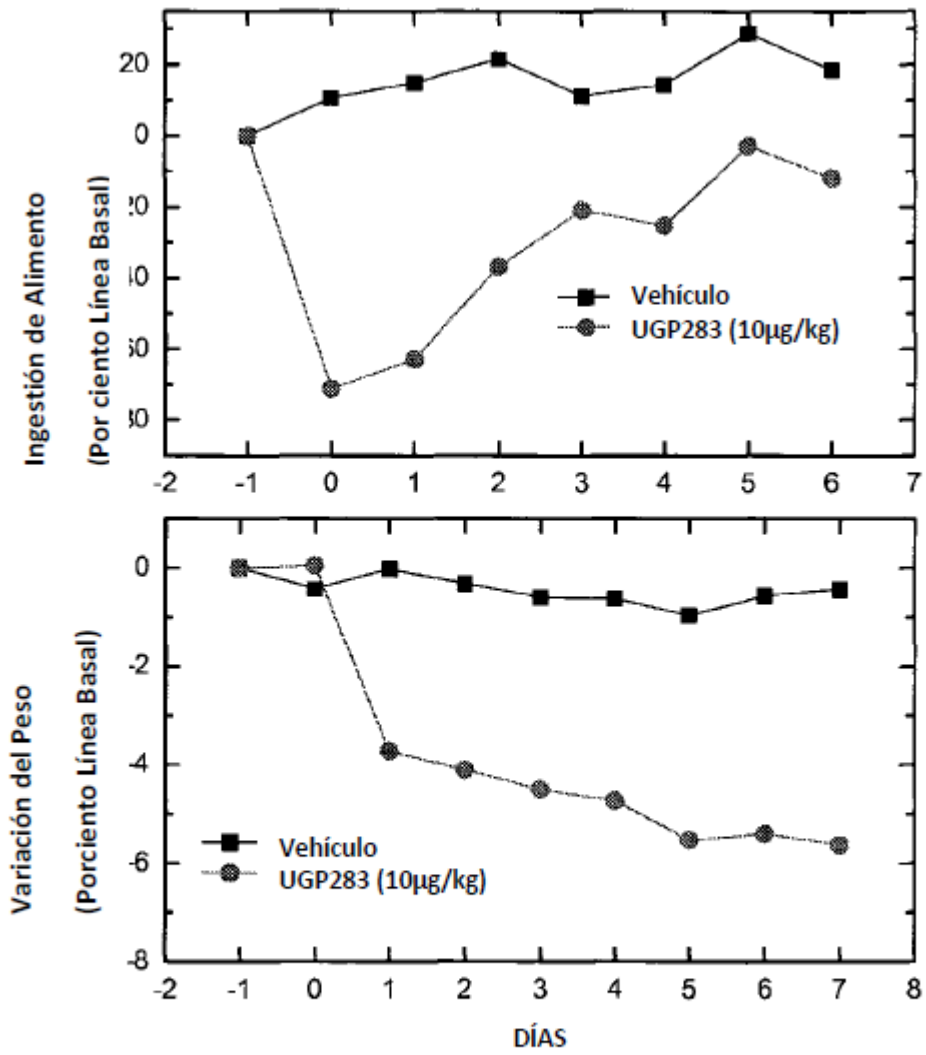


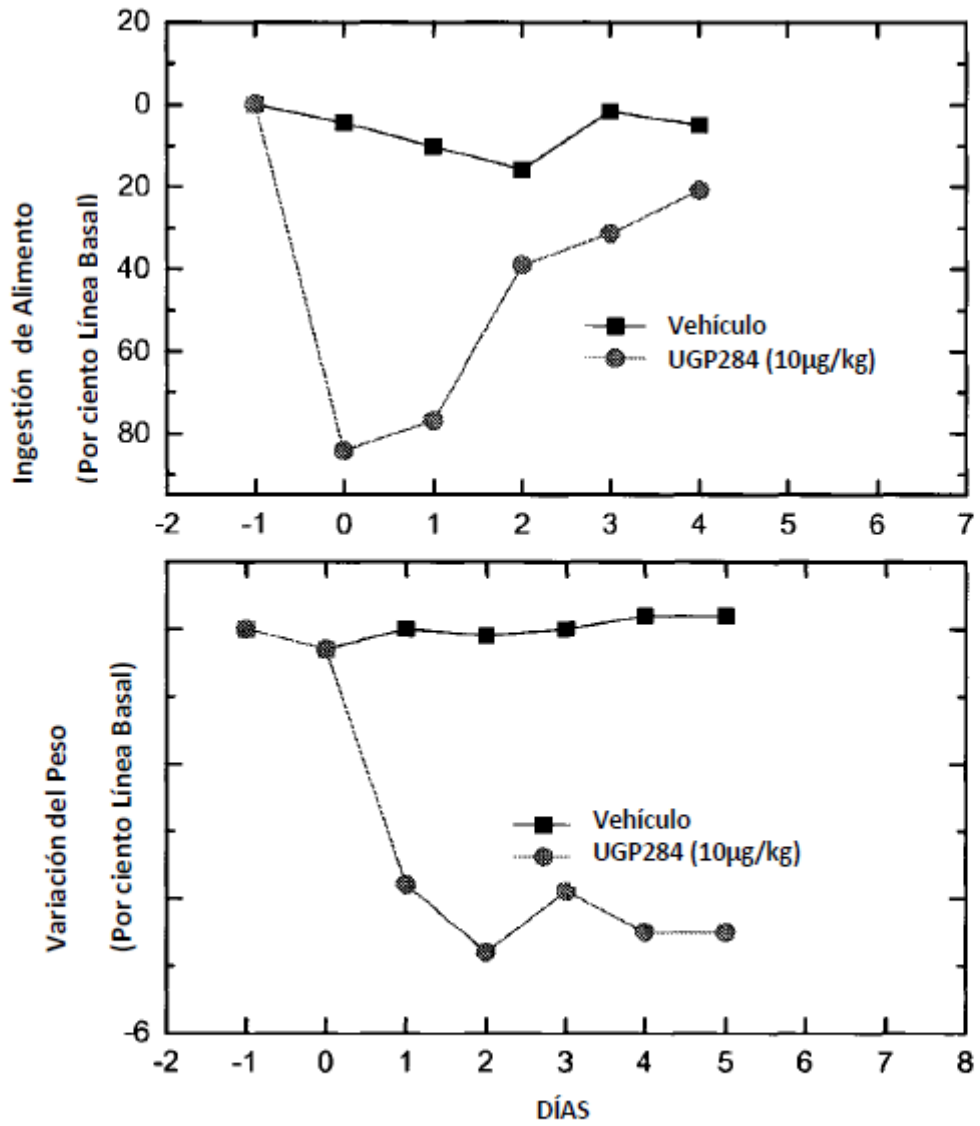
FIGURA 11



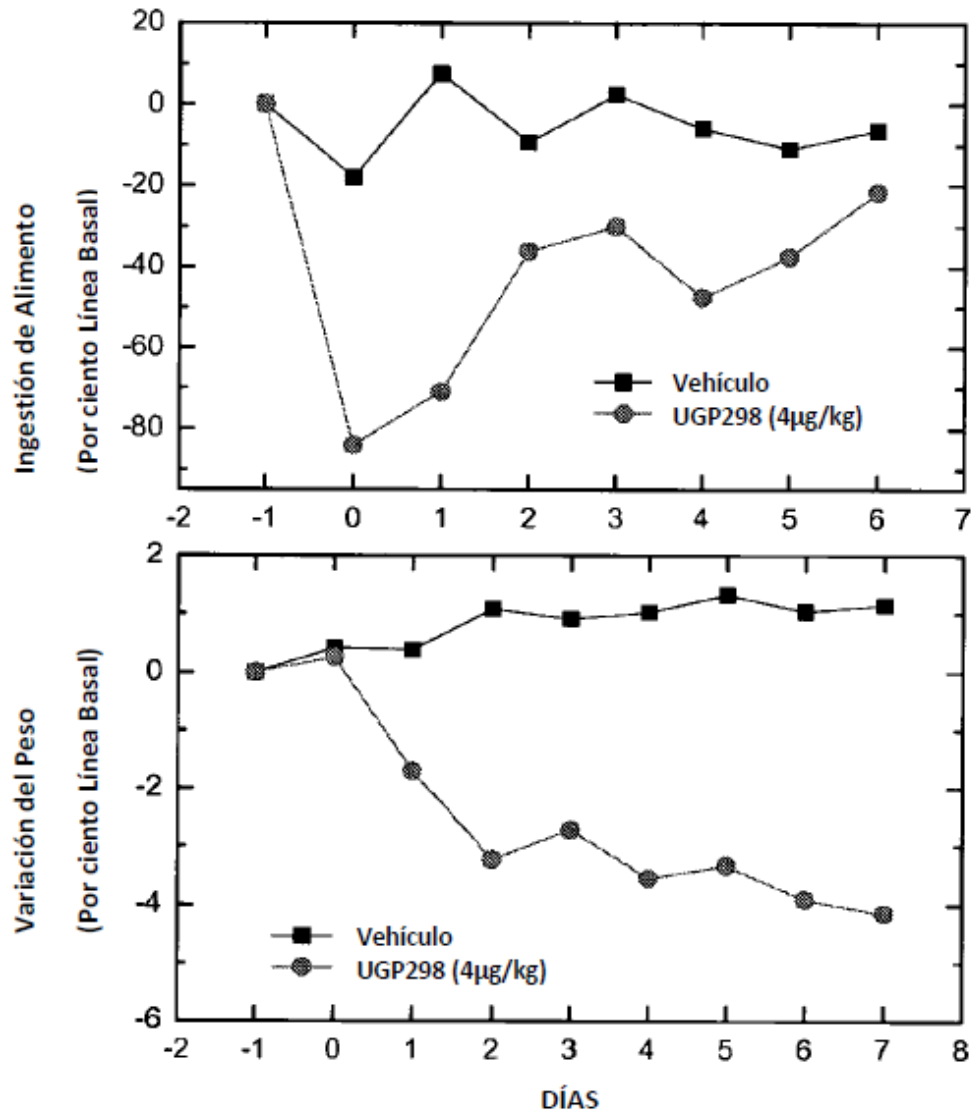
Figuras 12A (superior) y 12B (inferior)



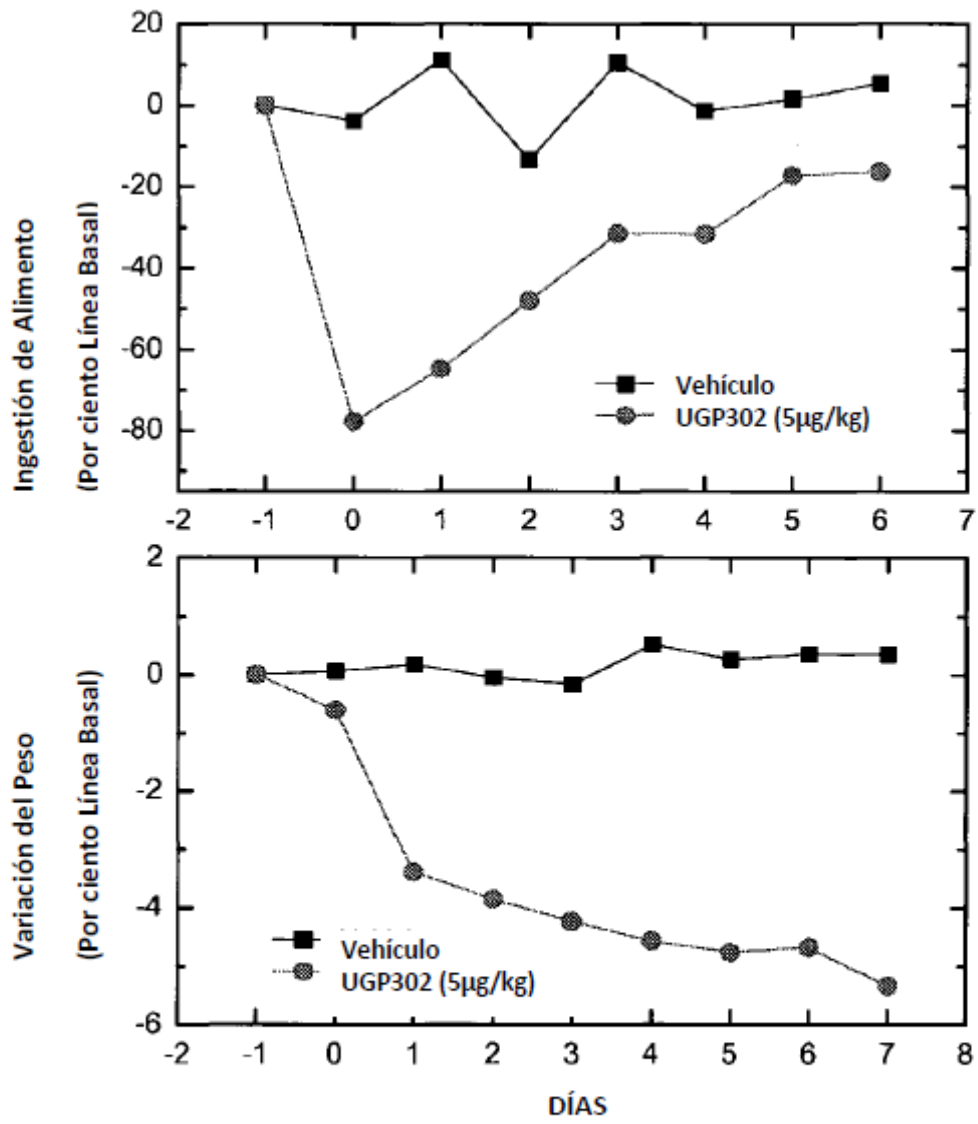
Figuras 13A (superior) y 13B (inferior)



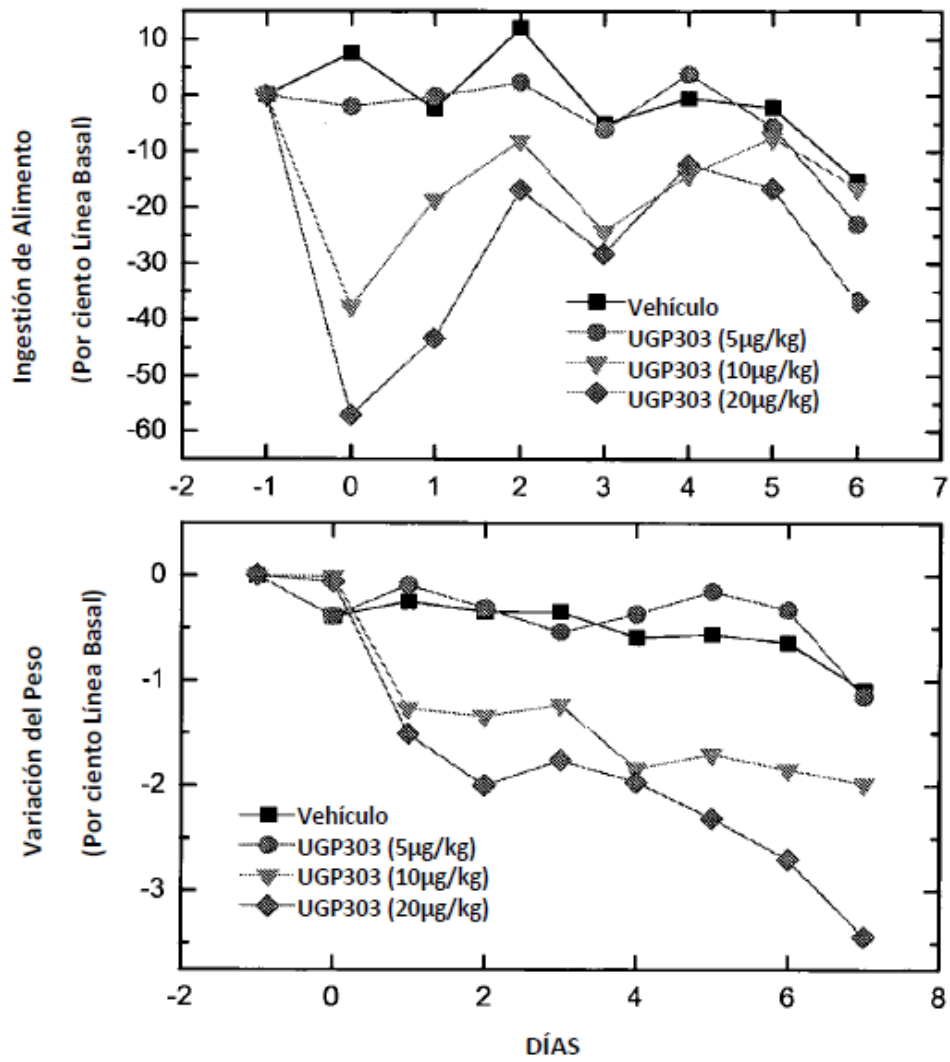
Figuras 14A (superior) y 14B (inferior)



Figuras 15A (superior) y 15B (inferior)



Figuras 16A (superior) y 16B (inferior)



Figuras 17A (superior) y 17B (inferior)

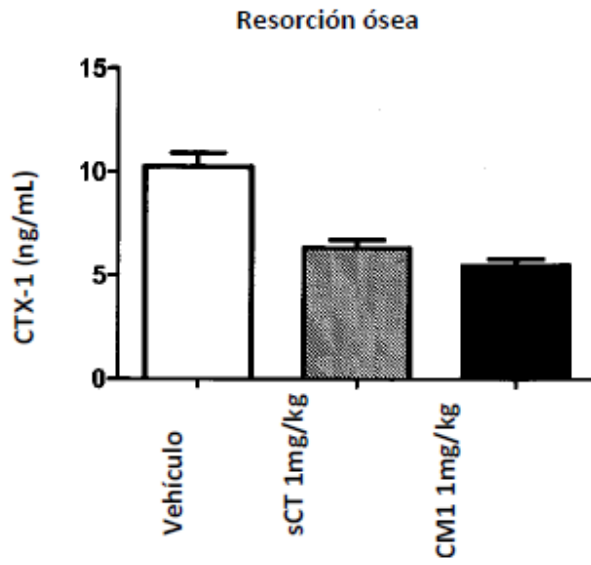


FIGURA 18

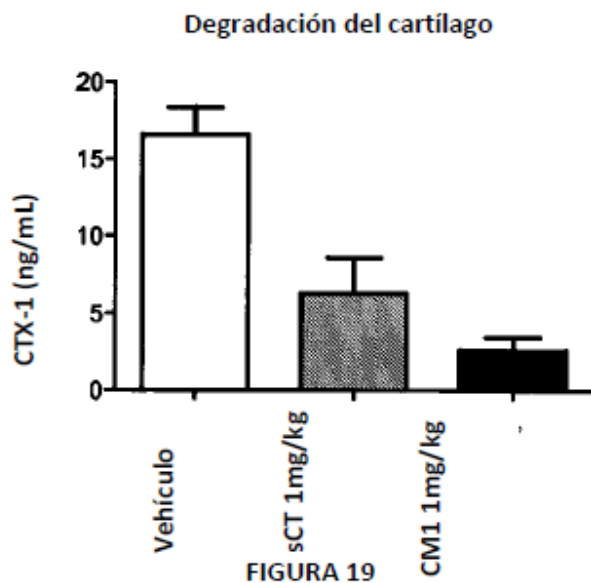


FIGURA 19