

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 617**

51 Int. Cl.:

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 16174260 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 3095484**

54 Título: **Miméticos de calcitonina 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:

25.06.2018

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:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 673 617 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

Miméticos de calcitonina para tratar enfermedades y trastornos

Campo

5 Las realizaciones divulgadas en la presente descripción se relaciona con miméticos de calcitonina, y más particularmente con el uso en el tratamiento de diversas 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.

Antecedentes

10 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.

15 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.

20 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.

25 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.

30 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.

35 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.

Resumen

45 La presente invención se relaciona con un mimético de calcitonina para uso como medicamento, en donde el mimético de calcitonina es:

AcCSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRTDVGANAP-NH ₂	SEQ ID NO: 15
--	---------------

5 Preferiblemente, la presente invención se refiere a un mimético de calcitonina para uso en el tratamiento de diabetes tipo I, diabetes tipo II o síndrome metabólico, obesidad, o para la supresión del apetito, o para mitigar la resistencia a la insulina, o para reducir un nivel de glucosa en suero en ayunas indeseablemente alto, o para reducir un nivel de glucosa en suero pico indeseablemente alto, o para reducir un nivel de insulina en suero pico indeseablemente alto, o para reducir una respuesta indeseablemente grande a una prueba de tolerancia a la glucosa, o para tratar la osteoporosis, o para tratar la osteoartritis, en el que el mimético de calcitonina es :

AcCSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRTDVGANAP-NH ₂
--

SEQ ID NO: 15

Preferiblemente, el mimético de calcitonina es para uso en el tratamiento de diabetes tipo I, diabetes tipo II o síndrome metabólico.

10 Preferiblemente, el mimético de calcitonina es para uso en el tratamiento de la obesidad

Preferiblemente, el mimético de calcitonina es para uso en la supresión del apetito.

Preferiblemente, el mimético de calcitonina es para uso en mitigar la resistencia a la insulina.

15 Preferiblemente, el mimético de calcitonina es para uso en la reducción de un nivel de glucosa en suero en ayunas indeseablemente alto, o para reducir un nivel de glucosa en suero pico indeseablemente alto, o para reducir un nivel de insulina en suero pico indeseablemente alto, o para reducir una respuesta indeseablemente grande a una prueba de tolerancia a la glucosa.

Preferiblemente, el mimético de calcitonina es para uso en el tratamiento de la osteoporosis o la osteoartritis.

20 Otros péptidos de calcitonina divulgados en la presente descripción pero no reivindicados son los que tienen una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:17 y SEQ ID NO:18.

Breve descripción de las figuras

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

25 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;

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;

30 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;

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;

35 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;

40 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;

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;

5 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;

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;

10 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;

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;

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.

20 Descripción detallada

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

Salmón	CSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRNTGSGTP SEQ ID NO:1
Ratón	CGNLSTCMLGTYTQDLNKFHTFPQTSIGVEAP SEQ ID NO:2
Pollo	CASLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRTDVGAGTP SEQ ID NO:3
Anguila	CSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRTDVGAGTP SEQ ID NO:4
Rata	CGNLSTCMLGTYTQDLNKFHTFPQTSIGVGAP SEQ ID NO:5
Caballo	CSNLSTCVLGTYTQDLNKFHTFPQTAIGVGAP SEQ ID NO:6
Canino-1	CSNLSTCVLGTYSKDLNMFHTFSGIGFGAETP SEQ ID NO:7
Canino-2	CSNLSTCVLGTYYTQDLNKFHTFPQTAIGVGAP SEQ ID NO:8
Porcino	CSNLSTCVLSAYWRNLNMFHRFSGMGFGPETP SEQ ID NO:9
Humano	CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP SEQ ID NO:10

25 Las realizaciones de la presente divulgación se refieren a miméticos de calcitonina. Las secuencias de aminoácidos de los miméticos de calcitonina de la presente divulgación se encuentran en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Mimético de calcitonina ("CM")	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
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 realizaciones, 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 (SEQ ID NOs 11, 12 y 15), grupo propionilo (SEQ ID NO: 13), o grupo succinilo (SEQ ID NOs 14 y 17) pueden sustituirse en cisteína-1. En algunas realizaciones, el aminoácido en la última posición ("Xaa_a") (posición 32 en las SEQ ID NOs 11, 13-15 y 17-18 o la posición 33 en la SEQ ID NO: 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 SEQ ID NO:16, en donde se ha añadido una lisina.

"Xaa" en la SEQ ID NO: 18 en la Tabla 1 puede ser cualquier aminoácido de origen natural. En una realización Xaa en la posición 31 se selecciona de uno de treonina o alanina. En una realización Xaa en la posición 32 se selecciona de uno de tirosina o prolina. Así, las SEQ ID NOs 11, 15, 16 y 17, están abarcadas por la SEQ ID NO: 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 de la presente divulgación 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 divulgación 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

Preferiblemente 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.

5 Formas de ácido libre de agentes activos peptídicos de la presente divulgación 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 divulgación 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.

10 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
15 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 divulgación.

20 Los miméticos de calcitonina de la presente divulgación 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 realización, el término "paciente" se refiere a vertebrados, con mayor preferencia, mamíferos que incluyen humanos.

25 En consecuencia, la presente divulgación incluye 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.

30 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 divulgación para reducir el porcentaje de hemoglobina que está glicosilada.

35 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 divulgación, se contempla que los miméticos de calcitonina pueden usarse para tratar la diabetes, donde el control de peso es un aspecto del tratamiento.

40 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 SEQ ID NO:15.

45 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 (Preferiblemente 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
50 estándar bien conocidas por los expertos en la técnica. Para la aplicación parenteral, los ejemplos de preparaciones adecuadas incluyen soluciones, Preferiblemente 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.

55 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.

5 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 Preferiblemente 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.

10 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.

15 Las formas de dosificación adecuadas para uso en la presente divulgación incluyen tabletas, minitables, cápsulas, gránulos, comprimidos, polvos, sólidos efervescentes y formulaciones sólidas masticables. Tales formulaciones pueden incluir gelatina que es Preferiblemente 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 resultante en dicha formulación farmacéutica oral, y en donde la gelatina puede tener un peso molecular medio de 1000 a 15000 Daltons. Tales formulaciones pueden incluir un compuesto portador de protección, tales como 5-CNAC u otros como se divulga en la presente descripción.

20 Aunque se prefieren formulaciones orales, tales como tabletas y cápsulas, composiciones para uso en la presente divulgación 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
25 enzimas digestivas, y membranas gastrointestinales impermeables a agentes activos, hace problemática la administración oral de calcitonina 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 tiroidea 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
30 incapacidad de calcitonina para transportarse fácilmente a través de las paredes intestinales hacia el torrente sanguíneo.

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

Tratamiento de los pacientes

35 El mimético de la calcitonina de la SEQ ID. NO: 15 puede administrarse a una dosis adecuada para mantener los niveles séricos del mimético en pacientes entre 5 y 500 picogramos por mililitro, Preferiblemente 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 mediante la administración de todos los componentes de la presente divulgación como una sola pastilla o cápsula.
40 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 si una o más tabletas o cápsulas (u otras formas de dosificación) se recomiendan en una administración dada.
45

Un mimético de la calcitonina de la SEQ ID. NO: 15 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
50 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.

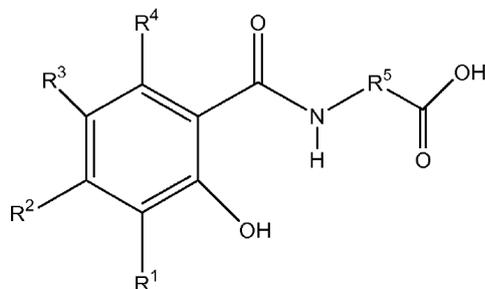
55 En una realización, el mimético de calcitonina de la SEQ ID. NO: 15 se formula Preferiblemente para la administración oral de una manera conocida en la Publicación de Patente de Estados Unidos núm. 2009/0317462.

Una forma de dosificación oral preferida de acuerdo con la presente divulgación se expone en la Tabla 2 a continuación:

Tabla 2

Agente activo o excipiente	Función
Un mimético calcitonina seleccionado de una de las SEQ ID NO:11 - SEQ ID NO:18	Agente activo
Partículas de Ácido Cítrico Revestidas	Inhibidor de proteasas
Lauroilcarnitina	Mejoradores de absorción
Polímero no iónico	Subcapa
Eudragit L30D-55	Recubrimiento entérico

- 5 En una realización, el mimético de calcitonina de la SEQ ID NO: 15 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 realización, una composición farmacéutica de la presente divulgación 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.
- 10
- 15 Además, el documento WO 00/059863 divulga las sales disódicas de la Fórmula I



en donde

R¹, R², R³, y R⁴ son independientemente hidrógeno, -OH, -NR⁶R⁷, halógeno, C₁-C₄ alquilo, o C₁-C₄ alcoxi;

- 20 R⁵ es un alquileo C₂-C₁₆ C sustituido o no sustituido, alquilenilo C₂-C₁₆ C sustituido o no sustituido, (alquil)arileno C₁-C₁₂ sustituido o no sustituido, o alquileo (C₁-C₁₂ aril sustituido o no sustituido); y R⁶ y R⁷ 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 divulgación.

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

- 30 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

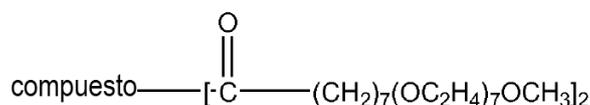
conocida el recubrimiento entérico puede llegar a ser permeable de una manera sensible al pH, por ejemplo, a un pH desde 3 hasta 7. El documento WO2004/091584 describe además métodos de formulación adecuados que usan potenciadores de la absorción de alcohol aromático.

5 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.

10 La administración oral de las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la divulgación 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 realizaciones divulgadas en la presente puede ser cualquier forma conocida, por ejemplo, formas de dosificación
15 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
20 formas sólidas de dosificación oral, todas las cuales pueden prepararse por métodos bien conocidos en la técnica. Las composiciones 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
25 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 Cetoprofina, puede estar presente en las composiciones de la presente divulgación. Las composiciones farmacéuticas sólidas de la presente divulgación pueden prepararse por
30 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
35 tableta o cápsula. Preferiblemente, los ingredientes en las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación 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 en US2003/0069170, por ejemplo.



40 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.

45 El compuesto activo puede formularse mediante la carga en nanocápsulas de quitosano como se divulga 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 divulga 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
50 portadores se discuten en de la Fuente et al y pueden usarse en la presente divulgación.

- 5 Otras estrategias adecuadas para la formulación oral incluyen el uso de un sistema transitorio potenciador de la permeabilidad (TPE) como se describe en WO2005/094785 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.
- 10 Además se incluye el uso de glutatión o compuestos que contienen numerosos grupos tiol como se describe en US2008/0200563 para inhibir la acción de las bombas de eflujo en la membrana mucosa. Ejemplos prácticos de tales técnicas se describen además en Caliceti, P. Salmaso, S., Walker, G. y Bernkop-Schnürch, 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-Schnürch, 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-Schnürch, A., Pinter, Y., Guggi, D., Kahlbacher, H., Schöffmann, 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.
- 15 El compuesto activo puede formularse en microesferas sin costura como se describe en el documento WO2004/084870 donde el ingrediente farmacéutico activo se solubiliza como una emulsión, microemulsión o suspensión, formulado en miniesferas; y de forma variable revestido ya sea por tecnologías de revestimiento convencionales o novedosas. El resultado es un medicamento encapsulado en forma de "presolubilizada", que cuando se administra por vía oral proporciona para el instante predeterminado o de liberación sostenida del medicamento activo a lugares específicos y en tasas específicas a lo largo del tracto gastrointestinal. En esencia, la presolubilización del medicamento mejora la previsibilidad de su perfil cinético mientras simultáneamente mejora la permeabilidad y estabilidad del medicamento.
- 20 Uno puede emplear nanocápsulas revestidas con quitosano como se describe en US2009/0074824. La molécula activa administrada con esta tecnología se protege dentro de las nanocápsulas, ya que son estables frente a la acción del fluido gástrico. Además, las propiedades mucoadhesivas del sistema aumenta el tiempo de adhesión a las paredes del intestino (se ha comprobado que hay un retraso en el tránsito gastrointestinal de estos sistemas) lo que facilita una absorción más efectiva de la molécula activa.
- 25 Los métodos desarrollados por TSRI Inc. pueden usarse. Estos incluyen la Tecnología de solubilización hidrofílica (HST) en la que la gelatina, un extracto de colágeno de origen natural que porta tanto cargas positivas como negativas, reviste las partículas del ingrediente activo contenido en micelas de lecitina y evita su agregación o aglutinación. Esto resulta en una humectabilidad mejorada de partículas de medicamento hidrófobo a través de interacciones polares. Además, la lecitina anfifílica reduce la tensión superficial entre el fluido de disolución y la superficie de la partícula.
- 30 El ingrediente activo puede formularse con cucurbiturilos como excipientes.
- 35 Alternativamente, puede emplearse la tecnología GIPET de Merrion Pharmaceuticals para producir tabletas con recubrimiento entérico que contienen el ingrediente activo con un potenciador de la absorción que puede ser un ácido graso de cadena media o un derivado de ácido graso de cadena media como se describe en US2007/0238707 o un péptido de translocación de membrana como se describe en US7268214.
- 40 Uno puede emplear la tecnología GIRESTM que consiste en una forma de dosificación de liberación controlada dentro de una bolsa inflable, que se coloca en una cápsula de medicamento para la administración oral. Tras la disolución de la cápsula, un sistema generador de gases infla la bolsa en el estómago. En los ensayos clínicos la bolsa se ha demostrado que se retiene en el estómago durante 16-24 horas.
- 45 Alternativamente, el activo se puede conjugar con un modificador de protección que permita resistir la degradación enzimática en el estómago y facilitar su absorción. El activo puede conjugarse covalentemente con un derivado metoxi polietilenglicol de glicolípidos monodispersos, de cadena corta que se cristaliza y se liofiliza en el ingrediente farmacéutico activo en seco después de la purificación. Tales métodos se describen en la patente US5438040 and at www.biocon.com.
- 50 Uno puede emplear además una vesícula dirigida al hígado (HDV) para la entrega activa. Una HDV puede consistir en liposomas (≤ 150 nm de diámetro) que encapsulan el activo, que además contienen una molécula orientada a los hepatocitos en su bicapa lipídica. La molécula de orientación dirige la entrega de los activos encapsulados para las células del hígado y por lo tanto relativamente menudas cantidades del activo se requieren para el efecto. Esta tecnología se describe en US2009/0087479 y además en www.diasome.com.
- 55 El activo puede incorporarse en una composición que contiene adicionalmente un medio hidrófilo sustancialmente no acuoso que comprende un alcohol y un codisolvente, en asociación con un glicérido parcial de cadena media, opcionalmente en mezcla con unas especies de PEG de cadena larga como se describe en US2002/0115592 en relación 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 polímero hidrófobo como se describe en la patente de Estados Unidos núm. 7189414.

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

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, Preferiblemente al menos 6 meses, Preferiblemente 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 divulgación y la administración por separado de uno o más de otros agentes terapéuticos. Alternativamente, la composición de acuerdo con la presente divulgación puede incorporar uno o más de otros agentes terapéuticos para la administración combinada.

- 15 Las terapias de combinación de acuerdo con la presente divulgación 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.
- 20
- 25

- 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]. De acuerdo con esto, la presente divulgación proporciona un compuesto de la fórmula Ac-CSNLSTCVLG KLSQELHKLQ TYPRTDVGAN AP-NH₂ (SEQ ID NO: 15), que se denominará en este documento "mimético de calcitonina 1" o "UGP302".
- 30
- 35

- De acuerdo con lo anterior, la presente divulgación 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 de glucosa en suero pico indeseablemente alto, o para reducir un nivel de insulina en suero pico indeseablemente alto, 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.
- 40

Preferiblemente, dicha formulación se formula para administración oral al tracto digestivo.

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

- 45 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.

Ejemplos

- 50 Ejemplo 1

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

5 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

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):

15 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/ 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 - - todo disuelto en milliQ H2O.

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

20 Administración del medicamento por sonda oral (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.

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

D-Glucosa:

25 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

línea base	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
------------	----------	----------	----------	----------

ES 2 673 617 T3

línea base	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
FPG	BW	BW	BW	BW
BW	Alimento	Alimento	Alimento	Alimento
B		FPG		FPG
		B		B
		OGTT		

FPG Glucosa en plasma en ayunas

BW peso corporal

B Sangre

5 OGTT Prueba de tolerancia a la glucosa oral

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

-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						

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.

- 10 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
- 15 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

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 \pm error estándar de la media (SEM).

3. Resultados

Características de línea base

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;

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 \pm SEM.

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 \pm 24,5	841,8 \pm 22,9***
Glucosa en plasma en ayunas (mM)	6,5 \pm 0,1	6,8 \pm 0,2
AUC en glucosa en sangre en OGTT (mM*min)	625,1 \pm 20,5	914,3 \pm 44,6***

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

Peso corporal e ingestión de alimentos

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 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 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.

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).

5 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.

Tolerancia a la glucosa

10 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.

15 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.

Glicemia en ayunas

20 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

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

Animales

30 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.

Compuestos

40 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-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/mimético de calcitonina 1:

ES 2 673 617 T3

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.

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

5 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

10 Condiciones Experimentales

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

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

15 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).

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):

-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 $3000 \times g$ (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).

10 Grupos experimentales

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
sCT oral	5-CNAC + sCT	150 mg/kg + 0,5 mg/kg	n = 8
Mimético de calcitonina oral 1	5-CNAC + mimético de calcitonina 1	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
sCT oral	5-CNAC + sCT	150 mg/kg + 1 mg/kg	n = 8
Mimético de calcitonina oral 1	5-CNAC + mimético de calcitonina 1	150 mg/kg	1 n = 8
Vehículo oral	5-CNAC	150 mg/kg	(4 grupos de n = 8) diseño con superposición de X con 2 mg/kg
sCT oral	5-CNAC + sCT	150 mg/kg + 2 mg/kg	n = 8
Mimético de calcitonina oral 1	5-CNAC + mimético de calcitonina 1	150 mg/kg	2 n = 8

Estadísticas

- 15 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 \pm error estándar de la media (SEM).

3. Resultados

Características de línea base

5 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).

10 Tabla 2 Parámetros metabólicos en ratas DIO y DR

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

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

Peso corporal e ingestión de alimentos

15 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 \pm 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;

20 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.

30 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 \pm 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

5 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.

15 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

20

(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

ES 2 673 617 T3

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:

- 5 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:

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

- 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):

-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

- 15 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 × 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).
- 20

Grupos experimentales

Intervención	Compuesto	Conc.	Número
--------------	-----------	-------	--------

ES 2 673 617 T3

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
sCT oral	5-CNAC + sCT	150 mg/kg +	n = 8
		0,5 mg/kg	
UGP284 Oral	5-CNAC + UGP284	150 mg/kg	n = 8
		0,5 mg/kg	
UGP298 oral	5-CNAC + UGP298	150 mg/kg	n = 8
		0,5 mg/kg	
UGP302 oral	5-CNAC + UGP302	150 mg/kg	n = 8
		0,5 mg/kg	
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 +	n = 8
		1 mg/kg	
UGP284 Oral	5-CNAC + UGP284	150 mg/kg	n = 8
		1 mg/kg	
UGP298 oral	5-CNAC + UGP298	150 mg/kg	n = 8
		1 mg/kg	
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
sCT oral	5-CNAC + sCT	150 mg/kg +	n = 8
		2 mg/kg	
UGP284 Oral	5-CNAC + UGP284	150 mg/kg	n = 8
		2 mg/kg	
UGP298 oral	5-CNAC + UGP298	150 mg/kg	n = 8
		2 mg/kg	

Intervención	Compuesto	Conc.	Número
UGP302 oral	5-CNAC + UGP302	150 mg/kg	n = 8
		2 mg/kg	

Estadísticas

5 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

Características de línea base

10 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).

15 Tabla 3. 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

20 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

30 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.

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™.

Grupos experimentales

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

ES 2 673 617 T3

Intervención	Compuesto	Conc.	Número
Mimético de calcitonina oral de SEQ ID NO:18	5-CNAC + SEQ ID NO:15	150 mg/kg 1 mg/kg	n = 8

Los resultados se ven en la Figura 18 y Figura 19, donde un mimético de calcitonina de SEQ ID NO: 18 muestra un efecto más fuerte en la reducción tanto de la resorción ósea como la degradación del cartílago que hace sCT.

- 5 Se apreciará que varias de las características y funciones divulgadas anteriormente y otras, o sus alternativas, pueden combinarse deseablemente en muchos otros sistemas o aplicaciones diferentes. Diversas alternativas, modificaciones, variaciones o mejoras presentes o no previstas en el mismo pueden ser realizadas posteriormente por los expertos en la técnica, que también pretenden estar abarcadas por las siguientes reivindicaciones.

Lista de secuencias

<110> NU-Co Desarrollado por GMBH

Mehta, Nozer M

Sturmer, Amy M.

5 Stern, William

Karsdal, Morten Asser

Henriksen, Kim

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

<130> 133302-465034/PCT

10 <140> Aún no asignado

<141> 2012-11-02

<150> 61/554,771

<151> 2011-11-02

<150> 61/578,620

15 <151> 2011-12-21

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 32

20 <212> PRT

<213> salmón

<400> 1

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 Asn Thr Gly Ser Gly Thr Pro
20 25 30

<210> 2

25 <211> 32

<212> PRT

ES 2 673 617 T3

<213> Ratón

<400> 2

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

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

<210> 3

5 <211> 32

<212> PRT

<213> Pollo

<400> 3

Cys Ala Ser 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 Gly Thr Pro
20 25 30

10 <210> 4

<211> 32

<212> PRT

<213> Anguila

<400> 4

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 Gly Thr Pro
20 25 30

<210> 5

<211> 32

<212> PRT

<213> Rata

20 <400> 5

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

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

ES 2 673 617 T3

<210> 6

<211> 32

<212> PRT

<213> Caballo

5 <400> 6

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

<210> 7

<211> 32

<212> PRT

10 <213> Canino

<400> 7

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

<210> 8

15 <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

ES 2 673 617 T3

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

<210> 10

<211> 32

<212> PRT

5 <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

<210> 11

<211> 32

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<220>

15 <221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> ACETILACIÓN

<220>

<221> MOD_RES

20 <222> (32)..(32)

<223> AMIDACIÓN

<400> 11

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 Thr Tyr
20 25 30

<210> 12

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Construcción Sintética

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

10 <223> ACETILACIÓN

<220>

<221> MOD_RES

<222> (32)..(32)

<223> ACETILACIÓN

15 <400> 12

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

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

<210> 13

<211> 32

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<220>

<221> MOD_RES

25 <222> (1)..(1)

<223> propionilo

<220>

<221> MOD_RES

<222> (32)..(32)

<223> AMIDACIÓN

5 <400> 13

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 Asn Thr Gly Ser Gly Thr Pro
20 25 30

<210> 14

<211> 32

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

15 <222> (1)..(1)

<223> Succinilo

<220>

<221> MOD_RES

<222> (32)..(32)

20 <223> AMIDACIÓN

<400> 14

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 Asn Thr Gly Ser Gly Thr Pro
20 25 30

<210> 15

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5 <220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> ACETILACIÓN

<220>

10 <221> MOD_RES

<222> (32)..(32)

<223> AMIDACIÓN

<400> 15

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		

15 <210> 16

<211> 33

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Construcción Sintética

<220>

<221> MOD_RES

<222> (33)..(33)

25 <223> AMIDACIÓN

<400> 16

ES 2 673 617 T3

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

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

Tyr

<210> 17

<211> 32

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<220>

<221> MOD_RES

10 <222> (1)..(1)

<223> Succinilo

<220>

<221> MOD_RES

<222> (32)..(32)

15 <223> AMIDACIÓN

<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

<210> 18

<211> 32

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> La cisteína se puede modificar con un grupo acetilo, grupo propionilo o grupo succinilo.

5 <220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (31)..(31)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

10 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (32)..(32)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> MOD_RES

15 <222> (32)..(32)

<223> Opcionalmente amidado

<400> 18

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 Xaa Xaa
 20 25 30

REIVINDICACIONES

1. Un mimético de calcitonina para uso como medicamento, en el que el mimético de calcitonina es:

AcCSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRTDVGANAP-NH ₂	SEQ ID NO: 15
--	---------------

5 2. Un mimético de calcitonina para uso en el tratamiento de diabetes tipo I, diabetes tipo II o síndrome metabólico, obesidad, o para la supresión del apetito, o para mitigar la resistencia a la insulina, o para reducir un nivel de glucosa en suero en ayunas indeseablemente alto, o para reducir un nivel de glucosa en suero pico indeseablemente alto, o para reducir un nivel de insulina en suero pico indeseablemente alto, o para reducir una respuesta indeseablemente grande a una prueba de tolerancia a la glucosa, o para tratar osteoporosis, o para tratar la osteoartritis, en el que el mimético de calcitonina es:

AcCSNLSTCVLGKLSQELHKLQTYPRTDVGANAP-NH ₂	SEQ ID NO: 15
--	---------------

- 10 3. Un mimético de calcitonina para uso de acuerdo con la reivindicación 2,
en el que el mimético de calcitonina es para uso en el tratamiento de diabetes tipo I, diabetes tipo II o un síndrome metabólico.
4. Un mimético de calcitonina para uso de acuerdo con la reivindicación 2,
15 en el que el mimético de calcitonina es para uso en el tratamiento de la obesidad
5. Un mimético de calcitonina para uso de acuerdo con la reivindicación 2,
en el que el mimético de calcitonina es para uso en la supresión del apetito.
6. Un mimético de calcitonina para uso de acuerdo con la reivindicación 2,
en el que el mimético de calcitonina es para uso en mitigar la resistencia a la insulina.
- 20 7. Un mimético de calcitonina para uso de acuerdo con la reivindicación 2,
en el que el mimético de calcitonina es para uso en la reducción de un nivel de glucosa en suero en ayunas indeseablemente alto, o para reducir un nivel de glucosa en suero pico indeseablemente alto, o para reducir un nivel de insulina en suero pico indeseablemente alto, o para reducir una respuesta indeseablemente grande a una prueba de tolerancia a la glucosa.
- 25 8. Un mimético de calcitonina para uso de acuerdo con la reivindicación 2,
en el que el mimético de calcitonina es para uso en el tratamiento de la osteoporosis o la osteoartritis.

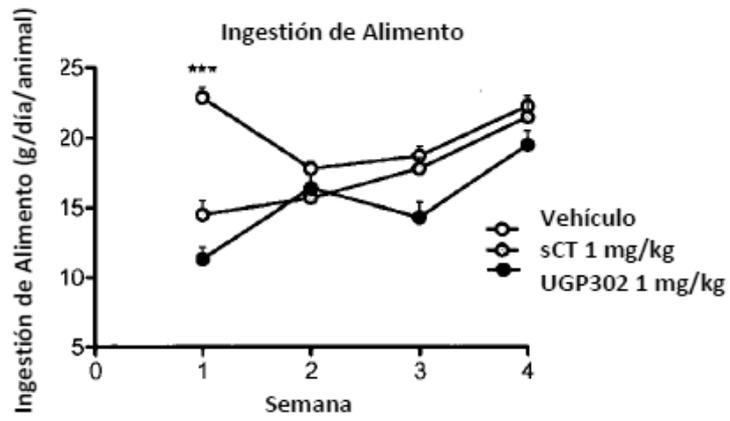


FIGURA 1A

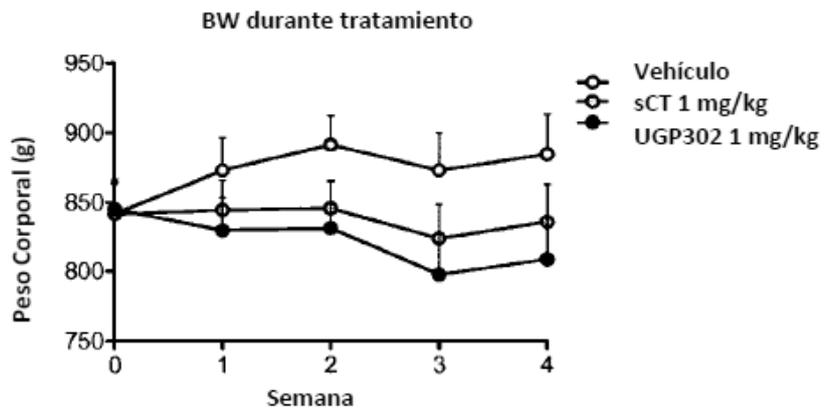
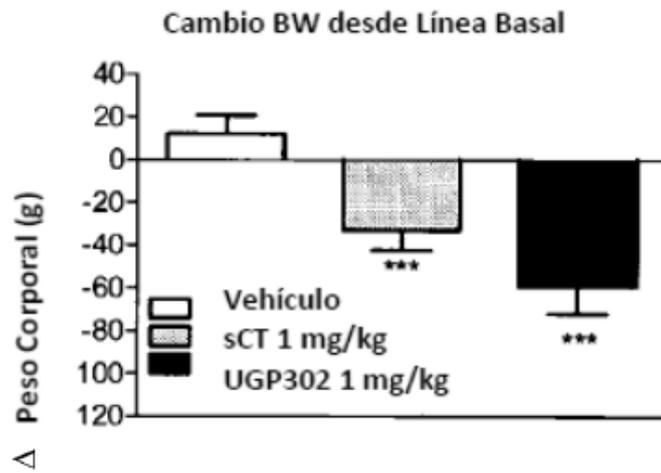
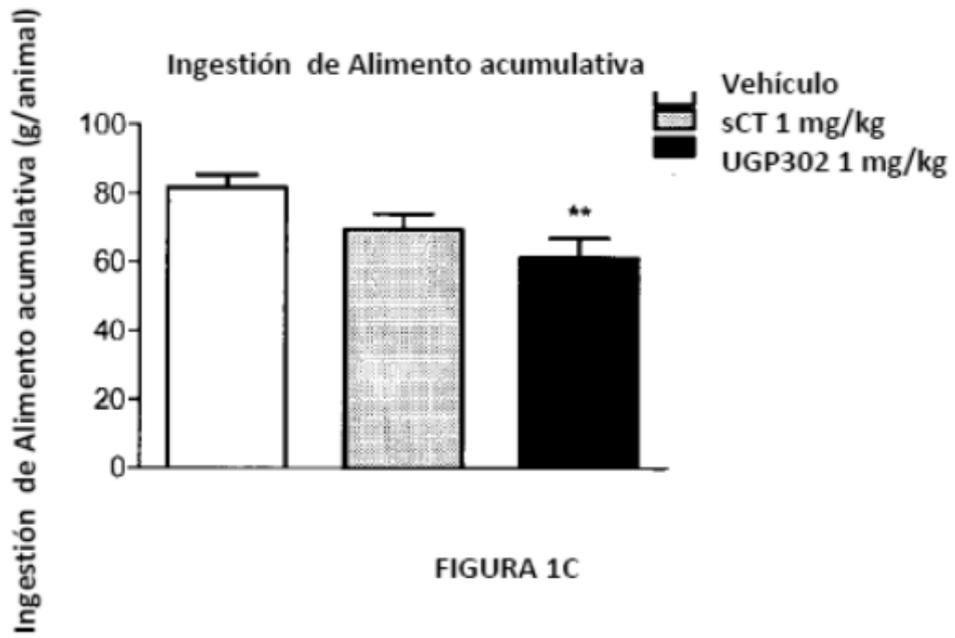


FIGURA 1B



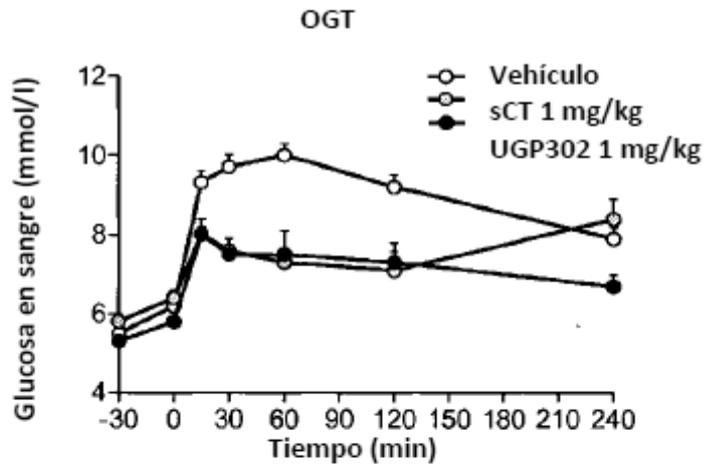


FIGURA 2A

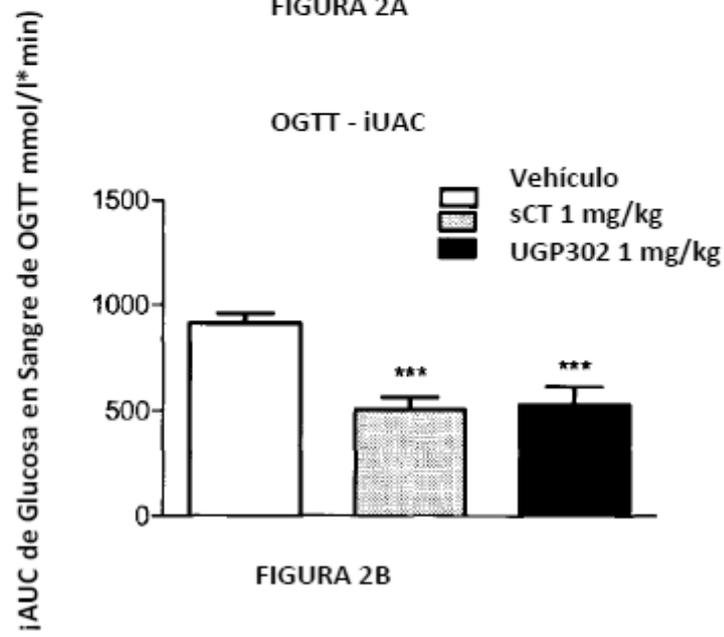


FIGURA 2B

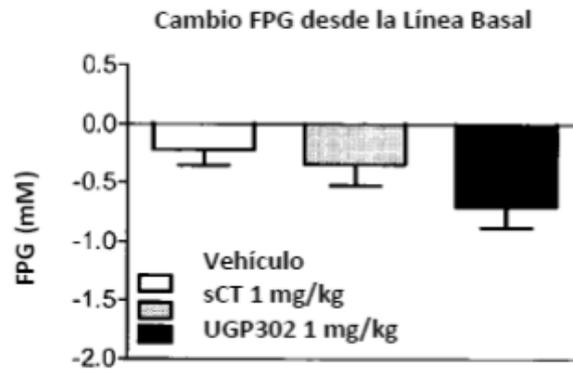


FIGURA 3

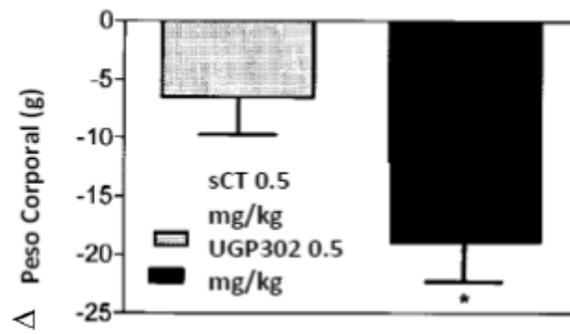


FIGURA 4A

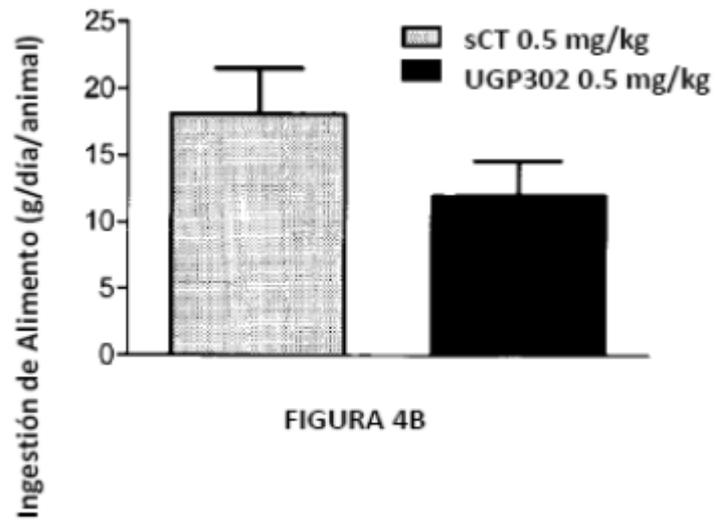


FIGURA 4B

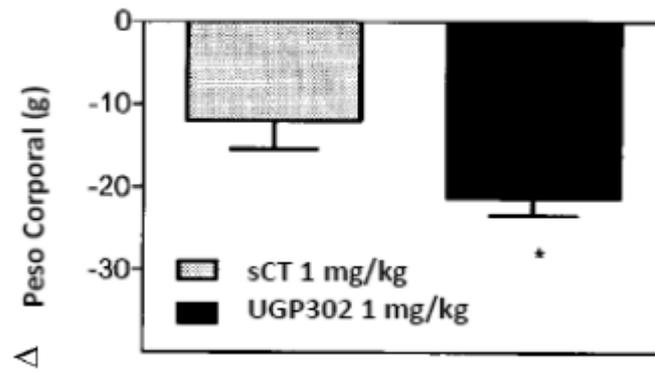


FIGURA 5A

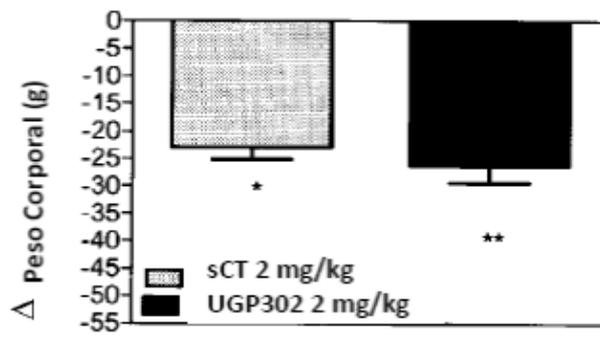
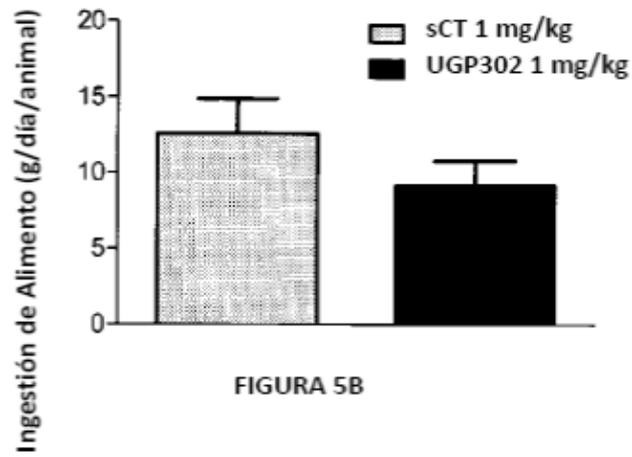


FIGURA 6A

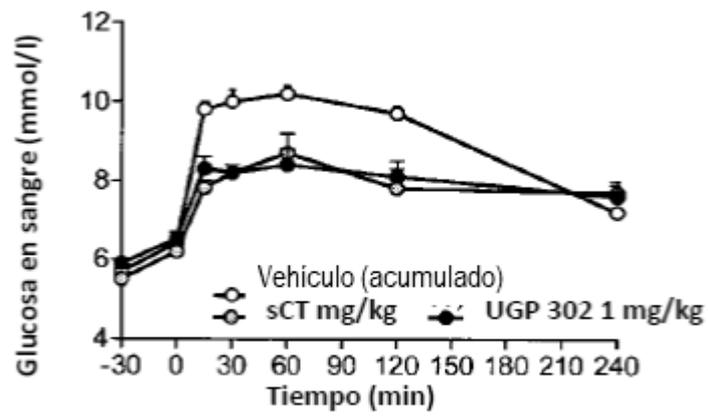
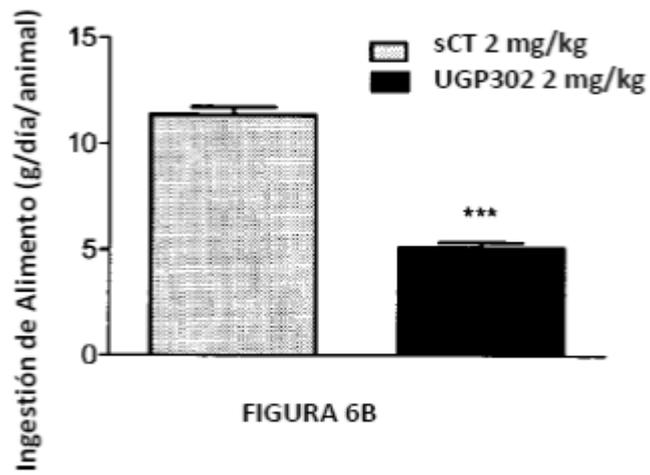
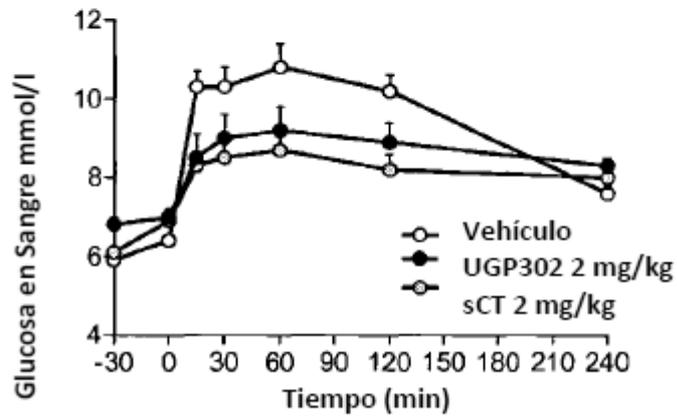
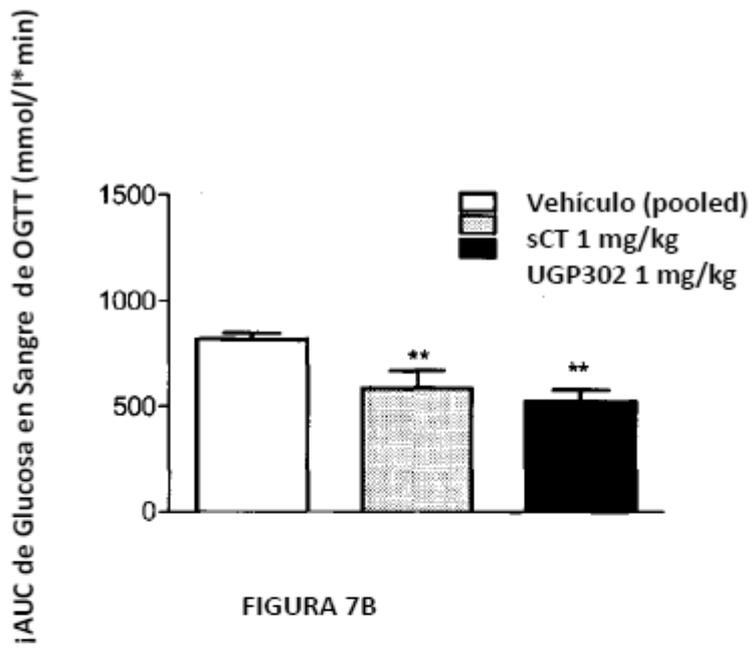
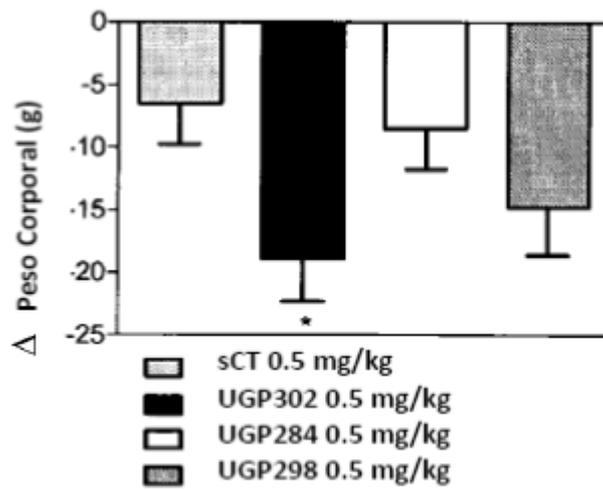
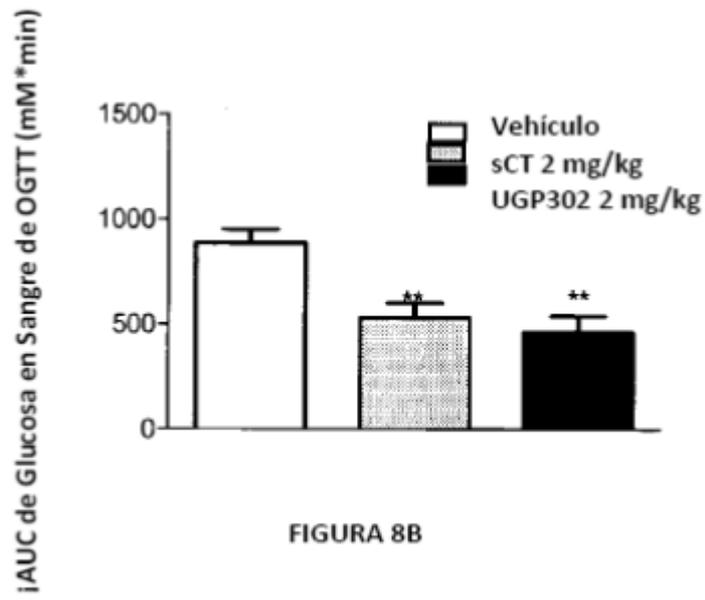
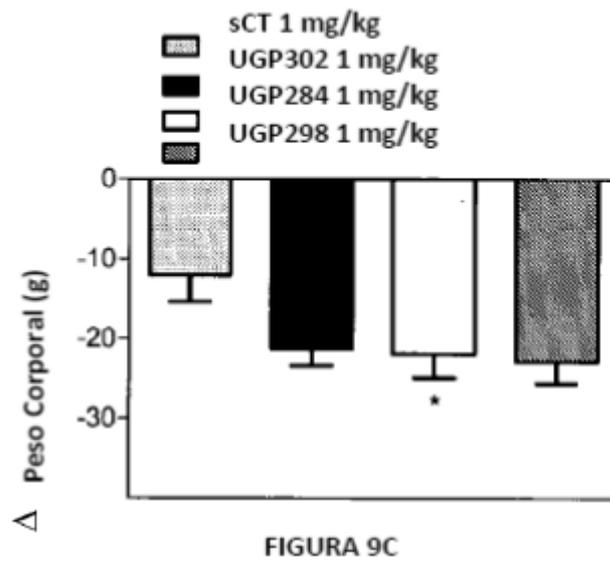
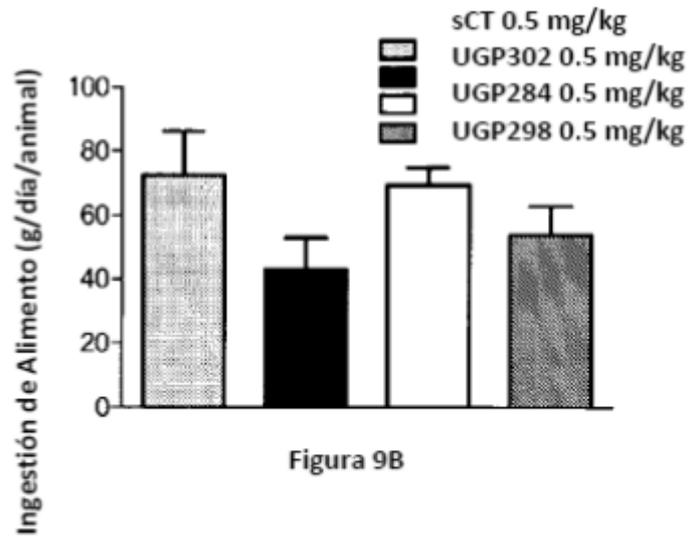


FIGURA 7A







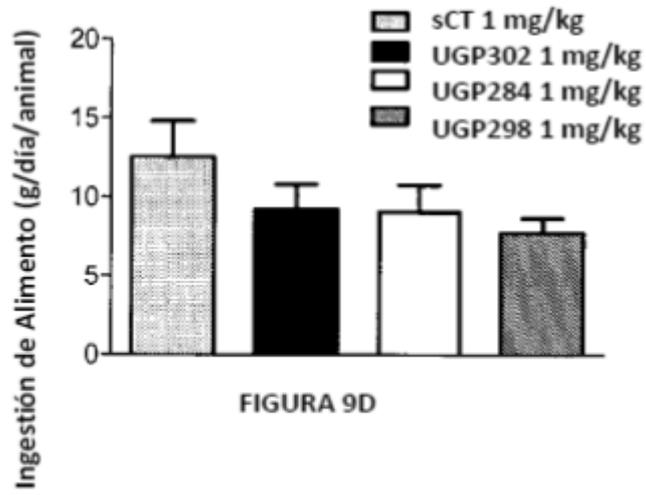


FIGURA 9D

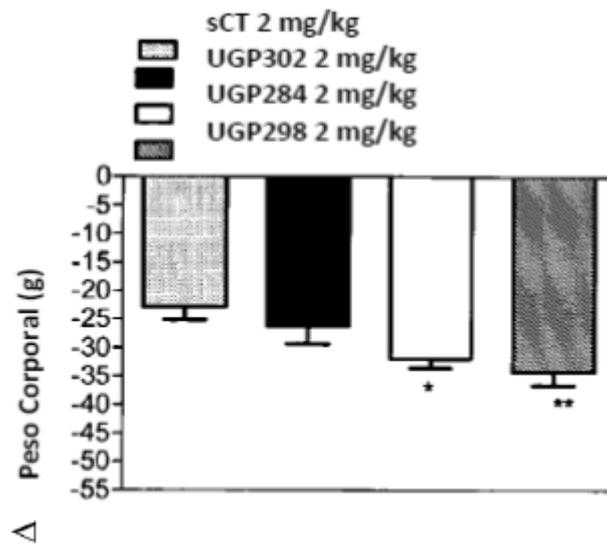
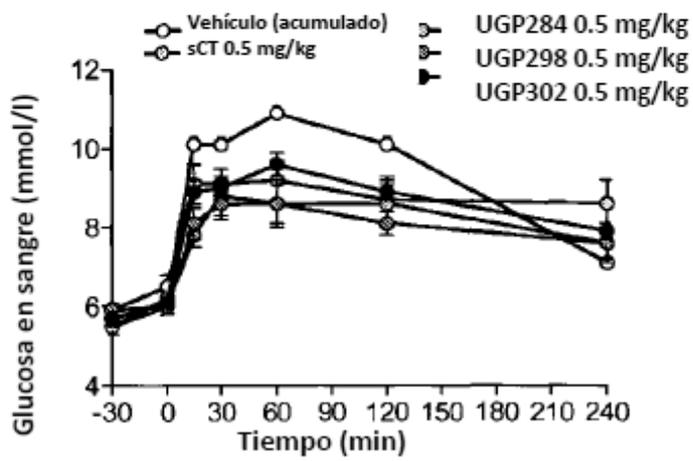
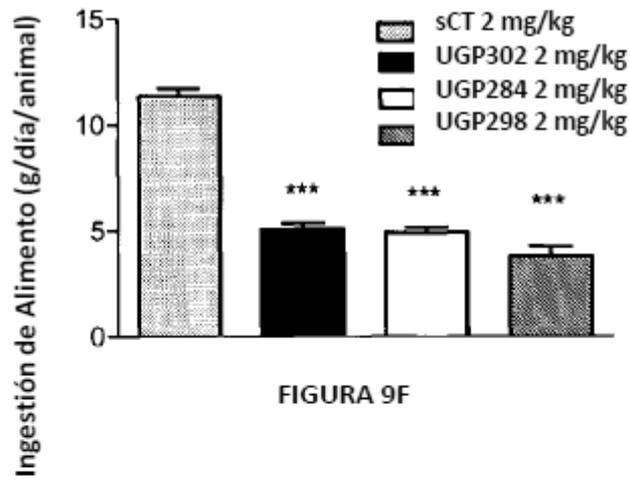
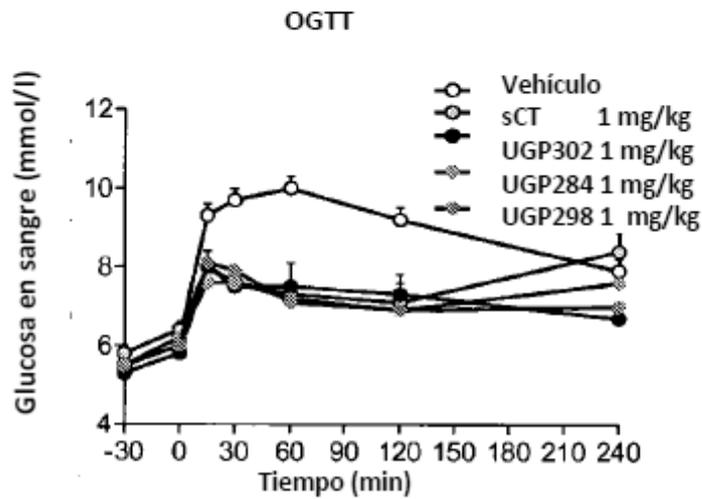
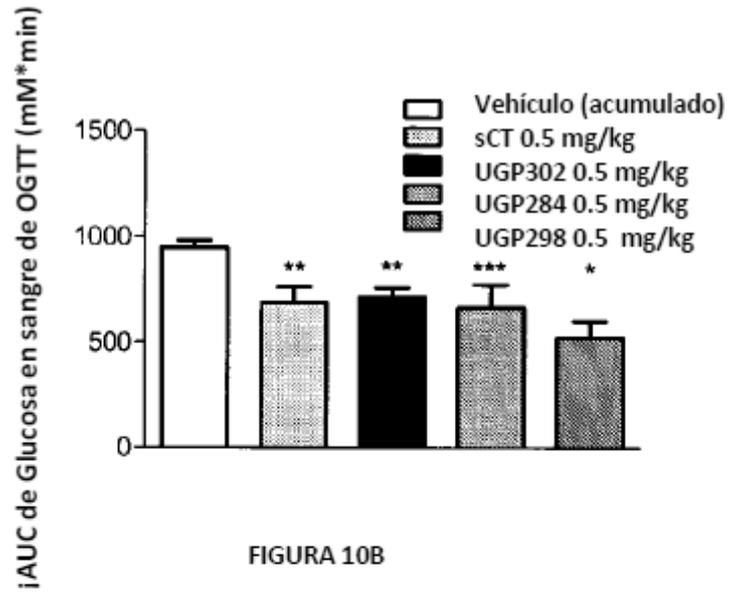
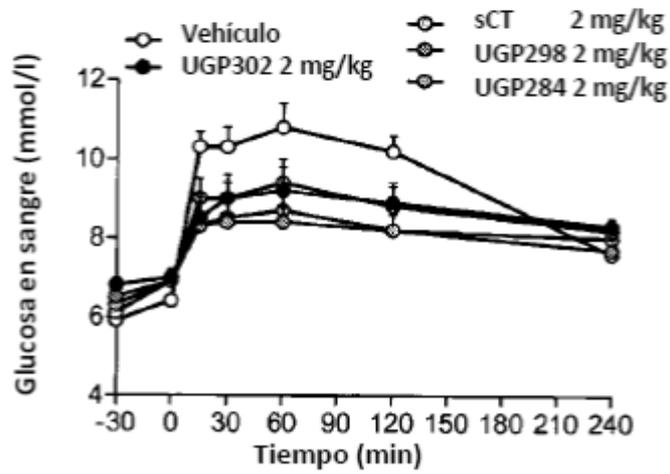
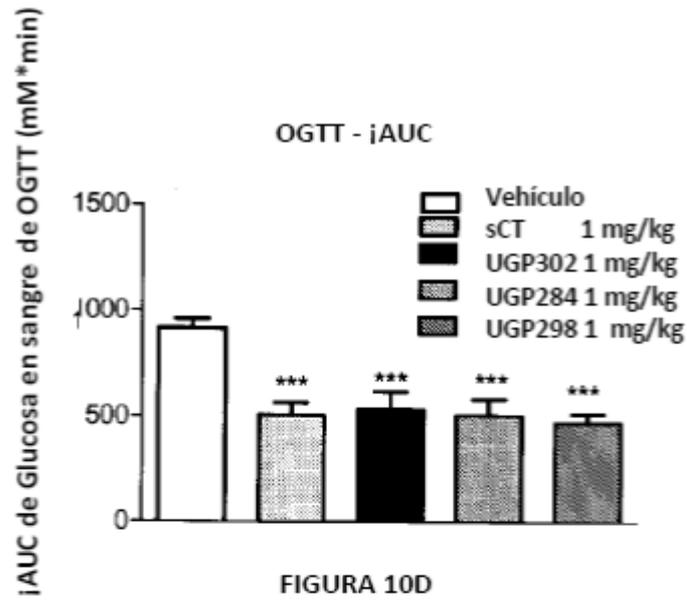
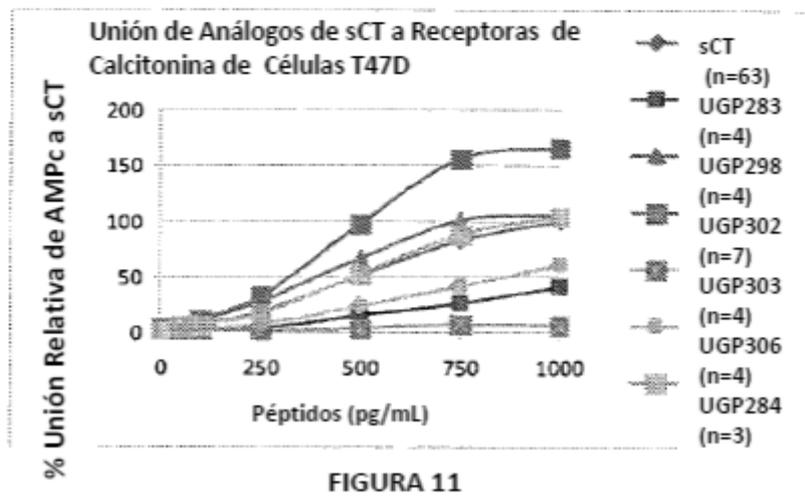
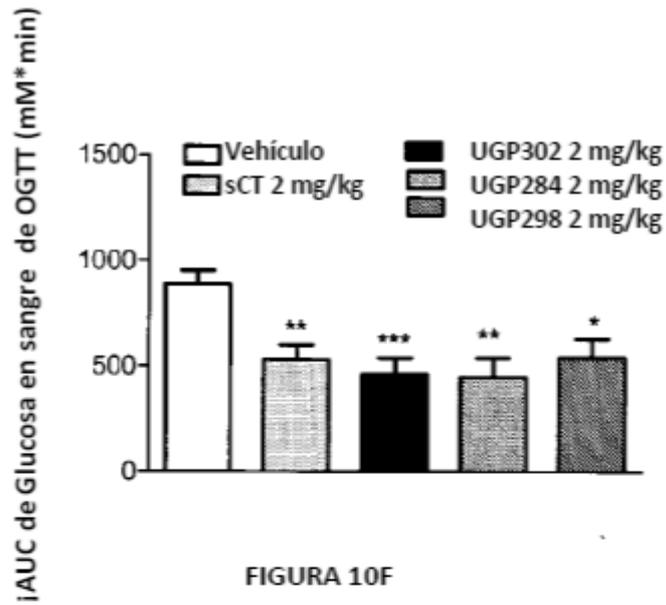


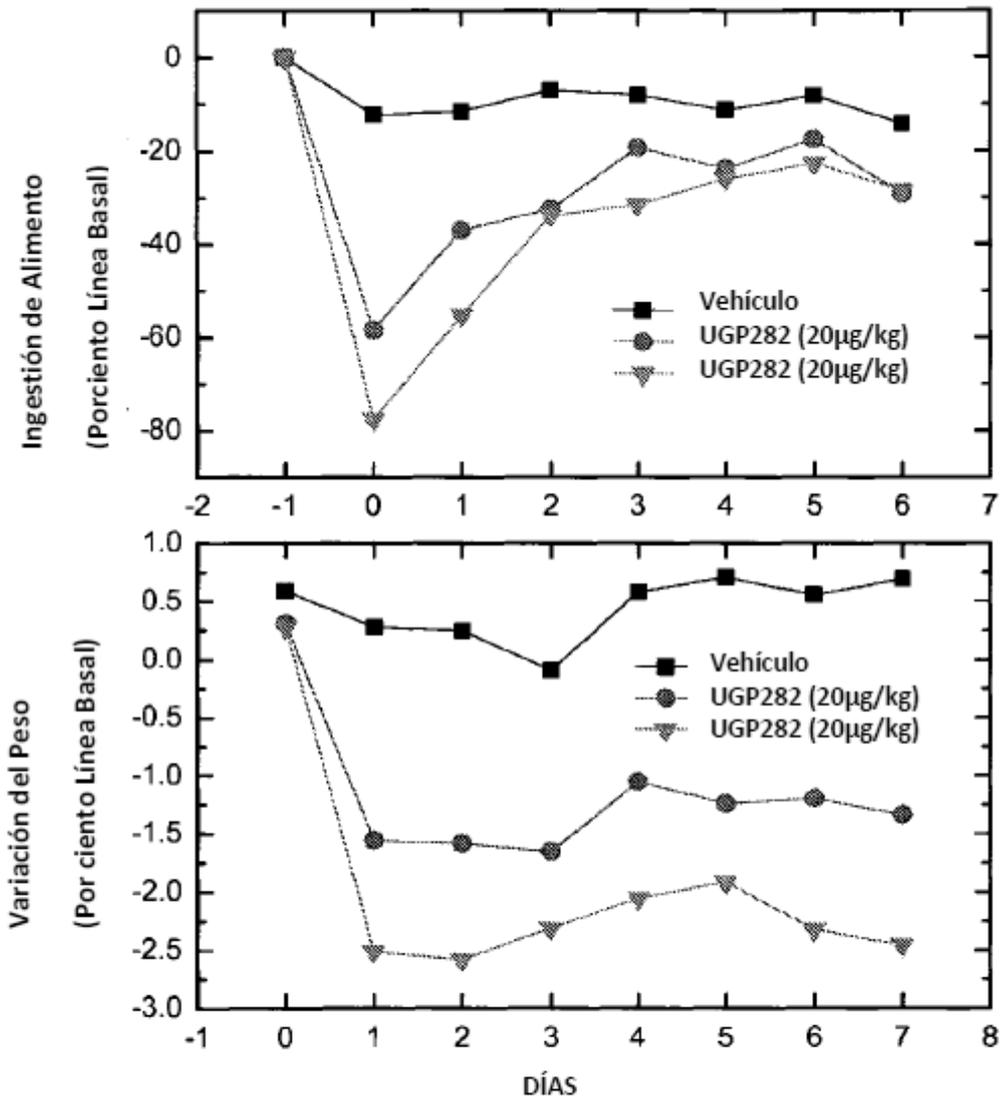
FIGURA 9E



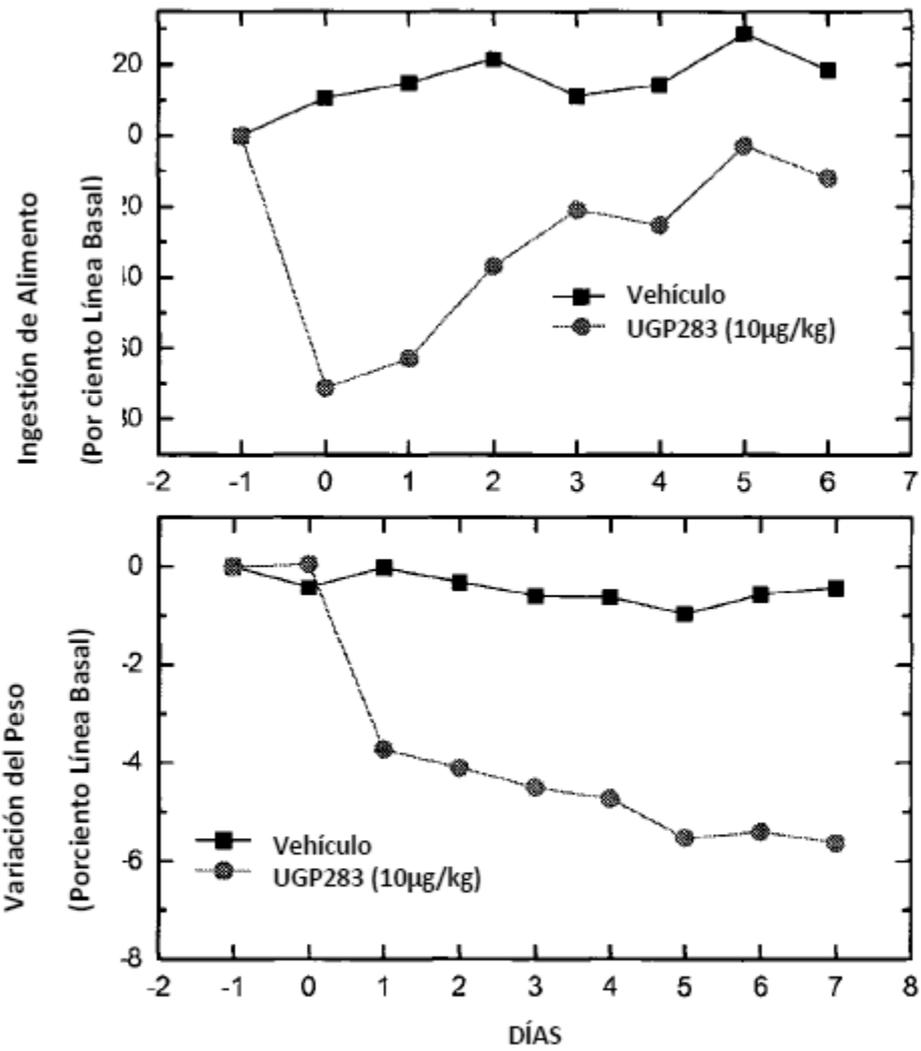




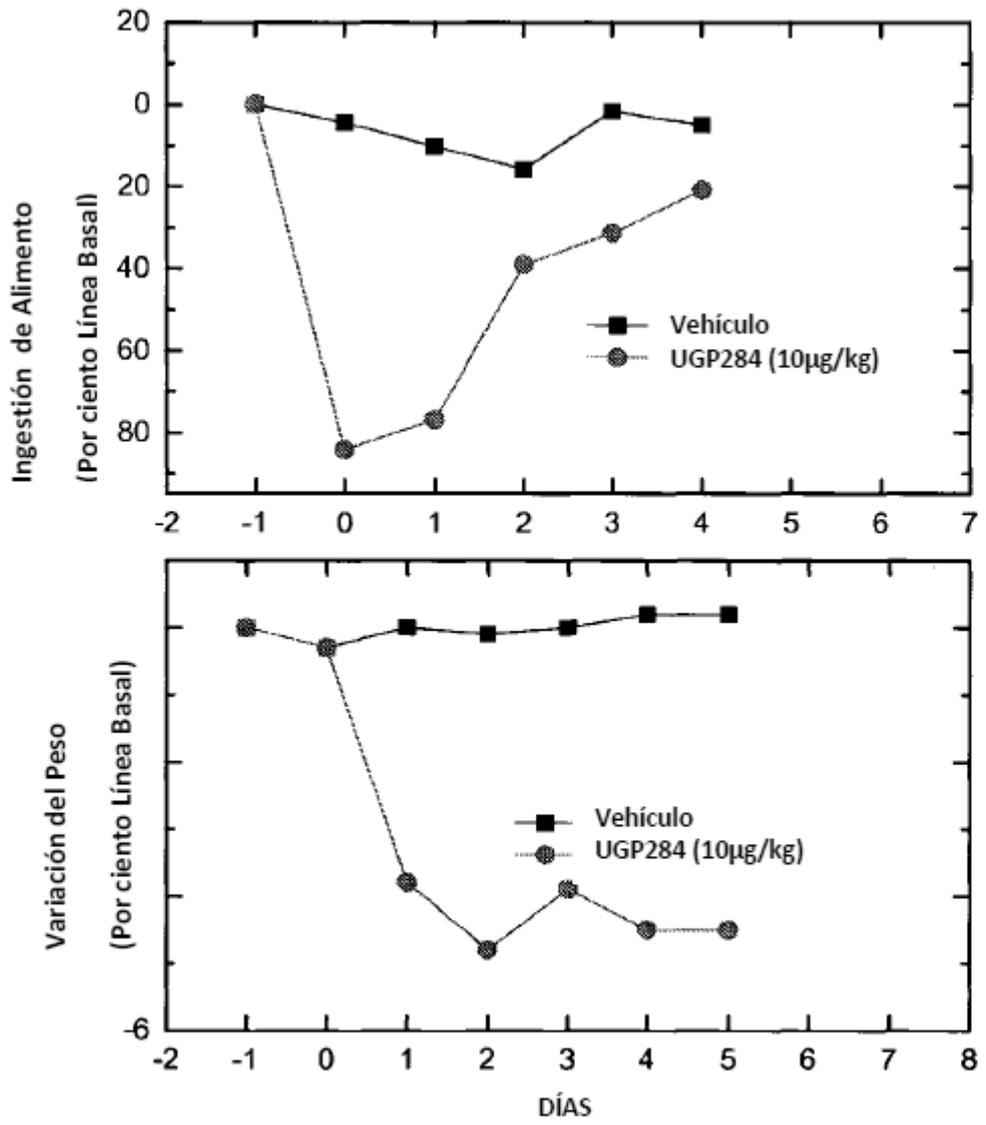




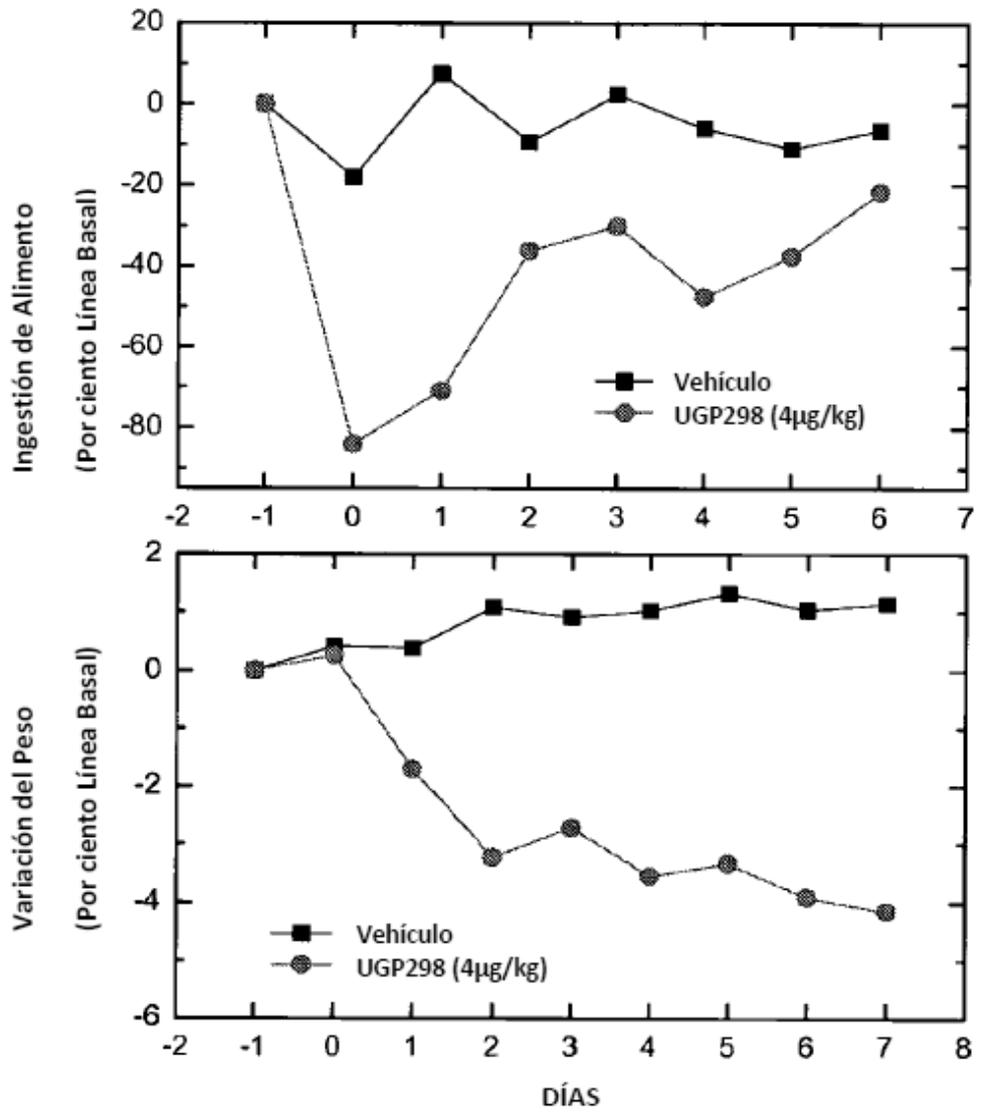
Figuras 12A (superior) y 12B (inferior)



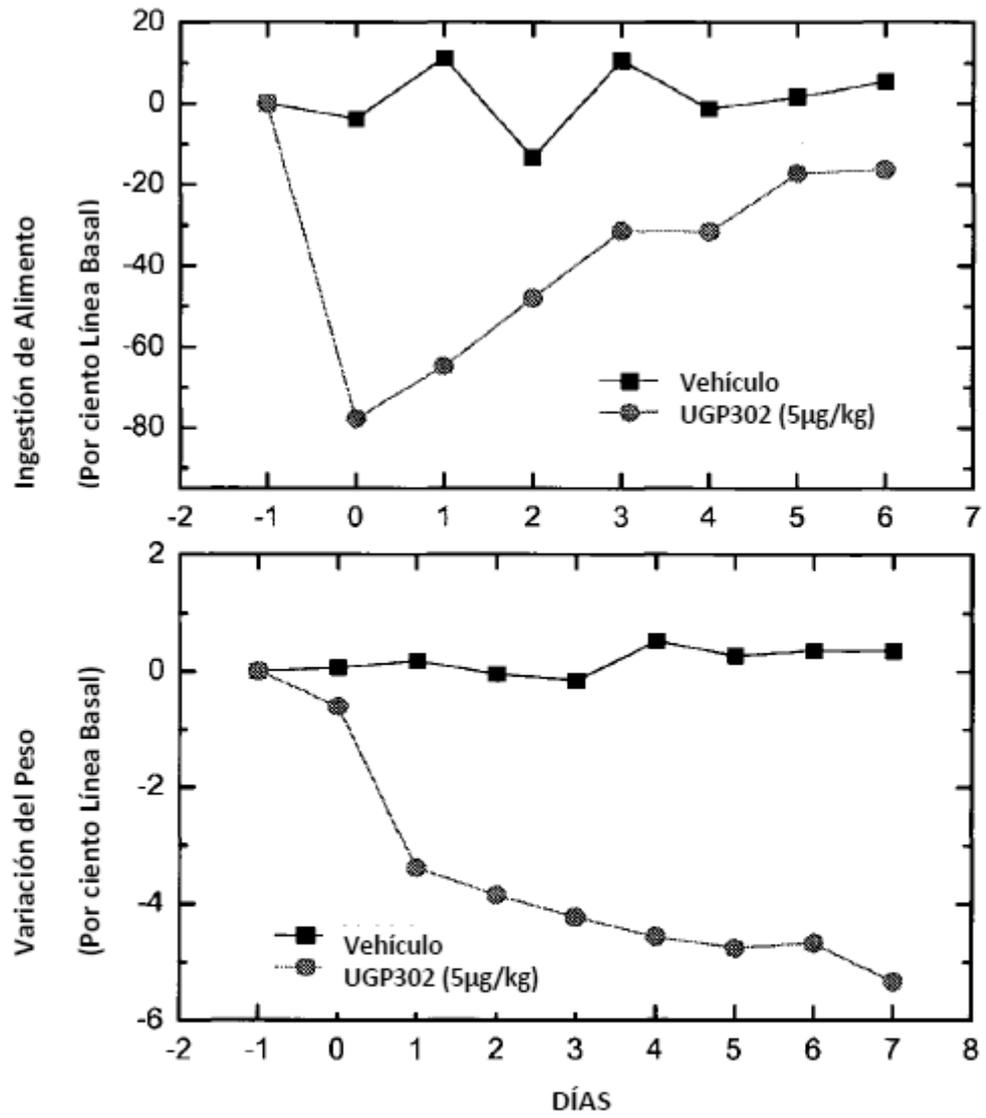
Figuras 13A (superior) y 13B (inferior)



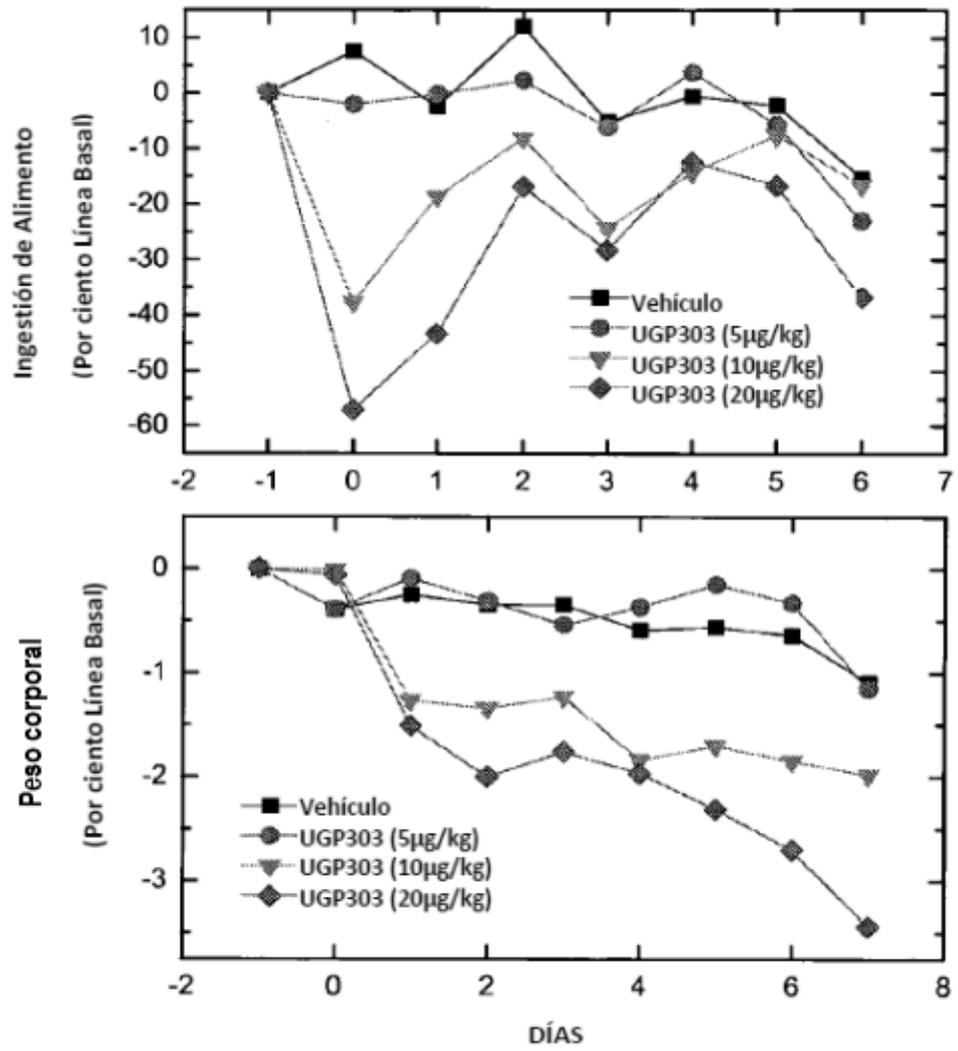
Figuras 14A (superior) y 14B (inferior)



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



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



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

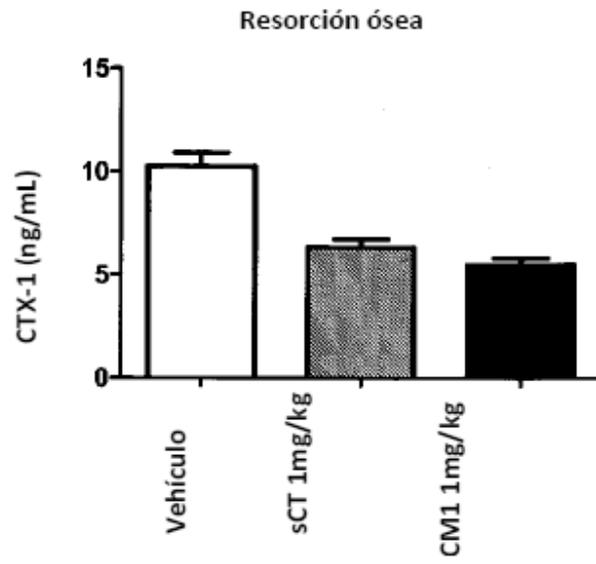


FIGURA 18

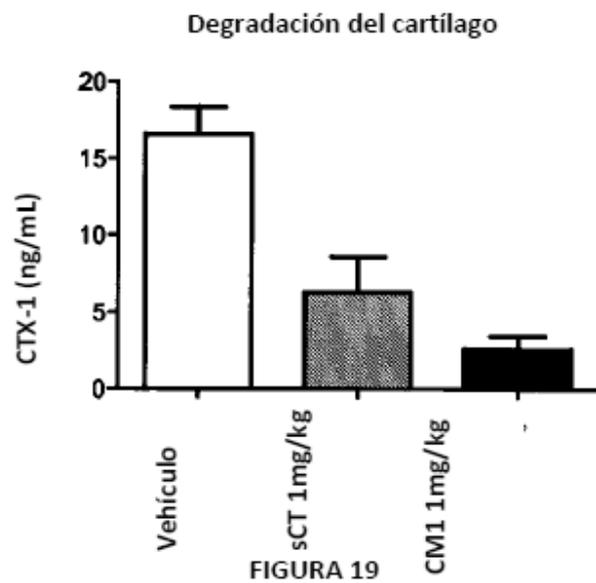


FIGURA 19