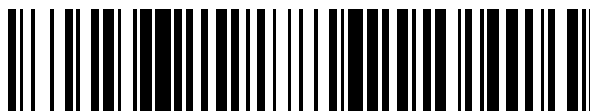


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 356**

51 Int. Cl.:

C07K 14/575 (2006.01)

C07K 17/00 (2006.01)

A61K 38/26 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2012** **PCT/KR2012/004722**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2012** **WO12173422**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2012** **E 12801247 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018** **EP 2721062**

54 Título: **Conjugado que comprende oxintomodulina y un fragmento de inmunoglobulina, y uso del mismo**

30 Prioridad:

17.06.2011 KR 20110058852

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

24.04.2019

73 Titular/es:

**HANMI SCIENCE CO., LTD. (100.0%)
550, Dongtangiheung-ro, Dongtan-myeon
Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-813, KR**

72 Inventor/es:

**JUNG, SUNG YOUB;
KIM, DAE JIN;
PARK, SUNG HEE;
WOO, YOUNG EUN;
CHOI, IN YOUNG y
KWON, SE CHANG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 710 356 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

Conjugado que comprende oxintomodulina y un fragmento de inmunoglobulina, y uso del mismo

Campo de la técnica

La presente invención se refiere a un conjugado que comprende oxintomodulina y un fragmento de inmunoglobulina, y al uso del mismo. Más particularmente, la presente invención se refiere a un conjugado que comprenden oxintomodulina, una región Fc de inmunoglobulina y un polímero no peptídico, en el que el conjugado se puede obtener mediante unión covalente de la oxintomodulina a la región Fc de inmunoglobulina a través de un polímero no peptídico, y a una composición farmacéutica para la prevención o tratamiento de la obesidad que comprende el conjugado.

Antecedentes de la técnica

Recientemente, el crecimiento económico y los cambios en el estilo de vida están llevando a cambios en los hábitos alimenticios. Las principales causas del aumento de las tasas de sobrepeso y obesidad en las personas contemporáneas son el consumo de alimentos ricos en calorías, como las comidas rápidas, y la falta de ejercicio. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que más de mil millones de personas en todo el mundo tienen sobrepeso y al menos 300 millones de ellas son clínicamente obesas. En particular, 250.000 personas mueren cada año en Europa y más de 2,5 millones de personas en todo el mundo mueren cada año como resultado del sobrepeso (Organización Mundial de la Salud, Estrategia Global sobre la Dieta, Physical Activity and Health, 2004).

El sobrepeso y la obesidad aumentan la presión arterial y los niveles de colesterol, lo que provoca la aparición o exacerbación de diversas enfermedades, tal como la enfermedad cardiovascular, la diabetes y la artritis, y también son las principales causas del aumento de las tasas de incidencia de arteriosclerosis, hipertensión, hiperlipidemia o enfermedad cardiovascular en niños o adolescentes, así como en adultos.

La obesidad es una afección grave que causa diversas enfermedades en todo el mundo. Se piensa que es superada mediante esfuerzos individuales, y también se cree que los pacientes obesos carecen de autocontrol. Sin embargo, es difícil tratar la obesidad, porque la obesidad es un trastorno complejo que implica la regulación del apetito y el metabolismo energético. Para el tratamiento de la obesidad, las acciones anormales asociadas con la regulación del apetito y el metabolismo energético deben tratarse junto con los esfuerzos de los pacientes obesos. Se han realizado muchos intentos para desarrollar fármacos capaces de tratar las acciones anormales. Como resultado de estos esfuerzos, se han desarrollado fármacos tales como Rimonabant (Sanofi-Aventis), Sibutramin (Abbott), Contrave (Takeda) y Orlistat (Roche), pero tienen las desventajas de efectos indeseables serios o efectos antiobesidad muy débiles. Por ejemplo, se ha notificado que Rimonabant (Sanofi-Aventis) muestra un efecto secundario de trastorno del nervio central, Sibutramine (Abbott) y Contrave (Takeda) muestran efectos secundarios cardiovasculares y Orlistat (Roche) muestra solo 4 kg de pérdida de peso cuando se toma durante 1 año. Desafortunadamente, no hay agentes terapéuticos para la obesidad que puedan prescribirse de forma segura para pacientes obesos.

Se han realizado muchos estudios para desarrollar agentes terapéuticos para la obesidad que no tienen los problemas de los medicamentos convencionales contra la obesidad. Recientemente, se le ha prestado mucha atención a los derivados del glucagón. El glucagón es producido por el páncreas cuando el nivel de glucosa en la sangre disminuye como resultado de otros medicamentos o enfermedades, deficiencias hormonales o enzimáticas. El glucagón estimula la degradación del glucógeno en el hígado y facilita la liberación de glucosa para elevar los niveles de glucosa en sangre a un rango normal. Además del efecto de aumentar los niveles de glucosa en sangre, el glucagón suprime el apetito y activa la lipasa sensible a hormonas (HSL) de los adipocitos para facilitar la lipólisis, mostrando de este modo un efecto antiobesidad. Uno de los derivados del glucagón, el péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) se está desarrollando como agente terapéutico para la hiperglucemia en pacientes con diabetes y funciona estimulando la síntesis y secreción de insulina, inhibiendo la secreción de glucagón, ralentizando el vaciamiento gástrico, incrementando la utilización de la glucosa e inhibiendo la ingesta de alimentos. La exendina-4 se aísla del veneno de lagarto que comparte aproximadamente un 50 % de homología de aminoácidos con GLP-1 y también se informa que activa el receptor de GLP-1, reduciendo de este modo la hiperglucemia en pacientes con diabetes. Sin embargo, se ha comunicado que los fármacos antiobesidad que contienen GLP-1 presentan efectos secundarios tales como vómitos y náuseas.

Como una alternativa al GLP-1, por lo tanto, se ha prestado mucha atención a la oxintomodulina, un péptido derivado de un precursor de glucagón, pre-glucagón, que se une a los receptores de dos péptidos, GLP-1 y glucagón. La oxintomodulina representa una potente terapia antiobesidad, porque inhibe la ingesta de alimentos como GLP-1, promueve la saciedad y tiene una actividad lipolítica como el glucagón.

Basado en la función dual del péptido oxintomodulina, se ha estudiado activamente como fármaco para el tratamiento de la obesidad. Por ejemplo, la patente coreana n.º 925017 desvela una composición farmacéutica que incluye oxintomodulina como principio activo para el tratamiento del sobrepeso humano, que se administra por vía oral, parenteral, mucosa, rectal, subcutánea o transdérmica. Sin embargo, se ha notificado que este fármaco antiobesidad que incluye oxintomodulina, tiene una semivida corta *in vivo* y una eficacia terapéutica débil, aunque se

administre a una dosis alta tres veces al día. Por lo tanto, se han realizado muchos esfuerzos para mejorar la semivida *in vivo* o el efecto terapéutico de la oxintomodulina sobre la obesidad mediante su modificación.

Por ejemplo, se prepara una oxintomodulina agonista doble (Merck) sustituyendo la L-serina por D-serina en la posición 2 de la oxintomodulina para aumentar la resistencia a la dipeptidil peptidasa-IV (DPP-IV) y uniendo un resto de colesterol en el extremo C-terminal para aumentar la semivida en sangre al mismo tiempo. ZP2929 (Zealand) se prepara sustituyendo L-serina con D-serina en la posición 2 para mejorar la resistencia a DPP-IV, sustituyendo la arginina con alanina en la posición 17 para mejorar la resistencia a la proteasa, sustituyendo metionina con lisina en la posición 27 para mejorar la estabilidad oxidativa, y sustituyendo glutamina con ácido aspártico y alanina en las posiciones 20 y 24 y asparagina con serina en la posición 28 para mejorar la estabilidad de la desamidación. Sin embargo, a pesar de que la semivida de la oxintomodulina agonista doble (Merck) se mejoró para mostrar una semivida de 8-12 minutos más que la de la oxintomodulina nativa, todavía tiene una semivida *in vivo* muy corta de 1,7 horas y su dosis de administración también es tan alta como de varios mg/kg. También se han propuesto Otros procedimientos para aumentar la semivida de los fármacos peptídicos, tales COMO conjugados de PEG o conjugados de PEG-Fc de inmunoglobulina (documento WO 2010/107256 A2). Otros derivados de oxintomodulina para tratar la diabetes y la obesidad se desvelan en el documento WO 2007/100535 A2). Desafortunadamente, La oxintomodulina o sus derivados tienen desventajas en la administración diaria de dosis altas debido a su corta semivida y baja eficacia.

Divulgación de la invención

Problema técnico

En consecuencia, los presentes inventores han hecho muchos esfuerzos para desarrollar un procedimiento para aumentar la semivida en sangre de la oxintomodulina mientras mantienen su actividad *in vivo*. Como resultado, descubrieron que un conjugado preparado mediante la unión de un vehículo a la oxintomodulina utilizando un polímero no peptídico muestra una semivida en sangre mejorada, al tiempo que mantiene la actividad *in vivo* para mostrar excelentes efectos antiobesidad, completando de esta forma la presente invención.

Solución al problema

Un objeto de la presente invención es proporcionar un conjugado que comprende un derivado de oxintomodulina que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24, 25 o 26, una región Fc de inmunoglobulina y un polímero no peptídico en el que el polímero no peptídico se une covalentemente al derivado de oxintomodulina y a la región Fc de inmunoglobulina.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de la obesidad, que comprende los conjugados.

Aún otro objeto de la presente invención es proporcionar dicho conjugado o dicha composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de la obesidad.

Los objetos adicionales de la presente invención se encuentran en las reivindicaciones dependientes.

Efectos ventajosos de la invención

El conjugado que comprende oxintomodulina y la Fc de inmunoglobulina de la presente invención reduce la ingesta de alimentos, suprime el vaciamiento gástrico y facilita la lipólisis sin efectos secundarios, a diferencia de la oxintomodulina nativa, y también muestra excelentes efectos activadores de receptores y sostenibilidad a largo plazo, en comparación con oxintomodulina. Por lo tanto, puede utilizarse ampliamente en el tratamiento de la obesidad con seguridad y eficacia. A diferencia de la oxintomodulina nativa, el nuevo péptido de la presente invención reduce la ingesta de alimentos, suprime el vaciamiento gástrico y facilita la lipólisis sin efectos secundarios, y también muestra excelentes efectos de activación del receptor. Por lo tanto, puede utilizarse ampliamente en el tratamiento de la obesidad con seguridad y eficacia. Los conjugados que comprenden derivados de oxintomodulina de acuerdo con la presente invención son los que se refieren a las SEQ ID NO: 24, 25 y 26. Otros derivados o variantes de oxintomodulina que se presentan son solo por referencia.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una gráfica que muestra los cambios en la ingesta de alimentos de acuerdo con la administración de la dosis de oxintomodulina o de un derivado de oxintomodulina.

La figura 2a es una gráfica que muestra el resultado de la purificación de oxintomodulina mono-PEGilada a través de una columna de purificación SOURCE S.

La figura 2b es una gráfica que muestra el resultado del mapeo de péptidos de oxintomodulina mono-PEGilada purificada.

La figura 2c es una gráfica que muestra el resultado de la purificación de conjugados que incluyen oxintomodulina y Fc de inmunoglobulina a través de una columna de purificación SOURCE 15Q.

La figura 3a es una gráfica que muestra el resultado de la purificación de un derivado de oxintomodulina mono-

de oxintomodulina (SEQ ID NO. 28) y una región Fc de inmunoglobulina a través de una columna de purificación SOURCE ISO;

La figura 12 es una gráfica que muestra los cambios en el peso corporal de los ratones de acuerdo con el tipo y la dosis de administración de los conjugados derivado de oxintomodulina-Fc de inmunoglobulina.

La figura 13 es una gráfica que muestra los cambios en el peso corporal de los ratones de acuerdo con el tipo y la dosis de administración de los conjugados derivado de oxintomodulina-Fc de inmunoglobulina.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

En un aspecto para lograr los objetos anteriores, la presente invención proporciona un conjugado que comprende oxintomodulina, una región Fc de inmunoglobulina y un polímero no peptídico, en el que el conjugado se puede obtener mediante unión covalente de la oxintomodulina a la región Fc de inmunoglobulina a través de un polímero no peptídico.

Como se utiliza en el presente documento, el término "conjugado" significa un conjugado que comprende oxintomodulina y otros factores. Otros factores pueden ser cualquier sustancia que pueda inducir una mayor estabilidad en la sangre, suspender la emisión a través del riñón u otros efectos útiles. En la presente invención, los factores pueden ser la región Fc de inmunoglobulina. Preferentemente, el conjugado puede estar compuesto por una oxintomodulina y una región Fc de inmunoglobulina, que están unidas por un polímero no peptídico. El polímero no peptídico puede enlazar una oxintomodulina y una región Fc de inmunoglobulina a través de enlaces covalentes. Dos extremos terminales del polímero no peptídico se pueden unir a un grupo amina o grupo tiol de la región Fc de inmunoglobulina y derivados de oxintomodulina, respectivamente.

El conjugado de la presente invención significa tener una duración mejorada *in vivo* de la eficacia, en comparación con la oxintomodulina nativa, y el conjugado de acción prolongada puede incluir oxintomodulina preparada mediante modificación, sustitución, adición o delección de las secuencias de aminoácidos de la oxintomodulina nativa, oxintomodulina conjugada con un polímero biodegradable, tal como polietilenglicol (PEG), oxintomodulina conjugada con una proteína de acción prolongada, tal como albúmina o inmunoglobulina, oxintomodulina conjugada a ácido graso que tiene la capacidad de unirse a la albúmina en el cuerpo u oxintomodulina encapsulada en nanopartículas biodegradables, pero el tipo de conjugado de acción prolongada no está limitado al mismo.

El término "oxintomodulina" significa un péptido derivado de un precursor de glucagón, pre-glucagón, e incluye una oxintomodulina nativa, precursores, derivados, fragmentos de los mismos y variantes de los mismos. Por ejemplo, puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 1 (HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTRNRNIA).

La expresión, "variante de oxintomodulina" es un péptido que tiene una o más secuencias de aminoácidos diferentes de las de la oxintomodulina nativa y significa un péptido que conserva la función de activar los receptores de GLP-1 y glucagón, y puede prepararse mediante uno de sustitución, adición, delección y modificación o por una combinación de los mismos en una parte de las secuencias de aminoácidos de la oxintomodulina nativa.

La expresión, "derivado de oxintomodulina" incluye péptidos, derivados peptídicos o miméticos de péptidos que se preparan mediante adición, delección o sustitución de aminoácidos de oxintomodulina para activar tanto el receptor de GLP-1 como el receptor de glucagón en un nivel alto, en comparación con la oxintomodulina nativa.

La expresión, "fragmento de oxintomodulina" significa un fragmento que tiene uno o más aminoácidos añadidos o delecionados en el extremo N-terminal o el extremo C-terminal de la oxintomodulina nativa, a la que se pueden añadir aminoácidos no naturales (por ejemplo, aminoácidos de tipo D) y tiene la función de activar tanto el receptor de GLP-1 como el receptor de glucagón.

Cada uno de los procedimientos de preparación para las variantes, derivados y fragmentos de oxintomodulina se pueden usar individualmente o en combinación. Por ejemplo, la presente invención incluye un péptido que tiene uno o más aminoácidos diferentes de los del péptido nativo y la desaminación del resto de aminoácido N-terminal y tiene la función de activar tanto el receptor de GLP-1 como el receptor de glucagón.

Los aminoácidos mencionados en el presente documento se abrevian de acuerdo con las normas de la IUPAC-IUB tal como sigue:

Alanina A Arginina R
Asparagina N Ácido Aspártico D
Cisteína C Ácido Glutámico E
Glutamina Q Glicina G
Histidina H Isoleucina I
Leucina L Lisina K
Metionina M Fenilalanina F
Prolina P Serina S
Treonina T Triptófano W
Tirosina Y Valina V

Se muestran péptidos de oxintomodulina que se preparan mediante sustituciones, adiciones, deleciones o modificaciones postraduccionales (por ejemplo, metilación, acilación, ubiquitinación, enlace covalente intramolecular) en la secuencia de (HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNTKRNRRNIA, SEQ ID NO. 1) para activar los receptores de glucagón y de GLP-1 al mismo tiempo. Tras la sustitución o adición de aminoácidos, puede usarse cualquiera de los 20 aminoácidos que se encuentran habitualmente en las proteínas humanas, así como aminoácidos atípicos o no naturales. Las fuentes de aminoácidos atípicos disponibles comercialmente incluyen Sigma-Aldrich, ChemPep Inc. y Genzyme Pharmaceuticals. Los péptidos que incluyen estos aminoácidos y secuencias peptídicas atípicas se pueden sintetizar y comprar a proveedores comerciales, por ejemplo, American Peptide Company o Bachem (EE.UU.) o Anygen (Corea).

Por ejemplo, El derivado de oxintomodulina incluye los aminoácidos de la siguiente fórmula 1.

R1-X1-X2-GTFTSD-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-X22-X23-X24-R2
(Fórmula 1)

en la que R1 es histidina, desamino-histidilo, dimetil-histidilo (N-dimetil-histidilo), beta-hidroxiimidazopropionilo, 4-imidazoacetilo, beta-carboxi imidazopropionilo o tirosina;

X1 es Aib (ácido aminoisobutírico), D-alanina, glicina, Sar(N-metilglicina), serina o D-serina;

X2 es ácido glutámico o glutamina;

X3 es leucina o tirosina;

X4 es serina o alanina;

X5 es lisina o arginina;

X6 es glutamina o tirosina;

X7 es leucina o metionina;

X8 es ácido aspártico o ácido glutámico;

X9 es ácido glutámico, serina, ácido alfa-metil-glutámico o se delecciona;

X10 es glutamina, ácido glutámico, lisina, arginina, serina o se delecciona;

X11 es alanina, arginina, valina o se delecciona;

X12 es alanina, arginina, serina, valina o se delecciona;

X13 es lisina, glutamina, arginina, ácido alfa-metil-glutámico o se delecciona;

X14 es ácido aspártico, ácido glutámico, leucina o se delecciona;

X15 es fenilalanina o se delecciona;

X16 es isoleucina, valina o se delecciona;

X17 es alanina, cisteína, ácido glutámico, lisina, glutamina, ácido alfa-metil-glutámico o se delecciona;

X18 es triptófano o se delecciona;

X19 es alanina, isoleucina, leucina, serina, valina o se delecciona;

X20 es alanina, lisina, metionina, glutamina, arginina o se delecciona;

X21 es asparagina o se delecciona;

X22 es alanina, glicina, treonina o se delecciona;

X23 es cisteína, lisina o se delecciona;

X24 es un péptido que tiene de 2 a 10 aminoácidos que consiste en combinaciones de alanina, glicina y serina, o se delecciona; y

R2 es KRNRRNIA (SEQ ID NO. 35), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO. 36), GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO. 37), HSQGTFTSDYSKYLD (SEQ ID NO. 38), HSQGTFTSDYSRYLDK (SEQ ID NO. 39), HEGTFTSDLSKQMEEEAVK (SEQ ID NO. 40) o se delecciona (se excluye si la secuencia de aminoácidos de Fórmula 1 es idéntica a la de la SEQ ID NO. 1).

Con el fin de mejorar la actividad de la oxintomodulina de tipo salvaje para el receptor de glucagón y el receptor de GLP-1, el péptido puede estar sustituido con 4-imidazoacetilo, en el que el carbono alfa de la histidina en la posición 1 de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO. 1 se delecciona, desamino-histidilo en el que se delecciona el grupo amino N-terminal, dimetil-histidilo (N-dimetil-histidilo) donde el grupo amino N-terminal se modifica con dos grupos metilo, beta-hidroxi imidazopropionilo en el que el grupo amino N-terminal está sustituido con un grupo hidroxilo, o beta-carboxi imidazopropionilo en el que el grupo amino N-terminal está sustituido con un grupo carboxilo. Además, la región de unión al receptor de GLP-1 puede estar sustituida con aminoácidos que mejoran los enlaces hidrófobos e iónicos o combinaciones de los mismos. Una parte de la secuencia de oxintomodulina puede estar sustituida con la secuencia de aminoácidos de GLP-1 o exendina-4 para mejorar la actividad en el receptor de GLP-1.

Además, una parte de la secuencia de oxintomodulina puede estar sustituida por una secuencia que estabiliza la hélice alfa. Los aminoácidos en las posiciones 10, 14, 16, 20, 24 y 28 de la secuencia de aminoácidos de la Fórmula 1 pueden estar sustituidos con aminoácidos o derivados de aminoácidos que consisten en Tyr (4-Me), Phe, Phe(4-Me), Phe(4-Cl), Phe(4-CN), Phe(4-NO₂), Phe(4-NH₂), Phg, Pal, Nal, Ala (2-tienilo) y Ala (benzotienilo) que se sabe que estabilizan la hélice alfa, y no hay limitaciones en cuanto al tipo y número de aminoácidos estabilizantes de la alfa-hélice o derivados de aminoácidos que van a insertar. Asimismo, los aminoácidos en las posiciones 10 y 14, 12 y 16, 16 y 20, 20 y 24, y 24 y 28 también pueden estar sustituidos con ácido glutámico o lisina, respectivamente, para formar anillos, y no hay limitación en el número de anillos que se van a insertar. Se muestran los péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de las siguientes fórmulas 1 a 6.

También se muestra un derivado de oxintomodulina que incluye la secuencia de aminoácidos de la siguiente Fórmula 2, en la que la secuencia de aminoácidos de oxintomodulina está sustituida con la de exendina o GLP-1.

R1-A-R3 (Fórmula 2)

5 También se describe un péptido que incluye la secuencia de aminoácidos de la siguiente Fórmula 3, que se prepara uniendo una parte de la secuencia de aminoácidos de la oxintomodulina y una parte de la secuencia de aminoácidos de la exendina o GLP-1 a través de un enlazador de aminoácidos adecuado.

R1-B-C-R4 (Fórmula 3)

10 Un derivado de oxintomodulina adicional incluye la secuencia de aminoácidos de la siguiente fórmula 4, en la que una parte de la secuencia de aminoácidos de la oxintomodulina está sustituida con un aminoácido capaz de mejorar la afinidad de unión al receptor de GLP-1, por ejemplo, Leu en la posición 26 que se une con el receptor de GLP-1 por interacción hidrófoba se sustituye por el residuo hidrófobo, Ile o Val.

R1-SQGTFTSDYSKYLD-D1-D2-D3-D4-D5-LFVQW-D6-D7-N-D8-R3 (Fórmula 4)

15 También se describe un derivado de oxintomodulina que incluye la siguiente fórmula 5, en la que una parte de la secuencia de aminoácidos se deleciona, se añade o se sustituye por otro aminoácido para mejorar las actividades de la oxintomodulina nativa en el receptor de GLP-1 y el receptor de glucagón.

R1-E1-QGTFTSDYSKYLD-E2-E3-RA-E4-E5-FV-E6-WLMNT-E7-R5 (Fórmula 5)

En las fórmulas 2 a 5, R1 es el mismo que en la descripción de la Fórmula 1;

20 A se selecciona del grupo que consiste en SQGTFTSDYSKYLDSRRAQD-FVQWLMNT (SEQ ID NO. 41), SQGTFTSDYSKYLDDEEAVRLFIEWLMNT (SEQ ID NO. 42), SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVAWLKNT (SEQ ID NO. 43), GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID NO. 44), GQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID NO. 45), GEGTFTSDL-SRQMEEEAVRLFIEWAA (SEQ ID NO. 46) y SQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLMNG (SEQ ID NO. 47);

25 B se selecciona del grupo que consiste en SQGTFTSDYSKYLDSRRAQD-FVQWLMNT (SEQ ID NO. 41), SQGTFTSDYSKYLDDEEAVRLFIEWLMNT (SEQ ID NO. 42), SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVAWLKNT (SEQ ID NO. 43), GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID NO. 44), GQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID NO. 45), GEGTFTSDL-SRQMEEEAVRLFIEWAA (SEQ ID NO. 46), SQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLMNG (SEQ ID NO. 47), GEGTFTSDL-SRQMEEEAVRLFIEW (SEQ ID NO. 48) y SQGTFTSDYSRYLD (SEQ ID NO. 49);

30 C es un péptido que tiene de 2 a 10 aminoácidos que consiste en combinaciones de alanina, glicina y serina;

D1 es serina, ácido glutámico o arginina;

D2 es arginina, ácido glutámico o serina;

D3 es arginina, alanina o valina;

D4 es arginina, valina o serina;

35 D5 es glutamina, arginina o lisina;

D6 es isoleucina, valina o serina;

D7 es metionina, arginina o glutamina;

D8 es treonina, glicina o alanina;

E1 es serina, Aib, Sar, d-alanina o d-serina;

E2 es serina o ácido glutámico;

40 E3 es arginina o lisina;

E4 es glutamina o lisina;

E5 es ácido aspártico o ácido glutámico;

E6 es glutamina, cisteína o lisina;

E7 es cisteína, lisina o se deleciona;

45 R3 es KRNRNNIA (SEQ ID NO. 35), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO. 36) o GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO. 37);

R4 es HSQGTFTSDYSKYLD (SEQ ID NO. 38), HSQGTFTSDYSRYLDK (SEQ ID NO. 39) o HGEGTFTSDLSKQMEEEAVK (SEQ ID NO. 40); y,

R5 es KRNRNNIA (SEQ ID NO. 35), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO. 36), GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO. 37) o se deleciona (se excluye si la secuencia de aminoácidos de las Fórmulas 2 a 5 es idéntica a la de la SEQ ID NO. 1).

50 Otro derivado de oxintomodulina descrito es de la siguiente Fórmula 6.

R1-X1-X2-GTFTSD-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-X22-X23-X24-R2 (Fórmula 6)

en la que R1 es histidina, desamino-histidilo, 4-imidazoacetilo o tirosina;

55 X1 es Aib (ácido aminoisobutírico), glicina o serina;

X2 es ácido glutámico o glutamina;

X3 es leucina o tirosina;

- X4 es serina o alanina;
 X5 es lisina o arginina;
 X6 es glutamina o tirosina;
 X7 es leucina o metionina;
 5 X8 es ácido aspártico o ácido glutámico;
 X9 es ácido glutámico, ácido alfa-metil-glutámico o se deleta;
 X10 es glutamina, ácido glutámico, lisina, arginina o se deleta;
 X11 es alanina, arginina o se deleta;
 X12 es alanina, valina o se deleta;
 10 X13 es lisina, glutamina, arginina, ácido alfa-metil-glutámico o se deleta;
 X14 es ácido aspártico, ácido glutámico, leucina o se deleta;
 X15 es fenilalanina o se deleta;
 X16 es isoleucina, valina o se deleta;
 15 X17 es alanina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, ácido alfa-metil-glutámico o se deleta;
 X18 es triptófano o se deleta;
 X19 es alanina, isoleucina, leucina, valina o se deleta;
 X20 es alanina, lisina, metionina, arginina o se deleta;
 X21 es asparagina o se deleta;
 X22 es treonina o se deleta;
 20 X23 es cisteína, lisina o se deleta;
 X24 es un péptido que tiene de 2 a 10 aminoácidos que consisten en glicina o se deleta; y
 R2 es KRNRNNIA (SEQ ID NO. 35), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO. 36), GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO. 37),
 HSQGTFTSDYSKYLD (SEQ ID NO. 38), HSQGTFTSDYSRYLDK (SEQ ID NO. 39),
 HGEGTFTSDLSKQMEEEAVK (SEQ ID NO. 40) o se deleta (se excluye si la secuencia de aminoácidos de
 25 Fórmula 6 es idéntica a la de la SEQ ID NO. 1)

El derivado de oxintomodulina descrito en el presente documento también es uno de los péptidos de las SEQ ID NO. 2 a 34. Esto se detalla adicionalmente en la Tabla 1 del Ejemplo 2-1. De estos últimos derivados de oxintomodulina, los de las SEQ ID NO: 24, 25 y 26 son parte de la invención.

- La oxintomodulina tiene las actividades de dos péptidos, GLP-1 y glucagón. GLP-1 disminuye el nivel de glucosa en
 30 sangre, reduce la ingesta de alimentos y suprime el vaciamiento gástrico, y el glucagón aumenta el nivel de glucosa
 en sangre, facilita la lipólisis y disminuye el peso corporal al aumentar los metabolismos energéticos. Los diferentes
 efectos biológicos de los dos péptidos pueden causar efectos no deseados como aumentar la glucosa en sangre si
 el glucagón muestra un efecto más dominante que el GLP-1, o causar náuseas y vómitos si el GLP-1 muestra un
 35 efecto más dominante que el glucagón. Por ejemplo, el conjugado que se produjo en el Ejemplo 10 a continuación
 mostró una mayor afinidad por el receptor de GLP-1 que el producido en el Ejemplo 12, pero la eficacia del primero
 fue menor que la del último, como se muestra en el experimento *in vivo* en el Ejemplo 18. Esto podría deberse a la
 mayor eficacia de los conjugados en relación con el receptor de glucagón en el Ejemplo 12 a pesar de su baja
 40 eficacia en relación con el receptor de GLP-1. Por lo tanto, los derivados de oxintomodulina y sus conjugados de la
 presente invención no están limitados a aquellos derivados que muestran un aumento incondicional de las
 actividades. Por ejemplo, los aminoácidos pueden modificarse en las posiciones 1 y 11 de la oxintomodulina, que se
 sabe que suprimen la actividad del glucagón, que controlan la relación de actividad entre el glucagón y el GLP-1.

- Los conjugados de la presente invención pueden inducir una mayor estabilidad en sangre, suspender la emisión a
 través del riñón y cambiar la afinidad a los receptores uniendo un vehículo a la oxintomodulina a través de un enlace
 45 covalente o formando una microesfera. El vehículo que puede formar un conjugado que contiene oxintomodulina se
 puede seleccionar del grupo que consiste en albúmina, transferrina, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos,
 elastina, heparina, polisacárido, tal como quitina, fibronectina y, más favorablemente, la región Fc de
 inmunoglobulina, todo lo cual puede aumentar la semivida en sangre de los conjugados cuando se unen a la
 oxintomodulina.

- La expresión "región Fc de inmunoglobulina" como se utiliza en el presente documento, se refiere a una proteína que
 50 contiene la región constante 2 de la cadena pesada (CH2) y a la región constante 3 de la cadena pesada (CH3) de
 una inmunoglobulina, excluyendo las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, la región constante 1 de la
 cadena pesada (CH1) y la región constante 1 de la cadena ligera (CL1) de la inmunoglobulina. Puede incluir además
 una región de bisagra en la región constante de la cadena pesada. Asimismo, la región Fc de inmunoglobulina de la
 presente invención puede contener una parte o la totalidad de la región Fc, incluida la región constante de la cadena
 55 pesada 1 (CH1) y/o la región constante de la cadena ligera 1 (CL1), excepto las regiones variables de las cadenas
 pesadas y ligeras, siempre que tenga una función fisiológica sustancialmente similar o mejor que el de la proteína
 nativa. Asimismo, la región Fc de inmunoglobulina puede ser un fragmento que tiene una delección en una parte
 relativamente larga de la secuencia de aminoácidos de CH2 y/o CH3. Es decir, la región Fc de inmunoglobulina de la
 presente invención puede comprender 1) un dominio CH1, un dominio CH2, un dominio CH3 y un dominio CH4, 2)
 60 un dominio CH1 y un dominio CH2, 3) un dominio CH1 y un dominio CH3, 4) un dominio CH2 y un dominio CH3, 5)
 una combinación de uno o más dominios y una región de bisagra de inmunoglobulina (o una parte de la región de
 bisagra) y 6) un dímero de cada dominio de las regiones constantes de la cadena pesada y la región constante de la
 cadena ligera.

La región Fc de inmunoglobulina de la presente invención incluye una secuencia de aminoácidos nativa y un derivado de secuencia (mutante) de la misma. Un derivado de la secuencia de aminoácidos tiene una secuencia que es diferente de la secuencia de aminoácidos nativa debido a una delección, una inserción, una sustitución no conservadora o conservadora o combinaciones de las mismas de uno o más restos de aminoácidos. Por ejemplo, en una Fc de IgG, los restos de aminoácidos conocidos por ser importantes en la unión, en las posiciones 214 a 238, 297 a 299, 318 a 322 o 327 a 331, se pueden usar como una diana adecuada para la modificación.

Asimismo, son posibles otros varios derivados, incluyendo uno en el que se deleciona una región capaz de formar un enlace disulfuro, o se eliminan ciertos to en el extremo N-terminal de una forma de Fc nativa o se añade un residuo de metionina a la misma. Además, para eliminar las funciones efectoras, se puede producir una delección en un sitio de unión del complemento, tal como un sitio de unión a C1q y un sitio de CDDA (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos). Las técnicas para preparar dichos derivados de la secuencia de la región Fc de inmunoglobulina se desvelan en los documentos WO 97/34631 y WO 96/32478.

En la materia se conocen intercambios de aminoácidos en proteínas y péptidos, que generalmente no alteran la actividad de las proteínas o péptidos (H. Neurath, R. L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, Nueva York, 1979). Los intercambios que se producen más habitualmente son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly, en ambas direcciones. Además, la región Fc, si se desea, se puede modificar mediante fosforilación, sulfatación, acrilación, glucosilación, metilación, farnesilación, acetilación, amidación, y similares.

Los derivados de Fc mencionados anteriormente son derivados que tienen una actividad biológica idéntica a la de la región Fc de la presente divulgación o una mejor estabilidad estructural, por ejemplo, contra el calor, pH o similares.

Además, estas regiones Fc se pueden obtener a partir de formas nativas aisladas de seres humanos y otros animales, incluyendo vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas y cobayas, o pueden ser recombinantes o derivados de los mismos, obtenidos de células animales transformadas o microorganismos. En el presente documento, se pueden obtener a partir de una inmunoglobulina nativa mediante el aislamiento de las inmunoglobulinas enteras de los organismos humanos o animales y, después, el tratamiento de los mismos con una enzima proteolítica. La papaína digiere la inmunoglobulina nativa en las regiones Fab y Fc, y el tratamiento con pepsina da como resultado la producción de fragmentos pF'c y F (ab)₂. Estos fragmentos pueden someterse a, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño para aislar los fragmentos Fc o pF'c'. Preferentemente, una región Fc derivada de ser humano es una región Fc de inmunoglobulina recombinante que se obtiene a partir de un microorganismo.

Además, la región Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede estar en forma de tener cadenas de azúcar nativas, aumento de cadenas de azúcar en comparación con una forma nativa o disminución de las cadenas de azúcar en comparación con la forma nativa, o pueden estar en una forma desglicosilada. El aumento, disminución o eliminación de las cadenas de azúcar de la Fc de inmunoglobulina puede conseguirse mediante procedimientos convencionales usados en la técnica, tales como un procedimiento químico, un procedimiento enzimático, y un procedimiento de ingeniería genética utilizando un microorganismo. La eliminación de las cadenas de azúcar de una región Fc produce una fuerte disminución de la afinidad de unión a la parte C1q del primer componente del complemento C1 y una disminución o pérdida de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos o la citotoxicidad dependiente del complemento, con lo que no se incluyen respuestas inmunitarias innecesarias *in vivo*. En este aspecto, una región Fc de inmunoglobulina en una forma desglicosilada o aglicosilada puede ser más adecuada para el objeto de la presente invención como vehículo de fármacos.

Como se utiliza en el presente documento, el término "desglicosilación" se refiere a eliminar enzimáticamente restos de azúcar de una región Fc y el término "aglicosilación" significa que una región Fc se produce en una forma no glicosilada en un procarionte, preferentemente *E. coli*.

Mientras tanto, la región Fc de inmunoglobulina puede derivar de seres humanos u otros animales, incluidas vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas y cobayas, y, preferentemente, de seres humanos.

Además, la región Fc de inmunoglobulina puede ser una región Fc que deriva de IgG, IgA, IgD, IgE e IgM, o que se hace por combinaciones de los mismos o sus híbridos. Preferentemente, deriva de IgG o IgM, que están entre las proteínas más abundantes en la sangre humana y, de la forma más preferente, de IgG, que se sabe que potencia la semivida de las proteínas de unión a ligando.

Por otro lado, el término "combinación", como se utiliza en el presente documento, significa que los polipéptidos que codifican regiones Fc de inmunoglobulina de cadena sencilla del mismo origen están unidos a un polipéptido de cadena simple de un origen diferente para formar un dímero o multímero. Es decir, se puede formar un dímero o multímero a partir de dos o más fragmentos seleccionados del grupo que consiste en los fragmentos Fc de IgG, Fc de IgA, Fc de IgM, Fc de IgM, Fc de IgD Fc y Fc de IgE.

La expresión "polímero no peptídico", se refiere a un polímero biocompatible que incluye dos o más unidades que se repiten unidas entre sí mediante cualquier enlace covalente con exclusión de un enlace peptídico. En la presente invención, el polímero no peptídico se puede usar indistintamente con el enlazador no peptídico.

El polímero no peptídico útil en la presente invención puede seleccionarse del grupo que consiste en un polímero biodegradable, un polímero lipídico, quitina, ácido hialurónico y una combinación de los mismos, y preferentemente, el polímero biodegradable puede ser polietilenglicol, polipropilenglicol, un copolímero de etilenglicol-propilenglicol, poliol polioxietilado, alcohol polivinílico, polisacárido, dextrano, éter polivinilético, ácido poliláctico (PLA) o ácido poliláctico-glicólico (PLGA) y, más preferentemente, es polietilenglicol (PEG). Además, los derivados de los mismos conocidos en la técnica y los derivados que se preparan fácilmente mediante un procedimiento conocido en la técnica pueden incluirse en el ámbito de la presente invención.

El enlazador peptídico que se utiliza en la proteína de fusión obtenida mediante un procedimiento de fusión dentro del marco convencional tiene inconvenientes en cuanto a que se puede escindir fácilmente *in vivo* mediante una enzima proteolítica y, por lo tanto, no se puede obtener un efecto suficiente de aumentar la semivida en suero del fármaco activo por un vehículo como se esperaba. Sin embargo, en la presente invención, el polímero que tiene resistencia a la enzima proteolítica puede usarse para mantener la semivida en suero del péptido similar a la del vehículo. Por lo tanto, se puede usar cualquier polímero no peptídico sin limitaciones, siempre que se trate de un polímero que tenga la función mencionada anteriormente, es decir, un polímero con resistencia a la enzima proteolítica *in vivo*. El polímero no peptídico tiene un peso molecular en el intervalo de 1 a 100 kDa y, preferentemente, de 1 a 20 kDa. El polímero no peptídico de la presente invención, unido a la región Fc de inmunoglobulina, puede ser un polímero o una combinación de diferentes tipos de polímeros.

El polímero no peptídico usado en la presente invención tiene un grupo reactivo capaz de unirse a la región Fc de inmunoglobulina y al fármaco proteico. El polímero no peptídico tiene un grupo reactivo en ambos extremos, que se selecciona, preferentemente, del grupo que consiste en un grupo aldehído reactivo, un propionaldehído, un butiraldehído, una maleimida y un derivado de succinimida. El derivado de succinimida puede ser propionato de succinimidilo, carbonato de hidroxisuccinimidilo, de succinimidilcarboximetilo o de succinimidilo. En particular, cuando el polímero no peptídico tiene un grupo reactivo en ambos extremos, es eficaz en la unión en ambos extremos con un polipéptido activo y una inmunoglobulina con las reacciones no específicas mínimas. Un producto final generado mediante alquilación reductora por un enlace aldehído es mucho más estable que el unido por un enlace amida. El grupo reactivo aldehído se une de forma selectiva a un extremo N-terminal a un pH bajo y se une a un residuo de lisina para formar un enlace covalente a un pH alto, tal como un pH de 9,0. Los grupos reactivos en ambos extremos del polímero no peptídico pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, el polímero no peptídico puede poseer un grupo maleimida en un extremo y un grupo aldehído, un grupo propionaldehído o un grupo butiraldehído en el otro extremo. Cuando un polietilenglicol que tiene un grupo hidroxilo reactivo en ambos extremos del mismo se usa como el polímero no peptídico, el grupo hidroxilo puede activarse para diversos grupos reactivos mediante reacciones químicas conocidas, o un polietilenglicol que tiene un grupo reactivo modificado disponible en el mercado puede usarse para preparar el conjugado de acción larga de la presente invención.

El conjugado de la presente invención, puede ser aquel en el que los dos extremos del polímero no peptídico que tiene dos grupos terminales reactivos están unidos a un grupo amina o grupo tiol de la región Fc de inmunoglobulina y derivados de oxintomodulina, respectivamente.

El polímero no peptídico tiene un grupo reactivo en ambos extremos, que se selecciona, preferentemente, del grupo que consiste en un grupo reactivo aldehído, un grupo propionaldehído, un grupo butiraldehído, un grupo maleimida, y un derivado de succinimida. El derivado de succinimida puede ser propionato de succinimidilo, carbonato de hidroxisuccinimidilo, de succinimidilcarboximetilo o de succinimidilo.

Los dos grupos terminales reactivos del polímero no peptídico pueden ser iguales o diferentes entre sí. Por ejemplo, el polímero no peptídico puede poseer un grupo maleimida en un extremo y un grupo aldehído, un grupo propionaldehído o un grupo butiraldehído en el otro extremo. Por ejemplo, cuando el polímero no peptídico tiene un grupo aldehído reactivo en un grupo terminal y un grupo maleimida en el otro grupo terminal, es eficaz en la unión en ambos extremos con un polipéptido activo y una inmunoglobulina con las reacciones no específicas mínimas. Según ejemplos de la presente invención, los conjugados se prepararon uniendo la oxintomodulina o derivado de la misma y la región Fc de inmunoglobulina mediante un enlace covalente utilizando PEG, que es un polímero no peptídico que incluye el grupo propionaldehído solo o el grupo maleimida y el grupo aldehído.

Los conjugados de la presente invención muestran una excelente actividad sobre el receptor de GLP-1 y el receptor de glucagón, en comparación con la oxintomodulina nativa, y la semivida en sangre aumenta al unirse con la región Fc para mantener la actividad *in vivo* durante un largo período de tiempo.

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de la obesidad, que comprende el péptido.

Como se utiliza en el presente documento, el término "prevención" significa todas las acciones por las cuales se restringe o retrasa la aparición de la enfermedad. En la presente invención, "prevención" significa que la aparición de obesidad por factores tales como un aumento en el peso corporal o la grasa corporal se ve restringida o retardada por la administración de los conjugados de la presente invención.

Como se utiliza en el presente documento, el término "tratamiento" significa todas las acciones por las cuales los

síntomas de la enfermedad se han aliviado, mejorado o recuperado. En la presente invención, "tratamiento" significa que los síntomas de la obesidad se alivian, mejoran o recuperan mediante la administración de los conjugados de la presente invención, dando como resultado una reducción del peso corporal o la grasa corporal.

Como se utiliza en el presente documento, el término "obesidad" implica la acumulación de una cantidad excesiva de tejido adiposo en el cuerpo, y un índice de masa corporal (peso corporal (kg) dividido por el cuadrado de la altura (m)) por encima de 25 debe considerarse obesidad. La obesidad está causada generalmente por un desequilibrio de energía, cuando la cantidad de ingesta en la dieta excede la cantidad de energía gastada durante un largo período de tiempo. La obesidad es una enfermedad metabólica que afecta a todo el cuerpo y aumenta el riesgo de diabetes, hiperlipidemia, disfunción sexual, artritis y enfermedades cardiovasculares, y, en algunos casos, se asocia con incidencia de cáncer.

Los conjugados de la presente invención, que se preparan mediante la unión de derivados de oxintomodulina de las SEQ ID NO: 24, 25 y 26 con la región Fc de inmunoglobulina, muestran una excelente afinidad de unión a los receptores de glucagón y GLP-1 (Tabla 3) y una excelente resistencia a las enzimas proteolíticas *in vivo* para exhibir la actividad *in vivo* durante un largo período de tiempo, de modo que muestran excelentes efectos antiobesidad, tales como reducciones del peso corporal (FIG. 12).

La composición farmacéutica de la presente invención puede incluir además un vehículo farmacéuticamente aceptable, excipiente o diluyente. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que la composición es suficiente para lograr los efectos terapéuticos sin efectos secundarios perjudiciales, y puede determinarse fácilmente dependiendo del tipo de enfermedad, la edad del paciente, el peso corporal, las afecciones en la salud, el sexo y la sensibilidad a los fármacos, la vía de administración, el modo de administración, la frecuencia de administración, la duración del tratamiento, los fármacos utilizados en combinación o junto con la composición de la presente invención, y otros factores conocidos en medicina.

La composición farmacéutica que incluye el derivado de la presente invención puede incluir además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Para administración oral, el vehículo puede incluir, pero sin limitación, un aglutinante, un lubricante, un disgregante, un excipiente, un solubilizante, un agente dispersante, un estabilizante, un agente de suspensión, un colorante y un saborizante. Para preparaciones inyectables, el vehículo puede incluir un agente de tamponamiento, un agente conservante, un analgésico, un solubilizante, un agente isotónico, y un estabilizante. Para las preparaciones para administración tópica, el vehículo puede incluir una base, un excipiente, un lubricante, y un agente conservante.

La composición de la presente invención puede formularse en diversas formas de dosificación en combinación con los vehículos farmacéuticamente aceptables mencionados anteriormente. Por ejemplo, para administración oral, la composición puede formularse en comprimidos, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes u obleas. Para preparaciones inyectables, la composición farmacéutica puede formularse en una ampolla como una forma de dosificación única o un recipiente multidosis. La composición también puede formularse en soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas y preparados de acción prolongada.

Por otro lado, ejemplos del vehículo, el excipiente y el diluyente adecuados para las formulaciones farmacéuticas incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, caucho de acacia, alginato, gelatina, fosfato cálcico, silicato cálcico, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, metilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, talco, estearato de magnesio y aceites minerales. Además, las formulaciones farmacéuticas pueden incluir además cargas, agentes anticoagulantes, lubricantes, humectantes, saborizantes y antisépticos.

Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede tener cualquier formulación seleccionada del grupo que consiste en comprimidos, píldoras, polvos, gránulos, cápsulas, suspensiones, líquidos para uso interno, emulsiones, jarabes, soluciones acuosas estériles, disolventes no acuosos, formulaciones liofilizadas y supositorios.

Además, la composición puede formularse en una forma de dosificación unitaria adecuada para el cuerpo del paciente, y se formula, preferentemente, en una preparación útil para fármacos peptídicos de acuerdo con el procedimiento típico en el campo farmacéutico para administrarse por vía oral o parenteral, tal como a través de la piel, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intramedular, intraventricular, pulmonar, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, intracolónico, tópica, sublingual, administración vaginal o rectal, pero sin limitación a las mismas.

La composición se puede usar mediante la mezcla con diversos vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como solución salina fisiológica o disolventes orgánicos. Con el fin de aumentar la estabilidad o la absorción, se pueden usar carbohidratos tales como glucosa, sacarosa o dextranos, antioxidantes tales como ácido ascórbico o glutatión, agentes quelantes, proteínas de bajo peso molecular u otros estabilizantes.

La dosis y la frecuencia de administración de la composición farmacéutica de la presente invención se determinan mediante el tipo de principio activo, junto con diversos factores, tales como la enfermedad a tratar, la vía de administración, la edad del paciente, el sexo y el peso corporal, y la gravedad de la enfermedad.

La dosis eficaz total de la composición de la presente invención se puede administrar a un paciente en una sola dosis o se puede administrar durante un período de tiempo prolongado en dosis múltiples de acuerdo con un protocolo de tratamiento fraccionado. En la composición farmacéutica de la presente invención, el contenido del principio activo puede variar dependiendo de la gravedad de la enfermedad. Preferentemente, la dosis diaria total del péptido de la presente invención puede ser de aproximadamente 0,0001 µg a 500 mg por 1 kg de peso corporal de un paciente. Sin embargo, la dosis eficaz del conjugado se determina considerando diversos factores, que incluyen la edad del paciente, el peso corporal, las afecciones en la salud, el sexo, la gravedad de la enfermedad, la dieta y la tasa de secreción, además de la vía de administración y la frecuencia del tratamiento de la composición farmacéutica. En vista de esto, los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente una dosis eficaz adecuada para el uso particular de la composición farmacéutica de la presente invención. La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención no está particularmente limitada a la formulación y la vía y modo de administración, siempre que presente los efectos de la presente invención.

La composición farmacéutica de la presente invención muestra una excelente duración *in vivo* de la eficacia y título, reduciendo de este modo de manera remarcada el número y la frecuencia de administración de la misma.

Además, la composición farmacéutica puede administrarse sola o en combinación o junto con otras formulaciones farmacéuticas que presentan efectos profilácticos o terapéuticos en la obesidad. Las formulaciones farmacéuticas que muestran efectos profilácticos o terapéuticos sobre la obesidad no están particularmente limitadas y pueden incluir un agonista del receptor de GLP-1, un agonista del receptor de leptina, un inhibidor de DPP-IV, un antagonista del receptor Y5, un antagonista del receptor de hormona concentradora de melanina (MCH), un agonista del receptor Y2/3, un agonista del receptor MC3/4, un inhibidor de lipasa gástrica/pancreática, un agonista de 5HT2c, un agonista del receptor β3A, un agonista del receptor de amilina, un antagonista de ghrelina y un antagonista del receptor de ghrelina.

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para la prevención o el tratamiento de la obesidad, que comprende la etapa de administrar a un sujeto el conjugado o la composición farmacéutica que incluye el mismo.

Como se utiliza en el presente documento, el término "administración" significa la introducción de una cantidad de una sustancia predeterminada en un paciente mediante un determinado procedimiento adecuado. La composición de la presente invención se puede administrar a través de cualquiera de las rutas comunes, siempre que pueda llegar a un tejido deseado, por ejemplo, pero sin limitación, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, oral, tópica, intranasal, intrapulmonar o intrarrectal. Sin embargo, ya que los péptidos son digeridos después de la administración oral, los principios activos de una composición para administración oral deben estar recubiertos o formularse para la protección contra la degradación en el estómago.

En la presente invención, el término "sujeto" son aquellos sospechosos de tener obesidad, lo que significa mamíferos, incluyendo seres humanos, ratón, y ganado con obesidad o con posibilidad de obesidad. Sin embargo, cualquier sujeto que se va a tratar con la composición farmacéutica de la presente invención se incluye sin limitación. La composición farmacéutica que incluye el péptido de la presente invención se administra a un sujeto sospechoso de tener obesidad, tratando de este modo al sujeto de manera eficaz. La obesidad es como se ha descrito anteriormente.

El procedimiento terapéutico de la presente invención puede incluir la etapa de administrar la composición que incluye el péptido a una cantidad farmacéuticamente eficaz. La dosis diaria total se debe determinar según el juicio médico apropiado mediante un médico y administrándola una vez o varias veces. Con respecto a los objetos de la presente invención, el nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente particular puede variar dependiendo de varios factores bien conocidos en la técnica médica, incluyendo el tipo y el grado de la respuesta que se desea conseguir, las composiciones concretas según se utilicen o no otros agentes con las mismas, la edad del paciente, el peso corporal, las afecciones en la salud, el sexo y la dieta, el tiempo y la vía de administración, la tasa de eliminación de la composición, el período de tiempo de la terapia, otros fármacos utilizados en combinación o junto con la composición de la presente invención, y factores similares bien conocidos en la técnica médica.

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un uso del conjugado o la composición farmacéutica que incluye el mismo en la preparación de fármacos para la prevención o el tratamiento de la obesidad.

Modo para la invención

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con más detalle en referencia a los siguientes Ejemplos.

De este modo, los derivados y conjugados de oxintomodulina que comprenden secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 24, 25 y 26 son de acuerdo con la invención. Los derivados y conjugados que comprenden secuencias de aminoácidos de las otras SEQ ID NO se proporcionan con fines ilustrativos.

Ejemplo 1. Producción de una línea celular activada *in vitro***Ejemplo 1-1: Producción de una línea celular que muestra respuesta de AMPc a GLP-1**

La PCR se realizó utilizando una región correspondiente al ORF (marco de lectura abierto) en el ADNc (OriGene Technologies, Inc. USA) del gen del receptor de GLP-1 humano como molde, y los siguientes cebadores directos e inversos incluyen cada uno de los sitios de restricción HindIII y EcoRI para obtener un producto de la PCR.

Cebador directo: 5'-CCCGGCCCGCGCGCGCTATTCGAAATAC-3'(SEQ ID NO. 47)

Cebador inverso: 5'-GAACGGTCCGGAGGACGTCGACTCTTAAGATAG-3'(SEQ ID NO. 48)

El producto de la PCR se clonó en el vector de expresión de células animales conocidas x0GC/dhfr para preparar un vector recombinante x0GC/GLP1R.

La línea celular CHO DG44 cultivada en medio DMEM/F12 (FBS al 10 %) se transfectó con el vector recombinante x0GC/GLP1R usando Lipofectamine (Invitrogen, EE.UU.) y se cultivó en un medio de selección que contenía 1 mg/ml de G418 y metotrexato 10 nM. Se seleccionaron líneas celulares de un solo clon mediante una técnica de dilución límite y finalmente se seleccionó una línea celular que mostraba una excelente respuesta de AMPc a GLP-1 de una manera dependiente de la concentración.

Ejemplo 1-2: Producción de una línea celular que muestra respuesta de AMPc a glucagón

La PCR se realizó utilizando una región correspondiente al ORF en el ADNc (OriGene Technologies, Inc. USA) del gen del receptor de glucagón humano como molde, y los siguientes cebadores directos e inversos incluyen cada uno de los sitios de restricción EcoRI and XhoI para obtener un producto de la PCR.

Cebador directo: 5'-CAGCGACACCGACCGTCCCCCGTACTTAAGGCC-3'(SEQ ID NO. 49)

Cebador inverso: 5'-CTAACCGACTCTCGGGGAAGACTGAGCTCGCC-3'(SEQ ID NO. 50)

El producto de la PCR se clonó en el vector de expresión de células animales conocidas x0GC/dhfr para preparar un vector recombinante x0GC/GCGR.

La línea celular CHO DG44 cultivada en medio DMEM/F12 (FBS al 10 %) se transfectó con el vector recombinante x0GC/GCGR usando Lipofectamine y se cultivó en un medio de selección que contenía 1 mg/ml de G418 y metotrexato 10 nM. Se seleccionaron líneas celulares de un solo clon mediante una técnica de dilución límite y finalmente se seleccionó una línea celular que mostraba una excelente respuesta de AMPc a glucagón de una manera dependiente de la concentración.

Ejemplo 2. Ensayo sobre la actividad *in vitro* de derivados de oxintomodulina**Ejemplo 2-1: Síntesis de derivados de oxintomodulina**

Con el fin de medir las actividades *in vitro* de los derivados de oxintomodulina, se sintetizaron derivados de oxintomodulina que tienen las siguientes secuencias de aminoácidos (Tabla 1).

Tabla 1

[Tabla 1]

Oxintomodulina y derivados de oxintomodulina	
SEQ ID NO.	Secuencia de aminoácidos
SEQ ID NO. 1	HSQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVQWLMNTRNRNNIA
SEQ ID NO. 2	CA-SQGTFTSDYSKYLDDEEAVRLFIEWLMNTRNRNNIA
SEQ ID NO. 3	CA-SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVAWLKNTGPSSGAPPP S
SEQ ID NO. 4	CA-GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
SEQ ID NO. 5	CA-GQGTFTSDYSRQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPP S
SEQ ID NO. 6	CA-GEGTFTSDLSRQMEEEEAVRLFIEWAAHSQGTFTSDYS KYLD

(continuación)

Oxintomodulina y derivados de oxintomodulina	
SEQ ID NO. 7	CA-SQGTFTSDYSRYLDEEAVRLFIEWLMNTK
SEQ ID NO. 8	CA-SQGTFTSDLSRQLEEEAVRLFIEWLMNK
SEQ ID NO. 9	CA-GQGTFTSDYSRYLDEEAVXLFIEWLMNTKRNRRNIA
SEQ ID NO. 10	CA-SQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLMNGGPSSGAPPP SK
SEQ ID NO. 11	CA-GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEWAAHSQGTFTSDYS RYLDK
SEQ ID NO. 12	CA-SQGTFTSDYSRYLDGGGGHGEGTFTSDLSKQMEEEAV K
SEQ ID NO. 13	CA-SQGTFTSDYSRYLDXEAVXLFIEWLMNTK
SEQ ID NO. 14	CA-GQGTFTSDYSRYLDEEAVLFXWLMNTKRNRRNIA
SEQ ID NO. 15	CA-GQGTFTSDYSRYLDEEAVRLFIXWLMNTKRNRRNIA
SEQ ID NO. 16	CA-SQGTFTSDLSRQLEGGGHSQGTFTSDLSRQLEK
SEQ ID NO. 17	CA-SQGTFTSDYSRYLDEEAVRLFIEWIRNTKRNRRNIA
SEQ ID NO. 18	CA-SQGTFTSDYSRYLDEEAVRLFIEWIRNGGPSSGAPPPS K
SEQ ID NO. 19	CA-SQGTFTSDYSRYLD <u>E</u> EAV <u>K</u> LFIEWIRN- TKRNRRNIA
SEQ ID NO. 20	CA-SQGTFTSDYSRYLD <u>E</u> EAV <u>K</u> LFIEWIRNGG- PSSGAPPPSK
SEQ ID NO. 21	CA-SQGTFTSDYSRQLEEEAVRLFIEWVRNTKRNRRNIA
SEQ ID NO. 22	DA-SQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRA <u>K</u> EFVQWLMNTK
SEQ ID NO. 23	HAibQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVCWLMNT
SEQ ID NO. 24	HAibQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTC
SEQ ID NO. 25	HAibQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> KRA <u>K</u> EFVQWLMNTC
SEQ ID NO. 26	HAibQGTFTSDYS <u>K</u> YLD <u>E</u> KRAKEFVQWLMNTC
SEQ ID NO. 27	HAibQGTFTSDYSKYLD <u>E</u> QAA <u>K</u> EFICWLMNT
SEQ ID NO. 28	HAibQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNT
SEQ ID NO. 29	H(d)SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRRNIA
SEQ ID NO. 30	CA-SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRRNIA
SEQ ID NO. 31	CA-(d)SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRRN IA
SEQ ID NO. 32	CA-AibQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTC
SEQ ID NO. 33	HAibQGTFTSDYAKYLDEKRAKEFVQWLMNTC
SEQ ID NO. 34	YAibQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTC

En la Tabla 1, los aminoácidos en negrita y subrayados representan la formación de anillos y los aminoácidos

representados por X significan un aminoácido no nativo, ácido alfa-metil-glutámico. Además, CA representa 4-imidazoacetilo y DA representa desamino-histidilo.

Ejemplo 2-2: Ensayo sobre la actividad *in vitro* de derivados de oxintomodulina

5 Con el fin de medir las eficacias antiobesidad de los derivados de oxintomodulina sintetizados en el Ejemplo 2-1, la actividad celular se midió *in vitro* utilizando las líneas celulares preparadas en los Ejemplos 1-1 y 1-2.

Las líneas celulares fueron las preparadas mediante la transfección de CHO (ovario de hámster chino) para expresar el gen del receptor de GLP-1 humano y el gen del receptor de glucagón, respectivamente. Por lo tanto, son adecuados para medir las actividades de GLP-1 y glucagón. Por lo tanto, la actividad de cada derivado de oxintomodulina se midió utilizando cada línea celular transformada.

10 Específicamente, cada línea celular se subcultivó dos o tres veces por semana, y se dividió en alícuotas en cada pocillo de una placa de 96 pocillos con una densidad de 1×10^5 , seguido de cultivo durante 24 horas.

15 Las células cultivadas se lavaron con tampón KRB y se suspendieron en 40 ml de tampón KRB que contenía IBMX 1 mM, y se dejaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Oxintomodulina (SEQ ID NO.1) y derivados de oxintomodulina (representados por las SEQ ID NO. 2-6, 8, 10-13, 17, 18, 23-25, 27, 28 y 32-34) se diluyeron de 1000 nM a 0,02 nM por dilución en serie 5 veces, y cada 40 ml de los mismos se añadieron a la células y se cultivaron a 37 °C durante 1 hora en una incubadora de CO₂. Después, se agregaron 20 ml de tampón de lisis celular para la lisis celular y los lisados celulares se aplicaron a un kit de ensayo de AMPc (Molecular Device, EE.UU) para medir las concentraciones de AMPc. Los valores de CE₅₀ se calcularon a partir de ellos, y se compararon entre sí. Los valores de CE₅₀ se muestran en la siguiente Tabla 2.

20 Tabla 2

[Tabla 2]

Comparación de las actividades <i>in vitro</i> para el receptor de GLP-1 y el receptor de glucagón entre la oxintomodulina y los derivados de la oxintomodulina		
SEQ ID NO.	CE ₅₀ (nM)	
	CHO/GLP-1R	CHO/GCGR
SEQ ID NO. 1	50 - 210	10 - 43
SEQ ID NO. 2	51,8	12,8
SEQ ID NO. 3	>1.000	637,7
SEQ ID NO. 4	5,5	>1.000
SEQ ID NO. 5	5,9	>1.000
SEQ ID NO. 6	500,1	>1.000
SEQ ID NO. 8	419,6	>1.000
SEQ ID NO. 10	>1.000	>1.000
SEQ ID NO. 11	>1.000	>1.000
SEQ ID NO. 12	>1.000	>1.000
SEQ ID NO. 13	>1.000	>1.000
SEQ ID NO. 17	97,9	>1.000
SEQ ID NO. 18	96,3	>1.000
SEQ ID NO. 23	2,46	5,8
SEQ ID NO. 24	1,43	6,95
SEQ ID NO. 25	1,9	1,3
SEQ ID NO. 27	2,8-5,5	3,1-5,6
SEQ ID NO. 28	3,1	0,3
SEQ ID NO. 32	14,25	17,3

(continuación)

Comparación de las actividades <i>in vitro</i> para el receptor de GLP-1 y el receptor de glucagón entre la oxintomodulina y los derivados de la oxintomodulina		
SEQ ID NO.	CE ₅₀ (nM)	
	CHO/GLP-1R	CHO/GCGR
SEQ ID NO. 33	2,20	80,2
SEQ ID NO. 34	12,5	1,0

Tal como se muestra en la Tabla 2, hubo derivados de oxintomodulina que mostraron excelentes actividades *in vitro* y diferentes proporciones de actividades en el receptor de GLP-1 y el receptor de glucagón, en comparación con la oxintomodulina nativa de SEQ ID NO. 1.

Se sabe que la oxintomodulina activa tanto el receptor DE GLP-1 como el receptor de glucagón para suprimir el apetito, Facilitar la lipólisis y promover la saciedad, mostrando de este modo un efecto antiobesidad. Los derivados de oxintomodulina de acuerdo con la presente invención muestran mayores actividades *in vitro* tanto en el receptor de GLP-1 como en el receptor de glucagón que la oxintomodulina de tipo salvaje y, por lo tanto, se pueden usar como agente terapéutico para la obesidad con eficacias más altas que la oxintomodulina conocida.

Ejemplo 3. Ensayo sobre la actividad *in vivo* de derivados de oxintomodulina

Con el fin de medir la actividad terapéutica *in vivo* de los derivados de oxintomodulina, los cambios en la ingesta de alimentos mediante la administración de derivados de oxintomodulina se examinaron en un ratón ob/ob usando oxintomodulina nativa como control.

Específicamente, se mantuvo en ayunas a ratones ob/ob obesos diabéticos utilizados habitualmente para probar la eficacia de los agentes terapéuticos para la obesidad y la diabetes durante 16 horas y se les administró 1 o 10 mg/kg de oxintomodulina, o 0,02, 0,1, 1 o 10 mg/kg del derivado de oxintomodulina de la SEQ ID NO. 2. Después, la ingesta de alimentos se examinó durante 2 horas (figura 1). La figura 1 es una gráfica que muestra los cambios en la ingesta de alimentos de acuerdo con la administración de la dosis de oxintomodulina o de un derivado de oxintomodulina. Tal como se muestra en la figura 1, la administración de 1 mg/kg de derivado de oxintomodulina mostró efectos inhibidores más excelentes en la ingesta de alimentos que la administración de 10 mg/kg de oxintomodulina.

En conjunto, los derivados de oxintomodulina de la presente invención tienen efectos antiobesidad mucho más altos que la oxintomodulina de tipo salvaje, aunque se administren a una dosis más baja, lo que indica una mejoría en los problemas de la oxintomodulina de tipo salvaje que muestra menores efectos antiobesidad y debe administrarse A una dosis alta tres veces al día.

Ejemplo 4: Preparación de conjugados que incluyen oxintomodulina y Fc de inmunoglobulina

En primer lugar, para la PEGilación del residuo de lisina en la posición 30 de la secuencia de aminoácidos de la oxintomodulina (SEQ ID NO. 1) con 3.4 K PropionALD (2) PEG (PEG con dos grupos propilaldehído, NOF, Japón), se hicieron reaccionar la oxintomodulina y 3.4 K PropionALD(2) PEG a una proporción molar de 1:12 con la concentración de proteína de 5 mg/ml a 4 °C durante 4,5 horas. En este momento, la reacción se realizó en una mezcla de disolventes de tampón de borato de sodio 100 mM (pH 9,0) e isopropanol al 45 % y a la misma se añadió cianoborohidruro de sodio 20 mM (cianoborohidruro (SCB, NaCNBH₃), NaCNBH₃) como agente reductor. Después de completarse la reacción, la mezcla de reacción se aplicó a una columna SOURCE S (XK16, Amersham Biosciences) para purificar la oxintomodulina que tiene lisina mono-pegilada (columna: SOURCE S (XK16, Amersham Biosciences), caudal: 2,0 ml/min, gradiente: A 0 → 3% 1 min B → 40 % 222 min B (A: Citrato Na 20 mM, pH 3,0 + 45 % de etanol, B: A + KCl 1M)) (FIG. 2a). La figura 2a es una gráfica que muestra el resultado de la purificación de oxintomodulina mono-PEGilada a través de una columna de purificación SOURCE S. La mono-PEGilación de los picos eluidos se examinó mediante SDS-PAGE y la selectividad de lisina se examinó mediante mapeo de péptidos usando Asp-N proteasa (Figura 2b). La figura 2b es una gráfica que muestra el resultado del mapeo de péptidos de oxintomodulina mono-PEGilada purificada.

A continuación, se hicieron reaccionar oxintomodulina mono-PEGilada purificada y Fc de inmunoglobulina a una proporción molar de 1:10 con la concentración de proteína de 20 mg/ml a 4 °C durante 16 horas. En este momento, la reacción se llevó a cabo en tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 6,0) y se añadió a la misma SCB 20 mM como agente reductor. Después de completarse la reacción, la mezcla de reacción se aplicó a una columna de purificación SOURCE 15Q para purificar conjugados que incluyen oxintomodulina y Fc de inmunoglobulina (columna: SOURCE 15Q (XK16, Amersham Biosciences), caudal: 2,0 ml/min, gradiente: A 0 → - 20 % 100 min B (A: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, B: A + NaCl 1 M)) (Figura 2c). La figura 2c es una gráfica que muestra el resultado de la purificación de conjugados que incluyen oxintomodulina y Fc de inmunoglobulina.

Ejemplo 5: Preparación de conjugados que incluyen derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 29) y Fc de inmunoglobulina

En primer lugar, para la PEGilación del residuo de lisina en la posición 30 de la secuencia de aminoácidos del derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 29) con 3.4 K PropionALD(2) PEG, se hicieron reaccionar el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 29) y 3.4 K PropionALD(2) PEG a una proporción molar de 1:12 con la concentración de proteína de 5 mg/ml a 4 °C durante 4,5 horas. En este momento, la reacción se llevó a cabo en una mezcla de disolventes de tampón de borato de sodio 100 mM (pH 9,0) e isopropanol al 45% y se añadió SCB 20 mM a la misma como agente reductor. Después de completarse la reacción, la mezcla de reacción se aplicó a una SOURCE S para purificar el derivado de oxintomodulina que tiene lisina mono-pegilada (Columna: SOURCE S, caudal: 2,0 ml/min, gradiente: A 0 → 3% 1 min B → 40 % 222 min B (A: Citrato de Na 20 mM, pH 3,0 + 45 % de etanol, B: A + KCl 1M)) (FIG. 3a). La figura 3a es una gráfica que muestra el resultado de la purificación de un derivado de oxintomodulina mono-PEGilada (SEQ ID NO. 29) a través de una columna de purificación SOURCE S.

A continuación, se hicieron reaccionar el derivado de oxintomodulina mono-PEGilada purificada (SEQ ID NO. 29) y la Fc de inmunoglobulina a una proporción molar de 1:10 con la concentración de proteína de 20 mg/ml a 4 °C durante 16 horas. En este momento, la reacción se llevó a cabo en tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 6,0) y se añadió a la misma SCB 20 mM como agente reductor. Después de completarse la reacción, la mezcla de reacción se aplicó a una columna de purificación SOURCE 15Q para purificar conjugados que incluyen oxintomodulina (SEQ ID NO. 29) y Fc de inmunoglobulina (columna: SOURCE 15Q, caudal: 2,0 ml/min, gradiente: A 0 → 20 % 100 min B (A: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, B: A + NaCl 1 M)) (Figura 3b). La figura 3b es una gráfica que muestra el resultado de la purificación de conjugados que incluyen derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 29) y Fc de inmunoglobulina.

Ejemplo 6: Preparación de conjugados que incluyen derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 30) y Fc de inmunoglobulina

En primer lugar, para la PEGilación del residuo de lisina en la posición 30 de la secuencia de aminoácidos del derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 30) con 3.4 K PropionALD(2) PEG, se hicieron reaccionar el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 30) y 3.4 K PropionALD(2) PEG a una proporción molar de 1:15 con la concentración de proteína de 3 mg/ml a 4 °C durante 4,5 horas. En este momento, la reacción se llevó a cabo en una mezcla de disolventes de tampón HEPES 100 mM (pH 7,5) e isopropanol al 45 % y se añadió SCB 20 mM a la misma como agente reductor. Después de completarse la reacción, la mezcla de reacción se aplicó a una columna de purificación SOURCE S para purificar el derivado de oxintomodulina que tiene lisina mono-pegilada (Columna: SOURCE S, caudal: 2,0 ml/min, gradiente: A 0 → 3% 1 min B → 40 % 222 min B (A: Citrato de Na 20 mM, pH 3,0 + 45 % de etanol, B: A + KCl 1M)) (FIG. 4a). La figura 4a es una gráfica que muestra el resultado de la purificación de un derivado de oxintomodulina mono-PEGilada (SEQ ID NO. 30) a través de una columna de purificación SOURCE S. La mono-PEGilación de los picos eluidos se examinó mediante SDS-PAGE y la selectividad de lisina se examinó mediante mapeo de péptidos usando Asp-N proteasa (Figura 4b). La figura 4b es una gráfica que muestra el resultado del mapeo de péptidos de un derivado de oxintomodulina mono-PEGilada purificada (SEQ ID NO. 30).

A continuación, se hicieron reaccionar el derivado de oxintomodulina mono-PEGilada purificada (SEQ ID NO. 30) y la Fc de inmunoglobulina a una proporción molar de 1:10 con la concentración de proteína de 20 mg/ml a 4 °C durante 16 horas. En este momento, la reacción se llevó a cabo en tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 6,0) y se añadió a la misma SCB 20 mM como agente reductor. Después de completarse la reacción, la mezcla de reacción se aplicó a una columna de purificación SOURCE 15Q para purificar conjugados que incluyen oxintomodulina (SEQ ID NO. 30) y Fc de inmunoglobulina (columna: SOURCE 15Q, caudal: 2,0 ml/min, gradiente: A 0 → 20 % 100 min B (A: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, B: A + NaCl 1 M)) (Figura 4c). La figura 4c es una gráfica que muestra el resultado de la purificación de conjugados que incluyen derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 30) y Fc de inmunoglobulina.

Ejemplo 7: Preparación de conjugados que incluyen derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 31) y Fc de inmunoglobulina

En primer lugar, para la PEGilación del residuo de lisina en la posición 30 de la secuencia de aminoácidos del derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 31) con 3.4 K PropionALD(2) PEG, se hicieron reaccionar el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 31) y 3.4 K PropionALD(2) PEG a una proporción molar de 1:15 con la concentración de proteína de 3 mg/ml a 4 °C durante 4,5 horas. En este momento, la reacción se llevó a cabo en una mezcla de disolventes de tampón HEPES 100 mM (pH 7,5) e isopropanol al 45 % y se añadió SCB 20 mM a la misma como agente reductor. Después de completarse la reacción, la mezcla de reacción se aplicó a una columna de purificación SOURCE S para purificar el derivado de oxintomodulina que tiene lisina mono-pegilada (Columna: SOURCE S, caudal: 2,0 ml/min, gradiente: A 0 → 3% 1 min B → 40 % 222 min B (A: Citrato de Na 20 mM, pH 3,0 + 45 % de etanol, B: A + KCl 1M)) (FIG. 5a). La figura 5a es una gráfica que muestra el resultado de la purificación de un derivado de oxintomodulina mono-PEGilada (SEQ ID NO. 31) a través de una columna de purificación SOURCE S.

A continuación, se hicieron reaccionar el derivado de oxintomodulina mono-PEGilada purificada (SEQ ID NO. 31) y la Fc de inmunoglobulina a una proporción molar de 1:10 con la concentración de proteína de 20 mg/ml a 4 °C

durante 16 horas. En este momento, la reacción se llevó a cabo en tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 6,0) y se añadió a la misma SCB 20 mM como agente reductor. Después de completarse la reacción, la mezcla de reacción se aplicó a una columna de purificación SOURCE 15Q para purificar conjugados que incluyen oxintomodulina (SEQ ID NO. 31) y Fc de inmunoglobulina (columna: SOURCE 15Q, caudal: 2,0 ml/min, gradiente: A 0 → 20 % 100 min B (A: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, B: A + NaCl 1 M)) (Figura 5b). La figura 5b es una gráfica que muestra el resultado de la purificación de conjugados que incluyen derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 31) y Fc de inmunoglobulina.

Ejemplo 8: Preparación de conjugados que incluyen derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 2) y Fc de inmunoglobulina

En primer lugar, para la PEGilación del residuo de lisina en la posición 30 de la secuencia de aminoácidos del derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 2) con 3.4 K PropionALD(2) PEG, se hicieron reaccionar el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 2) y 3.4 K PropionALD(2) PEG a una proporción molar de 1:10 con la concentración de proteína de 3 mg/ml a 4 °C durante 4 horas. En este momento, la reacción se llevó a cabo en una mezcla de disolventes de tampón HEPES 100 mM (pH 7,5) e isopropanol al 45 % y se añadió SCB 20 mM a la misma como agente reductor. Después de completarse la reacción, la mezcla de reacción se aplicó a una columna de purificación SOURCE S para purificar el derivado de oxintomodulina que tiene lisina mono-pegilada (Columna: SOURCE S, caudal: 2,0 ml/min, gradiente: A 0 → 3% 1 min B → 40 % 222 min B (A: Citrato de Na 20 mM, pH 3,0 + 45 % de etanol, B: A + KCl 1M)) (FIG. 6a). La figura 6a es una gráfica que muestra el resultado de la purificación de un derivado de oxintomodulina mono-PEGilada (SEQ ID NO. 2) a través de una columna de purificación SOURCE S. La mono-PEGilación de los picos eluidos se examinó mediante SDS-PAGE y la selectividad de lisina se examinó mediante mapeo de péptidos usando Asp-N proteasa (Figura 6b). La figura 6b es una gráfica que muestra el resultado del mapeo de péptidos de un derivado de oxintomodulina mono-PEGilada purificada (SEQ ID NO. 2).

A continuación, se hicieron reaccionar el derivado de oxintomodulina mono-PEGilada purificada (SEQ ID NO. 2) y la Fc de inmunoglobulina a una proporción molar de 1:8 con la concentración de proteína de 20 mg/ml a 4 °C durante 16 horas. En este momento, la reacción se llevó a cabo en tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 6,0) y se añadió a la misma SCB 20 mM como agente reductor. Después de completarse la reacción, la mezcla de reacción se aplicó a una columna de purificación SOURCE 15Q (Columna: SOURCE 15Q, caudal: 2,0 ml/min, gradiente: A 0 → 4 % 1 min B → 20 % 80 min B (A: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, B: A + 1 M NaCl)) (Figura 6c) y una columna de purificación SOURCE ISO (Columna: SOURCE ISO (XK16, Amersham Biosciences), caudal: 2,0 ml/min, gradiente: A 0 → 100 % 100 min B, (A: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, B: A + 1,3M AS) (FIG. 6d) para purificar conjugados que incluyen el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 2) y la Fc de inmunoglobulina. La figura 6c es gráfica que muestra el resultado de la purificación de conjugados que incluyen el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 2) y una región Fc de inmunoglobulina a través de una columna de purificación Source ISO y la figura 6d es gráfica que muestra el resultado de la purificación de conjugados que incluyen el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 2) y una región Fc de inmunoglobulina a través de una columna de purificación Source ISO.

Ejemplo 9: Preparación de conjugados que incluyen derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 3) y Fc de inmunoglobulina

En primer lugar, para la PEGilación del residuo de lisina en la posición 27 de la secuencia de aminoácidos del derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 3) con 3.4 K PropionALD(2) PEG, se hicieron reaccionar el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 3) y 3.4 K PropionALD(2) PEG a una proporción molar de 1:10 con la concentración de proteína de 3 mg/ml a 4 °C durante 4 horas. En este momento, la reacción se llevó a cabo en una mezcla de disolventes de tampón HEPES 100 mM (pH 7,5) e isopropanol al 45 % y se añadió SCB 20 mM a la misma como agente reductor. Después de completarse la reacción, la mezcla de reacción se aplicó a una columna de purificación SOURCE S para purificar el derivado de oxintomodulina que tiene lisina mono-pegilada (Columna: SOURCE S, caudal: 2,0 ml/min, gradiente: A 0 → 3% 1 min B → 40 % 222 min B (A: Citrato de Na 20 mM, pH 3,0 + 45 % de etanol, B: A + KCl 1M)) (FIG. 7a). La figura 7a es una gráfica que muestra el resultado de la purificación de un derivado de oxintomodulina mono-PEGilada (SEQ ID NO. 3) a través de una columna de purificación SOURCE S. La mono-PEGilación de los picos eluidos se examinó mediante SDS-PAGE y la selectividad de lisina se examinó mediante mapeo de péptidos usando Asp-N proteasa (Figura 7b). La figura 7b es una gráfica que muestra el resultado del mapeo de péptidos de un derivado de oxintomodulina mono-PEGilada purificada (SEQ ID NO. 3).

A continuación, se hicieron reaccionar el derivado de oxintomodulina mono-PEGilada purificada (SEQ ID NO. 3) y la Fc de inmunoglobulina a una proporción molar de 1:8 con la concentración de proteína de 20 mg/ml a 4 °C durante 16 horas. En este momento, la reacción se llevó a cabo en tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 6,0) y se añadió a la misma SCB 20 mM como agente reductor. Después de completarse la reacción, la mezcla de reacción se aplicó a una columna de purificación Butilo FF (Columna: Butilo FF (XK16, Amersham Biosciences), caudal: 2,0 ml/min, gradiente: B 0 → 100 % 5 min A (A: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, B: A + NaCl 1,5 M)) (Figura 7c) y una columna de purificación SOURCE 15Q (Columna: SOURCE 15Q, caudal: 2,0 ml/min, gradiente: A 0 → 4 % 1 min B → 20 % 80 min B (A: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, B: A + NaCl 1M)) (FIG. 7d) para purificar conjugados que incluyen el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 3) y la Fc de inmunoglobulina. La figura 7c es gráfica que muestra el resultado de la purificación de conjugados que incluyen el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 3) y una región Fc de inmunoglobulina a través de una columna de purificación Source Butilo FF y la figura 7d es gráfica que muestra el

resultado de la purificación de conjugados que incluyen el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 3) y una región Fc de inmunoglobulina a través de una columna de purificación SOURCE 15Q.

Ejemplo 10: Preparación de conjugados que incluyen derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 23) y Fc de inmunoglobulina

- 5 En primer lugar, para la PEGilación del residuo de cisteína en la posición 24 de la secuencia de aminoácidos del derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 23) con MAL-10K-ALD PEG (NOF., Japón), se hicieron reaccionar el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 23) y MAL-10K-ALD PEG a una proporción molar de 1:3 con la concentración de proteína de 3 mg/ml a temperatura ambiente durante 3 horas. En este momento, la reacción se llevó a cabo en tampón Tris 50 mM (pH 8,0) e isopropanol al 45 % y se añadió guanidina 1 mM a la misma. Después
- 10 de completarse la reacción, la mezcla de reacción se aplicó a una columna de purificación SOURCE S para purificar el derivado de oxintomodulina que tiene cisteína mono-pegilada (columna: SOURCE S, caudal: 2,0 ml/min, gradiente: A 0 → 100% 50 min B (A: Citrato de Na 20 mM, pH 3,0 + 45 % de etanol, B: A + KCl 1M)) (FIG. 8a). La figura 8a es una gráfica que muestra el resultado de la purificación de un derivado de oxintomodulina mono-PEGilada (SEQ ID NO. 23) a través de una columna de purificación SOURCE S.
- 15 A continuación, se hicieron reaccionar el derivado de oxintomodulina mono-PEGilada purificada (SEQ ID NO. 23) y la Fc de inmunoglobulina a una proporción molar de 1:5 con la concentración de proteína de 20 mg/ml a 4 °C durante 16 horas. En este momento, la reacción se llevó a cabo en tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 6,0) y se añadió a la misma SCB 20 mM como agente reductor. Después de completarse la reacción, la mezcla de reacción se aplicó a una columna de purificación SOURCE 15Q (columna: SOURCE 15Q, caudal: 2,0 ml/min, gradiente: A 0 → 4 % 1 min B → 20 % 80 min B(A: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, B: A + NaCl 1 M)) (Figura 8b) y una
- 20 columna de purificación Source ISO (columna: SOURCE ISO, caudal: 2,0 ml/min, gradiente: B 0 → 100 % 100 min A, (A: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, B: A + AS 1,1 M)) (FIG. 8c) para purificar conjugados que incluyen el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 23) y la Fc de inmunoglobulina. La figura 8b es gráfica que muestra el resultado de la purificación de conjugados que incluyen el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 23) y una región Fc de
- 25 inmunoglobulina a través de una columna de purificación SOURCE 15Q y la figura 8c es gráfica que muestra el resultado de la purificación de conjugados que incluyen el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 23) y una región Fc de inmunoglobulina a través de una columna de purificación Source ISO.

Ejemplo 11: Preparación de conjugados que incluyen derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 24) y Fc de inmunoglobulina

- 30 En primer lugar, para la PEGilación del residuo de cisteína en la posición 30 de la secuencia de aminoácidos del derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 24) con MAL-10K-ALD PEG, se hicieron reaccionar el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 24) y MAL-10K-ALD PEG a una proporción molar de 1:3 con la concentración de proteína de 3 mg/ml a temperatura ambiente durante 3 horas. En este momento, la reacción se llevó a cabo en tampón Tris 50 mM (pH 8,0) e isopropanol al 45 % y se añadió guanidina 1 mM a la misma. Después de completarse
- 35 la reacción, la mezcla de reacción se aplicó a una columna de purificación SOURCE S para purificar el derivado de oxintomodulina que tiene cisteína mono-pegilada (columna: SOURCE S, caudal: 2,0 ml/min, gradiente: A 0 → 100% 50 min B (A: Citrato de Na 20 mM, pH 3,0 + 45 % de etanol, B: A + KCl 1M)) (FIG. 9a). La figura 9a es una gráfica que muestra el resultado de la purificación de un derivado de oxintomodulina mono-PEGilada (SEQ ID NO. 24) a través de una columna de purificación SOURCE S.
- 40 A continuación, se hicieron reaccionar el derivado de oxintomodulina mono-PEGilada purificada (SEQ ID NO. 24) y la Fc de inmunoglobulina a una proporción molar de 1:5 con la concentración de proteína de 20 mg/ml a 4 °C durante 16 horas. En este momento, la reacción se llevó a cabo en tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 6,0) y se añadió a la misma SCB 20 mM como agente reductor. Después de completarse la reacción, la mezcla de reacción se aplicó a una columna de purificación SOURCE 15Q (columna: SOURCE 15Q, caudal: 2,0 ml/min, gradiente: A 0 → 4 % 1 min B → 20 % 80 min B(A: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, B: A + NaCl 1 M)) (Figura 9b) y una
- 45 columna de purificación Source ISO (columna: SOURCE ISO, caudal: 2,0 ml/min, gradiente: B 0 → 100 % 100 min A, (A: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, B: A + AS 1,1 M)) (FIG. 9c) para purificar conjugados que incluyen el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 24) y la Fc de inmunoglobulina. La figura 9b es gráfica que muestra el resultado de la purificación de conjugados que incluyen el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 24) y una región Fc de
- 50 inmunoglobulina a través de una columna de purificación SOURCE 15Q y la figura 9c es gráfica que muestra el resultado de la purificación de conjugados que incluyen el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 24) y una región Fc de inmunoglobulina a través de una columna de purificación Source ISO.

Ejemplo 12: Preparación de conjugados que incluyen derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 25) y Fc de inmunoglobulina

- 55 En primer lugar, para la PEGilación del residuo de cisteína en la posición 30 de la secuencia de aminoácidos del derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 25) con MAL-10K-ALD PEG, se hicieron reaccionar el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 25) y MAL-10K-ALD PEG a una proporción molar de 1:3 con la concentración de proteína de 3 mg/ml a temperatura ambiente durante 3 horas. En este momento, la reacción se llevó a cabo en tampón Tris 50 mM (pH 8,0) y se le añadió guanidina 1 M a la misma. Después de completarse la reacción, la

mezcla de reacción se aplicó a una columna de purificación SOURCE S para purificar el derivado de oxintomodulina que tiene cisteína mono-pegilada (columna: SOURCE S, caudal: 2,0 ml/min, gradiente: A 0 → 100% 50 min B (A: Citrato de Na 20 mM, pH 3,0 + 45 % de etanol, B: A + KCl 1M)) (FIG. 10a). La figura 10a es una gráfica que muestra el resultado de la purificación de un derivado de oxintomodulina mono-PEGilada (SEQ ID NO. 25) a través de una columna de purificación SOURCE S.

A continuación, se hicieron reaccionar el derivado de oxintomodulina mono-PEGilada purificada (SEQ ID NO. 25) y la Fc de inmunoglobulina a una proporción molar de 1:5 con la concentración de proteína de 20 mg/ml a 4 °C durante 16 horas. En este momento, la reacción se llevó a cabo en tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 6,0) y se añadió a la misma SCB 20 mM como agente reductor. Después de completarse la reacción, La mezcla de reacción se aplicó a una columna de purificación SOURCE 15Q (columna: SOURCE 15Q, caudal: 2,0 ml/min, gradiente: A 0 → 4 % 1 min B → 20 % 80 min B(A: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, B: A + NaCl 1 M)) (Figura 10b) y una columna de purificación Source ISO (columna: SOURCE ISO, caudal: 2,0 ml/min, gradiente: B 0 → 100 % 100 min A, (A: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, B: A + AS 1,1 M)) (FIG. 10c) para purificar conjugados que incluyen el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 25) y la Fc de inmunoglobulina. La figura 10b es gráfica que muestra el resultado de la purificación de conjugados que incluyen el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 25) y una región Fc de inmunoglobulina a través de una columna de purificación SOURCE 15Q y la figura 10c es gráfica que muestra el resultado de la purificación de conjugados que incluyen el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 25) y una región Fc de inmunoglobulina a través de una columna de purificación Source ISO.

Ejemplo 13: Preparación de conjugados que incluyen derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 28) y Fc de inmunoglobulina

En primer lugar, para la PEGilación del residuo de lisina en la posición 20 de la secuencia de aminoácidos del derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 28) con 3.4 K PropionALD(2) PEG, se hicieron reaccionar el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 28) y MAL-10K-ALD PEG a una proporción molar de 1:5 con la concentración de proteína de 3 mg/ml a 4°C durante 3 horas. En este momento, la reacción se llevó a cabo en tampón borato de Na, 50 mM (pH 9,0) y se añadió guanidina 2 M a la misma. Después de completarse la reacción, la mezcla de reacción se aplicó a una columna de purificación SOURCE S para purificar el derivado de oxintomodulina que tiene lisina mono-pegilada (columna: SOURCE S, caudal: 2,0 ml/min, gradiente: A 0 → 3% 1 min B → 40 % 222 min B (A: Citrato de Na 20 mM, pH 3,0 + 45 % de etanol, B: A + KCl 1M)) (FIG. 11a). La figura 11a es una gráfica que muestra el resultado de la purificación de un derivado de oxintomodulina mono-PEGilada (SEQ ID NO. 28) a través de una columna de purificación SOURCE S.

A continuación, se hicieron reaccionar el derivado de oxintomodulina mono-PEGilada purificada (SEQ ID NO. 28) y la Fc de inmunoglobulina a una proporción molar de 1:10 con la concentración de proteína de 20 mg/ml a 4 °C durante 16 horas. En este momento, la reacción se llevó a cabo en tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 6,0) y se añadió a la misma SCB 20 mM como agente reductor. Después de completarse la reacción, La mezcla de reacción se aplicó a una columna de purificación SOURCE 15Q (columna: SOURCE 15Q, caudal: 2,0 ml/min, gradiente: A 0 → 4 % 1 min B → 20 % 80 min B(A: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, B: A + NaCl 1 M)) (Figura 11b) y una columna de purificación Source ISO (columna: SOURCE ISO, caudal: 2,0 ml/min, gradiente: B 0 → 100 % 100 min A, (A: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, B: A + AS 1,1 M)) (FIG. 11c) para purificar conjugados que incluyen el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 28) y la Fc de inmunoglobulina. La figura 11b es gráfica que muestra el resultado de la purificación de conjugados que incluyen el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 28) y una región Fc de inmunoglobulina a través de una columna de purificación SOURCE 15Q y la figura 11c es gráfica que muestra el resultado de la purificación de conjugados que incluyen el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 28) y una región Fc de inmunoglobulina a través de una columna de purificación Source ISO.

Ejemplo 14: Preparación de conjugados que incluyen derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 32) y Fc de inmunoglobulina

En primer lugar, para la PEGilación del residuo de cisteína en la posición 30 de la secuencia de aminoácidos del derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 32) con MAL-10K-ALD PEG, se hicieron reaccionar el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 32) y MAL-10K-ALD PEG a una proporción molar de 1:3 con la concentración de proteína de 1 mg/ml a temperatura ambiente durante 3 horas. En este momento, la reacción se llevó a cabo en tampón Tris 50 mM (pH 8,0) y se añadió guanidina 2 M a la misma. Después de completarse la reacción, la mezcla de reacción se aplicó a una columna de purificación SOURCE S para purificar el derivado de oxintomodulina que tiene cisteína mono-pegilada (columna: SOURCE S, caudal: 2,0 ml/min, gradiente: A 0 → 100% 50 min B (A: Citrato de Na 20 mM, pH 3,0 + 45 % de etanol, B: A + KCl 1 M)).

A continuación, se hicieron reaccionar el derivado de oxintomodulina mono-PEGilada purificada (SEQ ID NO. 32) y la Fc de inmunoglobulina a una proporción molar de 1:8 con la concentración de proteína de 20 mg/ml a 4 °C durante 16 horas. En este momento, la reacción se llevó a cabo en tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 6,0) y se añadió a la misma SCB 20 mM como agente reductor. Después de completarse la reacción, La mezcla de reacción se aplicó a una columna de purificación SOURCE 15Q (columna: SOURCE 15Q, caudal: 2,0 ml/min, gradiente: A 0 → 4 % 1 min B → 20 % 80 min B(A: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, B: A + NaCl 1 M)) y una columna de purificación Source ISO (columna: SOURCE ISO, caudal: 2,0 ml/min, gradiente: B 0 → 100 % 100 min A, (A: Tris-

HCl 20 mM, pH 7,5, B: A + 1.1M AS) para purificar conjugados que incluyen el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 32) y la Fc de inmunoglobulina.

Ejemplo 15: Preparación de conjugados que incluyen el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 33) y la Fc de inmunoglobulina

- 5 En primer lugar, para la PEGilación del residuo de cisteína en la posición 30 de la secuencia de aminoácidos del derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 33) con MAL-10K-ALD PEG, se hicieron reaccionar el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 33) y MAL-10K-ALD PEG a una proporción molar de 1:1 con la concentración de proteína de 1 mg/ml a temperatura ambiente durante 3 horas. En este momento, la reacción se llevó a cabo en tampón Tris 50 mM (pH 8,0) y se añadió guanidina 2 M a la misma. Después de completarse la reacción, la mezcla de reacción se aplicó a una columna de purificación SOURCE S para purificar el derivado de oxintomodulina que tiene cisteína mono-pegilada (columna: SOURCE S, caudal: 2,0 ml/min, gradiente: A 0 → 100% 50 min B (A: Citrato de Na 20 mM, pH 3,0 + 45 % de etanol, B: A + KCl 1 M)).

- 15 A continuación, se hicieron reaccionar el derivado de oxintomodulina mono-PEGilada purificada (SEQ ID NO. 33) y la Fc de inmunoglobulina a una proporción molar de 1:5 con la concentración de proteína de 20 mg/ml a 4 °C durante 16 horas. En este momento, la reacción se llevó a cabo en tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 6,0) y se añadió a la misma SCB 20 mM como agente reductor. Después de completarse la reacción, la mezcla de reacción se aplicó a una columna de purificación SOURCE 15Q (columna: SOURCE 15Q, caudal: 2,0 ml/min, gradiente: A 0 → 4 % 1 min B → 20 % 80 min B(A: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, B: A + NaCl 1 M)) y una columna de purificación Source ISO (columna: SOURCE ISO, caudal: 2,0 ml/min, gradiente: B 0 → 100 % 100 min A, (A: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, B: A + 1.1M AS) para purificar conjugados que incluyen el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 33) y la Fc de inmunoglobulina.

Ejemplo 16: Preparación de conjugados que incluyen derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 34) y Fc de inmunoglobulina

- 25 En primer lugar, para la PEGilación del residuo de cisteína en la posición 30 de la secuencia de aminoácidos del derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 34) con MAL-10K-ALD PEG, se hicieron reaccionar el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 34) y MAL-10K-ALD PEG a una proporción molar de 1:1 con la concentración de proteína de 3 mg/ml a temperatura ambiente durante 3 horas. En este momento, la reacción se llevó a cabo en tampón Tris 50 mM (pH 8,0) y se le añadió guanidina 1 M a la misma. Después de completarse la reacción, la mezcla de reacción se aplicó a una columna de purificación SOURCE S para purificar el derivado de oxintomodulina que tiene cisteína mono-pegilada (columna: SOURCE S, caudal: 2,0 ml/min, gradiente: A 0 → 100% 50 min B (A: Citrato de Na 20 mM, pH 3,0 + 45 % de etanol, B: A + KCl 1 M)).

- 35 A continuación, se hicieron reaccionar el derivado de oxintomodulina mono-PEGilada purificada (SEQ ID NO. 34) y la Fc de inmunoglobulina a una proporción molar de 1:5 con la concentración de proteína de 20 mg/ml a 4 °C durante 16 horas. En este momento, la reacción se llevó a cabo en tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 6,0) y se añadió a la misma SCB 20 mM como agente reductor. Después de completarse la reacción, la mezcla de reacción se aplicó a una columna de purificación SOURCE 15Q (columna: SOURCE 15Q, caudal: 2,0 ml/min, gradiente: A 0 → 4 % 1 min B → 20 % 80 min B(A: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, B: A + NaCl 1 M)) y una columna de purificación Source ISO (columna: SOURCE ISO, caudal: 2,0 ml/min, gradiente: B 0 → 100 % 100 min A, (A: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, B: A + 1.1M AS) para purificar conjugados que incluyen el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 34) y la Fc de inmunoglobulina.

Ejemplo 17: Actividad *in vitro* de conjugados de derivado de oxintomodulina-Fc de inmunoglobulina

Con el fin de medir las eficacias antiobesidad de los conjugados que incluyen la oxintomodulina o el derivado de oxintomodulina y la Fc de inmunoglobulina que se prepararon en los ejemplos anteriores, se realizaron experimentos de la misma forma que en el ejemplo 2-2.

- 45 Específicamente, cada uno de los transformantes preparados en los ejemplos 1-1 y 1-2 se subcultivó dos o tres veces a la semana, y se dividió en alícuotas en cada pocillo de una placa de 96 pocillos con una densidad de 1×10^5 , seguido de cultivo durante 24 horas. Cada uno de los transformantes cultivados se lavó con tampón KRB y se suspendió en 40 ml de tampón KRB que contenía IBMX 1 mM y se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos. los conjugados de GLP-1, glucagón y derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 23, 24, 25, 32, 33 o 34)-Fc de inmunoglobulina se diluyeron de 1000 nM a 0,02 nM mediante dilución en serie por 5 y cada 40 ml del mismo se añadió a cada transformante y se cultivó a 37 °C durante 1 hora en un incubador de CO₂. Después, se añadieron 20 ml de tampón de lisis celular para la lisis celular y los lisados celulares se aplicaron a un kit de ensayo de AMPc (Molecular Device, EE.UU.) para medir las concentraciones de AMPc usando un Victor (Perkin Elmer, EE.UU.). Los valores de CE₅₀ se calcularon a partir de ellos, y se compararon entre sí (Tabla 3).

55

Tabla 3

[Tabla 3]

Actividad <i>in vitro</i> de conjugados de derivado de oxintomodulina-Fc de inmunoglobulina		
SEQ ID NO.	CE ₅₀ (nM)	
	CHO/GLP-1R	CHO/GCGR
GLP-1	1,7 ± 0,82	> 1.000
Glucagón	> 1.000	1,7 ± 1,69
Conjugados de SEQ ID NO. 23 - Fc	5,4	15,8
Conjugados de SEQ ID NO. 24 - Fc	8,4	76,8
Conjugados de SEQ ID NO. 25 - Fc	5,5	9,4
Conjugados de SEQ ID NO. 32 - Fc	68,7	11,9
Conjugados de SEQ ID NO. 33 - Fc	11,7	85,9
Conjugados de SEQ ID NO. 34 - Fc	168,0	8,0

Tal como se muestra en la Tabla 3, se descubrió que los conjugados de derivado de oxintomodulina-Fc de inmunoglobulina muestran la actividad *in vitro* de los receptores de GLP-1 y glucagón.

5 Ejemplo 18: Actividad *in vivo* de conjugados de derivado de oxintomodulina-inmunoglobulina

Se examinó si los conjugados de derivados de oxintomodulina-Fc de inmunoglobulina muestran excelentes efectos de reducción de peso corporal *in vivo*.

10 Específicamente, se alimentaron ratones C57BL/6 normales de 6 semanas de edad con una dieta rica en grasas de 60 kcal durante 24 semanas para aumentar su peso corporal en un promedio de aproximadamente 50 g y se les administró por vía subcutánea conjugados de derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO. 23, 24 o 25)-Fc de inmunoglobulina a una dosis de 0,03 o 0,06 mg/kg/semana durante 3 semanas. Posteriormente, se midieron los cambios en el peso corporal de los ratones (FIG. 12 y FIG. 13). La figura 12 y la figura 13 son gráficos que muestran los cambios en el peso corporal de los ratones de acuerdo con el tipo y la dosis de administración de los conjugados de derivado de oxintomodulina-Fc de inmunoglobulina. Como se muestra en la FIG. 12 y FIG. 13, a medida que
15 aumentaba la dosis de administración de los conjugados de derivado de oxintomodulina-Fc de inmunoglobulina, el peso corporal se redujo en proporción directa, a pesar de que hubo diferencias entre los tipos de conjugados de derivado de oxintomodulina-Fc de inmunoglobulina, lo que sugiere que los conjugados de derivado de oxintomodulina-Fc de inmunoglobulina reducen el peso corporal de una manera dependiente de la dosis.

<110> HANMI SCIENCE CO., LTD.

20 <120> UN CONJUGADO QUE COMPRENDE OXINTOMODULINA Y UN FRAGMENTO DE INMUNOGLOBULINA, Y USO DE LAS MISMAS

<130> OPA12063/PCT

<150> KR 10-2011-0058852

<151> 17/06/2011

25 <160> 53

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 37

<212> PRT

30 <213> oxintomodulina

<400> 1

ES 2 710 356 T3

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala
35

<210> 2
<211> 37
<212> PRT
<213> derivado de oxintomodulina

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)
<223> Este "H" se refiere a un derivado de histidina, 4-imidazoacetilo.

<400> 2

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala
35

<210> 3
<211> 39
<212> PRT
<213> derivado de oxintomodulina

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)
<223> Este "H" se refiere a un derivado de histidina, 4-imidazoacetilo.

<400> 3

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Ala Trp Leu Lys Asn Thr Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 4
<211> 39
<212> PRT
<213> derivado de oxintomodulina

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)
<223> Este "H" se refiere a un derivado de histidina, 4-imidazoacetilo.

<400> 4

ES 2 710 356 T3

His Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 5
<211> 39
<212> PRT
<213> derivado de oxintomodulina

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)
<223> Este "H" se refiere a un derivado de histidina, 4-imidazoacetilo.

<400> 5

His Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 6
<211> 42
<212> PRT
<213> derivado de oxintomodulina

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)
<223> Este "H" se refiere a un derivado de histidina, 4-imidazoacetilo.

<400> 6

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ala Ala His Ser Gln Gly Thr
20 25 30

Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp
35 40

<210> 7
<211> 30
<212> PRT
<213> derivado de oxintomodulina

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)
<223> Este "H" se refiere a un derivado de histidina, 4-imidazoacetilo.

<400> 7

ES 2 710 356 T3

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr Lys
20 25 30

<210> 8
<211> 29
<212> PRT
<213> derivado de oxintomodulina

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)
<223> Este "H" se refiere a un derivado de histidina, 4-imidazoacetilo.

<400> 8

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Leu Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Lys
20 25

<210> 9
<211> 37
<212> PRT
<213> derivado de oxintomodulina

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)
<223> Este "H" se refiere a un derivado de histidina, 4-imidazoacetilo.

<220>
<221> VARIANTE
<222> (20)
<223> Xaa = ácido aminoisobutírico

<400> 9

His Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Xaa Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala
35

<210> 10
<211> 40
<212> PRT
<213> derivado de oxintomodulina

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)
<223> Este "H" se refiere a un derivado de histidina, 4-imidazoacetilo.

<400> 10

ES 2 710 356 T3

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys
 35 40

<210> 11
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> derivado de oxintomodulina

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)
 <223> Este "H" se refiere a un derivado de histidina, 4-imidazoacetilo.

<400> 11

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ala Ala His Ser Gln Gly Thr
 20 25 30
 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Lys
 35 40

<210> 12
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> derivado de oxintomodulina
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)
 <223> Este "H" se refiere a un derivado de histidina, 4-imidazoacetilo.

<400> 12

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met
 20 25 30
 Glu Glu Glu Ala Val Lys
 35

<210> 13
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> derivado de oxintomodulina
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)
 <223> Este "H" se refiere a un derivado de histidina, 4-imidazoacetilo.

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (16)
 <223> Xaa = ácido aminoisobutírico

<220>

ES 2 710 356 T3

<221> VARIANTE

<222> (20)

<223> Xaa = ácido aminoisobutírico

<400> 13

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Xaa
1 5 10 15

Glu Ala Val Xaa Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr Lys
20 25 30

5

<210> 14

<211> 37

<212> PRT

<213> derivado de oxintomodulina

10

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)

<223> Este "H" se refiere a un derivado de histidina, 4-imidazoacetilo.

15

<220>

<221> VARIANTE

<222> (20)

<223> Xaa = ácido aminoisobutírico

20

<220>

<221> VARIANTE

<222> (24)

<223> Xaa = ácido aminoisobutírico

<400> 14

His Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Xaa Leu Phe Ile Xaa Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala
35

25

<210> 15

<211> 37

<212> PRT

<213> derivado de oxintomodulina

30

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)

<223> Este "H" se refiere a un derivado de histidina, 4-imidazoacetilo.

35

<220>

<221> VARIANTE

<222> (24)

<223> Xaa = ácido aminoisobutírico

<400> 15

ES 2 710 356 T3

His Gly Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Xaa Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
 20 25 30
 Arg Asn Asn Ile Ala
 35

<210> 16
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> derivado de oxintomodulina
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)
 <223> Este "H" se refiere a un derivado de histidina, 4-imidazoacetilo.

<400> 16
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Leu
 20 25 30
 Glu Lys

<210> 17
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> derivado de oxintomodulina
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)
 <223> Este "H" se refiere a un derivado de histidina, 4-imidazoacetilo.

<400> 17
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Thr Lys Arg Asn
 20 25 30
 Arg Asn Asn Ile Ala
 35

<210> 18
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> derivado de oxintomodulina
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)
 <223> Este "H" se refiere a un derivado de histidina, 4-imidazoacetilo.

<400> 18

ES 2 710 356 T3

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys
 35 40

<210> 19
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> derivado de oxintomodulina

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)
 <223> Este "H" se refiere a un derivado de histidina, 4-imidazoacetilo.

<400> 19

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Lys Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Thr Lys Arg Asn
 20 25 30
 Arg Asn Asn Ile Ala
 35

<210> 20
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> derivado de oxintomodulina
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)
 <223> Este "H" se refiere a un derivado de histidina, 4-imidazoacetilo.

<400> 20

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Lys Leu Phe Ile Glu Trp Ile Arg Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys
 35 40

<210> 21
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> derivado de oxintomodulina
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)
 <223> Este "H" se refiere a un derivado de histidina, 4-imidazoacetilo.

<400> 21

ES 2 710 356 T3

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Leu Glu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Val Arg Asn Thr Lys Arg Asn
 20 25 30
 Arg Asn Asn Ile Ala
 35

<210> 22
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> derivado de oxintomodulina

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)
 <223> Este "H" se refiere a un derivado de histidina, desamino-histidilo.

<400> 22

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys
 20 25 30

<210> 23
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> derivado de oxintomodulina

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)
 <223> Xaa = ácido aminoisobutírico

<400> 23

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Cys Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 24
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> derivado de oxintomodulina

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)
 <223> Xaa = ácido aminoisobutírico

<400> 24

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
 20 25 30

<210> 25
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> derivado de oxintomodulina

ES 2 710 356 T3

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)
 <223> Xaa = ácido aminoisobutírico
 5 <400> 25
 His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
 20 25 30
 <210> 26
 <211> 30
 <212> PRT
 10 <213> derivado de oxintomodulina
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)
 <223> Xaa = ácido aminoisobutírico
 15 <400> 26
 His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
 20 25 30
 <210> 27
 <211> 29
 <212> PRT
 20 <213> derivado de oxintomodulina'
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)
 <223> Xaa = ácido aminoisobutírico
 25 <400> 27
 His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Cys Trp Leu Met Asn Thr
 20 25
 <210> 28
 <211> 29
 <212> PRT
 30 <213> derivado de oxintomodulina
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)
 <223> Xaa = ácido aminoisobutírico
 35 <400> 28

ES 2 710 356 T3

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
20 25

<210> 29
<211> 37
<212> PRT
<213> derivado de oxintomodulina

<220>
<221> VARIANTE
<222> (2)
<223> Esta "S" se refiere un variante de serina, d-serina.

<400> 29

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala
35

<210> 30
<211> 37
<212> PRT
<213> derivado de oxintomodulina

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)
<223> Este "H" se refiere a un derivado de histidina, 4-imidazoacetilo

<400> 30

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala
35

<210> 31
<211> 37
<212> PRT
<213> derivado de oxintomodulina

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)
<223> Este "H" se refiere a un derivado de histidina, 4-imidazoacetilo

<220>
<221> VARIANTE
<222> (2)
<223> Esta "S" se refiere un variante de serina, d-serina.

<400> 31

ES 2 710 356 T3

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala
35

<210> 32

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> derivado de oxintomodulina

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)

<223> Este "H" se refiere a un derivado de histidina, 4-imidazoacetilo.

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)

<223> Xaa = ácido aminoisobutírico

<400> 32

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
20 25 30

<210> 33

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> derivado de oxintomodulina

<220>

<221> VARIANTE

<222> (2)

<223> Xaa = ácido aminoisobutírico

<400> 33

His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
20 25 30

<210> 34

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> derivado de oxintomodulina

<220>

ES 2 710 356 T3

<221> VARIANTE

<222> (2)

<223> Xaa = ácido aminoisobutírico

<400> 34

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
1 5 10 15

Lys Arg Ala Lys Glu Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Cys
20 25 30

<210> 35

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> grupo R2

<400> 35

Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala
1 5

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> grupo R2

<400> 36

Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
1 5 10

<210> 37

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> grupo R2

<400> 37

Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys
1 5 10

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> grupo R2

<400> 38

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp
1 5 10 15

<210> 39

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 710 356 T3

<223> grupo R2

<400> 39

	His	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Leu	Asp	Lys
	1				5					10					15	

<210> 40
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> grupo R2

5

<400> 40

	His	Gly	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Ser	Lys	Gln	Met	Glu	Glu
	1				5					10					15	

Glu Ala Val Lys
 20

<210> 41
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> grupo A o B

10

<400> 41

	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asp	Ser	Arg
	1				5					10					15	

Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 42
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> grupo A o B

15

<400> 42

	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asp	Glu	Glu
	1				5					10					15	

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 43
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> grupo A o B

20

<400> 43

25

30

ES 2 710 356 T3

		Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asp	Glu	Arg
		1				5					10					15	
		Arg	Ala	Gln	Asp	Phe	Val	Ala	Trp	Leu	Lys	Asn	Thr				
					20					25							
5		<210> 44 <211> 28 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> grupo A o B <400> 44															
		Gly	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Leu	Glu	Glu	Glu
		1				5					10					15	
		Ala	Val	Arg	Leu	Phe	Ile	Glu	Trp	Leu	Lys	Asn	Gly				
					20					25							
10		<210> 45 <211> 28 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> grupo A o B <400> 45															
15		<210> 46 <211> 26 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> grupo A o B <400> 46															
		Gly	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Arg	Gln	Met	Glu	Glu	Glu
		1				5					10					15	
		Ala	Val	Arg	Leu	Phe	Ile	Glu	Trp	Leu	Lys	Asn	Gly				
					20					25							
20		<210> 47 <211> 28 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> grupo A o B <400> 47															
		Gly	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Ser	Arg	Gln	Met	Glu	Glu	Glu
		1				5					10					15	
		Ala	Val	Arg	Leu	Phe	Ile	Glu	Trp	Ala	Ala						
25					20					25							
30		<210> 47 <211> 28 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> grupo A o B <400> 47															

ES 2 710 356 T3

Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Gln Met Glu Glu Glu
1 5 10 15

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Met Asn Gly
20 25

<210> 48
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> grupo B

<400> 48

Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Arg Gln Met Glu Glu Glu
1 5 10 15

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp
20

<210> 49
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> grupo B

<400> 49

Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp
1 5 10

<210> 50
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 50
cccggccccc gcgccgcta ttcgaaatac 30

<210> 51
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 51
gaacggtccg gaggacgtcg actcttaaga tag 33

<210> 52
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 52
cagcgacacc gaccgtcccc cgtacttaa ggcc 34

<210> 53

<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <223> cebador

<400> 53
ctaaccgact ctcggggaag actgagctcg cc 32

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado que comprende un derivado de oxintomodulina que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24, 25 o 26, una región Fc de inmunoglobulina y un polímero no peptídico, en el que el polímero no peptídico une covalentemente el derivado de oxintomodulina y la región Fc de inmunoglobulina.
- 5 2. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el derivado de oxintomodulina comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24.
3. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los aminoácidos en las posiciones 12 y 16 o 16 y 20 del derivado de oxintomodulina forman un anillo.
4. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el derivado de oxintomodulina comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25.
- 10 5. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el derivado de oxintomodulina comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26.
6. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el derivado de oxintomodulina es capaz de activar el receptor de GLP-1 y el receptor de glucagón.
- 15 7. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el conjugado tiene efectos antiobesidad.
8. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el polímero no peptídico es polietilenglicol, polipropilenglicol, un copolímero de etilenglicol-propilenglicol, un poliol polioxiethylado, alcohol polivinílico, un polisacárido, éter polivinilético, poli(ácido láctico) (PLA), ácido poliláctico-glicólico (PGA), un polímero lipídico, ácido hialurónico o una combinación de los mismos.
- 20 9. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el polímero no peptídico es polietilenglicol.
10. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el polisacárido es dextrano, una quitina o una combinación de los mismos.
11. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que un extremo del polímero no peptídico está unido a un grupo amina o un grupo tiol de la región Fc de inmunoglobulina y el otro extremo del polímero no peptídico está unido a un grupo amina o un grupo tiol del derivado de oxintomodulina.
- 25 12. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el polímero no peptídico tiene grupos reactivos capaces de unirse con la región Fc de inmunoglobulina y el derivado de oxintomodulina en ambos extremos.
13. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el grupo reactivo se selecciona de un grupo aldehído, un grupo propionaldehído, un grupo butiraldehído, un grupo maleimida o un derivado de succinimida.
14. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 12, en el que los grupos reactivos en ambos extremos son iguales o diferentes entre sí.
15. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc no glicosilada.
- 35 16. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que la región Fc de inmunoglobulina es un dominio H1, un dominio CH2, un dominio CH3 y un dominio CH4; un dominio CH1 y un dominio CH2; un dominio CH1 y un dominio CH3; un dominio CH2 y un dominio CH3; una combinación de uno o más dominios y una región bisagra de inmunoglobulina o una porción de la misma; o un dímero de cada dominio de las regiones constantes de la cadena pesada y la región constante de la cadena ligera.
- 40 17. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que la región Fc de inmunoglobulina es un derivado en el que se deleciona una región capaz de formar un enlace disulfuro, se eliminan ciertos restos de aminoácidos en el extremo N-terminal de una forma Fc nativa, se añade un residuo de metionina en el extremo N-terminal de una forma Fc nativa, se deleciona un sitio de unión al complemento, o se deleciona un sitio de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (CCDA).
- 45 18. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc derivada de IgG, IgA, IgD, IgE o IgM.
19. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 18, en el que la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc de IgG4.
- 50 20. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en el que la región Fc de

inmunoglobulina es la región Fc aglicosilada derivada de IgG4 humana.

21. Una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de la obesidad, que comprende el conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20.

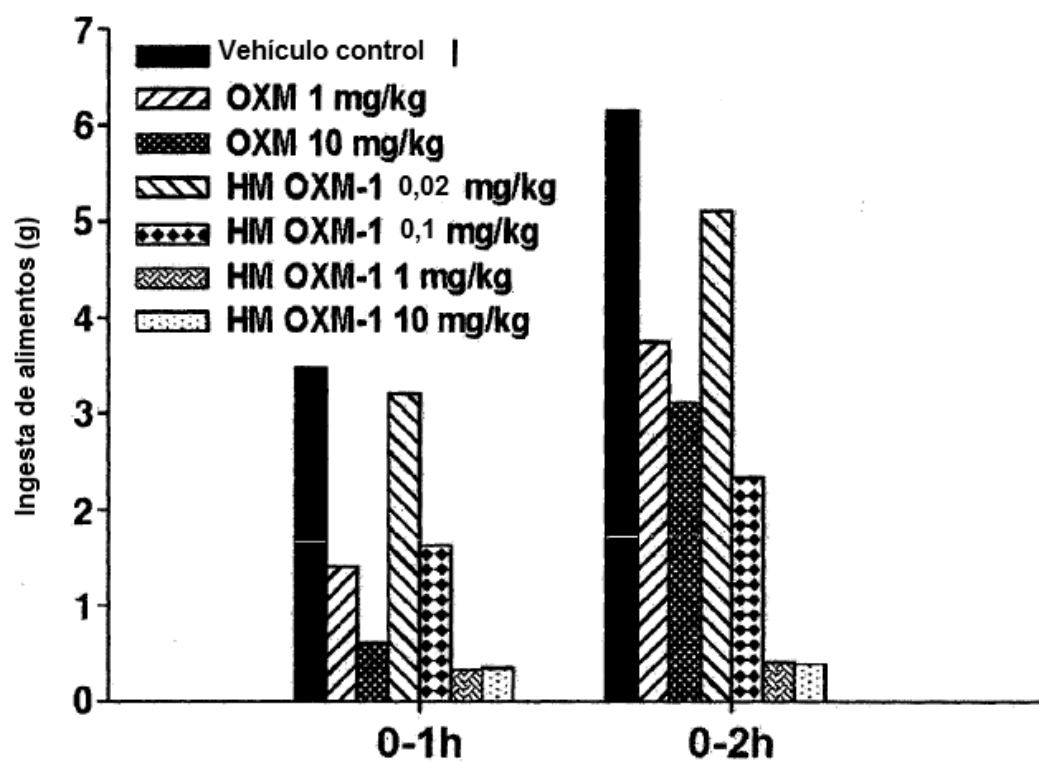
5 22. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 21, que comprende adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

23. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 21 o 22, en la que la composición se administra sola o en combinación con otras formulaciones farmacéuticas que presentan efectos profilácticos o terapéuticos en la obesidad.

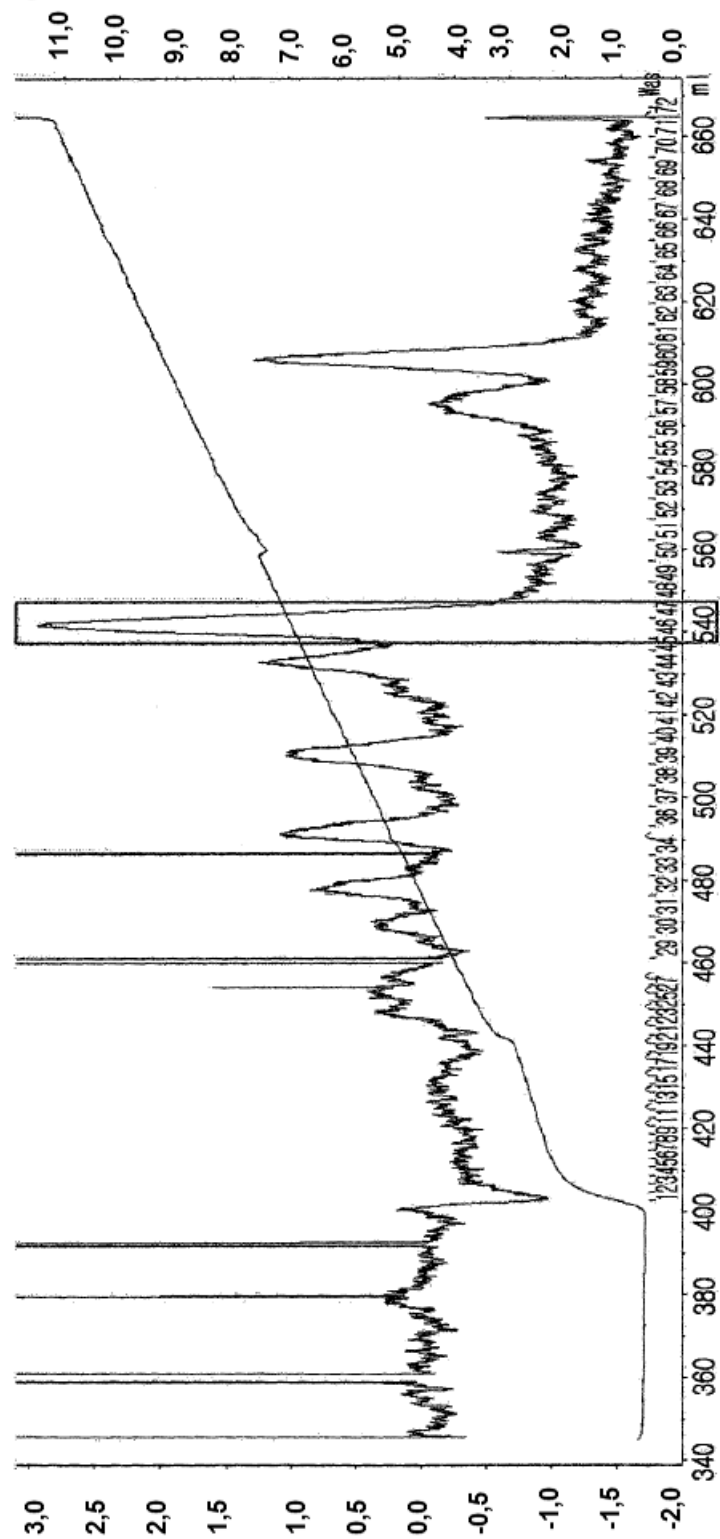
10 24. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, en la que la formulación farmacéutica es un agonista del receptor de GLP-1, un agonista del receptor de leptina, un inhibidor de DPP-IV, un antagonista del receptor Y5, un antagonista del receptor de hormona concentradora de melanina (MCH), un agonista del receptor Y2/3, un agonista del receptor MC3/4, un inhibidor de lipasa gástrica/pancreática, un agonista de 5HT2c, un agonista del receptor β 3A, un agonista del receptor de amilina, un antagonista de ghrelina o un antagonista del receptor de ghrelina.

15 25. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, para su uso en la prevención tratamiento de la obesidad.

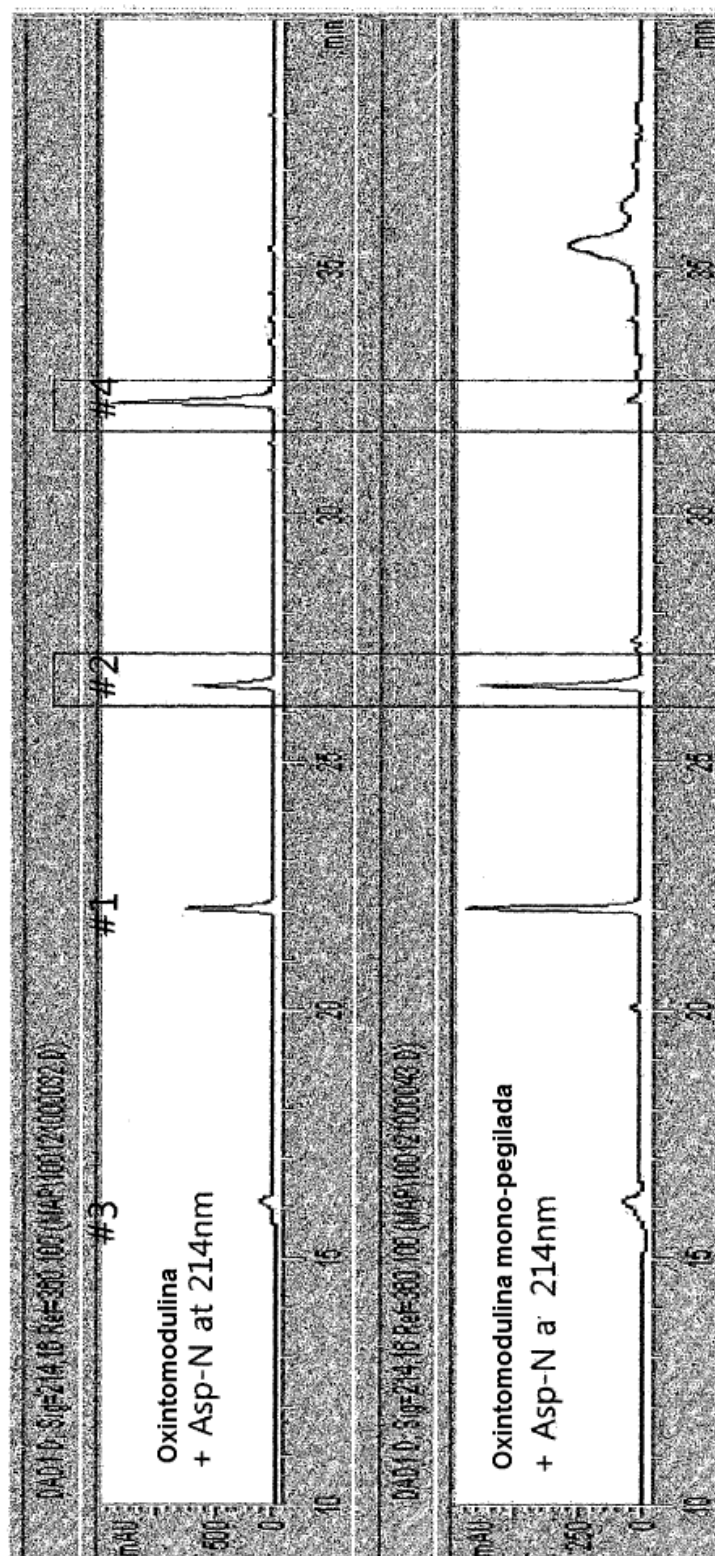
[Fig. 1]



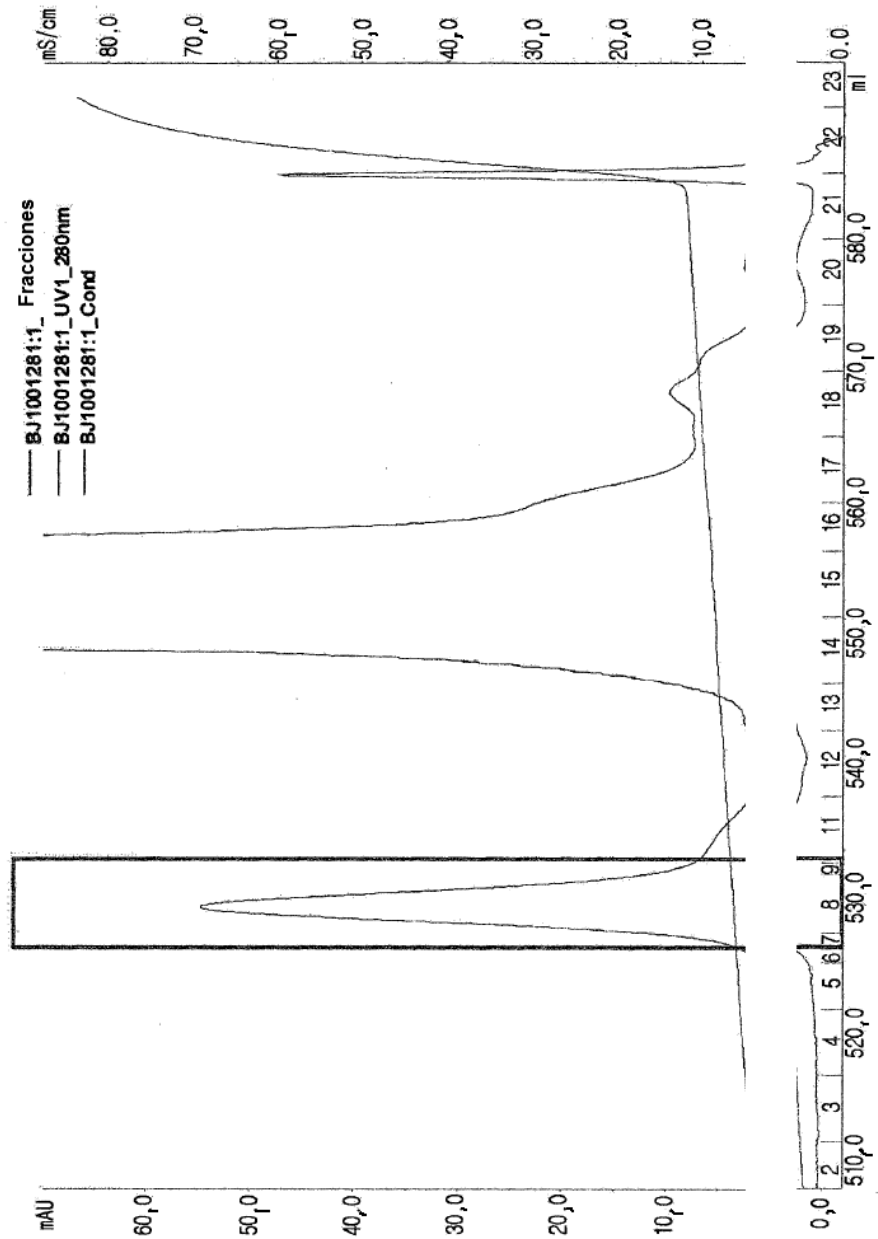
[Fig. 2a]



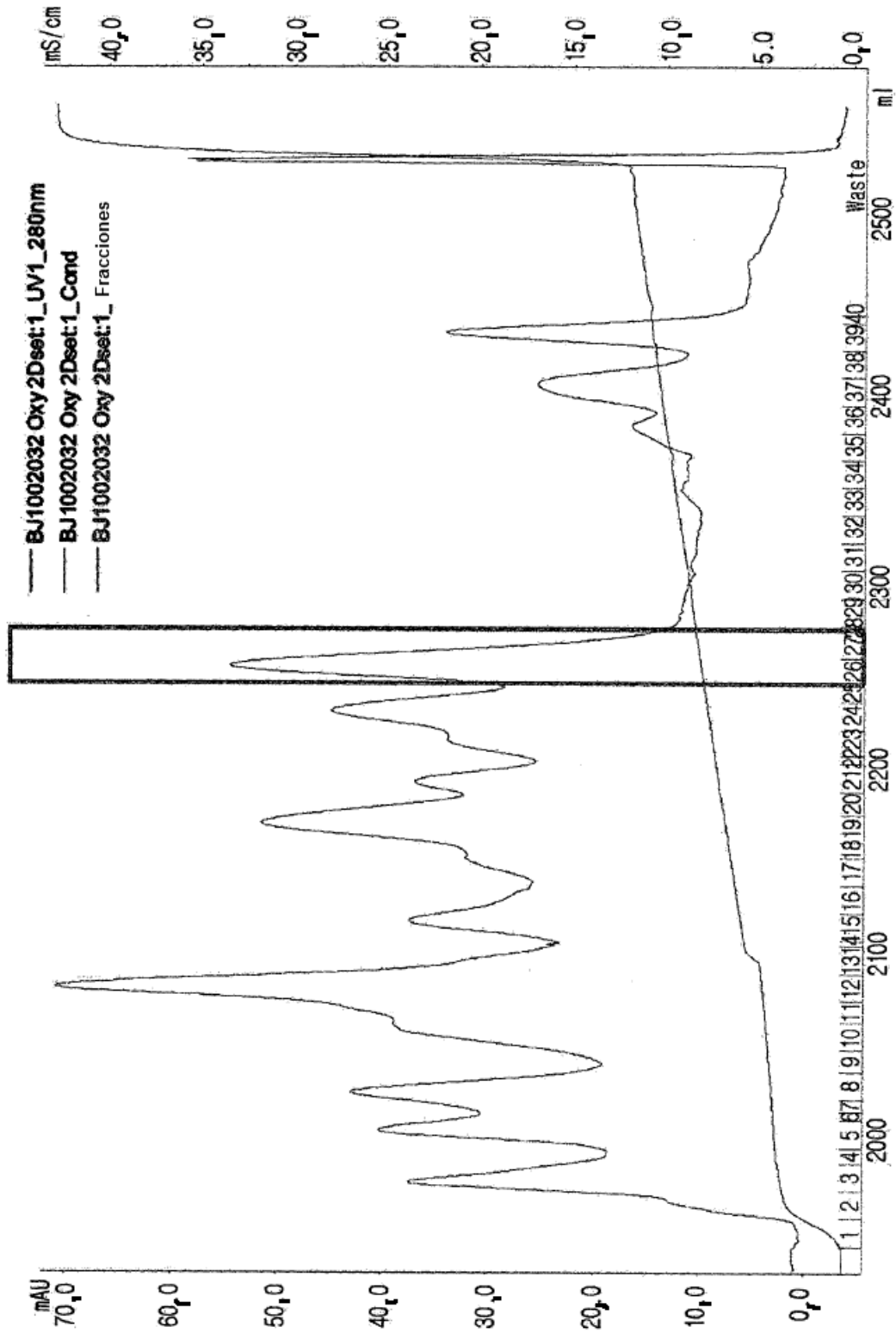
[Fig. 2b]



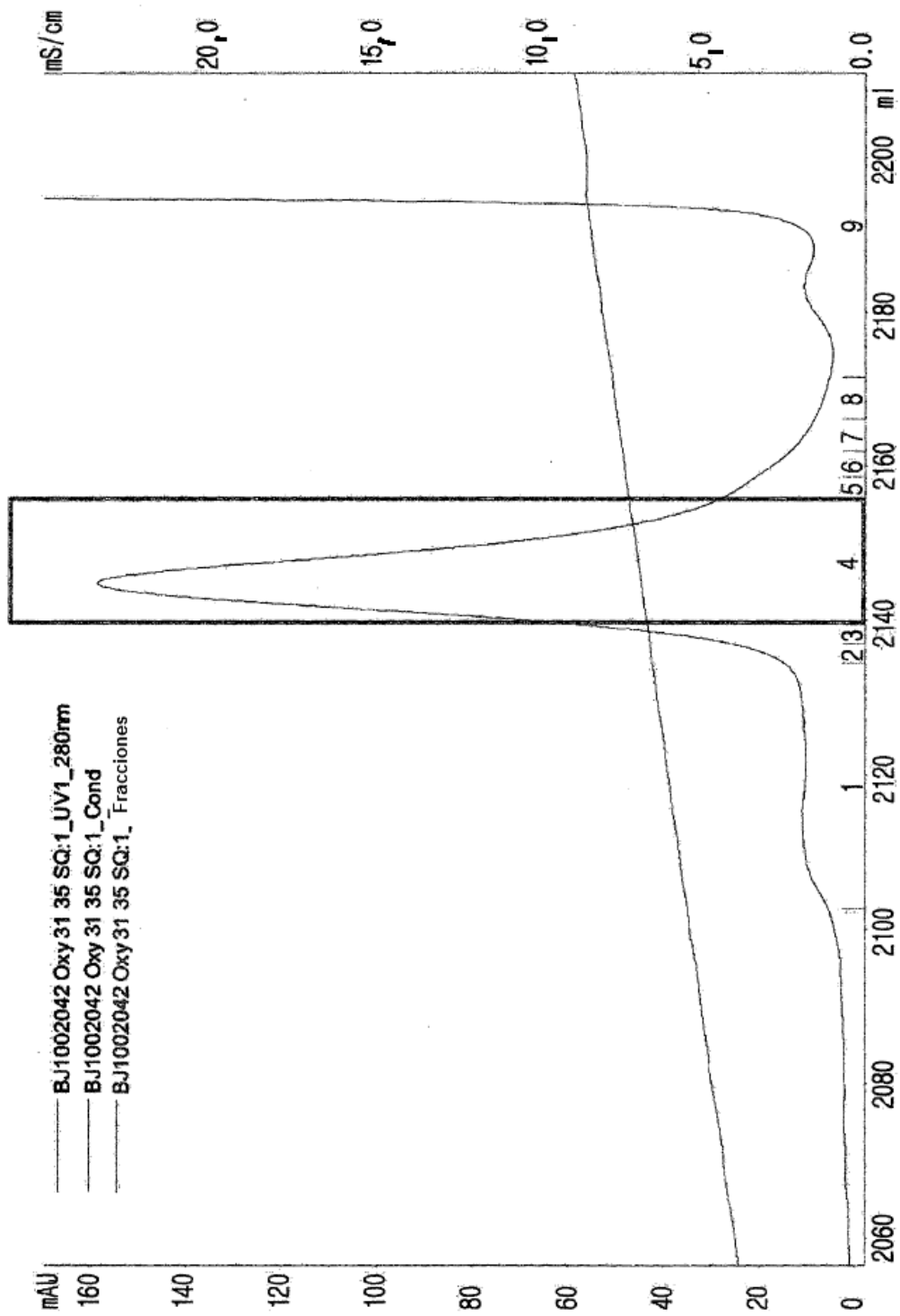
[Fig. 2c]



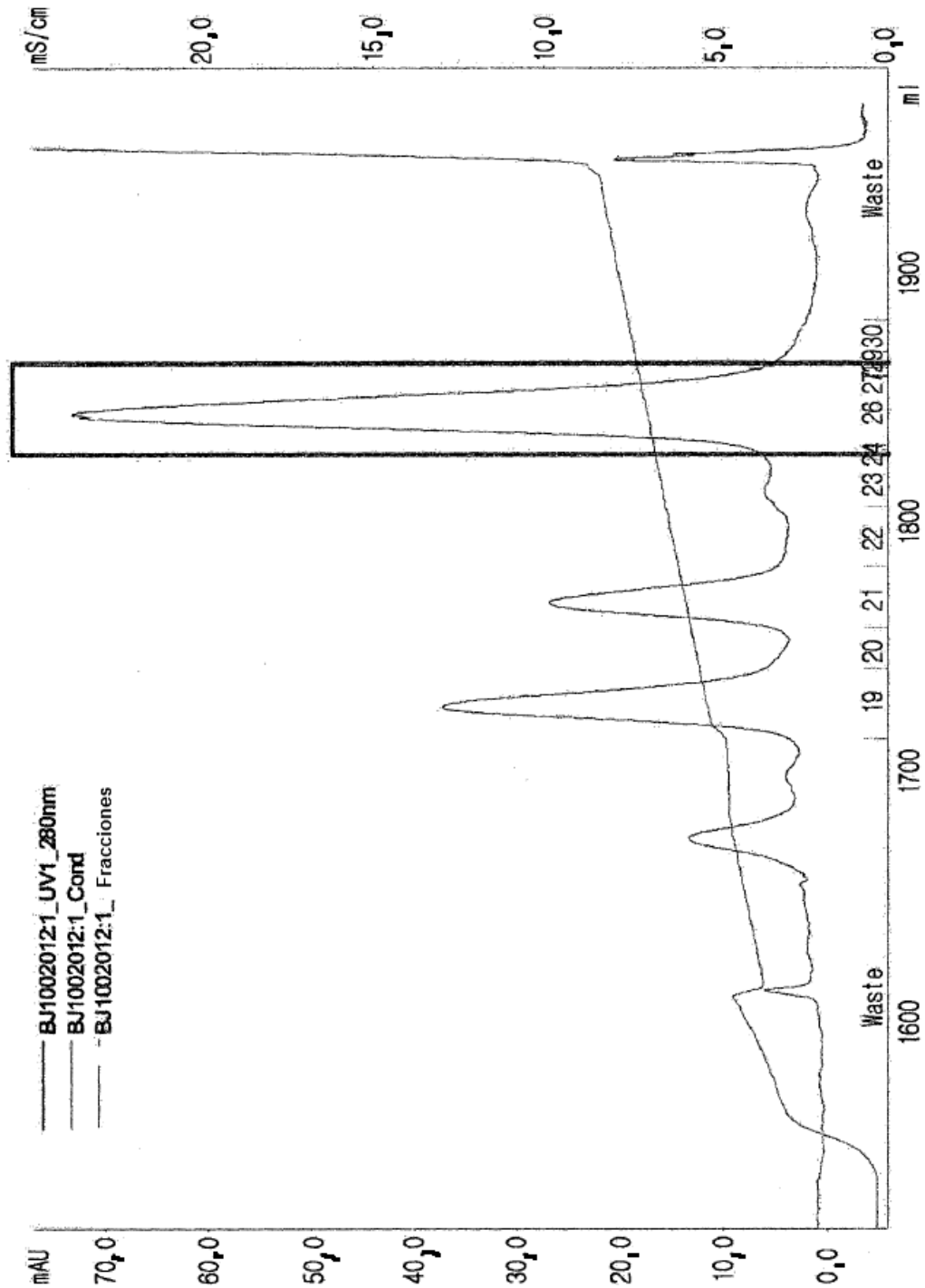
[Fig. 3a]



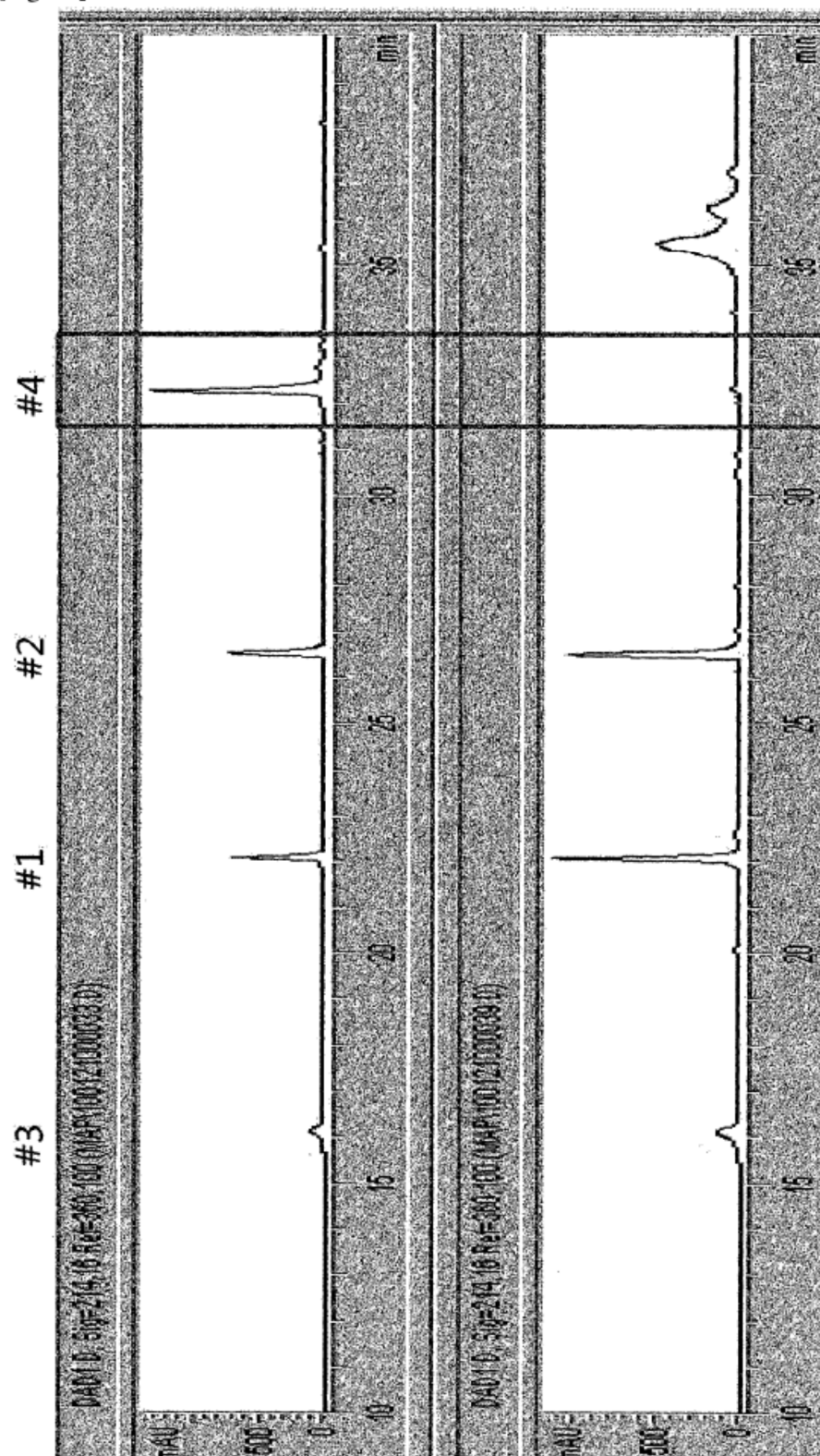
[Fig. 3b]



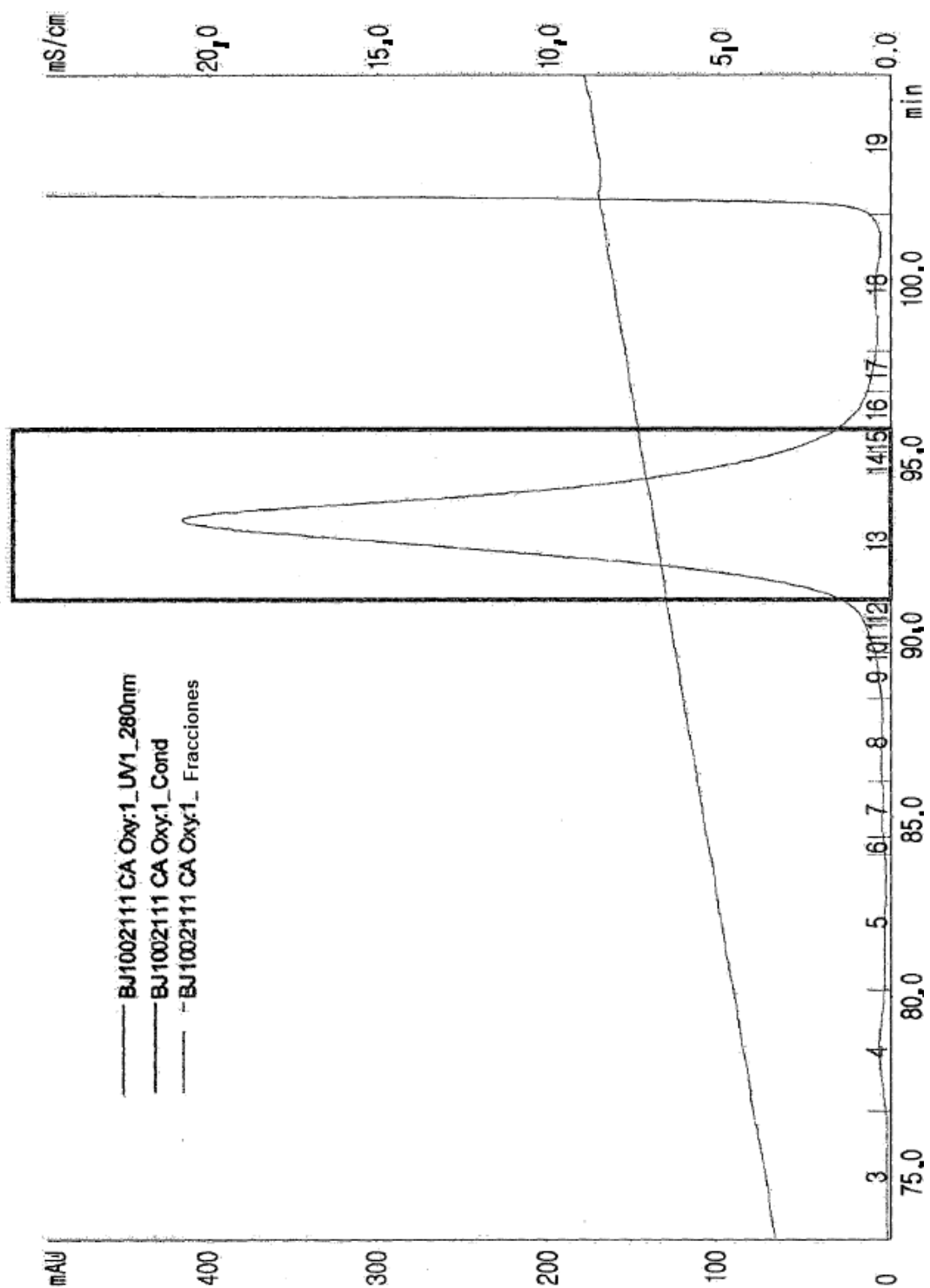
[Fig. 4a]



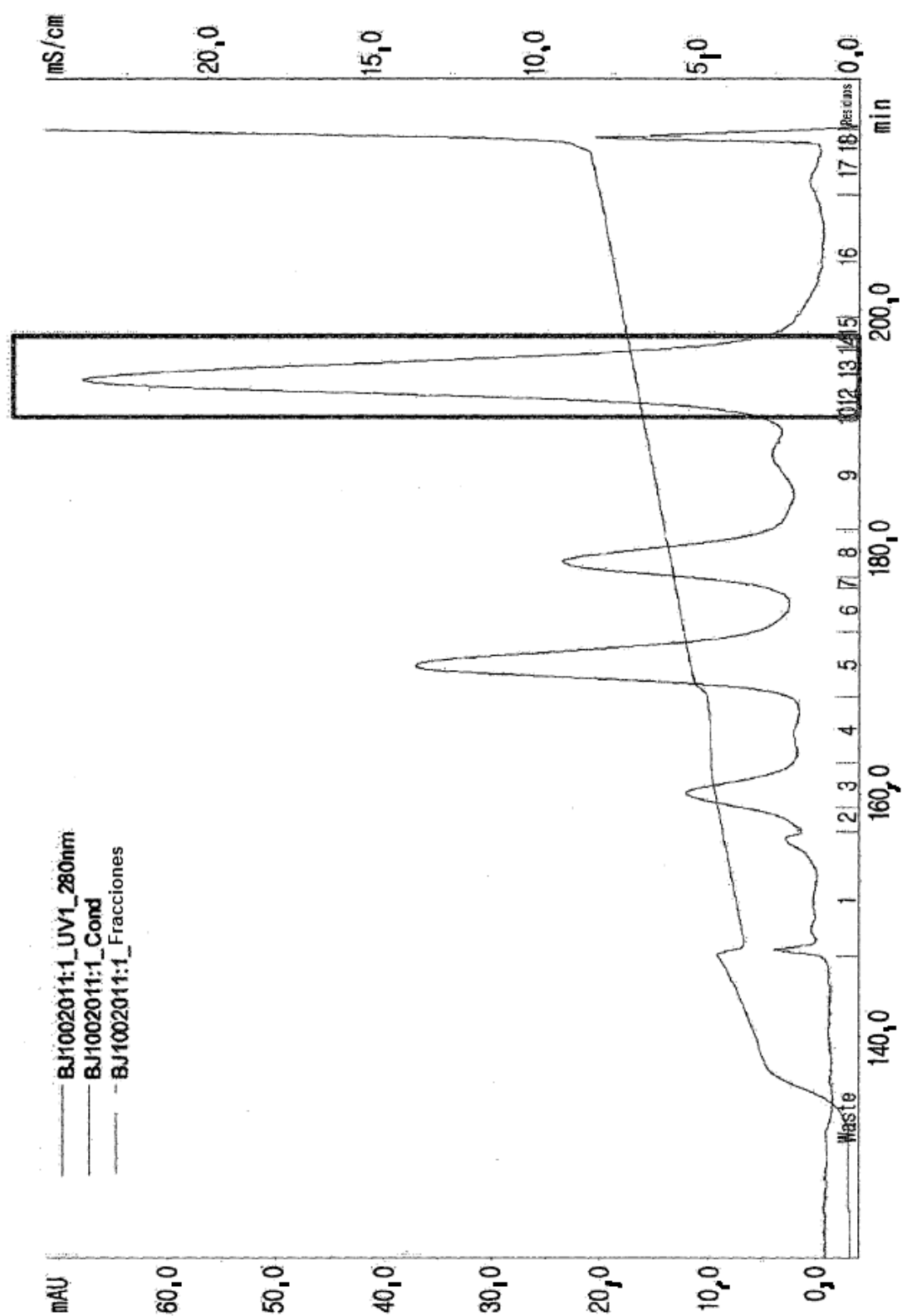
[Fig. 4b]



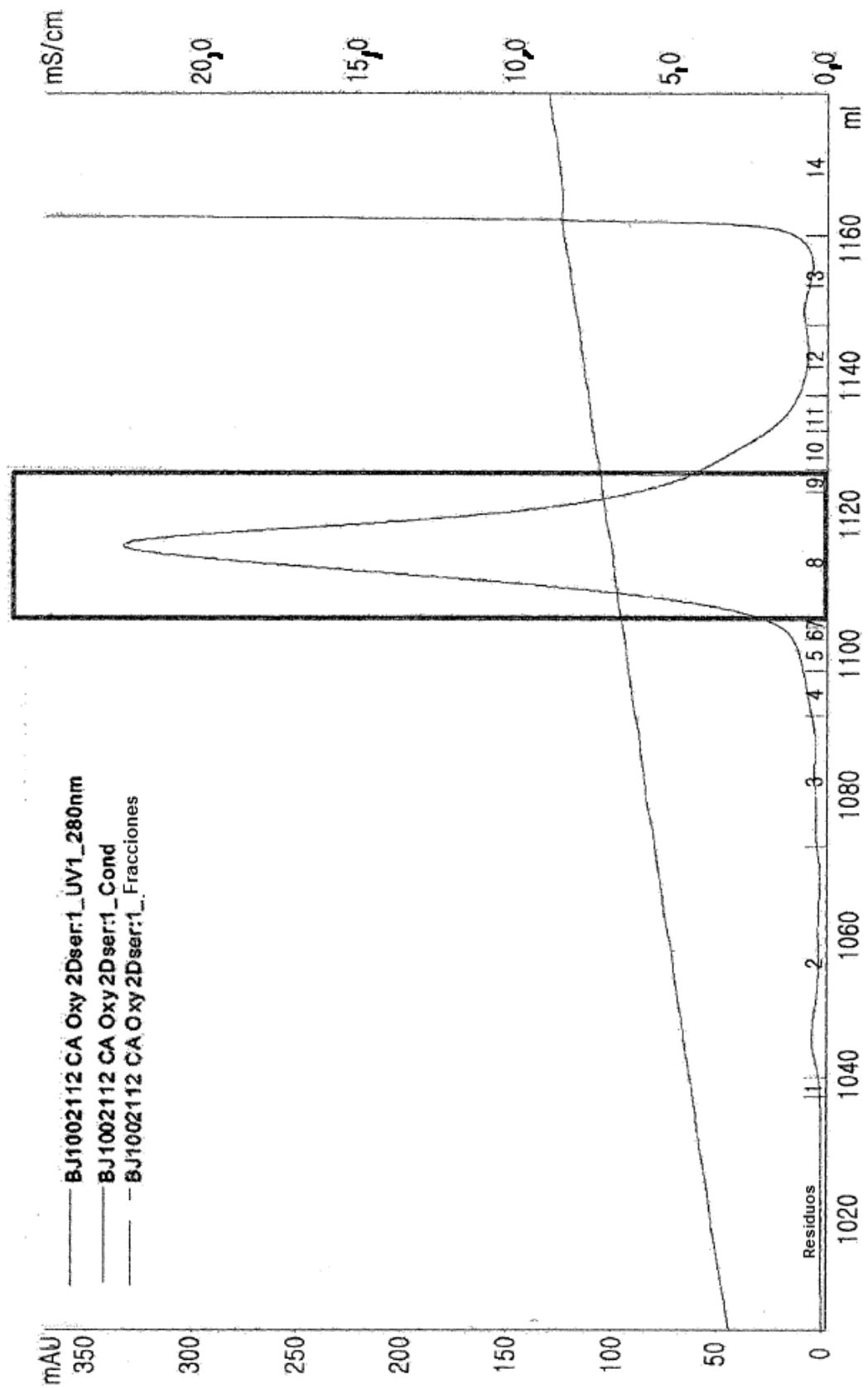
[Fig. 4c]



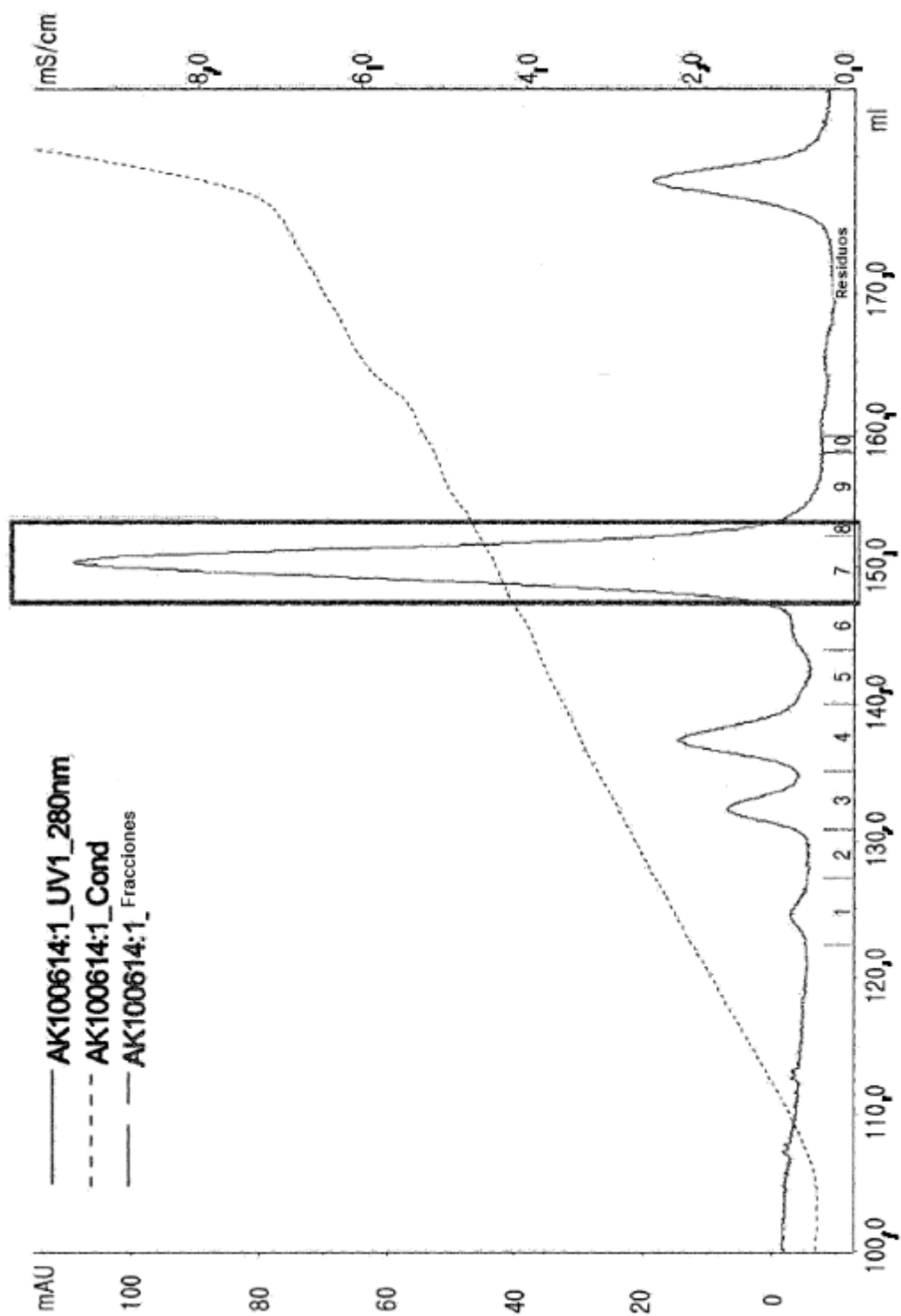
[Fig. 5a]



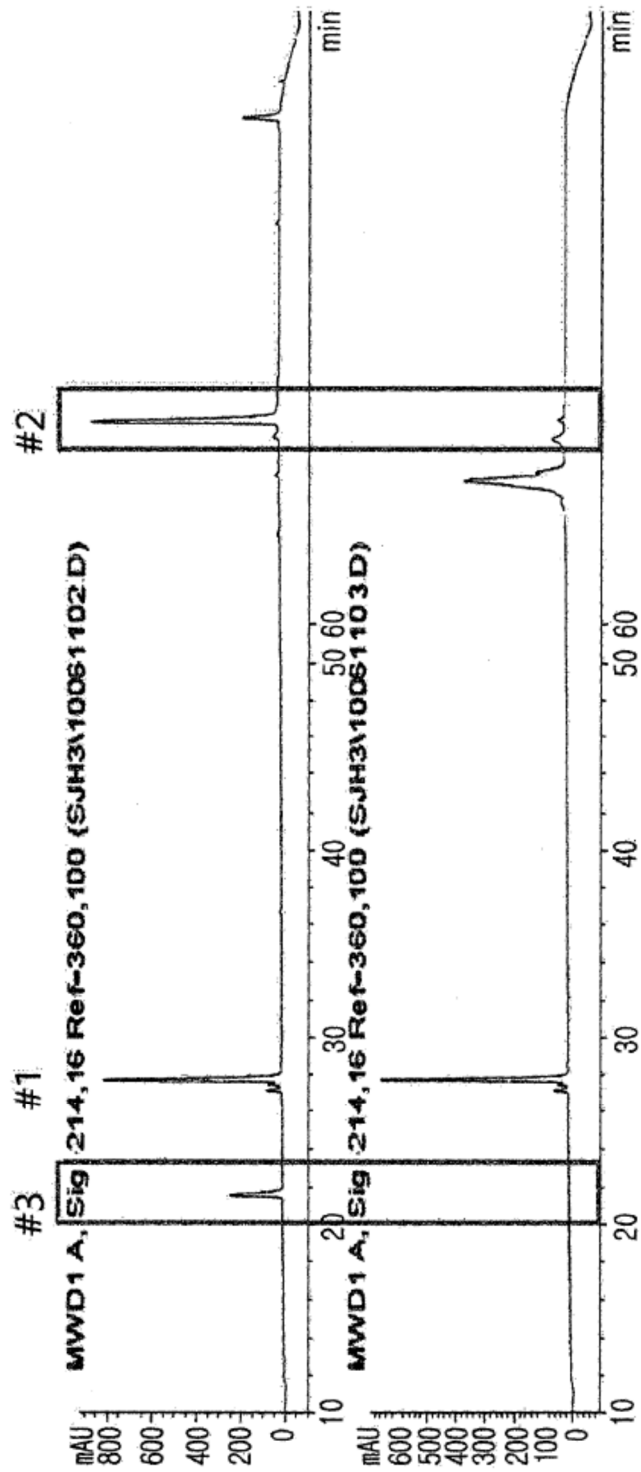
[Fig. 5b]



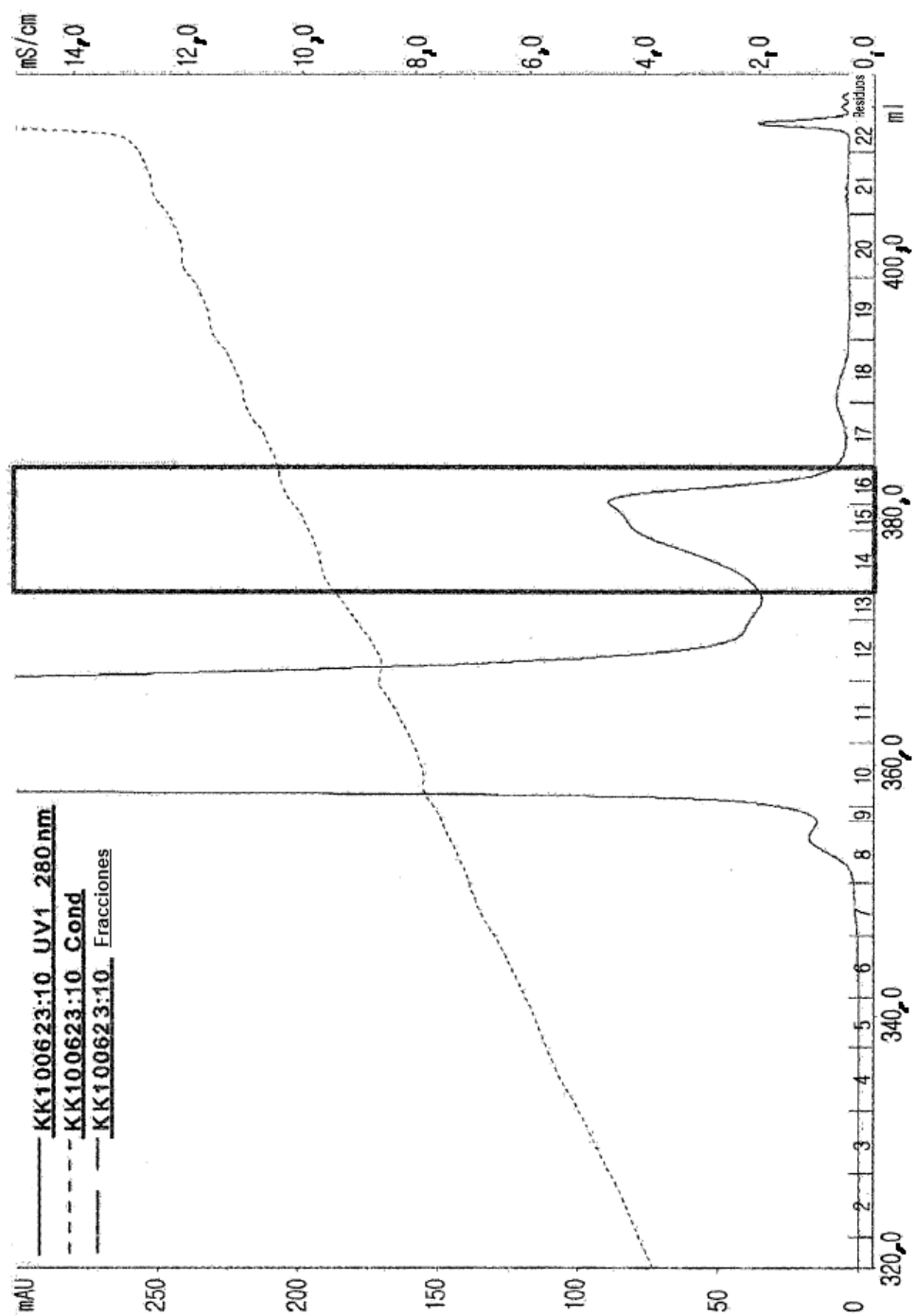
[Fig. 6a]



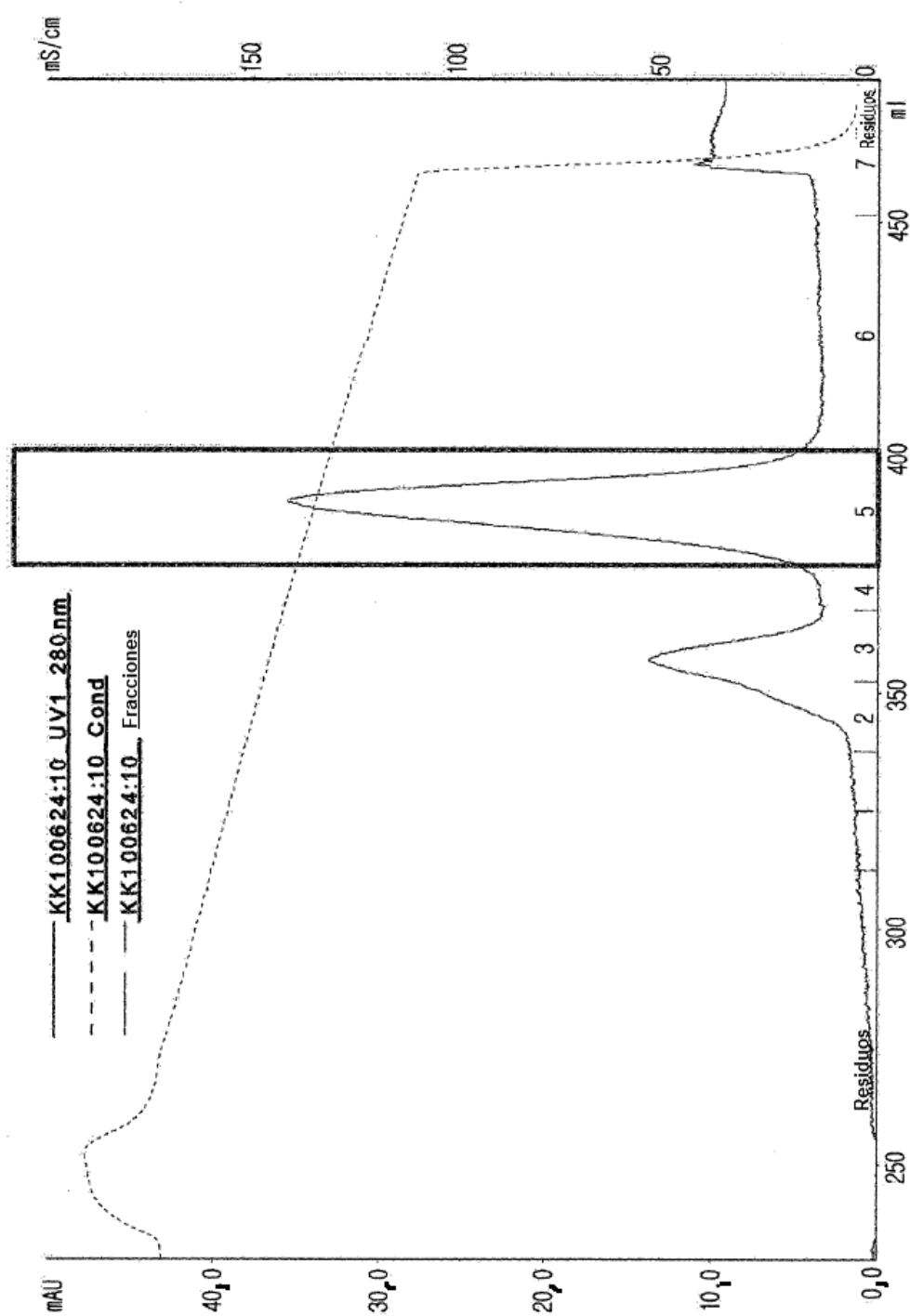
[Fig. 6b]



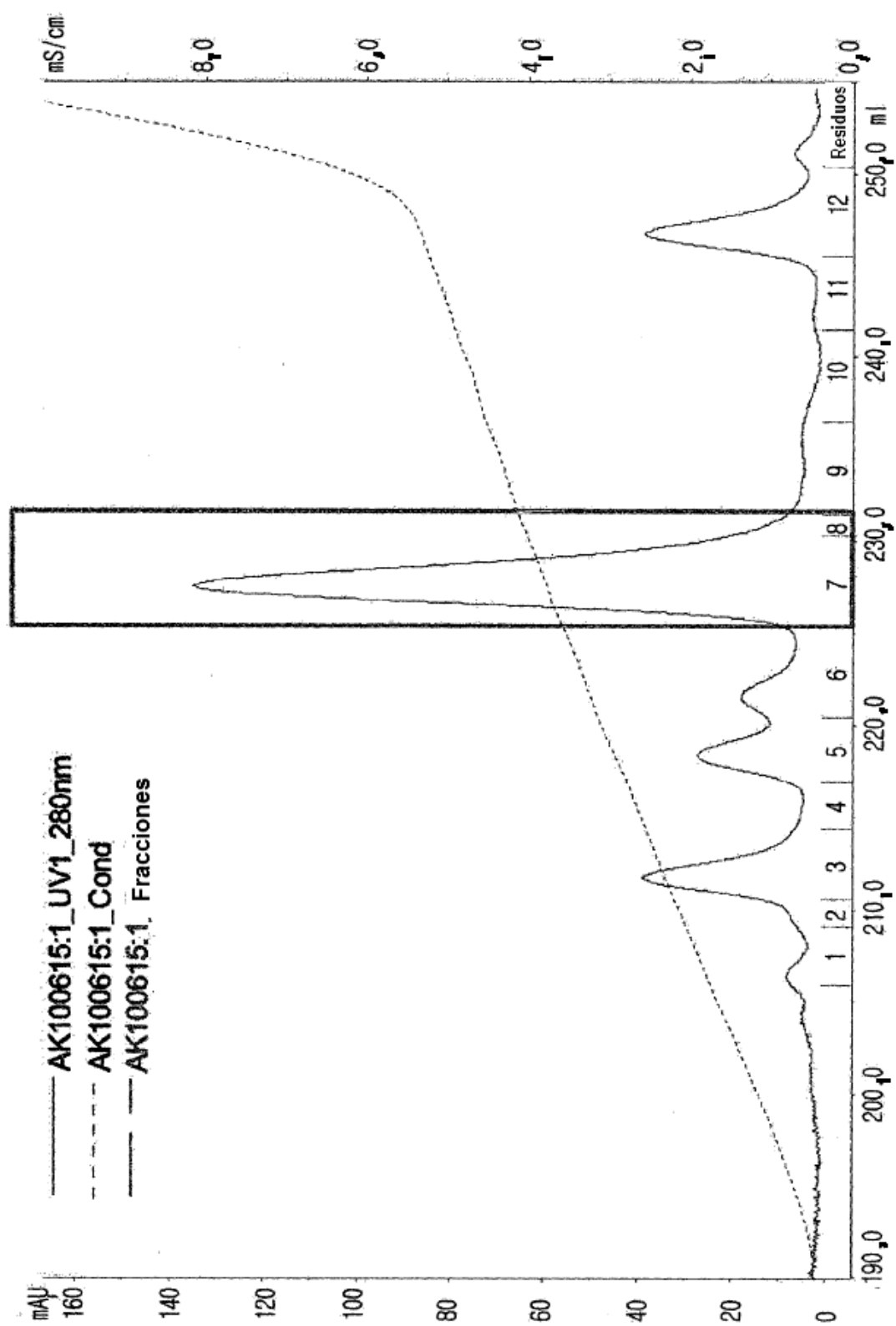
[Fig. 6c]



[Fig. 6d]



[Fig. 7a]



[Fig. 7b]

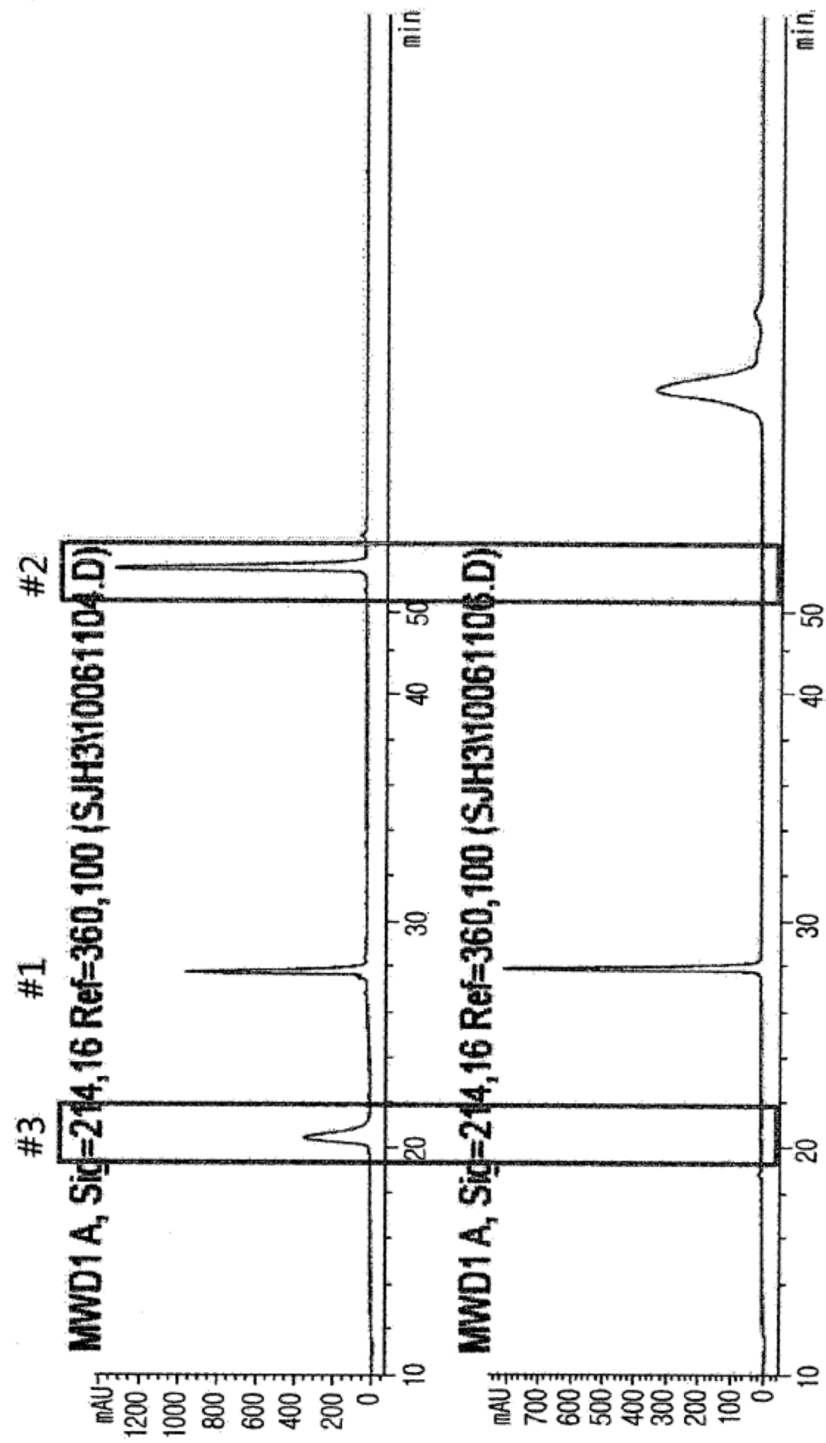
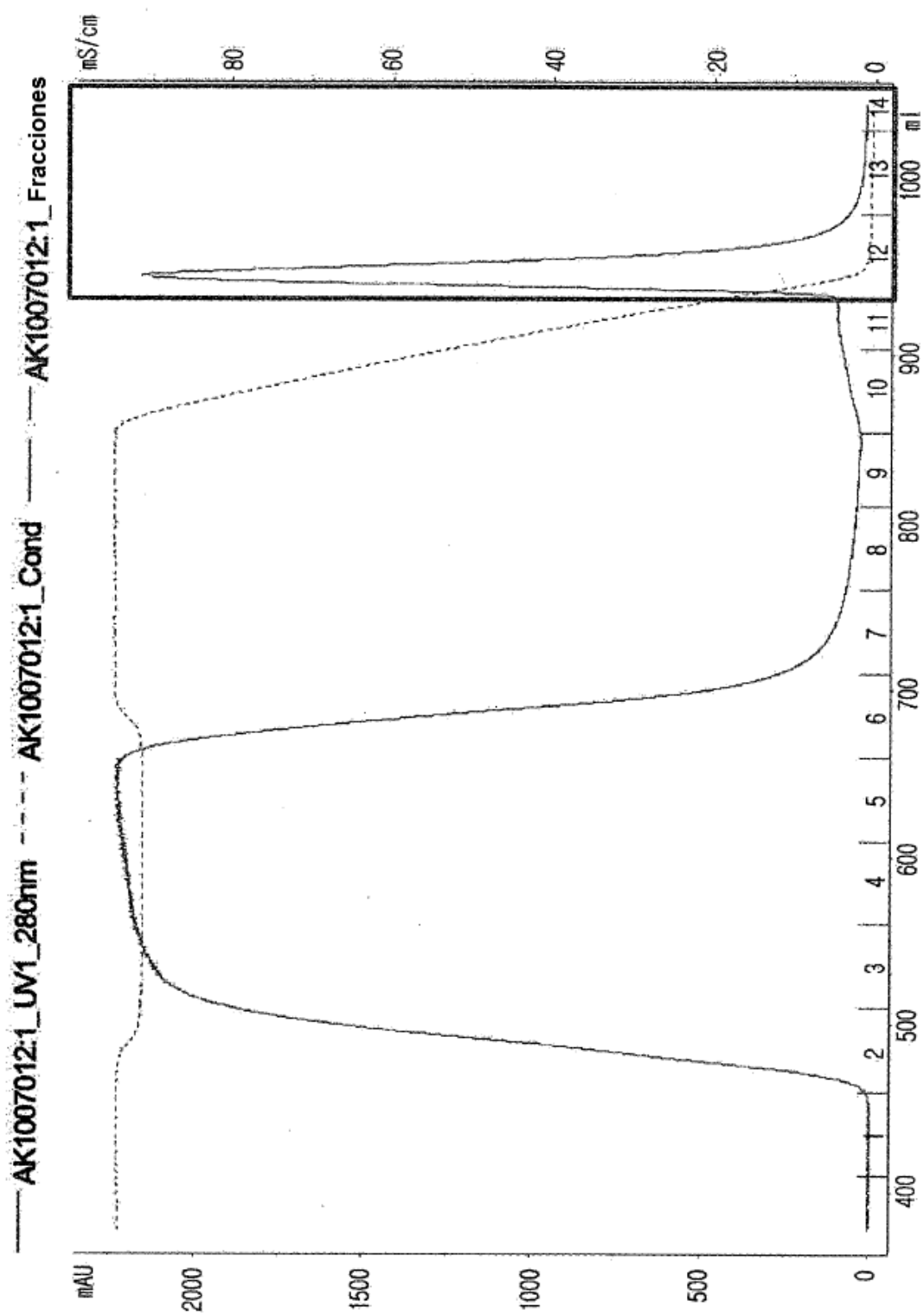
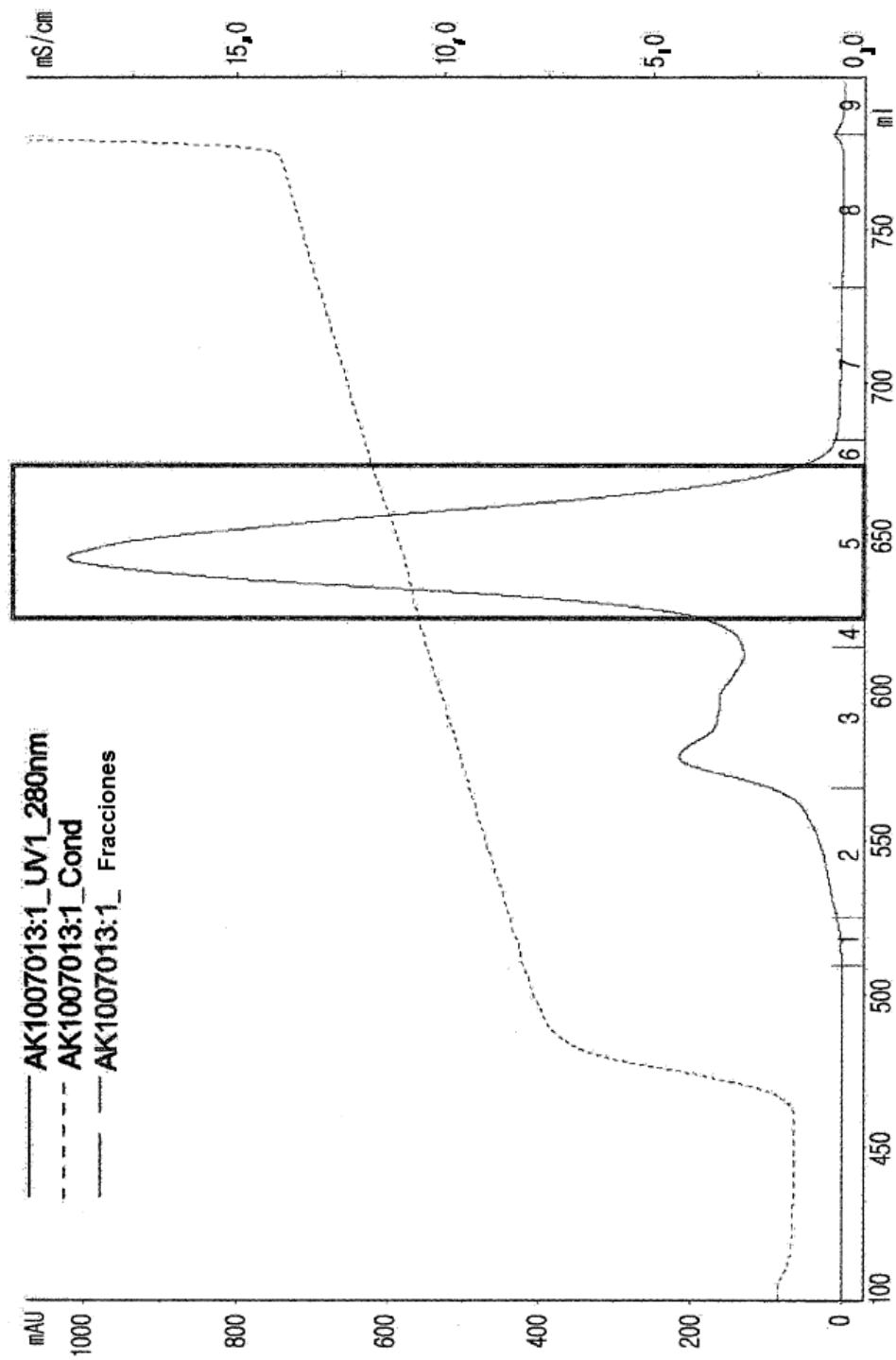


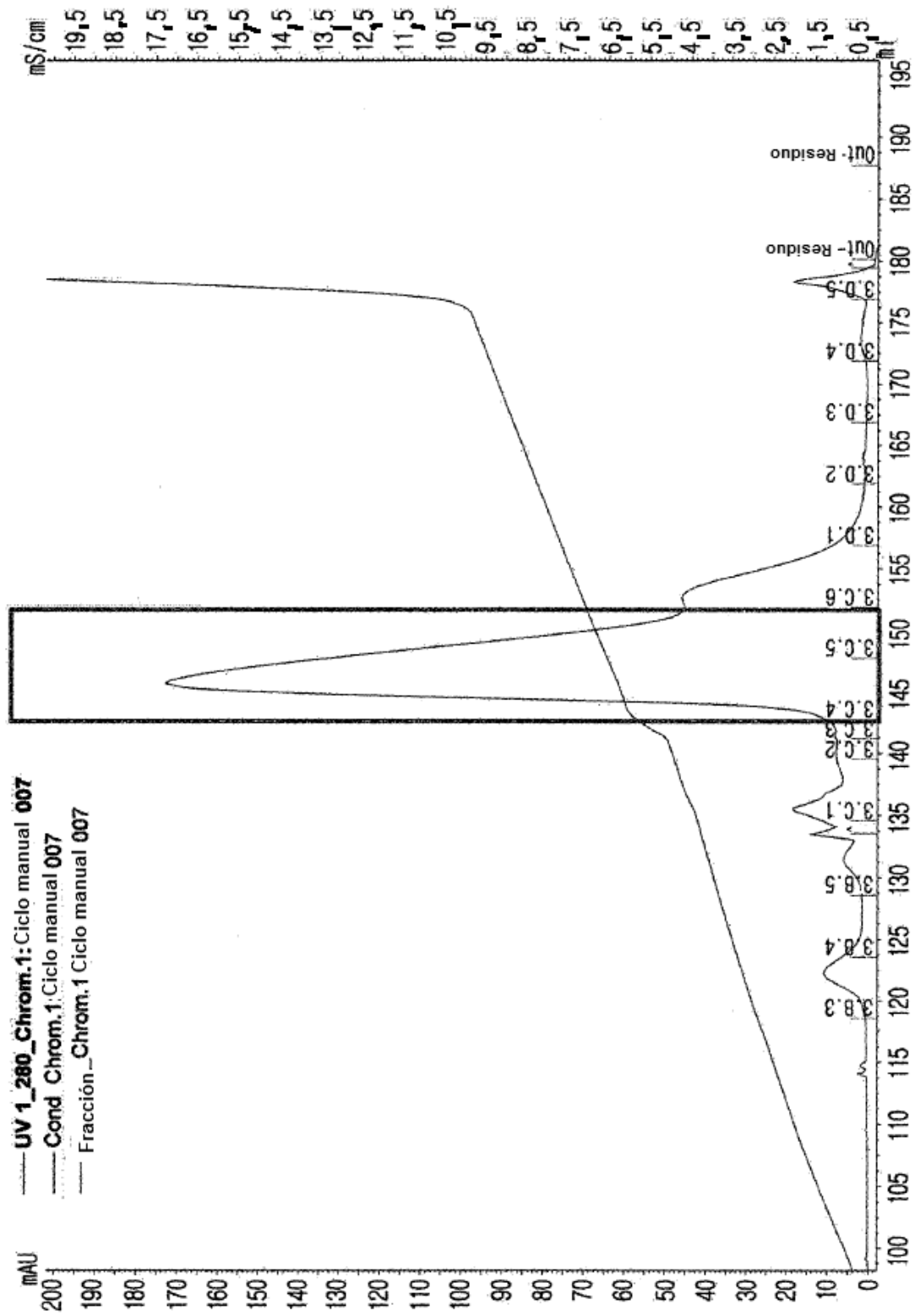
Fig. 7c]



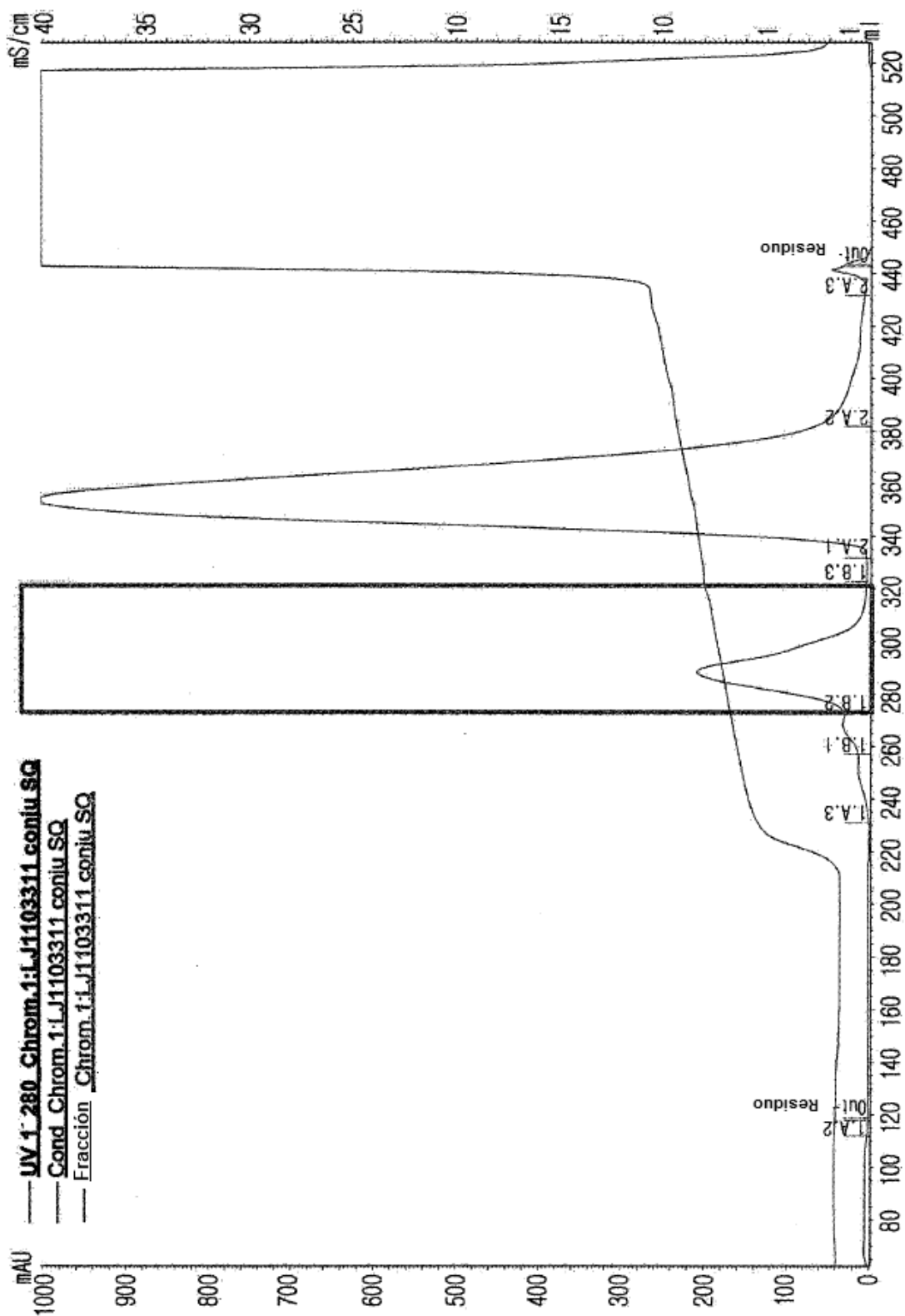
[Fig. 7d]



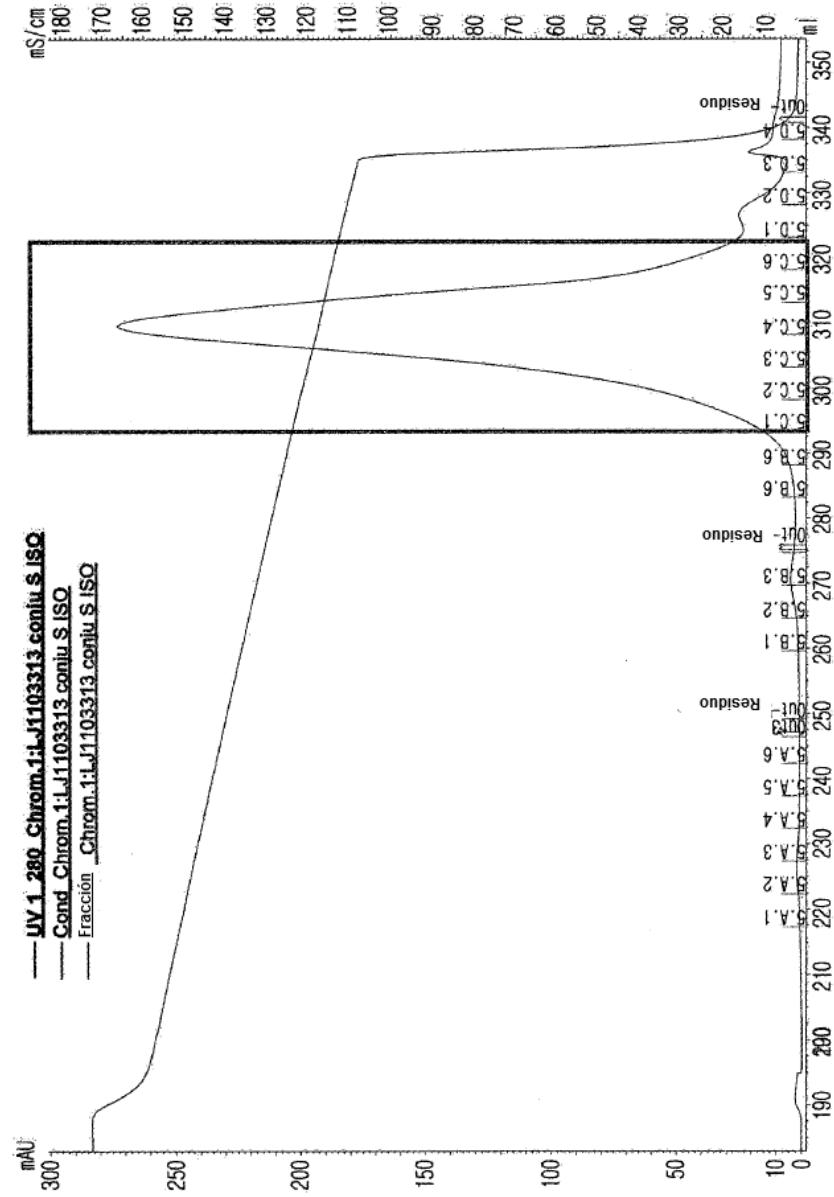
[Fig. 8a]



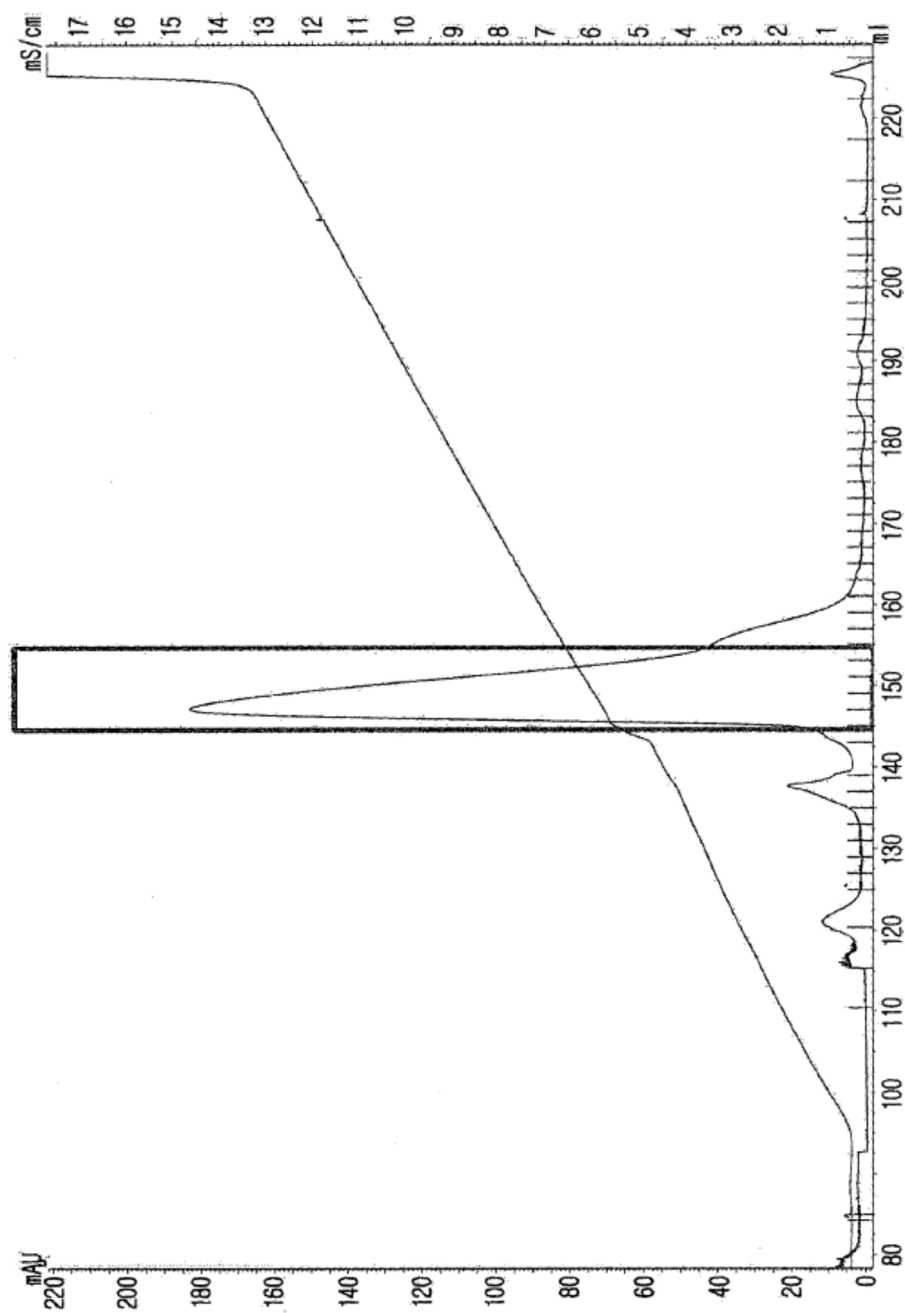
[Fig. 8b]



[Fig. 8c]



[Fig. 9a]



[Fig. 9b]

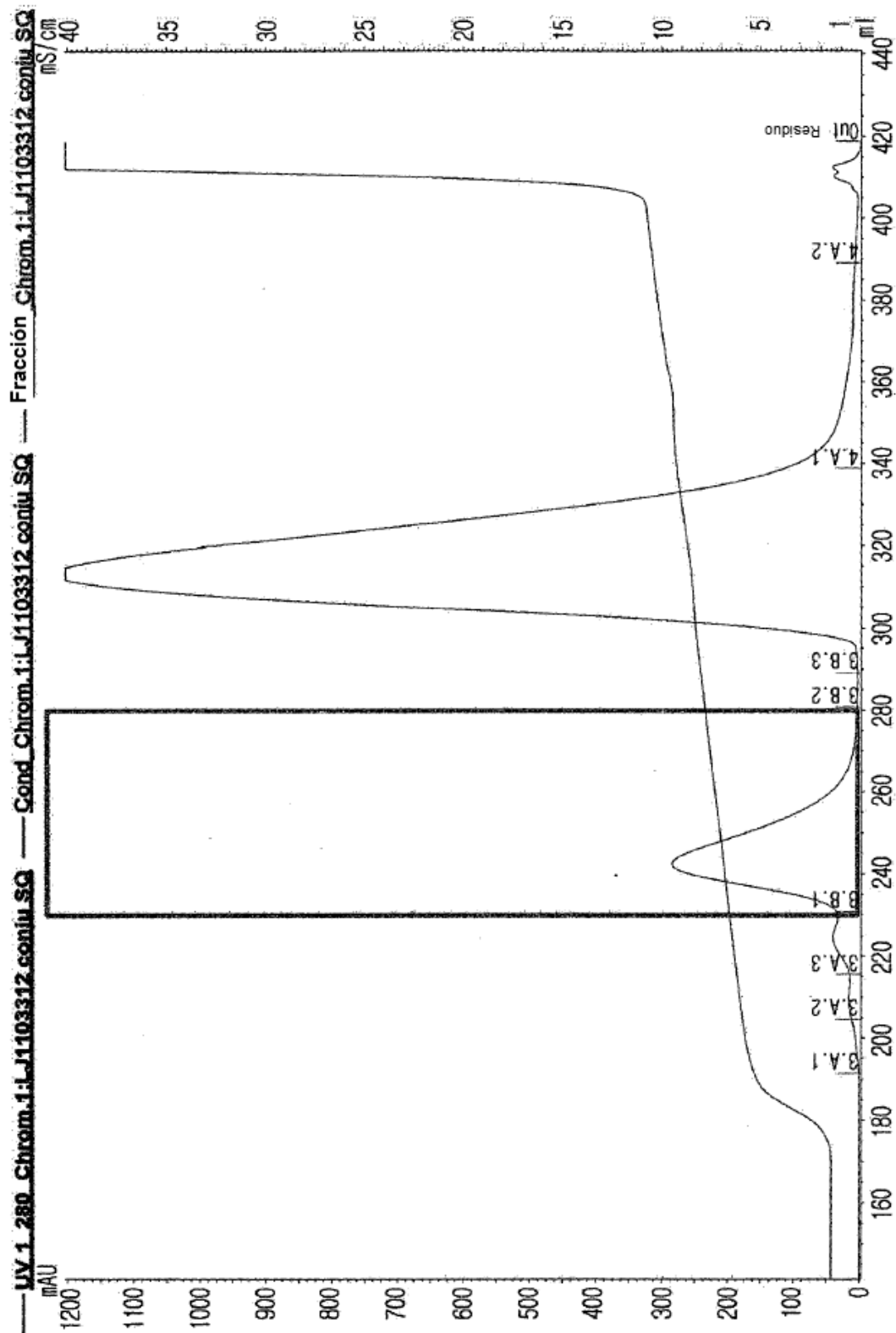
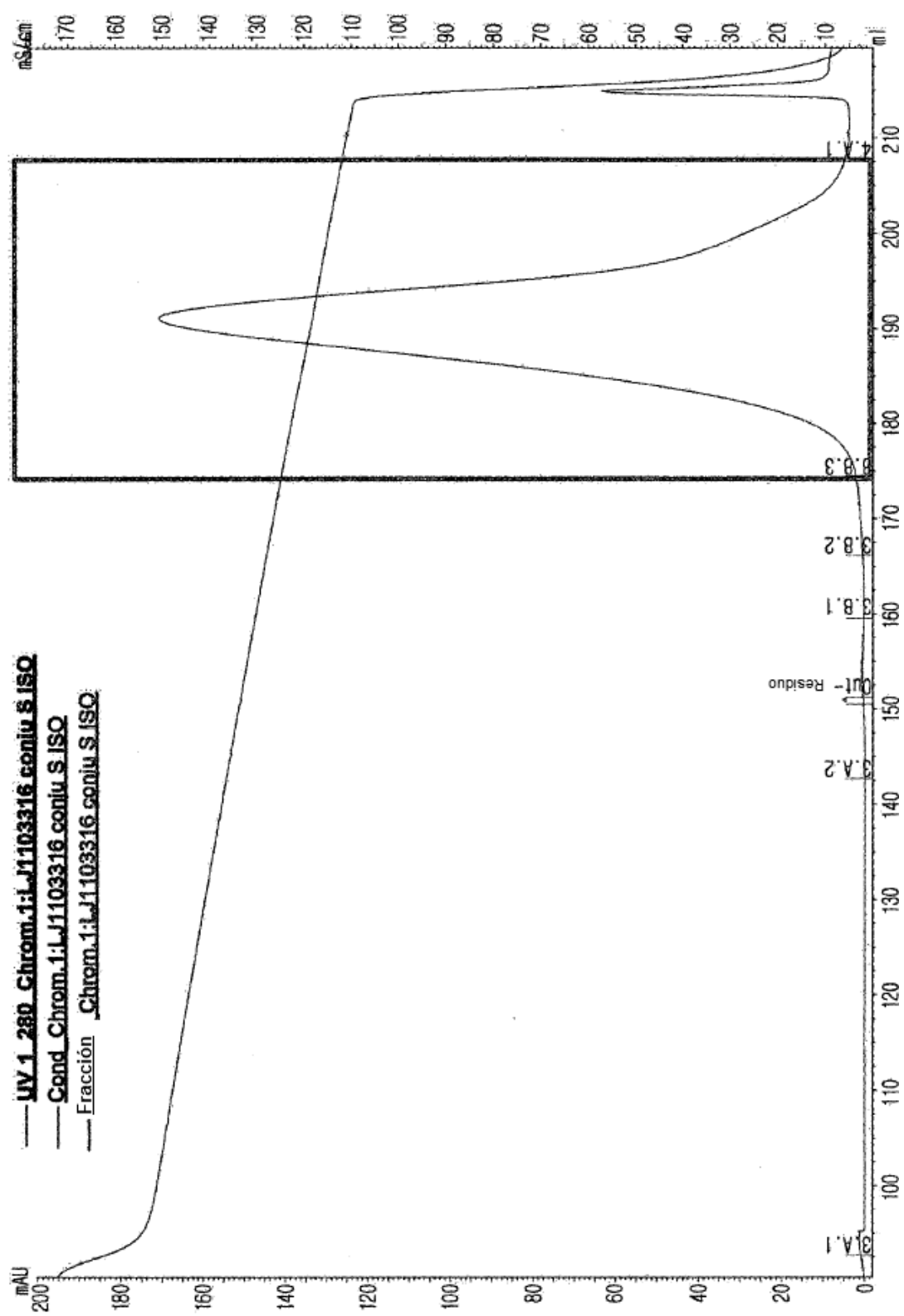
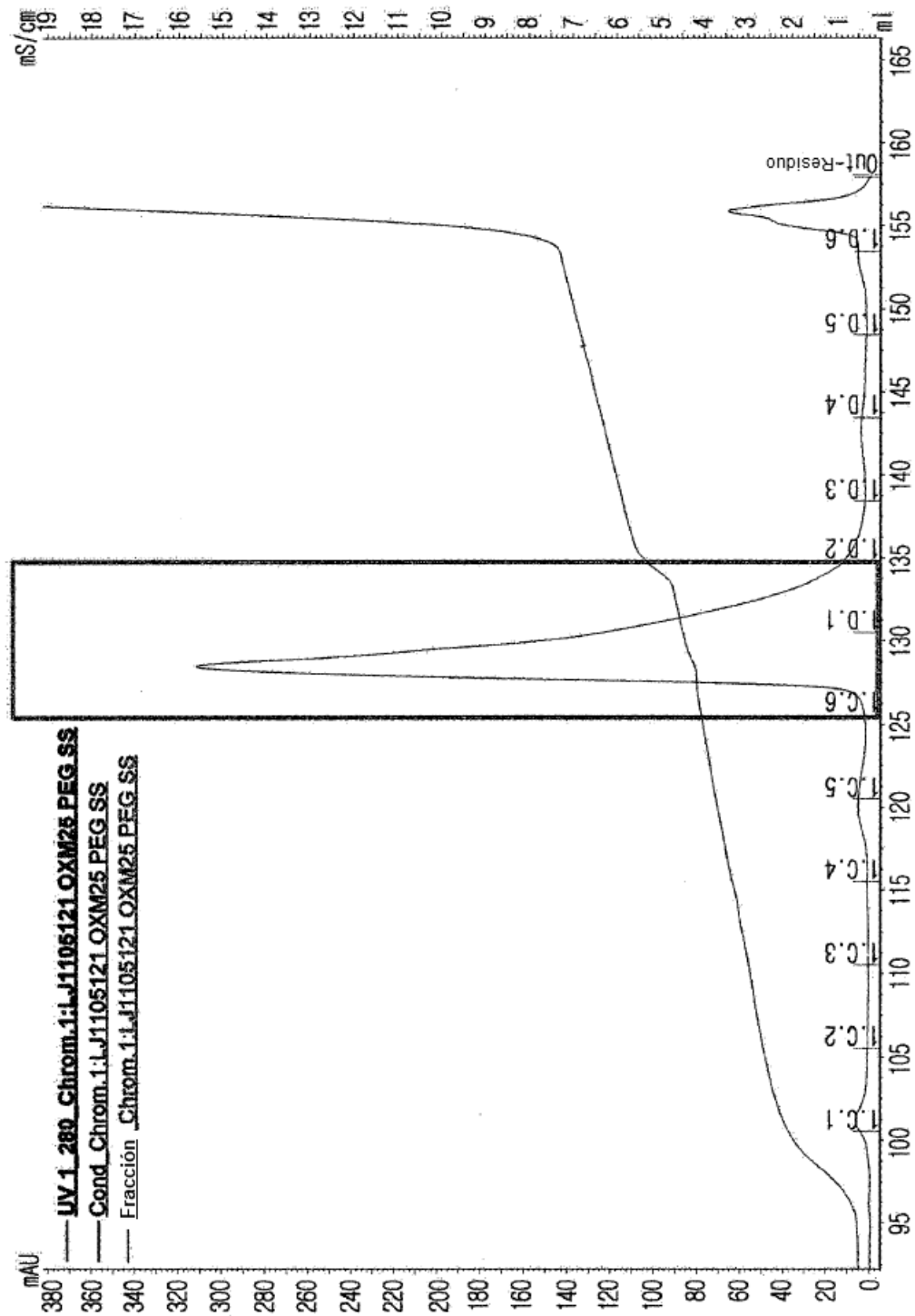


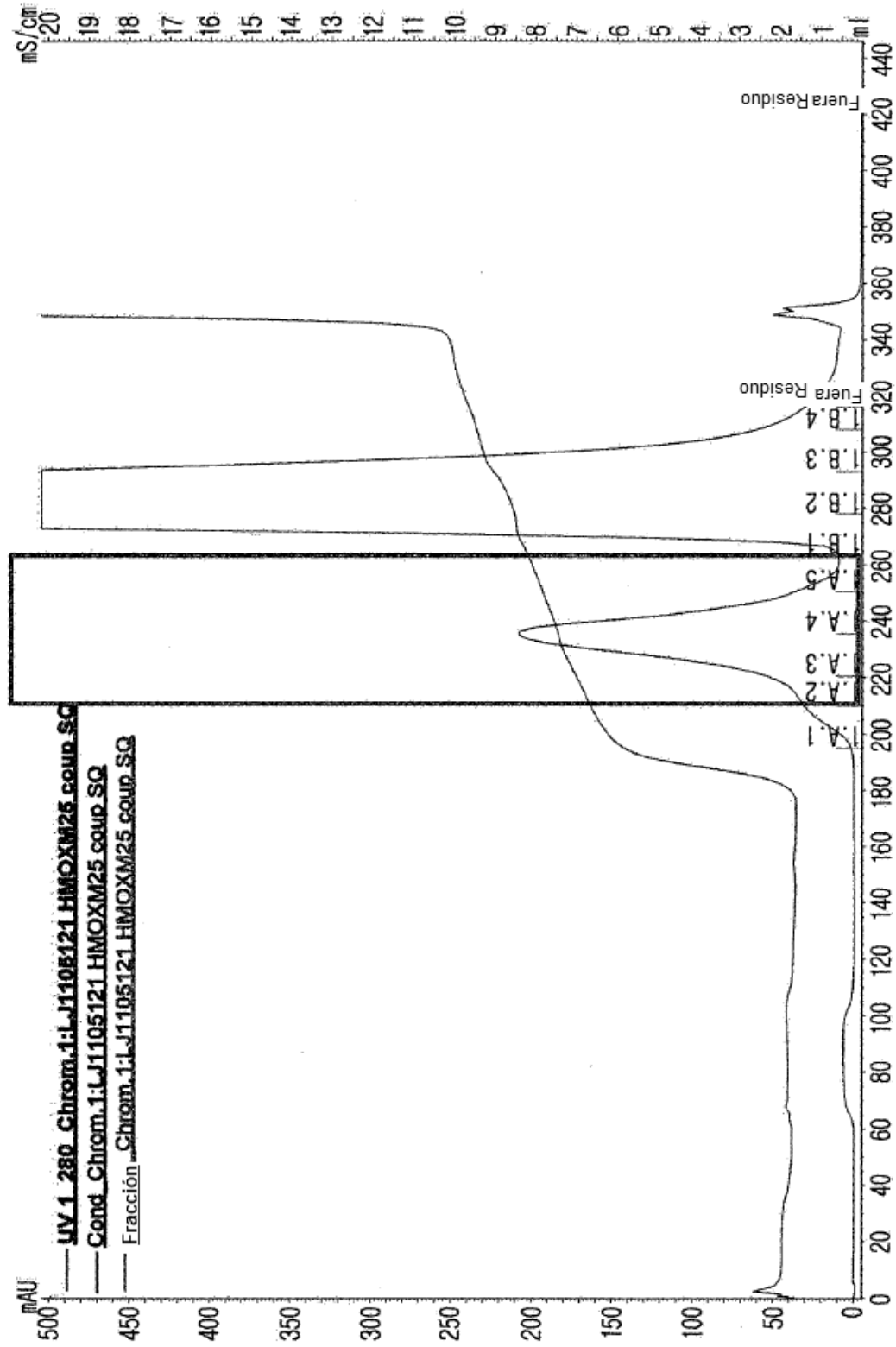
Fig. 9c]



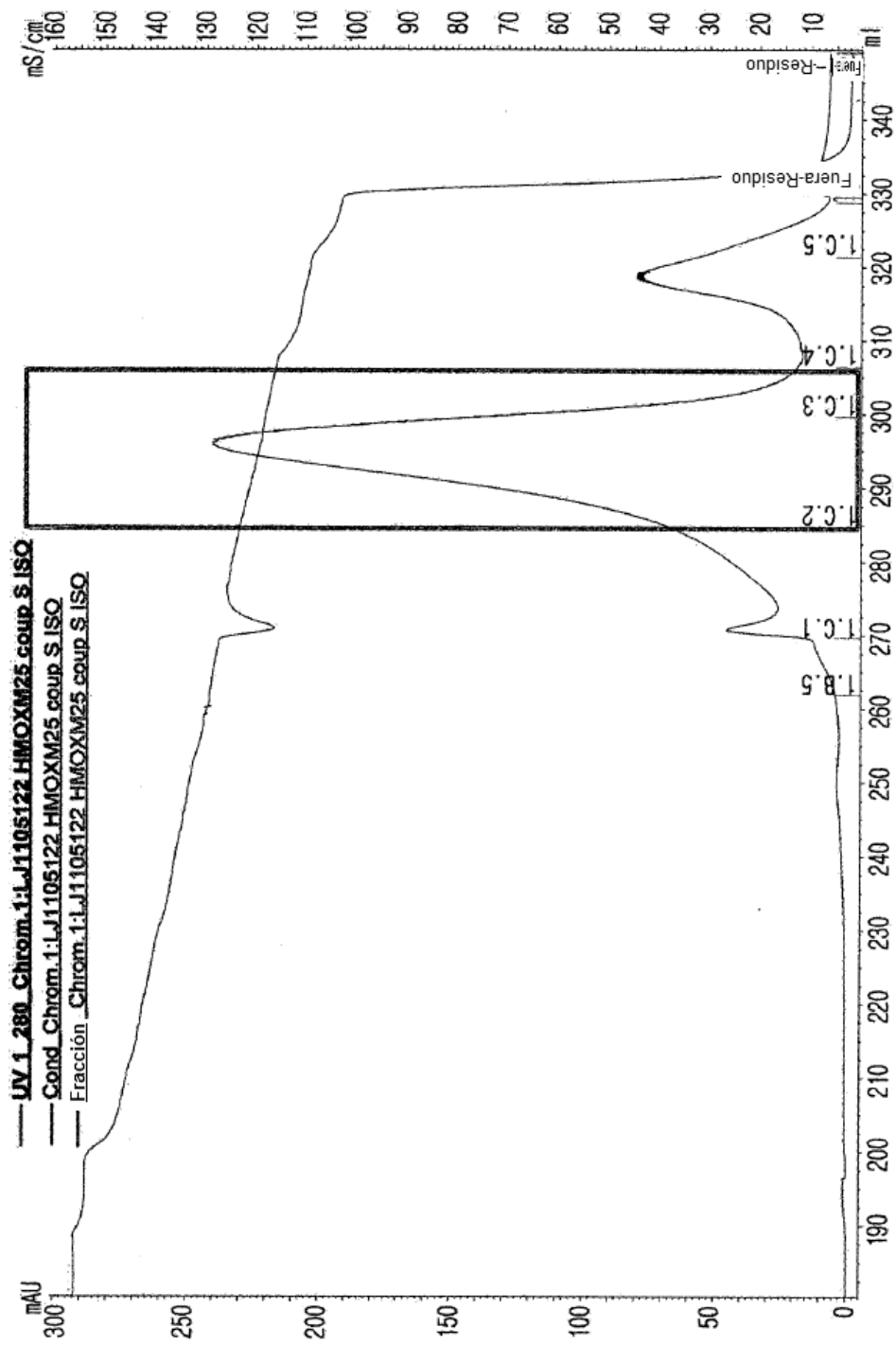
[Fig. 10a]



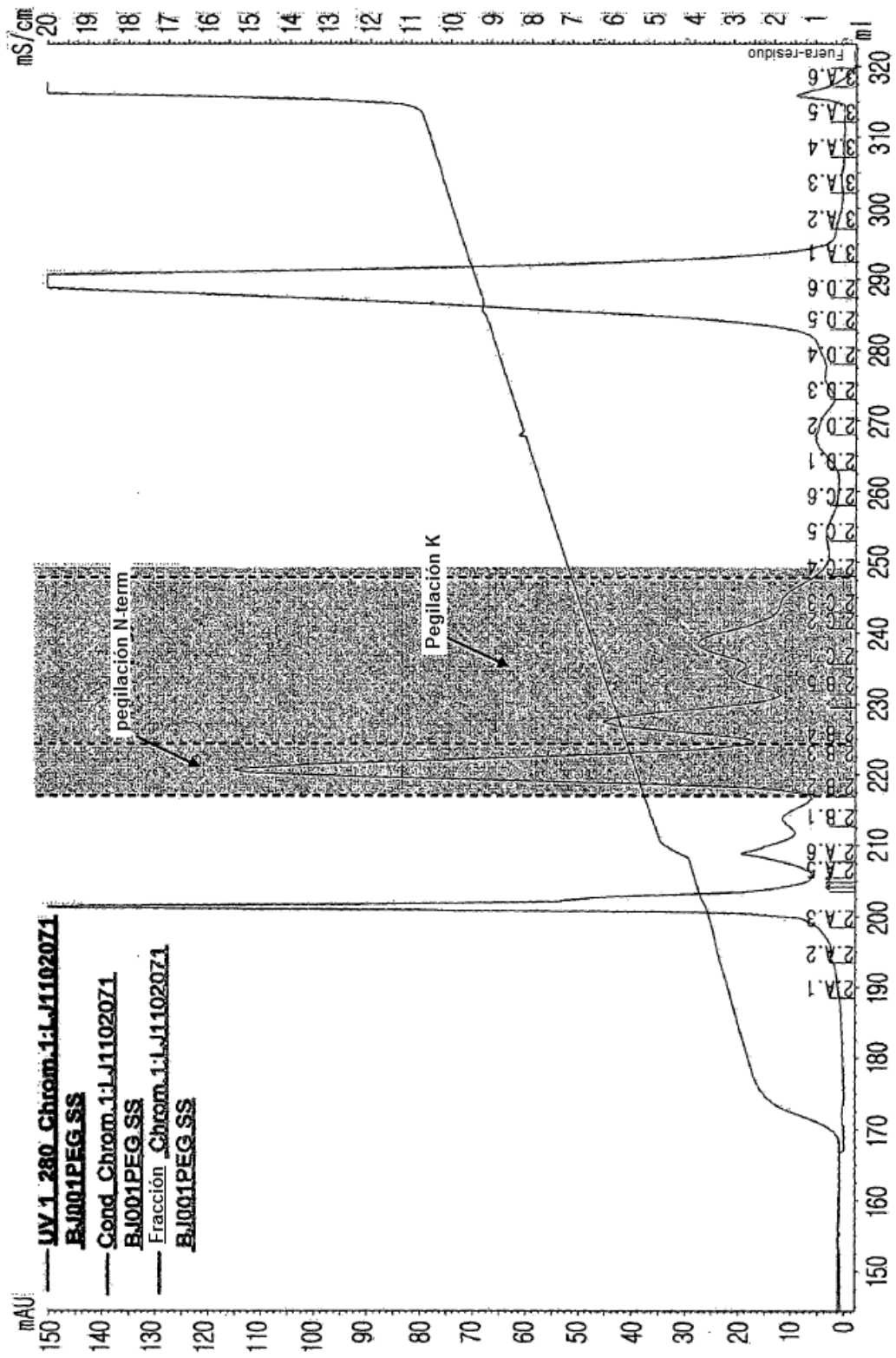
[Fig. 10b]



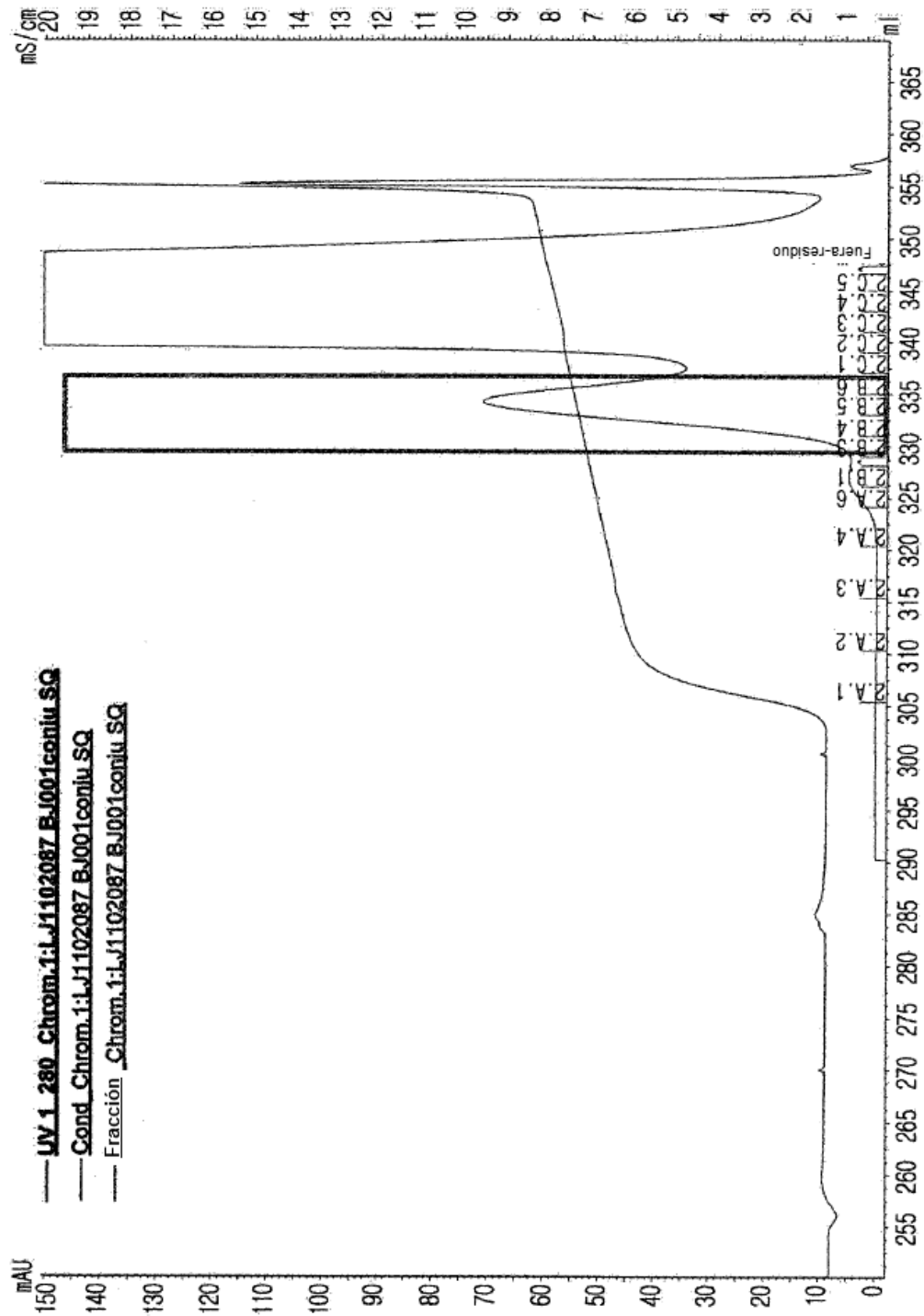
[Fig. 10c]



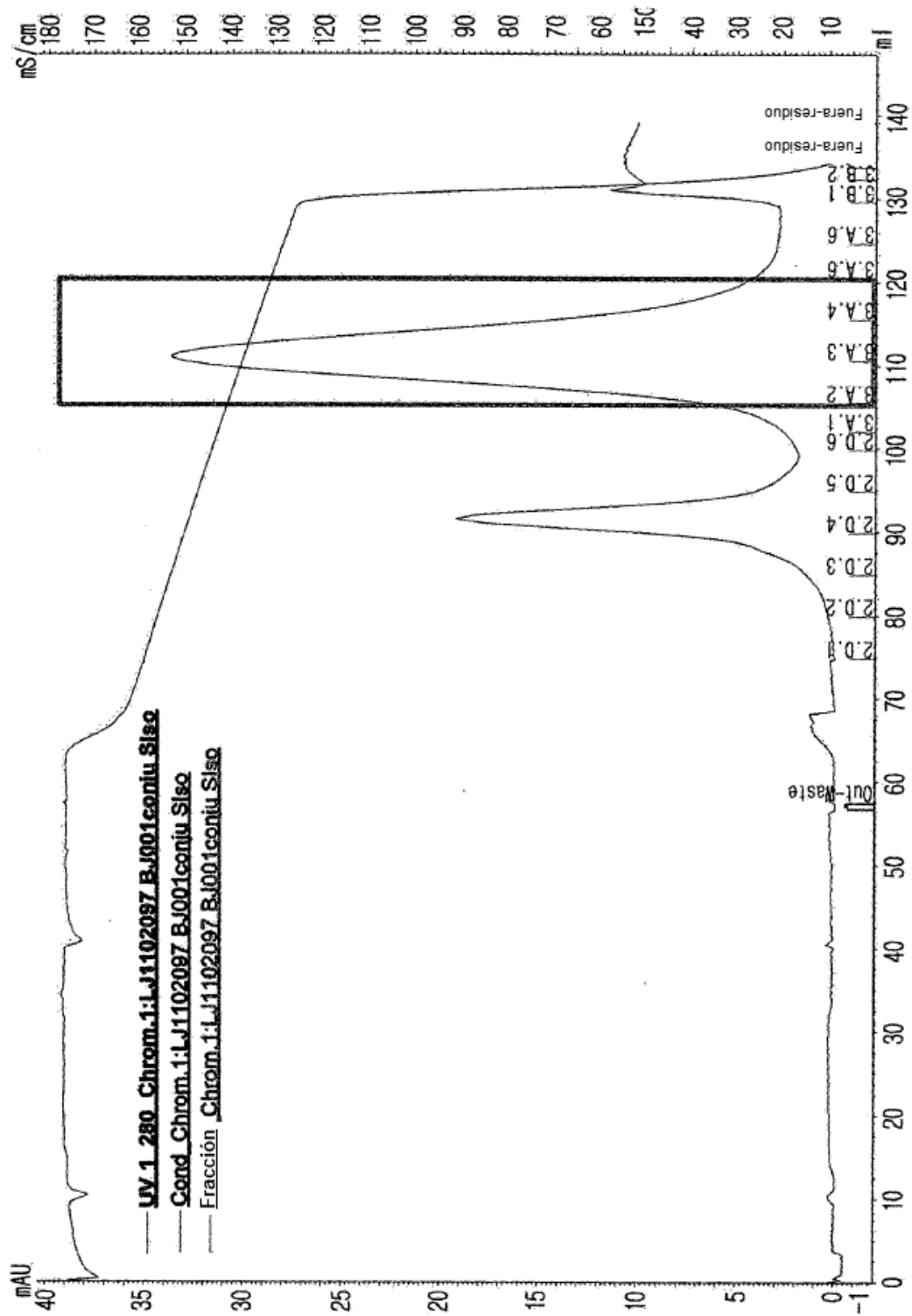
[Fig. 11a]



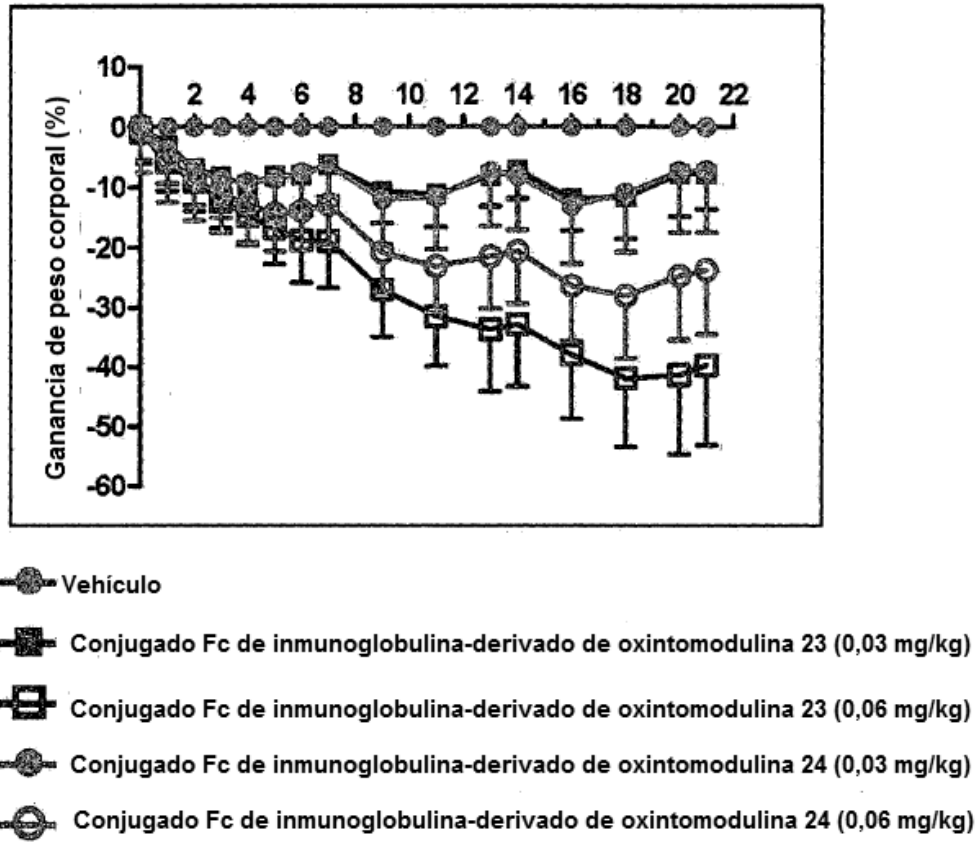
[Fig. 11b]



[Fig. 11c]



[Fig. 12]



[Fig. 13]

