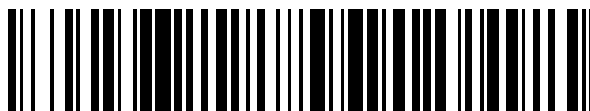


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 841**

51 Int. Cl.:

C07K 14/575 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.08.2015 PCT/IB2015/001614**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.02.2016 WO16027157**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2015 E 15778713 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018 EP 3183265**

54 Título: **Péptido para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 y sus complicaciones**

30 Prioridad:

21.08.2014 RU 2014134341

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

07.05.2019

73 Titular/es:

**CRYNO LLC (100.0%)
Skolkovo Innovation Center Bolshoi Blvd, 42-1,
office 332
143026 Moscow, RU**

72 Inventor/es:

**TITOV, MIKHAIL IVANOVICH;
ELISEEV, IVAN IVANOVICH;
MAKAROV, VALERY GENNADYEVICH;
MAKAROVA, MARINA NIKOLAEVNA;
SHEKUNOVA, ELENA VASILYEVNA y
KASHKIN, VLADIMIR ALEKSANDROVICH**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 711 841 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

Péptido para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 y sus complicaciones

La invención se refiere al nuevo análogo de exenatida con la siguiente fórmula

H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Gly-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Arg-Gly-OH,

5 que se puede utilizar para el tratamiento y la prevención de la diabetes mellitus, así como para el tratamiento y la prevención de las complicaciones de la diabetes tipo 2 tales como la neuropatía diabética, la distrofia muscular y la endotelopatía.

10 La invención se refiere a la medicina y la farmacia y se puede utilizar como el producto farmacéutico para la prevención y el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, así como sus complicaciones tales como la neuropatía diabética, la distrofia muscular y la endotelopatía.

15 La diabetes mellitus tipo 2 (DM 2 o diabetes mellitus no dependiente de insulina) es una enfermedad crónica, multisistémica, que se manifiesta principalmente en la alteración del metabolismo de los carbohidratos. La hiperglucemia se desarrolla como resultado de cambios anormales. Además, aparece una disfunción de las células especializadas de la glándula pancreática responsables de la generación de insulina. La principal causa de letalidad de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 es, en primer lugar, el desarrollo de complicaciones macrovasculares (lesión de las arterias coronarias, cerebrales y periféricas). Asimismo, la DM 2 es uno de los componentes principales para el desarrollo del síndrome metabólico (resistencia a la insulina o síndrome X) [1]. En los últimos tiempos, el número de observaciones que indican que la DM 2 es un marcador patológico del desarrollo de la demencia por Alzheimer está creciendo cada vez más [2].

20 Según los datos de la OMS a finales de 2013, hay 347 millones de personas que padecen diabetes en el mundo [3]. 3,4 millones de personas murieron debido al alto contenido de azúcar en sangre en 2004 [4]. El número de casos fatales causados por complicaciones de la diabetes se mantuvo en el mismo nivel en 2010 [5]. Según los pronósticos de la OMS, la diabetes se habrá convertido en la séptima causa significativa de letalidad en 2030 [4]. Se cree que la DM tipo 1 puede encontrarse entre el 10-15 % de los pacientes en los países desarrollados, y la DM tipo 2, entre el 85-90 %. Pero en los últimos años la frecuencia de la DM tipo 2 en los países desarrollados crece muy rápidamente, mientras que el número de pacientes con DM tipo 1 no ha cambiado significativamente. Según los últimos datos de la OMS, la proporción de DM tipo 1 y 2 en el mundo ha cambiado hacia el aumento de la frecuencia de DM tipo 2 [5].

30 La complicación más temprana y más frecuente de la diabetes mellitus es la neuropatía diabética [6], que se caracteriza por un trastorno del sistema nervioso asociado con lesiones de pequeños vasos sanguíneos (*vasa vasorum*, *vasa nervorum*). No solo esta complicación produce una disminución en el trabajo, sino que a menudo también causa el desarrollo de lesiones incapacitantes graves y la muerte de pacientes. El proceso patológico afecta a todas las fibras nerviosas: sensoriales, motoras y vegetales. Según datos de diferentes autores, la neuropatía diabética se puede observar entre el 90-100 % de los pacientes con diabetes mellitus. La frecuencia de lesiones del sistema nervioso debido a la diabetes mellitus es directamente proporcional a la duración de la enfermedad y, en algunos casos, precede a la aparición de los principales signos clínicos de la diabetes. Por lo tanto, el 5 % de los 35 pacientes con diabetes mellitus ya tienen síntomas de lesión del sistema nervioso que crecen en el curso de la enfermedad que alcanzan hasta el 60 % en 25 años de duración de la diabetes.

40 Todas las partes del sistema nervioso se ven afectadas por la diabetes mellitus: sistema nervioso central (encefalopatía, mielopatía), sistema nervioso periférico (poli y mononeuropatía) y sistema nervioso vegetal periférico (neuropatía autonómica).

Teniendo en consideración lo mencionado anteriormente, es obvio que el desarrollo y la implementación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes tipo 2 en sí y sus complicaciones en la práctica diaria son prometedores.

45 El tratamiento farmacológico de la diabetes mellitus tipo 2 y sus complicaciones actualmente se basa en fármacos antihiper glucémicos que se combinan en varios grupos:

- El primer grupo incluye dos tipos de medicamentos: tiazolidinedionas (rosiglitazona y pioglitazona), PPAR γ - agonistas, estimuladores de receptores gamma nucleares y biguanidas (Metformina, Siofor, Avandamet, Bagomet, Glucophage, Metfogamma). Los medicamentos de este grupo aumentan la sensibilidad de las células a la insulina, reducen la resistencia a la insulina y la capacidad de absorción de la glucosa por parte de las 50 células del tracto intestinal, y es por eso que a menudo se prescriben para personas con sobrepeso.
- El segundo grupo de fármacos antihiper glucémicos también comprende dos tipos de medicamentos - las sulfonilureas secundarias (Maninil, Diabeton, Amaril, Glurenorm, Glibinese-retard) que estimulan la generación

de insulina propia, lo que aumenta su eficacia y las meglitinidas (Repaglinida (Novonorm) y Nateglinida (Starlix)) que mejoran la síntesis de insulina por parte de la glándula pancreática y también reduce los picos postprandiales (aumento del nivel de azúcar después de las comidas).

- El tercer grupo de fármacos antihiper glucémicos incluye Acarbosa (Glucobay) que reduce la capacidad de absorción de la glucosa por las células del tracto intestinal mediante el bloqueo de la enzima alfa glucosidasa que divide los polisacáridos que se reciben con la comida.

Los nuevos desarrollos en el tratamiento y la prevención de las complicaciones de la DM 2 incluyen los miméticos directos de incretina, los agonistas de los receptores del péptido 1 similar al glucagón (GLP-1, de sus siglas en inglés) y los agentes bloqueantes indirectos de la dipeptidil peptidasa de tipo 4. Los miméticos directos de incretina incluyen medicamentos tales como exenatida (Byetta), liraglutida (Viktoza), albiglutida y dulaglutida. Los indirectos incluyen Sitagliptina (Januvia), Saxagliptina (Onglyza), Linagliptina (Trajenta) y Vildagliptina (Galvus).

El grupo de medicamentos similares a la incretina es especialmente interesante.

Incretinas como el GLP-1 mejoran el funcionamiento de las células beta, inhiben el aumento inadecuado de la secreción de glucagón y provocan un aumento en la secreción de insulina dependiente de glucosa. La exenatida (exendina-4), que es un mimético de los receptores de incretina (GLP-1R), es uno de los medicamentos cuya eficacia y tratamiento preventivo de la diabetes mellitus no dependiente de insulina y sus complicaciones se ha demostrado mediante ensayos clínicos en personas.

La exenatida es un polipéptido inicialmente conocido como exendina-4, cuyo procedimiento de extracción del veneno del lagarto *Heloderma suspectum* y cuya secuencia de aminoácidos (HGEFTFTSDLSKQEEAVRLFIEWLKNNG-PSSGAPPPS-NH₂) se publicaron por primera vez en abril de 1992 [7]. Como representante de los péptidos de incretina, la exendina-4 tiene un amplio intervalo de potencia, como el aumento de la secreción de insulina dependiente de glucosa, la mejora en el procesamiento de la glucosa, el descenso de la orexia, la desaceleración del movimiento de la comida desde el estómago, etc.

La utilización de exenatida en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 con hiperglucemia suprime la secreción excesiva de glucagón, pero la exenatida no afecta la respuesta regular del glucagón a la hipoglucemia.

El tratamiento con exenatida en combinación con Metformina y/o medicamentos a base de sulfonilurea produce una disminución del contenido de glucosa en sangre en estado de ayuno, el contenido de glucosa postprandial en sangre, y el valor de hemoglobina glucosilada (HbA_{1c}), mejorando el control glucémico de estos pacientes.

Se conocen campos de uso de exenatida: por lo tanto, la patente de EE.UU. [8] desvela la utilización de exenatida para la estimulación de la generación de insulina con una eficacia superior a la de la hormona endógena GLP-1. Los ejemplos proporcionados en la descripción de la invención demuestran que la exenatida es eficaz para el tratamiento de la diabetes mellitus.

Otros efectos terapéuticos de la exenatida se revelaron más adelante: reducción de peso [9], reducción de la actividad motora gástrica y desaceleración del vaciamiento gástrico [10, 11], así como los efectos inotrópicos y diuréticos de la exenatida [12, 13, 14]. Se describe la utilización de exenatida para el tratamiento del ovario poliquístico [15, 16, 17], el tratamiento y la prevención de la nefropatía [18, 19], la prevención y el tratamiento de la arritmia cardíaca [20], para la diferenciación de las células de la médula ósea [21], el tratamiento de la diabetes mellitus de la gestante [22, 23], la modulación del nivel de triglicéridos y el tratamiento de la dislipidemia [24, 25], la supresión de la secreción de glucagón [26, 27], para la diferenciación de células que no producen insulina a la producción de insulina [28]. La solicitud [29] describe la utilización de exenatida, sus agonistas y antagonistas para afectar el sistema nervioso central. Las patentes [30, 31] describen la utilización de exenatida y otros antagonistas de los receptores de incretina para la reducción de la ingesta de alimentos. La solicitud [32] describe composiciones de exenatida estabilizadas. Las patentes [33, 34] describen nuevas solicitudes de exenatida (exendina y sus agonistas).

Todos los aspectos mencionados anteriormente indican una alta eficacia de exenatida para la prevención y el tratamiento de la DM 2. Sin embargo, las complicaciones que se producen en la diabetes mellitus tipo 2, tal como la neuropatía diabética, la distrofia muscular y la endotelopatía, no se resuelven durante el tratamiento con exenatida ni todos los otros fármacos antihiper glucémicos mencionados anteriormente.

Es por eso que existe la tarea de crear nuevos análogos de exenatida que sean eficaces en el tratamiento de las complicaciones que se producen en el curso de la diabetes mellitus tipo 2, tal como la neuropatía diabética, la distrofia muscular y la endotelopatía.

El análogo más cercano de la invención reivindicada es la patente de EE.UU. 5424286 [8] seleccionada como prototipo, en la cual la utilización de miméticos de incretina para la estimulación de la generación de insulina es similar a la invención reivindicada.

La principal desventaja de la invención conocida es la ausencia de efectos terapéuticos de los miméticos de incretina (exenatidas) que permiten la prevención y el tratamiento de dichas complicaciones de la diabetes mellitus como la

neuropatía diabética, la distrofia muscular y la endotelopatía.

Por lo tanto, el resultado técnico de la invención reivindicada será la prevención y el tratamiento de dichas complicaciones de la diabetes como la neuropatía diabética, la distrofia muscular y la endotelopatía.

El resultado técnico en la invención reivindicada se logra mediante la utilización de la composición de acuerdo con la fórmula:

H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Gly-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Arg-Gly-OH

que tiene un efecto terapéutico que permite la prevención y el tratamiento de la neuropatía diabética, la distrofia muscular y la endotelopatía.

La invención se materializa en las siguientes figuras.

10 La Figura 1 es la concentración de glucosa en sangre periférica bajo la influencia de productos de prueba, $M \pm m$, mmol/l. La primera columna es el punto antes del inicio de la inyección de productos, la segunda columna es el último día de tratamiento (80° día).

* - diferencias estadísticamente significativas en los grupos a los que se administró los productos de prueba y el grupo de control, prueba de Bonferroni con $p < 0,05$;

15 # - diferencias estadísticamente significativas en los grupos entre el valor inicial y el último día de tratamiento (80° día de inyección de productos), *prueba t* con $p < 0,05$.

La Figura 2 es el impacto del péptido D en la dosis de 10 ppb en la alodinia táctil en ratas con neuropatía alcohólica. Se inyectaron animales con péptido D durante 100 días de acuerdo con el plan de estudio. Se evaluó la alodinia táctil antes de modelar la neuropatía por alcohol en el 1^{er} día de inyección del producto y en el 50° y 100° día de la inyección diaria. Los datos se proporcionan como un valor umbral medio de la retirada de la pata (g) ($M \pm m$).

20 La Figura 3 es el grosor de la íntima de la arteria mesentérica después de la inyección durante 80 días de productos de prueba, μm .

- diferencia con el grupo sano ($p < 0,05$);

25 * - diferencia con el grupo de control ($p < 0,05$, prueba de Bonferroni);

** - diferencia con el grupo de control ($p < 0,001$, prueba de Bonferroni).

La síntesis del compuesto reivindicado se describe en los ejemplos 1-5.

Ejemplo 1.

Síntesis de Fmoc-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-OH

30 Se suspendieron 6,0 g de resina de 2-clorotritilo (1,5 mM/g de capacidad) en 45 ml de DCM en el reactor de síntesis en fase sólida, mantenido durante 5 minutos; la resina se filtró y se lavó con 2x30 ml de DCM. Se añadieron una solución de 2,95 g (9,9 mM) de Fmoc-Gly-OH y 6 ml (36 mM) de DIPEA disuelta en 30 ml de DCM a la resina y se agitó durante 60 minutos a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 2x30 ml de DCM, se trató con 2x30 ml de la mezcla DCM/metanol/DIPEA (17:2:1) durante 10 min, y se lavó con 2x30 ml de DCM y 3x30 ml de DMF. Se añadieron al reactor 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x30 ml de DMF.

Una solución enfriada (4 °C) de 7,67 g (20,0 mM) de Fmoc-Ser(tBu)-OH, 2,98 g (22,0 mM) de HOBt y 3,42 ml (22,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x30 ml de DMF, se añadieron a DMF 30 ml de solución de dietilamina al 20 %, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x30 ml de DMF, se añadieron a DMF 30 ml de solución de dietilamina al 20 %, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x30 ml de DMF.

Una solución enfriada (4 °C) de 7,67 g (20,0 mM) de Fmoc-Ser(tBu)-OH, 2,98 g (22,0 mM) de HOBt y 3,42 ml (22,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x30 ml de DMF, se añadieron a DMF 30 ml de solución de dietilamina al 20 %, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x30 ml de DMF, se añadieron a DMF 30 ml de solución de dietilamina al 20 %, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x30 ml de DMF.

Una solución enfriada (4 °C) de 6,75 g (20,0 mM) de Fmoc-Pro-OH, 2,98 g (22,0 mM) de HOBt y 3,42 ml (22,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La

resina se filtró, se lavó con 6x30 ml de DMF, se añadieron a DMF 30 ml de solución de dietilamina al 20 %, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x30 ml de DMF, se añadieron a DMF 30 ml de solución de dietilamina al 20 %, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x30 ml de DMF.

- 5 Una solución enfriada (4 °C) de 3,50 g (20,0 mM) de Fmoc-Gly-OH, 2,98 g (22,0 mM) de HOBt y 3,42 ml (22,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x30 ml de DMF y 3x30 ml de DCM. Después de que la resina se trató con 10x30 ml de solución al 1 % de ácido trifluoroacético disuelto en DCM, las soluciones resultantes se combinaron en un matraz que contenía 30 ml de solución al 10 % de piridina en metanol. La mezcla se redujo a ~ 50 ml, y se añadieron 200 ml de agua al residuo. El sedimento obtenido se filtró, se lavó con agua y se secó. Se obtuvieron 6,4 g (91 %) de producto puro al 97 % de acuerdo con HELC.
- 10

Ejemplo 2.

Síntesis de Fmoc-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Ala-Val-Arg(CF₃COOH)-Leu-Phe-Ile-Glu(OtBu)-Trp(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Gly-OH

- 15 Se suspendieron 6,0 g de resina de 2-clorotritilo (1,5 mM/g de capacidad) en 45 ml de DCM en el reactor de síntesis en fase sólida, mantenido durante 5 minutos; la resina se filtró y se lavó con 2x30 ml de DCM. Se añadieron una solución de 2,95 g (9,9 mM) de Fmoc-Gly-OH y 6 ml (36 mM) de DIPEA disuelta en 30 ml de DCM a la resina y se agitó durante 60 minutos a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 2x30 ml de DCM, se trató con 2x30 ml de la mezcla DCM/metanol/DIPEA (17:2:1) durante 10 min, y se lavó con 2x30 ml de DCM y 3x30 ml de DMF. Se cargó en el reactor 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 minutos, se filtró, se lavó con 3x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x30 ml de DMF.
- 20

- 25 Una solución enfriada (4 °C) de 11,93 g (20,0 mM) de Fmoc-Asn(Trt)-OH, 2,98 g (22,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x30 ml de DMF, se añadieron a DMF 30 ml de solución de dietilamina al 20 %, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró, se lavó con 5x30 ml de DMF.

- 30 Una solución enfriada (4 °C) de 9,37 g (20,0 mM) de Fmoc-Lys(Boc)-OH, 2,98 g (22,0 mM) de HOBt y 3,42 ml (22,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x30 ml de DMF.

- 35 Una solución enfriada (4 °C) de 7,07 g (20,0 mM) de Fmoc-Leu-OH, 2,98 g (22,0 mM) de HOBt y 3,42 ml (22,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x30 ml de DMF.

- 40 Una solución enfriada (4 °C) de 10,53 g (20,0 mM) de Fmoc-Trp(Boc)-OH, 2,98 g (22,0 mM) de HOBt y 3,42 ml (22,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x30 ml de DMF.

- 45 Una solución enfriada (4 °C) de 8,51 g (20,0 mM) de Fmoc-Glu(OtBu)-OH, 2,98 g (22,0 mM) de HOBt y 3,42 ml (22,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x30 ml de DMF.

- 50 Una solución enfriada (4 °C) de 7,07 g (20,0 mM) de Fmoc-Ile-OH, 2,98 g (22,0 mM) de HOBt y 3,42 ml (22,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x30 ml de DMF.

- 55 Una solución enfriada (4 °C) de 7,75 g (20,0 mM) de Fmoc-Phe-OH, 2,98 g (22,0 mM) de HOBt y 3,42 ml (22,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x30 ml de DMF.

Una solución enfriada (4 °C) de 7,07 g (20,0 mM) de Fmoc-Leu-OH, 2,98 g (22,0 mM) de HOBt y 3,42 ml (22,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x30 ml de DMF.

Una solución enfriada (4 °C) de 8,66 g (20,0 mM) de Fmoc-Arg-OH.HCl, 2,98 g (22,0 mM) de HOBt y 3,42 ml (22,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x30 ml de DMF.

Una solución enfriada (4 °C) de 6,79 g (20,0 mM) de Fmoc-Val-OH, 2,98 g (22,0 mM) de HOBt y 3,42 ml (22,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x30 ml de DMF.

Una solución enfriada (4 °C) de 6,23 g (20,0 mM) de Fmoc-Ala-OH, 2,98 g (22,0 mM) de HOBt y 3,42 ml (22,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x30 ml de DMF.

Una solución enfriada (4 °C) de 8,51 g (20,0 mM) de Fmoc-Glu(OtBu)-OH, 2,98 g (22,0 mM) de HOBt y 3,42 ml (22,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x30 ml de DMF.

Una solución enfriada (4 °C) de 8,51 g (20,0 mM) de Fmoc-Glu(OtBu)-OH, 2,98 g (22,0 mM) de HOBt y 3,42 ml (22,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x30 ml de DMF.

Una solución enfriada (4 °C) de 8,51 g (20,0 mM) de Fmoc-Glu(OtBu)-OH, 2,98 g (22,0 mM) de HOBt y 3,42 ml (22,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x30 ml de DMF y 3x30 ml de DCM. Después de que la resina se trató con 10x30 ml de solución al 1 % de ácido trifluoroacético disuelto en DCM, las soluciones resultantes se combinaron en un matraz que contenía 30 ml de solución al 10 % de piridina en metanol. La mezcla se redujo a ~ 50 ml, y se añadieron 200 ml de agua al residuo. El sedimento obtenido se filtró, se lavó con agua y se secó. Se obtuvieron 21,8 g (80 %) de producto puro al 95 % de acuerdo con HELC.

Ejemplo 3.

Síntesis de Boc-His(Trt)-Gly-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Gly-OH

Se suspendieron 6,0 g de resina de 2-clorotritilo (1,5 mM/g de capacidad) en 45 ml de DCM en el reactor de síntesis en fase sólida, mantenido durante 5 minutos; la resina se filtró y se lavó con 2x30 ml de DCM. Se añadió una solución con 2,95 g (9,9 mM) de Fmoc-Gly-OH y 6 ml (36 mM) de DIPEA disuelta en 30 ml de DCM a la resina y se agitó durante 60 minutos a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 2x30 ml de DCM, se trató con 2x30 ml de la mezcla DCM/metanol/DIPEA (17:2:1) durante 10 min, y se lavó con 2x30 ml de DCM y 3x30 ml de DMF. Se cargaron en el reactor 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 minutos, se filtró, se lavó con 3x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x30 ml de DMF.

Una solución enfriada (4 °C) de 12,21 g (20,0 mM) de Fmoc-Gln(Trt)-OH, 2,98 g (22,0 mM) de HOBt y 3,42 ml (22,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x30 ml de DMF.

Una solución enfriada (4 °C) de 9,37 g (20,0 mM) de Fmoc-Lys(Boc)-OH, 2,98 g (22,0 mM) de HOBt y 3,42 ml (22,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 %

disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x30 ml de DMF.

5 Una solución enfriada (4 °C) de 7,67 g (20,0 mM) de Fmoc-Ser(tBu)-OH, 2,98 g (22,0 mM) de HOBt y 3,42 ml (22,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x30 ml de DMF.

10 Una solución enfriada (4 °C) de 7,07 g (20,0 mM) de Fmoc-Leu-OH, 2,98 g (22,0 mM) de HOBt y 3,42 ml (22,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x30 ml de DMF.

15 Una solución enfriada (4 °C) de 8,23 g (20,0 mM) de Fmoc-Asp(OtBu)-OH, 2,98 g (22,0 mM) de HOBt y 3,42 ml (22,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x30 ml de DMF.

20 Una solución enfriada (4 °C) de 7,67 g (20,0 mM) de Fmoc-Ser(tBu)-OH, 2,98 g (22,0 mM) de HOBt y 3,42 ml (22,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x30 ml de DMF.

25 Una solución enfriada (4 °C) de 7,95 g (20,0 mM) de Fmoc-Thr(tBu)-OH, 2,98 g (22,0 mM) de HOBt y 3,42 ml (22,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x30 ml de DMF.

30 Una solución enfriada (4 °C) de 7,75 g (20,0 mM) de Fmoc-Phe-OH, 2,98 g (22,0 mM) de HOBt y 3,42 ml (22,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x30 ml de DMF.

35 Una solución enfriada (4 °C) de 7,95 g (20,0 mM) de Fmoc-Thr(tBu)-OH, 2,98 g (22,0 mM) de HOBt y 3,42 ml (22,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x30 ml de DMF.

40 Una solución enfriada (4 °C) de 5,95 g (20,0 mM) de Fmoc-Gly-OH, 2,98 g (22,0 mM) de HOBt y 3,42 ml (22,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x30 ml de DMF.

45 Una solución enfriada (4 °C) de 8,51 g (20,0 mM) de Fmoc-Glu(OtBu)-OH, 2,98 g (22,0 mM) de HOBt y 3,42 ml (22,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x30 ml de DMF.

50 Una solución enfriada (4 °C) de 5,95 g (20,0 mM) de Fmoc-Gly-OH, 2,98 g (22,0 mM) de HOBt y 3,42 ml (22,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x30 ml de DMF, se añadieron 30 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x30 ml de DMF.

55 Una solución enfriada (4 °C) de 9,95 g (20,0 mM) de Boc-His(Trt)-OH, 2,98 g (22,0 mM) de HOBt y 3,42 ml (22,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x30 ml de DMF y 3x30 ml de DCM. Después de que la resina se trató con 10x30 ml de solución al 1 % de ácido trifluoroacético disuelto en DCM, las soluciones resultantes se combinaron en un matraz que contenía 30 ml de solución al 10 % de piridina en metanol. La mezcla se redujo a ~ 50 ml, y se añadieron 200 ml de agua al residuo. El sedimento obtenido se filtró, se lavó con agua y se secó. Se obtuvieron 20,9 g (85 %) de

producto puro al 95 % de acuerdo con HELC.

Ejemplo 4.

Síntesis de la 14-glicina-exendina-4 (*Heloderma suspectum*)-(1-39)-peptidil-octa-D-arginil-glicina

H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Gly-Glu-Glu-Ala-Val-
Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-D-Arg-
D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Arg-Gly-OH

- 5 Se suspendieron 2,0 g de resina de 2-clorotritilo (1,5 mM/g de capacidad) en 15 ml de DCM en el reactor de síntesis en fase sólida, mantenido durante 5 minutos; la resina se filtró y se lavó con 2x10 ml de DCM. Se añadió una solución con 0,98 g (3,3 mM) de Fmoc-Gly-OH y 2 ml (12 mM) de DIPEA disuelta en 10 ml de DCM a la resina y se agitó durante 60 minutos a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 2x30 ml de DCM, se trató con 2x10 ml de la mezcla DCM/metanol/DIPEA (17:2:1) durante 10 min, y se lavó con 2x10 ml de DCM y 3x10 ml de DMF.
- 10 Se añadieron al reactor 10 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 minutos, se filtró, se lavó con 3x10 ml de DMF, se añadieron 10 ml de solución al 20 % de DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x10 ml de DMF.
- 15 Una solución enfriada (4 °C) de 2,60 g (6,0 mM) de Fmoc-D-Arg-OH.HCl, 0,98 g (7,2 mM) de HOBt y 1,12 ml (7,2 mM) de DIC disuelto en 10 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x10 ml de DMF, se añadieron 10 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x10 ml de DMF, se añadieron 10 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x10 ml de DMF.
- 20 Una solución enfriada (4 °C) de 2,60 g (6,0 mM) de Fmoc-D-Arg-OH.HCl, 0,98 g (7,2 mM) de HOBt y 1,12 ml (7,2 mM) de DIC disuelto en 10 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x10 ml de DMF, se añadieron 10 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x10 ml de DMF, se añadieron 10 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x10 ml de DMF.
- 25 Una solución enfriada (4 °C) de 3,46 g (8,0 mM) de Fmoc-D-Arg-OH.HCl, 1,35 g (10,0 mM) de HOBt y 1,56 ml (10,0 mM) de DIC disuelto en 10 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x10 ml de DMF, se añadieron 10 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x10 ml de DMF, se añadieron 10 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x10 ml de DMF.
- 30 Una solución enfriada (4 °C) de 3,46 g (8,0 mM) de Fmoc-D-Arg-OH.HCl, 1,35 g (10,0 mM) de HOBt y 1,56 ml (10,0 mM) de DIC disuelto en 10 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x10 ml de DMF, se añadieron 10 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x10 ml de DMF, se añadieron 10 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x10 ml de DMF.
- 35 Una solución enfriada (4 °C) de 3,46 g (8,0 mM) de Fmoc-D-Arg-OH.HCl, 1,35 g (10,0 mM) de HOBt y 1,56 ml (10,0 mM) de DIC disuelto en 10 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 10 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x10 ml de DMF, se añadieron 10 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x10 ml de DMF, se añadieron 10 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x10 ml de DMF.
- 40 Una solución enfriada (4 °C) de 4,33 g (10,0 mM) de Fmoc-D-Arg-OH.HCl, 1,62 g (12,0 mM) de HOBt y 1,88 ml (12,0 mM) de DIC disuelto en 10 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x10 ml de DMF, se añadieron 10 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x10 ml de DMF, se añadieron 10 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x10 ml de DMF.
- 45 Una solución enfriada (4 °C) de 4,33 g (10,0 mM) de Fmoc-D-Arg-OH.HCl, 1,62 g (12,0 mM) de HOBt y 1,88 ml (12,0 mM) de DIC disuelto en 10 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x10 ml de DMF, se añadieron 10 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x10 ml de DMF, se añadieron 10 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x10 ml de DMF.
- 50 Una solución enfriada (4 °C) de 4,33 g (10,0 mM) de Fmoc-D-Arg-OH.HCl, 1,62 g (12,0 mM) de HOBt y 1,88 ml (12,0 mM) de DIC disuelto en 10 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x10 ml de DMF, se añadieron 10 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x10 ml de DMF, se añadieron 10 ml de solución de dietilamina al 20 %

disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x10 ml de DMF.

Una solución enfriada (4 °C) de 3,07 g (8,0 mM) de Fmoc-Ser(tBu)-OH, 1,35 g (10,0 mM) de HOBt y 1,56 ml (10,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x10 ml de DMF, se añadieron 10 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x10 ml de DMF, se añadieron 10 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x10 ml de DMF.

Una solución enfriada (4 °C) de 2,70 g (8,0 mM) de Fmoc-Pro-OH, 1,35 g (10,0 mM) de HOBt y 1,56 ml (10,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x10 ml de DMF, se añadieron 10 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x10 ml de DMF, se añadieron 10 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x10 ml de DMF.

Una solución enfriada (4 °C) de 2,70 g (8,0 mM) de Fmoc-Pro-OH, 1,35 g (10,0 mM) de HOBt y 1,56 ml (10,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x10 ml de DMF, se añadieron 10 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x10 ml de DMF, se añadieron 10 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x10 ml de DMF.

Una solución enfriada (4 °C) de 2,70 g (8,0 mM) de Fmoc-Pro-OH, 1,35 g (10,0 mM) de HOBt y 1,56 ml (10,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x10 ml de DMF, se añadieron 10 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x10 ml de DMF, se añadieron 10 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x10 ml de DMF.

Una solución enfriada (4 °C) de 2,49 g (8,0 mM) de Fmoc-Ala-OH, 1,35 g (10,0 mM) de HOBt y 1,56 ml (10,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x10 ml de DMF, se añadieron 10 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x10 ml de DMF, se añadieron 10 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x10 ml de DMF.

Una solución enfriada (4 °C) de 5,90 g (8,0 mM) de Fmoc-GlyProSer(tBu)Ser(tBu)Gly-OH (producto del Ejemplo 1), 1,62 g (12,0 mM) de HOBt y 1,88 ml (12,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x10 ml de DMF, se añadieron 10 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x10 ml de DMF, se añadieron 10 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x10 ml de DMF.

Solución enfriada (4 °C) de 11,35 g (4,0 mM) de Fmoc-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)Glu(OtBu)AlaValArg (HCl)LeuPheGlu(OtBu)Trp(Boc)LeuLys(Boc)Asn(Trt)Gly-OH (producto del Ejemplo 2), 0,81 g (6,0 mM) de HOBt y 0,95 ml (6,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x10 ml de DMF, se añadieron 10 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se agitó durante 5 min, se filtró, se lavó con 3x10 ml de DMF, se añadieron 10 ml de solución de dietilamina al 20 % disuelta en DMF, se mantuvo durante 20 min, se filtró y se lavó con 5x10 ml de DMF.

Solución enfriada (4 °C) de 9,94 g (4,0 mM) de Boc-His(Trt)Gly-Glu(OtBu)GlyThr(tBu)PheThr(tBu)Ser(tBu)Asp(OtBu)LeuSer(tBu)Lys(Boc)Gln(Trt)Gly-OH (producto del Ejemplo 3), 0,81 g (6,0 mM) de HOBt y 0,95 ml (6,0 mM) de DIC disuelto en 30 ml de DMF se cargó en el reactor y se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con 6x20 ml de DMF, 4x20 ml de DCM, se secó, se añadió 50 ml de la mezcla de TFA/TIS/EDT/H₂O (97:1:1:1), se mantuvo durante 4 horas a temperatura ambiente, se filtró y se lavó con 3x20 ml de ácido trifluoroacético, los filtrados combinados se redujeron hasta -20 ml, se añadieron 60 ml de éter seco al residuo. El sedimento obtenido se filtró, se lavó con éter sobre un filtro y se secó. El producto obtenido se disolvió con 50 ml de agua y la mezcla se congeló y se liofilizó. El liofilizado se disolvió con 40 ml de agua y se aplicó a la columna de resina de intercambio iónico Amberlite IRA-400 (forma Cl). La columna se lavó con agua, las fracciones que contenían el producto se redujeron hasta ~ 50 ml y se aplicaron a la columna de fase inversa C18 Water X-Bridge, 10 µm, 127Å, 50x250 mm. La elución se realizó a un flujo de eluyente de 50 ml/min. Fase A: HCl/H₂O al 0,1 %, B: acetonitrilo. Gradiente: 0 % (B)-70 % (B) durante 70 min. Las fracciones que contenían el producto principal se combinaron, se redujeron a -50 ml, se congelaron y se liofilizaron. Se obtuvieron 3,9 g (20 %) de producto puro al 97,5 % (HPLC). Espectro de masas: calculado para C₂₃₁H₃₇₄N₈₂O₇₀ MH⁺ 5420,98, se obtuvo MH⁺ 5420,80. Análisis de aminoácidos: alanina 2,02 (2), arginina 9,0 (9), ácido aspártico + asparagina 2,05 (2), ácido glutámico + glutamina 5,80 (6), glicina 7,25 (7), histidina 1,02 (1), isoleucina 1,03 (1), leucina 2,96 (3), lisina 2,07 (2), fenilalanina 2,05 (2), prolina 4,10 (4), serina 4,85 (5), treonina 1,90 (2) y valina 1,02 (1).

Ejemplo 5.

Síntesis de H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Gly-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Arg-

Gly-OH utilizando la cepa de *Corynebacterium acetoacidophilum*.

1.1. Diseño del vector pBSΔCg10278 para la eliminación del gen Cg10278 que codifica PBP1a

Se conocen la secuencia genómica de ATCC 13032 de *C. acetoacidophilum* y la secuencia de nucleótidos del gen Cg1278 que codifica la proteína de unión a penicilina PBPla (GenBank, número de inventario BA000036 (versión BA000036.3 GI: 42602314, locus_tag=«NCg10274»)). Los cebadores P1, P2, P3 y P4 se sintetizaron con referencia a esta secuencia. Con la ayuda de la PCR, se utilizó el ADN del cromosoma como matriz de la cepa ATCC 13869 de *C. acetoacidophilum* preparada en un procedimiento convencional (Saito H. y Miura K.I., Biochim. Biophys. Acta, 1963, 72:619-629) y los cebadores P1, P2, P3 y P4, se obtuvo un fragmento (aproximadamente 1 tpn) del lado 5' y un fragmento (aproximadamente 1 tpn) del lado 3' del Cg10278 que codifica PBPla respectivamente. Después, con la ayuda de la PCR y utilizando ambos fragmentos de ADN como matriz y los cebadores P1 y P4, se obtuvo un fragmento de ADN (aproximadamente 2 tpn) que consiste en ambos fragmentos combinados entre sí. Se aplicaron sitios de reconocimiento de enzimas de restricción BamH I y Xba I respectivamente. Se utilizó la ADN polimerasa Pyrobest (fabricada por Takara Bio) y las condiciones recomendadas por el fabricante para la PCR. Este fragmento de ADN se trató con las enzimas de restricción BamH I y Xba I y, con el fin de adquirir el vector pBSΔCg10278 para la eliminación del gen Cg0278, se agregó al sitio pBS4 de BamH I-Xba I descrito en el documento WO 2005/113744. Se utilizaron para la ligadura el kit Ver de ligadura de ADN 2.1 (fabricado por Takara Bio) y las condiciones recomendadas por el fabricante.

1.2. Diseño de la cepa PBPla-less

La cepa YDK010 de *C. acetoacidophilum* descrita en el documento WO 2004/029254 se transformó con el vector pBSΔCg10278 diseñado. La cepa YDK010 de *C. acetoacidophilum* es una cepa que carece de una proteína de la capa superior de células PS2 de la AJ12036 de *C. acetoacidophilum* (FERM BP-734) (documento WO 2004/029254). La cepa se eligió entre los transformantes obtenidos de acuerdo con la descripción de los documentos WO 2005/113744 y WO 2006/057450 con el fin de obtener la cepa YDK010ΔPBP1a que carece del gen Cg1278.

Los ejemplos que se muestran a continuación se refieren a pruebas farmacológicas del péptido obtenido.

El fin del estudio es la revelación de la actividad antihiper glucémica y los efectos preventivos y terapéuticos del compuesto reivindicado (en lo sucesivo, "péptido D") en las complicaciones sobre la base del modelo de diabetes experimental química inducida por una inyección única de estreptozocina (STZ) y nicotinamida en ratas macho [35].

Los siguientes medicamentos fueron utilizados para la comparación:

1. Byetta® (como medicamento de referencia para la prevención y el tratamiento de las complicaciones de la DM 2) es una solución transparente para inyección subcutánea, 250 µg/l ml: jeringas precargadas de 1,2 ml de BAXTER Pharmaceutical Solutions.
2. Sustancia exenatida sintética
3. Metformina (Siofor® 500) (como producto antihiper glucémico convencional de las biguanidas).

REACTIVOS Y MATERIALES APLICADOS

Un kit de reactivos para la determinación del nivel de hemoglobina glucosilada ("Phosphosorb" LLC, Rusia).

EQUIPO APLICADO

1. Dispositivo de dosificación médica de laboratorio, 10-100 µl.
2. Dispositivo de dosificación médica de laboratorio, 100-1.000 µl.
3. Microcentrífuga Z 216 MK (Hermle Labortechnik GmbH, Alemania).
4. Medidor de glucosa OneTouch UltraEasy® (LifeScan, EE.UU.).
5. Tiras reactivas OneTouch Ultra® (LifeScan, EE.UU.).
6. Filamentos de Von Frey (Stoelting, EE.UU.).

ANIMALES

Especies animales:	Ratas macho no consanguíneas
Origen:	Academia rusa de ciencias médicas Granja de animales de laboratorio "Rappolovo"
Peso de los animales antes de comenzar el estudio	140-200 g
Cantidad de animales:	50
Certificado veterinario:	247 N.º 0109645 con fecha 31 de julio de 2013

ADAPTACIÓN Y SELECCIÓN DE ANIMALES

- 5 Antes del comienzo del estudio, los animales de laboratorio se mantuvieron durante 7 días para la adaptación con el manejo grupal en jaulas. Durante este período, los animales se controlaron diariamente para la afección clínica mediante un examen visual. Los animales con anomalías detectadas en el examen no se incluyeron en grupos experimentales. Antes de comenzar el estudio, se agruparon los animales que cumplían con los criterios de inclusión en el experimento.

AGRUPACIÓN

- 10 La selección de los animales se realizó mediante el procedimiento de aleatorización por bloques modificada [36]. Para este fin, todos los animales suministrados de la granja se colocaron aleatoriamente en celdas de bloques de aleatorización (la cantidad de celdas del bloque de aleatorización es divisible por la cantidad de grupos en el experimento). Después, utilizando el generador de números aleatorios (programa estadístico Statistica 6.0), se obtuvo la lista de datos que contienen números de las celdas con animales y sus números de grupo correspondientes, en las que los animales se colocaron posteriormente [36].

IDENTIFICACIÓN DE ANIMALES

- 15 Las etiquetas de la jaula incluían sexo, cantidad de animales, fecha de inicio del experimento y nombre del grupo. A cada animal seleccionado para el estudio se le asignó un número individual aplicando una marca en la cola.

Los animales se mantuvieron bajo condiciones estándar de acuerdo con las reglas establecidas por el Ministerio de Salud de la URSS con fecha 06.07.1973 en cuanto a la disposición, equipamiento y manejo de clínicas experimentales y biológicas (terrarios) y GOST R 53434-2009.

- 20 Los animales se mantuvieron en jaulas de plástico transparente estándar en grupos de 5 individuos en lechos de paja; las jaulas se cubrieron con pantallas de acero con una cavidad de alimentación. La superficie de suelo para un animal comprendía 440 cm² (el área mínima permitida es de 250 cm²).

- 25 Se agregó *ad libitum* "alimento para el manejo de animales" Пк-120-1 preparado por GOST R 50258-92 de acuerdo con las regulaciones aprobadas por la Orden del Ministerio de Salud de la URSS N.º 755 con fecha 12.08.1977 a la cavidad de alimentación de la pantalla de la jaula de acero (al medir el nivel de glucosa, los animales fueron privados de alimento durante 18 horas). El certificado veterinario N.º 247 N.º 0294922 ("Aller Petfood" LLC, Rusia), así como el certificado de conformidad N.º POCRU.ПР98.H00093/0051289, período de validez desde el 17.05.2011 hasta el 16.05.2014.

- 30 Los animales se suministraron con agua purificada de acuerdo con el SOP ОК-ОС-4 y se racionaron por sus propiedades organolépticas, valores de pH, residuos secos, sustancias reductoras, dióxido de carbono, nitratos y nitritos, amoníaco, cloruros, sulfatos, calcio y metales pesados de acuerdo con el SOP АБ-38 sobre la base de GOST 51232-98 "Drinking water. General requirements for organization and quality control methods". Se suministró *ad libitum* agua en los bebederos estándar con tapa de acero de elevación manual.

- 35 Se utilizaron como lecho pellets de madera de 6 mm ("ZooSPb" LLC, Rusia). Los animales se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas (temperatura de 19,5-21 °C y humedad relativa del 61-75 %). El régimen de luz comprendía 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se ajustó el régimen de ventilación que proporciona aproximadamente 15 volúmenes de los locales por hora, concentración de CO₂ de no más de 0,15 % del vol., amoníaco de no más de 0,001 mg/l. La temperatura del aire y la humedad se registraron diariamente. No se observaron desviaciones significativas de estos parámetros durante el período de mantenimiento y en el curso del experimento.
- 40

DISEÑO DEL ESTUDIO

Características de los grupos de estudio, ruta y duración de la administración de sustancias de prueba

Grupo N.º	Sexo, q-ty de animales		Sustancia administrada	Dosis	Ruta y duración de la administración
1	M	5	-	-	Subcutánea, diaria, una vez al día durante 80 días
2	M	5	Agua destilada	-	
3	M	10	Byetta®	4,5 ppb	
4	M	10	Exenatida	4,5 ppb	
5	M	10	Péptido D	6,0 ppb	
6	M	10	Metformina (Siofor® 500)	85,7 ppm	Intragástrica, diaria, una vez al día durante 80 días

De acuerdo con el programa de experimentos, los animales se sometieron a la inducción de diabetes mellitus experimental utilizando una inyección única de estreptozotocina (STZ) abdominal en la dosis de 65 ppm previamente diluida en tampón de citrato (pH = 6,5) el día 0. Todos los animales se inyectaron abdominalmente con nicotinomida en la dosis de 230 ppm (solución al 5 %) 2 horas antes de la dosis [35, 37].

- 5 El nivel de glucosa en sangre periférica se midió en ratas en ayunas (los animales fueron privados de alimento durante una noche) antes de la inducción de la patología, luego 1, 3 y 9 días después de la inducción de la patología. Después del comienzo de la inyección de sustancias de prueba, el nivel de glucosa se midió cada 10 días y el día de la eutanasia. El registro del peso corporal se realizó los mismos días que la medición del nivel de glucosa. La prueba de alodinia se realizó en el 60°, 70° y 80° día de la inyección de medicamentos durante el experimento. En caso de neuropatía alcohólica, la prueba de sensibilidad táctil se realizó el 1^{er}, 50° y 100° día de la inyección de medicamentos.

Se tomó una muestra de sangre venosa para determinar el nivel de hemoglobina glucosilada de los animales el día de la eutanasia. Los siguientes órganos también se tomaron para estudio patomorfológico: nervio ciático, parte de la arteria mesentérica, parte de la arteria de la retina, parte del músculo gastrocnemio y glándula pancreática.

15 EXPERIMENTO Y CALENDARIO DE OPERACIONES

Operación	Día del experimento										
	0	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Inducción de patología											
Registro de peso corporal											
Medición del nivel de glucosa en sangre periférica*											
Prueba de alodinia											
Inyección de medicamentos											
Medición de la hemoglobina glucosilada											
Eutanasia											
Nota – * - la medición del nivel de glucosa también se llevó a cabo el 1 ^{er} , 2 ^o , 3 ^o , 9 ^o , 10 ^o y 14 ^o día después de la inyección adicional de STZ.											

Ejemplo 6. Determinación de glucosa en sangre de animales de experimentación.

- La medición del nivel de glucosa en sangre periférica de ratas se llevó a cabo utilizando el medidor de glucosa OneTouch® y las tiras reactivas OneTouch® mediante la prueba de la glucosa oxidasa. Se privaron a las ratas de alimento, pero no de agua por una noche antes de la medición del nivel de glucosa. El procedimiento de medición fue el siguiente: un animal con una marca requerida se retiró de la jaula, su cola se trató con un agente bactericida, se perforó una vena con una aguja de jeringa y se colocó el medidor de glucosa con una tira reactiva cuando se realizó la extracción de sangre. Los datos obtenidos se introdujeron en la placa inicial.

- Se puede ver en la figura 1 que la tendencia general a la reducción de la concentración de glucosa se observó en el contexto de la aplicación de los productos de prueba. El análisis de varianza bidireccional (ANOVA) con mediciones repetidas reveló un impacto estadísticamente significativo de los productos de prueba sobre la concentración de glucosa en sangre periférica ($F_{4,25} = 3,49$, $p = 0,02$). La comparación intergrupar adicional mostró una diferencia significativa entre el grupo inyectado con Metformina a partir del 20° día de la inyección del producto ($p < 0,05$, prueba de Bonferroni), así como los grupos inyectados con el péptido reivindicado (péptido D) a partir del 40° día de la inyección del producto ($p < 0,05$, prueba de Bonferroni) en comparación con el grupo de control.

- La comparación pareada entre el valor inicial de glucosa antes del tratamiento (punto "0") y el último día de tratamiento (día 80) mostró una diferencia estadísticamente significativa en los grupos que recibieron inyección de Metformina ($p = 0,017$, prueba t) y D-péptido ($p = 0,011$, prueba t) (figure 1).

- Finalmente, se puede concluir que el péptido D reivindicado tuvo un efecto antihyperglucémico durante el tratamiento con una duración de 80 días a partir del 40° día de la inyección. El producto similar a la incretina, la exenatida, también mostró un efecto antihyperglucémico a partir del 50° día de la inyección, aunque su intensidad fue menor que la del D-péptido. La inyección de Byetta® no mostró impacto en el nivel de glucosa en sangre periférica, pero el producto de referencia Metformina mostró propiedades antihyperglucémicas a partir del 20° día de tratamiento como se esperaba.

Ejemplo 7. Determinación de hemoglobina glucosilada en sangre periférica.

La determinación de la hemoglobina glucosilada en sangre venosa se realizó utilizando el kit de reactivos "Diabetes Test, HbA_{1c}" ("Phosphosorb" LLC, Rusia) mediante el procedimiento de cromatografía de afinidad de las fracciones de hemoglobina glucosilada y no glucosilada en hemolisado de sangre de rata.

- 5 Las muestras de sangre para la determinación de hemoglobina glucosilada en hemolisado de glóbulos rojos animales se tomaron de la vena de la cola de animales experimentales en el día 81° de la inyección diaria de los productos de prueba. Los datos obtenidos se dan en la tabla 1.

Tabla 1 - Contenido de hemoglobina glucosilada en sangre animal, %, M ± m

Grupo	n	Hemoglobina glucosilada, %
Grupo sano	5	4,2 ± 0,59
Grupo de control	4	15,6 ± 1,63 [#]
Byetta®	4	8,1 ± 1,16 [*]
Exenatida	4	7,9 ± 2,03 [*]
Péptido D	4	5,5 ± 0,53 [*]
Metformina	6	5,7 ± 0,25 [*]

Nota:

- las diferencias son estadísticamente significativas en comparación con el grupo sano, prueba t para variables independientes con p < 0,05,

* - las diferencias son estadísticamente significativas en comparación con el grupo de control, prueba de Bonferroni con p < 0,05.

- 10 Se puede observar en los datos de la tabla 1 que se observó un aumento estadísticamente significativo de la concentración de HbA_{1c} en 4 veces en los animales del grupo de control en comparación con el grupo sano (p = 0,0002, prueba t). Los datos de medición caracterizan el desarrollo aparente de la patología experimental.

- 15 Se estableció una reducción estadísticamente significativa de la concentración de HbA_{1c} en el contexto de la aplicación de los productos de prueba (F_{4,17} = 11,83, p < 0,0001). La comparación intergrupar adicional reveló el efecto máximo del tratamiento en los grupos a los que se administró el péptido D reivindicado (p < 0,0001) y Metformina (p < 0,0001), mientras que este efecto no fue tan evidente en los grupos que recibieron tratamiento con Byetta® y Exenatida (p = 0,0018 y p = 0,0015 respectivamente).

Ejemplo 8. Evaluación de la alodinia táctil en ratas con neuropatía diabética

- 20 Se colocó una rata en una jaula de plástico con un suelo de rejilla de alambre metálico y se dejó en esta jaula durante 5 minutos para extinguir la respuesta de orientación. La determinación del umbral medio eficaz de respuesta táctil se realizó mediante el procedimiento de Chaplan y col. [38] utilizando el kit que consta de 8 filamentos de von Frey estándar (Stoelting, EE.UU.). La tosquedad del filamento expresada como fuerza mínima que se requiere para la flexión del filamento aumentó logarítmicamente con valores absolutos de 0,692 a 28,840 g.

- 25 El umbral de cada rata se determinó inicialmente en la pata izquierda y luego en la pata derecha. Un extremo del filamento tocó el centro de la superficie plantar en la pata con la fuerza necesaria para doblar el filamento, y se dejó en esta posición durante 6-8 segundos. Se registró una respuesta positiva si el animal retiraba su pata de forma abrupta durante el contacto, o si la retirada de un filamento era seguida de una flexión aguda de la pata.

- 30 La prueba se inició a partir de la aplicación de un filamento correspondiente a la fuerza de 3,630 g. Luego se utilizaron estímulos (filamentos) en la secuencia creciente y decreciente. El filamento con la menor tosquedad se utilizó en caso de respuesta positiva, mientras que el filamento con la mayor tosquedad se utilizó en caso de respuesta negativa. Se utilizaron 4 filamentos más de acuerdo con el mismo principio después de la determinación inicial del umbral de sensibilidad.

El umbral eficaz medio psicofisiológico de la capacidad de respuesta táctil se calculó mediante el procedimiento descrito por Dixon [39].

- 35 La Tabla 2 presenta los resultados de los experimentos en el estudio del impacto de la inyección durante 80 días de productos de prueba en el grado de desarrollo de la alodinia táctil.

En los experimentos completados para el día 60 de inyección de medicamentos, la manifestación de alodinia táctil en el grupo de control fue máxima (F_{1,14} = 669,8, p < 0,0001), lo que indica el modelo establecido de neuropatía

diabética con síndrome de dolor aparente.

El procesamiento estadístico mediante análisis de varianza bidireccional con mediciones repetidas que permitieron determinar la importancia del factor "inyección de medicamentos" en la expresión de la alodinia táctil se llevó a cabo para una evaluación adicional de los resultados obtenidos ($F_{4,43} = 10,93$; $p < 0,0001$). La comparación intergrupar adicional (prueba de Bonferroni) mostró una disminución en la intensidad de la alodinia táctil en el grupo al que se administró el péptido D a partir del día 60° de la inyección. La Tabla 3 presenta los valores del criterio F para todas las sustancias utilizadas. Las comparaciones intergrupales posteriores (prueba de Bonferroni) confirmaron un impacto significativo solo en el grupo al que se administró el péptido D reivindicado.

Tabla 2 - Impacto de los productos de prueba en la alodinia táctil de ratas. La alodinia táctil se evaluó antes de la inyección de los productos de prueba. Los datos se proporcionan como un valor medio del umbral de retirada de la pata (g) ($M \pm m$).

Grupo	Valor inicial	60° día de inyección de productos	70° día de inyección de productos	80° día de inyección de productos
Grupo sano	28,82 $\pm$ 0,00	27,74 $\pm$ 0,80	26,94 $\pm$ 1,88	27,74 $\pm$ 0,80
Grupo de control	28,82 $\pm$ 0,00	2,77 $\pm$ 0,71 [#]	3,10 $\pm$ 0,78 [#]	3,46 $\pm$ 0,61 [#]
Byetta®	28,82 $\pm$ 0,00	5,72 $\pm$ 1,61	3,41 $\pm$ 0,55	6,59 $\pm$ 1,46
Exenatida	28,14 $\pm$ 0,69	5,33 $\pm$ 1,17	5,72 $\pm$ 1,18	8,24 $\pm$ 2,73
Péptido D	28,82 $\pm$ 0,00	16,15 $\pm$ 4,18 [*]	13,91 $\pm$ 3,59 [*]	15,05 $\pm$ 3,67 [*]
Metformina	28,82 $\pm$ 0,00	4,94 $\pm$ 0,90	4,98 $\pm$ 0,87	4,28 $\pm$ 0,45

Nota -

[#] - las diferencias son estadísticamente significativas en comparación con el grupo sano, prueba t para variables independientes con $p < 0,05$,

^{*} - las diferencias son estadísticamente significativas en comparación con el grupo de control, prueba de Bonferroni con $p < 0,05$.

Tabla 3 - Resultados del procesamiento de datos estadísticos mediante la expresión de alodinia táctil en el contexto de la inyección de productos de prueba

Indicador	Valor de criterio F	Valor de <i>P</i>
Grupo de control	$F_{1;14} = 669,8$	$< 0,0001$
Byetta	$F_{1;14} = 5,78$	0,03
Exenatida	$F_{1;14} = 4,66$	0,04
Péptido D	$F_{1;14} = 22,52$	0,0003
Metformina	$F_{1;14} = 2,87$	0,01

Por lo tanto, el estudio de los efectos de los productos de prueba mostró lo siguiente: Byetta®, exenatida y Metformina disminuyeron ligeramente la intensidad de la manifestación de la alodinia en la comparación individual de los indicadores, sin embargo, la comparación intergrupar adicional no confirmó el impacto estadísticamente significativo. La inyección del péptido D reivindicado a partir del día 60° de inyección disminuyó significativamente las manifestaciones de alodinia táctil en ratas que padecían neuropatía diabética (tablas 2-3). Esta observación permite concluir que en el caso de un tratamiento a largo plazo (a partir del día 60° de inyección) existe un cierto efecto terapéutico en relación con una de las complicaciones más extendidas de la DM 2, la neuropatía diabética periférica que probablemente esté condicionada por la acción neuroprotectora del péptido D reivindicado.

Ejemplo 9. Evaluación de la alodinia táctil en ratas que padecen neuropatía alcohólica.

La evaluación de la alodinia táctil se realizó de la misma manera que en el ejemplo 7. Los síntomas de la neuropatía alcohólica (alodinia táctil) se observaron a partir de la 8ª semana (56-60 días) de consumo de alcohol al 30 % por ratas de acuerdo con el procedimiento de consumo forzado [40] ($F_{1;12} = 26,25$; $p = 0,0003$; figura 2), que indica el modelo establecido de neuropatía alcohólica con síndrome de dolor aparente.

El procesamiento estadístico mediante análisis de varianza bidireccional con mediciones repetidas que permitieron determinar la importancia del factor "inyección de medicamentos" en el grado de desarrollo de la alodinia táctil se llevó a cabo para una evaluación adicional de los resultados obtenidos ($F_{1,10} = 8,79$; $p < 0,014$). La comparación intergrupar adicional (*post hoc*) mostró una disminución en la intensidad de la alodinia táctil en el grupo que se trató con el péptido D reivindicado en el día 100° de la inyección, en comparación con el grupo de control en el punto de medición correspondiente ($p < 0,05$; prueba de Bonferroni; figura 2).

Resumiendo todo lo anterior, se puede concluir que el péptido D reivindicado tiene propiedades neuroprotectoras en relación con los procesos neurodegenerativos desarrollados durante la neuropatía periférica diabética y alcohólica.

ESTUDIO PATOMORFOLOGICO

Todos los animales experimentales se sometieron a un estudio patomorfológico al final del estudio.

El estudio patomorfológico que comprende necropsia, examen macroscópico, examen histológico de los siguientes órganos internos: porción central del nervio ciático, arteria de la retina, parte de la arteria mesentérica, parte del músculo gastrocnemio, glándula pancreática. La necropsia se llevó a cabo bajo la supervisión directa de un patólogo. Se cortaron muestras de tejidos específicos y se pusieron en una solución al 10 % de formalina neutra, mientras que un bulbo ocular se fijó con un fijador Davidson durante 24 horas, luego el material se sometió a un tratamiento estándar para la producción de muestras histológicas e histoquímicas con grosor de secciones de parafina seriadas de 5-7 μm . Las secciones de tejidos y órganos para examen microscópico se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las muestras de tejido nervioso se tiñeron con hematoxilina y eosina, azul de toluidina mediante el procedimiento de Nissl y picro-fucsina mediante el procedimiento de van Gieson. Para revelar las fibras de mielina y los productos de descomposición de la mielina, las secciones transversales y longitudinales de los nervios obtenidos en el microtomo de congelación se tiñeron con negro de Sudán mediante el procedimiento de Lieson [41, 42, 43]. Los núcleos se contrastaron con hemalum. Las muestras de músculo gastrocnemio se tiñeron con hematoxilina, eosina y picro-fucsina mediante el procedimiento de van Gieson.

El examen morfológico de las muestras histológicas se llevó a cabo con el microscopio óptico de luz Carl Zeiss (Alemania) con un aumento de 100, 200 y 400. La microfotografía se realizó con la cámara digital Axio Scope A1 (Alemania). La morfometría se llevó a cabo de forma semiautomática y manual utilizando el software AxioVision Rel. 4,8 y el editor de imágenes PhotoM 1.21.

Para evaluar la acción de las sustancias de prueba, se realizó una evaluación histológica comparativa de su impacto en:

1. aparato insular de la glándula pancreática en el que se realizó la medición del área de los islotes;
2. arteria de tipo muscular y torrente sanguíneo microcirculatorio (arteriolas y capilares) de la retina, arteria mesentérica en la que se realizó la medición morfométrica del diámetro capilar y el grosor de la íntima de la arteria;
3. afección del nervio ciático;
4. afección de la musculatura somática.

Ejemplo 10. Evaluación de la afección de la íntima de la arteria mesentérica de ratas

La Figura 3 presenta datos sobre el impacto de las sustancias de prueba en la afección de la íntima de la arteria mesentérica de ratas. En la comparación pareada de los grupos sanos y control se demostró que se produce un aumento significativo en el grosor de la íntima del vaso en el grupo de control ($p < 0,0001$, *prueba t*). Este aumento de grosor y la inflamación de la íntima del vaso atestiguan el desarrollo de procesos de endotelopatía. Un análisis de varianza unidireccional adicional (ANOVA) mostró que la inyección a largo plazo de sustancias de prueba evita el aumento del grosor de la íntima de los vasos de la arteria mesentérica de ratas ($F_{4,25} = 12,87$; $p = 0,0001$). La comparación intergrupar mostró una disminución significativa del grosor de la íntima del vaso en todos los grupos en comparación con el grupo de control ($p < 0,05$, prueba de Bonferroni). El efecto máximo se observó en el grupo al que se administró el péptido D reivindicado ($p < 0,0001$, prueba de Bonferroni).

Ejemplo 11. Evaluación de la afección del tejido del nervio ciático

Se puede concluir que, según los cambios patomorfológicos establecidos en el tejido nervioso, el modelado de la diabetes mellitus tipo 2 inducida por STZ se acompañó de una afección aparente de neuropatía diabética que se caracterizó por una disminución del grosor y diámetro de los tallos nerviosos, deformación e hinchazón de las vainas de mielina, fibras nerviosas afectadas, edema del tejido intersticial, acumulación anormal de lípidos en epineuro y perineuro, así como crecimiento de tejido conectivo endoneural.

Las fibras individuales estaban en la afección de degeneración hidrópica. En los focos de desmielinización se observaron agregados de pequeños gránulos sudanófilos que indicaban una desintegración continua de la mielina.

La inyección de Metformina no tuvo un efecto terapéutico en el tejido nervioso. Se observaron en muestras de tejido de este grupo lesiones severas de tallos y fibras nerviosas, perineuro y epineuro se manifestaron en una aparente

infiltración polimorfonuclear con degeneración focal de vainas de mielina, así como hinchazón y deformación de las fibras, presencia de productos de desintegración de la mielina como gránulos sudanófilos adyacentes a la membrana basal de fibras de mielina no afectadas.

5 Cuando se inyectaron Byetta® y exenatida, solo se observó una acumulación insignificante de lípidos en el perineuro y el epineuro. Es obvio que los fenómenos degenerativos en este grupo fueron sustancialmente más bajos o no ocurrieron en absoluto. Por el contrario, la inyección del péptido D reivindicado tuvo un efecto terapéutico positivo, mientras que no se revelaron diferencias morfológicas aparentes en la estructura de los nervios ciáticos del grupo de animales sanos.

10 Se determinó durante el análisis patomorfológico de los indicadores del tejido nervioso que el grosor del tallo nervioso había disminuido significativamente en el grupo de control en comparación con los animales sanos ($p < 0,0001$; *prueba t*) que pueden indicar cambios degenerativos en el tejido y se comprueba mediante una afección patomorfológica del desarrollo de la patología (tabla 4).

Tabla 4 - Indicadores morfométricos de tejido nervioso bajo la acción de sustancias de prueba

Grupos	Indicadores	
	Grosor del tallo nervioso, μm	Área del tejido conjuntivo endoneuro, μm^2
Sano	$340,5 \pm 8,7$	$2.596,3 \pm 74,1$
Control	$203,3 \pm 6,9^{\#}$	$3.962,5 \pm 314,6^{\#}$
Byetta®	$213,2 \pm 37,4$	$2.111,7 \pm 239,9^*$
Exenatida	$256,8 \pm 11,2$	$2.284,4 \pm 211,5^*$
Péptido D	$303,6 \pm 20,3^*$	$1.956,1 \pm 273,4^{**}$
Metformina	$382 \pm 23,4$	$2.826,3 \pm 298,9^*$
Nota: # - diferencia con el grupo sano ($p < 0,05$); * - diferencia con el grupo de control ($p < 0,05$); ** - diferencia con el grupo de control ($p < 0,01$).		

15 Como se ha observado anteriormente, la afección patomorfológica de las muestras de tejido nervioso en el grupo que administró Metformina indica un edema del tallo nervioso y un aumento excesivo de su grosor, lo que implica un aumento de la patología, pero no un efecto terapéutico. El análisis estadístico sin la inclusión del grupo mencionado anteriormente se llevó a cabo a este respecto. El análisis de varianza unidireccional (ANOVA) reveló un impacto significativo de la inyección de sustancias de prueba en el grosor del tallo nervioso ($F_{3,34} = 4,83$; $p = 0,007$). La comparación adicional intergrupar (*post hoc*) confirmó un aumento significativo en el grosor del tallo nervioso en el grupo al que se administró el péptido D reivindicado ($p < 0,01$; prueba de Bonferroni) en comparación con el grupo de control.

25 Se estableció en el análisis de dicho indicador patomorfológico como área del tejido conjuntivo endoneurium que se produjo un crecimiento significativo del tejido conectivo endoneural en el modelado patológico ($p < 0,0018$; *prueba t*), que puede indicar un predominio de las manifestaciones degenerativas sobre las reparadoras [Karpova y Krishtop, 2013]. El rendimiento del análisis de varianza unidireccional (ANOVA) mostró un impacto significativo de la inyección de sustancias de prueba en el área del tejido conectivo endoneural ($F_{4,25} = 8,58$; $p = 0,0002$). La comparación intergrupar adicional (*post hoc*) confirmó una disminución significativa del área del tejido conectivo endoneural en todos los grupos ($p < 0,01$; prueba de Bonferroni). El efecto máximo se registró en los grupos a los que se administró el péptido D reivindicado ($p = 0,0002$; prueba de Bonferroni) (tabla 4) que puede tratarse como una mejora de los procesos reparativos en el tejido nervioso.

Ejemplo 12. Evaluación de la afección del tejido muscular (músculo gastrocnemio)

35 Se puede concluir, sobre la base de los cambios patomorfológicos establecidos en el tejido muscular estriado de los músculos gastrocnemios, que la progresión experimental de la DM 2 estuvo acompañada por una afección aparente de distrofia muscular que se caracterizó por adelgazamiento y deformación de las fibras musculares, crecimiento moderado del tejido conectivo circundante, en algunos casos con sustitución de fibras atrofiadas por tejido conjuntivo colágeno, así como aumento en la cantidad de núcleos de células musculares (mionúcleos). Se encontró una infiltración inflamatoria moderada en el tejido conjuntivo de endomisio y perimisio en animales con atrofia de fibra.

Se observó crecimiento focal del tejido conectivo con la sustitución de fibras musculares afectadas e infiltración linfocítica moderada en el grupo al que se administró Byetta® y exenatida. Se observó una infiltración inflamatoria

focal mínima de las fibras y el tejido intersticial en el grupo al que se administró Metformina en el contexto del aumento de la proporción mionuclear.

En el contexto de la patología establecida, la inyección del péptido D reivindicado tenía una acción terapéutica aparente en el tejido muscular. Se encontraron cambios patológicos en estos grupos en casos individuales y fueron menores en comparación con el grupo de control.

Al analizar el área de la sección transversal de las fibras musculares, se estableció que la progresión de la DM de tipo 2 experimental estaba acompañada por una disminución significativa en el área de la sección transversal de fibras del tejido muscular ($p < 0,0001$; *prueba t*) con una disminución simultánea en la cantidad de mionúcleos en fibras (alrededor del 70 %) que pueden tratarse como signos de distrofia muscular. El rendimiento del análisis de varianza unidireccional (ANOVA) mostró un impacto significativo de la inyección de sustancias de prueba en el área de la sección transversal de fibras musculares ($F_{4,22} = 13,67$; $p = 0,0001$). La comparación intergrupar adicional (*post hoc*) confirmó una disminución significativa del área de la sección transversal de fibras musculares en todos los grupos ($p < 0,01$; prueba de Bonferroni), a excepción del grupo al que se administró Byetta® ($p = 0,051$; prueba de Bonferroni). El efecto máximo se registró en los grupos a los que se administró exenatida ($p < 0,0001$; prueba de Bonferroni) y el péptido D reivindicado ($p = 0,0004$; prueba de Bonferroni) (tabla 5).

Tabla 5 - Área de la sección transversal de fibras musculares del músculo gastrocnemio bajo la acción de sustancias de prueba, ($M \pm m$)

Grupos	Área de la sección transversal de las fibras, μm^2
Sano	1.450 ± 120
Control	$551,1 \pm 45^{\#}$
Byetta®	$968,3 \pm 115$
Exenatida	$1.763 \pm 142^{**}$
Péptido D	$1.472 \pm 282^*$
Metformina	$1.286 \pm 157^*$
Nota: $\#$ - diferencia con el grupo sano ($p < 0,05$); $*$ - diferencia con el grupo de control ($p < 0,05$); $**$ - diferencia con el grupo de control ($p < 0,0001$).	

Ejemplo 13. Aparato insular de la glándula pancreática

La Tabla 6 presenta datos resumidos sobre el impacto de las sustancias de prueba en el aparato insular de las glándulas pancreáticas de animales experimentales. En la comparación pareada del grupo sano y control se demostró que se produce una disminución significativa de los islotes de Langerhans en el grupo de control ($p < 0,0001$, *prueba t*). Esta disminución en el área del aparato insular implica el desarrollo de una patología que también se correlaciona con el aumento del nivel de glucosa en sangre periférica. La comparación pareada del grupo de control con los experimentales reveló un impacto estadísticamente significativo de la inyección de todas las sustancias de prueba en el área de los islotes de las glándulas pancreáticas (tabla 7). Esta observación indica que la inyección a largo plazo de sustancias de prueba provoca un aumento del área de los islotes y, por lo tanto, facilita los procesos de reparación del aparato insular de la glándula pancreática.

Tabla 6 - Indicadores morfométricos de la afección del aparato insular de la glándula pancreática después de la inyección durante 80 días de productos de prueba.

Grupos	Área de los islotes de la glándula pancreática, μm^2
Sano	$0,066 \pm 0,008$
Control	$0,012 \pm 0,002^{\#}$
Byetta®	$0,030 \pm 0,006^*$
Exenatida	$0,030 \pm 0,008^*$
Péptido D	$0,025 \pm 0,004^*$

(continuación)

Grupos	Área de los islotes de la glándula pancreática, μm^2
Metformina	0,034 $\pm$ 0,004*
Nota: # - diferencia con el grupo sano ($p < 0,05$); * - diferencia con el grupo de control ($p < 0,05$, <i>prueba t</i>);	

Tabla 7. Resultados del procesamiento estadístico de los datos en el área de los islotes de las glándulas pancreáticas después de múltiples inyecciones de productos de prueba (prueba de Student)

Indicador	Valor de <i>P</i>
Grupo de control	$p < 0,0001^{\#}$
Byetta	$p = 0,019^*$
Exenatida	$p = 0,04$
Péptido D	$p = 0,011^*$
Metformina	$p = 0,001^*$
Nota: # - en comparación con el grupo sano de ratas ($p < 0,001$) * - en comparación con el grupo de control de ratas ($p < 0,05$)	

Por lo tanto, se reveló en el análisis patomorfológico de órganos y tejidos que el modelado de la diabetes mellitus tipo 2 inducida por estreptozotocina se acompañó de endotelopatía, disminución del área del aparato insular de la glándula pancreática, así como la aparente afección de desarrollo de neuropatía periférica diabética y alteraciones

5

Se observó un efecto terapéutico máximo y aparente después de la inyección durante 80 días del péptido D reivindicado. La inyección de este compuesto tuvo una acción curativa positiva con respecto a las complicaciones de la diabetes mellitus tipo 2, tal como la neuropatía diabética, la distrofia muscular, la endotelopatía, y tuvo un impacto favorable en los procesos de reparación en el aparato insular de la glándula pancreática. El análisis de las muestras histológicas se correlaciona con los datos clínicos. En particular, se observó un efecto curativo aparente en la manifestación de los signos de alodinia y en la disminución del contenido de hemoglobina glucosilada en los glóbulos rojos de los animales experimentales. También se observó una acción antihiper glucémica aparente de este compuesto que era comparable con la de la Metformina.

10

15

En vista de lo anteriormente dicho, se puede concluir que el péptido D reivindicado es un agente altamente eficaz para el tratamiento y la prevención de las complicaciones de la diabetes mellitus tipo 2, especialmente la neuropatía diabética, y tiene una acción neuroprotectora en relación con la neuropatía alcohólica.

Lista de referencias:

20

1. Stern, M.P., Williams, K., Gonzalez-Villalpando, C., Hunt, K.J., Haffner, S.M., 2004. Does the metabolic syndrome improve identification of individuals at risk of type 2 diabetes and/or cardiovascular disease? Diabetes Care 27, 2676-2681.

25

2. Fu, W., Patel, A., Jhamandas, J.H., 2013. Amylin receptor: a common pathophysiological target in Alzheimer's disease and diabetes mellitus. Front Aging Neurosci. 5, 42.

30

3. Danaei, G., Finucane, M.M., Lu, Y., Singh, G.M., Cowan, M.J., Paciorek C.J., Lin, J.K., Farzadfar, F., Khang, Y.H., Stevens, G.A., Rao, M., Ali, M.K., Riley, L.M., Robinson, C.A., Ezzati, M., 2011. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. Lancet 378, 31-40.

4. Global health risks. Mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Ginebra, World Health Organization, 2009.

5. Mathers, C.D., Loncar, D., 2006. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. PLoS. Med. 3, e442.

6. Nedosugova, L.V. Pathogenesis, clinical aspects, approaches to treatment of diabetic polyneuropathy // Meditsinsky Sovet, 12. 2013. págs. 43-49.

35

7. Eng., J. y col., Isolation and Characterization of Exendin-4, an Exendin-3 Analogue, from Heloderma

suspectum Venom. J. Biol. Chem., Vol. 267, Issue 11, 7402-7405, abril, 1992.

8. Documento US 5424286 Exendin-3 and exendin-4 polypeptides, and pharmaceutical compositions comprising same
9. Documento US 2005043238 Exendin formulations for weight reduction
- 5 10. Documento US 6858576 Method for regulating gastrointestinal motility
11. Documento US 9800449 Use of exendins and agonists thereof for the reduction of food intake
12. Documento US 2005037958 Inotropic and diuretic effects of GLP-1 and GLP-1 agonists
13. Documento US 6703359 Inotropic and diuretic effects of exendin
14. Documento JP 2002509078 Inotropic and diuretic effects of exendin and GLP-1
- 10 15. Documento US 2004266678 Methods and compositions for treating polycystic ovary syndrome
16. Documento MX 2008015640 Compounds for treatment of metabolic disorders
17. Documento US 2009291100 Therapeutic agent for polycystic ovary syndrome (PCOS)
18. Documento JP 2006520747 Methods and compositions for treating polycystic ovary syndrome
19. Documento US 2004209803 Compositions for the treatment and prevention of nephropathy
- 15 20. Documento AU 2003297356 Prevention and treatment of cardiac arrhythmias
21. Documento AU 2003262628 Bone marrow cell differentiation
22. Documento US 2004092443 Long-acting exendins and exendin agonists
23. Documento US 2004023871 Use of exendins and agonists thereof for the treatment of gestational diabetes mellitus
- 20 24. Documento JP 2003519667 Use of exendins and agonists thereof for modulation of triglyceride levels and treatment of dyslipidemia
25. Documento US 2003036504 Use of exendins and agonists thereof for modulation of triglyceride levels and treatment of dyslipidemia
26. Documento US 9410225 Method for regulating gastrointestinal motility
- 25 27. Documento RU 2247575 Method for inhibiting glucagon
28. Documento US 2007041951 Differentiation of non-insulin producing cells into insulin producing cells by GLP-1 or exendin-4 and uses thereof
29. Documento PT 1019077 Novel exendin agonist compounds
30. Documento LU 91342 Use of exendins and agonists thereof for the reduction of food intake
- 30 31. Documento US 2002137666 Use of exendins and agonists thereof for the reduction of food intake
32. Documento US 2006194719 Stabilized exendin-4 compounds
33. Documento US 2003087821 Exendins, exendin agonists, and methods for their use
34. Documento EP 1419783 Use of a composition comprising an exendin or a compound derived therefrom and a pharmaceutical carrier
- 35 35. Szkudelski T. Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat //Characteristics of the experimental model. Exp Biol Med (Maywood). 2012; 237(5):481-90.
36. Altman D.G. Bland J.M. How to randomize // BMJ. 1999. Vol. 11. pág. 319 (7211)
37. Guidance on non-clinical studies of drug products //Federal State Budgetary Institution "Scientific Center for Evaluation of Medical Products". Bajo la dirección editorial de A.N. Mironov. Vol. 1,2012. 695 p.
- 40 38. Chaplan, S.R., y col. "Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw". // J.Neurosci.Methods 53.1 (1994): 55-63.
39. Dixon W.J. Efficient analysis of experimental observations // Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. - 1980. - Vol. 20. - págs. 441-462.
40. Weiss, F., y Koob, G.F. The neuropharmacology of ethanol self-administration. //In: Meyer, R.E.; Koob, G.F.; Lewis, M.J.; y Paul, S.M., eds. Neuropharmacology of Ethanol: New Approaches. / Boston: Birkhauser, 1991. págs.125-162.
- 45 41. Kozyrev, K.M., Marzaganova, Z.A., Dzitstsoeva, P.A. Comparative clinicopathologic characteristics of Pick's disease and Alzheimer's disease // Boletín de New Medical Technologies. 2013. N.º 1, 7 p.
42. Makhmutov, O.K. Reactive changes in nerves at early stages of conduction anesthesia // Veterinarny Doktor, 2007. págs. 23-25.
- 50 43. Chumasov, E.I. Methodological developments on diagnosis of human and animal demyelinating diseases. 1993. págs. 1-16

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la siguiente fórmula: H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Gly-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Arg-Gly-OH.
- 5 2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento y prevención de la diabetes mellitus tipo 2 y sus complicaciones.
3. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que las complicaciones se seleccionan de neuropatía diabética, distrofia muscular y endotelopatía.

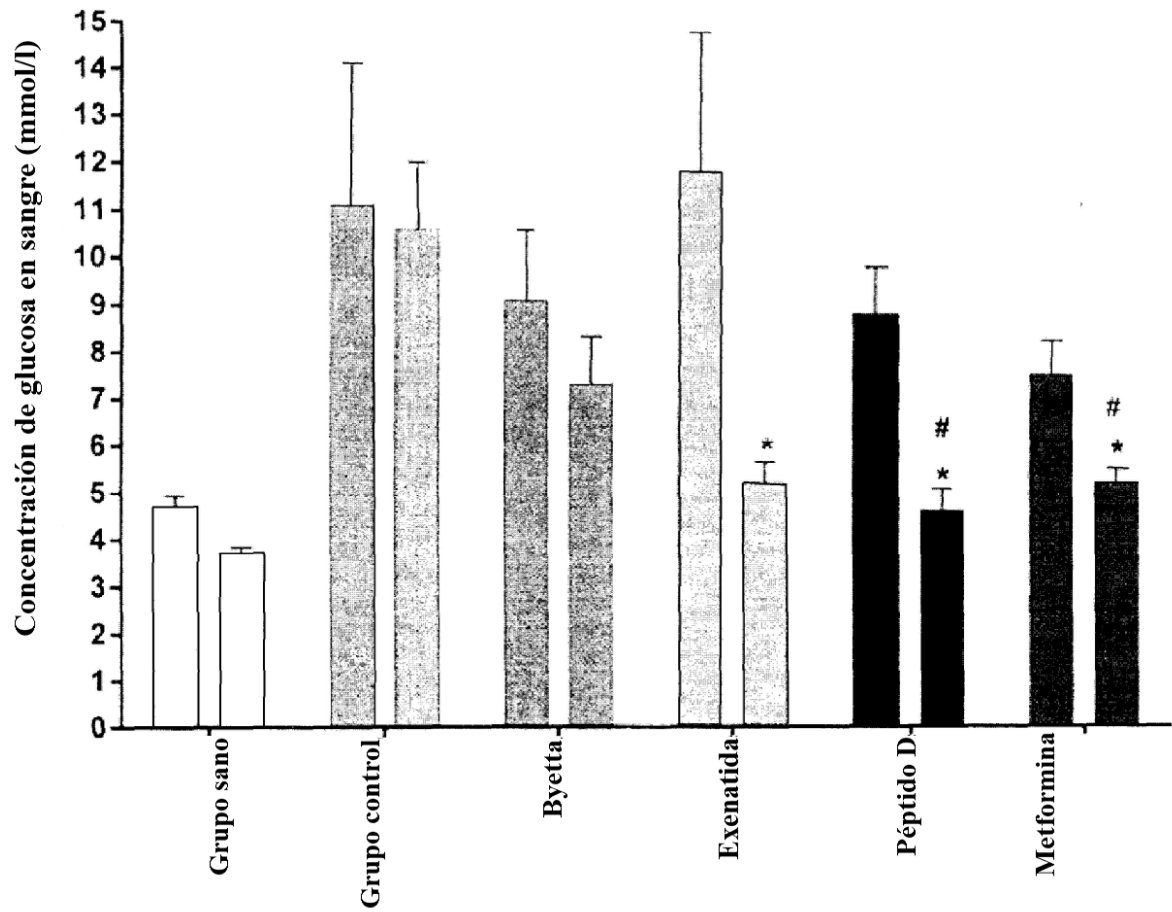


Fig.1

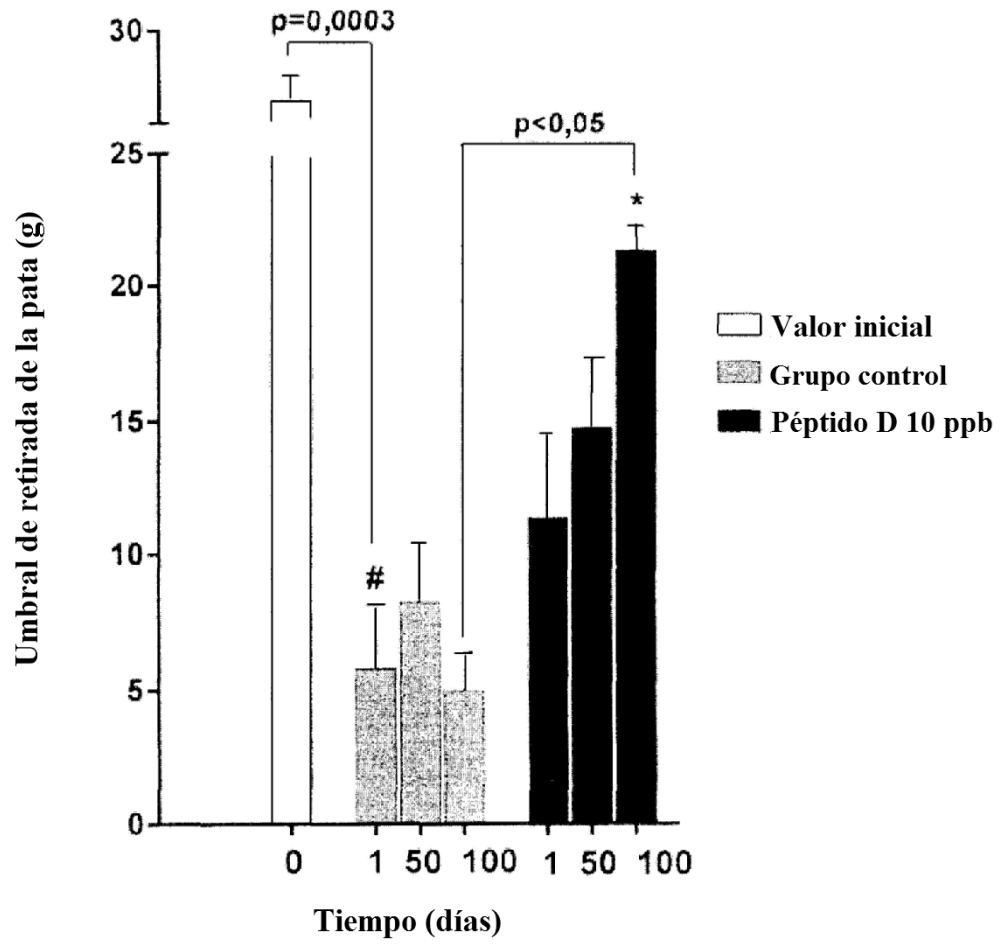


Fig.2

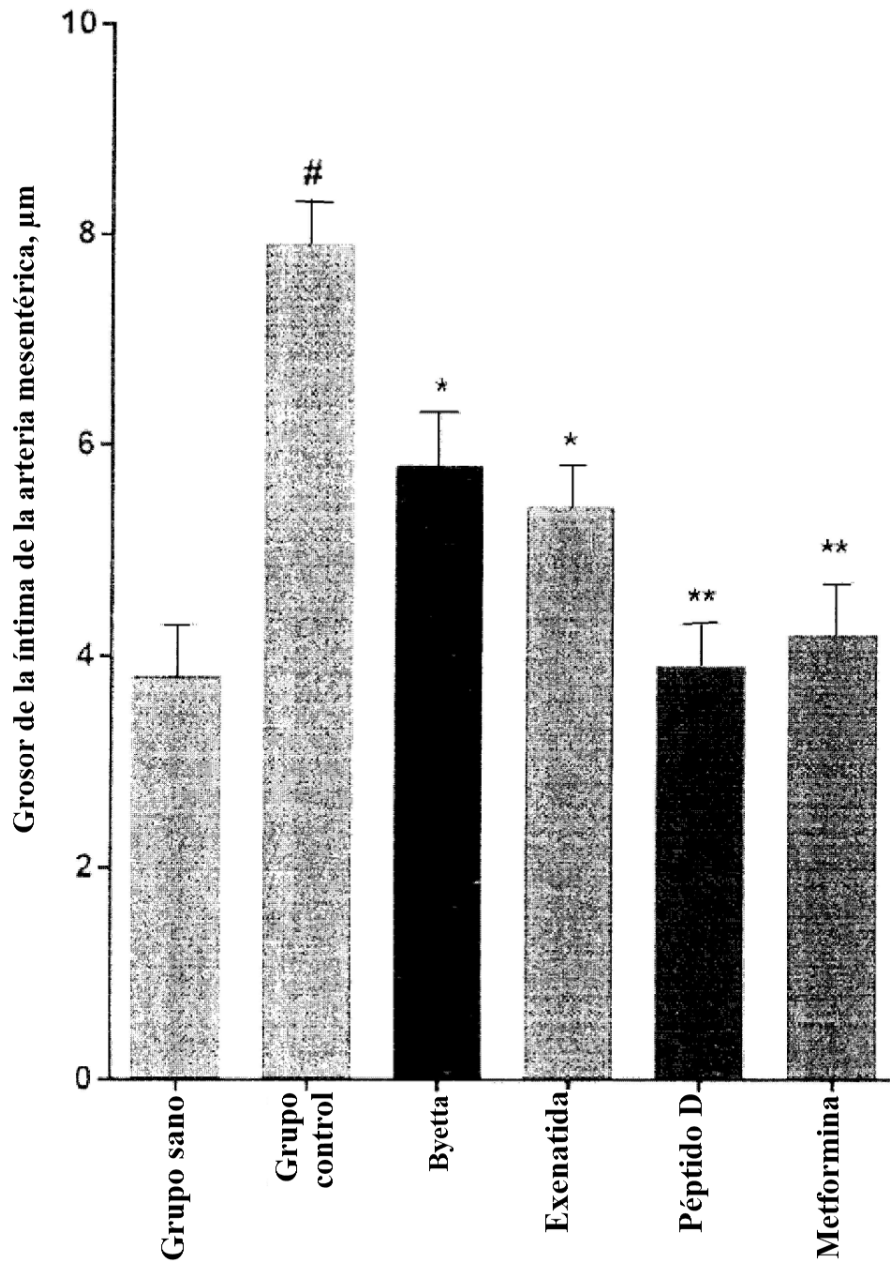


Fig.3