

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 842 881**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)
A61K 47/64 (2007.01)
A61K 47/60 (2007.01)
A61K 47/59 (2007.01)
A61K 38/22 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2013** **E 18169490 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2020** **EP 3384925**

54 Título: **Composición para el tratamiento de la hiperlipidemia que comprende un derivado de oxintomodulina**

30 Prioridad:

25.07.2012 KR 20120081475

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.07.2021

73 Titular/es:

HANMI PHARM. CO., LTD. (100.0%)
214 Muha-ro, Paltan-myeon
Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-958, KR

72 Inventor/es:

JUNG, SUNG YOUB;
KIM, JIN-SUN;
JANG, MYUNG HYUN;
LEE, SANG HYUN;
CHOI, IN YOUNG y
KWON, SE CHANG

74 Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester

ES 2 842 881 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

Composición para el tratamiento de la hiperlipidemia que comprende un derivado de oxintomodulina

5 Campo Técnico

La presente invención se refiere a una composición para su uso en la prevención o el tratamiento de la hiperlipidemia, la enfermedad del hígado graso o la arteriosclerosis, que comprende un derivado de oxintomodulina como ingrediente activo. También se describe un método para tratar la hiperlipidemia, la enfermedad del hígado graso o la arteriosclerosis mediante el uso de la composición.

Antecedentes

En los últimos años, en Corea, la ingesta de grasas de los alimentos ha aumentado debido al crecimiento económico y la occidentalización de los hábitos alimenticios, y han aumentado las enfermedades metabólicas, tales como la hiperlipidemia, la diabetes, la hipertensión, la arteriosclerosis y la enfermedad del hígado graso, que son provocadas por la falta de ejercicio.

La hiperlipidemia se refiere a una afección asociada con los niveles elevados de los lípidos, tales como el colesterol libre, los ésteres de colesterol, los fosfolípidos y los triglicéridos, en sangre. La hiperlipidemia puede aparecer en tres formas: (1) hipercolesterolemia, (2) hipertrigliceridemia y (3) hiperlipidemia combinada (hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia). La hiperlipidemia se clasifica generalmente en hiperlipidemia primaria e hiperlipidemia secundaria. La hiperlipidemia primaria es provocada generalmente por defectos genéticos, mientras que la hiperlipidemia secundaria es provocada por diversas afecciones, fármacos y hábitos alimentarios. Además, la hiperlipidemia también es provocada por una combinación de las causas primarias y secundarias de la hiperlipidemia. Como criterios para el diagnóstico de la hiperlipidemia, generalmente se usan un nivel de colesterol total de 220 mg/dl o superior y un nivel de triglicéridos de 150 mg/dl o superior.

Hay varias formas de colesterol que se encuentran de manera natural en los mamíferos. Se sabe que el colesterol de baja densidad (LDL) es perjudicial para la salud y se sabe que un aumento del colesterol LDL aumenta el riesgo de enfermedad cardíaca (Assman y otros, Am. J. Card, 1996). Además, el colesterol de alta densidad (HDL) se considera colesterol bueno y es esencial para la salud, ya que previene la aterosclerosis o similares.

Aunque la hiperlipidemia no muestra síntomas específicos por sí misma, los lípidos en exceso en la sangre se adhieren a las paredes de los vasos sanguíneos para reducir el tamaño de los vasos sanguíneos y provocar la aterosclerosis por reacciones inflamatorias. Por esta razón, pueden producirse enfermedades coronarias, enfermedades cerebrovasculares, obstrucción de los vasos sanguíneos periféricos, etc. (E. Falk y otros, Circulation, 1995). Además, los lípidos en exceso en la sangre se acumulan en el tejido hepático y, por lo tanto, pueden provocar la enfermedad del hígado graso. El hígado graso se refiere a una afección en la que la relación de grasas en el peso del hígado es superior al 5 %. El hígado graso puede provocarse no solo por la ingesta excesiva de grasas, sino también por la ingesta de alcohol.

Los métodos actuales que se usan para reducir los niveles de lípidos en sangre incluyen la terapia dietética, la terapia con ejercicios y la terapia con fármacos. Sin embargo, la terapia dietética o la terapia con ejercicios es difícil de controlar y realizar estrictamente y el efecto terapéutico de estas también es limitado.

Los fármacos para reducir los niveles de lípidos, desarrollados hasta la fecha, incluyen la resina de unión a ácidos biliares, los fármacos para reducir el colesterol, tales como los inhibidores de la HMG-CoA reductasa, importante en la biosíntesis del colesterol, los fármacos para reducir los triglicéridos, tales como los derivados del ácido fibrótico y el ácido nicotínico, etc. Se informó que estos fármacos tienen efectos secundarios como la toxicidad hepática, los trastornos gastrointestinales y la carcinogénesis. Por tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar fármacos que puedan usarse para tratar la hiperlipidemia y las enfermedades relacionadas (por ejemplo, la aterosclerosis y la enfermedad del hígado graso) que tengan menos efectos secundarios.

La oxintomodulina ha recibido atención recientemente como candidato para tales fármacos. La oxintomodulina se produce a partir del preglucagón y es un péptido que puede unirse tanto al péptido similar al glucagón-1 (GLP-1) como al receptor de glucagón para realizar una función doble. Debido a tales características, la oxintomodulina se ha estudiado para diversos fines, que incluye el tratamiento de la obesidad, la hiperlipidemia y la enfermedad del hígado graso. Sin embargo, la oxintomodulina tiene el problema de que debe administrarse a una dosis alta, ya que tiene una vida media corta in vivo y la actividad de esta es insuficiente para su uso en el tratamiento de la obesidad, la hiperlipidemia y la enfermedad del hígado graso.

Por consiguiente, los presentes inventores han desarrollado un derivado de oxintomodulina que tiene una actividad incrementada en comparación con la oxintomodulina nativa y han descubierto que el derivado de oxintomodulina redujo el contenido y la relación de lípidos en sangre en un modelo de hámster inducido a la hiperlipidemia, lo que indica que el derivado puede usarse eficazmente para el tratamiento de las enfermedades de hiperlipidemia, lo que

completa de este modo la presente invención. El documento núm. WO2011/075393 describe los análogos de glucagón, tales como, entre otros, la SEQ ID NO 42, para el tratamiento de la hiperlipidemia, la enfermedad del hígado graso, etc.

5 Divulgación

Problema Técnico

10 Es un objetivo de la presente invención proporcionar una composición para prevenir o tratar la hiperlipidemia, la enfermedad del hígado graso o la aterosclerosis, que contiene un derivado de oxintomodulina como ingrediente activo.

15 También se describe en la presente descripción un método para tratar la hiperlipidemia, la enfermedad del hígado graso o la aterosclerosis, comprendiendo el método una etapa de administración de un derivado de oxintomodulina a un sujeto.

También se describe en la presente descripción el uso de un derivado de oxintomodulina en la preparación de un medicamento para prevenir o tratar la hiperlipidemia, la enfermedad del hígado graso o la aterosclerosis.

20 [Solución Técnica]

Para lograr los objetivos anteriores, la presente invención proporciona una composición para su uso en la prevención o el tratamiento de la hiperlipidemia, la enfermedad del hígado graso o la aterosclerosis, que contiene un derivado de oxintomodulina como ingrediente activo, según se define en las reivindicaciones.

25 Como se usa en la presente descripción, el término "oxintomodulina" se refiere a un péptido producido a partir del preglucagón que es un precursor del glucagón. En la presente invención, la oxintomodulina se destina a incluir la oxintomodulina nativa y sus precursores, análogos (derivados), fragmentos y variantes. Preferentemente, la oxintomodulina tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 (HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTRNRNIA).

30 Como se usa en la presente descripción, el término "variante de oxintomodulina" es un péptido que tiene uno o más residuos de aminoácidos diferentes de los de la secuencia de aminoácidos de la oxintomodulina nativa y posee una función de activación de los receptores de GLP-1 y glucagón. La variante de oxintomodulina puede prepararse por cualquiera de la sustitución, la adición, la delección, la modificación o una combinación de estas de algunos aminoácidos de la oxintomodulina nativa.

35 Como se usa en la presente descripción, el término "derivado de oxintomodulina" se refiere a un péptido, derivado de péptido o imitador de péptido, que se prepara mediante la adición, la delección o la sustitución de algunos aminoácidos de la oxintomodulina nativa y puede activar a un nivel alto tanto el receptor de GLP-1 como el receptor de glucagón en comparación con el nivel activado por la oxintomodulina nativa.

40 Como se usa en la presente descripción, el término "fragmento de oxintomodulina" se refiere a un fragmento que tiene una adición o delección de uno o más aminoácidos en el extremo amino o carboxilo terminal de la oxintomodulina nativa, en donde los aminoácidos añadidos también pueden ser aminoácidos que no son de origen natural (por ejemplo, aminoácidos tipo D). Dichos aminoácidos tienen la función de regular los niveles de glucosa en sangre in vivo.

45 Los métodos para preparar la variante, el análogo y el fragmento de oxintomodulina pueden usarse solos o en combinación. Por ejemplo, la presente invención incluye un péptido que tiene uno o más aminoácidos diferentes de los del péptido nativo y una desaminación de los residuos de aminoácidos N-terminales y tiene la función de activar tanto el receptor de GLP-1 como el receptor de glucagón.

50 Los aminoácidos mencionados en la presente descripción se abrevian de acuerdo con las reglas de la nomenclatura de IUPAC-IUB de la siguiente manera:

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.

El derivado de oxintomodulina abarca cualquier péptido que se prepara mediante la sustitución, la adición, la delección o la modificación postraducciona (por ejemplo, la metilación, la acilación, la ubiquitinación o la unión covalente intramolecular) de los aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y puede activar los receptores de glucagón y GLP-1. Tras la sustitución o la adición de aminoácidos, no solo pueden usarse los 20 aminoácidos que se encuentran comúnmente en las proteínas humanas, sino también los aminoácidos atípicos o no naturales. Las fuentes comerciales de aminoácidos atípicos incluyen Sigma-Aldrich, ChemPep Inc. y Genzyme Pharmaceuticals. Los péptidos que incluyen estos aminoácidos y las secuencias de péptidos atípicos pueden sintetizarse y comprarse a proveedores comerciales, por ejemplo, American Peptide Company o Bachem (Estados Unidos) o Anygen (Corea).

En la presente descripción se describe un derivado de oxintomodulina que es un péptido que incluye la secuencia de aminoácidos de la siguiente Fórmula 1:

[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

en donde

R1 es histidina, desamino-histidilo, dimetil-histidilo (N-dimetil-histidilo), beta-hidroxiimidazopropionilo, 4-imidazoacetilo, beta-carboxiimidazopropionilo o tirosina;
 X1 es Aib (ácido aminosiobutírico), 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 elimina;
 X10 es glutamina, ácido glutámico, lisina, arginina o serina o se elimina; X11 es alanina, arginina o valina o se elimina;
 X12 es alanina, arginina, serina o valina o se elimina;
 X13 es lisina, glutamina, arginina o ácido alfa-metil-glutámico o se elimina; X14 es ácido aspártico, ácido glutámico o leucina o se elimina;
 X15 es fenilalanina o se elimina;
 X16 es isoleucina o valina o se elimina;
 X17 es alanina, cisteína, ácido glutámico, lisina, glutamina o ácido alfa-metil-glutámico o se elimina; X18 es triptófano o se elimina;
 X19 es alanina, isoleucina, leucina, serina o valina o se elimina;
 X20 es alanina, lisina, metionina, glutamina o arginina o se elimina; X21 es asparagina o se elimina;
 X22 es alanina, glicina o treonina o se elimina;
 X23 es cisteína o lisina o se elimina;
 X24 es un péptido que tiene de 2 a 10 aminoácidos que consisten en una combinación de alanina, glicina y serina o se elimina; y R2 es KRNRNNIA (SEQ ID NO: 35), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 36), GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO: 37), HSQGT-FTSDYSKYLD (SEQ ID NO: 38), HSQGTFTSDYSRYLDK (SEQ ID NO: 39), HEGTFTSDLSKQMEEEAVK (SEQ ID NO: 40) o se elimina (con la excepción del caso en el que la secuencia de aminoácidos de la Fórmula 1 es idéntica a la de la SEQ ID NO: 1).

Para aumentar la actividad de la oxintomodulina de tipo salvaje para el receptor de glucagón y el receptor de GLP-1, el derivado de oxintomodulina puede sustituirse con 4-imidazoacetilo obtenido por delección del carbono alfa de la histidina en la posición 1 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, el desamino-histidilo obtenido por delección del grupo amino N-terminal, el dimetil-histidilo (N-dimetil-histidilo) obtenido por modificación del grupo amino N-terminal con dos grupos metilo, el beta-hidroxiimidazopropionilo obtenido por sustitución del grupo amino N-terminal con un grupo hidroxilo, o el beta-carboxiimidazopropionilo obtenido por sustitución del grupo amino N-terminal 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 una combinación de estos. Además, una parte de la secuencia de la oxintomodulina puede sustituirse con la secuencia de aminoácidos del GLP-1 o la Exendina-4 para aumentar la actividad del receptor de GLP-1.

Además, una parte de la secuencia de la oxintomodulina puede sustituirse con una secuencia que mejora la hélice alfa. Preferentemente, los aminoácidos en las posiciones 10, 14, 16, 20, 24 y 28 de la secuencia de aminoácidos de la Fórmula 1 pueden sustituirse 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. Preferentemente, los aminoácidos en las posiciones 10 y 14, 12 y 16, 16 y 20, 20 y 24, y 24 y 28 de la secuencia de aminoácidos también pueden sustituirse con ácido glutámico o lisina para formar anillos.

En la presente descripción se describe un derivado de oxintomodulina que es un péptido que incluye la secuencia de aminoácidos de la siguiente Fórmula 2, obtenida por sustitución de la secuencia de aminoácidos de la oxintomodulina con la de la exendina o el GLP-1:

[Fórmula 2]

R1-A-R3

En la presente descripción se describe un derivado de oxintomodulina que es un péptido que incluye la secuencia de aminoácidos de la siguiente Fórmula 3, que se prepara por la unión de una parte de la secuencia de aminoácidos de la oxintomodulina y una parte de la secuencia de aminoácidos de la exendina o el GLP-1 a través de un enlazador de aminoácidos adecuado:

[Fórmula 3]

R1-B-C-R4

En otra modalidad específica más, el derivado de oxintomodulina de la presente invención es un nuevo péptido que incluye la secuencia de aminoácidos de la siguiente Fórmula 4, en donde una parte de la secuencia de aminoácidos de la oxintomodulina se sustituye con un amino ácido capaz de potenciar la afinidad de unión al receptor de GLP-1, por ejemplo, la Leu en la posición 26 que se une con el receptor de GLP-1 por interacción hidrófoba se sustituye con el residuo hidrófobo Ile o Val.

[Fórmula 4]

R1-SQGTFTSDYSKYLD-D1-D2-D3-D4-D5-LFVQW-D6-D7-N-D8-R3

En la presente descripción se describe un derivado de oxintomodulina que es un péptido que incluye la secuencia de aminoácidos de la siguiente Fórmula 5, en donde una parte de la secuencia de aminoácidos de la oxintomodulina nativa se elimina, se añade o se sustituye con otros aminoácidos para aumentar las capacidades de la oxintomodulina nativa para activar el receptor de GLP-1 y el receptor de glucagón:

[Fórmula 5]

R1-E1-QGTFTSDYSKYLD-E2-E3-RA-E4-E5-FV-E6-WLMNT-E7-R5

En las Fórmulas de 2 a 5, R1 es como se describe en la Fórmula 1;

A se selecciona del grupo que consiste en SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT (SEQ ID NO: 41), SQGTFTSDYSKYLDEEAVRLFIEWLMNT (SEQ ID NO: 42), SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVAWLKNT (SEQ ID NO: 43), GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID NO: 44), GQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID NO: 45), GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEWAA (SEQ ID NO: 46) y SQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLMNG (SEQ ID NO: 47);

B se selecciona del grupo que consiste en SQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT (SEQ ID NO: 41), SQGTFTSDYSKYLDEEAVRLFIEWLMNT (SEQ ID NO: 42), SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVAWLKNT (SEQ ID NO: 43), GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID NO: 44), GQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLKNG (SEQ ID NO: 45), GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEWAA (SEQ ID NO: 46), SQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLMNG (SEQ ID NO: 47), GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEW (SEQ ID NO: 48) y SQGTFTSDYSRYLD (SEQ ID NO: 49);

C es un péptido que tiene de 2 a 10 aminoácidos que consiste en una combinación 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;

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;

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 o lisina o se elimina;

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 HEGTFTSDLSKQMEEEE- AVK (SEQ ID NO: 40); y R5 es KRNRNNIA (SEQ ID NO: 35), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 36) o GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO: 37) o se elimina

(con la excepción del caso en el que las secuencias de aminoácidos de las Fórmulas de 2 a 5 son idénticas a las de la SEQ ID NO: 1).

El derivado de oxintomodulina puede ser un péptido de la siguiente Fórmula 6:

[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

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

X1 es Aib (ácido aminosobutírico), glicina, 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 o ácido alfa-metil-glutámico o se elimina;

X10 es glutamina, ácido glutámico, lisina o arginina o se elimina;

X11 es alanina o arginina o se elimina;

X12 es alanina o valina o se elimina;

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

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

X15 es fenilalanina o se elimina;

X16 es isoleucina o valina o se elimina;

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

X18 es triptófano o se elimina;

X19 es alanina, isoleucina, leucina o valina o se elimina;

X20 es alanina, lisina, metionina o arginina o se elimina;

X21 es asparagina o se elimina;

X22 es treonina o se elimina;

X23 es cisteína, lisina o se elimina;

X24 es un péptido que tiene de 2 a 10 aminoácidos que consiste en glicina o se elimina; y

R2 es KRNRNNIA (SEQ ID NO: 35), GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 36), GPSSGAPPPSK (SEQ ID NO: 37), HSQGT-FTSDYSKYLD (SEQ ID NO: 38), HSQGTFTSDYSRYLDK (SEQ ID NO: 39) o HEGTFTSDLSKQMEEEEAVK (SEQ ID NO: 40) o se elimina (con la excepción del caso en el que la secuencia de aminoácidos de la Fórmula 6 es idéntica a la de la SEQ ID NO: 1).

El derivado de oxintomodulina puede seleccionarse del grupo que consiste en los péptidos de las SEQ ID NO: 2 a 34. El derivado de oxintomodulina puede ser un derivado de oxintomodulina descrito en la Tabla 1 del Ejemplo 2-1. De acuerdo con la presente invención, el derivado de oxintomodulina comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24, la SEQ ID NO: 25 o la SEQ ID NO: 26.

En un ejemplo, se prepararon los derivados de oxintomodulina que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 2 a 34, respectivamente, y se encontró que los derivados de oxintomodulina mostraban excelentes actividades de receptor de GLP-1 y receptor de glucagón en comparación con la oxintomodulina nativa (Ejemplo 2). En otras palabras, a partir de los resultados anteriores pudo verse que el derivado de oxintomodulina descrito en la presente descripción exhibió excelentes efectos terapéuticos contra la hiperlipidemia, la enfermedad del hígado graso o la aterosclerosis mediante la activación del receptor de GLP-1 y el receptor de glucagón.

Los derivados de oxintomodulina descritos en la presente descripción están presentes en forma de conjugados que comprenden diversos polímeros para mejorar el efecto terapéutico y la vida media in vivo de los derivados.

Los conjugados muestran un aumento en la duración de los efectos en comparación con la oxintomodulina nativa, y los conjugados de acción prolongada incluyen una oxintomodulina preparada mediante la modificación, la sustitución, la adición o la delección de los aminoácidos de la oxintomodulina nativa, una oxintomodulina conjugada con un polímero biodegradable tal como el polietilenglicol (PEG), una oxintomodulina conjugada con un polisacárido, la albúmina, un anticuerpo, la elastina, la fibronectina o la quitina o con una proteína de acción prolongada, tal como un fragmento de inmunoglobulina, una oxintomodulina conjugada con un ácido graso que

tiene la capacidad de unirse a la albúmina in vivo, o una oxintomodulina encapsulada en nanopartículas biodegradables.

También se describe un conjugado en donde un derivado de oxintomodulina que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2 a 34 se une a una región Fc de inmunoglobulina a través de un polímero no peptídico. De acuerdo con la presente invención, el conjugado es un conjugado en donde un derivado de oxintomodulina que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 24, 25 o 26 se une a una región Fc de inmunoglobulina a través de un polímero no peptídico, en donde el polímero no peptídico une covalentemente el derivado de oxintomodulina y la región Fc de inmunoglobulina.

La región Fc de inmunoglobulina es un polipéptido biodegradable que se metaboliza in vivo y, por lo tanto, es seguro para su uso como portador de un fármaco. La región Fc de inmunoglobulina tiene un peso molecular bajo en comparación con la molécula de inmunoglobulina completa, y por lo tanto es ventajosa en términos de preparación, purificación y rendimiento de los conjugados. Además, debido a que la secuencia de aminoácidos difiere entre los anticuerpos, una parte Fab muestra una alta no homogeneidad y, por lo tanto, la homogeneidad del material puede aumentarse considerablemente y la posibilidad de inducir antigenicidad sanguínea también puede reducirse.

Como se usa en la presente descripción, el término "región Fc de inmunoglobulina" se refiere a una proteína que contiene la región constante de la cadena pesada 2 (CH2) y la región constante de la cadena pesada 3 (CH3) de una inmunoglobulina, excluyendo las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, la región constante de la cadena pesada 1 (CH1) y la región constante de la cadena ligera 1 (CL1) de la inmunoglobulina. Puede incluir además una región bisagra en la región constante de la cadena pesada. Además, la región Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede ser una región Fc expandida que incluye parte o la totalidad de la región constante de la cadena pesada 1 (CH1) y/o la región constante de la cadena ligera 1 (CL1), excepto para las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, siempre que tenga un efecto que sea sustancialmente igual o mejor que la proteína nativa. Además, la región Fc de inmunoglobulina puede ser una región que tiene una delección de una parte de una secuencia de aminoácidos relativamente larga correspondiente a CH2 y/o CH3. Específicamente, 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) 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 bisagra de inmunoglobulina (o una parte de la región bisagra), o 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 la secuencia (mutante) de esta. Como se usa en la presente descripción, el término "derivado de la secuencia de aminoácidos" se refiere a una secuencia que es diferente de la secuencia de aminoácidos nativa debido a la delección, la inserción, la sustitución no conservadora o conservadora o una combinación de estas de uno o más residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos nativa. Por ejemplo, en el caso de una Fc de IgG, los residuos de aminoácidos en las posiciones de 214 a 238, de 297 a 299, de 318 a 322 o de 327 a 331, que se sabe que son importantes en la unión, pueden usarse como sitios adecuados para la modificación.

Además, son posibles otros diversos derivados, incluido uno que tiene una delección de una región capaz de formar un enlace disulfuro, o una delección de algunos residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal de la Fc nativa o una adición de un residuo de metionina en el extremo N-terminal de la Fc nativa. Además, para eliminar las funciones efectoras, puede ocurrir una delección en un sitio de unión al complemento, tal como un sitio de unión a C1q y un sitio ADCC (citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos). Las técnicas para preparar tales derivados de secuencia de la región Fc de inmunoglobulina se describen en las publicaciones de patentes internacionales núms. WO 97/34631 y WO 96/32478.

Los intercambios de aminoácidos en las proteínas y los péptidos, que generalmente no alteran la actividad de las proteínas o los péptidos, se conocen en la técnica (H. Neurath, R. L. Hill, The Proteins, Academic Press, Nueva York, 1979). Los intercambios más comunes 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 es necesario, puede modificarse mediante fosforilación, sulfatación, acrilación, glicosilación, metilación, farnesilación, acetilación o amidación.

Los derivados de Fc descritos anteriormente muestran una actividad biológica idéntica a la de la región Fc de la presente invención o tienen una estabilidad estructural aumentada contra el calor o el pH.

Además, esta región Fc puede obtenerse a partir de formas nativas aisladas de seres humanos y otros animales que incluyen vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas y cobayas, o pueden ser recombinantes o los derivados de estas, obtenidos de células animales o microorganismos transformados. En la presente descripción, la región Fc puede obtenerse de una inmunoglobulina nativa mediante el aislamiento de una inmunoglobulina completa de un cuerpo humano o animal vivo y el tratamiento de esta con proteinasas. Cuando la inmunoglobulina completa se trata con papaína, se escinde en las regiones Fab y Fc, y cuando la inmunoglobulina

completa se trata con pepsina, se divide en los fragmentos pF'c y F(ab)2. Fc o pF'c pueden aislarse mediante el uso de la cromatografía de exclusión por tamaño o similar. Preferentemente, una región Fc derivada de humano es una región Fc de inmunoglobulina recombinante obtenida de un microorganismo.

Además, la región Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede estar en la forma de cadenas de azúcar nativas o cadenas de azúcar aumentadas o disminuidas en comparación con una forma nativa, o puede estar en una forma desglucosilada. El aumento, la disminución o la eliminación de las cadenas de azúcar de Fc de inmunoglobulina puede lograrse mediante los métodos convencionales, tales como un método químico, un método enzimático y un método de ingeniería genética mediante el uso de un microorganismo. La región Fc obtenida por la eliminación de las cadenas de azúcar de Fc muestra una disminución significativa en la afinidad de unión a la parte C1q del primer componente del complemento y una disminución o pérdida en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos o la citotoxicidad dependiente del complemento, y por lo tanto no induce las respuestas inmunitarias innecesarias in vivo. Con respecto a esto, una región Fc de inmunoglobulina en una forma desglucosilada o aglicosilada puede ser más adecuada para el objetivo de la presente invención como un portador farmacológico.

Como se usa en la presente descripción, el término "desglucosilación" se refiere a la eliminación enzimática de los restos de azúcar de una región Fc, y el término "aglicosilación" se refiere a una región Fc no glicosilada producida en un procariota, preferentemente E. coli.

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

Además, la región Fc de inmunoglobulina puede derivarse de IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, o una combinación o híbrido de estas. Preferentemente, se deriva de IgG o IgM, que se encuentran entre las proteínas más abundantes en la sangre humana, y con la máxima preferencia de IgG que se sabe que mejora la vida media de las proteínas de unión a ligando.

Como se usa en la presente descripción, el término "combinación" significa que los polipéptidos que codifican las regiones Fc de inmunoglobulina de cadena sencilla del mismo origen se unen a un polipéptido de cadena única de un origen diferente para formar un dímero o un multímero. Específicamente, puede formarse un dímero o multímero a partir de dos o más fragmentos que se seleccionan del grupo que consiste en los fragmentos Fc de IgG, Fc de IgA, Fc de IgM, Fc de IgD y Fc de IgE.

Como se usa en la presente descripción, el término "híbrido" significa que las secuencias correspondientes a dos o más fragmentos Fc de inmunoglobulina de diferentes orígenes están presentes en una región Fc de inmunoglobulina de cadena sencilla. En la presente invención, son posibles diversas formas de híbrido. En otras palabras, es posible un híbrido compuesto de 1 a 4 dominios que se seleccionan del grupo que consiste en CH1, CH2, CH3 y CH4 de Fc de IgG, Fc de IgM, Fc de IgA, Fc de IgE y Fc de IgD, y puede incluir una bisagra.

Mientras tanto, la IgG también puede subclasificarse en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y en la presente invención, también es posible una combinación o híbrido de estas subclases. Preferentemente, IgG es la subclase IgG2 e IgG4, y con la máxima preferencia, es la región Fc de IgG4 que carece sustancialmente de funciones efectoras, tal como la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

En otras palabras, la región Fc de inmunoglobulina más preferida que se usa como portador farmacológico en la presente invención es una región Fc derivada de IgG4 humana. Una región Fc derivada de seres humanos es más preferible que una región Fc no derivada de seres humanos, que puede actuar como un antígeno en el cuerpo humano y provocar respuestas inmunitarias indeseables, tal como la producción de un nuevo anticuerpo contra el antígeno.

Como se usa en la presente descripción, el término "polímero no peptidílico" se refiere a un polímero biocompatible que incluye dos o más unidades repetitivas unidas entre sí por cualquier enlace covalente en lugar de un enlace peptídico. En la presente invención, el polímero no peptidílico puede usarse de manera intercambiable con el enlazador no peptidílico.

El polímero no peptidílico que puede usarse en la presente invención puede seleccionarse del grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol, un copolímero de etilenglicol/propilenglicol, poliol polioxitilado, alcohol polivinílico, polisacáridos, dextrano, éter polivinilético, polímeros biodegradables, tales como PLA (poli(ácido láctico)) y PLGA (ácido poliláctico-glicólico), polímeros lipídicos, quitinas, ácido hialurónico y las combinaciones de estos. Preferentemente, el polímero no peptidílico es el polietilenglicol. Además, los derivados de estos conocidos en la técnica y los derivados que pueden prepararse fácilmente mediante un método conocido en la técnica también están dentro del alcance de la presente invención.

El enlazador peptídico que se usa en una proteína de fusión obtenida por un método convencional de fusión en marco tiene inconvenientes en el sentido de que es fácilmente escindido por las proteinasas in vivo y, por lo tanto,

no puede obtenerse un efecto suficiente de aumentar la vida media en el suero del fármaco activo por un portador como se esperaba. Sin embargo, en la presente invención, el polímero que tiene resistencia a las proteinasas puede usarse para mantener la vida media en el suero del péptido, similar al portador. Por lo tanto, cualquier polímero no peptidílico puede usarse en la presente invención, siempre que sea un polímero que tenga la función mencionada anteriormente, es decir, un polímero que tenga resistencia a las proteinasas in vivo. El polímero no peptidílico tiene un peso molecular en el intervalo de 1 a 100 kDa, y preferentemente de 1 a 20 kDa. El polímero no peptidílico de la presente invención, que se une a la región Fc de inmunoglobulina, puede ser un tipo de polímero o una combinación de diferentes polímeros.

El polímero no peptidílico que se usa en la presente invención puede tener un grupo reactivo capaz de unirse a la región Fc de inmunoglobulina y al fármaco proteico. El grupo reactivo en ambos extremos del polímero no peptidílico se selecciona preferentemente del grupo que consiste en un grupo aldehído reactivo, un grupo propionaldehído, un grupo butiraldehído, un grupo maleimida y un derivado de succinimida.

El derivado de succinimida puede ser propionato de succinimidilo, hidroxisuccinimidilo, succinimidilcarboximetilo o carbonato de succinimidilo. En particular, cuando el polímero no peptidílico tiene un grupo aldehído reactivo en ambos extremos de este, pueden minimizarse las reacciones no específicas, y un polipéptido fisiológicamente activo y una inmunoglobulina pueden unirse eficazmente a ambos extremos del polímero no peptidílico, respectivamente. Un producto final generado por alquilación reductora con un enlace aldehído es mucho más estable que el unido por un enlace amida. El grupo reactivo aldehído se une selectivamente a un extremo N-terminal a un pH bajo y puede formar un enlace covalente con un residuo de lisina a un pH alto, tal como pH 9,0.

Los grupos reactivos en ambos extremos del polímero no peptidílico pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, el polímero no peptidílico puede poseer un grupo maleimida en un extremo, y un grupo aldehído, un grupo propionaldehído o un grupo butiraldehído en el otro extremo. Cuando se usa un polietilenglicol que tiene un grupo hidroxilo reactivo en ambos extremos de este como el polímero no peptidílico, el grupo hidroxilo puede activarse a varios grupos reactivos mediante reacciones químicas conocidas, o un polietilenglicol que tiene un grupo reactivo modificado disponible comercialmente puede usarse para preparar el conjugado de acción prolongada de la presente invención.

El conjugado de la presente invención puede ser uno en el que un extremo del polímero no peptidílico y el otro están unidos a un grupo amina o un grupo tiol de la región Fc de inmunoglobulina y el derivado de oxintomodulina, respectivamente.

El polímero no peptidílico de la presente invención tiene un grupo funcional en ambos extremos que puede unirse a una región Fc de inmunoglobulina o un fármaco proteico. Los grupos funcionales pueden ser, como ejemplos ilustrativos, un grupo aldehído, un grupo propionaldehído, un grupo butiraldehído, un grupo maleimida y un derivado de succinimida (es decir, propionato de succinimidilo, hidroxisuccinimidilo, succinimidilcarboximetilo o carbonato de succinimidilo).

Los grupos reactivos en ambos extremos del enlazador, que es el polímero no peptidílico, pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, el polímero no peptidílico puede tener 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 peptidílico tiene un grupo aldehído reactivo en un extremo y un grupo maleimida reactivo en el otro extremo, las reacciones no específicas pueden minimizarse, y un polipéptido fisiológicamente activo y una inmunoglobulina pueden unirse eficazmente a ambos extremos del polímero no peptidílico. De acuerdo con una modalidad de la presente invención, se sintetizó un conjugado mediante la unión de la oxintomodulina o su derivado a la región Fc de inmunoglobulina a través de un enlace covalente mediante el uso del polímero no peptidílico PEG que incluye un grupo propionaldehído solo o un grupo maleimida y un grupo aldehído.

La composición farmacéutica de la presente invención puede usarse para la prevención o el tratamiento de la hiperlipidemia, la enfermedad del hígado no graso y la aterosclerosis.

Como se usa en la presente descripción, el término "prevención" se refiere a todas las acciones que inhiben o retrasan el desarrollo de una enfermedad diana. Como se usa en la presente descripción, el término "prevención" significa administrar el derivado de oxintomodulina de la presente invención para inhibir o retrasar el desarrollo de la hiperlipidemia, la enfermedad del hígado graso o la aterosclerosis, que muestran un aumento en los niveles de colesterol total y de colesterol de baja densidad en sangre y una disminución en los niveles de colesterol de alta densidad.

Como se usa en la presente descripción, el término "tratamiento" se refiere a todas las acciones que alivian, mejoran o mitigan los síntomas de la enfermedad desarrollada. Como se usa en la presente descripción, el término "tratamiento" significa administrar el derivado de oxintomodulina de la presente invención para aliviar, mejorar o mitigar la hiperlipidemia, la enfermedad del hígado graso o la aterosclerosis, que muestra un aumento en los niveles de colesterol total y de colesterol de baja densidad en sangre y una disminución en los niveles de colesterol de alta densidad.

Como se usa en la presente descripción, el término "hiperlipidemia" se refiere a una afección asociada con los niveles anormalmente elevados de lípidos, tales como el colesterol libre, los ésteres de colesterol, los fosfolípidos y los triglicéridos, en sangre. Aunque la hiperlipidemia no muestra síntomas específicos por sí misma, los lípidos en exceso en la sangre se adhieren a las paredes de los vasos sanguíneos para reducir el tamaño de los vasos sanguíneos y provocar la aterosclerosis por reacciones inflamatorias. Por esta razón, pueden producirse las enfermedades coronarias, las enfermedades cerebrovasculares, la obstrucción de los vasos sanguíneos periféricos, etc.

Por tanto, la composición farmacéutica de la presente invención puede usarse para el tratamiento no sólo de la hiperlipidemia, la enfermedad del hígado graso o la aterosclerosis, sino también de las enfermedades coronarias, las enfermedades cerebrovasculares y la obstrucción de los vasos sanguíneos periféricos.

Como se usa en la presente descripción, el término "enfermedad del hígado graso" se refiere a una afección en la que la relación de grasas en el peso del hígado es más del 5 %. En la presente invención, las enfermedades del hígado graso incluyen la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), la enfermedad del hígado graso alcohólico, la enfermedad del hígado graso nutricional, la enfermedad del hígado graso por inanición, la enfermedad del hígado graso por obesidad, la enfermedad del hígado graso diabético o la esteatohepatitis. La enfermedad del hígado graso no alcohólico pretende incluir la enfermedad del hígado graso no alcohólico primaria y secundaria, pero puede ser preferentemente una enfermedad del hígado graso no alcohólico resultante de la hiperlipidemia primaria, la diabetes o la obesidad.

Además, en la presente invención, se entiende que la enfermedad del hígado graso no alcohólico incluye la esteatosis simple, la esteatohepatitis no alcohólica y la fibrosis hepática y la cirrosis hepática que resultan de la progresión de tales enfermedades.

La aterosclerosis se refiere a una enfermedad vascular en la que se forma un ateroma como resultado del depósito de colesterol en el endotelio de los vasos sanguíneos y la proliferación de células endoteliales.

En un ejemplo de la presente invención, se preparó un conjugado de derivado de oxintomodulina de acción prolongada mediante la unión del derivado de oxintomodulina a la región Fc de inmunoglobulina por un enlace covalente mediante el uso del polietilenglicol, y el conjugado preparado se administró a modelos animales de hámster que tenían hiperlipidemia inducida por la ingesta de una dieta rica en grasas. Como resultado, se demostró que el grupo al que se le administró el conjugado de derivado de oxintomodulina de acción prolongada de acuerdo con la presente invención mostró una disminución significativa en los niveles de triglicéridos en sangre (Figura 1), una disminución significativa en los niveles de colesterol total en sangre (Figura 2) y una disminución significativa de los niveles de colesterol de baja densidad (LDL) en sangre, en comparación con los modelos animales inducidos a la hiperlipidemia. Además, se observó que el grupo al que se le administró el conjugado de derivado de oxintomodulina de acción prolongada de acuerdo con la presente invención mostró un aumento significativo en los niveles de colesterol de alta densidad (HDL) en sangre (Figura 4) y un aumento significativo en la relación de colesterol HDL/colesterol LDL en sangre (Figura 5), en comparación con los modelos animales inducidos a la hiperlipidemia.

Además, pudo observarse que el conjugado de derivado de oxintomodulina de acción prolongada de acuerdo con la presente invención mostró una disminución en los niveles de colesterol total en sangre (Figura 6) y una disminución en los niveles de colesterol LDL y triglicéridos en sangre (Figura 7), en comparación con VICTOZA® que es un análogo de GLP-1 de acción prolongada comercial. Además, pudo observarse que la administración del conjugado de derivado de oxintomodulina de acción prolongada de la presente invención mostró aumentos en el nivel de colesterol HDL en sangre y en la relación de colesterol HDL/LDL en comparación con la administración de VICTOZA® (Figuras 8 y 9). En particular, un conjugado de acción prolongada del péptido de la SEQ ID NO: 25 con Fc mostró aumentos significativos en los niveles de HDL en sangre y en la relación de colesterol HDL/LDL en comparación con VICTOZA®.

En otras palabras, el derivado de oxintomodulina de acuerdo con la presente invención reduce los niveles de lípidos en sangre y, por lo tanto, puede usarse como un agente para tratar la hiperlipidemia, la enfermedad del hígado graso o la arteriosclerosis. Además, el conjugado de la presente invención tiene una excelente capacidad para activar el receptor de GLP-1 y el receptor de glucagón, en comparación con la oxintomodulina nativa, y muestra una vida media en sangre aumentada in vivo y por lo tanto la actividad de estos puede mantenerse in vivo durante un período prolongado de tiempo.

El derivado de oxintomodulina de la presente invención puede aumentar la actividad de un factor (Proteína quinasa C- ζ o PKC- ζ) que regula la actividad de las enzimas que están involucradas en la lipólisis de grasas, y aumentar la expresión de un factor (Glut2) que participa en la lipólisis de las grasas, por lo que trata la hiperlipidemia, la enfermedad del hígado graso o la arteriosclerosis.

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender además un agente farmacéutico que muestra efectos preventivos o terapéuticos contra la hiperlipidemia, la enfermedad del hígado graso o la arteriosclerosis. Específicamente, la composición de la presente invención puede comprender además un agente farmacéutico conocido como un agente para tratar la hiperlipidemia, la enfermedad del hígado graso o la arteriosclerosis para administrar el agente farmacéutico en combinación con el derivado de la presente invención.

Por lo tanto, la composición de la presente invención puede usarse sola o administrarse en combinación con otros fármacos para prevenir o tratar la hiperlipidemia, la enfermedad del hígado graso o la arteriosclerosis.

Como se usa en la presente descripción, el término "administración" significa introducir un material dado en un paciente mediante cualquier método apropiado. El derivado de la presente invención puede administrarse por cualquier vía general, siempre que pueda alcanzar un tejido diana. Específicamente, el derivado de la presente invención puede administrarse por vía intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, oral, local, intranasal, intrapulmonar o intrarrectal. Sin embargo, debido a que el péptido se digiere cuando se administra por vía oral, la composición oral se formula preferentemente de modo que el ingrediente activo esté recubierto o protegido de la degradación en el estómago. Preferentemente, la composición de la presente invención puede administrarse en forma inyectable. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse mediante el uso de cualquier sistema capaz de suministrar el ingrediente activo a las células diana.

La composición farmacéutica que comprende el derivado de oxintomodulina de la presente invención puede comprender además un portador farmacéuticamente aceptable. Para la administración oral, los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen un aglutinante, un lubricante, un desintegrante, un excipiente, un solubilizante, un agente dispersante, un estabilizante, un agente de suspensión, un colorante y un agente saborizante. Para las preparaciones inyectables, los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen un amortiguador, un conservante, un analgésico, un solubilizante, un agente isotónico y un estabilizante. Para la administración tópica, los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen una base, un excipiente, un lubricante y un conservante.

La composición farmacéutica de la presente invención puede formularse en diversas formas de dosificación mediante el uso de los portadores farmacéuticamente aceptables mencionados anteriormente. Por ejemplo, para la administración oral, la composición farmacéutica puede formularse en comprimidos, grageas, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes u obleas. Para las preparaciones inyectables, la composición farmacéutica puede proporcionarse en forma de una ampolla de dosificación unitaria o un recipiente de dosificación múltiple. La composición farmacéutica también puede formularse en soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas y preparaciones de liberación sostenida.

Mientras tanto, los ejemplos del portador, excipiente y diluyente adecuado para la formulación incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma de acacia, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, metilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, talco, estearato de magnesio y aceites minerales. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede incluir además rellenos, agentes anticoagulantes, lubricantes, agentes humectantes, saborizantes o conservantes.

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

La composición farmacéutica de la presente invención tiene una vida media larga in vivo y una excelente potencia, y por lo tanto el número y la frecuencia de la administración de la composición farmacéutica pueden reducirse significativamente.

En la presente descripción se describe un método para tratar la hiperlipidemia, la enfermedad del hígado graso o la arteriosclerosis, comprendiendo el método una etapa de administración del derivado de oxintomodulina de la presente invención a un sujeto.

La oxintomodulina anterior, la hiperlipidemia, la enfermedad del hígado graso y la arteriosclerosis son como se describieron anteriormente.

Como se usa en la presente descripción, el término "sujeto" se refiere a un sujeto sospechoso de tener la hiperlipidemia, la enfermedad del hígado graso o la arteriosclerosis. Específicamente, el término significa los mamíferos, que incluye los seres humanos, las ratas y los animales domésticos, que tienen o corren el riesgo de desarrollar la enfermedad anterior. Además, el sujeto puede ser cualquier sujeto que pueda tratarse por el derivado de oxintomodulina de la presente invención.

El método terapéutico, como se describe en la presente descripción, puede comprender administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que comprende el conjugado. La dosis diaria total de la

composición puede determinarse mediante un juicio médico apropiado por parte de un médico, y la composición puede administrarse una o varias veces. Sin embargo, en vista del propósito de la presente invención, la dosis terapéuticamente eficaz específica de la composición para cualquier paciente en particular puede variar dependiendo de varios factores que se conocen bien en el campo médico, que incluye el tipo y el grado de la respuesta a alcanzar, las composiciones concretas de acuerdo si los agentes se usan con ellos o no, la edad del paciente, el peso corporal, el estado de salud, el sexo y la dieta, el tiempo y la vía de administración, la tasa de secreción de la composición, la duración del tratamiento, otros fármacos usados en combinación o coincidentes con la composición de la presente invención, y otros factores conocidos en el campo médico.

En otro aspecto más, en la presente descripción se describe un método para preparar un conjugado de derivado de oxintomodulina de la presente invención.

El método de preparación puede comprender las etapas de: (1) unir covalentemente un polímero no peptídico que tiene un grupo aldehído, maleimida o succinimida reactivo al grupo amino o tiol de un péptido de derivado de oxintomodulina; (2) separar el péptido de derivado de oxintomodulina, que tiene el polímero no peptídico unido covalentemente al mismo en posiciones distintas del extremo amino terminal, de la mezcla de reacción de la etapa (1); y (3) unir covalentemente una región Fc de inmunoglobulina al otro extremo del polímero no peptídico unido, produciendo de este modo un conjugado peptídico que comprende la región Fc de inmunoglobulina y el péptido de derivado de oxintomodulina, unido a ambos extremos del polímero no peptídico, respectivamente.

Más específicamente, el método de preparación puede comprender las etapas de: (1) unir covalentemente un polímero no peptídico, que tiene un grupo aldehído reactivo y un grupo maleimida reactivo en ambos extremos de este, respectivamente, al residuo de cisteína de un derivado de oxintomodulina; (2) separar el derivado de oxintomodulina, que tiene el polímero no peptídico unido covalentemente al residuo de cisteína, de la mezcla de reacción de la etapa (1); y (3) unir covalentemente una región Fc de inmunoglobulina al otro extremo del polímero no peptídico unido, produciendo de este modo un conjugado peptídico que comprende la región Fc de inmunoglobulina y el derivado de oxintomodulina, unido a ambos extremos del polímero no peptídico, respectivamente.

En otro aspecto más, en la presente descripción se describe el uso del derivado de oxintomodulina en la preparación de un medicamento para prevenir o tratar la hiperlipidemia, la enfermedad del hígado graso o la arteriosclerosis.

Efectos Ventajosos

El derivado de oxintomodulina de la presente invención tiene una alta capacidad para activar el receptor de GLP-1 y el receptor de glucagón en comparación con la oxintomodulina nativa y exhibe los efectos de reducir los niveles de colesterol total, el colesterol de baja densidad y los triglicéridos en sangre que aumentaron con una dieta rica en grasas y el aumento de los niveles de colesterol de alta densidad y la relación de colesterol de alta densidad/colesterol de baja densidad. Por tanto, el derivado de oxintomodulina de la presente invención puede usarse eficazmente para el tratamiento de la hiperlipidemia y las enfermedades relacionadas.

Descripción de los Dibujos

La Figura 1 es un gráfico que muestra el cambio en los niveles de triglicéridos en sangre provocado por la administración de un derivado de oxintomodulina de acción prolongada a hámsteres con hiperlipidemia inducida por una dieta rica en grasas (#: indica un aumento significativo en comparación con un grupo con dieta general con una confianza del 99,9 % ($p < 0,001$); *: indica una disminución significativa en comparación con un grupo con una dieta rica en grasas con una confianza del 99,9 % ($p < 0,001$).

La Figura 2 es un gráfico que muestra el cambio en los niveles de colesterol total en sangre provocado por la administración de un derivado de oxintomodulina de acción prolongada a hámsteres con hiperlipidemia inducida por una dieta rica en grasas (#: indica un aumento significativo en comparación con un grupo con dieta general con una confianza del 99,9 % ($p < 0,001$); *: indica una disminución significativa en comparación con un grupo con una dieta rica en grasas con una confianza del 99,9 % ($p < 0,001$).

La Figura 3 es un gráfico que muestra el cambio en los niveles de colesterol LDL en sangre provocado por la administración de un derivado de oxintomodulina de acción prolongada a hámsteres con hiperlipidemia inducida por una dieta rica en grasas (#: indica un aumento significativo en comparación con un grupo con dieta general con un nivel de confianza del 99,9 % ($p < 0,001$); *: indica una disminución significativa en comparación con un grupo con una dieta rica en grasas con una confianza del 99,9 % ($p < 0,001$).

La Figura 4 es un gráfico que muestra el cambio en los niveles de colesterol HDL en sangre provocado por la administración de un derivado de oxintomodulina de acción prolongada a hámsteres con hiperlipidemia inducida por una dieta rica en grasas (*: indica una disminución significativa en comparación con un grupo con una dieta rica en grasas con una confianza del 99 % ($p < 0,01$)).

La Figura 5 es un gráfico que muestra el cambio en los niveles de colesterol HDL/LDL en sangre provocado por la administración de un derivado de oxintomodulina de acción prolongada a hámsteres con hiperlipidemia inducida por una dieta rica en grasas (*: muestra una disminución significativa en comparación con un grupo con una dieta rica en grasas con una confianza del 95 % ($p < 0,05$).

La Figura 6 es un gráfico que muestra el cambio en los niveles de colesterol total en sangre provocado por la administración de VICTOZA® o un derivado de oxintomodulina de acción prolongada a hámsteres con hiperlipidemia inducida por una dieta rica en grasas (***: indica una disminución significativa en comparación con un grupo con una dieta rica en grasas con una confianza del 99,9 % ($p < 0,001$).

La Figura 7 es un gráfico que muestra el cambio en los niveles de colesterol LDL en sangre provocado por la administración de VICTOZA® o un derivado de oxintomodulina de acción prolongada a hámsteres con hiperlipidemia inducida por una dieta rica en grasas (***: indica una disminución significativa en comparación con un grupo con una dieta rica en grasas con una confianza del 99,9 % ($p < 0,001$).

La Figura 8 es un gráfico que muestra el cambio en los niveles de colesterol HDL en sangre provocado por la administración de VICTOZA® o un derivado de oxintomodulina de acción prolongada a hámsteres con hiperlipidemia inducida por una dieta rica en grasas (*: indica una disminución significativa en comparación con un grupo con una dieta rica en grasas con una confianza del 95 % ($p < 0,05$).

La Figura 9 es un gráfico que muestra el cambio en los niveles de colesterol HDL/LDL en sangre provocado por la administración de VICTOZA® o un derivado de oxintomodulina de acción prolongada a hámsteres con hiperlipidemia inducida por una dieta rica en grasas (**: indica una disminución significativa en comparación con un grupo con una dieta rica en grasas con una confianza del 99 % ($p < 0,01$).

La Figura 10 es un gráfico que muestra el cambio en los niveles de triglicéridos en sangre provocado por la administración de VICTOZA® o un derivado de oxintomodulina de acción prolongada a hámsteres con hiperlipidemia inducida por una dieta rica en grasas (***: indica una disminución significativa en comparación con un grupo con una dieta rica en grasas con una confianza del 99,9 % ($p < 0,001$).

Modo para la Invención

A continuación, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los ejemplos. Sin embargo, debe entenderse que estos ejemplos tienen fines ilustrativos. El alcance de la protección se determina por las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1: Producción de la línea celular para activación in vitro

Ejemplo 1-1: Producción de la línea celular que muestra la respuesta de AMPc a GLP-1

Mediante el uso de una parte correspondiente al ORF (marco de lectura abierto) del ADNc (OriGene Technologies, Inc. Estados Unidos) del gen del receptor de GLP-1 humano como una plantilla, la PCR se realizó mediante el uso de cebadores inversos y directos que incluyen un sitio de escisión HindIII y un sitio de escisión EcoRI, respectivamente, para obtener de este modo un producto de PCR.

Cebador directo: 5'-CCCGGCCCGCGCGCGCTATTGAAATAC-3' (SEQ ID NO: 50)

Cebador inverso: 5'-GAACGGTCCGGAGGACGTCGACTCTTAAGATAG-3' (SEQ ID NO: 51)

El producto de PCR se clonó en el vector de expresión en células animales conocido x0GC/dhfr, construyendo de este modo el vector recombinante x0GC/GLP-1R.

El vector recombinante x0GC/GLP-1R se introdujo en una línea celular CHO DG44, cultivada en medio DMEM/F12 (FBS al 10 %), mediante el uso de la lipofectamina (Invitrogene, Estados Unidos), para obtener un transformante. El transformante se incubó en un medio selectivo que contenía 1 mg/ml de G418 y metotrexato 10 nM, y se seleccionaron las líneas celulares monoclonales a partir de este. A continuación, una línea celular que muestra una buena respuesta de AMPc dependiente de la concentración a GLP-1 finalmente se seleccionó de las líneas celulares monoclonales.

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

Mediante el uso de una parte correspondiente al ORF (marco de lectura abierto) del ADNc (OriGene Technologies, Inc. Estados Unidos) del gen del receptor de glucagón humano como plantilla, la PCR se realizó mediante el uso de cebadores inversos y directos que incluyen un sitio de escisión EcoRI y un sitio de escisión XhoI, respectivamente, obteniendo de este modo un producto de PCR.

Cebador directo: 5'-CAGCGACACCGACCGTCCCCCGTACTTAAGGCC-3' (SEQ ID NO: 52)

Cebador inverso: 5'-CTAACCGACTCTCGGGGAAGACTGAGCTCGCC-3' (SEQ ID NO: 53)

El producto de PCR se clonó en el vector de expresión en células animales conocido x0GC/dhfr, construyendo de este modo el vector recombinante x0GC/GCGR.

El vector recombinante x0GC/GCGR se introdujo en una línea celular CHO DG44, cultivada en medio DMEM/F12 (FBS al 10 %), mediante el uso de la lipofectamina (Invitrogene, Estados Unidos) para obtener un transformante. El transformante se incubó en un medio selectivo que contenía 1 mg/ml de G418 y metotrexato 10 nM, y se seleccionaron las líneas celulares monoclonales a partir de este.

A continuación, una línea celular que muestra una buena respuesta de AMPc dependiente de la concentración a glucagón finalmente se seleccionó de las líneas celulares monoclonales.

Ejemplo 2: Actividad in vitro de los derivados de oxintomodulina

Ejemplo 2-1: Síntesis de los derivados de oxintomodulina

Para medir las actividades in vitro de los derivados de oxintomodulina, los derivados de oxintomodulina que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Oxintomodulina y derivados de oxintomodulina (solo las SEQ ID NO: 24, 25 y 26 están cubiertas por las reivindicaciones)	
SEQ ID NO.	Secuencias
SEQ ID NO: 1	HSQGTFTSDYSKYLSRRAQDFVQWLMNTKRNRRNNIA
SEQ ID NO: 2	CA-SQGTFTSDYSKYLDEEAVRLFIEWLMNTKRNRRNNIA
SEQ ID NO: 3	CA-SQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVAWLKNTGPSSGAPPPS
SEQ ID NO: 4	CA-GQGTFTSDYSRYLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
SEQ ID NO: 5	CA-GQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
SEQ ID NO: 6	CA-GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEWAAHSQGTFTSDYSKYLD
SEQ ID NO: 7	CA-SQGTFTSDYSRYLDEEAVRLFIEWLMNTK
SEQ ID NO: 8	CA-SQGTFTSDLSRQLEEEAVRLFIEWLMNK
SEQ ID NO: 9	CA-GQGTFTSDYSRYLDEEAVXLFIEWLMNTKRNRRNNIA
SEQ ID NO: 10	CA-SQGTFTSDYSRQMEEEAVRLFIEWLMNGGPSSGAPPPSK
SEQ ID NO: 11	CA-GEGTFTSDLSRQMEEEAVRLFIEWAAHSQGTFTSDYSRYLDK
SEQ ID NO: 12	CA-SQGTFTSDYSRYLDGGGHGEGTFTSDLSKQMEEEAVK
SEQ ID NO: 13	CA-SQGTFTSDYSRYLDXEAVXLFIEWLMNTK
SEQ ID NO: 14	CA-GQGTFTSDYSRYLDEEAVXLFIXWLMNTKRNRRNNIA
SEQ ID NO: 15	CA-GQGTFTSDYSRYLDEEAVRLFIXWLMNTKRNRRNNIA
SEQ ID NO: 16	CA-SQGTFTSDLSRQLEGGHSGQGTFTSDLSRQLEK
SEQ ID NO: 17	CA-SQGTFTSDYSRYLDEEAVRLFIEWIRNTKRNRRNNIA
SEQ ID NO: 18	CA-SQGTFTSDYSRYLDEEAVRLFIEWIRNGGPSSGAPPPSK
SEQ ID NO: 19	CA-SQGTFTSDYSRYLDEEAVKLFIEWIRNTKRNRRNNIA
SEQ ID NO: 20	CA-SQGTFTSDYSRYLDEEAVKLFIEWIRNGGPSSGAPPPSK
SEQ ID NO: 21	CA-SQGTFTSDYSRQLEEEAVRLFIEWVRNTKRNRRNNIA
SEQ ID NO: 22	DA-SQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTK
SEQ ID NO: 23	HAibQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVCWLMNT
SEQ ID NO: 24	HAibQGTFTSDY SKYLDEKRAK EFVQWLMNTC
SEQ ID NO: 25	HAibQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTC
SEQ ID NO: 26	HAibQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTC
SEQ ID NO: 27	HAibQGTFTSDYSKYLDEQAAKEFICWLMNT
SEQ ID NO: 28	HAibQGTFTSDY SKYLDEKRAK EFVQWLMNT
SEQ ID NO: 29	H(d)SQGTFTSDYSKYLSRRAQDFVQWLMNTKRNRRNNIA
SEQ ID NO: 30	CA-SQGTFTSDYSKYLSRRAQDFVQWLMNTKRNRRNNIA
SEQ ID NO: 31	CA-(d)SQGTFTSDYSKYLSRRAQDFVQWLMNTKRNRRNNIA
SEQ ID NO: 32	CA-AibQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTC
SEQ ID NO: 33	HAibQGTFTSDYAKYLDEKRAKEFVQWLMNTC
SEQ ID NO: 34	YAibQGTFTSDYSKYLDEKRAKEFVQWLMNTC

indica 4-imidazoacetilo, DA indica desamino-histidilo, Aib indica ácido aminoisobutírico y (d)S indica d-serina.
Ejemplo 2-2: Medición de actividades in vitro de los derivados de oxintomodulina

Para medir los efectos de los péptidos anti-obesidad, se midieron las actividades in vitro de las células mediante el uso de los transformantes preparados en los Ejemplos 1-1 y 1-2.

Cada uno de los transformantes se transformó para expresar cada uno de los genes del receptor de GLP-1 humano y del receptor de glucagón en CHO (ovario de hámster chino) y fue adecuado para medir las actividades de GLP-1 y glucagón. Por lo tanto, la actividad de cada uno de los derivados de oxintomodulina se midió mediante el uso de cada uno de los transformantes.

Específicamente, cada uno de los transformantes se subcultivó dos o tres veces por semana, y las células se dispensaron en cada pocillo de una placa de 96 pocillos a una densidad de 1×10^5 células/pocillo y se cultivaron durante 24 horas.

Las células cultivadas se lavaron con amortiguador KRB, se suspendieron en 40 ml de amortiguador KRB que contenía IBMX 1 mM y después se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Cada uno de oxintomodulina y los derivados de oxintomodulina (SEQ ID NO: 2-6, 8, 10-13, 17, 18, 23-25, 27, 28 y 32-34) se diluyeron en serie por cinco veces desde 1000 nM hasta 0,02 nM, y se añadieron 40 ml de cada una de las diluciones a las células, que se incubaron a continuación en una incubadora de CO₂ a 37 °C durante 1 hora. A continuación, se añadieron 20 ml de amortiguador de lisis celular para lisar las células, y se midió la concentración de AMPc en cada uno de los lisados celulares mediante el uso de un kit de ensayo de AMPc (Molecular Device, Estados Unidos). A partir de los resultados de la medición, se calcularon los valores de EC₅₀ y se compararon entre sí (Tabla 2).

Tabla 2 Comparación de las actividades in vitro del receptor de GLP-1 y del receptor de glucagón entre los derivados de oxintomodulina (solo las SEQ ID NO: 24, 25 y 26 están cubiertas por las reivindicaciones)

SEQ ID NO.	EC 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	>1000	637,7
SEQ ID NO: 4	5,5	>1000
SEQ ID NO: 5	5,9	>1000
SEQ ID NO: 6	500,1	>1000
SEQ ID NO: 8	419,6	>1000
SEQ ID NO: 10	>1000	>1000
SEQ ID NO: 11	>1000	>1000
SEQ ID NO: 12	>1000	>1000
SEQ ID NO: 13	>1000	>1000
SEQ ID NO: 17	97,9	>1000
SEQ ID NO: 18	96,3	>1000
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	41,3	17,7
SEQ ID NO: 33	2,2	80,2
SEQ ID NO: 34	12,5	1,04

Para PEGilar un residuo de cisteína en la posición 24 de un derivado de oxintomodulina de la SEQ ID NO: 24 con MAL-10K-ALD PEG (NOF., Japón), se dejaron reaccionar entre sí el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO: 23)

y MAL-10K-ALD PEG en una relación molar de 1:3 a una concentración de proteína de 3 mg/ml a temperatura ambiente durante 3 horas. La reacción se realizó en amortiguador Tris 50 mM (pH 8,0) que contenía guanidina 1 M. Una vez completada la reacción, la solución de reacción se purificó mediante el uso de SOURCE S en las siguientes condiciones, obteniéndose de este modo una oxintomodulina mono-PEGilada en la cisteína: columna: SOURCE S, velocidad de flujo: 2,0 ml/min, gradiente: A 0 → 100 % 50 min B (A: Na-citrato 20 mM, pH 3,0 + etanol al 45 %, B: A + KCl 1 M)).

A continuación, se dejaron reaccionar entre sí el derivado de oxintomodulina mono-PEGilado purificado (SEQ ID NO: 23) y una Fc de inmunoglobulina en una relación molar de 1:5 a una concentración de proteína de 20 mg/ml a 4 °C durante 16 horas. La reacción se realizó en amortiguador de fosfato de potasio 100 mM (pH 6,0) que contenía SCB 20 mM como un agente reductor. Una vez completada la reacción, la solución de reacción se purificó en las condiciones siguientes, obteniéndose de este modo un conjugado que comprende el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO: 23) y la inmunoglobulina: columna: SOURCE 15Q, velocidad de flujo: 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)); columna Source ISO: SOURCE ISO, velocidad de flujo: 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)).

Ejemplo 4: Preparación de un conjugado que comprende un derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO: 25) con Fc de inmunoglobulina (conjugado de derivado de oxintomodulina 25 con Fc de inmunoglobulina)

Para PEGilar un residuo de cisteína en la posición 30 de un derivado de oxintomodulina de la SEQ ID NO: 25 con MAL-10K-ALD PEG, se dejaron reaccionar entre sí el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO: 25) y MAL-10K-ALD PEG en una relación molar de 1:3 a una concentración de proteína de 3 mg/ml a temperatura ambiente durante 3 horas. La reacción se realizó en amortiguador Tris 50 mM (pH 8,0) que contenía guanidina 1 M. Una vez completada la reacción, la solución de reacción se purificó mediante el uso de SOURCE S en las siguientes condiciones, obteniéndose de este modo una oxintomodulina mono-PEGilada en la cisteína: columna: SOURCE S, velocidad de flujo: 2,0 ml/min, gradiente: A 0 → 100 % 50 min B (A: Na-citrato 20 mM, pH 3,0 + etanol al 45 %, B: A + KCl 1 M).

A continuación, se dejaron reaccionar entre sí el derivado de oxintomodulina mono-PEGilado purificado (SEQ ID NO: 25) y una Fc de inmunoglobulina en una relación molar de 1:5 a una concentración de proteína de 20 mg/ml a 4 °C durante 16 horas. La reacción se realizó en amortiguador de fosfato de potasio 100 mM (pH 6,0) que contenía SCB 20 mM como un agente reductor. Una vez completada la reacción, la solución de reacción se purificó en las siguientes condiciones, obteniéndose de este modo un conjugado que comprende el derivado de oxintomodulina (SEQ ID NO: 25) y la inmunoglobulina: columna SOURCE 15Q: SOURCE 15Q, velocidad de flujo: 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 columna Source ISO: SOURCE ISO, velocidad de flujo: 2,0 ml/min, gradiente: B 0 → 100 % 100 min A (A: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, B: A + AS 1,1M).

Ejemplo 5: Efecto de la oxintomodulina de acción prolongada sobre la reducción de los lípidos en modelos de hámsteres con hiperlipidemia

Ejemplo 5-1: Grupo de animales de prueba

Se adquirieron hámsteres machos de 8 semanas de edad (hámsteres sirios dorados, 120-130 g) de Vital River China. Se sabe que los hámsteres muestran perfiles de lípidos en sangre similares a los humanos, a diferencia de otros roedores, y son sensibles a las dietas ricas en grasas. A los animales se les permitió el acceso a una dieta esterilizada rica en grasas (Purina 5001 que contenía 11,5 % de aceite de maíz, 11,5 % de aceite de coco, 0,5 % de colesterol y 0,25 % de desoxicolato; Dyets, Belén, PA) o una dieta estándar para roedores (baja en grasas, 2018; Harlan Teklad, Madison, WI). A un grupo con dieta normal se le permitió acceder al agua del grifo filtrada y esterilizada con UV, y a un grupo con una dieta rica en grasas se le permitió acceder al agua que contenía un 10 % de fructosa. Los animales se mantuvieron en una cámara de cría que satisfacía los estándares de GLP, bajo un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad (iluminación: de 6 am a 6 pm), y todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la guía estándar para los experimentos con animales. La administración del fármaco se inició después de 3 semanas de la inducción a la hiperlipidemia, y los animales se dividieron en cuatro grupos (n=6) como se muestra en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3

Grupos	Fármacos administrados	Métodos de administración
Grupo normal	Vehículo (DPBS)	Administrado por vía subcutánea una vez por semana
Grupo inducido a la hiperlipidemia	Vehículo (DPBS)	
	3,25 nmol/kg de conjugado de SEQ ID NO: 25-Fc	
	8,96 nmol/kg de conjugado de SEQ ID NO: 23-Fc	

5 Específicamente, el grupo 1, grupo normal, se alimentó con una alimentación normal y se le administró por vía subcutánea 5 ml/kg de solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco (DPBS, Sigma) una o más veces por semana.

10 El grupo 2 (grupo inducido a la hiperlipidemia) se alimentó con una dieta rica en grasas para inducir la hiperlipidemia y luego se administró por vía subcutánea con 5 ml/kg de solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco (DPBS, Sigma) una o más veces por semana. El grupo 3 (grupo inducido a la hiperlipidemia + grupo administrado con 3,25 nmol/kg de conjugado de SEQ ID NO: 25-Fc) se alimentó con una dieta rica en grasas para inducir la hiperlipidemia, y luego se administró con 3,25 nmol/kg de conjugado de SEQ ID NO: 25-Fc (preparado en el Ejemplo 4) una vez por semana a una dosis de inyección de 5 ml/kg.

15 El grupo 4 (grupo inducido a la hiperlipidemia + grupo administrado con 8,96 nmol/kg de conjugado de SEQ ID NO: 23-Fc) se alimentó con una dieta rica en grasas para inducir la hiperlipidemia, y luego se administró con 8,96 nmol/kg de conjugado de SEQ ID NO: 23-Fc (preparado en el Ejemplo 3) una vez a la semana a una dosis de inyección de 5 ml/kg.

20 Se administró solución salina o el fármaco a cada grupo (n=6) durante 2 semanas, y luego se analizaron los efectos de estas sobre la reducción de los niveles de lípidos.

25 Ejemplo 5-2: Análisis del efecto del conjugado de derivado de oxintomodulina de acción prolongada sobre la reducción de los niveles de lípidos

Para examinar el efecto del conjugado de derivado de oxintomodulina de acción prolongada sobre una reducción de los niveles de lípidos en los hámsteres, se realizó el siguiente experimento.

30 Se recogió la sangre de los hámsteres a los que se les administró o no el derivado de oxintomodulina de acción prolongada como se describe en el Ejemplo 5-1, y se analizaron los niveles de lípidos en la sangre mediante el uso de HITACHI 7020. Los resultados del análisis se muestran en las Figuras de 1 a 5.

35 Las Figuras de 1 a 5 muestran el cambio en los niveles de triglicéridos en sangre (Figura 1), el cambio en los niveles de colesterol total en sangre (Figura 2), el cambio en los niveles de colesterol LDL (Figura 3), los niveles de colesterol HDL en sangre (Figura 4) y el cambio en la relación de colesterol HDL/LDL en sangre (Figura 5). Los resultados obtenidos se procesaron estadísticamente y se calcularon los valores medios y las desviaciones estándar de los valores medios. En la verificación de la significación entre los grupos (n=6), los datos se procesaron estadísticamente mediante el uso de la prueba de Dunnett de ANOVA unidireccional, y un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

40 Específicamente, en los resultados de la medición de los niveles de triglicéridos en sangre, se observó que, en el caso de los hámsteres alimentados con una dieta rica en grasas, los niveles de triglicéridos aumentaron significativamente, pero cuando el derivado de oxintomodulina de acción prolongada (conjugado de SEQ ID NO: 25-Fc o conjugado de SEQ ID NO: 23-Fc) se administró en los hámsteres, los niveles de triglicéridos disminuyeron significativamente (Figura 1).

45 En los resultados de la medición de los niveles de colesterol total en sangre, se observó que, en el caso de los hámsteres alimentados con una dieta rica en grasas, los niveles de colesterol total en sangre aumentaron significativamente, pero cuando el derivado de oxintomodulina de acción prolongada (conjugado de SEQ ID NO: 25-Fc o conjugado de SEQ ID NO: 23-Fc) se administró a los hámsteres, los niveles de colesterol total en sangre disminuyeron significativamente (Figura 2).

50 En los resultados de la medición de los niveles de colesterol LDL en sangre, se observó que, en el caso de los hámsteres alimentados con una dieta rica en grasas, los niveles de colesterol LDL en sangre aumentaron significativamente, pero cuando el derivado de oxintomodulina de acción prolongada (conjugado de SEQ ID NO: 25-Fc o conjugado de SEQ ID NO: 23-Fc) se administró a los hámsteres, los niveles de colesterol LDL en sangre disminuyeron significativamente (Figura 3).

55 En los resultados de la medición de los niveles de colesterol HDL en sangre, el grupo al que se le administró el conjugado de SEQ ID NO: 25-Fc o el conjugado de SEQ ID NO: 23-Fc mostró un aumento significativo de los niveles de colesterol HDL en sangre en comparación con el grupo de hámsteres con una dieta rica en grasas (Figura 4).

60 En los resultados de la medición de los niveles de colesterol HDL/LDL en sangre, el grupo al que se le administró el conjugado de SEQ ID NO: 25-Fc o el conjugado de SEQ ID NO: 23-Fc mostró un aumento significativo en la

relación de colesterol HDL/LDL en sangre en comparación con el grupo de hámsteres con una dieta rica en grasas (Figura 5).

A partir de los resultados anteriores, pudo observarse que el conjugado de derivado de oxintomodulina de la invención que comprende la región Fc de inmunoglobulina unida covalentemente al derivado de oxintomodulina por PEG previene la acumulación de los triglicéridos en sangre y el colesterol de baja densidad (LDL) y, por lo tanto, puede usarse eficazmente para el tratamiento de la hiperlipidemia o la enfermedad del hígado graso o la arteriosclerosis.

Ejemplo 6: Análisis de los efectos del análogo de GLP-1 de acción prolongada conocido y del conjugado de derivado de oxintomodulina de acción prolongada

VICTOZA® es un péptido similar al glucagón-1 de acción prolongada, análogo de GLP-1 que se comercializa actualmente como un agente para el tratamiento de la diabetes y se sabe que tiene los efectos de tratar la obesidad y el aumento de los niveles de colesterol HDL.

El efecto de reducir los niveles de lípidos se comparó entre el conjugado de derivado de oxintomodulina y el conocido VICTOZA®.

Como se describe en el Ejemplo 5, los hámsteres se dividieron en un grupo de hámsteres normal y los grupos de hámsteres alimentados con una dieta rica en grasas. El grupo de hámsteres normal se administró por vía subcutánea con 5 ml/kg de DPBS una o más veces por semana. Los grupos de hámsteres alimentados con una dieta rica en grasas se dividieron en un grupo administrado por vía subcutánea con 5 ml/kg de DPBS una o más veces por semana, un grupo administrado por vía subcutánea con 35,5 nmol/kg de VICTOZA® una o más veces por semana, un grupo administrado por vía subcutánea con 3,25 nmol/kg del conjugado de SEQ ID NO: 25-Fc, y un grupo administrado por vía subcutánea con 8,96 nmol/kg del conjugado de SEQ ID NO: 23-Fc, y se analizaron los niveles de lípidos en sangre de los grupos.

Como resultado, pudo observarse que la administración del conjugado de derivado de oxintomodulina de acción prolongada de la invención (conjugado de SEQ ID NO: 25-Fc o conjugado de SEQ ID NO: 23-Fc) mostró una disminución en los niveles de colesterol total en sangre (Figura 6) y una disminución del nivel de colesterol LDL en sangre (Figura 7) en comparación con la administración de VICTOZA® comercial.

Además, pudo observarse que la administración del conjugado de derivado de oxintomodulina de acción prolongada de la invención (conjugado de SEQ ID NO: 25-Fc o conjugado de SEQ ID NO: 23-Fc) mostró aumentos en los niveles de colesterol HDL en sangre y en la relación de colesterol HDL/LDL en comparación con la administración de VICTOZA® (Figuras 8 y 9). En particular, el conjugado de SEQ ID NO: 25-Fc de acción prolongada mostró aumentos significativos en los niveles de colesterol HDL en sangre y en la relación de colesterol HDL/LDL en comparación con VICTOZA®.

Además, la administración del conjugado de derivado de oxintomodulina de acción prolongada de la invención (conjugado de SEQ ID NO: 25-Fc o conjugado de SEQ ID NO: 23-Fc) mostró una disminución en los niveles de triglicéridos en sangre en comparación con la administración de VICTOZA®.

A partir de los resultados anteriores, puede observarse que el conjugado de derivado de oxintomodulina de acción prolongada de la presente invención exhibe un efecto de disminución de los lípidos que es igual o superior al del conocido VICTOZA® y, por lo tanto, el conjugado puede usarse eficazmente como un agente para tratar la hiperlipidemia, la enfermedad del hígado graso o la arteriosclerosis.

<110> HANMI PHARM. CO., LTD.

<120> Una composición para tratar la hiperlipidemia que comprende un derivado de oxintomodulina

<130> HAN15277PCTEPD1

<150> KR10-2012-0081475

<151> 2012-07-25

<160> 53

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 37

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> oxintomodulina

ES 2 842 881 T3

<400> 1

5 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
10 35

<210> 2

<211> 37

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> derivado de oxintomodulina

<220>

20 <221> VARIANTE

<222> (1)

<223> Xaa = 4-imidazoacetilo

<400> 2

25 Xaa 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
30 20 25 30
Arg Asn Asn Ile Ala
35

<210> 3

35 <211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> derivado de oxintomodulina

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1)

45 <223> Xaa = 4-imidazoacetilo

<400> 3

50 Xaa 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
55 35

<210> 4

<211> 39

<212> PRT

60 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> derivado de oxintomodulina

<220>

65

5 <221> VARIANTE
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoacetilo

<400> 4

10 Xaa 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

15 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 5
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> derivado de oxintomodulina

25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoacetilo

30 <400> 5

Xaa 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

40 <210> 6
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> derivado de oxintomodulina

<220>
 <221> VARIANTE

50 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoacetilo

<400> 6

55 Xaa 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

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

<210> 7
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> derivado de oxintomodulina

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoacetilo

10 <400> 7

Xaa	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		

15 <210> 8
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> derivado de oxintomodulina

25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoacetilo

30 <400> 8

Xaa	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							

35 <210> 9
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> derivado de oxintomodulina

45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoacetilo

50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (20)
 <223> Xaa = ácido alfa-metil-glutámico

55 <400> 9

Xaa	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												

60 <210> 10
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

65

5 <220>
<223> derivado de oxintomodulina

<220>
<221> VARIANTE
10 <222> (1)
<223> Xaa = 4-imidazoacetilo

<400> 10

15 Xaa 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

20 <210> 11
<211> 43
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> derivado de oxintomodulina

30 <220>
<221> VARIANTE
<222> (1)
<223> Xaa = 4-imidazoacetilo

<400> 11

35 Xaa 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

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

<210> 12
45 <211> 38
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> derivado de oxintomodulina

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1)
55 <223> Xaa = 4-imidazoacetilo

<400> 12

60 Xaa 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

65 <210> 13
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> derivado de oxintomodulina

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoacetilo

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (16)
 <223> Xaa = ácido alfa-metil-glutámico

20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (20)
 <223> Xaa = ácido alfa-metil-glutámico

<400> 13

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

30 <210> 14
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> derivado de oxintomodulina

40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoacetilo

45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (20)
 <223> Xaa = ácido alfa-metil-glutámico

50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (24)
 <223> Xaa = ácido alfa-metil-glutámico

<400> 14

55	Xaa	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		
60	Arg	Asn	Asn	Ile	Ala											
			35													

65 <210> 15
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> derivado de oxintomodulina

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)
 10 <223> Xaa = 4-imidazoacetilo

 <220>
 <221> VARIANTE
 15 <222> (24)
 <223> Xaa = ácido alfa-metil-glutámico

 <400> 15
 20 Xaa 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
 25 35

 <210> 16
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30

 <220>
 <223> derivado de oxintomodulina

 <220>
 35 <221> VARIANTE
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoacetilo

 <400> 16
 40 Xaa 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
 45 20 25 30
 Glu Lys

 <210> 17
 <211> 37
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> derivado de oxintomodulina
 55

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoacetilo
 60

 <400> 17

 Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 65 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

5 <210> 18
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> derivado de oxintomodulina

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoacetilo

20 <400> 18
 Xaa 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

25 <210> 19
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> derivado de oxintomodulina

35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoacetilo

40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (16), (20)
 <223> aminoácidos en la posición 16 y la posición 20 forman un anillo

45 <400> 19
 Xaa 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

55 <210> 20
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> derivado de oxintomodulina

65 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoacetilo

<220>
 <221> VARIANTE

5 <222> (16), (20)
 <223> aminoácidos en la posición 16 y la posición 20 forman un anillo

<400> 20

10 Xaa 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 Ser Lys
 35 40

15 <210> 21
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> derivado de oxintomodulina

<220>
 <221> VARIANTE

25 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoacetilo

<400> 21

30 Xaa 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 35

<210> 22
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> derivado de oxintomodulina

45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)
 <223> Xaa = desamino-histidilo.

50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (16), (20)
 <223> aminoácidos en la posición 16 y la posición 20 forman un anillo

55 <400> 22

60 Xaa 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

65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> derivado de oxintomodulina

5
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)
 <223> Xaa = ácido aminoisobutírico
 <400> 23

10
 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

15
 <210> 24
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> derivado de oxintomodulina
 <220>
 <221> VARIANTE

25
 <222> (2)
 <223> Xaa = ácido aminoisobutírico
 <400> 24

30
 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

35
 <210> 25
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> derivado de oxintomodulina
 <220>
 <221> VARIANTE

45
 <222> (2)
 <223> Xaa = ácido aminoisobutírico
 <220>
 <221> VARIANTE

50
 <222> (16), (20)
 <223> aminoácidos en la posición 16 y la posición 20 forman un anillo
 <400> 25

55
 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

60
 <210> 26
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

65
 <220>
 <223> derivado de oxintomodulina

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)
 <223> Xaa = ácido aminoisobutírico

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (12), (16)
 <223> aminoácidos en la posición 12 y la posición 16 forman un anillo

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

20 <210> 27
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> derivado de oxintomodulina
 <220>
 <221> VARIANTE

30 <222> (2)
 <223> Xaa = ácido aminoisobutírico

35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (16), (20)
 <223> aminoácidos en la posición 16 y la posición 20 forman un anillo

40 <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

45 <210> 28
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> derivado de oxintomodulina

55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)
 <223> Xaa = ácido aminoisobutírico

60 <400> 28
 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

65 <210> 29
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> derivado de oxintomodulina

 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)
 10 <223> Xaa = d-serina.

 <400> 29

 His Xaa 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
 20 <210> 30
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> derivado de oxintomodulina

 <220>
 <221> VARIANTE
 30 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoacetilo

 <400> 30

 Xaa 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
 40 <210> 31
 <211> 37
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> derivado de oxintomodulina

 50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoacetilo

 55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)
 <223> Xaa = d-serina.

 60 <400> 31

 Xaa Xaa 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
 65

5 <210> 32
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> derivado de oxintomodulina

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)
 <223> Xaa = 4-imidazoacetilo

20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)
 <223> Xaa = ácido aminoisobutírico

<400> 32

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

30 <210> 33
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> derivado de oxintomodulina

40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2)
 <223> Xaa = ácido aminoisobutírico

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

50 <210> 34
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> derivado de oxintomodulina

60 <220>
 <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	
65	Lys	Arg	Ala	Lys	Glu	Phe	Val	Gln	Trp	Leu	Met	Asn	Thr	Cys		
				20					25					30		

5 210> 35
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> grupo R2
<400> 35

15 Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala
1 5
<210> 36
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> grupo R2
<400> 36

25 Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
1 5 10
<210> 37
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> grupo R2
<400> 37

35 Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys
1 5 10
<210> 38
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> grupo R2
<400> 38

50 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

55 <220>
<223> grupo R2
<400> 39

60 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

65

<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> grupo R2

<400> 40

10 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

15 <210> 41
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> grupo A o B

<400> 41

25 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

30 <210> 42
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> grupo A o B

<400> 42

40 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

45 <210> 43
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> grupo A o B

<400> 43

55 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

60 <210> 44
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> grupo A o B

<400> 44

ES 2 842 881 T3

5 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

15 <220>
<223> grupo A o B

<400> 45

20 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

25 <210> 46
<211> 26
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> grupo A o B

<400> 46

35 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
20 25

40 <210> 47
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> grupo A o B

<400> 47

50 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

55 <210> 48
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> grupo B

<400> 48

65 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

5 <210> 49
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> grupo B
 <400> 49

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

20 <210> 50
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> cebador
 <400> 50
 cccggccccc gcggccgcta ttcgaaatac 30

30 <210> 51
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> cebador
 <400> 51
 gaacggtccg gaggacgtcg actcttaaga tag 33

40 <210> 52
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> cebador
 <400> 52
 cagcgacacc gaccgtcccc ccgtacttaa ggcc 34

50 <210> 53
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> cebador
 <400> 53
 ctaaccgact ctcggggaag actgagctcg cc 32

60

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición para su uso en la prevención o el tratamiento de la hiperlipidemia, la enfermedad del hígado graso o la arteriosclerosis, que comprende un conjugado de derivado de oxintomodulina como ingrediente activo, en donde el conjugado de derivado de oxintomodulina comprende:

un derivado de oxintomodulina que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 24, 25 o 26; una región Fc de inmunoglobulina; y

10 un polímero no peptídico, en donde el polímero no peptídico une el derivado de oxintomodulina y la región Fc de inmunoglobulina.
- 15 2. Un conjugado de derivado de oxintomodulina que comprende:

un derivado de oxintomodulina que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 24, 25 o 26; una región Fc de inmunoglobulina; y

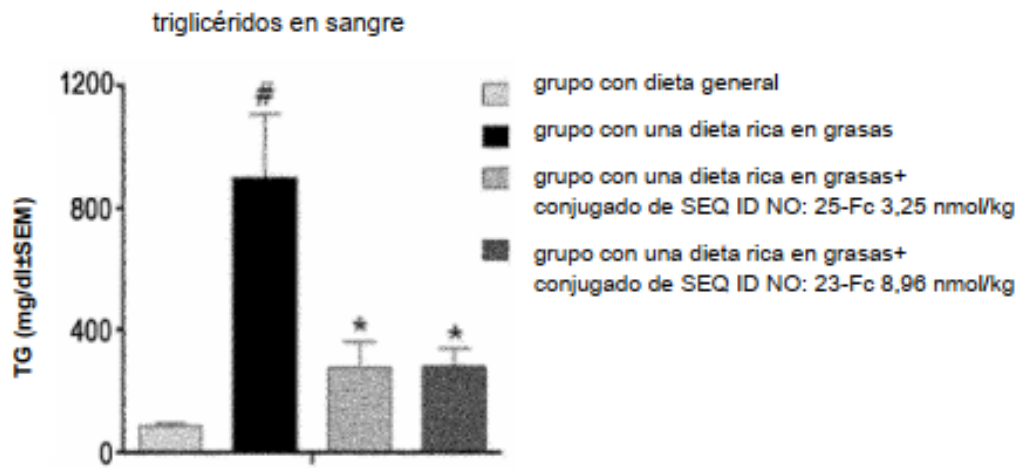
un polímero no peptídico, en donde el polímero no peptídico une el derivado de oxintomodulina y la región Fc de inmunoglobulina,

20 para su uso en la prevención o el tratamiento de la hiperlipidemia, la enfermedad del hígado graso o la arteriosclerosis.
- 25 3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, o el conjugado de derivado de oxintomodulina para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el derivado de oxintomodulina comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24.
- 30 4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, o el conjugado de derivado de oxintomodulina para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la lisina en la posición 12 y el ácido glutámico en la posición 16, o el ácido glutámico en la posición 16 y la lisina en la posición 20 del derivado de oxintomodulina forman un anillo.
- 35 5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, o el conjugado de derivado de oxintomodulina para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el derivado de oxintomodulina comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25.
- 40 6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, o el conjugado de derivado de oxintomodulina para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el derivado de oxintomodulina comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26.
- 45 7. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-6, o el conjugado de derivado de oxintomodulina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 2 a 6, en donde el polímero no peptídico se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol, un copolímero de etilenglicol/propilenglicol, poliol polioxietilado, alcohol polivinílico, un polisacárido, éter polivinilético, PLA (ácido poliláctico), PLGA (ácido poliláctico-glicólico), un polímero lipídico, ácido hialurónico o una combinación de estos.
- 50 8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, o el conjugado de derivado de oxintomodulina para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el polímero no peptídico es el polietilenglicol.
- 55 9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, o el conjugado de derivado de oxintomodulina para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el polisacárido es el dextrano, una quitina o una combinación de estos.
- 60 10. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-9, o el conjugado de derivado de oxintomodulina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-9, en donde un extremo del polímero no peptídico y el otro se unen a un grupo amina o un grupo tiol de la región Fc de inmunoglobulina y el derivado de oxintomodulina, respectivamente.
- 65 11. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-10, o el conjugado de derivado de oxintomodulina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-10, en combinación con un agente farmacéutico que muestra efectos preventivos o terapéuticos contra la hiperlipidemia, la enfermedad del hígado graso o la arteriosclerosis.
12. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-11, o el conjugado de derivado de oxintomodulina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-11, en donde la enfermedad del hígado graso es la enfermedad del hígado graso no alcohólico, la enfermedad del hígado

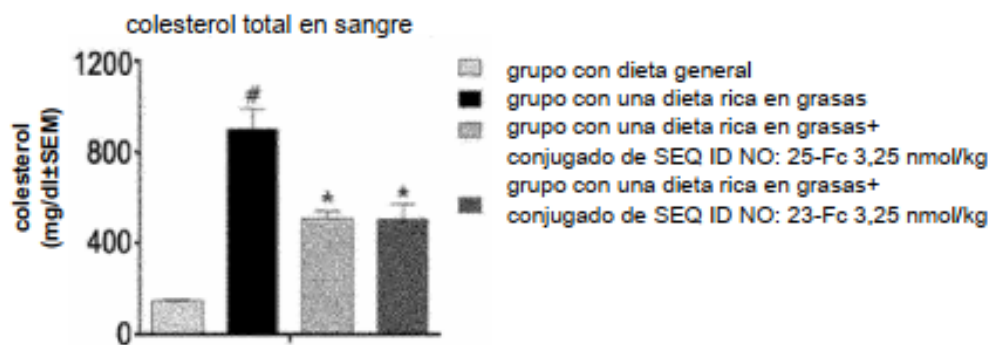
graso alcohólico, la enfermedad del hígado graso nutricional, la enfermedad del hígado graso por inanición o la esteatohepatitis.

- 5 13. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, o el conjugado de derivado de oxintomodulina para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la enfermedad del hígado graso no alcohólico es la esteatosis simple, la esteatohepatitis no alcohólica, la fibrosis hepática o la cirrosis hepática.
- 10 14. La composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 13, o el conjugado de derivado de oxintomodulina para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 2 a 13, en donde el polímero no peptídico une covalentemente el derivado de oxintomodulina y la región Fc de inmunoglobulina.

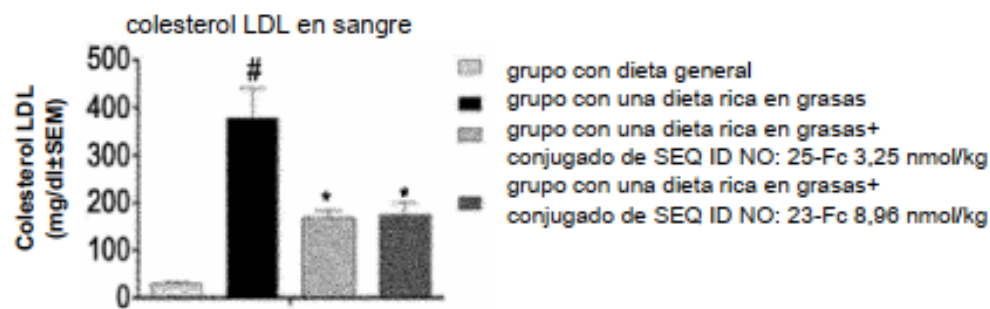
[Figura 1]



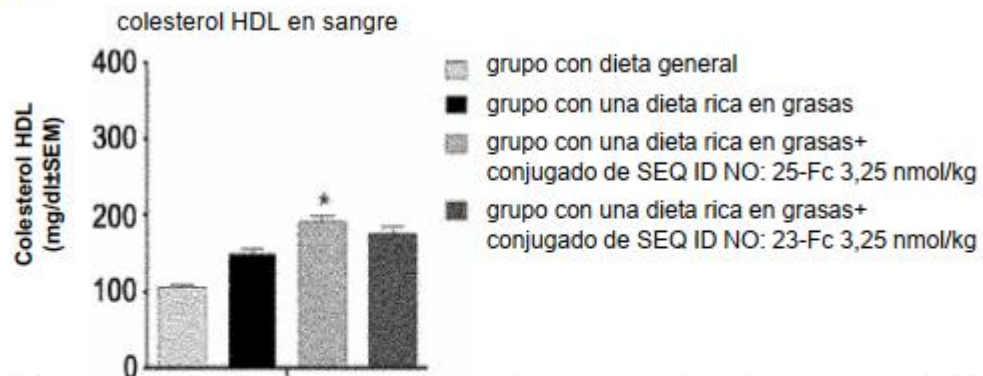
[Figura 2]



[Figura 3]

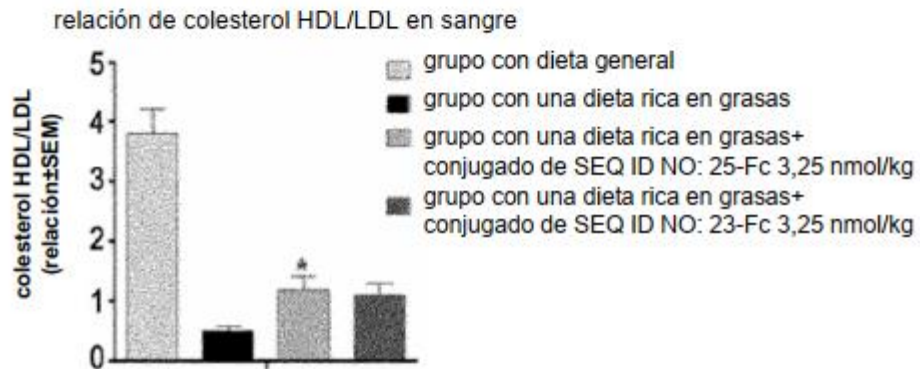


[Figura 4]



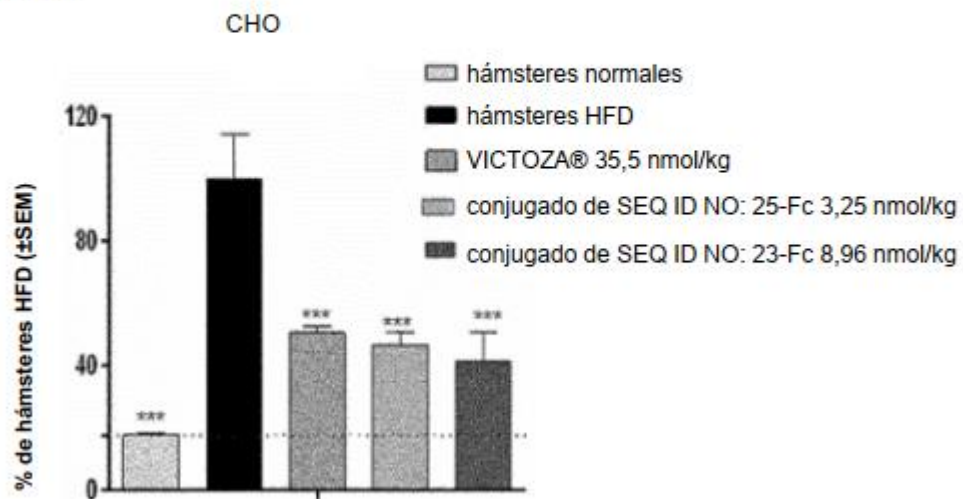
*: disminución significativa en comparación con el grupo con una dieta rica en grasas ($p < 0,01$)

[Figura 5]



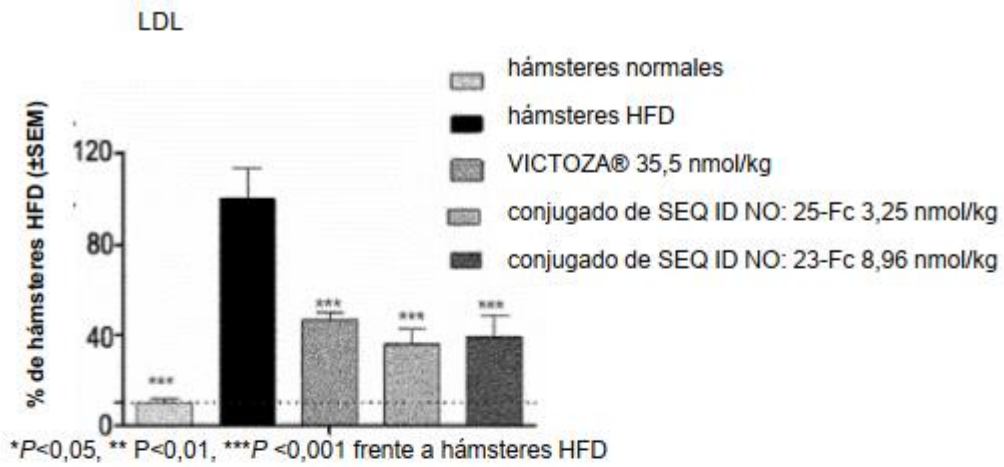
*: disminución significativa en comparación con el grupo con una dieta rica en grasas ($p < 0,05$)

[Figura 6]

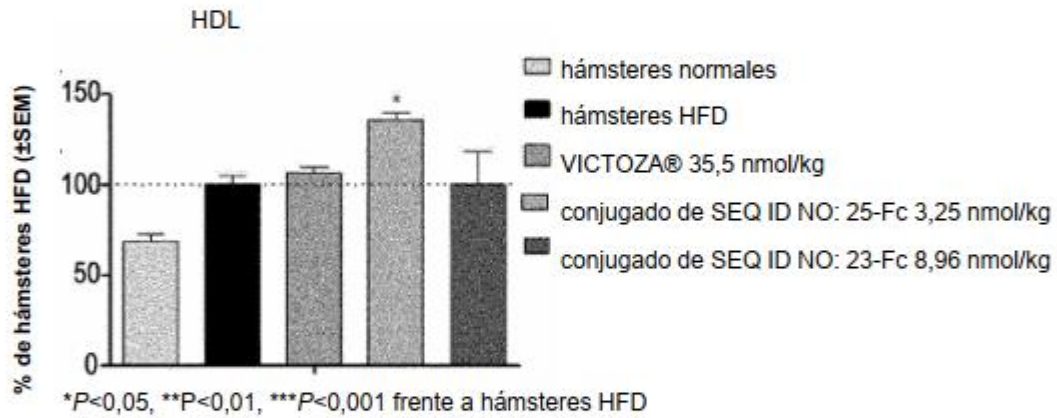


* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ frente a hámsteres HFD

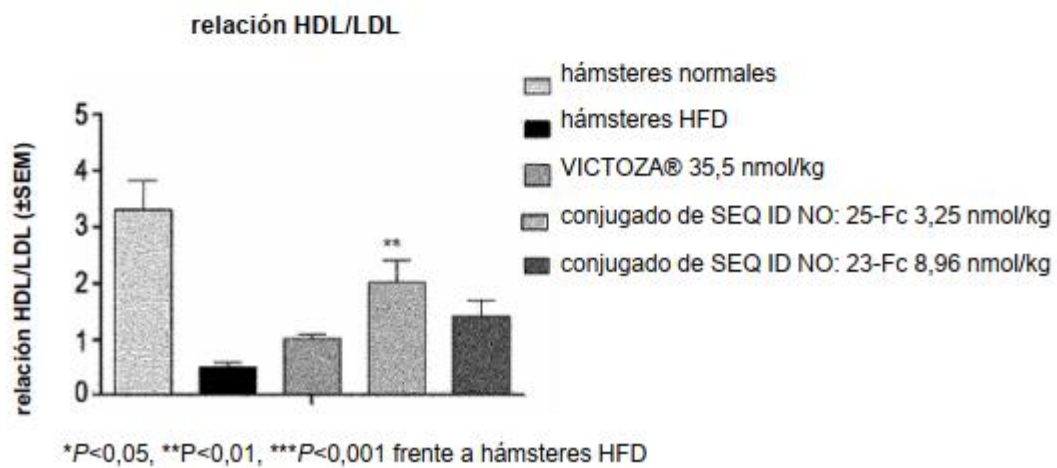
[Figura 7]



[Figura 8]



[Figura 9]



[Figura 10]

