

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 796**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 14/62 (2006.01)
A61K 38/30 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)
C07K 14/605 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2011 E 11711424 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016 EP 2552471**

54 Título: **Nuevos péptidos y procedimientos para su preparación y uso**

30 Prioridad:

26.03.2010 US 317850 P

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

04.05.2016

73 Titular/es:

ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US

72 Inventor/es:

ALSINA-FERNANDEZ, JORGE;
BOKVIST, KRISTER BENGT;
GUO, LILI y
MAYER, JOHN PHILIP

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 568 796 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

Nuevos péptidos y procedimientos para su preparación y uso

La presente invención está en el campo del tratamiento de la diabetes y se relaciona con péptidos que presentan actividad tanto para el receptor del péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP-R, de *glucose-dependent insulinotropic peptide receptor*) como para el receptor del péptido 1 similar al glucagón (GLP-1-R, de *glucagon-like peptide-1 receptor*) y son selectivos sobre el receptor del glucagón (Gluc-R). Se proporcionan de forma específica análogos de GIP con sustituciones de aminoácidos introducidas para modular la actividad tanto para GIP-R como para GLP-1-R y mantener la selectividad sobre Gluc-R.

GIP, conocido como péptido inhibidor gástrico y como péptido insulínico dependiente de glucosa, es un péptido regulador gastrointestinal de 42 aminoácidos que se ha demostrado que estimula la secreción de insulina a partir de las células beta pancreáticas en presencia de glucosa, jugando así un papel fisiológico en la homeostasis de la glucosa. GLP-1 es un péptido de 37 aminoácidos que protege las células beta pancreáticas e inhibe la secreción de glucagón, el vaciamiento gástrico y la ingesta de alimento, lo que conduce a una pérdida de peso. GIP y GLP-1 se conocen como incretinas. La señalización del receptor de incretina ejerce una acción fisiológicamente relevante, crítica para la homeostasis de la glucosa. el glucagón es un péptido de 29 aminoácidos que está producido por el páncreas. Esta hormona señala el hígado para liberar glucosa, lo cual da como resultado un aumento de la glucosa sanguínea. Por lo tanto, la estimulación de Gluc-R es indeseable en un escenario de diabetes.

A diferencia de lo que se observa en los sujetos sanos, Individualmente, GIP tiene un efecto reductor de la glucosa muy escaso en los seres humanos diabéticos de tipo 2. Sin embargo, después de lograr cierta reducción de la glucosa, la eficacia de GIP aumenta y llega a ser cercana a la observada en un sujeto normoglucémico. Por otra parte, GLP-1 es eficaz en la reducción de la glucosa tanto en sujetos sanos como diabéticos, pero provoca náuseas y, por lo tanto, la eficacia total de GLP-1 puede no alcanzarse nunca. Además, tanto GIP como GLP-1 se inactivan rápidamente por la proteasa ubicua dipeptidil peptidasa IV (DPP IV), que produce péptidos que son incapaces de estimular la secreción de insulina y, por tanto, sólo pueden usarse para el control metabólico a corto plazo.

Ciertos análogos de GIP se han descrito en los documentos WO 2010/016940 y WO 2010/016944. Se ha descrito que ciertos análogos de glucagón presentan actividad tanto de GIP como de GLP-1 en el documento WO 2010/011439.

El tratamiento actual para la diabetes incluye secretagogos de insulina, tales como sulfonilureas y glitinidas, que suelen presentar una reducción progresiva de la eficacia y pueden causar hipoglucemia en pacientes con diabetes de tipo 2. Como tal, hay una necesidad de identificar nuevos agentes que potencien la secreción de insulina de una manera sostenida dependiente de glucosa. También es deseable identificar nuevos agentes que posean los efectos reductores de glucosa de GLP-1 sin las náuseas, y de identificar además nuevos agentes que tengan mayor estabilidad metabólica.

La presente invención proporciona nuevos péptidos potentes y eficaces con sustituciones de aminoácidos introducidas para modular la actividad tanto para GIP como para GLP-1 al tiempo que mantienen la selectividad sobre el glucagón. Esta invención logra los efectos reductores de glucosa de GLP-1 y emplea los efectos de secreción de insulina estimulada por glucosa de GIP. Además, ciertos compuestos de la invención proporcionan tratamientos eficaces para reducir el peso corporal.

La presente invención proporciona un péptido que consiste en la secuencia:

```

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-
      5                                10
Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Arg-Ala-Xaa1-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-
15                                20                                25
Aib-Lys-Gly-Lys-Lys-Gln-Glu-Trp-Lys-His-Gln-Ile-Thr-Gln-
      30                                35                                40
Xaa2-Xaa3 (SEQ ID NO:1)

```

en la que Xaa¹ en la posición 22 es Nal o Phe; Xaa² en la posición 43 es Cys o está ausente; Xaa³ en la posición 44 es Cys o está ausente; el aminoácido C-terminal está opcionalmente amidado; y a condición de que Xaa² en la posición 43 o Xaa³ en la posición 44 sea Cys, entonces, cada uno de ellos o ambos están opcionalmente PEGilados.

Una realización de la presente invención se relaciona con péptidos en los que Xaa¹ es Phe. Una realización preferida de la presente invención se relaciona con péptidos en los que Xaa¹ es Nal.

Una realización de la presente invención se relaciona con péptidos en los que Xaa² y Xaa³ están ausentes. Una realización preferida de la presente invención se relaciona con péptidos en los que Xaa² y Xaa³ son cada uno Cys. En dicha realización, se prefiere que el grupo carboxilo de la Cys en posición 44 esté amidado.

- 5 Una realización preferida más de la presente invención se relaciona con péptidos en los que el péptido está PEGilado en cualquiera de las Cys en las posiciones 43 y 44 con una molécula de PEG de 20 kDa. En dicha realización, se prefiere que el grupo carboxilo de la Cys C-terminal esté amidado. Otra realización preferida de la presente invención se relaciona con péptidos en los que el péptido está PEGilado en ambas Cys en las posiciones 43 y 44 con una molécula de PEG de 20 kDa. En dicha realización, se prefiere que el grupo carboxilo de la Cys C-terminal esté amidado.
- 10 Una realización de la presente invención se relaciona con péptidos en los que Xaa¹ es Phe. y Xaa² y Xaa³ están ausentes. En dicha realización, se prefiere que el grupo carboxilo de la Gln C-terminal en la posición 42 esté amidado. Una realización preferida de la presente invención se relaciona con péptidos en los que Xaa¹ es Nal. y Xaa² y Xaa³ están ausentes. En dicha realización, se prefiere que el grupo carboxilo de la Gln C-terminal en la posición 42 esté amidado.
- 15 Una realización más preferida de la presente invención se relaciona con péptidos en los que Xaa¹ es Phe; Xaa² y Xaa³ son ambos Cys y ambos están opcionalmente PEGilados y el grupo carboxilo de la Cys en la posición 44 está opcionalmente amidado. Una realización especialmente preferida de la presente invención se relaciona con péptidos en los que Xaa¹ es Nal. Xaa² y Xaa³ son Cys y cualquiera de ellos o ambos están opcionalmente PEGilados y el grupo carboxilo de la Cys en la posición 44 está opcionalmente amidado.
- 20 Una realización especialmente preferida de la presente invención es

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-
Lys-Ile-Ala-Gln-Arg-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Aib-Lys-
Gly-Lys-Lys-Gln-Glu-Trp-Lys-His-Gln-Ile-Thr-Gln-Cys (PEG20K) -
Cys (PEG20K) (SEQ ID NO: 2)

y la Cys en la posición 44 está amidada. A este péptido se hace referencia como Aib², Aib¹³, Nal²², Aib²⁹, Cys⁴³(PEG20K), Cys⁴⁴(PEG20K)-GIP.

Una realización muy preferida de la presente invención es

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-Asp-
Lys-Ile-Ala-Gln-Arg-Ala-Nal-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-Aib-Lys-
Gly-Lys-Lys-Gln-Glu-Trp-Lys-His-Gln-Ile-Thr-Gln-Cys (PEG20K) -
Cys (PEG20K) (SEQ ID NO: 3)

- 25 y la Cys en la posición 44 está amidada. A este péptido se hace referencia como Aib², Aib¹³, Nal²², Aib²⁹, Cys⁴³(PEG20K), Cys⁴⁴(PEG20K)-GIP.

- 30 La presente invención también proporciona un procedimiento para tratar la diabetes mellitus en un paciente, que comprende la administración a un paciente con necesidad de dicho tratamiento de una cantidad eficaz de un péptido de la invención. La presente invención proporciona además un procedimiento para tratar la diabetes mellitus no insulino dependiente en un paciente, que comprende la administración a un paciente con necesidad de dicho tratamiento de una cantidad eficaz de un péptido de la invención. La presente invención proporciona además un procedimiento para tratar la diabetes mellitus insulino dependiente en un paciente, que comprende la administración a un paciente con necesidad de dicho tratamiento de una cantidad eficaz de un péptido de la invención.
- 35 Además, la presente invención también proporciona un método para tratar una afección seleccionada de entre el grupo que consiste en obesidad, síndrome metabólico, arteriopatía coronaria, y aterosclerosis mediante la administración a un paciente con necesidad de dicho tratamiento de una cantidad eficaz de un péptido de la invención. Además, la presente invención también proporciona un procedimiento para inducir pérdida de peso mediante la administración a un paciente con necesidad de dicho tratamiento de una cantidad eficaz de un péptido de la invención.
- 40 La presente invención también proporciona un procedimiento para tratar la fragilidad o aumentar la resistencia ósea mediante la administración a un paciente con necesidad de dicho tratamiento de una cantidad eficaz de un péptido de la invención.

- 45 Además, esta invención proporciona un péptido de la invención para su uso en terapia. En una realización particular, la invención proporciona un péptido de la invención para su uso para el tratamiento de la diabetes mellitus. Esta invención proporciona un péptido de la invención para su uso para el tratamiento de la diabetes mellitus no insulino

dependiente. Esta invención proporciona un péptido de la invención para su uso para el tratamiento de la diabetes mellitus insulino dependiente. Asimismo, esta invención proporciona un péptido de la invención para su uso para el tratamiento de la obesidad. De forma adicional, esta invención proporciona un péptido de la invención para su uso para el tratamiento de una afección seleccionada de entre el grupo que consiste en obesidad, síndrome metabólico, arteriopatía coronaria, y aterosclerosis. Esta invención proporciona además un péptido de la invención para su uso para inducir pérdida de peso. Asimismo, esta invención proporciona un péptido de la invención para su uso para el tratamiento de la fragilidad o para incrementar la resistencia ósea.

Esta invención también proporciona el uso de un péptido de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes mellitus. Esta invención también proporciona el uso de un péptido de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la obesidad. Esta invención proporciona además el uso de un péptido descrito anteriormente para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección seleccionada de entre el grupo que consiste en síndrome metabólico, arteriopatía coronaria, y aterosclerosis. Esta invención proporciona además el uso de un péptido de la invención para la fabricación de un medicamento para la inducción de pérdida de peso. Esta invención también proporciona el uso de un péptido de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la fragilidad o el incremento de la resistencia ósea.

De forma adicional, esta invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende un péptido de la invención con un vehículo, diluyente, o excipiente farmacéuticamente aceptable. Además, esta invención proporciona una formulación farmacéutica adaptada para el tratamiento de la diabetes mellitus. Esta invención proporciona una formulación farmacéutica adaptada para el tratamiento de la diabetes mellitus no insulino dependiente. Esta invención proporciona una formulación farmacéutica adaptada para el tratamiento de la diabetes mellitus insulino dependiente. Además, esta invención proporciona una formulación farmacéutica adaptada para el tratamiento de la obesidad. Esta invención proporciona una formulación farmacéutica adaptada para el tratamiento de una afección seleccionada de entre el grupo que consiste en síndrome metabólico, arteriopatía coronaria, y aterosclerosis. Esta invención proporciona una formulación farmacéutica adaptada para la inducción de la pérdida de peso. Esta invención proporciona además una formulación farmacéutica adaptada para el tratamiento de la fragilidad o el incremento de la resistencia ósea. En una realización particular, la composición comprende además uno o más de otros agentes terapéuticos.

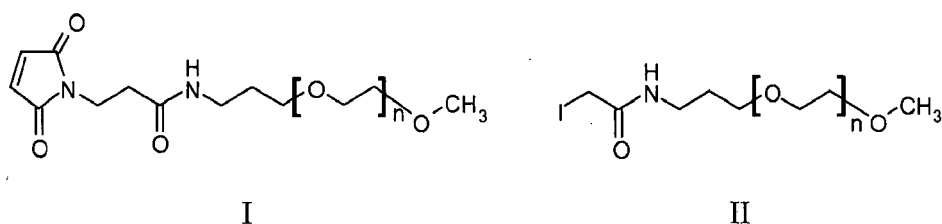
Esta invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un péptido de la invención junto con uno o más vehículos, diluyentes, o excipientes farmacéuticamente aceptables. En una realización particular, la composición comprende además uno o más de otros agentes terapéuticos.

La presente invención proporciona también moléculas estables que están menos predisuestas a la desactivación metabólica rápida por DPP IV

Las secuencias de la presente invención contienen los códigos de aminoácidos convencionales de una sola letra o de tres letras para los veinte aminoácidos que aparecen de forma natural. Los otros códigos de aminoácidos usados se definen de la forma siguiente: Aib = ácido alfa aminoisobutírico; Nal = 1-naftilalanina.

La expresión "aminoácido C-terminal" se refiere al último aminoácido de la secuencia de un péptido que contiene un grupo carboxilo libre. El aminoácido C-terminal de la presente invención puede ser Gln en la posición 42, Cys en la posición 43, o Cys en la posición 44.

El término "polietilenglicol" o "PEG" se refiere a un compuesto de polialquilenglicol o un derivado del mismo, con o sin agentes acoplantes o derivación con residuos acoplantes o activadores. En su forma típica, PEG es un polímero lineal con grupos hidroxilo terminales y tiene la fórmula $\text{HO}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$, en la que n es desde alrededor de 8 a 4000. mPEG es monometoxipolietilenglicol. Como los PEG se generan y se usan típicamente como mezclas de compuestos de PEG que varían en cierto grado en cuanto a su peso molecular, un experto habitual en la técnica describe de forma general el peso molecular de un PEG unido a un compuesto mediante la descripción del peso molecular medio del reactivo PEG usado en la reacción de PEGilación que generó el compuesto PEGilado concreto. En la técnica existen numerosos derivados de PEG. Las moléculas PEG unidas de forma covalente a los péptidos de la presente invención pueden ser de 10.000 Dalton, 20.000 Dalton, 30.000 Dalton o 40.000 Dalton. La media de las moléculas PEG es preferentemente de 18.000 a 22.000 Dalton. Más preferentemente, la media es de 19.000 a 21.000 Dalton. Lo más preferentemente, la media es de 20.000 a 21.000 Dalton. Las moléculas PEG pueden ser lineales o ramificadas y pueden estar presentes de forma individual o tándem. Los péptidos PEGilados de la presente invención tienen preferentemente moléculas PEG lineales en tándem unidas al extremo carboxilo del péptido. En particular, las moléculas PEG se unen preferentemente a los dos restos de cisteína del extremo C-terminal del péptido mediante una mPEG maleimida de 20kDa (mPEG MAL) (I) o una mPEG yodoacetamida de 20kDa (II) en la que n es de 10 a 2500. Preferentemente, n es de 350 a 600. Más preferentemente, n es de 425 a 475.



El término "PEGilación", tal como se usa en el presente documento, significa la unión covalente de una o más moléculas PEG como se describe previamente, a los péptidos de la presente invención. Por ejemplo, un péptido de la presente invención está PEGilado en las Cys de las posiciones 43 y 44 con una molécula PEG de 20 kDa unida de forma covalente a cada Cys.

En el presente documento se usan las siguientes abreviaturas: "t-Bu" se refiere a *tert*-butilo; "fmoc" se refiere a fluorenilmetiloxycarbonilo; "Pbf" se refiere a 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo; "Trt" se refiere a tritilo or trifenilmetilo; "OtBu" se refiere a *tert*-butoxilo; "Boc" se refiere a *tert*-butoxicarbonilo; "PiBOP" se refiere a hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio ; "DIEA" se refiere a diisopropiletilamina; "HEK" se refiere a riñón embrionario humano (*human embryonic kidney*); "Tris" se refiere a 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol; "BSA" se refiere a seroalbúmina bovina (*bovine serum albumin*); "HEPES" se refiere a ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etanosulfónico; "PBS" se refiere a solución salina tamponada con fosfato (*phosphate buffered saline*); "UNS" se refiere a unión no específica; "HBSS" se refiere a solución salina tamponada con Hank (*Hank's buffered salt solution*); "IBMX" se refiere a 1-metil-3-(2-metilpropil)-7H-purin-2,6-diona; y "DMSO" se refiere a dimetil sulfoxido.

Síntesis de péptidos

Todos los péptidos de la presente invención se han generado mediante síntesis de péptidos en fase sólida en un sintetizador de péptidos automático Protein Technologies Inc. Symphony®. La síntesis se lleva a cabo sobre una resina de poliestireno Fmoc-Rink amida (Rapp Polymere Tubingen, Alemania) con sustitución de aproximadamente 0,7 mmol/g. La síntesis se lleva a cabo usando síntesis de péptido en fase sólida Fmoc/t-Bu. Los derivados de la cadena lateral de aminoácidos usados son: Arg(Pbf), Asp(OtBu), Cys(Trt), Gln(Trt), Glu(OtBu), His(Trt), Lys(Boc), Ser(tBu), Thr(tBu), Trp(Boc) y Tyr(tBu). El acoplamiento se lleva a cabo con aproximadamente 6 equivalentes de aminoácido activados con diisopropilcarbodiimida (DIC) e hidroxibenzotriazol (HOBt) (proporción molar 1:1:1 molar) en dimetilformamida (DMF) durante 90 minutos a temperatura ambiente. Se usaron las siguientes condiciones para el acoplamiento del Fmoc-(1-Nal)-OH en la posición 22: Fmoc-(1-Nal)-OH (3 equiv), PyBOP (3 equiv), y DIEA (6 equiv) en DMF durante 3 h a temperatura ambiente. Se usaron las siguientes condiciones para el acoplamiento del Fmoc-Ile-OH en la posición 12: Fmoc-Ile-OH (6 equiv), PyBOP (6 equiv), y DIEA (12 equiv) en DMF durante 10 h a temperatura ambiente.

La escisión simultánea de la resina y la eliminación del grupo protector de la cadena lateral se llevan a cabo en una solución que contiene ácido trifluoroacético (TFA): triisopropilsilano: 1,2-etanoditiol: metanol: tianisol 90:4:2:2:2 (v/v) durante 2 h a temperatura ambiente. La solución se filtra y los péptidos se precipitan con dietiléter frío, se redisuelven en 30-40 ml de acetonitrilo al 10 % en agua, y se purifican en una columna C₁₈ de HPLC de fase reversa (típicamente una Waters SymmetryPrep™ de 7 mm, 19 x 300 mm) a un caudal de 18 ml/min. Las muestras se eluyen con un gradiente lineal AB de dos etapas, de 0 a 18 % de B durante 5 min seguida de 18 a 45 % de B durante 110 minutos en el que A = TFA 0,05%/agua y B = TFA 0,05%/acetonitrilo. El producto se eluye generalmente con acetonitrilo al 28-35 %. La pureza y el peso molecular del péptido se confirman en un sistema Agilent 1100 Serie LC-MS con un detector individual cuadrupolar de EM. La separación analítica por HPLC se efectúa en una columna Zorbax® Eclipse™ XDB-C8, 5 µm, 4,6 mm d.i. x 15 cm con un gradiente lineal AB de 6 a 60 % de B durante 15 minutos en el que A = TFA 0,05 % /H₂O y B = TFA 0,05 % /acetonitrilo y el caudal es de 1 ml/min. Todos los péptidos se purifican a una pureza > 95 % y se confirma que tienen un peso molecular que corresponde con el valor calculado dentro de 1 uma.

Ejemplo 1

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-
5 10
Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Arg-Ala-Nal-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-
15 20 25
Aib-Lys-Gly-Lys-Lys-Gln-Glu-Trp-Lys-His-Gln-Ile-Thr-Gln
30 35 40
(SEQ ID NO: 4)

Ejemplo 2

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-
5 10
Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Arg-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-
15 20 25
Aib-Lys-Gly-Lys-Lys-Gln-Glu-Trp-Lys-His-Gln-Ile-Thr-Gln
30 35 40
(SEQ ID NO: 5)

Intermediario 1

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-
5 10
Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Arg-Ala-Nal-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-
15 20 25
Aib-Lys-Gly-Lys-Lys-Gln-Glu-Trp-Lys-His-Gln-Ile-Thr-Gln-Cys-
30 35 40
Cys
(SEQ ID NO: 6)

5 Intermediario 2

```

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-
      5                                10
Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Arg-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-
15                                20                                25
Aib-Lys-Gly-Lys-Lys-Gln-Glu-Trp-Lys-His-Gln-Ile-Thr-Gln-Cys-
      30                                35                                40
Cys
(SEQ ID NO: 7)

```

PEGilación de péptido con mPEG-MAL de 20 kDa

El péptido liofilizado se pesa (típicamente 30-50 mg). Se pesa un equivalente molar de 2,1 veces de mPEG maleimida de 20kDa ($\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_3\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2(\text{NOF SUNBRIGHT ME-200MA})$) (mPEG MAL) y se combina con el péptido. Los reactantes se disuelven en una mezcla de agua/acetonitrilo 50/50 (v/v) a una concentración de péptido de aproximadamente 20 mg/ml. La solución de péptido se diluye dos veces con acetato amónico 100 mM, EDTA 10 mM, pH 7. La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se controla mediante HPLC analítico de fase reversa (la separación analítica por HPLC se efectúa en una columna Waters SymmetryShield™ C18, 3,5 μM , 4,6 mm d.i. x 10 cm a 60 °C con un gradiente lineal AB de dos etapas de 0 a 30 % de B durante 5 minutos y de 30 a 90 % de B durante los siguientes 30 min en el que A = TFA 0,05 % / H_2O y B = TFA 0,05% /acetonitrilo y el caudal es de 1 ml/min.), y, típicamente, después de un tiempo de reacción de 1-2 h, muestra una desaparición del pico del péptido casi completa. Aparecen dos picos debidos al péptido mono y diPEGilado, constituyendo típicamente el péptido diPEGilado el 90-95 % del área total del pico.

Después, la muestra se diluye típicamente hasta alrededor de 40 ml con agua acidificada (TFA 0,05%/agua) y se purifica mediante una columna C_{18} de HPLC de fase reversa (típicamente una Waters SymmetryPrep™ 7 μM , 19 x 300 mm) a un caudal de 10 ml/min con un gradiente lineal AB de dos etapas, de 0 a 25 % de B durante 15 min seguida de 25 a 55 % de B durante 100 min en el que A = TFA 0,05 %/agua y B = TFA 0,05 % /acetonitrilo. El producto se eluye generalmente con acetonitrilo al 35-40 %. El péptido purificado se cuantifica mediante la absorbancia UV a 280 nm usando un coeficiente de extinción molar calculado sobre la base de la secuencia del péptido. El rendimiento tras la purificación está típicamente alrededor del 70 % sobre la base de la cantidad de péptido de partida.

Ejemplo 3

Aib², Aib¹³, Aib²⁹, Cys⁴³(PEG20K), Cys⁴⁴(PEG20K)-GIP

Ejemplo 4

Aib², Aib¹³, NaI²², Aib²⁹, Cys⁴³(PEG20K), Cys⁴⁴(PEG20K)-GIP

- 5 Los péptidos del ejemplo 3 y el ejemplo 4 se han PEGilado usando mPEG-MAL.

PEGilación de péptido con mPEG-yodoacetamida de 20 kDa

El péptido liofilizado se pesa (típicamente 30-50 mg). Se pesa un equivalente molar de 2,1 veces de mPEG yodoacetamida de 20kDa ($\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_2\text{-I}$) (NOF SUNBRIGHT ME-200IA) y se combina con el péptido. Los reactantes se disuelven en una solución acuosa tamponada de pH 8,5 (tampón de ácido bórico, cloruro potásico, hidróxido sódico 0,1 M + EDTA 10 mM) + acetonitrilo 20 % (v/v) a una concentración de péptido de aproximadamente 10 mg/ml. Después, la mezcla resultante se agita a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se controla mediante HPLC analítico de fase reversa (la separación analítica por HPLC se efectúa en una columna Waters SymmetryShield™ C18, 3,5 micras, 4,6 mm d.i. x 10 cm a 60 °C con un gradiente lineal AB de dos etapas de 0 a 30 % de B durante 5 minutos y de 30 a 90 % de B durante los siguientes 30 min en el que A = TFA 0,05 % /H₂O y B = TFA 0,05% /acetonitrilo y el caudal es de 1 ml/min.), y, típicamente, después de un tiempo de reacción de 18 h, muestra una desaparición del pico del péptido casi completa. Aparecen dos picos debidos al péptido mono y diPEGilado, constituyendo típicamente el péptido diPEGilado el 90-95 % del área total del pico.

Después, la muestra se diluye típicamente hasta alrededor de 50 ml con agua acidificada (TFA 0,05%/agua) y se purifica mediante una columna C₁₈ de HPLC de fase reversa (típicamente una Waters SymmetryPrep™ 7 mm, 19 x 300 mm) a un caudal de 10 ml/min con un gradiente lineal AB de dos etapas, de 0 a 25 % de B durante 15 min seguida de 25 a 55 % de B durante 100 min en el que A = TFA 0,05 %/agua y B = TFA 0,05 % /acetonitrilo. El producto se eluye generalmente con acetonitrilo al 35-40 %. El péptido purificado se cuantifica mediante la absorbancia UV a 280 nm usando un coeficiente de extinción molar calculado sobre la base de la secuencia del péptido. El rendimiento tras la purificación está típicamente alrededor del 70 % sobre la base de la cantidad de péptido de partida.

De forma alternativa, el péptido liofilizado se pesa (típicamente 30-50 mg). Se pesa un equivalente molar de 2,1 veces de mPEG yodoacetamida de 20kDa ($\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_2\text{-I}$) (NOF SUNBRIGHT ME-200IA) y se combina con el péptido. Los reactantes se disuelven en una solución acuosa tamponada de pH 8,0 (tampón bicarbonato 0,1 M + EDTA 10 mM) + acetonitrilo 20 % (v/v) a una concentración de péptido de aproximadamente 8 mg/ml. Después, la mezcla resultante se agita a temperatura ambiente en oscuridad. La mezcla de reacción se controla mediante HPLC analítico de fase reversa (la separación analítica por HPLC se efectúa en una columna Waters SymmetryShield™ C₁₈, 3,5 micras, 4,6 mm d.i. x 10 cm a 60 °C con un gradiente lineal AB de dos etapas de 0 a 30 % de B durante 5 minutos y de 30 a 90 % de B durante los siguientes 30 min en el que A = TFA 0,05 % /H₂O y B = TFA 0,05% /acetonitrilo y el caudal es de 1 ml/min.), y, típicamente, después de un tiempo de reacción de 3 h, muestra una desaparición del pico del péptido casi completa. Aparecen dos picos debidos al péptido mono y diPEGilado, constituyendo típicamente el péptido diPEGilado el 90-95 % del área total del pico.

Después, la muestra se diluye típicamente hasta alrededor de 50 ml con agua acidificada (TFA 0,05%/agua) y se purifica como se ha descrito previamente. El rendimiento tras la purificación está típicamente alrededor del 70 % sobre la base de la cantidad de péptido de partida.

Ejemplo 5: SEQ ID: 3

Aib², Aib¹³, NaI²², Aib²⁹, Cys⁴³(PEG20K), Cys⁴⁴(PEG20K)-GIP

El péptido del ejemplo 5 se PEGila usando mPEG-yodoacetamida.

ENSAYOS***In vitro***

45 Los compuestos ejemplificados en el presente documento se analizaron esencialmente como se describe más adelante y presentan una afinidad de unión (K_i) a GIP-R y GLP-1-R de menos de 100 nM y una proporción selectiva frente a Gluc-R de al menos 100 veces. Además, los compuestos del presente documento presentan una proporción de actividad en los ensayos de unión para GIP-R y GLP-1-R entre 4:1 y 1:2 (GIP-R:GLP-1-R) (4:1 indica mayor potencia hacia GIP-R; 1:2 indica mayor potencia hacia GLP-1-R).

50 Ensayo de unión del receptor del péptido insulíntrópico dependiente de glucosa (GIP-R)

El ensayo de unión del receptor del polipéptido insulíntrópico dependiente de glucosa humano usa hGIP-R (Usdin, T.B., Gruber, C., Modi, W. y Bonner, T.I., GenBank: AAA84418.1) clonado en el plásmido pcDNA3.1

(Promega)-NeoR. El plásmido hGIP-R-pcDNA3.1/Neo se transfecta a células de ovario de hámster chino, CHO-S (CHO, de *Chinese Hamster Ovary*), para cultivos en suspensión y se selecciona en presencia de 500 µg/ml de geneticina (Invitrogen).

Las membranas plasmáticas sin procesar se preparan usando células del cultivo en suspensión. Las células se lisan en hielo en tampón hipotónico que contiene Tris HCl 25 mM, pH 7,5, MgCl₂ 1 mM, 20 u/ml de ADNasa 1, e inhibidores Roche Complete™ sin EDTA. La suspensión celular se homogeneiza con un homogeneizador fino de vidrio usando un mortero de Teflon® durante 25 impulsos. El homogeneizado centrifuga a 4 °C a 1800 x g durante 15 minutos. El sobrenadante se recoge y el sedimento se resuspende en tampón hipotónico y se rehomogeneiza. La mezcla se centrifuga a 1800 x g durante 15 minutos. El segundo sobrenadante se combina con el primer sobrenadante. Los sobrenadantes combinados se recentrifugan a 1800 x g durante 15 minutos para aclarar. El sobrenadante aclarado se transfiere a tubos de alta velocidad y se centrifuga a 25000 x g durante 30 minutos a 4 °C. El sedimento de membranas se resuspende en tampón de homogeneización y se almacena en forma de alícuotas congeladas en congelador de -80 °C hasta su uso.

El GIP se marca con yodo radiactivo mediante el procedimiento de la I-125-lactoperoxidasa (Markalonis, J.J., Biochem. J. 113:299 (1969)) y se purifica mediante HPLC de fase reversa Perkin-Elmer/NEN (NEX-402). La actividad específica es de 2200 Ci/mmol. La determinación de la K_D se realiza mediante competición homóloga usando hGIP frío en lugar de saturación de la unión. El ensayo de unión al receptor se lleva a cabo usando un ensayo de proximidad del centelleo (EPC) (Sun, S., Almaden, J., Carlson, T.J., Barker, J. y Gehring, M.R. Assay development and data analysis of receptor-ligand binding based on scintillation proximity assay. Metab Eng. 7:38-44 (2005)) con perlas de aglutinina de germen de trigo (AGT) (GE Health Care) previamente bloqueadas con BSA libre de ácidos grasos al 1% (Gibco, BSA 7,5%). El tampón de unión contiene HEPES 25 mM, pH 7,4, CaCl₂ 2,5 mM, MgCl₂ 1 mM, BSA libre de ácidos grasos al 1%, Tween 20 al 0,003%, e inhibidores Roche Complete™ sin EDTA. El hGIP y los análogos de péptido se disuelven en PBS y se almacenan a -80 °C. Los análogos de péptido se diluyen en serie en tampón de unión. A continuación, se transfieren 10 µl de péptido diluido a placas de ensayo de fondo transparente Corning® 3632 que contienen 40 µl de tampón de unión del ensayo o GIP frío (UNS a 0,1 µM final). Después, se añaden 90 µl de membranas (4 µg/pocillo), 50 µl de [¹²⁵I] GIP (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences a una concentración final en la reacción de 0,15 nM), y 50 µl de perlas de AGT (150 µg/pocillo), se sellan, y se mezclan sucesivamente. Las placas se leen con un contador de centelleo MicroBeta® después de un tiempo de estabilización de 12 horas a temperatura ambiente.

Los resultados se calculan como un porcentaje de la unión específica de I-125-GIP en presencia de compuesto. La concentración absoluta CI₅₀ de compuesto se obtiene mediante regresión no lineal del porcentaje de unión específica de I-125-GIP frente a la concentración de compuesto añadido. La concentración CI₅₀ se convierte a K_i usando la ecuación de Cheng-Prusoff en la que la se estima que la K_D es 0,174 nM (Cheng, Y., Prusoff, W. H., Biochem. Pharmacol. 22, 3099-3108, (1973)).

Tabla 1

Ejemplo	K _i
1	0,044 nM
2	0,023 nM
3	9,79 nM
4	8,23 nM
5	9,22 nM

Estos datos demuestran que los péptidos de la tabla 1 se unen a GIP-R y pueden activar el desencadenamiento sucesivo de respuestas fisiológicas dependientes de GIP por parte del receptor.

Ensayo de unión del receptor del péptido 1 similar al glucagón (GLP-1-R)

El ensayo de unión del receptor de GLP-1 usa receptor humano clonado del péptido 1 similar al glucagón hGLP-1-R) (Graziano MP, Hey PJ, Borkowski D, Chicchi GG, Strader CD, Biochem Biophys Res Commun. 196(1): 141-6, 1993) aislado de membranas de células 293HEK. El ADNc de hGLP-1-R se subclona en el plásmido de expresión pHd (expresión transactivada de proteína C humana recombinante totalmente gammacarboxilada, un factor antitrombótico. Grinnell, B.W., Berg, D.T., Walls, J. y Yan, S.B. Bio/Technology 5: 1189-1192, 1987). Este ADN de plásmido se transfecta a células 293HEK y se selecciona con 200 µg/ml de higromicina.

Las membranas plasmáticas sin procesar se preparan usando células del cultivo en suspensión. Las células se lisan en hielo en tampón hipotónico que contiene Tris HCl 25 mM, pH 7,5, MgCl₂ 1 mM, 20 u/ml de ADNasa 1, e inhibidores Roche Complete™ sin EDTA. La suspensión celular se homogeneiza con un homogeneizador fino de

vidrio usando un mortero de Teflon® durante 25 impulsos. El homogeneizado centrifuga a 4 °C a 1800 x g durante 15 minutos. El sobrenadante se recoge y el sedimento se resuspende en tampón hipotónico y se rehomogeneiza. La mezcla se centrifuga a 1800 x g durante 15 minutos. El segundo sobrenadante se combina con el primer sobrenadante. Los sobrenadantes combinados se recentrifugan a 1800 x g durante 15 minutos para aclarar. El sobrenadante aclarado se transfiere a tubos de alta velocidad y se centrifuga a 25000 x g durante 30 minutos a 4 °C. El sedimento de membranas se resuspende en tampón de homogeneización y se almacena en forma de alícuotas congeladas en congelador de -80 °C hasta su uso.

El péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) se marca con yodo radiactivo mediante el procedimiento de la I-125-lactoperoxidasa y se purifica mediante HPLC de fase reversa en Perkin-Elmer/NEN (NEX308). La actividad específica es de 2200 Ci/mmol. La determinación de la K_D se realiza mediante competición homóloga en lugar de saturación de la unión debido al alto contenido en propanolol en el material de I-125-GLP-1. Se estima que la K_D es 0,96 nM y se usa para calcular los valores de K_i para todos los compuestos analizados.

El ensayo de unión del receptor se lleva a cabo usando un ensayo de proximidad de centelleo (EPC) con perlas de aglutinina de germen de trigo (AGT) previamente bloqueadas con BSA libre de ácidos grasos al 1% (Gibco). El tampón de unión contiene HEPES 25 mM, pH 7,4, $CaCl_2$ 2,5 mM, $MgCl_2$ 1 mM, BSA libre de ácidos grasos al 1%, Tween 20 al 0,003%, e inhibidores Roche Complete™ sin EDTA. El péptido 1 similar al glucagón se disuelve a 1 mg/ml en PBS y se congela inmediatamente a -80 °C en alícuotas de 30 µl. El alícuota de péptido 1 similar al glucagón se diluye y se usa en los ensayos de unión antes de una hora. El análogo de péptido se disuelve en PBS y se diluye en serie en tampón de unión. A continuación, se transfieren 10 µl de compuestos diluidos o de PBS a placas de ensayo de fondo transparente Corning® 3632 que contienen 40 µl de tampón de unión del ensayo o de glucagón frío (UNS a 1 µM final). Después, se añaden 90 µl de membranas (1 µg/pocillo), 50 µl de I-125-Péptido 1 similar al glucagón (concentración final en la reacción de 0,15 nM), y 50 µl de perlas de AGT (150 µg/pocillo), se sellan, y se mezclan sucesivamente. Las placas se leen con un contador de centelleo Trilux MicroBeta®, de PerkinElmer Life and Analytical Sciences, después de un tiempo de estabilización de 12 horas a temperatura ambiente.

Los resultados se calculan como un porcentaje de la unión específica de I-125-Péptido 1 similar al glucagón en presencia de compuesto. La concentración absoluta CI_{50} de compuesto se obtiene mediante regresión no lineal del porcentaje de unión específica de I-125-Péptido 1 similar al glucagón frente a la concentración de compuesto añadido. La concentración CI_{50} se convierte a K_i usando la ecuación de Cheng-Prusoff.

Tabla 2

Ejemplo	K_i
1	0,096 nM
2	0,059 nM
3	9,00 nM
4	5,27 nM
5	6,20 nM

Estos datos demuestran que los péptidos de la tabla 2 se unen a GLP-1-R y, por lo tanto, pueden activar el desencadenamiento sucesivo de respuestas fisiológicas dependientes de GLP-1 por parte del receptor.

Ensayo de unión del receptor de glucagón (hGlucR)

El ensayo de unión del receptor de glucagón utiliza receptor humano clonado de glucagón (Lok, S, y col., Gene 140 (2), 203-209 (1994)) aislado de membranas de células 293HEK. El ADNc de hGlucR se subclona en el plásmido de expresión pHd (expresión transactivada de proteína C humana recombinante totalmente gammacarboxilada, un factor antitrombótico. Grinnell, B.W., y col., Bio/Technology 5: 1189-1192 (1987)). Este ADN de plásmido se transfecta a células 293HEK y se selecciona con 200 µg/ml de higromicina.

Las membranas plasmáticas sin procesar se preparan usando células del cultivo en suspensión. Las células se lisan en hielo en tampón hipotónico que contiene Tris HCl 25 mM, pH 7,5, $MgCl_2$ 1 mM, 20 u/ml de ADNasa 1, e inhibidores Roche Complete™ sin EDTA. La suspensión celular se homogeneiza con un homogeneizador fino de vidrio usando un mortero de Teflon® durante 25 impulsos. El homogeneizado centrifuga a 4 °C a 1800 x g durante 15 minutos. El sobrenadante se recoge y el sedimento se resuspende en tampón hipotónico y se rehomogeneiza. La mezcla se centrifuga a 1800 x g durante 15 minutos. El segundo sobrenadante se combina con el primer sobrenadante. Los sobrenadantes combinados se recentrifugan a 1800 x g durante 15 minutos para aclarar. El sobrenadante aclarado se transfiere a tubos de alta velocidad y se centrifuga a 25000 x g durante 30 minutos a 4 °C. El sedimento de membranas se resuspende en tampón de homogeneización y se almacena en forma de alícuotas

congeladas en congelador de -80 °C hasta su uso.

El glucagón se marca con yodo radiactivo mediante el procedimiento de la I-125-lactoperoxidasa y se purifica mediante HPLC de fase reversa en Perkin-Elmer/NEN (NEX308). La actividad específica es de 2200 Ci/mmol. La determinación de la K_D se realiza mediante competición homóloga en lugar de saturación de la unión debido al alto contenido en propanolol en el material de I-125-Glucagón. Se estima que la K_D es 2,62 nM y se usa para calcular los valores de K_i para todos los compuestos analizados.

El ensayo de unión del receptor se lleva a cabo usando un ensayo de proximidad de centelleo (EPC) con perlas de aglutinina de germen de trigo (AGT) previamente bloqueadas con seroalbúmina bovina libre de ácidos grasos al 1% (BSA) (Gibco, BSA 7,5%). El tampón de unión contiene ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetasulfónico (HEPES) 25 mM pH 7,4, CaCl_2 2,5 mM, MgCl_2 1 mM, BSA libre de ácidos grasos al 1%, Tween 20 al 0,003%, e inhibidores Roche Complete™ sin EDTA. El glucagón se disuelve a 1 mg/ml en PBS y se congela inmediatamente a -80 °C en alícuotas de 30 µl. El alícuota de glucagón se diluye y se usa en el ensayo de unión antes de una hora. El análogo de péptido se disuelve en PBS y se diluye en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se diluye en serie en tampón de unión. A continuación, se transfieren 10 µl de compuestos diluidos o de PBS a placas de ensayo de fondo transparente Corning® 3632 que contienen 40 µl de tampón de unión del ensayo o de glucagón frío (UNS a 1 µM final). Después, se añaden 90 µl de membranas (3 µg/pocillo), 50 µl de I-125-Glucagón (concentración final en la reacción de 0,15 nM), y 50 µl de perlas de AGT (150 µg/pocillo), se sellan, y se mezclan sucesivamente. Las placas se leen con un contador de centelleo Trilux MicroBeta®, de PerkinElmer Life and Analytical Sciences, después de un tiempo de estabilización de 12 horas a temperatura ambiente.

Los resultados se calculan como un porcentaje de la unión específica de I-125-Glucagón en presencia de compuesto. La concentración absoluta CI_{50} de compuesto se obtiene mediante regresión no lineal del porcentaje de unión específica de I-125-Glucagón frente a la concentración de compuesto añadido. La dosis CI_{50} se convierte a K_i usando la ecuación de Cheng-Prusoff.

Tabla 3

Ejemplo	K_i
1	>23.600 nM
2	> 23.600 nM
3	> 7.890 nM
4	> 7.490 nM
5	>7.490 nM

Estos datos demuestran que los péptidos de la tabla 3 son menos selectivos para Gluc-R y, por tanto, no inician respuestas fisiológicas mediadas por Gluc-R.

Activación funcional de células hGIP-R para generar AMPc intracelular

El ensayo funcional de AMPc usa la misma línea celular de GIP-R clonado aislada para el ensayo de unión del hGIP-R descrito anteriormente. Las células se estimulan con los péptidos y el AMPc generado dentro de la célula se cuantifica usando el *kit* CisBio AMPc Dynamic 2 HTRF® Assay kit, (62AM4PEB). Brevemente, El AMPc inducido dentro de la célula se detecta mediante la unión el anticuerpo de captura AMPc-d2 en presencia del tampón de lisis celular. Un segundo anticuerpo de detección, antiAMPc criptato, se añade para crear un *sandwich* que se detecta después usando un equipo Perkin-Elmer Life Sciences Envision®.

Las células hGIP-R-CHO-S se recogen a partir de placas de cultivo en subconfluencia con solución de disociación celular libre de enzimas, (especialidad de medios 5-004-B). Las células se sedimentan a baja velocidad y se lavan 3 veces con tampón de ensayo de AMPc [Hepes 25 mM en HBSS con Mg y Ca (GIBCO, 14025-092) con BSA libre de ácidos grasos al 0,1% (Gibco, BSA 7,5%), IBMX 500 µM], después se diluyen hasta una concentración final de 312.000 células por ml. Se preparan el hGIP y los péptidos como soluciones de reserva 5X y se diluyen en serie en el tampón de ensayo de AMPc, así como una curva patrón de AMPc, que se prepara a partir de soluciones de reserva congeladas de AMPc 2.848 nM en PBS almacenadas a -20 °C. Para empezar el ensayo, se transfieren 40 µl de suspensión celular a placas negras de medio pocillo no tratadas para cultivo celular (CoStar 3694), seguido de la adición de 10 µl de las diluciones 5X de péptidos. Las células se dejan a temperatura ambiente durante 1 h. La reacción se detiene mediante la adición de 25 µl del anticuerpo de captura AMPc-d2 (CisBio) diluido en el tampón de lisis de CisBio, después se mezcla suavemente en un agitador Titertek. Después de 15 minutos de lisis, se añaden 25 µl del anticuerpo de detección, antiAMPc criptato (CisBio), se mezcla suavemente. Las mezclas de células lisadas y anticuerpo se leen después de 1 h a temperatura ambiente usando el Perkin-Elmer Envision®. Las unidades de Envision® se convierten a AMPc nM/pocillo usando la curva patrón de AMPc. Los nmoles AMPc

generados en cada pocillo se convierten en un porcentaje de la respuesta máxima observada con el control de hGIP. Se obtiene un valor relativo de CE_{50} mediante análisis de regresión no lineal usando el porcentaje de respuesta máxima frente a la concentración de péptido añadido.

Tabla 4

Ejemplo	CE_{50}
1	0,005 nM
2	0,023 nM
3	0,244 nM
4	0,277 nM
5	0,207 nM

5

Estos datos demuestran que los péptidos de la tabla 4 se unen y activan a GIP-R y, de esa manera, pueden iniciar respuestas fisiológicas mediadas por GIP-R.

Activación funcional de células hGLP-1-R para generar AMPc intracelular

El ensayo funcional de AMPc usa una línea clonal de células que expresan hGLP-1-R aisladas a partir de la transfección de hGLR-1-R clonado en pcDNA3.1/Neo (Promega) ((Graziano MP, Hey PJ, Borkowski D, Chicchi GG, Strader CD, Biochem Biophys Res Commun. 1993 Oct 15;196(1):141-6)) y transfectado a células 293HEK. Las células hGLP-1-R se estimulan con los péptidos y el AMPc generado dentro de la célula se cuantifica usando el *kit* CisBio AMPc Dynamic 2 HTRF® Assay kit, (62AM4PEB). Brevemente, El AMPc inducido dentro de la célula se detecta mediante la unión el anticuerpo de captura AMPc-d2 (CisBio) en presencia del tampón de lisis celular. Un segundo anticuerpo de detección, antiAMPc criptato (CisBio), se añade para crear un *sandwich* que se detecta después usando un equipo Perkin-Elmer Envision®.

Las células hGLP-1-R-293HEK se recogen a partir de placas de cultivo en subconfluencia con solución de disociación celular libre de enzimas, (especialidad de medios 5-004-B). Las células se sedimentan a baja velocidad y se lavan 3 veces con tampón de ensayo DMEM de AMPc [Hepes 10 mM en DMEM (Gibco-31053) SBF al 0,5 % y 2 ml de glutamina, IBMX 500 μ M], después se diluyen hasta una concentración final de 50.000 células por ml. Se preparan el hGLP-1 y los péptidos como soluciones de reserva 5X y se diluyen en serie en el tampón de ensayo DMEM de AMPc, así como una curva patrón de AMPc, que se prepara a partir de soluciones de reserva congeladas de AMPc 2.848 nM en PBS almacenadas a -20 °C. Para empezar el ensayo, se transfieren 40 μ l de suspensión celular a placas negras de medio pocillo no tratadas para cultivo celular (CoStar 3694), seguido de la adición de 10 μ l de las diluciones 5X de péptidos. Las células se dejan a temperatura ambiente durante 1 h. La reacción se detiene mediante la adición de 25 μ l del anticuerpo de captura AMPc-d2 (CisBio) diluido en el tampón de lisis de CisBio, después se mezcla suavemente en un agitador Titertek. Después de 15 minutos de lisis, se añaden 25 μ l del anticuerpo de detección, antiAMPc criptato (CisBio), se mezcla suavemente. Las mezclas de células lisadas y anticuerpo se leen después de 1 hora a temperatura ambiente usando el Perkin-Elmer Envision®. Las unidades de Envision® se convierten a AMPc nM/pocillo usando la curva patrón de AMPc. Los nmoles AMPc generados en cada pocillo se convierten en un porcentaje de la respuesta máxima observada con el control de hGLP-1. Se obtiene un valor relativo de CE_{50} mediante análisis de regresión no lineal usando el porcentaje de respuesta máxima frente a la concentración de péptido añadido.

Tabla 5

Ejemplo	CE_{50}
1	0,036 nM
2	0,045 nM
3	1,11 nM
4	0,844 nM
5	0,959 nM

35

Estos datos demuestran que los péptidos de la tabla 5 se unen y activan a GLP-1-R y, de esa manera, pueden iniciar respuestas fisiológicas mediadas por GLP-1-R.

In vivo**Efectos sobre la ingesta de alimento, el peso corporal y la composición corporal en ratones obesos inducidos por la dieta (DIO, de *diet induced obese*)**

- 5 Se usan ratones obesos inducidos por la dieta (DIO) machos de cuatro meses de edad. Los animales se alojan de forma individual en una instalación con temperatura controlada (24 °C) con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (luces encendidas a las 22:00), y tienen libre acceso al alimento y al agua. Después de 2 semanas de aclimatación a la instalación, los ratones se asignan de forma aleatoria a los grupos de tratamiento (n= 8-10/grupo) de modo que cada grupo tenga similar peso y masa corporal. Antes del experimento, se inyecta a los ratones una solución de vehículo por vía subcutánea (sc) y se les pesa durante 7 días para aclimatarlos a los procedimientos.
- 10 El vehículo o el análogo de péptido (intervalo de dosificación 10-100 nmol/Kg) disuelto en vehículo se administran mediante inyección sc a ratones DIO alimentados libremente, 30-90 minutos antes del comienzo del ciclo de oscuridad cada 3 días durante 2 a 4 semanas. El peso corporal y el peso del alimento mas la tolva se miden al mismo tiempo. El alimento consumido en las últimas 24 horas se calcula sustrayendo el peso actual del alimento mas la tolva al del día anterior. Las modificaciones absolutas en el peso corporal se calculan sustrayendo el peso corporal del animal antes de la primera inyección. En los días 1 y 14, se mide la masa grasa total mediante resonancia magnética nuclear (RMN) usando un equipo Echo Medical System (Houston, TX). La masa grasa libre se calcula sustrayendo la masa grasa del peso corporal total.
- 15

Tabla 6a Modificación del peso en ratones DIO a lo largo de un periodo de tratamiento de 14-días (ejemplos 3 y 4)

Ejemplo (dosis)	Pérdida de peso total (modificación del peso en g durante 14 días)	Ingesta total de alimento (g totales durante 14 días)	Pérdida de masa grasa (modificación del peso de grasa en g durante 14 días)
Vehículo	+0,7±0,4	36,9±1,0	0,2±0,3
4 (10 nmol/Kg)	-4,5±0,3**	28,4±1,8**	-3,6±1,1**
4 (30 nmol/Kg)	-6,0±0,4**	25,5±2,6**	-4,7±0,4**
3 (30 nmol/Kg)	-5,5±0,4**	26,5±1,5**	-4,3±0,3**
3 (100 nmol/Kg)	-7,0±0,3**	23,4±0,7**	-5,6±0,2**

20 Tabla 6b Modificación del peso en ratones DIO a lo largo de un periodo de tratamiento de 14-días (ejemplos 4 y 5)

Ejemplo (dosis)	Pérdida de peso total (modificación del peso en g durante 14 días)	Ingesta total de alimento (g totales durante 14 días)	Pérdida de masa grasa (modificación del peso de grasa en g durante 14 días)
Vehículo	+0,8±0,4	38,4±0,5	0,1±0,2
4 (10 nmol/Kg)	-4,9±0,4*	26,9±1,5*	-3,6±0,3*
5 (10 nmol/Kg)	-3,2±0,3*	31,0±1,0*	-2,4±0,3*
5 (30 nmol/Kg)	-5,0±0,4*	26,7±0,7*	-3,6±0,4**

- 25 Los datos de las tablas 6a y 6b muestran que los ejemplos 3, 4, y 5 redujeron la ingesta de alimento y el peso corporal acumulados en los estudios de 14 días con ratones DIO al compararlos con ratones tratados con vehículo. El peso corporal reducido se debió principalmente a la reducción de la masa grasa. *p<0,01, **p<0,001 frente a vehículo (prueba de Dunnett)

Efectos sobre la fluctuación de la glucosa en sangre durante una prueba de tolerancia a la glucosa oral en ratones DIO a las dos semanas de tratamiento

- 30 Cincuenta y seis horas después de la última inyección de compuesto en el estudio de DIO anterior, se sometió a los animales a una prueba de tolerancia a la glucosa oral. En pocas palabras, se hizo ayunar a los ratones durante 16 horas antes del comienzo de la prueba de tolerancia a la glucosa. En el momento 0, los animales reciben 2 g/kg de dextrosa mediante sonda oral. La muestra se recoge mediante sangrado de la cola, tomado a los 0, 15, 30, 60 y 120 minutos de la estimulación con glucosa. La concentración de glucosa se mide mediante un glucómetro.

Tabla 7a. Efectos de los ejemplos 3 y 4 sobre las fluctuaciones de glucosa después de una carga de glucosa oral. Los datos se dan como área bajo la curva de glucosa (media $\pm$ ETM).

Ejemplo (dosis)	ABC de glucosa (mg*min/dl)		
	MEDIA	ETM	Dunnett
Vehículo	18232	624	
4 (10 nmol/Kg)	11725	448	< 0,01
4 (30 nmol/Kg)	10907	252	< 0,01
3 (30 nmol/Kg)	10293	179	<0,01
3 (100 nmol/Kg)	10892	396	<0,01

Tabla 7b. Efectos de los ejemplos 4 y 5 sobre las fluctuaciones de glucosa después de una carga de glucosa oral. Los datos se dan como área bajo la curva de glucosa (media $\pm$ ETM)

Ejemplo (dosis)	ABC de glucosa (mg*min/dl)		
	MEDIA	ETM	Dunnett
Vehículo	24412	1511	
4 (10 nmol/Kg)	13719	385	<0,01
5 (10 nmol/Kg)	14332	413	<0,01
5 (30 nmol/Kg)	12474	369	<0,01

Estos datos de las tablas 7a y 6b muestran que los ejemplos 3, 4, y 5 redujeron significativamente la fluctuación de glucosa después de una carga de glucosa oral. Significación estadística evaluada mediante la prueba de Dunnett.

Efectos sobre la ingesta de alimento, el peso corporal y la composición corporal en ratas Long Evans obesas inducidas por la dieta (DIO)

Se usan ratas macho Long Evans obesas inducidas por la dieta de cuatro a cinco meses de edad. Los animales se alojan de forma individual en una instalación con temperatura controlada (24 °C) con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (luces encendidas a las 22:00), y tienen libre acceso al alimento (dieta TD95217) y al agua. Los animales se aclimatan a la instalación durante al menos 2 semanas. En el día 0, se determina la composición corporal mediante RMNC y las ratas se asignan de forma aleatoria a los grupos respectivos (n= 6/grupo) sobre la base del peso corporal, % de grasa, y % de masa magra. El compuesto se administra mediante inyección subcutánea en los días 1, 4, 8, 11, y 15. En el día 14 la composición corporal se determina de nuevo mediante RMNC y en el día 16, los animales se pesan y se someten a sangrado de la cola para la extracción de muestras para determinar glucosa, lípidos, insulina, glucagón, y PYY en plasma. Después de la eutanasia con CO₂, se toman muestras de sangre mediante punción cardíaca para el análisis de la determinación de la exposición.

La administración de los ejemplos 3 y 4 durante 16 días produjo modificaciones en el peso corporal y en la composición corporal de las ratas DIO en comparación con las ratas DIO tratadas con vehículo, incrementando el porcentaje de masa magra y reduciendo el porcentaje de masa grasa. Por ejemplo, tras la administración de una dosis de 10 nmol/Kg del ejemplo 3 durante 16 días, la masa magra aumenta un 0,6 % y la masa grasa se reduce un 1,3 %. De forma similar, tras la administración de una dosis de 30 nmol/Kg del ejemplo 3 durante 16 días, la masa magra aumenta un 1,3% y la masa grasa se reduce un 2,3%. Además, tras la administración de una dosis de 30 nmol/Kg del ejemplo 4 durante 16 días, la masa magra aumenta un 0,4% y la masa grasa se reduce un 1,8%. De forma similar, tras la administración de una dosis de 100 nmol/Kg del ejemplo 4 durante 16 días, la masa magra aumenta un 1,8% y la masa grasa se reduce un 3,2%.

La administración de los ejemplos 3 y 4 redujo las cantidades de lípidos en plasma, incluyendo los triglicéridos y el colesterol total, y aumentó la cantidad de ácidos grasos libres en las ratas DIO en comparación con los ratones tratados con vehículo. Por ejemplo, tras la administración de una dosis de 10 nmol/Kg del ejemplo 3, los triglicéridos y el colesterol total se redujeron de 507,3 mg/dl y 104 mg/dl (vehículo) a 262,1 mg/dl y 91 mg/dl, respectivamente, y los ácidos grasos libres aumentaron de 0,69 mEq/L a 0,94 mEq/L. De forma similar, tras la administración de una dosis de 30 nmol/Kg del ejemplo 3, los triglicéridos y el colesterol total se redujeron de 507,3 mg/dl y 104 mg/dl (vehículo) a 233,5 mg/dl y 94 mg/dl, respectivamente, y los ácidos grasos libres aumentaron de 0,69 mEq/L a 1,01 mEq/L. Además, tras la administración de una dosis de 10 nmol/Kg del ejemplo 4, los triglicéridos y el colesterol total

se redujeron de 808,1 mg/dl y 127 mg/dl (vehículo) a 488,7 mg/dl y 110 mg/dl, respectivamente. De forma similar, tras la administración de una dosis de 30 nmol/Kg del ejemplo 4, los triglicéridos y el colesterol total se redujeron de 808,1 mg/dl y 127 mg/dl (vehículo) a 212,2 mg/dl y 104 mg/dl, respectivamente, y los ácidos grasos libres aumentaron de 0,67 mEq/L a 0,82 mEq/L.

5 Efectos sobre la fluctuación de la glucosa en sangre durante una prueba de tolerancia a la glucosa intravenosa ratas normales

En este estudio se usan ratas macho Wistar normales (225-250 g). Los animales se asignan de forma aleatoria a los grupos sobre la base del peso corporal y la glucosa en sangre alimentados. Se inyecta a los animales vehículo o análogo de péptido (dosis 3-400 µg contenido de péptido/kg) 16 horas antes del comienzo de la prueba. El alimento se retira en el momento de la inyección. Antes del ensayo, los animales se someten a anestesia, 65 mg/kg de fenobarbital i.p., y se insertan dos catéteres, uno en la vena yugular y otro en la arteria carótida. En el momento 0, los animales reciben 0,5 g glucosa/kg a través del catéter venoso. La sangre se recoge de la arteria carótida en los momentos 0 (antes de la glucosa), y a los 2, 4, 6, 10, 20 y 30 minutos de la estimulación con glucosa. La concentración de glucosa se mide mediante un glucómetro. La insulina se mide mediante Mesoscale®. La eficacia se mide como el incremento del área total bajo la curva de insulina (= valores integrados de insulina en plasma desde t+0 a 30 min) así como el área bajo la curva de glucosa, la cual es una medida de la fluctuación de glucosa tras la estimulación con glucosa intravenosa.

La administración de los ejemplos 3 y 4 aumentó el ABC de insulina y redujo el ABC de glucosa en comparación con las ratas tratadas con vehículo. Por ejemplo, tras la administración de una dosis de 50 µg/Kg del ejemplo 3, el ABC de insulina aumentó de 55 ng*min/ml (vehículo) a 137 ng*min/ml y el ABC de glucosa se redujo de 7830 mg*min/dl (vehículo) a 6780 mg*min/dl. De forma similar, tras la administración de una dosis de 200 µg/Kg del ejemplo 3, el ABC de insulina aumentó de 55 ng*min/ml (vehículo) a 183 ng*min/ml y el ABC de glucosa se redujo de 7830 mg*min/dl (vehículo) a 7020 mg*min/dl. Además, tras la administración de una dosis de 50 µg/Kg del ejemplo 4, el ABC de insulina aumentó de 44 ng*min/ml (vehículo) a 150 ng*min/ml y el ABC de glucosa se redujo de 8010 mg*min/dl (vehículo) a 7730 mg*min/dl. De forma similar, tras la administración de una dosis de 200 µg/Kg del ejemplo 4, el ABC de insulina aumentó de 44 ng*min/ml (vehículo) a 161 ng*min/ml y el ABC de glucosa se redujo de 8010 mg*min/dl (vehículo) a 7420 mg*min/dl.

Tras la administración de una dosis de 50 µg/Kg del ejemplo 5, el ABC de insulina aumenta de 41 ng*min/ml (vehículo) a 133 ng*min/ml y el ABC de glucosa se reduce de 7739 mg*min/dl (vehículo) a 7202 mg*min/dl. De forma similar, tras la administración de una dosis de 200 µg/Kg del ejemplo 5, el ABC de insulina aumenta de 41 ng*min/ml (vehículo) a 124 ng*min/ml y el ABC de glucosa se reduce de 7739 mg*min/dl (vehículo) a 7351 mg*min/dl.

Efectos esqueléticos

El ejemplo 4 se evaluó en ratas Sprague Dawley ovariectomizadas (OvX; véase Endocrinology 144: 2008-2015) de 6 meses de edad. Las ratas recibieron dosis de 0, 2,9, 9,7, o 29 nmol/kg en forma de inyecciones subcutáneas diarias que comenzaron a los 9 días de la cirugía. El tratamiento duró 35 días y, como respuesta, la dosis del ejemplo 4 redujo como respuesta el consumo de alimento y el peso corporal hasta un 8% en comparación con las ratas OvX operadas de forma simulada. La reducción del peso corporal se debió al descenso de la masa grasa y no se observó ninguna modificación de la masa magra en las ratas OvX. El ejemplo 4 redujo la glucosa y los triglicéridos en suero en las ratas OvX sin ayuno. El compuesto evitó de forma dependiente de la dosis la pérdida de contenido mineral óseo y de densidad mineral ósea en las vértebras lumbares inducidas por la OvX pero no tuvo ningún efecto en la cortical medial ósea del fémur. El ejemplo 4 no afectó de forma adversa la densidad mineral ósea ni el contenido mineral óseo en el fémur y las vértebras lumbares de las ratas OvX. Hay que destacar que la pérdida de peso corporal (8% en este estudio) puede afectar directamente a la masa ósea. La resistencia ósea depende de la carga y la pérdida de peso da como resultado una carga menor en los huesos que llevan peso y, como consecuencia, se observa menos impacto en los parámetros esqueléticos de los huesos que llevan peso, es decir, la cortical ósea del fémur. Las significaciones estadísticas se evaluaron mediante ANOVA unidireccional seguida por una prueba de Dunnett.

Tabla 8: Modificaciones en la densidad mineral ósea (DMO) de las vértebras lumbares

Ejemplo (dosis)	Densidad mineral ósea (mg/cm ³)		
	MEDIA	ETM	Significación frente a OvX+Veh
Cirugía simulada + vehículo	589	9,6	<0,05
OvX + vehículo	540	10,2	n/a
OvX + 2,9 nmol/kg Ej. 4	557	10,7	n.s.
OvX + 9,7 nmol/kg Ej. 4	558	10,9	n.s.
OvX + 29 nmol/kg Ej. 4	588	21,6	<0,05

Tabla 9: Modificaciones en el contenido mineral óseo (CMO) de las vértebras lumbares

Ejemplo (dosis)	Densidad mineral ósea (mg)		
	MEDIA	ETM	Significación frente a OvX+Veh
Cirugía simulada + vehículo	9,61	0,17	n.s.
OvX + vehículo	9,13	0,24	n/a
OvX + 2,9 nmol/kg Ej. 4	9,75	0,25	n.s.
OvX + 9,7 nmol/kg Ej. 4	9,98	0,18	<0,05
OvX + 29 nmol/kg Ej. 4	10,49	0,55	<0,05

Los datos de las tablas 8 y 9 muestran que el ejemplo 4 mejora la DMO y el CMO en las ratas OvX.

Los compuestos de la presente invención se formulan preferentemente como composiciones farmacéuticas administradas mediante una diversidad de vías. Lo más preferentemente, dichos compuestos son para su administración parenteral. Dichas composiciones farmacéuticas y los procedimientos para preparar las mismas son bien conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Remington: The Science and Practice of Pharmacy (A. Gennaro, y col., eds., 19ª ed., Mack Publishing Co., 1995).

Los compuestos de la presente invención son efectivos generalmente en un amplio intervalo de dosificación. Por ejemplo, las dosificaciones por semana están dentro del intervalo de 1 a 24 mg de conjugado de péptido o de 0,014 a 0,343 mg/Kg de peso corporal. En algunos casos, pueden ser más que adecuados niveles de dosificación por debajo del límite inferior del intervalo reseñado anteriormente, mientras que en otros casos pueden emplearse dosis aún mayores sin causar ningún efecto secundario perjudicial y, por tanto, el intervalo de dosificación anterior no se ha planeado para limitar el alcance de la invención de ningún modo. se entenderá que la cantidad real del compuesto administrado realmente la determinará un médico, a la luz de las circunstancias relevantes, incluyendo la afección que se va a tratar, la vía de administración elegida, el compuesto o compuestos reales administrados, la edad, el peso, y la respuesta del paciente individual, y la gravedad de los síntomas del paciente.

Otras modificaciones de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica sin desviarse del alcance de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Eli Lilly and Company

<120> Nuevos péptidos y procedimientos para su preparación y uso

<130> X18982

<150> US 61/317850

<151> 26-03-2010

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 44

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa en la posición 2 es ácido alfa-amino isobutírico

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Xaa en la posición 13 es ácido alfa-amino isobutírico

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa en la posición 22 es 1-naftilalanina o Phe
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa en la posición 29 es ácido alfa-amino isobutírico
 10
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (42)..(42)
 <223> Gln en la posición 42 puede estar amidado cuando Xaa en las posiciones 43 y 44 están ausentes
 15
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (43)..(43)
 <223> Xaa en la posición 43 es Cys o está ausente
 20
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (43)..(43)
 <223> Xaa en la posición 43 puede estar amidado cuando Xaa en la posición 44 está ausente
 25
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (43)..(43)
 <223> Xaa en la posición 43 puede estar PEGilado cuando es Cys
 30
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (44)..(44)
 <223> Xaa en la posición 44 es Cys o está ausente
 35
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (44)..(44)
 <223> Xaa en la posición 44 puede estar amidado
 40
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (44)..(44)
 <223> Xaa en la posición 44 puede estar PEGilado cuando es Cys
 45
 <400> 1

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

Ile Ala Gln Arg Ala Xaa Val Gln Trp Leu Ile Ala Xaa Lys Gly Lys
20 25 30

Lys Gln Glu Trp Lys His Gln Ile Thr Gln Xaa Xaa
35 40

50 <210> 2
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Construcción sintética

<220>
<221> MISC_FEATURE
5 <222> (2)..(2)
<223> Xaa en la posición 2 es ácido alfa-amino isobutírico

<220>
10 <221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> Xaa en la posición 13 es ácido alfa-amino isobutírico

<220>
15 <221> MISC_FEATURE
<222> (29)..(29)
<223> Xaa en la posición 29 es ácido alfa-amino isobutírico

<220>
20 <221> MOD_RES
<222> (43)..(43)
<223> Cys en la posición 43 está PEGilado con un PEG que tiene un peso molecular medio de alrededor de 20 kDa

<220>
25 <221> MOD_RES
<222> (44)..(44)
<223> Cys en la posición 44 está PEGilado con un PEG que tiene un peso molecular medio de alrededor de 20 kDa

<220>
30 <221> MOD_RES
<222> (44)..(44)
<223> Cys en la posición 44 está amidado

35 <400> 2

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

Ile Ala Gln Arg Ala Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Xaa Lys Gly Lys
20 25 30

Lys Gln Glu Trp Lys His Gln Ile Thr Gln Cys Cys
35 40

40 <210> 3
<211> 44
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Construcción sintética

<220>
50 <221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa en la posición 2 es ácido alfa-amino isobutírico

<220>
55 <221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> Xaa en la posición 13 es ácido alfa-amino isobutírico

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa en la posición 22 es 1-naftilalanina
 10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa en la posición 29 es ácido alfa-amino isobutírico
 15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (43)..(43)
 <223> Cys en la posición 43 está PEGilado con un PEG que tiene un peso molecular medio de alrededor de 20 kDa
 20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (44)..(44)
 <223> Cys en la posición 44 está PEGilado con un PEG que tiene un peso molecular medio de alrededor de 20 kDa
 25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (44)..(44)
 <223> Cys en la posición 44 está amidado
 <400> 3

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

 Ile Ala Gln Arg Ala Xaa Val Gln Trp Leu Ile Ala Xaa Lys Gly Lys
 20 25 30

 Lys Gln Glu Trp Lys His Gln Ile Thr Gln Cys Cys
 30 35 40
 35 <210> 4
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Construcción sintética
 45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa en la posición 2 es ácido alfa-amino isobutírico
 50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa en la posición 13 es ácido alfa-amino isobutírico
 55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa en la posición 22 es 1-naftilalanina

<221> MISC_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> Xaa en la posición 29 es ácido alfa-amino isobutírico

5 <400> 4

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

Ile Ala Gln Arg Ala Xaa Val Gln Trp Leu Ile Ala Xaa Lys Gly Lys
20 25 30

Lys Gln Glu Trp Lys His Gln Ile Thr Gln
35 40

10 <210> 5
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Construcción sintética

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa en la posición 2 es ácido alfa-amino isobutírico

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa en la posición 13 es ácido alfa-amino isobutírico

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa en la posición 29 es ácido alfa-amino isobutírico

<400> 5

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

Ile Ala Gln Arg Ala Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Xaa Lys Gly Lys
20 25 30

Lys Gln Glu Trp Lys His Gln Ile Thr Gln
35 40

35 <210> 6
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Construcción sintética

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)

<223> Xaa en la posición 2 es ácido alfa-amino isobutírico
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 5 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa en la posición 13 es ácido alfa-amino isobutírico
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa en la posición 22 es 1-naftilalanina
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 15 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa en la posición 29 es ácido alfa-amino isobutírico
 <400> 6

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

 <210> 7
 <211> 44
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa en la posición 2 es ácido alfa-amino isobutírico
 35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa en la posición 13 es ácido alfa-amino isobutírico
 40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa en la posición 29 es ácido alfa-amino isobutírico
 45 <400> 7

ES 2 568 796 T3

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

Ile Ala Gln Arg Ala Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Xaa Lys Gly Lys
 20 25 30

Lys Gln Glu Trp Lys His Gln Ile Thr Gln Cys Cys
 35 40

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que consiste en la secuencia:

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-
Leu-Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Arg-Ala-Xaa¹-Val-Gln-Trp-Leu-
Ile-Ala-Aib-Lys-Gly-Lys-Lys-Gln-Glu-Trp-Lys-His-Gln-
Ile-Thr-Gln-Xaa²-Xaa³ (SEQ ID NO:1)

5 en la que Xaa¹ en la posición 22 es Nal o Phe; Xaa² en la posición 43 es Cys o está ausente;
Xaa³ en la posición 44 es Cys o está ausente; el aminoácido C-terminal está opcionalmente amidado;
y a condición de que cuando Xaa² en la posición 43 o Xaa³ en la posición 44 sea Cys, entonces, cualquiera de ellos
o ambos están opcionalmente PEGilados.

2. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 en el que Xaa¹ is Nal.

3. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 en el que Xaa¹ is Phe.

10 4. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que Xaa² y Xaa³ están ambos
ausentes.

5. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que Xaa² y Xaa³ son cada uno Cys.

6. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la reivindicación 5 en el que, bien la Cys
en la posición 43 o bien la Cys en la posición 44, o ambas están PEGiladas con una molécula PEG de 18 a 22 kDa.

15 7. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 6 en el que la molécula PEG es de 20 a 21 kDa.

8. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 6 en el que la molécula PEG es de 20 kDa.

9. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o las reivindicaciones 5 a 8 en el que cada
PEG es lineal.

20 10. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en el que el aminoácido C-terminal está
amidado.

11. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o las reivindicaciones 5 a 10 que
comprende la secuencia:

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-
Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Arg-Ala-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-
Aib-Lys-Gly-Lys-Lys-Gln-Glu-Trp-Lys-His-Gln-Ile-Thr-Gln-
Cys (PEG20K) -Cys (PEG20K) (SEQ ID NO: 2)

en la que el grupo carboxilo de la Cys PEGilada en la posición 44 está amidado.

25 12. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o las reivindicaciones 5 a 10 que
comprende la secuencia:

Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Aib-Leu-
Asp-Lys-Ile-Ala-Gln-Arg-Ala-Nal-Val-Gln-Trp-Leu-Ile-Ala-
Aib-Lys-Gly-Lys-Lys-Gln-Glu-Trp-Lys-His-Gln-Ile-Thr-Gln-
Cys (PEG20K) -Cys (PEG20K) (SEQ ID NO: 3)

en la que el grupo carboxilo de la Cys PEGilada en la posición 44 está amidado.

30 13. Una formulación farmacéutica que comprende un péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 con
un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptables.

14. Una formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13 que comprende uno o más de otros agentes
terapéuticos adicionales.

15. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en terapia.

16. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en el tratamiento de la diabetes mellitus.

17. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en el tratamiento de la pérdida de peso.