



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 271 218**

51 Int. Cl.:
C07K 14/595 (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Número de solicitud europea: **02704898 .2**
86 Fecha de presentación : **28.02.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1363945**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **26.11.2003**

54 Título: **Derivados modificados de CCK-8.**

30 Prioridad: **01.03.2001 GB 0105069**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2007

73 Titular/es: **Uutech Limited**
University House
Coleraine, County Londonderry BT52 1SA, GB

72 Inventor/es: **Flatt, Peter, Raymond y**
O'Harte, Finbarr, Paul, Mary

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 271 218 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

Derivados modificados de CCK-8.

5 La presente invención se refiere a la regulación de la alimentación y el control de metabolismo energético. De forma más particular la invención se refiere al uso de péptidos para suprimir ingesta de alimentos y a preparaciones farmacéuticas para el tratamiento de obesidad y diabetes tipo 2.

10 Colecistoquinina (CCK), es una hormona neuropeptídica que se encuentra en el cerebro y secretada por las células endocrinas del intestino, que se identificó en un principio por su capacidad de estimular la contracción de la vesícula. Ahora se sabe que CCK desempeña un papel significativo en muchos procesos fisiológicos incluyendo la regulación de la saciedad, la motilidad intestinal, el vaciado gástrico, la secreción de insulina, la secreción pancreática enzimática y la neurotransmisión. CCK existe en múltiples formas moleculares en la circulación variando entre 58, 39, 33, 22, 8 y 4 aminoácidos de longitud. CCK-33 fue la primera forma purificada a partir de intestino porcino. El octapéptido del extremo C CCK-8 está bien conservado entre especies y es la forma más pequeña que conserva todo el abanico de actividades biológicas. Tras la ingestión de grasa y proteína alimenticias, una variedad de las formas moleculares de CCK es segregada por las células endocrinas de la mucosa que están localizadas principalmente en el duodeno y en el yeyuno proximal. Una vez liberada, CCK-8 ejerce su acción biológica en diversos tejidos diana del cuerpo, de una forma neurocrina, paracrina o endocrina. Estas acciones son mediadas por dos subgrupos principales de receptores CCKA (subtipo periférico) y CCKB (subtipo cerebral). Antagonistas específicos de los receptores tales como as proglumida han ayudado a comprender la acción de CCK sobre la ingesta de alimentos.

25 La implicación de CCK en el control de la ingesta de alimentos en los roedores se reconoció a principios de los 70 y desde entonces se ha demostrado que esta hormona peptídica reduce la alimentación en el hombre y en diversas especies animales. La inducción de la saciedad es una característica común en las diferentes especies pero el mecanismo por el que se consigue no se comprende bien. Sin embargo, se sabe que muchos tejidos diferentes poseen receptores específicos para CCK incluyendo el nervio vago, el esfínter pilórico y el cerebro, todos los cuales están implicados en este mecanismo de control. Se ha propuesto que CCK estimula los receptores del intestino que activan el nervio vago, que transmite un mensaje a los centros de saciedad del hipotálamo. Apoyando este concepto, se ha encontrado que los efectos saciantes de CCK se eliminan en los animales vagotomizados. Además, los estudios en roedores han indicado que CCK tiene una capacidad saciante más potente cuando se administra por vía intraperitoneal en lugar de por vía central. Se cree que CCK-8 intraperitoneal actúa de forma local en lugar de hormonal. Además, se sabe que CCK8 no cruza la barrera hematoencefálica.

35 Sin embargo, otros indicios sugieren que CCK tiene una influencia neuronal clara sobre la ingesta de alimentos en el sistema nervioso central. Algunos trabajos en perros han sugerido que los niveles en circulación de CCK eran demasiado bajos para inducir efectos saciantes. Sin embargo, estudios en cerdos inmunizados contra CCK revelaron que estos animales aumentaban la ingesta de alimentos y presentaban una subida de peso acelerada comparando con los animales de control. Además, los antagonistas del receptor CCK aumentaron la ingesta de alimentos en cerdos y disminuyeron la saciedad en los seres humanos. En conjunto, los estudios anteriores indican que CCK desempeña un papel significativo en la regulación de la ingesta de alimentos en mamíferos.

45 Se ha considerado que CCK-8 es una señal de saciedad a corto plazo relacionada con la comida, mientras que el producto del gen OB leptina descubierto recientemente, es más probable que actúe como señal de adiposidad que puede reducir la ingesta total de alimentos a largo plazo. De hecho, algunos investigadores han sugerido que CCK-8 y leptina actúan de forma sinérgica controlando la alimentación a largo plazo en los ratones.

50 El objetivo de la presente invención es proporcionar análogos eficaces de CCK-8. Un objetivo de la invención es proporcionar fármacos para el tratamiento de obesidad y/o diabetes tipo 2. Un compuesto similar para uso pertinente se describe en Diabetes, 47(10) páginas 1619-1624 (1998). De acuerdo con la presente invención se proporciona un análogo peptídico de CCK-8 eficaz biológicamente activo, que tiene características mejoradas para el tratamiento de obesidad y/o diabetes tipo 2, en el que el análogo está modificado mediante la extensión en el extremo N mediante pGlu-Gln en Asp¹ o N-alkilación, N-acetilación, N-acilación o N-isopropilación de Asp¹ y el análogo no tiene más de una sustitución o modificación de aminoácidos tal como se describe más adelante sin incluir Asp¹-glucitol CCK-8.

55 La estructura primaria de CCK-8 humana se muestra a continuación: Asp¹Tyr²(SO₃H)-Met³Gly⁴Trp⁵Met⁶Asp⁷Phe⁸ amida.

60 Los análogos de la presente solicitud de patente se representan mediante la fórmula anterior con una extensión en el extremo y otra modificación tal como se indica más adelante.

El análogo puede incluir la modificación mediante la adición de ácidos grasos (por ejemplo, palmitoilo) en el grupo α -amino de Asp¹.

65 Los análogos de CCK-8 pueden tener una capacidad mejorada de inhibir la ingesta de alimentos, de estimular la secreción de insulina, de potenciar la eliminación de glucosa o pueden mostrar una estabilidad mejorada en plasma comparados con CCK-8 natural. También pueden poseer resistencia mejorada a la degradación mediante exopeptidasas y endopeptidasas naturales.

ES 2 271 218 T3

Cualquiera de estas propiedades potenciará la potencia del análogo como agente terapéutico.

Se incluyen los análogos que tienen una sustitución de D-aminoácido en CCK-8 y/o aminoácidos N-glicosados, N-alquilados, N-acetilados, N-acilados, N-isopropilados, N-piroglutamidados en la posición 1.

5

Diversas sustituciones de aminoácidos incluyen por ejemplo, sustitución de Met³ y/o Met⁶ por norleucina o ácido 2-aminohexanoico. Otras diversas sustituciones de uno o más aminoácidos por aminoácidos alternativos que incluyen la sustitución de Met³ por Thr, Met⁶ por Phe, Phe⁸ por N-metil-Phe.

10

Otros análogos estabilizados incluyen los que tienen un enlace peptídico isostero que sustituye el enlace peptídico normal entre los restos 1 y 2 así como en cualquier otro sitio dentro de la molécula. Estos diversos análogos deberían ser resistentes a las enzimas plasmáticas responsables de la degradación y la inactivación de CCK-8 *in vivo* incluyendo por ejemplo aminopeptidasa A.

15

En realizaciones particulares, la invención prevé un péptido que es más potente que CCK-8 en la inducción de la saciedad, en la inhibición de la ingesta de alimentos o en la moderación de las fluctuaciones de la glucosa, estando formado dicho péptido por CCK(1-8) o un fragmento menor con una o más modificaciones que se seleccionan del grupo formado por:

20

(i) extensión en el extremo N de CCK-8 mediante pGlu-Gln,

(ii) extensión en el extremo N de CCK-8 mediante pGlu-Gln con sustitución de Met⁸ por Phe,

25

(iii) sustitución del penúltimo Tyr²(SO₃H) por un Tyr fosforilado,

(iv) sustitución del penúltimo Tyr²(SO₃H) por Phe(pCH₂SO₃Na),

30

(v) sustitución de un aminoácido natural por un aminoácido alternativo que incluye: Met³ o Met⁶ por norleucina o ácido 2-aminohexanoico, Met³ por Thr, Met⁶ por Phe, Phe⁸ por N-metil-Phe,

(vi) la sustitución que se describe en (vii) anteriormente con o sin modificación en el extremo N de Asp¹ (por ejemplo, mediante acetilación, acilación, alquilación, pGlu-Gln, etc.),

35

(vii) modificación de Asp¹ mediante acetilación,

(viii) modificación de Asp¹ mediante acilación (por ejemplo, palmitato),

(ix) modificación de un resto Lys sustituido por un ácido graso (por ejemplo palmitato),

40

(x) modificación de Asp¹ mediante alquilación,

(xi) modificación de Asp¹ mediante conversión del enlace Asp¹-Tyr² en un enlace isostero no peptídico estable CH₂NH,

45

(xiii) conversión del enlace Tyr²-Met³ en un enlace psi [CH₂NH],

(xiv) conversión del enlace Met³-Gly⁴ en un enlace psi [CH₂NH],

(xv) conversión del enlace Met⁶-Asp⁷ en un enlace psi [CH₂NH],

50

(xvi) conversión de otro enlace peptídico en un enlace psi [CH₂NH],

(xxvii) CCK-8 sustituida por D-aminoácidos en un sitio,

55

(xxviii) CCK-8 sustituida por D-aminoácidos en uno o más sitios además de una modificación en el extremo N por ejemplo mediante acetilación, acilación, etc.,

(xix) CCK-8 retroinversa (sustituida por D-aminoácidos por todo el octapéptido y estructura primaria sintetizada en orden inverso),

60

(xx) formas acortadas truncadas en el en el extremo C de CCK-8 y formas cíclicas de CCK-8.

(xxi) La invención también prevé un procedimiento de modificar CCK-8 o sus análogos en el extremo N durante la síntesis. Preferiblemente, los agentes serían glucosa, anhídrido acético o ácido piroglutámico.

65

La invención también prevé el uso de un péptido tal como se define en la reivindicación 3 y otros análogos en la preparación de un medicamento para el tratamiento de obesidad y/o diabetes tipo 2.

ES 2 271 218 T3

La invención además prevé composiciones farmacéuticas mejoradas que incluyen péptidos de la invención con propiedades farmacológicas mejoradas.

De acuerdo con la presente invención también se prevé una composición farmacéutica de utilidad en el tratamiento de obesidad y/o diabetes tipo 2 que comprende una cantidad eficaz del péptido que se describe en el presente documento, mezclado con un excipiente farmacéuticamente aceptable para la administración por vía transdérmica, inhalación nasal, oral o inyectada. Dicho péptido debe administrarse solo o en politerapia con leptina, polipéptido amiloide de los islotes (IAPP) o bombesina (péptido de liberación de gastrina) nativos o sus análogos derivados.

La invención también prevé un procedimiento de modificación de CCK-8 y sus análogos en el extremo N. Este procedimiento en 3 etapas primero implica la síntesis en fase sólida desde el extremo C hasta Met³. Segundo, la adición de Tyr(tBu) a un sistema de burbujas manual en forma de una resina PAM protegida con Fmoc, la desprotección del Fmoc mediante piperidina en DMF y la reacción con un Asp(OtBu)-OH protegido con Fmoc, permitiendo continuar la reacción hasta que se complete, la eliminación del grupo protector Fmoc del dipéptido, la reacción del dipéptido con el agente modificador (por ejemplo, glucosa, anhídrido acético, palmitato, etc.), la eliminación de los grupos protectores de las cadenas laterales (tBu y OtBu) mediante ácido, la sulfatación del Tyr² con trióxido de azufre, la escisión del péptido de la resina en condiciones alcalinas. Tercero, el dipéptido modificado en el extremo N puede añadirse a la resina con el péptido del extremo C del sintetizador, seguido de escisión de la resina en condiciones alcalinas con amoniaco metanólico, y finalmente purificación del producto final usando procedimientos estándar.

A continuación se demostrará la invención con respecto a los siguientes ejemplos no limitantes y a las figuras, en las que:

La Figura 1 ilustra la degradación de CCK-8 y Asp¹-glucitol CCK-8 por el plasma.

La Figura 2 ilustra la no degradación de pGlu-Gln-CCK-8 por el plasma.

La Figura 3 ilustra el efecto de CCK-8, Asp¹-glucitol CCK-8 y pGlu-Gln CCK-8 sobre la ingesta de alimentos.

La Figura 4 ilustra el efecto de CCK-8 y Asp¹-glucitol CCK-8 sobre la ingesta de alimentos en ratones ob/ob.

La Figura 5 ilustra el efecto de diferentes dosis de CCK-8 sobre la ingesta de alimentos.

La Figura 6 ilustra el efecto de diferentes dosis de Asp¹-glucitol CCK-8 sobre la ingesta de alimentos.

La Figura 7 ilustra el efecto de diferentes dosis de pGlu-Gln CCK-8 sobre la ingesta de alimentos.

La Figura 8 ilustra el efecto de CCK-8 y leptina tanto solas como combinadas sobre la ingesta de alimentos.

La Figura 9 ilustra el efecto de CCK-8 e IAPP tanto solos como combinados sobre la ingesta de alimentos.

La Figura 10 ilustra el efecto de bombesina y pGlu-Gln CCK-8 sobre la ingesta de alimentos.

La Figura 11 ilustra el efecto de pGlu-Gln CCK-8 y leptina tanto solas como combinadas sobre la ingesta de alimentos.

La Figura 12 ilustra el efecto de pGlu-Gln CCK-8 y leptina tanto solas como combinadas sobre la ingesta de alimentos.

Ejemplo 1

Preparación de CCK-8 modificada en el extremo N y sus análogos

La modificación de CCK-8 en el extremo N es esencialmente un procedimiento en tres etapas. Primero, se sintetiza CCK-8 desde su extremo C (empezando a partir de una resina Fmoc-Phe-OCH₂-PAM, Novabiochem) hasta Met³ en un sintetizador peptídico automático (Applied Biosystems, CA, EE.UU.). La síntesis sigue los protocolos de la química peptídica Fmoc estándar utilizando otros aminoácidos protegidos de forma secuencial que incluyen Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Met-OH. La desprotección del Fmoc-Met del extremo N se realizará usando piperidina en DMF (al 20% v/v). El grupo OtBu se eliminará agitando en TFA/Anisol/DCM. Segundo, el penúltimo aminoácido de CCK-8 natural del extremo N (Tyr(tBu)) se añade a un sistema de burbujas manual en forma de una resina Tyr(tBu)-PAM protegida con Fmoc inestable en presencia de álcalis. Este aminoácido se desprotege en su extremo N (piperidina en DMF (2,0% v/v)). Éste después se deja reaccionar con un exceso de Fmoc-Asp(OtBu)-OH formando un dipéptido unido a resina Fmoc-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-PAM. Éste se desprotegerá en su extremo N (piperidina en DMF (20% v/v)) dejando un grupo α -amino libre. Éste se dejará reaccionar con anhídrido acético (acetilación), ácido piroglutámico (piroglutamilo) etc. durante hasta 24 horas según sea necesario para permitir que se complete la reacción. Se controlará si se ha completado la reacción usando la prueba de la ninhidrina que determinará la presencia de grupos α -amino libres disponibles. La desprotección de las cadenas laterales se logrará agitando en TFA/Anisol/DCM. La sulfatación del dipéptido modificado en el extremo N se logrará suspendiendo el péptido en

DMF/piridina y añadiendo complejo de trióxido de azufre y piridina agitando durante hasta 24 horas. Una vez se ha completado la reacción, el dipéptido del extremo N ahora modificado estructuralmente, que contiene el Tyr sulfatado, se escindiría de la resina PAM (en condiciones básicas con amoniaco metanólico) y con moléculas secuestradoras apropiadas. Tercero, se añadirá un exceso de 4 veces de Asp-Tyr(SO₃H)-OH modificado en el extremo N directamente al sintetizador peptídico automatizado, que hará proseguir la síntesis, uniendo así la región modificada en el extremo N al α -amino de CCK(Met³), completando la síntesis del análogo sulfatado de CCK. Este péptido se escinde de la resina PAM (tal como anteriormente en condiciones alcalinas) y después se purifica usando las técnicas estándar de filtración con Buchner, precipitación, rotoevaporación y secado. El filtrado se liofilizará antes de su purificación en una columna de HPLC semipreparativa Vydac C-18 (1,0 x 25 cm). La confirmación de la estructura de los análogos relacionados con CCK8 se realizará por espectrometría de masas (EM-IES y/o EM-MALDI).

Ejemplo 2

Efectos de los análogos de CCK-8 sobre la ingesta de alimentos

El siguiente ejemplo investiga la preparación de Asp¹-glucitol CCK-8 y pGlu-Gln CCK-8 junto con una evaluación de su eficacia en la inducción de la saciedad y disminución de la ingesta de alimentos *in vivo*. Los resultados demuestran claramente que estos análogos novedosos muestran una resistencia sustancial a la degradación por aminopeptidasa y una actividad biológica aumentada comparada con CCK-8 natural.

Diseño de la investigación y procedimientos

Materiales. El octapéptido colecistoquinina (CCK-8 sulfatada), pGlu-Gln CCK-8 y otros análogos se sintetizarán usando un sintetizador peptídico Applied Biosystems 432 (tal como se describe anteriormente). El acetonitrilo de calidad HPLC se obtuvo de Rathburn (Walkersburn, Escocia). El ácido trifluoroacético de calidad de secuenciación (TFA) se obtuvo de Aldrich (Poole, Reino Unido). Todo el agua que se usó en estos experimentos se purificó usando un sistema de purificación de agua Milli-Q, (Millipore Corporation, Millford, MA, EE. UU.). Todos los demás compuestos químicos comprados eran de Sigma, Poole, Reino Unido.

Preparación de Asp¹-glucitol CCK-8 y pGlu-Gln CCK-8. Asp¹-glucitol CCK-8 y pGlu-Gln CCK-8 se prepararon mediante un procedimiento en 3 etapas como el que se describe en el ejemplo 1. Los péptidos se purificaron en una columna de HPLC semi-preparativa Vydac C18 (1,0 x 25 cm) seguido de una columna analítica C-18 usando una elución en gradiente con los disolventes acetonitrilo/agua/TFA. La confirmación de la estructura de los análogos relacionados con CCK-8 se realizó mediante espectrometría de masas (EM-IES y/o EM-MALDI). Se cuantificaron las fracciones purificadas de CCK-8 de control y estructuralmente modificadas que se usaron para los estudios en animales (usando la columna Supelcosil C-8) comparando las áreas de los picos con una curva de patrones construida a partir de concentraciones conocidas de CCK-8 (0,78 - 25 μ g/ml).

Determinación de la masa molecular de Asp¹-glucitol CCK-8 y pGlu-Gln CCK-8 por espectrometría de masas con ionización por electrospray (EM-IES). Las muestras de CCK-8 y de análogos de CCK-8 estructuralmente modificados se purificaron por HPLC de fase inversa. Los péptidos se disolvieron (aproximadamente 400 pmol) en 100 μ l de agua y se aplicaron al espectrómetro de masas de sobremesa LCQ (Finnigan MAT, Hemel Hempstead, Reino Unido) equipado con una columna de HPLC C-18 microperforada (150 x 2,0 mm, Phenomenex, UK Ltd., Macclesfield). Las muestras (30 μ l en inyección directa al bucle) se inyectaron con un caudal de 0,2 ml/minuto, en condiciones isocráticas al 35% (v/v) acetonitrilo/agua. Los espectros de masas se obtuvieron a partir del analizador de masas con trampa de iones cuadrupolo y se registraron. Los espectros se obtuvieron en modo positivo y negativo usando el modo de barrido iónico completo en el intervalo de masa y carga (m/z) 150-2000. Las masas moleculares de los iones positivos de CCK-8 y análogos relacionados se determinaron a partir de los perfiles de EM-IES usando iones cargados múltiples prominentes y la siguiente ecuación $M_r = iM_i - iM_h$ (donde M_r = masa molecular; M_i = relación m/z; i = número de cargas; M_h = masa de un protón).

Efectos de CCK-8, Asp¹-glucitol CCK-8, pGlu-Gln CCK-8 y otros péptidos sobre la ingesta de alimentos en ratones. Se realizaron estudios para evaluar las potencias relativas de CCK-8 control, Asp¹-glucitol CCK-8, pGlu-Gln CCK-8 y otros péptidos implicados en la regulación de la alimentación usando ratones Swiss TO macho (n = 16) de 7-12 semanas de edad de una colonia originada en la Unidad de investigación biomédica y del comportamiento de la Universidad del Úlster. Los animales se alojaron individualmente en una sala con aire acondicionado a 22 \pm 2°C con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se administró agua potable a voluntad y una dieta estándar de mantenimiento de ratones (Trouw Nutrition, Cheshire, Reino Unido) durante tiempos diversos, tal como se indica más adelante. Los ratones se habituaron a un periodo de alimentación diario de 3 horas/día reduciendo progresivamente el periodo de alimentación durante un periodo de 3 semanas. Los días 1-6, se administró comida de las 10:00 a las 20:00 horas, los días 7-14 de 10:00 a 16:00 horas y los días 15-21 se restringió la comida de 10:00 a 13:00 horas. El peso corporal y la ingesta de comida y agua se controlaron a diario.

Los ratones que se habían habituado anteriormente a alimentarse durante 3 horas/día recibieron una única inyección i.p. de solución salina (0,9% p/v de NaCl, 10 ml/kg) en estado de ayuno (10:00 horas) e inmediatamente tras la inyección se restituyó la comida. Dos días después de la inyección de solución salina, los ratones se repartieron aleatoriamente en grupos de 7-8 animales a los que se administró una única inyección i.p. (de 1 a 100 nmol/kg) o bien de CCK-8, o de análogos de CCK-8 estructuralmente modificados y/u otras hormonas peptídicas (que incluían,

bombesina, leptina y polipéptido amiloide de los islotes (IAPP)). La ingesta de alimentos se controló cuidadosamente en intervalos de 30 minutos hasta 180 minutos de la inyección. En una serie de experimentos, se estudió la capacidad de CCK-8 y de Asp¹-glucitol CCK-8 de inhibir la actividad de alimentación en ratones adultos obesos hiperglucémicos (ob/ob) en ayunas durante toda la noche. Todos los estudios con animales se realizaron de acuerdo con la Animals (Scientific Procedures) Act, 1986.

Efectos del suero de ratón sobre la degradación de CCK-8

Asp¹-glucitol CCK-8 y pGlu-Gln CCK-8. Se incubó suero (20 μ l) de ratones Swiss TO en ayunas a 37°C con 10 μ g de CCK-8 natural, Asp¹-glucitol CCK-8 o pGlu-Gln CCK-8 durante periodos de hasta 2 horas en una mezcla de reacción (vol. final de 500 μ l) que contenía 50 mmol/l de tampón de trietanolamina y HCl a pH 7,8. La reacción se terminó mediante la adición de 5 μ l de TFA y el volumen final se ajustó a 1,0 ml usando TFA al 0,1% (v/v) en agua. Las muestras se centrifugaron (13.000 x g, 5 minutos) y el sobrenadante se aplicó a un cartucho C-18 Sep-Pak (Waters/Millipore) que previamente había sido cebado y lavado con TFA al 0,1% (v/v) en agua. Después de lavar con 20 ml de TFA al 0,12% en agua, el material unido se liberó mediante elución con 2 ml de acetonitrilo al 80% (v/v) en agua y se concentró usando una concentradora Speed-Vac (AES 1000, Savant). El volumen se ajustó a 1,0 ml con TFA al 0,1% (v/v) en agua y se aplicó a una columna Vydac C-18 (250 x 4,6 mm) previamente equilibrada con TFA al 0,12% (v/v) en agua a un caudal de 1,0 ml/minuto. La concentración de acetonitrilo en el disolvente de elución se elevó de 0 a 31,5% durante 15 minutos, de 31,5 a 38,5% durante 30 minutos, y de 38,5 a 70% durante 5 minutos, usando gradientes lineales controlando los picos eluidos a 206 nm.

Análisis estadístico. Los grupos de datos se presenta en términos de medias \pm DT. La evaluación estadística se realizó usando análisis de varianza, prueba de comparaciones múltiples de diferencias menos significativas y prueba t de Student's no pareada según fuera apropiado. Las diferencias se consideraban significativas si $P < 0,05$.

Resultados

Determinación de las masas moleculares. Tras la incubación, Asp¹-glucitol CCK-8 y pGlu-Gln CCK-8 se separaron claramente de CCK-8 natural en una columna de HPLC Vydac C-18. Las masas moleculares medias de CCK-8 (Mr 1064,2), Asp¹-glucitol CCK-8 (Mr 1228,4) y pGlu-Gln CCK-8 (Mr 1352,4) se determinaron por EM-IES, confirmando sus estructuras.

Degradación in vitro de CCK-8, Asp¹-glucitol CCK-8 y pGlu-Gln CCK-8. La Fig. 1 muestra una comparación de ejemplos típicos de trazas de HPLC tras la acción del suero de ratón *in vitro* en la degradación de CCK-8 (gráficos de la izquierda) o Asp¹-glucitol CCK-8 (gráficos de la derecha) en tiempo 0, 1 y 2 horas. CCK-8 intacta (pico A) y tres fragmentos separados de CCK-8 (picos B, C, D) eluyeron a los 22,18, 22,01, 19,81 y 18,98 minutos, respectivamente. Asp¹-glucitol CCK-8 (pico E, gráficos de la derecha) eluyó a los 21,65 minutos. La Tabla 1 resume el patrón de la descomposición de CCK-8 y Asp¹-glucitol CCK-8 en cada caso. A partir de los análisis de los datos de las áreas de los picos de la HPLC es evidente que 83,1% y 100% de la CCK-8 se convirtió en los fragmentos de CCK-8 después de 1 y 2 horas de incubación, respectivamente. Por el contrario, Asp¹-glucitol CCK-8 permaneció intacto después de 1 y 2 horas de incubación y no se detectaron fragmentos peptídicos adicionales. De forma similar, pGlu-Gln CCK-8 también era muy resistente a la degradación en plasma después de 2 horas (Fig. 2).

Ensayos de ingesta de alimentos. La ingesta de alimentos diaria de los ratones durante el periodo anterior de la administración de los péptidos que indicaba el consumo medio de alimento de los ratones a los que se permitía acceso a la comida durante 3 horas era de $3,8 \pm 0,2$ g/ratón. Tras la administración de solución salina i.p., no hubo diferencias significativas en la ingesta voluntaria de alimentos durante 3 horas ($3,66 \pm 0,1$ g) comparada con la ingesta de alimentos durante 3 horas sola. La Fig. 3 muestra que la inyección i.p. con CCK-8 tuvo un efecto inhibitorio sobre la ingesta voluntaria de alimentos a los 30, 60 y 90 minutos después del tratamiento comparada con la solución salina sola. Sin embargo, no existió una acción inhibitoria mantenida de CCK-8 sobre la ingesta de alimentos acumulada más allá de 90 minutos. Por el contrario, el efecto inhibitorio de Asp¹-glucitol CCK-8 y pGlu-Gln CCK-8 sobre la ingesta de alimentos se mantuvo durante el periodo de alimentación de 3 horas tras el tratamiento comparado con la respuesta a solución salina. Además, ambos péptidos CCK-8 estructuralmente modificados fueron significativamente más potentes en la reducción de la ingesta de alimentos en cada tiempo (excepto a los 30 minutos) comparados con la dosis equivalente de CCK-8. La Figura 4 muestra que CCK-8 y Asp¹-glucitol CCK-8 también redujeron significativamente la ingesta voluntaria de alimentos en ratones genéticamente obesos diabéticos (ob/ob). Asp¹-glucitol CCK-8 es considerablemente más potente que CCK-8 natural.

Los efectos de respuesta en función de la dosis de CCK-8, Asp¹-glucitol CCK-8 y pGlu-Gln CCK-8 sobre la ingesta de alimentos se muestran en las Figuras 5-7. Comparados con CCK-8 ambos péptidos estructuralmente modificados ejercieron efectos más prolongados a dosis menores. Tal como se muestra en las Figuras 8-10, CCK-8 o pGlu-Gln CCK-8 fueron considerablemente más potentes en términos equimolares que leptina, polipéptido amiloide de los islotes (IAPP) o bombesina en la inhibición de la ingesta de alimentos durante un periodo de 30-180 minutos. La combinación de CCK-8 con leptina o IAPP, de forma particular éste, produjo una potenciación muy marcada de la acción saciante (Figuras 8-9). La Fig. 10 muestra que tanto pGlu-Gln CCK-8 como bombesina son agentes anorécticos eficaces pero el primero tiene efectos de acción más prolongada. La Fig. 11 muestra que la combinación de CCK-8 con exendina (1-39) ha mejorado de forma particular la acción saciante. La administración de leptina con pGlu-Gln CCK-8 también produjo una inhibición de la ingesta de alimentos particularmente marcada y prolongada.

Discusión

El actual estudio examinó los efectos de CCK-8, Asp¹-glucitol CCK-8 y pGlu-Gln CCK-8 sobre la ingesta de alimentos en ratones. El presente estudio demostró que CCK-8 fue eficaz en la reducción de la ingesta de alimentos hasta 90 minutos después de la administración comparado con los controles de solución salina. Se investigaron los efectos de Asp¹-glucitol CCK-8 y pGlu-Gln CCK-8 sobre la ingesta de alimentos y se reveló que estos péptidos modificados en el extremo amino presentaban una capacidad notablemente mejorada y prolongada de reducir la ingesta voluntaria de alimentos comparando con una dosis equimolar de CCK-8 natural. La alteración de la estructura primaria mediante modificación en el extremo N de CCK-8 parece potenciar su actividad biológica y extender la duración de su acción en animales normales de 90 minutos a más de 3 horas. De hecho, los resultados también indican que puede persistir un potente efecto saciante durante más de 5 horas en ratones obesos diabéticos (ob/ob). El cambio en la actividad biológica que se encontró con Asp¹-glucitol CCK-8 y pGlu-Gln CCK-8 extiende las observaciones de que la glicación de péptidos puede alterar sus actividades biológicas. Merece la pena destacar que los experimentos de control realizados con tGLP-1 glicado indican que la presencia de un aducto de glucitol en el extremo amino de un péptido, es insuficiente por sí solo para inducir la saciedad en este sistema de pruebas.

El hecho de que Asp¹-glucitol CCK-8 y pGlu-Gln CCK-8 potencien la supresión del apetito presenta la cuestión de un posible mecanismo. Dado que la semivida de CCK-8 de 1-2 minutos se acepta generalmente como explicación de un efecto saciante transitorio del péptido, es posible que la modificación del extremo amino de CCK-8 prolongue la semivida protegiéndolo del ataque de aminopeptidasa potenciando así su actividad. Se ha demostrado que aminopeptidasa A degrada directamente CCK-8 *in vivo* hidrolizando el enlace Asp-Tyr. El péptido también puede ser degradado por endopeptidasa neutra 24.11 (NEP), endopeptidasas de tiol o serina y enzima convertidora de angiotensina. El presente estudio reveló que Asp¹-glucitol CCK-8 y pGlu-Gln CCK-8 eran extremadamente resistentes a la degradación por peptidasas en suero. Así, parece probable que la protección del extremo amino de CCK-8 con glucitol o un aducto de piroglutamilo y Gln mejore la semivida de CCK-8 glicada en circulación y contribuya así a la potenciación de su actividad biológica extendiendo la duración de su acción *in vivo*.

Se han propuesto diversos mecanismos para explicar la acción de CCK en la reducción de la ingesta de alimentos. Una hipótesis es que tras la ingestión de alimento, la distensión gástrica y la absorción de nutrientes provoquen la liberación de CCK-8 lo que termina la alimentación. Se propone que CCK-8 contrae el esfínter pilórico y además relaja el estómago proximal, lo que conjuntamente retrasa el vaciado gástrico. La rama gástrica del nervio vago tiene una relación muy estrecha con la mediación de la acción de CCK-8. La señal de saciedad parece transmitirse del nervio vago al hipotálamo mediante el *nucleus tractus solitarius* y la zona postrema.

Aunque se ha prestado mucha atención a las acciones y posible uso terapéutico de la leptina y NIDDM en la obesidad, Asp¹-glucitol CCK-8, pGlu-Gln CCK-8 u otros análogos de CCK-8 estructuralmente modificados pueden potencialmente presentar un número de atributos significativos comparados con leptina. Primero, existen indicios crecientes de defectos en el receptor de leptina y en la señalización posterior al receptor en ciertas formas de obesidad y diabetes. Segundo, CCK-8 presenta potentes acciones periféricas, mientras que leptina actúa a nivel central y requiere su paso a través de la membrana hematoencefálica. Tercero, los efectos de CCK-8 sobre la ingesta de alimentos son inmediatos mientras que la acción de leptina requiere una dosificación elevada y es prolongada. Cuarto, se ha demostrado que CCK actúa como una hormona de la saciedad en los seres humanos a concentraciones fisiológicas y un inhibidor específico de la degradación de CCK demuestra efectos prosaciantes en las ratas. También es interesante observar que los efectos de CCK-8 administrado junto con leptina, IAPP, exendina (1-39) o bombesina sobre la saciedad son aditivos, aumentando la posibilidad de mecanismos complementarios y tratamientos combinados.

En resumen, este estudio demuestra que CCK-8 puede ser fácilmente modificada estructuralmente en el extremo amino y que Asp¹-glucitol CCK-8 o pGlu-Gln CCK-8 administradas por vía intraperitoneal, en particular, presentan una acción saciante notablemente mejorada *in vivo*, debido en parte a la protección contra las aminopeptidasas en suero. Estos datos indican claramente el potencial de los análogos de CCK-8 modificadas en el extremo N para inhibir la alimentación y sugieren un posible uso terapéutico en los seres humanos en el tratamiento de obesidad y trastornos metabólicos relacionados.

Leyendas de las figuras

Fig. 1 Perfiles de HPLC de CCK-8 y Asp¹-glucitol CCK-8 tras la incubación con suero durante 0, 1 y 2 horas en una columna Vydac C18. Se muestran trazas representativas para CCK-8 (gráficos de la izquierda) y Asp¹-glucitol CCK-8 (gráficos de la derecha). Las incubaciones de Asp¹-glucitol CCK-8 y CCK-8 se separaron usando gradientes lineares de acetonitrilo de 0% a 31,5% durante 15 minutos seguido de 31,5% a 38,5% durante 30 minutos y de 38,5% a 70% de acetonitrilo durante 5 minutos. El Pico A corresponde a CCK-8 intacto; los picos B, C y D a fragmentos de CCK-8; y el pico E a Asp¹-glucitol CCK-8.

Fig. 2 Perfiles de HPLC de pGlu-Gln CCK-8 tras la incubación con suero durante 0 y 2 horas en una columna Vydac C-18. Se muestran trazas representativas para pGlu-Gln CCK-8 después de 0 horas (gráfico de la izquierda) y 2 horas (gráfico de la derecha). Las incubaciones de pGlu-Gln CCK-8 se separaron usando gradientes lineares de acetonitrilo de 0% a 31,5% durante 15 minutos seguido de 31,5% a 38,5% durante 30 minutos y 38,5% a 70% de acetonitrilo durante 5 minutos. El único pico que eluyó a 0 y 2 horas corresponde a pGlu-Gln CCK-8 intacto.

ES 2 271 218 T3

Fig. 3 Efecto de CCK-8, Asp¹-glucitol CCK-8, pGlu-Gln CCK-8 o solución salina sobre la ingesta voluntaria de alimentos en ratones Swiss TO. Se administró solución salina o agentes de experimentación mediante inyección i.p. (100 nmol/kg) a ratones en ayunas a tiempo 0 inmediatamente antes de la introducción del alimento. Se controló la ingesta de alimentos acumulada a los 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos de la inyección. Los valores son medias ± DT de 7-8 observaciones (n = 16 para los controles con solución salina). Las diferencias significativas se indican mediante *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 comparando con solución salina en el mismo tiempo y ΔP<0,05, ΔΔP<0,01 comparando con CCK-8 natural.

Fig. 4 Efecto de CCK-8, Asp¹-glucitol CCK-8 o solución salina sobre la ingesta voluntaria de alimentos en ratones obesos diabéticos (ob/ob). Se administró solución salina o agentes de experimentación mediante inyección i.p. (100 nmol/kg) a ratones obesos diabéticos (ob/ob) en ayunas a tiempo 0 inmediatamente antes de la introducción de alimento. Se controló la ingesta de alimentos acumulada a los 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 y 300 minutos de la inyección. Los valores son medias ± DT de 8 observaciones. Las diferencias significativas se indican mediante *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 comparando con solución salina en el mismo tiempo y ΔP<0,05, ΔΔP<0,001 comparando con CCK-8 natural.

Fig. 5 Efecto de diferentes dosis de CCK-8 o solución salina sobre la ingesta voluntaria de alimentos en ratones Swiss TO. Se administró solución salina o agentes de experimentación mediante inyección i.p. (1 a 100 nmol/kg) a ratones en ayunas a tiempo 0 inmediatamente antes de la introducción de alimento. Se controló la ingesta de alimentos acumulada a los 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos de la inyección. Los valores son medias ± DT de 7-8 observaciones (n = 16 para los controles con solución salina). Las diferencias significativas se indican mediante *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 comparando con solución salina en el mismo tiempo.

Fig. 6 Efecto de diferentes dosis de Asp¹-glucitol CCK-8 o solución salina sobre la ingesta voluntaria de alimentos en ratones Swiss TO. Se administró solución salina o agentes de experimentación mediante inyección i.p. (1 a 100 nmol/kg) a ratones en ayunas a tiempo 0 inmediatamente antes de la introducción de alimento. La ingesta de alimento acumulada se controló a los 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos de la inyección. Los valores son medias ± DT de 7-8 observaciones (n = 16 para los controles con solución salina). Las diferencias significativas se indican mediante *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 comparando con solución salina en el mismo tiempo.

Fig. 7 Efecto de diferentes dosis de pGlu-Gln CCK-8 o solución salina sobre la ingesta voluntaria de alimentos en ratones Swiss TO. Se administró solución salina o agentes de experimentación mediante inyección i.p. (1 a 100 nmol/kg) a ratones en ayunas a tiempo 0 inmediatamente antes de la introducción de alimento. Se controló la ingesta de alimentos acumulada a los 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos de la inyección. Los valores son medias ± DT de 7-8 observaciones (n = 16 para los controles con solución salina). Las diferencias significativas se indican mediante *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 comparando con solución salina en el mismo tiempo.

Fig. 8 Efecto de CCK-8, leptina, CCK-8 y leptina combinadas, así como solución salina sobre la ingesta voluntaria de alimentos en ratones Swiss TO. Se administró solución salina o agentes de experimentación solos (100 nmol/kg) o combinados (100 nmol/kg de cada uno) mediante inyección i.p. a ratones en ayunas a tiempo 0 inmediatamente antes de la introducción de alimento. Se controló la ingesta de alimentos acumulada a los 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos de la inyección. Los valores son medias ± DT de 7-8 observaciones. Las diferencias significativas se indican mediante **P<0,01 comparando con solución salina y ΔΔP<0,01 comparando con leptina sola en el mismo tiempo.

Fig. 9 Efecto de CCK-8, IAPP, CCK-8 e IAPP combinados, así como solución salina sobre la ingesta voluntaria de alimentos en ratones Swiss TO. Se administró solución salina o agentes de experimentación solos (100 nmol/kg) o combinados (100 nmol/kg de cada uno) mediante inyección i.p. a ratones en ayunas a tiempo 0 inmediatamente antes de la introducción de alimento. Se controló la ingesta de alimentos acumulada a los 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos de la inyección. Los valores son medias ± DT de 7-8 observaciones. Las diferencias significativas se indican mediante **P<0,01 comparando con solución salina y ΔΔP<0,01 comparando con IAPP solo en el mismo tiempo.

Fig. 10 Efecto de pGlu-Gln CCK-8, bombesina, así como solución salina sobre la ingesta voluntaria de alimentos en ratones Swiss TO. Se administró solución salina o agentes de experimentación solos (100 nmol/kg) o combinados (100 nmol/kg de cada uno) mediante inyección i.p., a ratones en ayunas a tiempo 0 inmediatamente antes de la introducción de alimento. Se controló la ingesta de alimentos acumulada a los 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos de la inyección. Los valores son medias ± DT de 7-8 observaciones. Las diferencias significativas se indican mediante **P<0,01 comparando con solución salina y ΔΔP<0,01 comparando con bombesina sola en el mismo tiempo.

Fig. 11 Efecto de CCK-8, exendina (1-39), CCK-8 y exendina (1-39) combinadas, así como solución salina sobre la ingesta voluntaria de alimentos en ratones Swiss TO. Se administró solución salina o agentes de experimentación solos (50 y 100 nmol/kg, respectivamente) o combinados mediante inyección i.p. a ratones en ayunas a tiempo 0 inmediatamente antes de la introducción de alimento. Se controló la ingesta de alimentos acumulada a los 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos de la inyección. Los valores son medias ± DT de 7-9 observaciones. Las diferencias significativas se indican mediante *P<0,05 **P<0,01 ***P<0,001 comparando con solución salina y ΔP<0,05 ΔΔP<0,01, ΔΔΔP<0,001 comparando con exendina (1-39) sola en el mismo tiempo.

Fig. 12 Efecto de pGlu-Gln CCK-8, leptina, pGlu-Gln CCK-8 y leptina combinadas, así como solución salina sobre la ingesta voluntaria de alimentos en ratones Swiss TO. Se administró solución salina o agentes de experimentación

ES 2 271 218 T3

solos (pGlu-Gln CCK-8 50 mmol/kg; leptina 100 nmol/kg) o combinados mediante inyección i-p. a ratones en ayunas a tiempo 0 inmediatamente antes de la introducción de alimento. Se controló la ingesta de alimentos acumulada a los 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos de la inyección. Los valores son medias \pm DT de 7-8 observaciones. Las diferencias significativas se indican mediante *P<0,05 **P<0,01 ***P<0,001 comparando con solución salina y Δ P<0,05 $\Delta\Delta$ P<0,01 $\Delta\Delta\Delta$ P<0,001 comparando con leptina sola en el mismo tiempo.

TABLA 1

Efecto del suero sobre la degradación in vitro de CCK-8 y CCK-8 glicada

Tiempo de incubación (horas)	Identidad del pico	Tiempo de retención del pico (minutos)	% del material tipo CCK total
CKK-8			
0	CCK-8 (A)	22,18	100
1	Fragmento (C) de CCK-8	19,81	43,8
	Fragmento (B) de CCK-8	22,01	39,3
	CCK-8 (A)	22, 18	16,9
2	Fragmento (D) de CCK-8	18,98	11,8
	Fragmento (C) de CCK-8	19,81	29,5
	Fragmento (B) de CCK-8	22,01	58,7
	CCK-8 (A)	22,18	0
CCK-8 glicada			
0	CCK-8 glicada	21,65	100
1	CCK-8 glicada	21,65	100
2	CCK-8 glicada	21,65	100

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de modificar CCK-8 y sus análogos en el extremo N que comprende las etapas de síntesis en fase sólida del extremo C hasta Met³, adición de Tyr(tBu) en forma de una resina PAM protegida con Fmoc, desprotección del Fmoc mediante piperidina en DMF y reacción con un Asp(OtBu)-OH protegido con Fmoc, permitiendo continuar la reacción hasta que se complete, eliminación del grupo protector Fmoc del dipéptido, reacción del dipéptido con un agente modificador, eliminación de los grupos protectores de las cadenas laterales (tBu y OtBu) mediante ácido, sulfatación del Tyr² con trióxido de azufre, escisión del péptido de la resina en condiciones alcalinas.

2. Un procedimiento tal como se reivindica en la reivindicación 1 que además incluye la etapa de añadir el dipéptido modificado en el extremo N a la resina con péptidos en el extremo C en el sintetizador, seguido de escisión de la resina en condiciones alcalinas con amoníaco metanólico.

3. Un péptido para el tratamiento de obesidad y/o diabetes tipo 2, estando constituido dicho péptido por la estructura primaria:



en el que dicha estructura primaria se modifica mediante extensión en el extremo N por pGlu-Gln en Asp¹ o N-alquilación, N-acetilación, N-acilación o N-isopropilación de Asp¹, y opcionalmente una sustitución o modificación adicional de un aminoácido, o una modificación del enlace peptídico, en el que dicha sustitución o modificación adicional de un aminoácido es en un resto aminoacídico distinto de Asp¹;

en el que dicha sustitución o modificación adicional de un aminoácido, o una modificación de enlace peptídico consisten en:

(i) sustitución de Met⁸ por Phe, en el que dicha modificación de la estructura primaria es por extensión en el extremo N mediante pGlu-Gln,

(ii) sustitución del penúltimo Tyr²(SO₃H) por un Tyr fosforilado,

(iii) sustitución del penúltimo Tyr²(SO₃H) por Phe(pCH₂SO₃Na),

(iv) sustitución de un aminoácido natural por un aminoácido alternativo que incluye: Met³ o Met⁶ por norleucina o ácido 2-aminohexanoico, Met³ por Thr, Met⁶ por Phe, Phe⁸ por N-metil-Phe,

(v) modificación de un resto Lys sustituido por un ácido graso (por ejemplo, palmitato),

(vi) conversión del enlace Asp¹-Tyr² en un enlace isostero no peptídico CH₂NH estable,

(vii) sustitución de un enlace peptídico entre dos restos adyacentes por un enlace peptídico isostero,

(viii) conversión del enlace Tyr²-Met³ en un enlace psi [CH₂NH],

(ix) conversión del enlace Met³-Gly⁴ en un enlace psi [CH₂NH],

(x) conversión del enlace Met³-Asp⁷ en un enlace psi [CH₂NH],

(xi) conversión de otro enlace peptídico en un enlace psi [CH₂NH],

(xii) CCK-8 sustituida por un D-aminoácido en un sitio,

(xix) CCK-8 retroinversa (sustituida por D-aminoácidos por todo el octapéptido y estructura primaria sintetizada en orden inverso),

(xiv) eliminación de Phe⁸,

4. El péptido tal como se reivindica en la reivindicación 3, en el que dicha extensión en el extremo N consiste en la extensión mediante pGlu-Gln, o N-alquilación o N-isopropilación.

5. El péptido tal como se reivindica en la reivindicación 4, en el que dicha extensión en el extremo N consiste en la extensión mediante pGlu-Gln.

6. El péptido tal como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que dicha estructura primaria no comprende dicha sustitución o modificación adicional de un aminoácido.

7. El péptido tal como se reivindica en una cualquiera de reivindicaciones 3 a 5, en el que la modificación en el extremo N es la acilación en el extremo N mediante un ácido graso en el grupo α-amino de Asp¹.

ES 2 271 218 T3

8. El péptido tal como se reivindica en una cualquiera de reivindicaciones 3 a 5, en el que la modificación adicional del aminoácido consiste en una sustitución por D-aminoácido.

5 9. El péptido tal como se reivindica en una cualquiera de reivindicaciones 3 a 5, en el que además la sustitución de aminoácido consiste en sustitución de Met³ por norleucina, ácido 2-aminohexanoico o Thr, sustitución de Met⁶ por norleucina, ácido 2-aminohexanoico o Phe, o sustitución de Phe⁸ por N-metil-Phe.

10 10. Un péptido tal como se reivindica en una cualquiera de reivindicaciones 3 a 5, en el que la modificación de aminoácido adicional consiste en:

10 (i) sustitución del Tyr²(SO₃H) por un Tyr fosforilado,

(ii) sustitución del Tyr²(SO₃H) por Phe(pCH₂O₃Na).

15 (iii) sustitución de un resto aminoacídico por un resto Lys con un ácido graso (por ejemplo, palmitato) en el grupo ε-amino del resto Lys o

20 (iv) sustitución de cada resto con D-aminoácidos sintetizados en orden inverso al que se muestra en la SEC. ID. N.º: 1.

11. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicha modificación adicional comprende la eliminación de Phe⁸.

25 12. Un péptido tal como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que al menos un enlace peptídico es reemplazado por un enlace peptídico isostero.

13. Un péptido tal como se reivindica en la reivindicación 12, en el que está presente un enlace peptídico isostero entre los restos Asp¹ y Tyr² (SO₃H).

30 14. Uso de un péptido tal como se reivindica en una cualquiera de reivindicaciones 3 a 13 en la preparación de un medicamento para inhibir la ingesta de alimentos, inducir la saciedad, estimular la secreción de insulina, moderar las fluctuaciones de la glucosa en sangre, potenciar la eliminación de glucosa y/o exhibir una estabilidad mejorada en plasma comparada con CCK-8 natural.

35 15. El uso de un péptido tal como se reivindica en una cualquiera de reivindicaciones 3 a 13 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de obesidad y/o diabetes tipo 2.

40 16. Una composición farmacéutica que incluye un péptido de acuerdo con una cualquiera de reivindicaciones 3 a 13.

45 17. Una composición farmacéutica de utilidad en el tratamiento de obesidad y/o diabetes tipo 2 que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 3 a 13 mezclada con un excipiente farmacéuticamente aceptable para la administración por vía transdérmica, inhalación nasal, oral o inyectada.

50 18. Una composición farmacéutica tal como se reivindica en la reivindicación 17 que además comprende leptina, exendina, polipéptido amiloide de los islotes (IAPP) o bombesina (péptido de liberación de gastrina) naturales o sus análogos derivados.

50

55

60

65

Fig. 1 Perfiles de HPLC de CCK-8 y Asp¹-glucitol CCK-8 tras la incubación con suero durante 0, 1 y 2 horas en una columna Vydac C-18

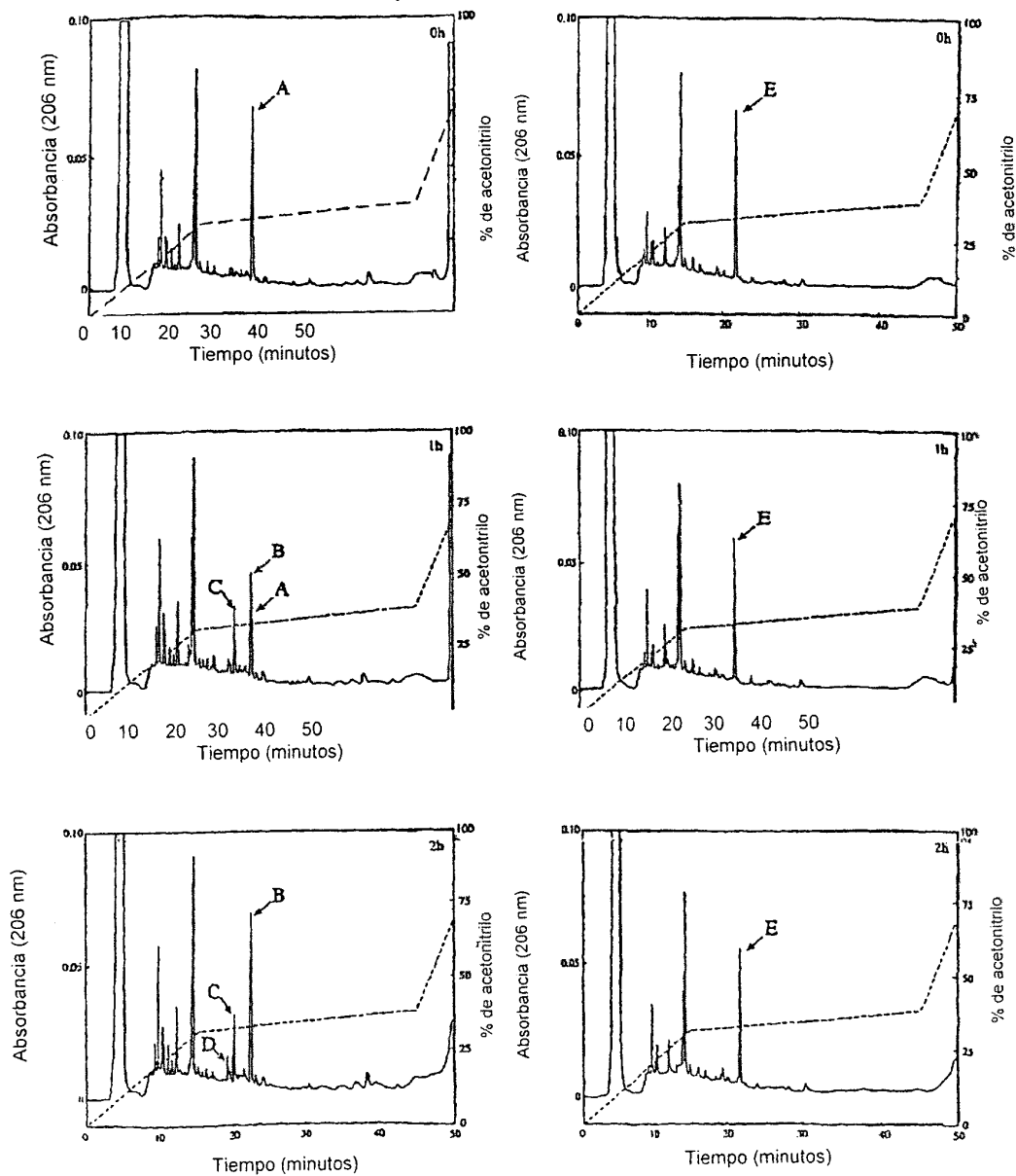


Fig. 2 Perfiles de HPLC de pGlu-Gln CCK-8 tras la incubación con suero durante 0 y 2 horas en una columna Vydac C-18

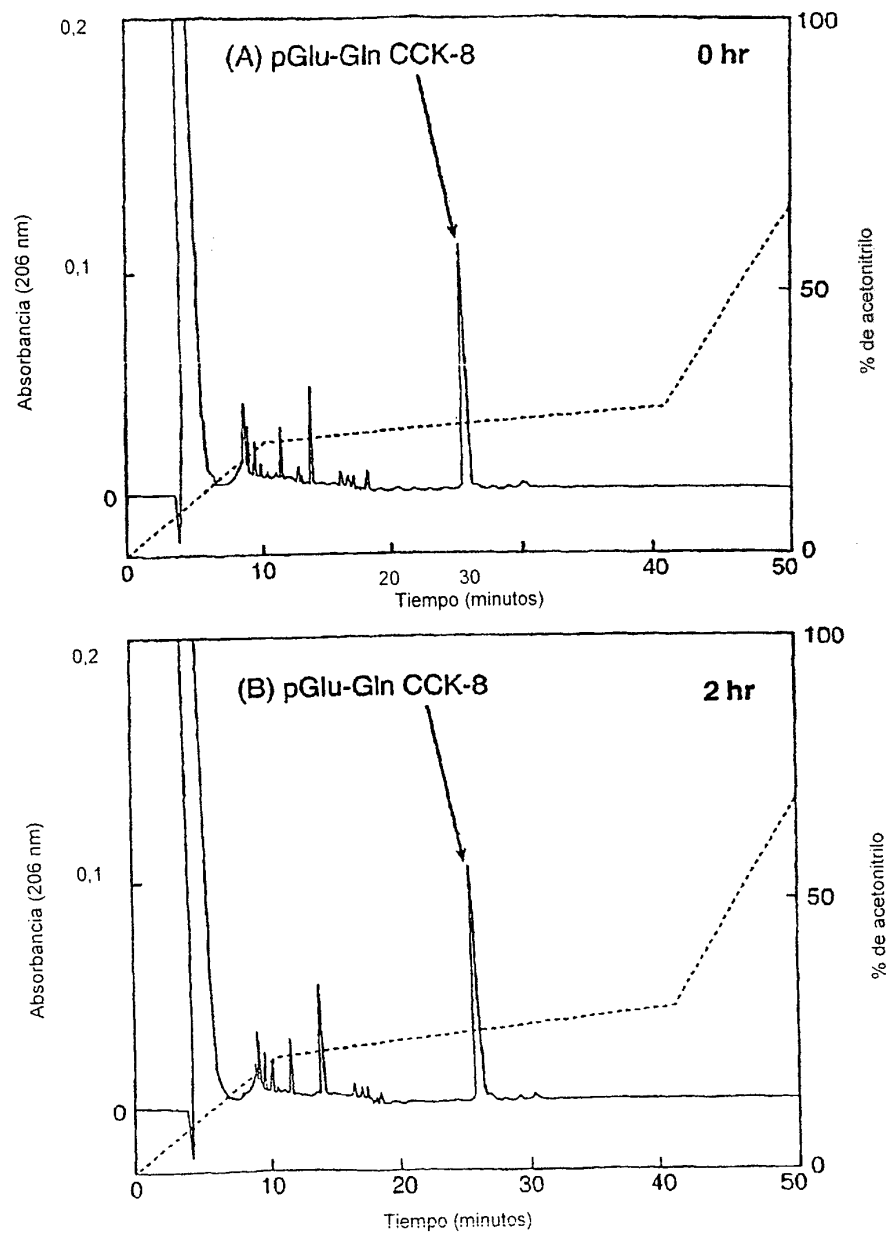
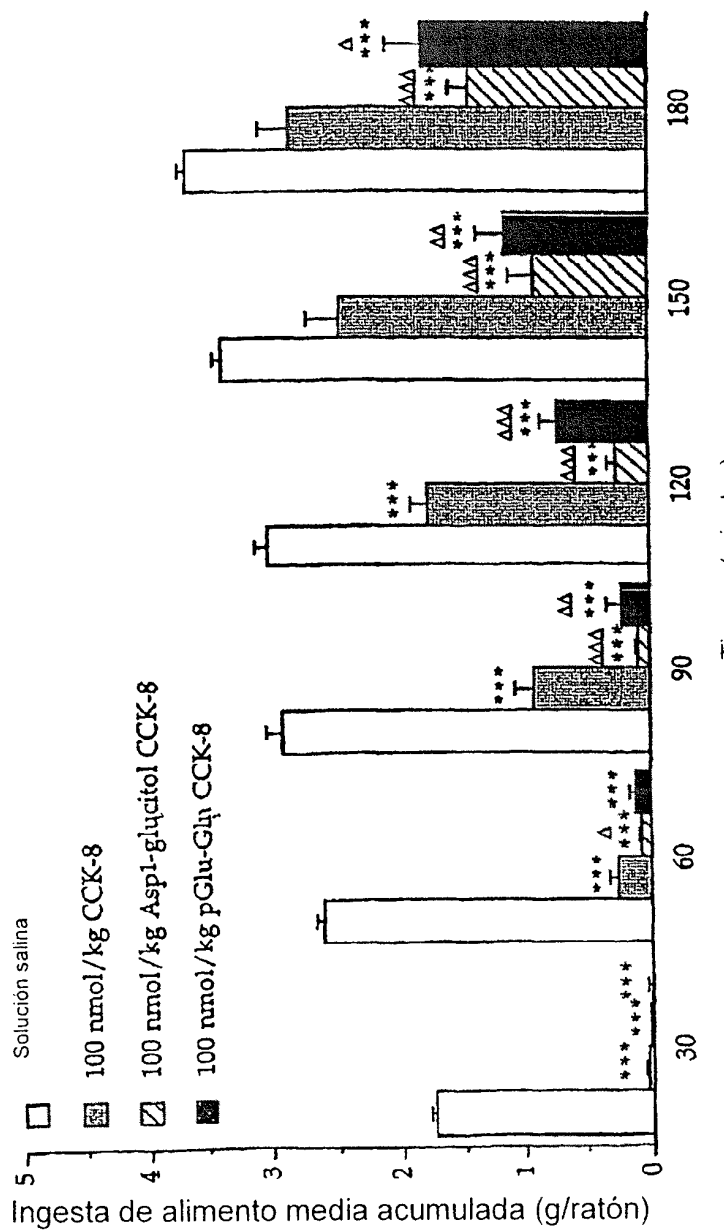
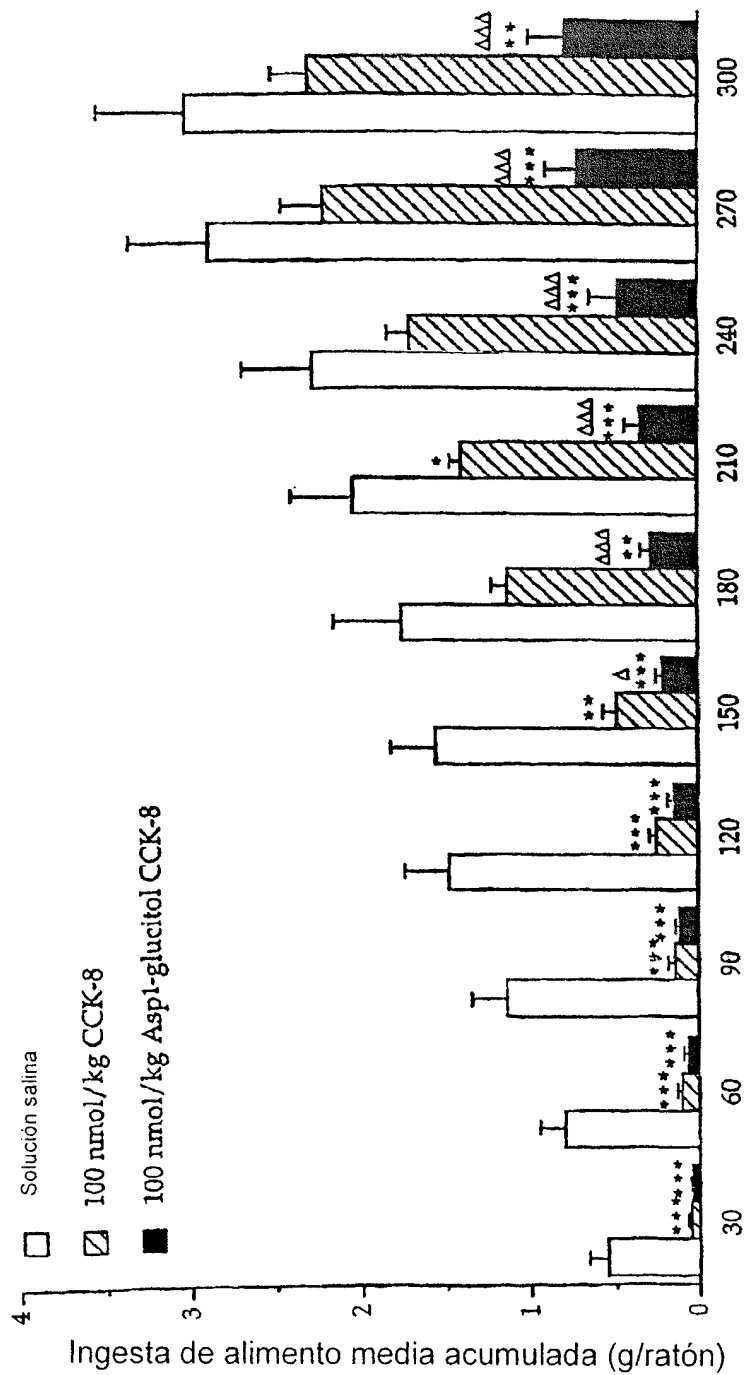


Fig. 3 Efectos de diferentes análogos de CCK-8 sobre la ingesta de alimento



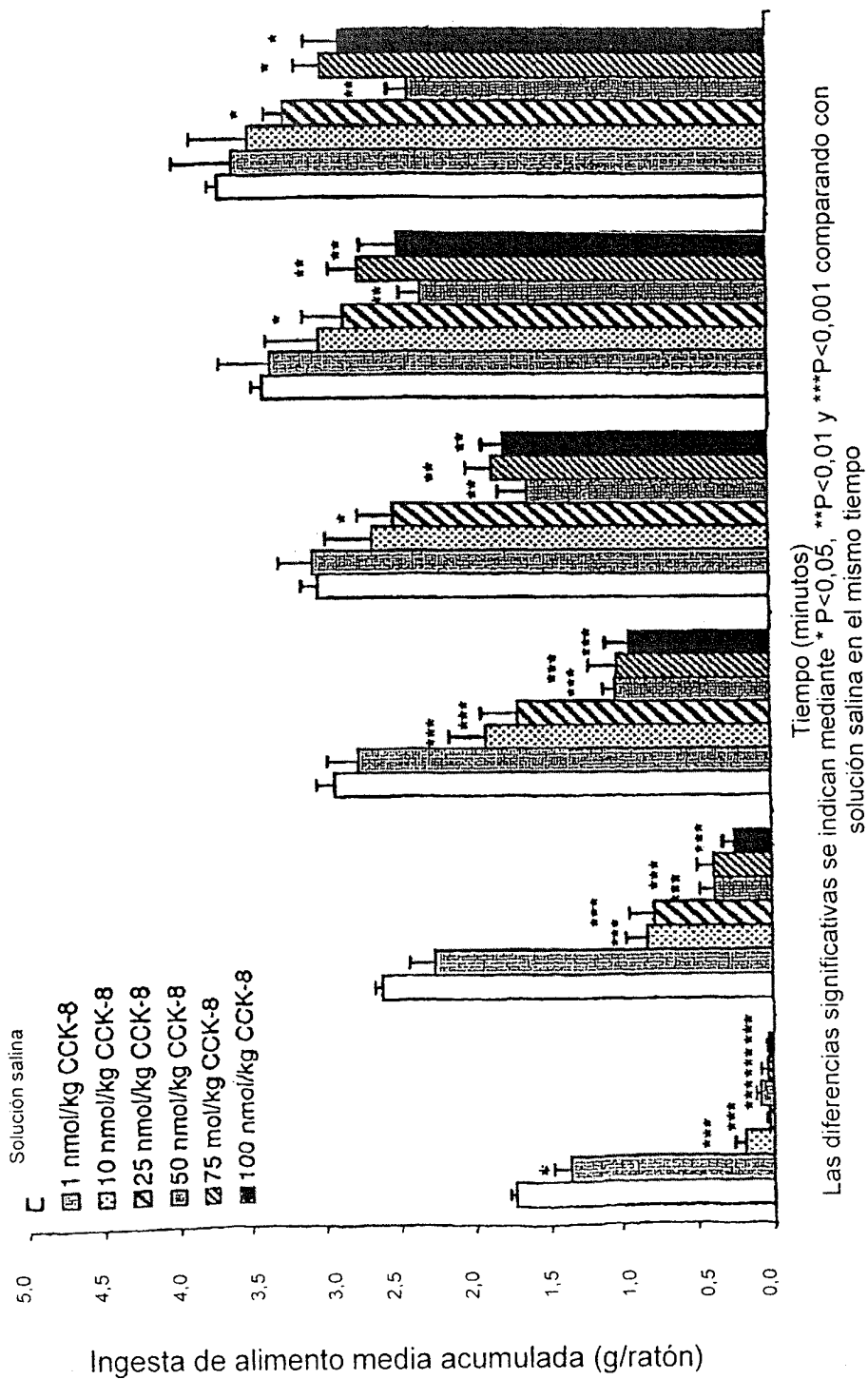
Las diferencias significativas se indican mediante ***P<0,001 comparando con solución salina en el mismo tiempo y ΔP< 0,05, ΔΔP<0,01, ΔΔΔP<0,001 comparando con CCK-8 natural

Fig. 4 Efectos de diferentes análogos de CCK-8 sobre la ingesta de alimento en ratones diabéticos obesos (ob/ob)



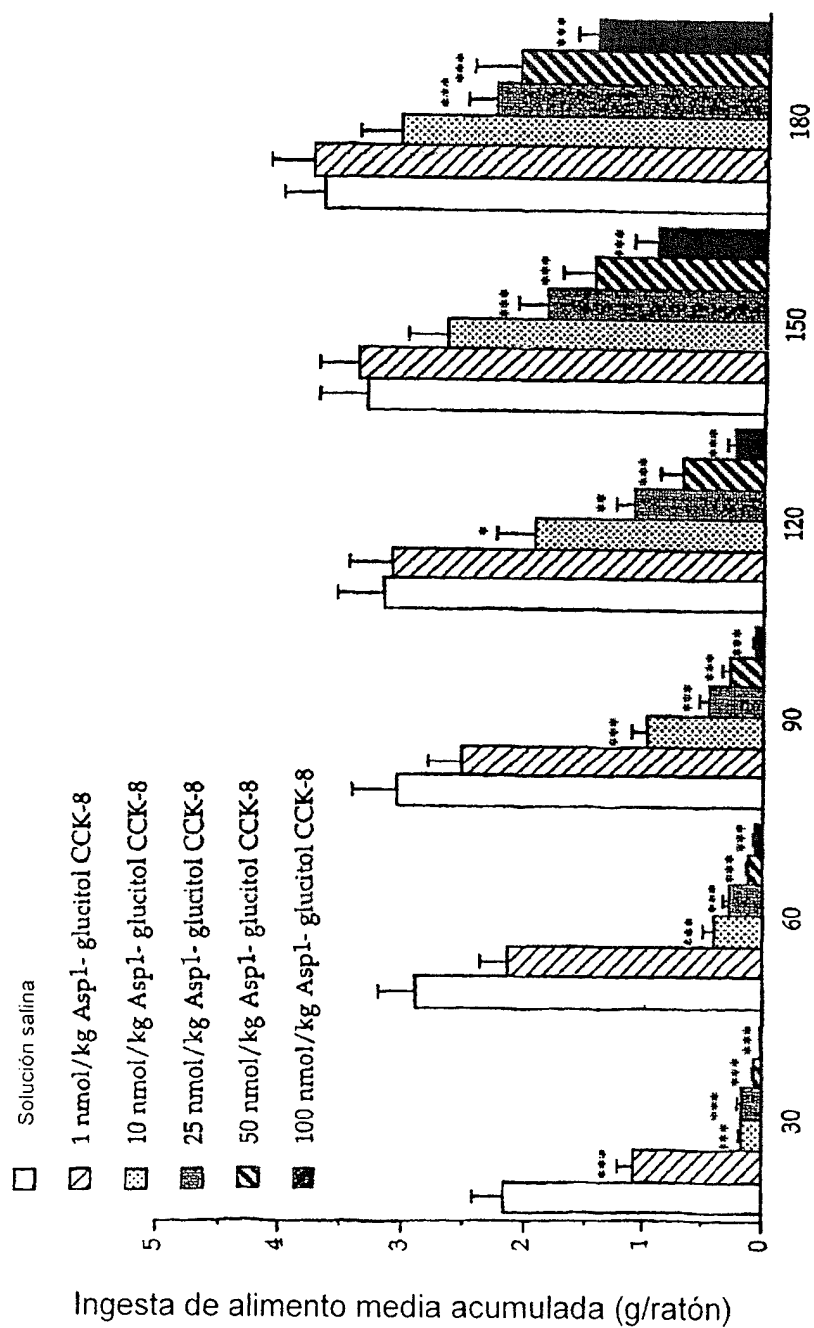
Tiempo (minutos)
 Las diferencias significativas se indican mediante * P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 comparando con solución salina y ΔP< 0,05, ΔΔP<0,01, ΔΔΔP<0,001 comparando con CCK-8 natural en el mismo tiempo

Fig. 5 Efectos de diferentes dosis de CCK-8 sobre la ingesta de alimento



Las diferencias significativas se indican mediante * P<0,05, **P<0,01 y ***P<0,001 comparando con solución salina en el mismo tiempo

Fig. 6 Efectos de diferentes dosis de Asp¹-glucitol CCK-8 sobre la ingesta de alimento



Las diferencias significativas se indican mediante * P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 comparando con solución salina en el mismo tiempo

Fig. 7 Efectos de diferentes dosis de pGlu-Gln CCK-8 sobre la ingesta de alimento

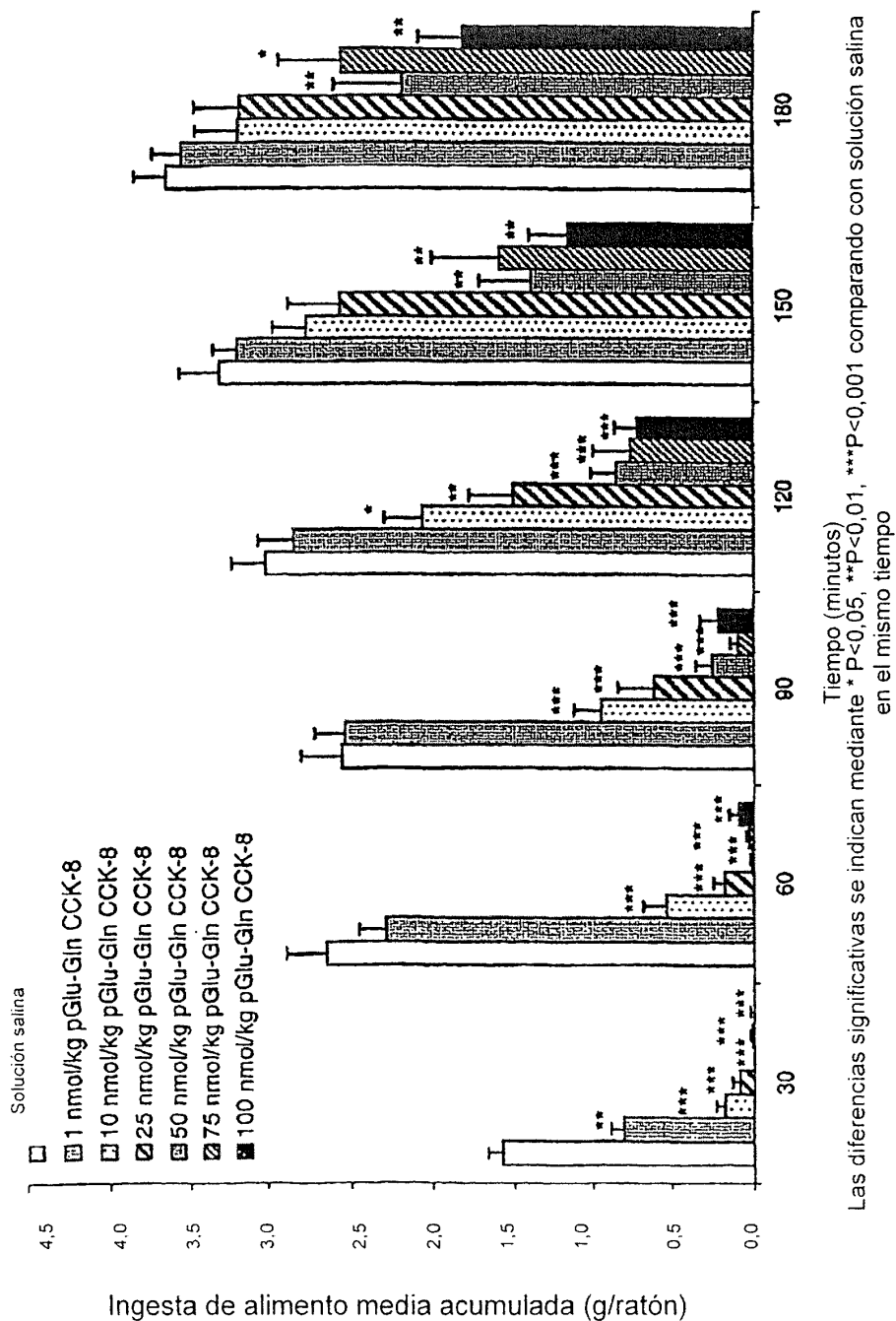


Fig. 8 Efectos de leptina y CCK-8 sobre la ingesta de alimento

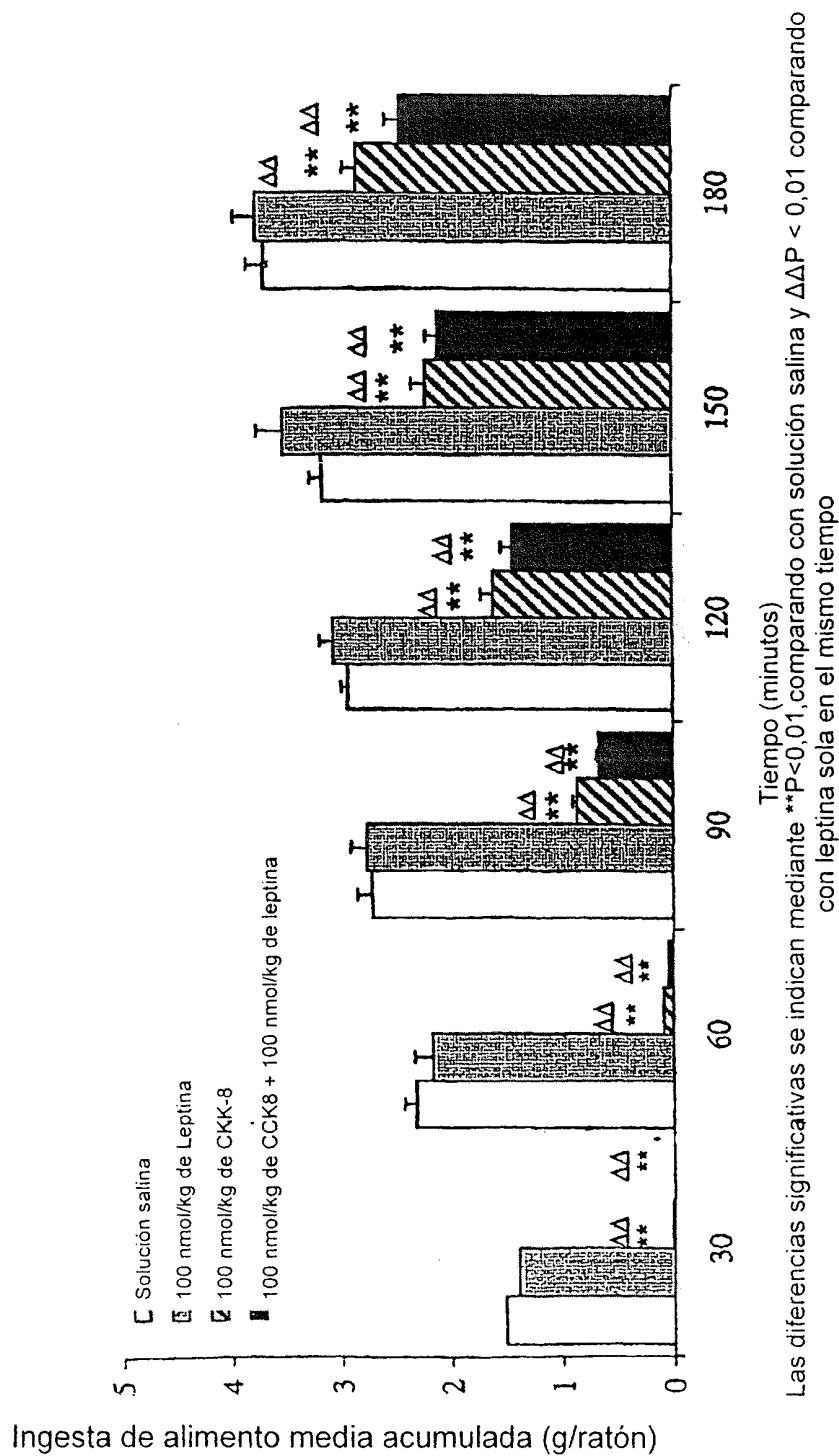
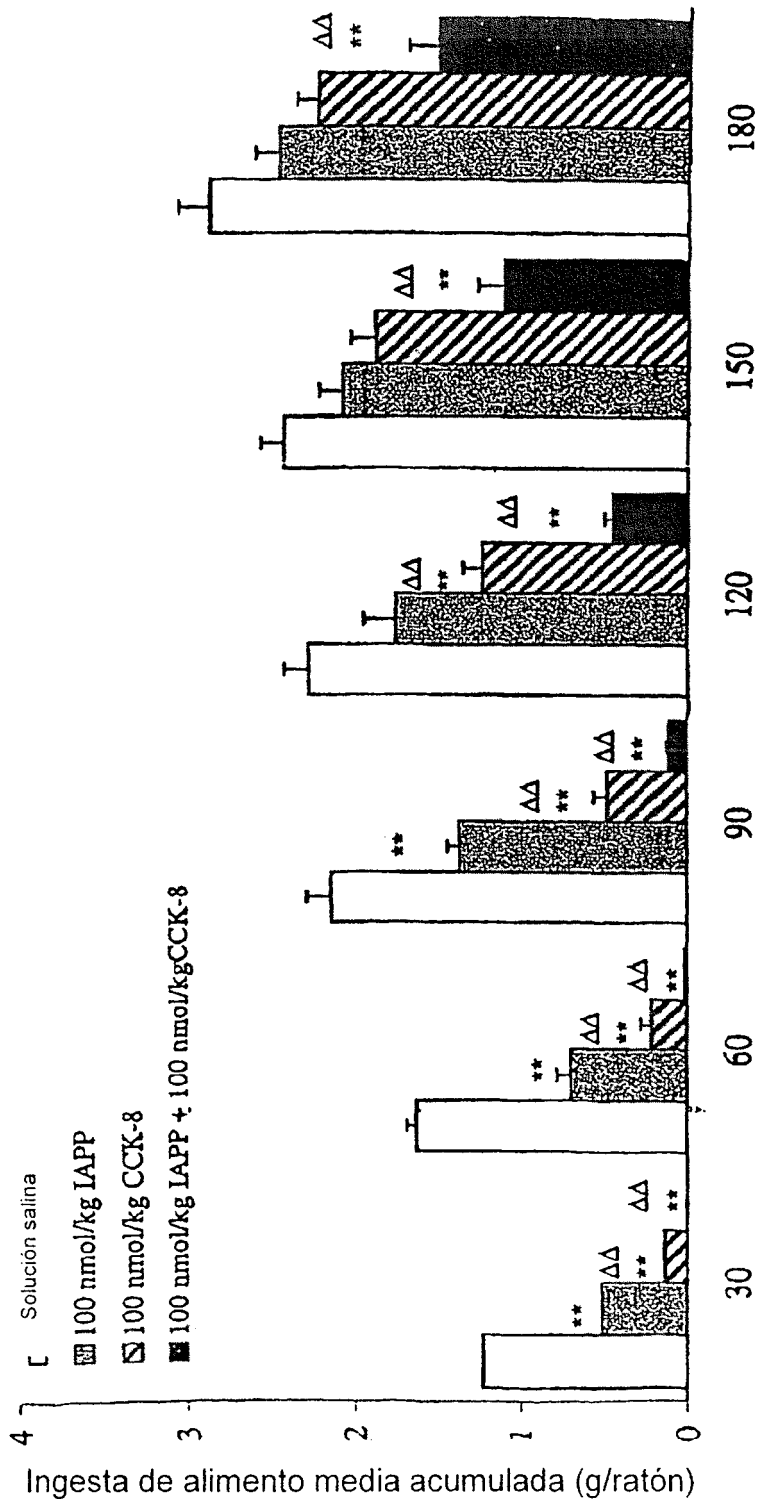
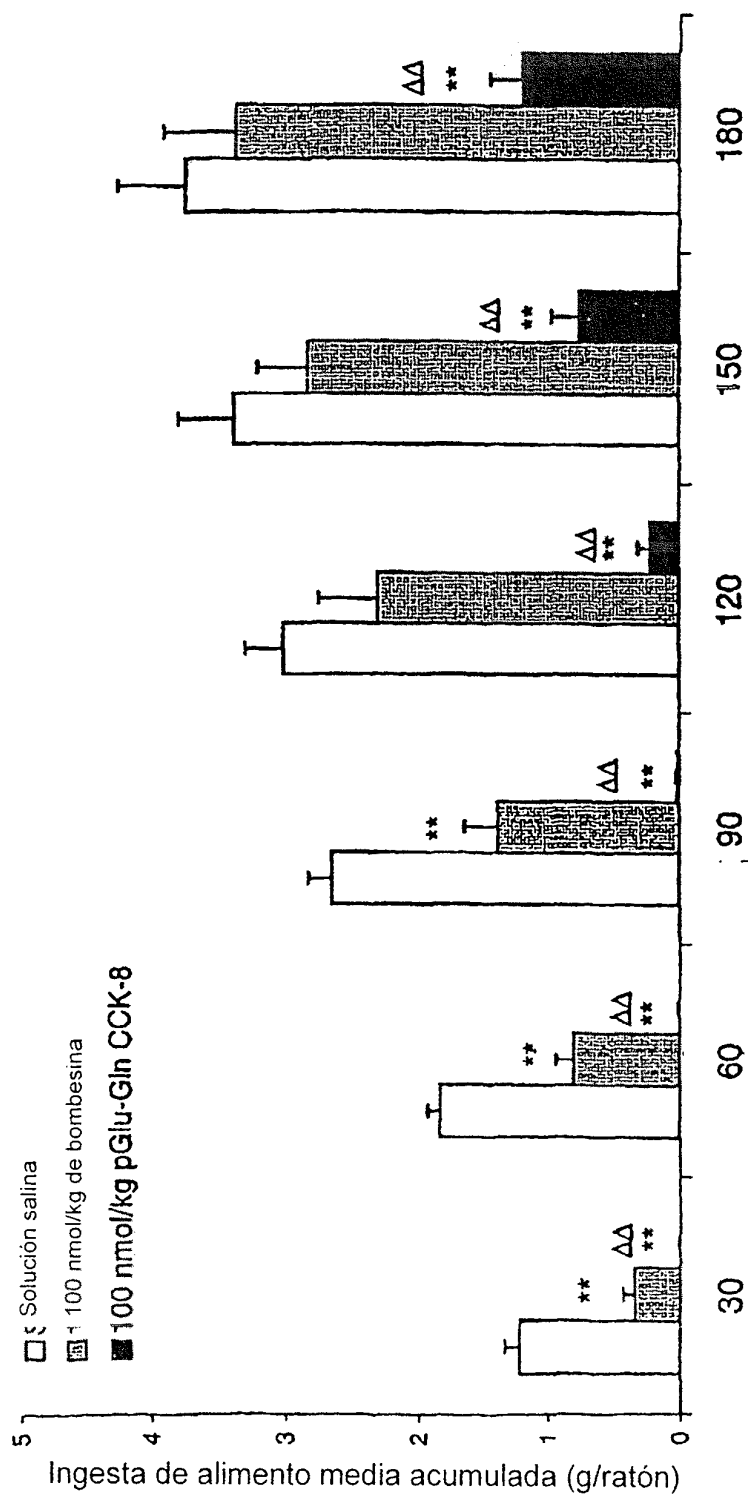


Fig. 9 Efectos de IAPP y CCK-8 sobre la ingesta de alimento



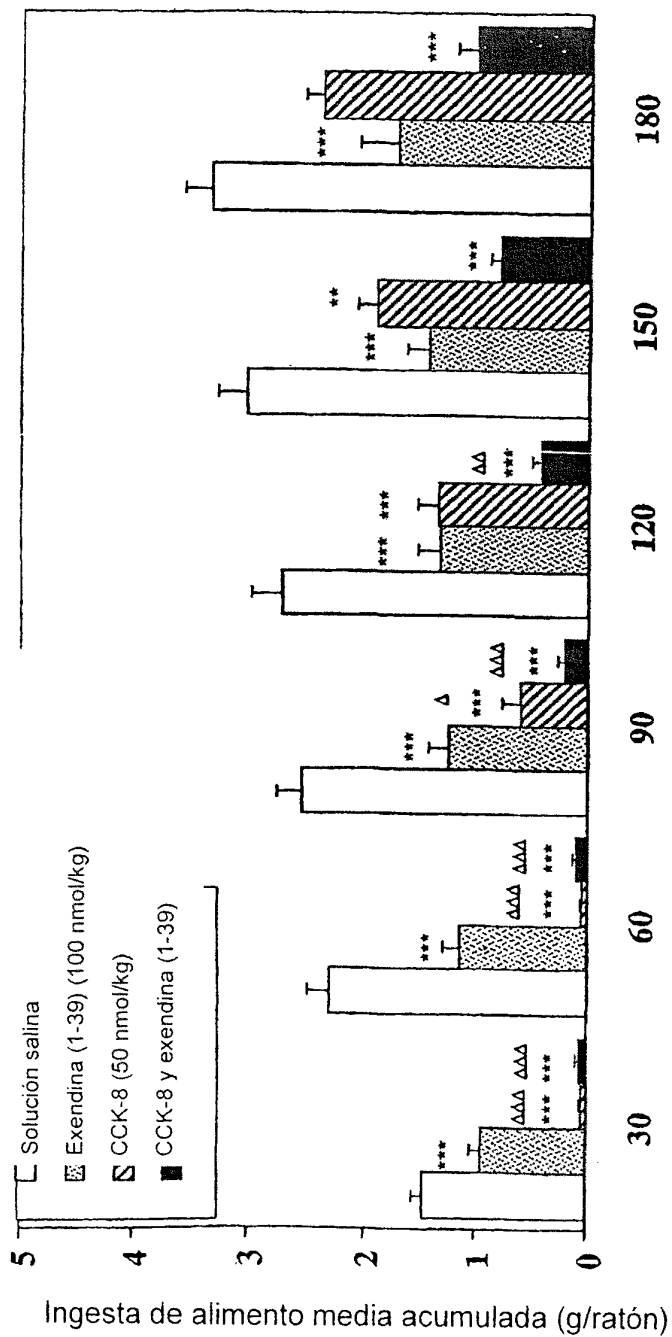
Las diferencias significativas se indican mediante **P<0,01, comparando con solución salina y ΔΔP<0,01 comparando con IAPP sola en el mismo tiempo

Fig. 10 Efectos de bombesina y pGlu-Gln CCK-8 sobre la ingesta de alimento



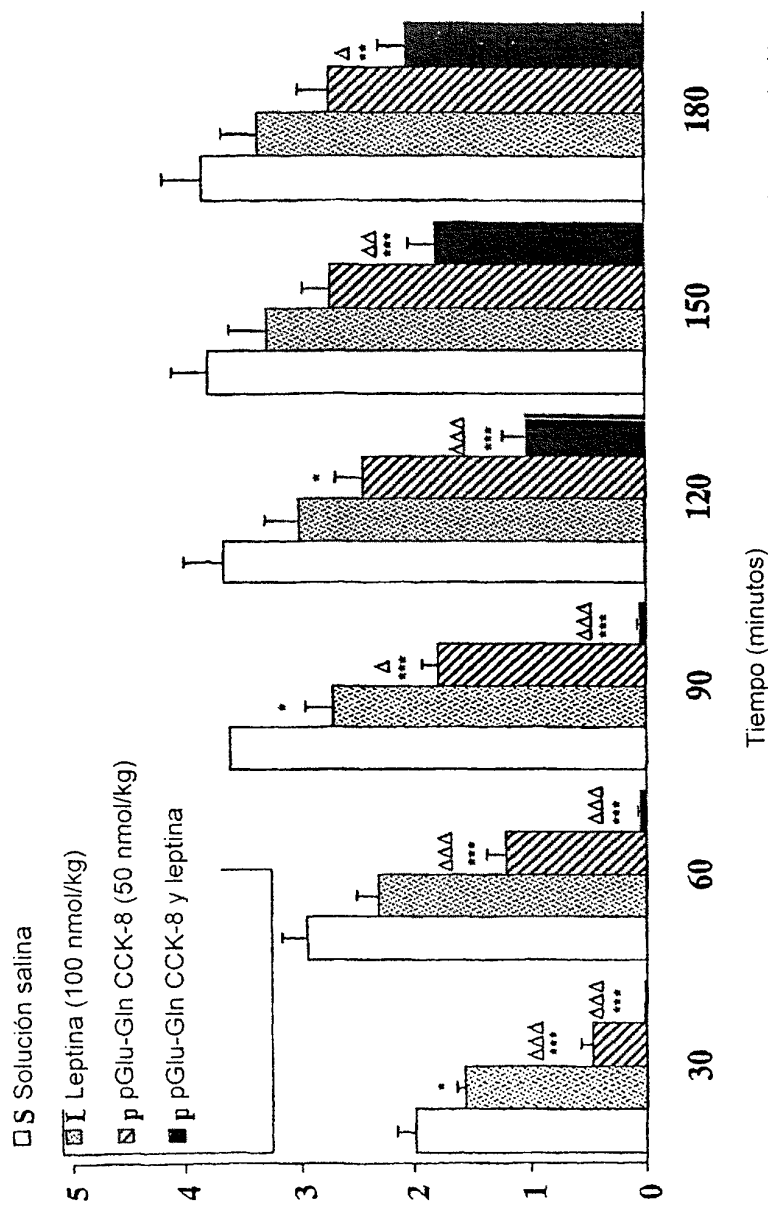
Las diferencias significativas se indican mediante **P<0,01 comparando con solución salina y ΔΔP<0,01 comparando con bombesina en el mismo tiempo

Fig. 11 Efectos de exendina (1-39) y CCK-8 sobre la ingesta de alimento



Las diferencias significativas se indican mediante **P<0,01 y ***P<0,001 comparando con solución salina y ΔP< 0,05, ΔΔP<0,01 y ΔΔΔP<0,001 comparando con exendina (1-39)

Fig. 12 Efectos de leptina (120 µg/kg) y pGlu-Gln sobre la ingesta de alimento



Las diferencias significativas se indican mediante *P<0,05, **P<0,01 y ***P<0,001 comparando con solución salina y ΔP< 0,05, ΔΔP<0,01 y ΔΔΔP<0,001 comparando con leptina en el mismo tiempo

Ingesta de alimento media acumulada (g/ratón)

ES 2 271 218 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Universidad del Úlster
<120> Péptido modificado
<130> P25558A
- 10 <140> PCT/GB02/00827
<141> 28/02/2002
- 15 <150> GB0105069.9
<151> 01/03/2001
- <160> 2
- <170> PatentIn versión 3.1
- 20 <210> 1
<211> 8
<212> PRT
- 25 <213> *Homo sapiens*
- <220>
<221> MOD_RES
- 30 <222> (2)..(2)
<223> SULFATACIÓN
- <220>
- 35 <221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> AMIDACIÓN
- 40 <400> 1
- 45 Asp Tyr Met Gly Trp Met Asp Phe
1 5
- <210> 2
<211> 8
<212> PRT
- 50 <213> Secuencia artificial
- <220>
- 55 <223> Análogo de péptido humano CCK8 - SEC. ID. N.º: 1
- <220>
- 60 <221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> AMIDACIÓN
- 65 <220>
<221> MOD_RES
<212> (2)..(2)

ES 2 271 218 T3

<213> SULFATACIÓN

<220>

5 <221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS

<222> (3)..(3)

<223> Thr 3 puede ser ácido 2-aminohexanoico

10 <220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

15 <223> Thr 3 puede ser Norleucina (NLE)

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS

20 <212> (6)..(6)

<213> Phe 6 puede ser ácido 2-aminohexanoico

<220>

25 <221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Phe 6 puede ser Norleucina (NLE)

30 <220>

<221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS

<222> (8)..(8)

35 <223> Phe 8 puede ser N-metil-Phe

<400> 2

40 Asp Tyr Thr Gly Trp Phe Asp Phe
1 5

45

50

55

60

65